

原代猪肝细胞 PERV 检测及其意义

郭海涛, 王英杰, 刘鸿凌, 王海慧, 刘俊, 黄艳萍, 王宇明

郭海涛, 王英杰, 刘鸿凌, 刘俊, 黄艳萍, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038
王海慧, 中国人民解放军第三军医大学西南医院内分泌科 重庆市 400038
郭海涛, 男, 1976-03-06 生, 江苏省阜宁人, 汉族. 感染病学硕士, 住院医师, 主要从事生物人工肝细胞材料方面研究.
国家自然科学基金资助项目 No.30027001
项目负责人: 王英杰, 400038, 重庆市沙坪坝高滩岩, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. wangyj103@263.net
电话: 023-68754289
收稿日期: 2003-03-14 接受日期: 2003-03-28

Detection and significance of PERV in primary porcine hepatocytes

Hai-Tao Guo, Ying-Jie Wang, Hong-Ling Liu, Hai-Hui Wang, Jun Liu, Yan-Ping Huang, Yu-Ming Wang

Hai-Tao Guo, Ying-Jie Wang, Hong-Ling Liu, Jun Liu, Yan-Ping Huang, Yu-Ming Wang, Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Hai-Hui Wang, Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by the National Natural Scientific Foundation of China, No. 30027001
Correspondence to: Ying-Jie Wang, Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. wangyj103@263.net
Received: 2003-03-14 Accepted: 2003-03-28

Abstract

AIM: To investigate the significance of laboratory detection for PERV in primary porcine hepatocytes.

METHODS: Porcine hepatocytes was isolated and cultured with a two-stage perfusion method. Polymerase chain reaction (PCR) were used to detect PERV previrus sequences and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assays were used to detect PERV RNA sequences by using specific primers in primary porcine hepatocytes and culture supernate, controlled with no RT-PCR.

RESULTS: All these PCR assays gave positive results in tissue and serum samples from 2 HCV patients, 1 rabbit and 1 rat. Observation showed the persistent releasing of PERV in the culture supernate in different time points without the stimulation of mitogen by the established method and could last till cell death.

CONCLUSION: The method is rapid, cheap and safe, and it will be helpful to the further study of PERV infection and biosafety. The releasing of PERVs in the culture model demonstrates the existence of PERV security in the bioartificial liver support system.

Guo HT, Wang YJ, Liu HL, Wang HH, Liu J, Huang YP, Wang YM. Detection and significance of PERV in primary porcine hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(1):101-104

摘要

目的: 探讨猪肝细胞内源性逆转录病毒(PERV)检测方法及其意义。

方法: 采用体外二步灌注法获取猪肝细胞, 使用特异性引物对其前病毒序列进行观察; 以未逆转录 PCR 为对照, 采用 RT-PCR 方法检测原代猪肝细胞 PERV 携带及释放情况, 并用套式 RT-PCR 对扩增产物进行鉴定。

结果: 原代猪肝细胞基因组中可检测到 PERV 前病毒序列, 肝细胞中亦可检测到特异性的 PERV RNA 序列. 在缺乏有丝分裂原刺激的情况下, 猪肝细胞普通培养的不同时段均可检测到病毒释放, 并可持续至细胞死亡。

结论: 中国实验小型猪肝细胞携带 PERV 病毒序列, 猪肝细胞普通培养时可释放该病毒, 其感染性及生物安全性尚需进一步研究。

郭海涛, 王英杰, 刘鸿凌, 王海慧, 刘俊, 黄艳萍, 王宇明. 原代猪肝细胞 PERV 检测及其意义. *世界华人消化杂志* 2004;12(1):101-104
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/101.asp>

0 引言

由于同种细胞来源有限, 且肝癌细胞株具有潜在危险性, 猪器官、组织和细胞逐渐成为异种移植使用较多的生物材料之一. 包括体外生物人工肝、肝细胞移植及肝移植的广义生物人工肝对终末期肝病患者的支持作用已经得到了国内外学者的共识, 其中, 以培养猪肝细胞为基础的生物人工肝成为研究热点之一. 采用猪或转基因猪肝细胞已成为生物人工肝的主要细胞来源, 具有良好的应用前景^[1-7]. 但自报道猪内源性逆转录病毒 (porcine endogenous retrovirus, PERV) 感染体外培养人细胞来^[8-12], 跨种族间感染越来越引起人们的重视. 为检测原代培养猪肝细胞 PERV 携带以及病毒释放情况, 我们选用了 PERV 特异性引物进行 PCR 及 RT-PCR 检测, 为进一步研究 PERV 感染及其安全性研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 健康 1-7 日龄中国实验型小型猪由第三军医大学动物所提供; Collagenase IV, DMSO, 台盼蓝等由 Sigma 公司提供; 离心管为 Nucleon 公司产品; 胎牛血清 (FBS)、DMEM 培养液等购于 Gibco 公司; 参照 PERV RNA gag 区的序列合成 2 对引物, 由上海生工合成, 上游引物序列 P1: 5' -GCGACCCACGCAGTTGCATA-3';

下游引物序列 P2: 5' -CAGTTCCTTGCCAGTGTCTT-3', 目的片段为 662 bp. 套式 PCR 上游引物序列为 P3: 5' -TGATCTAGTGAGAGAGGCAGAC-3'; 下游引物序列 P4: 5' -CGCACACTGGTCCTTGTCG-3', 扩增目的片段为 262 bp. 加样缓冲液购自 FMC 公司(美国), PCR Markers 购自华美生物工程公司; 扩增仪为 iCyclerPCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); Protanase K, DEPC, Taq 酶, 10 × PCR Buffer 和 25 mmol/L MgCl₂ RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司, 10 mmol/L dNTP 购自 Sigma 公司, Trizol 试剂购自 Roche 公司, GET DOC2000 型凝胶成像仪购自 Bio Rad 公司(美国).

1.2 方法 常规消毒后采用改良 Seglen 体外二步胶原酶灌注法分离肝细胞, 双层消毒纱布过滤, 然后 50 g × 3 min 离心 3 次, 获取肝细胞^[13-20]. 从获取猪肝细胞中提取基因组 DNA, 8 mL 消化缓冲液重悬, 50 °C 温育 12-16 h, 等体积酚/氯仿/异戊醇, 1 700 g 离心 10 min, 取上清, 加入 1/2 体积 7.5 mol/L 乙酸铵和 2 体积无水乙醇, 1 700 g 离心 2 min, 700 mL/L 乙醇洗涤制成 PCR 模板. 分别于培养第 1 d、3 d、5 d、7 d、9 d 留取 1 mL 培养上清, 200 g 离心 10 min 以去除脱落细胞, 3 500 g 离心 10 min, 10 000 g 离心 30 min 以去除细胞碎片, 按 Trizol 试剂操作说明提取血清及培养上清总 RNA. 略作改动, 取血清 50 μL, 加入 150 μL Trizol 试剂, 震荡混匀, 静置后加入氯仿 60 μL, 离心后取上清液 50 μL 加入等体积异丙醇, 静置离心去上清并加入 750 mL/L 乙醇 450 μL, 洗涤、离心、干燥、沉淀作逆转录. PCR 扩增 100 μL 反应体系中含 0.5 μmol/L 引物, 200 μmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 μL 模板, 扩增条件: 95 °C, 10 min; 95 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; 共 35 个循环. RT-PCR 扩增按 Promega 公司试剂盒进行, 稍作变动. 提高镁离子浓度为 1.5 mmol/L, 逆转录温度不变, 以未行逆转录 PCR 作对照. 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后于凝胶成像仪上拍照. 参照 DNA Marker, 在 662 bp 处出现特异性扩增核酸带为阳性. 使用套式 PCR 鉴定扩增产物, 取扩增产物 5 μL, 加入内循环引物按上述条件进行再次扩增, 在 262 bp 处出现特异性扩增核酸带为阳性.

2 结果

2.1 在 6 例中国实验香猪肝脏标本中均可检测出 PERV 前病毒序列, 阳性率为 100%, 而在兔、鼠、正常人及 HCV 感染患者肝脏中均未检测出其前病毒序列(图 1). 在中国实验香猪血清标本中均可检测出 PERV RNA 序列, 而在正常人、HBV、HCV 感染患者血清以及其他动物血清中均未检测出其病毒序列(图 2).

2.2 在原代猪肝细胞普通培养的早期, 未检测到 PERV RNA 序列, 在培养 3-5 d 时, 上清中可检测到 262 bp 的扩增产物, 并可持续至细胞死亡(图 3).

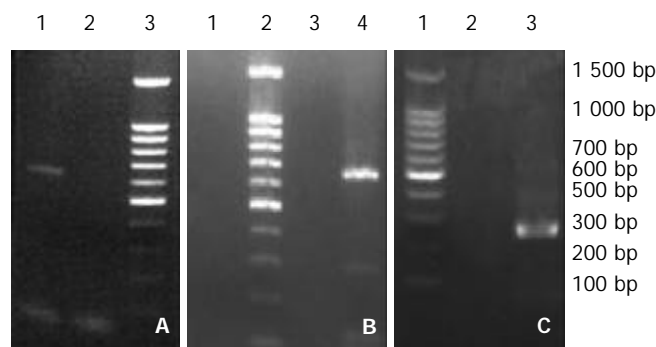


图 1 原代猪肝细胞前病毒 PCR 检测. 图 A: 1: 猪肝细胞; 2: 兔肝细胞; 3: Marker. B: 1: 正常人肝组织; 2: Marker; 3: HCV 阳性肝组织; 4: 猪肝细胞 PCR. C: 1: Marker; 2: 阴性对照; 3: 猪肝细胞.

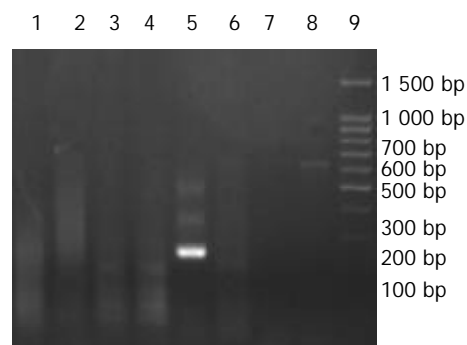


图 2 中国实验小型猪血清 PERV 检测. 1: 正常成人; 2: HBV 阳性; 3: HCV 阳性; 4: 兔; 5: 猪套式 PCR 产物; 6: HCV 阳性; 7: 猪未 RT 的 PCR; 8: 猪 RT-PCR; 9: Marker.

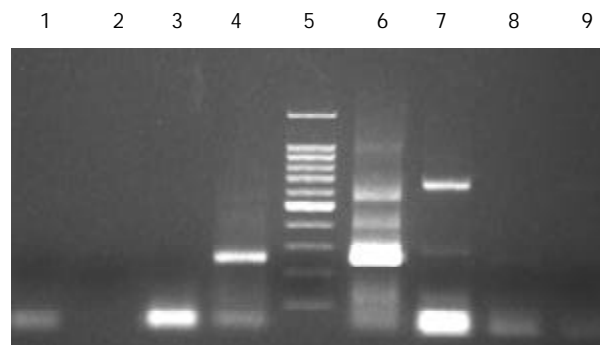


图 3 普通培养上清 PERV 检测. 1: day 1 未 RT 的 PCR; 2: day 1 RT-PCR; 3: day 3 RT-PCR; 4: day 3 套式 PCR; 5: Marker; 6: day 5 RT-PCR; 7: day 7 RT-PCR; 8: day 9 RT-PCR; 9: day 9 未 RT 的 PCR.

3 讨论

近年来的研究显示, 以培养猪肝细胞为生物材料的广义生物人工肝系统可为急性肝衰竭患者提供可靠的过渡支持治疗, 但自报道 PERV 感染体外培养人细胞系^[8], 并建立该病毒感染 SCID 鼠的动物模型以来^[21-22], 当猪的细胞、组织或器官植入处于高度免疫抑制状态(如: 肝衰竭或肝移植)患者体内时, 是否会突破种间屏障而造成感染, 因此, PERV 跨种族间感染及异种移植的生物安全性越来越受到重视^[23-31].

当前, 在对猪源性细胞材料进行病毒安全性评估的诸多研究中, 多采用猪 PK-15 细胞系作为 PERV 来源细胞. 要全面、准确地了解中国实验小型猪 PERV

携带情况, 不仅需要可靠、特异的 PERV 检测方法, 同时还需要对病毒释放情况进行观察. 本研究采用体外两步灌流法获取中国实验小型猪肝细胞, 选用特异性引物, 对原代细胞、血清及培养上清进行了 PERV 检测. 结果发现, 中国实验小型猪原代细胞均携带有 PERV 前病毒序列, 血清及培养上清中亦可检测到该病毒释放, 且培养上清中所检测到的病毒属新产生病毒, 不是血清残留或是脱落细胞所致, 其理由在于: (1) 体外分离获取的猪肝细胞经 3-4 次洗涤留取的最后一次洗液, 经 RT-PCR 检测证实为阴性; (2) 根据 Specke et al 所使用的检测方法, 基本可以排除脱落细胞对实验结果造成的干扰. (3) 对培养第 3 d、5 d、7 d 培养上清的检测均得到相同的结果, 也对此作了佐证. 在培养的初期, 病毒释放量较少; 培养中后期, 病毒释放量比较恒定, 并可持续至细胞死亡. 据此可初步认为, 中国实验小型猪肝细胞能够作为 PERV 来源细胞, 应对其进行生物安全性评估, 此外, 还需对病毒分型、病毒复制的动态定量分析等工作进行深入研究.

免疫抑制剂的使用、病毒重叠感染以及细胞毒疗法等诸多因素均可增加逆转录病毒被动激活的可能性, 虽然在对使用胎猪神经细胞治疗 Parkinson's 病、移植猪胰岛细胞治疗糖尿病以及使用猪肾进行透析治疗患者的实验研究中, 均未发现 PERV 感染的直接证据, 但 Van der Laan et al^[21]将猪的胰岛细胞移植入 SCID 鼠的肾囊下, 使用定量 RT-PCR 方法检测到 PERV 特异性 mRAN 的存在, 证实了 PERV 在体内能感染 SCID 鼠, 再次表明异种移植存在病原安全性问题. 正当猪源性生物材料应用逐渐增多^[32-38], 并取得一定临床疗效之时, 对异源性生物材料的潜在感染性问题应引起足够的重视.

猪肝细胞被公认为是目前生物人工肝较好的细胞材料之一, 由于暂无更好的细胞来源, 猪肝细胞在今后一段时期内仍会继续使用, 故需进一步建立和完善生物人工肝病毒安全性的评估系统. 随着对 PERV 的分子生物学以及免疫学特性研究的不断深入, 对其转录、翻译及感染机制将会更加清楚, 从而逐步完善异种移植安全性的评估体系, 进而推动猪源性生物材料临床应用的广泛开展.

4 参考文献

- Secheser A, Osorio J, Freise C, Osorio RW. Artificial liver support devices for fulminant liver failure. *Clin Liver Dis* 2001;5: 415-430
- 李俊刚, 陈耀凯. 生物人工肝细胞材料研究进展. *世界华人消化杂志* 2002;10:699-701
- Tsiaooussis J, Newsome PN, Nelson LJ, Hayes PC, Plevris JN. Which hepatocyte will it be? Hepatocyte choice for Bioartificial liver support systems. *Liver Transplantation* 2001;7:2-10
- Boudjema K, Bachellier P, Wolf P, Tempe JD, Jaeck D. Auxiliary liver transplantation and bioartificial bridging procedures in treatment of acute liver failure. *World J Surg* 2002;26:264-274
- Eguchi S, Kawazoe Y, Sugiyama N, Kawashita Y, Fujioka H, Furui J, Sato M, Ishii T, Kanematsu T. Effects of recombinant

- human hepatocyte growth factor on the proliferation and function of porcine hepatocytes. *ASAIO J* 2000;46:56-59
- Bain VG, Montero JL, de La Mata M. Bioartificial liver support. *Can J Gastroenterol* 2001;15:313-318
- Chen Z, Ding Y, Zhang H. Morphology, viability and functions of suckling pig hepatocytes cultured in serum-free medium at high density. *Dig Surg* 2002;19:184-191
- Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature Med* 1997;3:282-286
- Weiss RA. Xenografts and retroviruses. *Science* 1999;285:1221-1222
- Birmingham K. FDA subcommittee finds no evidence of PERV transmission. *Nature Med* 1999;5:855
- Tacke SJ, Kurth R, Denner J. Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation? *Virology* 2000;268:87-93
- Akiyoshi DE, Denaro M, Zhu H, Greenstein JL, Banerjee P, Fishman JA. Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J Virology* 1998;72: 4503-4507
- 王英杰, 刘国栋, 刘俊, 李梦东. 大量分离乳猪肝细胞的方法. *世界华人消化杂志* 1999;7:661-662
- 陈钟, 丁义涛, 张鹤云. 无血清培养基培养乳猪肝细胞的效果. *世界华人消化杂志* 2002;10:320-323
- 刘俊, 王英杰, 王宇明, 刘国栋. 分离人肝细胞的超低温保存. *第三军医大学学报* 2001;23:487-488
- Morsiani E, Brogli M, Galavotti D, Bellini T, Ricci D, Pazzi P, Puviani AC. Long-term expression of highly differentiated functions by isolated porcine hepatocytes perfused in a radial-flow bioreactor. *Artificial Organs* 2001;25:740-748
- Chen Z, Ding Y, Zhang H. Cryopreservation of suckling pig hepatocytes. *Annals Clin Laborat Sci* 2001;31: 391-398
- Benoist S, Sarkis R, Chafai N, Barbu V, Honiger J, Lakehal F, Becquemont L, Baudrimont M, Capeau J, Housset C, Nordlinger B. Survival and differentiation of porcine hepatocytes encapsulated by semiautomatic device and allotransplanted in large number without immunosuppression. *J Hepatol* 2001;35:208-216
- 陈钟, 丁义涛, 张鹤云. 乳猪肝细胞的低温保存. *世界华人消化杂志* 2002;10:173-176
- Unger JK, Catapano G, Horn NA, Schroers A, Gerlach JC, Rossaint R. Comparative analysis of metabolism of medium- and plasma perfused primary pig hepatocytes cultured around a 3-D membrane network. *Int J Artif Organs* 2000;23: 104-110
- Van der Laan LJ, Lockey C, Griffeth BC, Frasier FS, Wilson CA, Onions DE, Hering BJ, Long Z, Otto E, Torbett BE, Salomon DR. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 2000;407: 90-94
- Deng YM, Tuch BE, Rawlinson WD. Transmission of porcine endogenous retroviruses in severe combined immunodeficient mice xenotransplanted with fetal porcine pancreatic cells. *Transplantation* 2000;70:1010-1016
- Switzer WM, Shanmugan V, Chapman L, Heneine W. Polymerase chain reaction assays for the diagnosis of infection with the porcine endogenous retrovirus and the detection of pig cells in human and nonhuman recipients of pig xenografts. *Transplantation* 1999;68:183-188
- Blusch JH, Pjatiencie C, Matin U. Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2002;9:242-251
- Tucker A, Belcher C, Moloo B, Bell J, Mazzulli T, Humar A, Hughes A, McArdle P, Talbot A. The production of transgenic pigs for potential use in clinical xenotransplantation: microbiological evaluation. *Xenotransplantation* 2002;9:191-202
- Kuddus R, Patzer JF 2nd, Lopez R, Mazariegos GV, Meighen B, Kramer DJ, Rao AS. Clinical and laboratory evaluation of the safety of a bioartificial liver assist device for potential transmission of porcine endogenous retrovirus. *Transplantation* 2002;73:420-429

- 27 Clemenceau B, Jegou D, Martignat L, Sai P. Microchimerism and transmission of porcine endogenous retrovirus from a pig cell line or specific pathogen-free pig islets to mouse tissues and human cells during xenografts in nude mice. *Diabetologia* 2002;45:4-23
- 28 Specke V, Schuurman HJ, Plesker R, Coulbaly C, Ozel M, Langford G, Kurth R, Denner J. Virus safety in xenotransplantation: first exploratory in vivo studies in small laboratory animals and non-human primates. *Transplant Immunol* 2002;9:281-288
- 29 Bartosch B, Weiss RA, Takeuchi Y. PCR-based cloning and immunocytological titration of infectious porcine endogenous retrovirus subgroup A and B. *J General Virol* 2002;83:2231-2240
- 30 Argaw T, Ritzhaupt A, Wilson CA. Development of a real time quantitative PCR assay for detection of porcine endogenous retrovirus. *J Virol Meth* 2002;106:97-106
- 31 王宇明. 重视我国生物人工肝的研究与开发. 中华传染病杂志 2001;12:1-2
- 32 杨继震. 生物人工肝的研究现状. 世界华人消化杂志 1999;7:185-187
- 33 徐小平, 高毅, 杨继震. 人工肝生物材料人肝细胞系 CL-1 的微载体培养. 世界华人消化杂志 1999;7:197-199
- 34 向德栋, 王英杰, 王宇明. 人工肝生物反应器研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:598-600
- 35 陈耀凯, 王宇明. 体外生物人工肝支持系统的疗效. 世界华人消化杂志 2002;10:234-236
- 36 胡还章, 徐小平, 高毅, 杨继震. 生物人工肝治疗猪实验性急性肝衰. 世界华人消化杂志 2001;9:139-143
- 37 薛国柱, 刘冰艳, 高毅, 杨继震, 黄祖汉. 体外培养肝细胞合成微量人清蛋白测定方法. 世界华人消化杂志 2000;8:473-474
- 38 胡还章, 徐小平, 高毅, 杨继震. 猪急性肝衰模型的建立. 世界华人消化杂志 2001;9:144-148

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

国科技论文产出世界第五 医药卫生期刊竞争力强劲

健康报 记者张荔子 2003-12-10 报到: 这是一连串枯燥的数字, 却是大量科研人员辛勤一年的收获. 12月9日, 中国科学技术信息研究所在京发布的2002年度中国科技论文统计结果显示, 我国科技论文产出由2001年全世界第六位上升为第五位, 在世界论文总数中首次超过5%. 论文数据统计取自3种在国际上颇具影响的检索工具: 《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP). 2002年我国科技论文产出比2001年增长19.9%, 达77395篇, 占世界论文总数的5.37%. 排在前四位的国家依次是美国、日本、英国和德国. 我国国际论文被引用数和被引用次数也分别增长31.6%和33.3%, 其中临床医学国内论文数量和被引用次数居各学科第一, 基础医学论文在国内被引用次数排名第四. 临床医学和基础医学论文较以前都显示出更多的国际合作. 分类统计还排列出高等院校、科研机构、医疗机构各类机构论文产出和被引用情况前20位, 其中解放军总医院连续3年获国内科技论文被引用数量全国医疗机构第一名, 第四军医大学西京医院连续3年获国内科技论文数量全国医疗机构第一. 10位国际论文高产作者和高引用作者中有3位是来自上海第二医科大学的沈志祥、陈国强和牛超, 他们因在《血液》发表的论文被广泛引用而分别名列第三、六、九. 共有387种医药卫生类期刊进入今年的影响因子分类排序, 其中影响因子超过1的期刊有12种, 除《世界华人消化杂志》和《世界胃肠病学杂志》外, 其余10种均为“中华牌”期刊. 此外, 刚选出的第二届中国百种杰出学术期刊中, 19种医药卫生类期刊及其主编榜上有名. 纵观2002年中国科技论文各项统计, 可以看到中国科技论文数量 and 影响力水平继续保持上升趋势, 但中国与世界科技强国还有很大差距. 据《国际竞争力度报告》评价, 中国科技竞争力在49个被评价的国家和地区中处于中等偏下的水平. 据SCI统计, 中国论文平均被引用率低于世界平均水平.