

• 论 著 •

二甲基亚砷促进乙型肝炎病毒对 HepG2 细胞的吸附作用

任玲龙¹, 郭永建^{2△}, 罗玉兰²

(1. 厦门市海沧医院检验科, 福建厦门 361026; 2. 厦门市海沧区妇幼保健院妇保科, 福建厦门 361026)

摘要:目的 初步探讨乙型肝炎病毒(HBV)感染经二甲基亚砷(DMSO)处理的 HepG2 细胞的早期吸附过程, 为 HBV 体外感染机制的研究提供细胞学依据。方法 将 HepG2 细胞分为 DMSO 处理组和对照组, 分别以含有 1.5% DMSO 和不含 DMSO 的 DMEM 培养液培养 4 d, 观察 HepG2 细胞形态的变化。另将 ECV304 细胞设为阴性对照组以 DMSO 处理, 3 组细胞培养 24 h 后分别以 HBV 阳性血清孵育 2 h, 收集胰酶消化液及 HepG2、ECV304 细胞, 采用聚合酶链式反应(PCR)分别检测各组的 HBV DNA; 同时设立空白对照组, 采用间接免疫荧光法(IIF)检测乙型肝炎表面抗原(HBsAg)在 HepG2 细胞上的定位。结果 DMSO 处理组的 HepG2 细胞体积明显增大; DMSO 处理组和对照组 HepG2 细胞内和胰酶消化液中均可检出 HBV DNA, 但 DMSO 处理组表达较强; IIF 检测结果显示, DMSO 处理组的 HepG2 细胞膜和细胞质的绿色荧光信号明显增强, 而阴性对照组的 HBV DNA 及 IIF 检测均为阴性。结论 DMSO 能在一定程度上促进 HBsAg 的吸附, 从而有助于感染早期过程的实现。

关键词:乙型肝炎病毒; 二甲基亚砷; HepG2 细胞; 吸附

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.23.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)23-3444-03

The effect of Dimethyl sulfoxide on facilitating the absorption of hepatitis B virus in HepG2 cells

Ren Linglong¹, Guo Yongjian^{2△}, Luo Yulan²

(1. Department of Clinical Laboratory, Haicang Hospital of Xiamen City, Xiamen, Fujian 361026, China; 2. Department of Women Health Care, Maternal and Child Health Care Hospital of Haicang District, Xiamen, Fujian 361026, China)

Abstract: **Objective** To preliminarily explore the early process of hepatitis B virus(HBV) infection in HepG2 cells induced by dimethyl sulfoxide(DMSO), and provide cytological bases for mechanism study of HBV infection in vitro. **Methods** HepG cells were divided into the DMSO inducing group and control group, and were cultured 4 days by DMEM containing 1.5% DMSO and normal DMEM respectively; changes of cellular morphology were observed. In addition, selected ECV304 cells as the negative control group and treated with DMSO. Cells in the three groups were incubated 2 hours with HBV positive serum after culturing 24 hours, then trypsin digestive solution, HepG2 cells and ECV304 cells were collected and polymerase chain reaction(PCR) was used for the determination of HBV DNA. Simultaneously, the blank control group was set, and the position of HBsAg on HepG2 cells were detected by using indirect immunofluorescence. **Results** HepG2 cell volume in the DMSO inducing group was obviously increased. HBV DNA was found in HepG2 cells both in DMSO inducing group and control group, and DMSO inducing group expressed much stronger. The results of IIF shown that green fluorescent signals of cell membrane and cytoplasm of HepG2 cells in the DMSO inducing group were increased obviously, while the results of HBV DNA and IIF both were negative in the negative control group. **Conclusion** DMSO could facilitate adsorption of HBsAg in some extent, which are benefit for completing the process of early infection.

Key words: hepatitis B virus; dimethyl sulfoxide; HepG2 cells; adsorption

国内外有关乙型肝炎病毒(HBV)感染 HepG2 细胞模型的建立及 HBV 相关受体的研究已经有很多报道, 但关于其相互作用分子机制的研究几乎没有突破性进展, 尤其是 HBV 与宿主细胞的相互作用机制仍不清楚^[1]。既往研究表明 HBV 颗粒与 HepG2 细胞作用的模式存在两种假说: (1) 共受体模式; (2) 蛋白酶与细胞受体共存。但是, 还没有直接证据表明导致 HBV 自然感染过程的是哪种模式^[2]。HBV 自然感染 HepG2 细胞未能成功建立细胞模型的原因, 可能与 HBV 吸附穿入 HepG2 细胞的某个环节受阻有关, 特别是 HepG2 细胞是否能够自然吸附结合 HBV 颗粒后进入胞内。因此, 本研究主要初步探讨二甲基亚砷(DMSO)在 HBV 感染 HepG2 细胞早期吸附过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞及 HBV 阳性血清来源

HepG2 细胞和 ECV304 细

胞由福建医科大学分子研究中心提供; HBV 阳性血清由福建医科大学附属协和医院检验科提供, 经过荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测 HBV DNA 载量为 5.21×10^8 copies/mL。

1.2 仪器与试剂 DMEM 高糖型培养基(美国 GIBCO 公司)、新鲜胎牛血清(杭州四季青生物公司)、免疫荧光抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)、6 孔培养板(美国 Corning 公司)、倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 方法

1.3.1 HepG2 细胞分组和吸附实验 将在 6 孔板中生长良好的 HepG2 细胞分成两组, 其中 DMSO 处理组用 DMEM 混合培养液(含终浓度 1.5% 的 DMSO)培养, 对照组仅用常规的 DMEM 混合培养液培养, 每隔 24 h 换液 1 次, 4 d 后观察 DMSO 处理前后 HepG2 细胞形态的变化。同样, 将 HepG2 细胞分为 DMSO 处理组和对照组, 另外将 ECV304 细胞设为阴性

对照组并加入 DMSO 处理,在 37 ℃ 条件下培养 24 h 后,各组均接种 HBV 阳性血清(稀释至 1.0×10^8 copies/mL),置于 37 ℃、5% CO_2 温箱孵育,每隔 30 min 轻轻水平晃动培养板数次,确保病毒与细胞充分接触,共孵育 2 h。两组均用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)小心充分洗涤 3 次以除去未吸附的 HBV,再加入 0.1%胰蛋白酶溶液(pH 2.2)0.5 mL,室温作用 5 min 以洗脱吸附的病毒,收集胰酶溶液以备后续检测;再用预冷的 PBS 小心晃洗 3 次后,加入 0.5 mL 培养液,充分吹打成细胞悬液后收集,用于后续病毒 DNA 检测。以上操作参考文献[3],并加以改进。

1.3.2 DNA 提取

1.3.2.1 吸附实验胰酶消化液中 HBV DNA 的提取 采用辛酸钠法抽提,在 EP 管中加入 120 mmol/L 辛酸钠水溶液 20 μL ,然后加入待检液 40 μL ,充分混匀,100 ℃ 水浴裂解 15 min,13 500 r/min 离心 15 min,留取上清液待用。

1.3.2.2 HBV 吸附实验细胞 DNA 的提取 采用蛋白酶 K-酚/氯仿法提取,具体步骤如下:将收集的细胞悬液 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清;细胞沉淀用 1 mL $1 \times \text{PBS}$ 洗涤 1 次,离心后加 250 μL $1 \times \text{PBS}$ 重悬,加入等体积细胞裂解液[50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)、100 mmol/L 氯化钠(NaCl)、1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)]和 1 g/L 十二烷基硫酸钠(SDS)混匀,加 10 μL 蛋白酶 K(10 g/L)37 ℃ 水浴保温过夜;加等量的 Tris 平衡酚振荡混匀后 12 000 r/min,离心 10 min;取上清加等量氯仿/异戊醇(24 : 1)颠倒混匀后,12 000 r/min 离心 10 min,重复抽提 1 次;小心吸取上清液于另一新 EP 管中,加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠(pH 5.2)和 2 倍体积的无水乙醇,−20 ℃ 沉淀过夜;12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加 1 mL 70%乙醇,振荡洗涤后,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,晾干后用 30 μL 三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(TE,pH 8.0)缓冲液溶解,保存于−20 ℃。

1.3.2.3 PCR 检测 HBV DNA 通过 PCR 方法对胰酶消化液、HepG2 细胞各组分提取的 HBV DNA 进行检测。从 GeneBank 中找到 HBV DNA 基因序列,采用 Prime5.0 软件设计引物,再用 Olig6.0 校对,最后用 Blast 软件进行同源性分析,引物序列见表 1,送上海生物工程公司合成。共 35 个循环,72 ℃ 延伸 5 min 后,取 4 μL 扩增产物加 1 μL 上样缓冲液混合后于 1.7%琼脂糖凝胶,100 V 恒压电泳 25 min,同时选用 DNA 标记物鉴定 DNA 扩增片断大小,于成像仪观测结果并摄像。

表 1 HBV DNA 引物设计

引物名称	引物序列	产物大小(bp)
上游	5'-CTG TGC CTT GGG TGG CTT TA-3'	191
下游	5'-CTG AGT GCC GTA TGG TGA-3'	

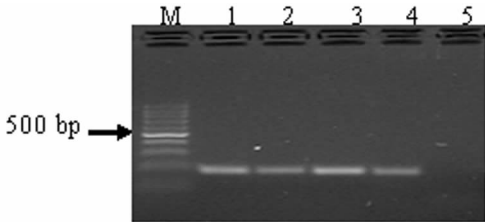
1.3.2.4 间接免疫荧光法(IIF)检测乙型肝炎表面抗原(HBsAg) 为进一步证实实验结果,在 HBV 吸附实验中,应用 IIF 分别检测 HepG2 细胞中 HBsAg 的分布情况,同时设立空白对照组,仅用 DMEM 培养液培养的 HepG2 细胞,未经 DMSO 和 HBV 阳性血清处理。细胞爬片具体步骤见参考文献[4],并稍加改动。

2 结 果

2.1 两组 HepG2 细胞培养的形态 DMSO 处理组和对照组的 HepG2 细胞经过 4 d 的培养后,倒置相差显微镜观察显示:

DMSO 处理组的 HepG2 细胞部分胞体明显增大饱满,表明 DMSO 能促进 HepG2 细胞体积的增大。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 HBV DNA 检测结果 收集两组 HepG2 细胞及其胰酶消化溶液,经 PCR 扩增为 191 bp 产物,DMSO 处理组中 HepG2 细胞强度比对照组强,而胰酶消化液中两组基本相似,这与 DMSO 处理组细胞的胞体比对照组大的结果相一致。阴性对照组无扩增产物。见图 2。



1、2:分别是 DMSO 处理组的 HepG2 细胞和胰酶消化液;3、4:分别是对照组的 HepG2 细胞和胰蛋白酶消化液;5:ECV304 细胞;M:DNA 标记物。

图 2 HBV 吸附实验各组的 HBV DNA

2.3 吸附后 HBsAg 的分布 IIF 检测发现 HBV 吸附在 HepG2 细胞膜上可见明显的绿色荧光信号,甚至可见胞浆内微弱的绿色荧光信号。DMSO 处理组较对照组的绿色荧光信号明显增强,而空白对照组的 HepG2 细胞无明显荧光,可以排除非特性的荧光染色。见图 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

目前,有关建立 HBV 感染细胞模型的研究很多,但至今没有理想的 HBV 感染的细胞模型。常用的 HBV 细胞模型主要是人工转染,如 HepG2.2.15 等转基因细胞系,虽然可以实现病毒基因组表达和复制,但是无法用于 HBV 感染过程中生命周期的研究,特别是病毒结合受体、穿入胞膜及内化等早期过程。HBV 感染肝细胞的大体过程包括:(1)吸附细胞膜;(2)穿入细胞;(3)脱衣壳,病毒基因组转入胞核;(4)形成共价闭合环状 DNA(cccDNA),病毒基因组转录;(5)核衣壳蛋、膜蛋白合成,病毒 RNA 逆转录;(6)子代病毒装配;(7)成熟病毒颗粒释放^[5]。本研究主要初步探讨 DMSO 在 HBV 感染 HepG2 细胞早期吸附过程中的作用,选择人肝胚胎瘤系 HepG2 细胞作为 HBV 吸附的靶细胞,HBV DNA 高拷贝(每毫升 10^8 数量级)的阳性血清作为感染源。

有研究证明,DMSO 能增强 HBV 对 HepG2 转染人钠离子/牛磺胆酸共转运蛋白(hNTCP)受体的 C4 细胞的感染,约增加 30%~40%产 HbcAg 感染细胞,并且细胞对 HBV 的易感性与 DMSO 预处理的浓度和时间存在依赖性^[6]。DMSO 具有渗透性冷冻保护剂的作用,实验室常用其冻存细胞,细胞膜的通透性可能改变,但只能允许小分子物质通过,像 HBV 颗粒这样的大分子无法通过。既往研究表明,经 DMSO 处理后的 HepG2 细胞,大多停留在 G_0/G_1 期或被阻滞于 M 期,细胞停止分裂,胞体增大^[7]。这就说明了本研究结果中经过 DMSO 处理的 HepG2 细胞体积明显增大的原因,而是否会引起细胞表面受体的相应增多尚需进一步研究。也有研究显示,经 DMSO 处理的 HepG2 细胞其特异性受体的表达提高,增加了 HBV 颗粒的内化作用^[8]。在本研究的吸附实验中,由于 HBV 感染的靶细胞具有嗜性,只结合肝细胞来源的细胞,因此选用非肝源性的 ECV304 细胞作为阴性对照,用 0.1%胰酶液处

理吸附实验中的 HepG2 细胞,收集胰蛋白酶溶液及 HepG2 细胞,通过 PCR 能检测到其中含有 HBV DNA,且 DMSO 处理组的强度更高,这可能是由于经 DMSO 处理后的 HepG2 细胞吸附 HBV 颗粒更容易发生内化进入细胞浆周围,以及胞体增大有更多受体表达导致更多 HBV 颗粒进入胞内。为了进一步证实这一现象,本实验采用 IIF 检测 HBV 颗粒的 HBsAg 定位,结果发现 DMSO 处理组部分 HepG2 细胞膜和胞浆内绿色荧光信号明显强于对照组,而空白对照组 HepG2 细胞几乎没有荧光染色,排除非特异性荧光染色的可能,结果表明 DMSO 能够促进 HBV 颗粒吸附到 HepG2 细胞且部分细胞随后即发生内化。因此,DMSO 处理后可以允许大量的 HBV 颗粒进入胞内,这为核心颗粒进入核内提供了前提条件,提供了感染成功的可能性。国内有研究表明,DMSO 可促进核心蛋白进入核内进而携带 HBV DNA 进入细胞核,从而完成病毒感染的过程,这进一步表明 DMSO 确实有可能实现 HBV 对 HepG2 细胞株的感染^[3]。但是,HBV 是如何与 HepG2 细胞发生作用的尚不明确,这需要进一步研究 HBV 吸附所依赖的受体结构和功能。近年来有研究发现,钠离子/牛磺胆酸共转运蛋白(NTCP)是 HBV 感染肝细胞的特异性受体,通过 HBV 的 preS1 区 N 端酰化而附着于受体上,因此,HepG2 细胞表面存在 HBV 特异性结合的位点,并通过受体-配体模式相互作用^[6,9]。

关于 HBV 细胞受体的研究已有数十年,至今仍存在争议。目前主要有两种推测:(1)与 HBV 表面膜蛋白结合的细胞受体不止一种,很可能是几种蛋白的复合体(即受体和辅助受体组成),这一复合体组成功能性的 HBV 受体,与 HBV 表面膜蛋白呈多结构及多步骤的对应关系,而辅助受体决定了 HBV 组织细胞特异性,类似于人类免疫缺陷病毒(HIV)感染模式;(2)有些包膜病毒须先经过蛋白酶水解后,暴露出疏水性融合区,才能与细胞受体融合,进入靶细胞。本实验结果支持“受体-配体结合模式”,这可能是由于 HBV 感染靶细胞涉及不同病毒蛋白和多种细胞成分,是多步骤的复杂过程;另外,HBV 基因组的开放读码框相互重叠,使其表达的膜蛋白功能放大,这可能是导致至今对 HBV 的细胞受体及其具体作用机制的研究没有实质性进展的主要原因。

综上所述,本研究表明 DMSO 在一定程度上促进 HBV 颗粒的吸附、内化,但是 DMSO 能否促进核心颗粒进入核内,以及成功构建 HepG2 细胞复制性感染模型,均有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences[J]. N Engl J Med, 2004, 350(11): 1118-1129.
- [2] 任玲龙, 郭永建. HBV 感染宿主细胞的早期过程[J]. 国际病毒学杂志, 2006, 13(5): 143-147.
- [3] 潘孝本, 韩进超, 魏来, 等. DMSO 促进 HepG2 细胞感染乙型肝炎病毒后核心蛋白入核[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(29): 3079-3084.
- [4] 吴雄文, 梁智辉. 实用免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 276.
- [5] 骆抗先. 乙型肝炎基础与临床[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 74-88.
- [6] Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, et al. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells over-expressing a membrane transporter NTCP[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 443(3): 808-813.
- [7] Choresca CH, Koo OJ, Hong SG, et al. Effect of dimethyl sulfoxide on cell cycle synchronization of goldfish caudal fin derived fibroblasts cells[J]. Reprod Domest Anim, 2010, 45(5): 73-77.
- [8] Paran N, Geiger B, Shaul Y. HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment[J]. Embo J, 2001, 20(16): 4443-4453.
- [9] Yan H, Peng B, He W, et al. Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse Sodium taurocholate co-transporting polypeptide[J]. J Virol, 2013, 87(14): 7977-7991.

(收稿日期: 2015-07-14)



(上接第 3443 页)

参考文献

- [1] 马洪刚, 梁凌云, 孙静. 血清降钙素原和 C 反应蛋白在小儿感染性肺炎诊断中的应用[J]. 中国中西医结合儿科学, 2013, 5(6): 537-538.
- [2] 王伟伟, 刘霞, 马国瑞. 抗生素序贯疗法治疗小儿肺炎支原体肺炎效果观察[J]. 中国综合临床, 2013, 29(6): 657-659.
- [3] 周爱华. 儿童肺炎支原体肺炎 240 例临床分析[J]. 实用预防医学, 2011, 18(6): 1080-1082.
- [4] Rossi PG, Camilloni L, Cogo C, et al. Methods to increase participation in cancer screening programmes[J]. Epidemiol Prev, 2012, 36(Suppl 1): S1-104.
- [5] 马秋玲. 82 例肺炎支原体肺炎患儿血清 C 反应蛋白检测及分析[J]. 山东医药, 2011, 51(23): 80-81.
- [6] 马红萍, 范淑英, 陈功. 全血 C-反应蛋白与白细胞计数联合检测在

小儿肺炎中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(5): 610-612.

- [7] Goodwin JS, Tan AL, Jaramillo E, et al. Prostate-Specific antigen testing in men aged 40-64 years: impact of publication of clinical trials[J]. J Natl Cancer Inst, 2013, 105(10): 743-745.
- [8] 周彦平. 小儿肺炎血清粒细胞集落刺激因子、可溶性白细胞介素受体、C 反应蛋白水平的变化及意义[J]. 实用临床医药杂志, 2014, 18(1): 46-48.
- [9] 董金涛, 梁丽红, 熊静, 等. C 反应蛋白、血沉联合免疫球蛋白检测在小儿支原体肺炎中的作用[J]. 医学理论与实践, 2014, 27(14): 1927-1928.
- [10] 陈凤莲. 肺炎支原体抗体和超敏 C 反应蛋白联合检测对早期诊断小儿支原体肺炎感染的意义[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(32): 3620-3621.

(收稿日期: 2015-08-14)