维普资讯 http://www.cqvip.com

第6卷第3期 1991年9月
中国病毒学 VIROLOGICA SINICA
Vol.6 No.3 Sept.1991

# 登革热Ⅱ型病毒受体的初步研究

汪玎妍* 郭辉玉

（广州市中山二路中山医科大学微生物学与免疫学教研室，广州 510089）

## 提 要

本实验用甲基纤维素复盖层的$C_{6}/_{36}$单层细胞微量蚀斑法的间接免疫荧光法，初步观察了登革热Ⅱ型病毒与靶细胞的联接反应情况。同时还制备了四种细胞的可溶性膜制剂，并研究了它们对登革热Ⅱ型病毒的抑制活性。结果提示，对登革热Ⅱ型病毒敏感的细胞表面存在登革热Ⅱ型病毒受体，在触发病毒感染阶段起重要作用。

关键词：登革热Ⅱ型病毒　联接反应分析　可溶性膜制剂　病毒受体

细胞的病毒受体是指由病毒联接蛋白识别并介导其特异地进入细胞，触发感染的细胞膜的特殊分子结构[1,11]。登革热病毒通过蚊媒而侵入人体，于人体内单核细胞及淋巴细胞中增殖，引起登革热、登革出血热、登革休克综合征。为探讨病毒受体触发登革热病毒感染靶细胞的作用。本文选用白纹伊蚊传代细胞（$C_{6}/_{36}$株）、人类传代单核细胞（$U_{937}$株）、人类传代T类淋巴细胞（$H_{9}$株）、人类传代B类淋巴细胞（Raji株）小鼠纤维母细胞（$L_{929}$株）、小鼠骨髓瘤细胞（$SP_{2/0}$株）作为研究对象，进行了初步的研究。

## 材 料 与 方 法

**一、应用$C_{6/36}$单层细胞、甲基纤维素复盖层的微量蚀斑法测定登革热Ⅱ型病毒[2]**

DEN-2病毒标准株（New Guinea Strain）由本教研室提供。

滴定登革热Ⅱ型病毒的方法按本教研室陈佩嘉老师的方法进行（见文献[2]）。

**二、DEN-2病毒与六种传代细胞的联接反应分析[3,12]**

$C_{6/36}$、$H_{9}$、$L_{929}$、$SP_{2/0}$四种细胞由本教研室提供；$U_{937}$、Raji二种细胞由北京中国预防医学科学院病毒所提供。

将所需试验的靶细胞$C_{6/36}$细胞株、$U_{937}$细胞株、$H_{9}$细胞株、Raji细胞株、$SP_{2/0}$细胞株、$L_{929}$细胞株用毛细吸管吹下（$L_{929}$细胞先用0.25%胰蛋白酶消化，使细胞脱离玻璃壁）。置于离心管离心2000r/m 5分钟，计算并调整细胞浓度为$5.0\times10^{5}\sim1.0\times10^{7}$个/ml。按同样浓度将细胞离心一次去除上清，然后加入一定剂量的DEN-2病毒，使细胞重新悬浮于病毒液中。DEN-2病毒预先用含5%小牛血清的Eagle's维持液稀释。病毒与细胞的比例是0.1PFU/cell，置4℃冰浴中

本文于1990年7月10日收到，1991年1月14日修回

*汪玎妍现于广东省老年医学研究所病毒室工作（广州 510080）

维普资讯 http://www.cqvip.com



使细胞与DEN-2病毒吸附不同时间后取出。取出的病毒-细胞悬液立即加入4℃的0.5%水解乳蛋白Hanks液，使之稀释到1∶100，以停止病毒与细胞的联接反应。于各时间收集的样本经2000r/m离心10分钟去除细胞后，吸取上清，立即接种于$C_{6/36}$单层细胞上测定其上清的PFU值，或于上清中加入30%小牛血清后置－28℃冰箱保存，随后作病毒的PFU测定用。

病毒与细胞的联接率（Attachment rate）按下列公式计算，即经吸附一段时间后，被细胞吸附的病毒与原来投入的病毒浓度的比率[3]。

$$联接率=\frac{接种的病毒剂量-吸附后留于上清中的病毒剂量}{接种的病毒剂量^{*}}\times 100\%$$

此公式中"接种的病毒剂量"是指经吸附一段时间后，在无细胞对照管中的病毒滴度。

**三、$C_{6/36}$细胞、$U_{937}$细胞、$SP_{2/0}$细胞、$L_{929}$细胞四种细胞可溶性膜制剂（SCM）对DEN-2病毒感染活性的影响**

1. 可溶性细胞膜制剂的制备方法

用MSE型超声波破碎器破碎细胞。接着用低速离心法去除细胞核及残存细胞。取其上清于SW 55转头的BECK KMANL8-55M/E超速离心机离心45000r/m，60分钟4℃[4,5]。得到的沉淀膜碎片加入0.2%去氧胆酸钠（Sodium Deoxycholate, DOC），于强旋涡搅拌器作用15分钟，使膜碎片溶解，未溶解部分再用超速离心去除。上清液即为可溶性膜制剂。用岛津UV3000型紫外分光光度计于波长287和260nm中测其OD值，求出其蛋白含量[6]。

2. 可溶性细胞膜制剂对DEN-2病毒活性的影响

为了统一对照标准，预先将DEN-2病毒与可溶性膜制剂的蛋白浓度的比例定于$4.0\times10^{6}$PFU/mg。

将四种可溶性细胞膜制剂分别于4℃与DEN-2病毒作用4小时，然后接种$C_{6/36}$细胞单层中测定其PFU值，求出DEN-2病毒感染活性的下降率。

$$DEN\text{-}2病毒感染活性下降率=\frac{对照组DEN\text{-}2VPFU-SCM作用后的DEN\text{-}2PFU}{对照组的DEN\text{-}2VPFU}\times 100\%$$

式中对照组DEN-2 V PFU是指DEN-2 V与0.2% DOC于4℃作用4小时之后的PFU值。以消除DOC对DEN-2病毒活性影响的因素。

**四、DEN-2病毒与$C_{6/36}$、$U_{937}$、$H_9$、Raji、$SP_{2/0}$五种细胞于4℃ 24小时联接后作间接免疫荧光检测**

将各种细胞的浓度调整为$10^{5}$个/ml，分别加入$3.0\times10^{7}$ PFU/ml的DEN-2病毒于4℃中作用24小时。然后取出用PBS洗4次每次5分钟，去除吸附不稳定的DEN-2病毒以及其他非特异性吸附的DEN-2病毒。取细胞涂片作用间接荧光检测。

## 结 果

一、应用甲基纤维素复盖$C_{6/36}$单层细胞微量蚀斑法测定DEN-2病毒结果的重复性

利用此法测定了多批DEN-2病毒，发现其病毒的稀释度与病毒蚀斑数呈很好的直线关系。图1标示其中两批DEN-2病毒的稀释度与病毒蚀斑数均呈较好的直线关系。且在不同时间重复测定同一批DEN-2病毒滴度，其PFU较接近。表1所示的是应用本法每隔四天连续重复测定不同时间制备的三批DEN-2病毒滴度的结果。说明本法具有较好的重复性。

二、DEN-2病毒对6种传代细胞联接反应的比较

维普资讯 http://www.cqvip.com



用一定剂量的 DEN-2 病毒接种各种细胞，于 4℃ 作用不同时间，然后测定在细胞培养上清液中的残余病毒量，以计算 DEN-2 病毒与靶细胞的联接率。结果表明：$C_{6/36}$、$U_{937}$ 和 $H_9$ 三种细胞于 4℃ 与 DEN-2 病毒的联接率均高于 $L_{929}$、$SP_{2/0}$ 和 Raji 三种细胞与 DEN-2 病毒的联接率，其差异有非常显著性意义，$P<0.001$（见表2—3）。

三、$C_{6/36}$、$U_{937}$、$SP_{2/0}$、$L_{929}$ 四种细胞的可溶性膜制剂对 DEN-2 病毒感染活性的影响

本实验制备了四种细胞的可溶性膜制剂（SCM），将之分别加入 DEN-2 病毒于4℃作用 4 小时，然后检测病毒的感染性。结果表明：$C_{6/36}$、$U_{937}$ 细胞的 SCM 均能明显抑制DEN-2 病毒的感染性。而$SP_{2/0}$、$L_{929}$ 两种细胞的 SCM 只呈微弱的抑制作用。表 4 是其中一次实验的结果。

四、应用间接免疫荧光法检测 DEN-2 病毒对 $C_{6/36}$、$U_{937}$、$H_9$、Raji、$SP_{2/0}$五种细胞的联接作用

利用间接免疫荧光法观察 DEN-2 病毒在 4℃ 与细胞相互作用 24 小时后，病毒抗原在细胞的分布，结果发现 90%—100% 的 $C_{6/36}$ 细胞于胞质内或质膜上均有 DEN-2 病毒抗原。同样径 DEN-2 病毒作用 $U_{937}$ 细胞中 DEN-2 病毒阳性细胞也达20%。但 $H_9$ 细胞

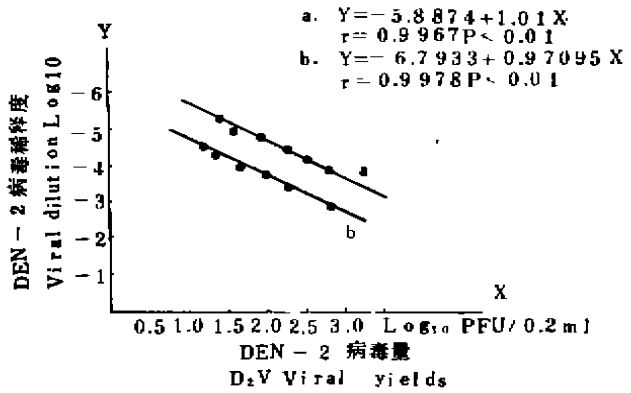


图 1　病毒稀释度与病毒蚀斑形成数量的关系

Fig. 1　The correlation between viral dilutions and viral yields

表1　应用甲基纤维素复盖$C_{6/36}$单层细胞微量蚀斑法测定三批DEN-2病毒的滴度重复性

Table 1. Reproducibility of $D_2V$ titration by microplaque formation on $C_{6/36}$ monolayer cells under methylcellulose overlay

| 检测序次 Test No. | 三批 DEN-2 病毒的滴度 PFU/ml titers of 3 batches of $D_2V$ | | |
|---|---|---|---|
| | 88.6.20 | 88.12.20 | 89.3.20 |
| 1 | $4.5\times10^6$ | $7.5\times10^6$ | $8.2\times10^7$ |
| 2 | $5.0\times10^6$ | $7.0\times10^6$ | $7.6\times10^7$ |
| 3 | $4.8\times10^6$ | $6.5\times1\ ^2$ | $8.0\times10^7$ |
| 4 | $4.3\times10^2$ | $7.0\times10^6$ | $8.2\times10^7$ |
| 5 | $4.0\times10^6$ | $6.8\times10^6$ | $7.5\times10^7$ |

维普资讯 http://www.cqvip.com



的表面比胞质内似出现更多的黄绿色荧光。说明DEN-2病毒在4℃与$C_{6/36}$细胞作用24小时后，一部分病毒已进入细胞。但在同样条件下，$H_9$细胞中虽然有小部分病毒进入胞质，但大部分病毒仍附于细胞质膜上。而DEN-2病毒在4℃与Raji和$SP_{2/0}$细胞作用24小时，无论细胞表面或质膜内，检查DEN-2病毒抗原的结果均阴性（见图版Ⅰ1—8）。

表2 $C_{6/36}$、$U_{936}$、$H_9$、$SP_{2/0}$、$L_{929}$五种细胞与DEN-2病毒于4℃作用30分钟时的联接率比较

Table 2. Comparison of attachment rates of DEN-2 viruses with C6/36, U937, H9, SP2/0 and L929 cells at 4℃ for 30 minutes

| | 细胞种类 cell types | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | (A) C6/36 | (B) U937 | (C) H9 | (D) SP2/0 | (E) L929 |
| DEN-2 viruses with cells attachment rates (%) DEN-2V与细胞的联接率(%) | 85.7 | 7[illegible].6 | 92.7 | 17.1 | 13.8 |
| Comparing the differences between 2 means 两两比较结果 | P(A.B), P(A.D), P(A.E), P(B.C), P(B.D), P(C.D), P(C.E)。 P<0.01, P(A.C), <0.05, P(D.E) >0.05 | | | | |

表3 五种细胞与DEN-2病毒于4℃作用90分钟的联接率比较

Table 3. Comparison of attachment rates of DEN-2 viruses with C6/36 U937, H9, SP2/0 and L929 cells at 4℃ for 90 minutes

| | 细胞种类 cell types | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | (A) C6/36 | (B) U937 | (C) H9 | (D) SP2/0 | (E) L929 |
| DEN-2V—细胞联接率(%) DEN-viruses with cells attachment rates (%) | 93.1 | 83.3 | 95.9 | 16.4 | 17.1 |
| 两两比较结果 Comparing the differences between 2 means | P(A.B), P(A.D), P(B.C), P(B.D), P(B.E), P(C.D), P(C.E)。 P<0.01 P(A.C), P(D.E)。 P<0.05 | | | | |

表4 四种不同细胞株的可溶性细胞膜制剂对$D_2V$感染活性的抑制作用

Table 4. Inhibition of solubilized cellular membrane preparations of different cell lines on DEN-2 virus infectivity

| Experiment groups 实验组 | DEN-2 virus PFU/mg SCM DEN-2病毒PEU/mgSCM | DEN-2 virus infectivity PFU/ml 作用后的DEN-2V PFU | % Reduction in DEN-2V infectivity DEN-2V活性下降率 |
|---|---|---|---|
| C6/36 SCM | $4.8\times10^6$ | $4.5\times10^4$ | 79.0 |
| U937 SCM | $4.2\times10^5$ | $6.1\times10^4$ | 71.0 |
| L929 SCM | $3.8\times10^6$ | $1.9\times10^5$ | 10.0 |
| SP2/0 SCM | $4.8\times10^6$ | $1.8\times10^5$ | 14.3 |
| Control group (no SCM) 对照组 | | $2.1\times10^5$ | 0 |

(Table 4 showed one of the experiments result that SCM preparation with DEN-2 viruses at 4℃ for 4 hours)

表4表示的是DEN-2病毒与可溶性细胞膜制剂（SCM）于4℃作用4小时后的实验结果

维普资讯 http://www.cqvip.com



## 讨　论

采用蚀斑法测定一定剂量的DEN-2病毒在4℃与细胞作用一段时间后，在上清液中残留的病毒感染性，作为分析病毒与细胞受体联接反应的指标。实验结果表明：$C_{6/36}$、$H_9$、$U_{937}$三种细胞对DEN-2病毒的联接率较高，而SP2/0、$L_{929}$、Raji三种细胞与DEN-2病毒的联接率则明显较低，统计学上组间差异有非常显著性意义。(Raji细胞与DEN-2病毒的联接反应的实验次数相对较少，只作三次，故未作显著性分析)。此外本实验还通过测定DEN-2病毒在上述6种细胞培养中的生长曲线以及用间接免疫荧光法测其DEN-2病毒于各种细胞中的抗原表达情况(详细结果未列入)，发现上述六种细胞与DEN-2病毒在4℃的联接率高低基本上与细胞对DEN-2病毒敏感程度呈平行关系。即$C_{6/36}$、$U_{937}$对DEN-2病毒敏感性较高，细胞对DEN-2病毒的联接率亦高。SP2/0、$L_{929}$、Raji三种细胞对DEN-2病毒不敏感，细胞对DEN-2病毒的联接率亦低。$H_9$对DEN-2病毒的敏感性虽然较低，但细胞对DEN-2病毒亦有较高的联接率。同时本实验还测定了四种细胞的可溶性膜制剂(SCM)对DEN-2病毒感染活性的影响。结果表明：$C_{6/36}$、$U_{937}$两种细胞的SCM均能抑制DEN-2病毒的感染活性。而$L_{929}$、$SP_{2/0}$两种细胞的SCM对DEN-2病毒的抑制活性则很微弱(见表4)。因此，我们推测$C_{6/36}$细胞的质膜可能存在有DEN-2病毒的特异性受体。DEN-2病毒的吸附蛋白(VAP)与病毒受体相互作用而触发感染。据文献报道，人类单核细胞表面的Fc受体与$C_3$受体与DEN-2病毒感染的抗体依赖增强作用或补体依赖增强作用有十分密切的关系[7,8]。但抗体不存在时，DEN-2病毒是否通过与质膜上的真正病毒受体结合而以某种方式进入宿主细胞，则尚未弄清楚。本研究提示$U_{937}$细胞表面亦可能有DEN-2病毒受体。其存在对DEN-2病毒进入该细胞可能有密切关系。另一方面，$U_{937}$细胞是来源于人组织细胞瘤的传代单核细胞，仍有低度的吞噬作用[9]。因此，DEN-2病毒对$U_{937}$细胞较高的联接率，是否也和该细胞对病毒的吞噬作用有关，有待进一步研究。而可溶性膜制剂对DEN-2病毒抑制活性的结果则进一步提示，$C_{6/36}$、$U_{937}$的SCM可能含有能够和DEV-2病毒结合因而降低病毒感染活性的特殊分子结构，与DEN-2病毒受体可能有密切关系。$H_9$细胞是一株来源于人血癌细胞的传代$T_4$淋巴细胞[11]，其较高的病毒与细胞的联接率与细胞对病毒较低的敏感性似乎并不相平行，其原因有待进一步研究。

本实验还利用了间接免疫荧光法，分析了DEN-2病毒与靶细胞联接反应情况。其结果亦支持上述结论。

综观上述，本研究提示对DEN-2病毒敏感的细胞表面存在DEN-2病毒受体，在触发病毒感染阶段起重要作用。但尚需进一步确定其特异性受体的性质特征以及它们在登革热病毒感染中的作用。

## 参 考 文 献

〔1〕 Crowell RL.,1987, *ASM News*, 53(8)：422—425。

〔2〕 陈佩嘉，1988，临床和实验病毒学杂志，2(2：)26—27。

维普资讯 http://www.cqvip.com



〔3〕 Crowell R.,1983, *Method Enzymology*, 96 : 443.
〔4〕 David LK et al., 1982, *Virology*, 118 : 148—156.
〔5〕 Conti Cet et al., 1988, *Arch Viral*, 99 : 261—269.
〔6〕 北京大学生物系生物化学教研室。1987，生物化学实验指导第95页。
〔7〕 Hastead SB., 1977, J *Exp Med*, 156 : 201—217.
〔8〕 Hastead SB., 1977, *Exp Bio Pro Sco Exp Biol Med*, 151 : 136.
〔9〕 Christ S., 1876, *Int J Cancer*, 17 : 575—577.
〔10〕 Povic *M* et al., 1984, *Lancet*, II : 1472—73.
〔11〕 Thomas L., 1988, *TIPS*, 9 : 247.
〔12〕 Lonberg-Holm K 1981 An Introduction virus receptors and recognition, Series B 8 : 3—17, Edited by Lonberg-Holm K & Philpson L Chapman and Hall London.

# Preliminary Studies on Cellular Receptor for Dengue-2 Virus

Wang Ding-yan Guo Hui-yu

(*Department of Microbiology, Sun Yatsen University of Medical Sciences, Guangzhou*, 510089)

To investigate the role of viral receptor in the initiation of dengue virus infection, viral attachment rates (AR) on *Aedes albopictus* cell (C6/36), human monocyte-like cell (U937), human T4 (H9),B lymphoblastoid cell(Raji), mouse myeloma cell (SP2/0) and mouse fibroblast cell (L929) were calculated by measuring the residual virus concentration after inoculating a known dose of Den-2 virus upon the above 6 cell lines and then keeping the cells at 4℃ for 15, 30 and 90 min. The results showed that the ARs of Den-2 on C6/36, H9 and U937 were much higher than the ARs of Den-2 on L929, SP2/0 and Raji cells, the difference being highly significant ($P<0.001$). Solubilized cellular membrane preparations (SCM) were prepared by ultrasonic disintegration followed by ultracentrifugation and sodium deoxycholate treatment of C6/36, U937, L929 and Raji cells. Definite inhibitory actions upon Den-2 infectivity were shown in the SCM from C6/36 and U937 cells after their interaction with Den-2 at 4℃ for 4 hour, suggesting the SCM contained specific molecular complex closely related with Den-2 receptor and capable of blocking the infectivity of Den-2 virus. Only very weak inhibition of Den-2 infectivity could be found in the SCMs from L929 and SP2/0 cells. The above findings suggest the existence on the surface of susceptible cells Den-2 virus receptors which might play a crucial role in the initial step of virus infection.

**Key words:** Dengue-2 virus Attachment assay Solubilized cellular membrane (SCM) Virus receptor