

猪肝细胞和培养上清液中猪内源性 逆转录病毒的检测

田鹏鹏¹ 陈 钟^{1,2*} 黄 华² 吴振宇² 沈洪薰² 李根喜¹ 丁义涛³

¹南京大学生命科学学院, 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093;

²南通医学院附属医院普外科, 南通 226001;

³南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科, 南京 210008)

摘要 建立了猪肝细胞及其培养上清液中猪内源性逆转录病毒(PERV)的检测方法, 探讨了其在猪肝细胞生物人工肝应用中的意义。以 PERV gag 基因为靶序列, 选用特定的引物, PCR 检测中国实验用小型猪肝细胞 PERV 前病毒 DNA; RT-PCR 检测猪、犬、大鼠以及 HBV 阳性病人血清和猪肝细胞培养 6 h、24 h 时的上清液 PERV RNA, 同时检测猪肝细胞猪线粒体 DNA(mtDNA)。研究表明: 检测 5 份中国实验用小型猪血清、肝细胞及培养猪肝细胞 24 h 时的上清液 PERV 均为阳性, 而 5 份培养猪肝细胞 6 h 时的上清液、5 份犬血清、5 份大鼠血清和 5 份 HBV 阳性病人血清 PERV 检测结果均为阴性, 猪肝细胞中均可检测到猪 mtDNA。因此, 中国实验用小型猪肝细胞携带 PERV; PERV 可释放到血清中; 猪肝细胞培养 24 h 后该病毒颗粒已释放到培养液中; PCR 和 RT-PCR 方法检测 PERV 具有特异性强、简便的特点。

关键词 猪内源性逆转录病毒; PCR; 生物人工肝; 肝细胞

由于人体器官来源短缺, 猪的器官、组织和细胞将有可能成为较好的异种移植来源。但猪基因组整合的内源性逆转录病毒(porcine endogenous retrovirus, PERV)的释放和对人体细胞的感染危险性是猪器官移植所面临的一大问题^[1]。建立对该病毒灵敏的检测方法有助于对其进行深入的研究。本文报道了应用 PCR 和 RT-PCR 的方法对猪肝细胞及其不同时间的培养上清液和猪、犬、大鼠以及 HBV 阳性病人血清中 PERV 的检测结果。

1 材料与方 法

1.1 实验样本采集

中国实验用小型猪 5 只, 平均体重 4.8 kg; 杂种犬 5 只, 平均体重 8.5 kg; SD 大鼠 5 只, 平均体重 250 g, 雌雄不限, 均购自南通医学院实验动物中心。收集 5 份猪、5 份犬、5 份大鼠和 5 份 HBV 阳性病人血液标本, 离心后取上清液备用; 采用原位胶原酶循环灌注法分离猪肝细胞^[2,3], 取分离的肝细胞于 -20 °C 冻存准备做 DNA 的提取, 同时肝细胞

以 5×10^5 个 /ml 接种到含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养基中培养 24 h, 取培养 6 h、24 h 的培养上清液备用。

1.2 主要试剂和仪器

蛋白酶 K、RNA PCR Kit (AMV) Ver 2.1 和 Marker DL2000 均购自 TaKaRa 公司; 扩增仪为 Gene Amp PCR System 2400(Perkin Elmer); 凝胶成像仪为上海四星生物技术有限公司生产, 型号 SX-100。

1.3 引物

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。针对 PERV gag 基因序列^[4], 上游引物 PRETR1: 5'-CAG TTC CTT GCC CAG TGT CCT CTT-3', 下游引物 PRETR2: 5'-CGG CAA GAG AAG AAT TTG ACT AAG ATC-3', 扩增的目的片段大小为 187 bp。针对猪线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)序

收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-03-23

中国博士后科学基金(No.2003033487)、江苏省卫生厅 2002 年重大项目基金(No.H200215)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0513-5052351, E-mail: zchen9999@sina.com.cn

列，上游引物 PMTF: 5'-TCA CCC ATC ATA GAA GAA CTC CTA CA-3', 下游引物 PMTR: 5'-TTT TAC GGT TAA GGC TGG GTT ATT AAT T-3', 扩增的目的片段大小为 255 bp。

1.4 肝细胞 DNA 的提取

按 1 ml 消化缓冲液: 10^8 个细胞的比例加入消化缓冲液[100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 25 mmol/L EDTA(pH 8.0), 5 g/L SDS, 0.1 mg/ml 蛋白酶 K]。50 °C 保温 18 h, 其间经常振摇。加入等体积酚 / 氯仿 / 异戊醇, 混匀、振摇、离心 (5000 g, 10 min, 室温)。有机相弃去, 向水相加入 1/2 体积 7.5 mol/L 醋酸铵和 2 体积预冷无水乙醇。离心(5000 g, 5 min, 室温)弃上清液。沉淀用 70% 乙醇洗涤 1 次, 空气中晾干, 溶于 TE 中。

1.5 血清和肝细胞培养上清液中 RNA 的提取

按照 TaKaRa 公司的 Catrimox-14™ RNA 提取试剂盒的说明提取 RNA, 乙醇沉淀, 干燥后溶于 DEPC 处理的 dH₂O 中。

1.6 PCR 检测猪肝细胞 PERV 原病毒 DNA 和猪 mtDNA

50 μl 反应体系中, 各 1 μl 引物 PRETR1、PRETR2(各 20 μmol/L), 1 μl 模板, 5 μl PCR 缓冲液, 3 μl MgCl₂ (25 mmol/L), 4 μl dNTPs(各 2.5 mmol/L), 0.25 μl Taq 聚合酶(5 u/μl), 加灭菌蒸馏水至终体积 50 μl。按标准的 PCR 反应条件: 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min 进行 35 个循环。然后 72 °C 延伸 10 min, 于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。同时其他条件不变, 将引物改为 PMTF、

PMTR 各 1 μl, PCR 扩增猪 mtDNA, 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.7 RT-PCR 扩增反应

20 μl 反应体系中, 4 μl MgCl₂, 2 μl PCR 缓冲液, 8.5 μl 无 RNA 酶的 dH₂O, 2 μl dNTPs(各 10 mmol/L), 0.5 μl RNA 酶抑制剂, 1 μl PG2, 1 μl 模板 RNA, 1 μl 逆转录酶(RT)。42 °C 反应 20 min 后, 99 °C 5 min。再向反应体系中加入 6 μl MgCl₂, 64.5 μl 灭菌蒸馏水, 8 μl PCR 缓冲液, 1 μl PG1, 0.5 μl Taq 酶。与 PCR 循环的条件相同进行 PCR 扩增。同时以无 RT 的 PCR 作对照。

1.8 产物鉴定

研究所得 PERV gag 基因序列的 PCR 扩增产物由上海博亚生物技术有限公司进行测序。

2 结果

2.1 PCR 扩增

图 1 显示了猪肝细胞中 PERV gag 基因和 mtDNA PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果。结果表明, 在分离的 5 只中国实验用小型猪肝细胞中均可检测出 PERV 原病毒 DNA 和猪 mtDNA。

2.2 RT-PCR 扩增

图 2 显示了中国实验用小型猪血清标本 PERV RNA RT-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果。图 3 显示了培养猪肝细胞 24 h 的上清液、犬、大鼠和 HBV 阳性病人血清 PERV RNA RT-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果。结果表明, 在 5 只中国实验用

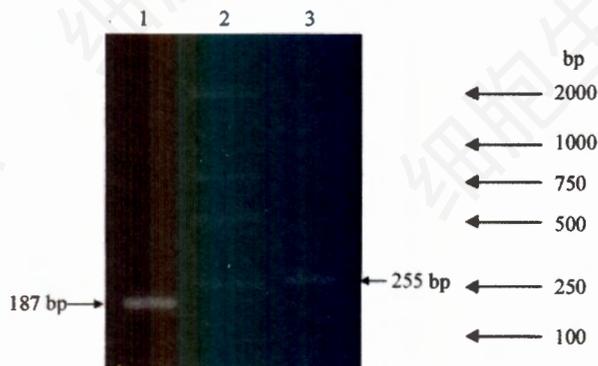


图 1 PERV 原病毒 DNA 和猪 mtDNA PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

1: gag 基因; 2: marker; 3: mtDNA。

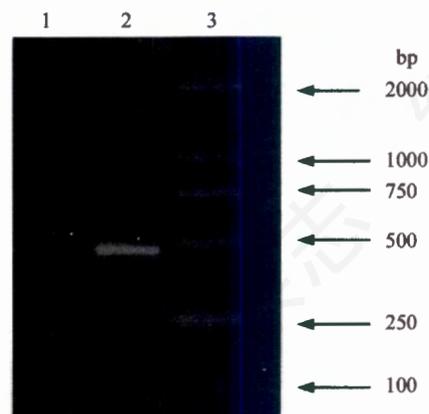


图 2 猪血清 PERV RNA RT-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

1: 猪血清; 2: RNA 阳性对照; 3: marker。

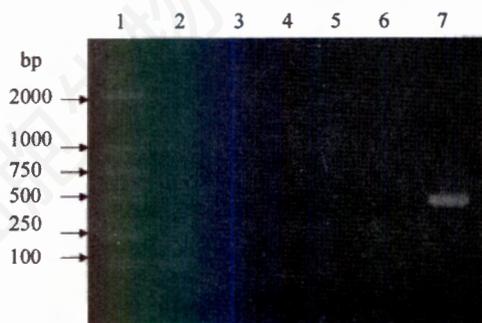


图3 PERV RNA RT-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

1: marker; 2: 培养 24 h 上清液; 3: 培养 24 h 上清液, 无 RT 对照; 4: 鼠血清对照; 5: 犬血清对照; 6: HBV 阳性血清; 7: 阳性 RNA 对照。

小型猪血清标本中和培养猪肝细胞 24 h 的上清液中均可检测出 PERV RNA, 而在猪肝细胞培养 6 h 时的上清液、犬、大鼠和 HBV 阳性病人血清中未检测出 PERV RNA, 无 RT 的 PCR 对照为阴性。

2.3 测序结果

研究所得 PERV gag 基因序列的 PCR 扩增产物测序结果与 PERV gag DNA 序列相同^[4]。

3 讨论

近年来的研究表明, 生物人工肝和肝细胞移植有望成为急性肝衰竭治疗的有效手段^[5]。在肝细胞来源方面, 从理论上讲, 人肝细胞最为理想, 但人体供肝来源缺乏; 动物肝细胞中, 猪肝细胞来源广泛, 功能与人相近, 因此有可能成为异种肝细胞的合适来源^[3]。但猪肝细胞携带的 PERV 可释放出来, 并有可能感染人类, 因此, 猪肝细胞使用的生物安全性引起人们极大的关注。PERV 是单链 RNA 病毒, 几乎存在于所有猪的品系中。体外实验发现猪器官释放的 PERV 可感染一些人的细胞系^[6]。van der Laan 等^[1]报道了在 SCID 小鼠进行胰岛细胞异种移植后有少量的 PERV 感染。这引起人们对种族间 PERV 传播的担心。对使用猪肝细胞进行生物人工肝及肝细胞移植等治疗应进行 PERV 监测, 以

期阐明 PERV 感染的可能性, 推动生物人工肝及肝细胞移植的广泛开展。

PERV 的检测方法包括分子生物学方法和免疫学方法。前者检测 PERV 原病毒 DNA 序列、mRNA 表达或 RT 活性, 后者通过特异性抗体来检测 PERV, 包括 Western 杂交和 ELISA。本研究依据高度保守的 PERV gag 基因序列, 选用特异性引物, 建立了猪肝细胞 PERV 原病毒 DNA 检测的 PCR 方法和猪血清、肝细胞培养上清液 PERV RNA 检测的 RT-PCR 方法^[4,7]。研究结果发现猪肝细胞 PERV 和猪特异性 mtDNA 及猪血清 PERV 检测结果为阳性, 犬、大鼠、HBV 阳性病人血清 PERV 检测结果为阴性, 无 RT 的 PCR 对照为阴性, 表明本研究采用的 PCR 和 RT-PCR 方法具有特异性强、简便的特点。

研究发现 5 只中国实验用小型猪肝细胞和血清中均可检测到 PERV, 提示中国实验用小型猪肝细胞和猪血清存在 PERV。研究还发现肝细胞培养 6 h 时的上清液中 PERV 为阴性, 而培养 24 h 时的上清液中 PERV 为阳性。提示培养 6 h 时猪肝细胞携带的 PERV 可能尚未释放或病毒浓度较低, RT-PCR 方法尚难以检测出来。

通常, 生物人工肝治疗时间为 6 h, 但亦有报告最长治疗时间超过 24 h^[8,9]。因此, 本研究选择培养 6 h、24 h 的猪肝细胞培养上清液进行检测, 研究结果为猪肝细胞生物人工肝临床应用的安全性提供了实验依据。

参考文献 (References)

- [1] van der Laan LJ *et al. Nature*, 2000, **407**: 90
- [2] 陈 钟等. *细胞生物学杂志*, 2003, **25**: 124
- [3] Chen Z *et al. Artif Organs*, 2003, **27**: 613
- [4] Switzer WM *et al. Transplantation*, 1999, **68**: 183
- [5] Watanabe FD *et al. Ann Surg*, 1997, **225**: 484
- [6] Patience C *et al. Nat Med*, 1997, **3**: 282
- [7] Heneine W *et al. Lancet*, 1998, **352**: 695
- [8] Sheil AG *et al. Transplant Proc*, 1999, **31**:3258
- [9] Stefanovich P *et al. J Surg Res*, 1996, **66**: 57

Detection of Porcine Endogenous Retrovirus in Porcine Hepatocytes and the Supernatant of Cultured Porcine Hepatocytes

Peng-Peng Tian¹, Zhong Chen^{1,2*}, Hua Huang², Zhen-Yu Wu², Hong-Xun Shen², Gen-Xi Li¹, Yi-Tao Ding³

(¹State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

²Department of General Surgery, Affiliated Hospital, Nantong Medical College, Nantong 226001, China; ³Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School, Nanjing University, Nanjing 210008, China)

Abstract In this study, we constructed the determination methods of porcine endogenous retrovirus (PERV) in porcine hepatocytes and the supernatant and studied the significance in the application of bioartificial liver based on porcine hepatocytes. Proviral PERV gag sequences in Chinese experimental miniature pig hepatocytes were detected by PCR using specific primers. PERV RNA in the sera from pigs, canines, rats and HBV patients and the supernatant of cultured porcine hepatocytes at 6 h, 24 h was detected by RT-PCR using specific primers. In the same time, porcine mitochondrial DNA (mtDNA) was detected in porcine hepatocytes. The results showed that proviral PERV gag sequences and porcine mtDNA were detectable in porcine hepatocytes from 5 Chinese experimental miniature pigs. PERV RNA was detectable in the porcine serum and the supernatant of cultured porcine hepatocytes at 24 h. Negative results were showed in the supernatant at 6 h and sera from 5 pigs, 5 canines, 5 rats and 5 HBV patients. Therefore, Chinese experimental miniature pig hepatocytes contain PERV and PERV particles can be released into the serum. PERV particles have been released into the supernatant of cultured porcine hepatocytes at 24 h. PCR and RT-PCR methods we used are of high specificity and convenience.

Key words porcine endogenous retrovirus; PCR; bioartificial liver; hepatocyte

Received: February 3, 2004 Accepted: March 23, 2004

This work was supported by the China Post-doctor Scientific Fund (No.2003033487) and the Health Department of Jiangsu Province (No.H200215)

*Corresponding author. Tel: 86-513-5052351, E-mail: zchen9999@sina.com.cn