病毒学杂志 3，1987
Virologica Sinica

人巨细胞病毒在包皮细胞培养中的潜伏性感染

曾凡济*

（武汉大学病毒系，武汉）

摘 要

用具有特异性抑制蛋白质糖基化作用的含氨基葡糖的衣霉素 Tunicamycin（TM）处理人胚包皮细胞（HEF）建立起人巨细胞病毒（HCMV）的潜伏性感染模型。观察了TM对HEF细胞及HCMV的毒性作用，当TM浓度大于500ng/ml时对单层细胞生长有影响；在TM浓度为500ng/ml时，细胞生长虽受一定程度的影响，但仍然逐步生长扩增；不同浓度的TM对HCMV有不同程度的影响，但不能将全部HCMV在短期内完全抑制，在TM含量1000ng/ml的维持液中处理5日的HCMV感染细胞培养物中未检出感染性病毒。感染HCMV的HEF单层细胞保持在含TM500ng/ml的维持液中于37℃培养7日，然后换加不含TM的维持液并改置40.5℃中培养，可保持HCMV以非感染性的病毒状态潜伏于HEF细胞内长达135日；在此潜伏期间如将细胞培养物由40.5℃再移置37℃中培养，HCMV能被激活为可检测到高滴度的感染性病毒。定期取在40.5℃中培养的HCMV潜伏感染细胞培养物进行感染中心测定（Infectious Center Assays），感染中心滴度（Infectous Center Titer）为0.0004%～0.005%，只有很低的病毒重激活率。对潜伏性感染及TM引起疱疹病毒的潜伏性机理结合文献作了简要讨论。

人巨细胞病毒（Cytomegalovirus，简称HCMV）感染宿主细胞，可导致诸如杀细胞感染、潜伏性感染或细胞转化等一些病毒—细胞的相互关系[1,2]。关于HCMV的潜伏性感染及其在肿瘤疾病中的潜伏作用，是近几年来颇受重视的研究领域之一[3-8]。研究这些HCMV—细胞相互关系需要抑制病毒的复制。有几种方法如用非允许细胞[9,10]、缺损病毒颗粒[11]、药物或加热处理等[5,12,13]曾用来抑制病毒复制和防止从感染细胞中释放病毒。已建立起用人白细胞干扰素-α和无环鸟苷（Acyclovir）合并限制感染细胞中的病毒基因组表达的体外实验模型[14]。

衣霉素Tunicamycin(简称TM)具有抑制动物细胞糖蛋白生成所需的N-乙酰葡糖胺酸脂(N-Acetylglucosamine-lipid)中间体合成的作用，为研究有囊膜RNA病毒和有囊膜DNA病毒形成过程中糖蛋白的作用提供有效的和特异的手段[15,20]。在建立起用TM加干扰素处理引起HCMV在人胚肺细胞中潜伏性感染的实验模型的基础上[21]，本文报告

本文1986年7月26日收到

*本文为作者1985年在美国宾夕法尼亚大学医学院药学系进修时研究工作的一部分。感谢该系P.J.Fritz教授的热情支持和鼓励。

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

单独应用 TM 这种病毒复制晚期抑制剂可引起 HCMV 基因组在包皮细胞上长期维持潜伏状态，并可使病毒再度激活的研究结果。

材料和方法

细胞和病毒：取胎儿包皮组织按 Ladda 方法制备成单层细胞培养（简称HEF），培养和维持实验细胞的方法按文献[23]。HCMV 用AD169 株，取细胞感染病毒后出现最大细胞病变的培养物经3次反复冻融后收集，病毒滴度用空斑滴定法检定。

TM对HEF细胞的抑制：每个35mm直径培养瓶中加1ml 4×10^4 HEF 细胞悬液及1ml 两倍标示浓度的 TM 即试验浓度为500ng/ml时，则加 1ml 1000ng/ml TM，使每瓶细胞最终含量为 2×10^4HEF/ml，置37°C培养。每日取两瓶细胞培养物按常法用胰酶消化并作细胞计数；用0.1%台酚兰染色作活细胞计数。

TM对HCMV复制的抑制试验：HEF 致密单层细胞按 0.1pfu/cell（空斑形成单位/细胞）的感染量接HCMV，在37℃吸附 1 小时后加入含不同浓度 TM 的维持液中置37℃培养。感染后定期取细胞培养物用空斑滴定检查感染病毒量。

潜伏性感染试验：HCMV 潜伏性感染实验主要步骤参照文献[21,23]。HEF 致密单层细胞预先用含 TM 500ng/ml 的维持液在37℃中处理 4 小时，然后用 Hanks 液洗涤 3 次；细胞培养物按 0.1pfu/cell 感染量接种 HCMV，在37°C中吸附 1 小时后，加入含500ng/ml TM 的维持液。置 37°C 中培养。每日用上述维持液更换一次；在感染后第 7 日用 Hanks 液洗涤细胞两次，然后加入不含 TM 的维持液，并改置于40.5°C中培养，每日观察细胞状况，每隔3—4日更换维持液。

感染中心滴定（Infectious Center Assays）：参照文献[25,26]，简化步骤为：潜伏性感染细胞用磷酸盐缓冲盐水洗涤两次后按常法用 0.5%胰酶消化，加生长液（Dulbecco培养基加10%胎牛血清、0.03%谷氨酰胺及 25u/ml 青霉素、25μg/ml 链霉素、100μg/ml卡那霉素）使成1×10^5感染细胞/ml的细胞悬液；另取没有感染的正常HEF单层细胞培养按同法消化并稀释成1.5×10^5 细胞/ml 作为指示细胞(Indicator cells)悬液；取此指示细胞悬液2ml 及潜伏性感染细胞悬液1ml于35mm直径的平皿内，在37°C中培养过夜；吸出培养液，加5%甲基纤维素营养液4ml复盖于单层细胞上，置 37°C中培养7—10天，然后吸出甲基纤维素营养液，用 5%福尔马林溶液固定及以 1%结晶紫溶液染色，镜检计数空斑，并按公式计算感染中心滴度(Infectious Center Titer)：

$$感染中心滴度=\frac{感染中心数(\text{No. of infectious centers})}{滴定细胞总数(\text{Total no. of cells assayed})}$$

Tunicamycin为Sigma Chemical Co.产品，含下列异构体成份：A 7%，B 33%，C44%及D15%。

结　　果

1.不同浓度TM对HEF细胞的抑制

HEF 单层细胞培养经不同浓度 TM 处理，每日检查致细胞病变（CPE），如细胞变

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

园、裂解、脱落等，在TM处理后第8天记录结果，当TM浓度大于500ng/ml时对细胞有抑制作用(表1)。

表1 TM对HEF单层细胞培养的病变情况

Table 1 Cytopathological changes of HEF monolayer at TM

	TM conc.ng/ml				
	125	250	500	1000	2000
CPE	—	—	—	++	++++

-- = About 50% of cultures show rapid rounding, lysis or detached. Cytopathological changes were recorded at 8 days postinfection.

取定量HEF细胞径不同浓度TM处理后置37°C中培养，每日计算其活细胞数及观察细胞生长状况，图1结果表明不同浓度TM对HEF细胞有不同程度的抑制作用，当TM浓度低于500ng/ml时，细胞生长虽受一定程度的影响，但仍能逐步生长扩增。

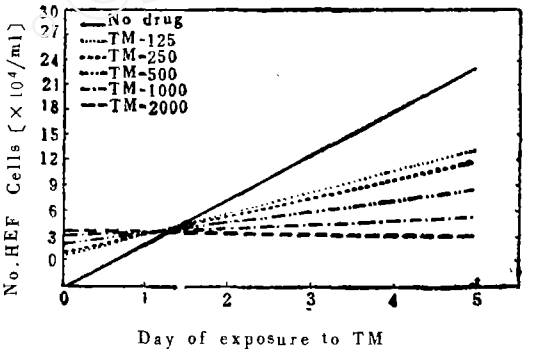

图1.不同浓度TM对HEF细胞的抑制作用
Fig.1 Inhibitory effect of TM on HEF cells

2.TM对感染HEF细胞的HCMV的抑制

用不同浓度TM处理感染HEF细胞的HCMV的结果见图2。在头两天HCMV的滴度很低，不同浓度TM对感染病毒量可引起不同程度减少，但不能将全部HCMV完全抑制。感染后第5天在含TM1000ng/ml处理的细胞培养物中未检出感染性的HCMV。

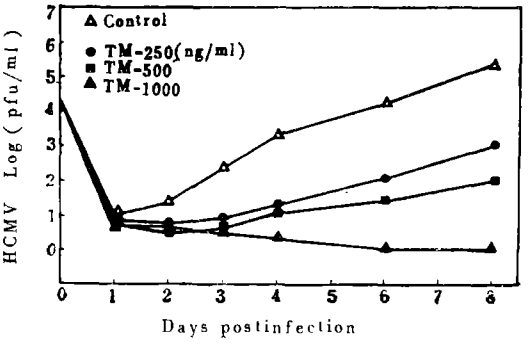

图2.TM对HEF细胞中HCMV复制的抑制作用
Fig.2 Effect of tm on HCMV replic-ation in HEF cells

3.TM引起HCMV在HEF细胞上的潜伏性感染

感染HCMV的HEF单层细胞培养保持在含TM500ng/ml的维持液中，于37℃培养7日，未检查出感染性病毒；在感染后第7日将细胞培养物洗涤两次，换加不含TM的维持液，改置40.5℃中培养，观察长达135日，亦未检出HCMV；在此期间，若将细胞培养物（例如在感染后第30、45日或110日取出正在40.5℃中培养的HEF细胞)重新移置于37℃中培养一段时间，即出现典型的病毒性细胞病变，并检查出高滴度的感染性HCMV(见图3)。结果表明这种对病毒复制晚期有抑制作用的TM，可以引起HCMV在HEF细胞中的潜伏性感

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

染；这种潜伏状态可保持长达135日或更久些。

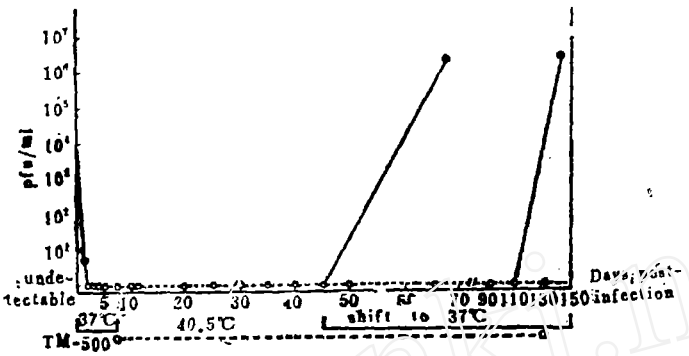

图3. 经500ng/ml TM处理引起HCMV在HEF细胞上的潜伏性感染

Fig 3. HCMV Latency in HEF Cells with TM 500ng/ml (mol=0.1pfu/Cell)

感染HCMV的HEF单层细胞保持在含TM 500ng/ml维持液中于37°C培养7天，然后洗去TM，换加不含TM的维持液并改置40.5°C中培养，观察至135天，均未检出感染性HCMV，细胞正常；在此潜伏期间随时将细胞培养物，例如在感染后第45天或第110天将HEF细胞重又置于37°C中培养一段时间后，即出现细胞病变并可检出感染性HCMV。

4.感染中心测定

定期抽取在40.5°C中培养的处于潜伏感染状态的HEF细胞培养物进行感染中心测定，结果见表2。HCMV潜伏感染的细胞培养物的感染中心滴度为0.0004%～0.005%，只有很低的病毒重激活率(reactivation rate)。本试验在感染后第90日抽查的2瓶细胞培养物中，有一瓶细胞的感染中心测定为阴性。这些结果提示在本实验系统中，感染中心测定对检测细胞培养物内处于潜伏感染状态的HCMV可能不是十分敏感的。

表2.在40.5°C中潜伏性感染细胞内的HCMV感染中心测定结果

Tab.2 Infectious center in HCMV latently infected cells maintained at 40.5°C

Days postinfection	Infectious-center per 10^5 cells	titer* %
30	5	0.005
50	3	0.003
70	0.8	0.0008
90	0.4	0.0004
110	0.5	0.0005
130	0.5	0.0005

* Average from two replicate cultures

讨　论

所有人类疱疹病毒，如人类单纯疱疹病毒、HCMV、水痘一带状疱疹病毒及EB病毒等都能引起持续性感染(Persistent virus infection)。HCMV可引起唾液腺和肾脏上皮细胞或引起泌尿生殖系统的潜伏性感染，亦可持续存在于外周血的B淋巴细胞及嗜中性粒细胞中。HCMV等感染的复发或激发感染对免疫抑制的病人具有严重的甚至是对生

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

命的威胁。各种人类疱疹病毒都各以不同方式引起人类的持续感染。Fenner 等[32]将续持性感染分为三个主要类型：慢病毒感染(Slow virus infection)、潜伏性感染(Latent infection)及慢性感染(Chronic infection)。引起持续性感染的机理虽然已知主要与病毒的整合作用或稳定状态感染、病毒致病力减低、或受感染个体免疫功能存在缺陷、或是与遗传因素有关；在机体抗病毒感染方面的一些重要免疫学因素，如特异性抗体、干扰素、细胞介导免疫、淋巴细胞及巨噬细胞等功能降低亦与之有关，所以对潜伏性感染无论在分子水平、细胞水平或整体水平的发生机理及与病毒致癌关系等都还不大清楚，因而成为迫切需要解决和有待研究的重要课题。

TM是一种特异性抑制蛋白质糖基化作用的含氨基葡糖的抗菌素。具有阻断尿苷-5′-二磷酸-N-乙酰葡糖胺(Uridine5′-diphosphate-N-acetylglucosamine，简称UDP-Glc NAc)到长萜磷酸酯(Dolichyl monophosphate)的N-乙酰葡糖胺-1-磷酸(N—acetylglucosamine-1-phosphate)合成作用。可引起细胞形态学及细胞膜正常特性改变，亦可导致病毒对成纤维细胞的转化[29,30]。本试验模型即利用TM在病毒复制晚期对糖蛋白的抑制作用，以适当浓度的TM处理HEF细胞来建立HCMV的潜伏性感染。实验结果表明，一定浓度的TM对HCMV和HEF细胞都有不同程度的抑制作用；在含TM500ng/ml的维持液中，HEF细胞生长不受影响；HCMV感染HEF细胞经TM短期处理后洗去TM，然后移置40.5°C中培养，可使HCMV较长期地在细胞内保持非感染状态。在潜伏期的任何时间内如将细胞培养物再移入37°C中培养，HCMV又可被激活转为能用常法检测到的感染性病毒。

关于HCMV潜伏性感染过程中的分子水平变化尚待研究。已知机体经急性原发性HCMV感染后，在一定的条件下，病毒呈潜伏状态，不易检出；经数月或数年后当周期性的激活病毒增殖到一定的临界水平时，可再复发急性感染，又能检出感染性病毒。潜伏病毒激活引起复发急性感染给免疫抑制的病人和器官移植的病人造成严重威胁，因而寻找合适的模型来加强研究病毒的潜伏性感染，是十分必要的。近几年来，国外有关潜伏性感染的研究报道日见增多。已证实许多因素与疱疹病毒的激活有关，如化学的和生物的药物作用、物理的光和热作用、细胞免疫功能降低、医源性或病理性免疫抑制导致机体对病毒的易感性增强、机体的精神紧张、情感失调、激素水平改变等等因素有关。

Katz等曾用TM加干扰素处理单纯疱疹病毒(HSV)证明其病毒颗粒及病毒DNA合成只受此抗菌素的部分影响，但病毒糖蛋白多肽的糖基化作用则全被抑制，而病毒颗粒形态与完整的病毒类似。缺乏病毒糖蛋白多肽的碳水化物侧链并不影响病毒粒子的完整，但这些病毒颗粒的感染性却明显降低[31]。TM对HCMV的作用是否与对HSV相类似？TM引起HCMV在HEF细胞上的潜伏和再激活的作用机制、以及在细胞内长期潜伏的后果如何？例如对细胞的转化有什么作用等还不清楚，尚待进一步研究。

已有的实验报道都是并用化学药物和干扰素处理来建立HCMV的潜伏性感染[14,21,23]，本文报告仅单独用TM处理即可建立HCMV的潜伏感染模型，其潜伏期可维持长达135日或更久，为进一步研究HCMV的潜伏性感染机理和致癌潜能等提供一个简便有用的实验系统。

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献

〔1〕 Rapp, F. and D. Robbins, 1984, Birth Defects: Original Article Series, March of Dimes Defects Foundation, 20: 175.
〔2〕 Overall, Jr J.C., 1981, *New Eng.J.Med.*, 305: 95.
〔3〕 Geder, L. et al., 1976, *Science*, 192: 1134.
〔4〕 Demarchi, J.M. et al., 1980, *J.Virol.*, 35: 277.
〔5〕 Gadler, H. and B.wahren, 1983, *Arch.Virol.*, 75: 297.
〔6〕 Mocarski, E.S. and M.F.Stinski, 1979, *J.Virol.*, 31: 761.
〔7〕 Albrecht, T. and F.Rapp, 1973, *Virology*, 55: 53.
〔8〕 Rapp, F. et al.1975, *J.Virol.*, 16: 932.
〔9〕 Fioretti, A. et al., 1973, *J.Virol.*, 11: 998.
〔10〕 Spector, D.H. and Spector, S.A., 1984, *Prog.Med.Virol.*, 29: 45.
〔11〕 Stinski, M.F. et al., 1979, *J.Virol.*, 31: 231.
〔12〕 Gönczöl, E. and L.Váczi., 1973, *J.Gen.Virol.*, 16: 143.
〔13〕 Stinski, M.F. et al., 1982, *J.Gen. Virol.m* 60: 261.
〔14〕 Bucher, L.J. et al., 1983, *Virology*, 130: 269.
〔15〕 Petrie, B.L. et al., 1983, *J.Virol.*, 46: 270.
〔16〕 Gibson, R. et al. 1978, *Cell*, 13: 671.
〔17〕 Garoff, H. and R.T.Schwarz., 1978, *Nature*, 274: 487.
〔18〕 Nakamura, K. and R.W.Compans., 1978, *Virology*, 81: 303.
〔19〕 Witte, O.N. and D.F.Wirth., 1979, *J Virol.*, 29: 735.
〔20〕 Diggelmann, H., 1979, *J.Virol.*, 30: 799.
〔21〕 Zeng, F.J. and F.Rapp, 1985, 美国宾夕法尼亚州立大学医学院专题报告，待发表。
〔22〕 Ladda, R.D., 1978, Proceedings of the XInter.Cong. of Gerontol., International Cong. Series, No.469, pp.85.
〔23〕 Bucher, L.J., et al., 1984, Herpesvirus, (ed.F.Rapp), Alan R.Liss, Inc., Now York, pp.277.
〔24〕 Wentworth, B.B. and L.French., 1970, *Proe. Soc. Exp. Biol.Med.*, 135: 253.
〔25〕 O'Neill, F., 1977, *J.Virol.*, 24: 41.
〔26〕 Colberg-Poley, A.M. et al., 1981, *J.Virol.*, 37: 1051.
〔27〕 Duksin, D. and P.Bornstein., 1977, *J.Biol.Chem.*, 252: 955.
〔28〕 Heifetz, A. et al., 1979, *Biochemistry*, 18: 2186.
〔29〕 Duksin, D. and P.Bornstein., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74: 3433.
〔30〕 Duksin, D. et al., 1978, *Exp. Cell Res.*, 116: 153.
〔31〕 Katz, E. et al., 1980, *Antimicro. Agents and Chemothe.*, 17: 1014.
〔32〕 Fenner, F.et al., 1974, *The Animal Viruses*, New York and London, pp.452.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

病毒学杂志 3，1987
Virologica Sinica

HUMAN CYTOMECALOVIRUS LATENCY IN HUMAN EMBRYONIC FORESKIN CELLS IN VITRO

Zeng Fan-ji

(*Department of Virology, Wuhan University, Wuhan*)

Human cytomegalovirus(HCMV)latency model in human embryonic foreskin cells(HEF)was established with 500ng/ml of Tunicamycin(TM) which is a glucosamine-containing antibiotic that specifically inhibits glycosylation of proteins.

Toxic effects in confluent monolayer cultures occurred when more than 500ng/ml of TM was used.

The different concentrations of TM reduced the yield of HCMV to varying degrees, however, HCMV was not totally inhibited. At 5 days postinfection HCMV was not detectable at a TM concentration of 1000ng/ml.

HEF monolayer cultures were infected with HCMV and maintained for 7 days in maintenance medium containing 500ng/ml of TM。Infectious virus became undetectable and remained undetectable for periods of at least 135 days postinfection after TM treatment and incubation at 40.5°C. The high titers of infectious HCMV could be detected by decreasing the incubation temperature from 40.5°C at any time during the latent period.

To determine the number of latently infected cells maintained at 40.5°C, infectious center assays were carried out. The infectious center titers ranged from 0.0004%—0.005%. The results showed a low reactivation rate.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net