

## 从病人外周血单个核细胞中检测 HHV-6: 分离培养和基因扩增\*

陈斌 姚堃 周瑶玺 季晓辉

(南京医科大学微生物学教研室, 南京 210029)

R511.04  
R446.5

A

**提要** 收集婴幼儿急疹及淋巴系统增生性疾病患者外周血单个核细胞进行体外培养, 从7例婴幼儿急疹及2例淋巴系统增生性疾病患者中分离出一种病毒, 此病毒能在PHA激活的人脐血单个核细胞中传代生长, 产生典型CPE; 形成气球样巨细胞。电镜下观察, 感染细胞中可见直径180 nm左右, 有包膜, 疱疹样病毒颗粒; 血清学试验证明分离株与HSV-1, 2, HCMV、及EBV无抗原交叉, 而与HHV-6 GS株间存在抗原一致性; 多聚酶链反应表明该分离株HHV-6特异性DNA阳性; 综合以上结果, 初步认为该分离株为HHV-6。同时还用PCR法对所收集的标本直接检测HHV-6特异性DNA。PCR法与病毒分离法相比较, 前者HHV-6检出率为88.8% (16/18), 后者为38.9% (7/18)。

**关键词** 人类疱疹病毒6型(HHV-6), 病毒分离培养, 鉴定, 多聚酶链反应(PCR)

(续发新生儿学检查)

基因扩增

人类疱疹病毒6型是1986年由美国的Salahuddin发现的新型疱疹科病毒<sup>[1]</sup>。国外对其研究已很深入, 认为其为婴幼儿急疹(ES)的病因<sup>[2,3]</sup>, 另外还与淋巴系统增生性疾病、AIDS、慢性疲劳综合症、器官移植后感染等多种疾病有关<sup>[3]</sup>。国内在这方面的研究尚处于起步阶段, 本研究旨在从病人外周血中分离HHV-6的南京地方株, 并对其进行初步鉴定; 同时建立用于检测HHV-6的分离培养及PCR两种方法, 并对之进行比较。

### 材料与方 法

#### 1 病例选择

- 1.1 选择18例临床确诊为婴幼儿急疹的患儿。年龄3~13个月。
- 1.2 9例淋巴系统增生性疾病患者(7例为淋巴瘤, 2例为淋巴细胞性白血病)。

#### 2 标本采集

- 2.1 取ES患儿急性期及淋巴系统增生性疾病晚期患者外周血, 用淋巴细胞分离液分离其单个核细胞, 部分做分离培养, 部分备PCR用。
- 2.2 取ES患儿恢复期血清一份, 此患儿在发病第5天从外周血中分离出病毒, PCR证明为HHV-6, 并命名为CN<sub>5</sub>。在患儿发病后第21天, 取血清一份。

#### 3 细胞

- 3.1 人脐血单个核细胞: 取新生儿脐带血, 用淋巴细胞分离液分离其单个核细胞, 用含pHA的20%小牛血清1640培养2~3天待用。

本文于1995年7月收到, 11月6日修回

\* 国家自然科学基金项目

3.2 HSB<sub>2</sub> 细胞:由香港大学惠赠

4 HHV-6 标准病毒株 美国 GS 株(由香港大学惠赠)。

### 5 病毒分离与传代

5.1 病毒分离 将患者外周血单个核细胞混悬于 20% 小牛血清 1640 营养液中,加入 pHA 及 IL<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养, 逐天观察, 适时换液, 对于出现典型 CPE 者, 收集感染细胞及上清, 作为初代病毒材料, 部分保存、部分传代。对于观察 10 d 仍无 CPE 者, 继续在脐血单个核细胞上盲传 2 代(每代 10 d), 仍无 CPE 者视为阴性。

5.2 病毒传代 取出现 CPE 的初代病毒材料, 接种于 pHA 刺激培养 3 d 的脐血单个核细胞悬液中, 加入 pHA、IL<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 于 37 °C 培养, 如出现 CPE 视为传代成功。

### 6 电镜观察

收集 CPE 明显的感染细胞, 常规方法做超薄切片透射电镜下观察。

### 7 血清学试验

用兔抗 HSV-1, 2 多抗(本室制备), HSV-1 单抗、HSV-2 单抗(第四军医大学惠赠), HCMV 单抗(南京军区总医院惠赠)、EBV 单抗(上海华美公司产品)及 ES 恢复期血清(1:50 稀释), 常规方法对分离株 CN<sub>5, 8, 10</sub> 及 GS 株做病毒中和试验及间接免疫荧光试验(IFA)。

### 8 PCR 法检测 HHV-6 DNA

参考国外文献<sup>[4]</sup>, 采用源自 HHV-6U<sub>1126</sub> 株克隆质粒 PHDS<sub>α</sub> 的引物对 H6-6/H 6-7, 国外实验证明其为 HHV-6 特异性, 扩增产物为 223bp。用细胞裂解液加蛋白酶 K 法(pK 法)或酚氯仿抽提法制备待检 DNA 模板。常规方法加样(PCR 试剂为上海夏华公司产品), 按 92.5 °C 35 S、55 °C 40 S、72 °C 50 S 循环 35 次, 扩增产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, EB 染色, 紫外灯下观察。

## 结 果

### 1 病毒分离与初步鉴定

#### 1.1 病毒分离结果与细胞病变特点

从 7 例 ES 患儿外周血单个核细胞中分离出病毒。其中 3 例在原代培养第 4 天、1 例在原



图 1 婴幼儿急疹患者外周血单个核细胞体外培养 4—6 d, 出现细胞病变(CPE)。箭头所示为典型气球样病变巨细胞。

Fig 1 Peripheral blood mononuclear cells from patients with exanthem subitum were cultured *in vitro*, and the cytopathic effect was observed after 4~6 d in culture, Arrows indicate the large ballon-like cells.

代培养第 5 d, 2 例在原代培养第 6 d, 1 例在 2 代培养第 3 d 出现 CPE, 病毒所致典型 CPE 为: 细胞变圆透亮, 体积增大十至数十倍, 折光性增强, 呈气球样巨细胞, 多个巨大细胞可互相融合成合胞体(见图 1)。淋巴系统增生病组中 2 例分别在原代培养第 7、第 8 d 出现 CPE, 其形态与 ES 组相似。两组分离率分别为 38.9% (7/18) 和 22.2% (2/9)。

### 1.2 分离病毒的体外传代建株及其细胞感染特点

取 ES 组 3 例分离后 CPE 出现早且形态典型的分离病毒, 在人脐血单个核细胞中传代培养 20 代以上, 每代均出现与初代一致的典型 CPE。表明此 3 株病毒已形成稳定传代, 根据其分离于中国(China)南京(Nanjing)以及分离顺序, 命名为 CN<sub>5</sub>、CN<sub>8</sub>、CN<sub>10</sub> 株。将此 3 株病毒与 GS 株相对照, 接种于成人外周血单个核细胞、HSB<sub>2</sub> 细胞、人胚肺细胞(结果见表 1)。分离株在 HSB<sub>2</sub> 细胞上不能生长, 而 GS 株在 HSB<sub>2</sub> 上生长良好。

表 1 HHV-6 在体外细胞中的生长情况

Tab 1 Cell susceptibility of HHV-6

病毒株 Virus isolate	脐血单个核细胞 Cord blood mononuclear cell		成人外周血单个核细胞 Human peripheral blood mononuclear cell		HSB <sub>2</sub> 细胞 HSB <sub>2</sub> cell		人胚肺细胞 Human embryo fibroblast cell	
	CPE	感染滴度	CPE	感染滴度	CPE	感染滴度	CPE	感染滴度
	CPE	Titre	CPE	Titre	CPE	Titre	CPE	Titre
CN <sub>5</sub>	+	10 <sup>-4</sup>	+	10 <sup>-3</sup>	-	N <sub>0</sub>	-	N <sub>0</sub>
CN <sub>8</sub>	+	10 <sup>-4</sup>	+	10 <sup>-3</sup>	-	N <sub>0</sub>	-	N <sub>0</sub>
CN <sub>10</sub>	+	10 <sup>-4</sup>	+	10 <sup>-3</sup>	-	N <sub>0</sub>	-	N <sub>0</sub>
GS	+	10 <sup>-5</sup>	+	10 <sup>-4</sup>	+	10 <sup>-5</sup>	-	N <sub>0</sub>

N<sub>0</sub>: undetectable

### 1.3 电镜结果

电镜下感染细胞中可见疱疹样病毒颗粒, 圆形, 中心为染色深的致密核心, 直径约 110 nm 左右, 为病毒核衣壳, 外周有包膜, 整个成熟颗粒直径约 180 nm 左右。有包膜成熟颗粒主要分布在细胞浆内, 而细胞核内主要为大量病毒核衣壳, 无包膜包裹(见图 2)。



图 2 ES 患儿单个核细胞中疱疹样病毒颗粒。A 图示胞浆中有包膜病毒颗粒; B 图示正在穿过核膜, 获得包膜的病毒核衣壳。

Fig 2 Herpes-like virus particles in mononuclear cells from ES patients. A: An enveloped virus particle in cytoplasm; B: A nucleocapsid was passing through the nucleomembrane and getting enveloped.

1.4 血清学试验结果

1.4.1 中和试验结果:ES 恢复期血清对分离株及 GS 株有中和作用,能抑制病毒接种后 CPE 的出现,其余各抗体对分离株及 GS 株均无中和作用。

1.4.2 IFA 结果:表 2 示分离株病毒与 HHV-6 GS 株一样,不能与抗 HSV、HCMV 及 EBV 抗体反应,但能与 ES 恢复期血清反应。上述各血清学试验结果均提示分离株与 HSV、HCMV、EBV 无交叉抗原,而各分离株间及与 GS 株间存在共同抗原。

表 2 间接免疫荧光试验结果

Tab 2 Results of IFA

抗体 Antibody	HSV-1 阳性对 照 <sup>a</sup> Positive control of HSV-1 <sup>a</sup>	HSV-2 阳性对 照 <sup>b</sup> Positive control of HSV-2 <sup>b</sup>	EBV 阳 性对照 <sup>c</sup> Positive control of EBV <sup>c</sup>	CN <sub>5</sub> 感 染的 单个 核细胞 Mono- nuclear cells infected by CN <sub>5</sub>	CN <sub>6</sub> 感 染的 单个 核细胞 Mono- nuclear cells infected by CN <sub>6</sub>	CN <sub>10</sub> 感 染的 单个 核细 胞 Mono- nuclear cells infected by CN <sub>10</sub>	GS 株感 染的 HSB <sub>2</sub> in- fected by GS	脐血单 个核细 胞 Cord blood mono- nuclear cells	HSB <sub>2</sub> 细 胞 HSB <sub>2</sub> cells
兔抗 HSV-1/2 多抗 Rabbit anti- HSV-1/2 polyclonal anti- body	++	++	--	--	--	--	--	--	--
抗 HSV-1 单 抗 Anti-HSV <sub>1</sub> McAb	++	--	--	--	--	--	--	--	--
抗 HSV-2 单 抗 Anti-HSV <sub>2</sub> McAb	--	++	--	--	--	--	--	--	--
抗 HCMV 单 抗 Anti-HCMV McAb	--	--	--	--	--	--	--	--	--
抗 EBV 单抗 Anti-EBV McAb	--	--	++	--	--	--	--	--	--
ES 患儿恢复 期血清 Convalescent phase serum from ES pa- tient	±	±	--	++	++	++	++	--	--

a: HSV-1 感染的人肌皮细胞  
a: human skin fibroblast cells infected by HSV<sub>1</sub>

b: HSV-2 感染的人肌皮细胞  
b: human skin fibroblast cells infected by HSV<sub>2</sub>

c: EBV 转化的 HO-1 细胞  
c: HO-1 cells transformed by EBV

1.5 PCR 法对分离病毒的鉴定结果

以源自 HHV-6U<sub>1102</sub> 株基因的引物 H6-6/H6-7 对所有 CPE 阳性的分离病毒及 HHV-6 GS 株进行体外扩增,均得到预期 223 bp 的特异性扩增产物,多次重复,结果完全一致(见图 3)。表明所分离病毒与 GS 株具有相同基因片段,提示该病毒属于 HHV-6。

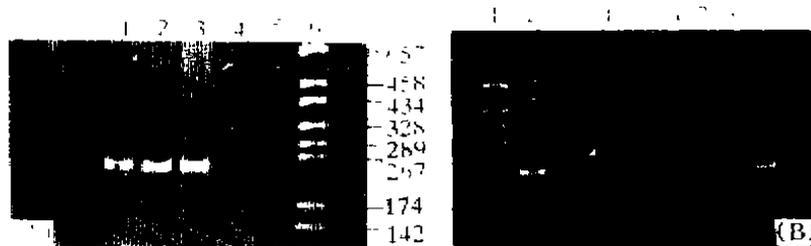


图3 PCR法对HHV-6的检测

A 图示 PCR 法从 ES 患儿外周血单个核细胞中检测出 HHV-6 DNA。1. CN<sub>5</sub>; 2. CN<sub>8</sub>; 3. CN<sub>10</sub>; 4. 正常脐血单个核细胞; 5. HHV-6 GS 株; 6. 分子量 Marker。

B 图示 PCR 法从淋巴系统增生性疾病患者外周血单个核细胞中检测 HHV-6 DNA。1. 分子量 Marker; 2. HHV-6 GS 株 3-4 为淋巴细胞性白血症病标本, 5-10 淋巴瘤标本

Fig 3 Detection of HHV-6 DNA by PCR

A HHV-6 DNA was detected by PCR from patients' peripheral blood mononuclear cells with ES. 1. CN<sub>5</sub>; 2. CN<sub>8</sub>; 3. CN<sub>10</sub>; 4. Cord blood mononuclear cells; 5. HHV-6 GS strain; 6. Size marker.

B. HHV-6 DNA was detected by PCR from patients' peripheral blood mononuclear cells with lymphoproliferative disorders. 1. Size marker; 2. HHV-6 GS stain, 3-4 lymphocytic leukemia samples, 5-10 lymphoma samples.

## 2 PCR 法对病人血细胞标本的检测结果

本文还应用 PCR 法对所收集的 18 例 ES 及 9 例淋巴系统增生性疾病患者外周血单个核细胞标本直接检测 HHV-6 基因(见图 3)。结果 ES 组 16 例阳性, 淋巴系增生病组 4 例阳性。同时本文还将 PCR 法与病毒分离法进行了比较, 结果见表 3。

表3 PCR法检测HHV-6与病毒分离法比较

Tab 3 Comparison of PCR and virus isolation for detection of HHV-6

疾病分组 Disease group	例数 Case	阳性数(%) Positive case (%)		PCR法与病毒分离法之对照比较 Comparison of PCR and virus isolation				
		PCR法	病毒分离 Virus isolation	PCR法 病毒分离	+	-	+	-
ES组 Exanthem Subitum	18	16(88.9)	7(38.9)	7	9	0	2	<0.05
淋巴系统增生病组 Lymphoprolife- rative disorders	9	4(44.4)	2(22.2)	2	2	0	5	
合计 Total	27	20	9	9	11	0	7	<0.05

\* Virus isolation

## 讨 论

### 1 对分离病毒的鉴定

对分离株从细胞学、病毒学、免疫学及分子生物学方面进行初步鉴定, 认为以病毒为人类疱疹病毒 6 型, 证据如下:

#### 1.1 细胞学证据

此病毒分离株可感染人脐血单个核细胞及成人外周血单个核细胞, 产生特征性 CPE, 所

观察到的 CPE 与国外 Salahuddin<sup>[1]</sup>、Yamanishi<sup>[2]</sup> 等报道的各株 HHV-6 及本室 HHV-6 GS 株所致 CPE 极其一致,均为气球样巨细胞。故从病毒细胞学上看,分离株很可能为 HHV-6。另外分离株不感染人胚肺细胞,故可排除其为 HSV、VZV 的可能性。

### 1.2 病毒形态学证据

电镜下,分离株感染细胞中可见圆形、有包膜病毒颗粒,与国外<sup>[1,2]</sup>报道的 HHV-6 电镜结果相比,其形态、大小、结构均极为相似,同属疱疹科病毒。

### 1.3 血清学证据

中和试验及 IFA 结果均提示分离株与 HSV-1、2、HCMV、EBV 无抗原交叉,故可排除其为 HSV、HCMV、EBV 的可能性。ES 恢复期血清的血清学试验结果说明分离株与 GS 株间存在共同抗原,即分离株表达 HHV-6 抗原,结合上述排除试验结果,进一步提示该分离株为 HHV-6。

### 1.4 PCR 法鉴定病毒核酸证据

PCR 结果显示在预期 223 bp 处各分离株与 GS 株均出现一致的特异性条带,说明分离株具有 HHV-6 特异性核酸,且与 GS 株间存在相同 DNA 序列,即分离株属于 HHV-6。

综合以上 CPE 电镜、血清学试验及 PCR 鉴定结果,可以初步肯定分离株为 HHV-6。

另外,实验中还发现在体外生长特性上 GS 株可感染 HSB<sub>2</sub> 细胞,而分离株不能。国外文献报道,HHV-6 可分 A、B 两型<sup>[5]</sup>,A 型可感染 HSB<sub>2</sub>,B 型则不能<sup>[5]</sup>。GS 株属于 A 型,故可感染 HSB<sub>2</sub>,而分离株不感染 HSB<sub>2</sub>,可能属于 B 型。

## 2 对病毒分离法及 PCR 法检测 HHV-6 的评价及经验

本研究采用单个核细胞培养法分离 HHV-6,此法成功的关键有两点:①在 HHV-6 感染急性期取血;②细胞、病毒培养中,CO<sub>2</sub>、pH、血清、pHA、IL<sub>2</sub> 等各特定培养条件需适合。细胞培养法分离 HHV-6,其准确性虽高,但周期长,耗时费力,检出率不高(40%左右),与之相比,PCR 法病毒检出率高达 90%左右,其最大优点为高度敏感,简便迅速,特别可提供 HHV-6 感染的早期诊断,更适合临床应用。PCR 法的缺点为容易污染,造成假阳性。我们通过 PCR 试剂的一次性分装,严格区分操作环境和加样器,以及设置阴性对照等措施,有效地控制了污染。另外,试用 pK 法代替酚-氯仿抽提法制备待检 DNA 模板,扩增结果两者完全一致,pK 法较简便省时,减少操作污染机会,值得推荐。

## 3 HHV-6 与人类疾病的关系

目前,大多数学者认为 HHV-6 为 ES 病因<sup>[2,3]</sup>,我们从 ES 患儿血中分离出 HHV-6,电镜下看到病毒颗粒,PCR 法检出 HHV-6 核酸,血清学试验也发现患儿恢复期发生了 HHV-6 抗体阳转,本研究结果与国外报道相符,也支持 HHV-6 为 ES 病因的观点。对于淋巴系统增生性疾病,用 PCR 法从 9 例患者血中检出 4 例 HHV-6 DNA 阳性,其中 2 例分离出病毒,提示 HHV-6 感染可能与其有关,但尚不能得出两者间明确的因果关系,对此还将做进一步的研究。

## 参 考 文 献

- 1 Salahuddin S. Z., Ablashi DV, Markham PD, *et al.* Isolation of a new virus, HBLV, in patients with Lymphoproliferative disorders Science, 1986; 234(4776): 596-601

- 2 Yamanishi K, Okuno T, Takahashi M, *et al.* Identification of human herpesvirus-6 as a causat agent for exanthem subitum. *Lancet*, 1988; May 14: 1065 - 1067
- 3 Salahuddin SZ, Kelley AS, Kruegger GR, *et al.* Human herpes virus-6 in diseases. *Clini and Diagno virol*, 1993; 1: 81 - 100
- 4 Gopal M R, Thomson BJ, Fox J, *et al.* Detection by PCR of HHV-6 and EBV DNA in blood and oropharynx of healthy adults and HIV - Seropositives. *Lancet*, 1990; June 30: 1598 - 1599
- 5 Ablashi DV, Balachandran N, Josephs SF, *et al.* Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in Human herpesvirus-6 isolates. *Virology*, 1991; 184: 545 - 552

## The Detection of HHV-6 in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients: Virus Isolation and Gene Amplification

Chen Bin Yao Kun Ji Xiaohui Zhou Yaoxi

(*Department of Microbiology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029*)

Peripheral blood samples from patients with exanthem subitum and lymphoproliferative disorders were collected. Mononuclear cells were separated from patients blood and were cultured *in vitro*. As a result, virus strains were isolated from the peripheral blood mononuclear cells of seven patients with exanthem subitum and two patients with lymphoproliferative disorders. The isolates could propagate in the PHA stimulated umbilical cord blood mononuclear cells and the cytopathic effects characterized by large ballooning cells were observed after infection. Electronmicroscopy of infected cells ultrathin section showed the size of enveloped virus particles is 180 nm in diameter and the particles morphologically resemble herpesgroup virus. Serological test further demonstrated that the isolates lacked immunological cross-reactivity with HSV-1 and 2, HCMV and EBV, but were shown to be antigenically related to HHV-6 GS strain; HHV-6 specific DNAs were detected in all the isolate by polymerase chain reaction. All the results confirmed that the isolated virus was HHV-6. In addition, PCR was also used to detect the HHV-6 DNA directly from all the patients samples. Two methods for detection of HHV-6 were compared, the results showed; the positive rate was 88.8% by PCR and 38.9% by virus isolation.

**Key words** Human Herpesvirus Type 6 (HHV-6), Virus Isolation, Identification, Polymerase chain reaction(PCR)