

人类疱疹病毒6型可诱生 TNF- $\alpha$ 

范萍 姚堃 季晓辉 周瑶玺

(南京医科大学微生物教研室, 南京 210029)

A

**摘要** 用生物活性法和双抗体夹心桥联酶免疫吸附(ELISA)法检测了人类疱疹病毒6型(HHV-6)GS株和南京地方株 CNS, 8, 10 感染的淋巴细胞培养上清中的肿瘤坏死因子(TNF)的水平, 发现培养 24 h 即可检出高水平的 TNF, 48~72 h 达到峰值, 此后逐渐下降, 与未感染对照组比较有极其显著的差异( $P < 0.001$ )。GS 株与地方株间诱生 TNF 水平无显著性差异( $P > 0.1$ ), 三株地方株诱生 TNF 也无显著性差异( $P > 0.05$ )。TNF- $\alpha$  单抗可以完全中和培养上清中 TNF 的活性, 证实上清中有 TNF- $\alpha$ 。与 LPS 比较, HHV-6 诱生 TNF- $\alpha$  的能力要强得多。

**关键词** 人类疱疹病毒6型, 肿瘤坏死因子- $\alpha$ , 诱生

肿瘤坏死因子

HHV-6 是一种新发现的人类疱疹病毒<sup>[1]</sup>, 主要感染淋巴细胞<sup>[2]</sup>。许多学者十分关注其对免疫功能的影响, 其中 HHV-6 感染对细胞因子诱生的影响引起了人们的广泛兴趣<sup>[3-5]</sup>。1994 年我们从南京婴幼儿急疹患儿外周血单个核细胞中分离出 HHV-6 南京地方株<sup>[6]</sup>。本文通过生物活性法及双抗体桥联酶免疫吸附试验, 证实 HHV-6 我国南京地方株和国际 A 型标准株 GS 感染淋巴细胞后, 受染细胞均可产生高水平 TNF- $\alpha$ 。

## 材料和方法

## 1 HHV-6 毒株

- 1.1 HHV-6 GS 株 由香港大学微生物教研室惠赠。
- 1.2 南京地方株 CN 株 我室从 ES 患儿外周血单个核细胞中分离培养。

## 2 细胞

- 2.1 正常新生儿脐带血单个核细胞(CBMCs) 健康产婴的脐带血由南京市妇产医院产房提供。用肝素(62.5 u/mL)抗凝, 淋巴细胞分离液分离。浓度为  $2 \times 10^6$  细胞/mL。培养条件: 20% 新生牛血清的 RPMI 1640, 含 PHA 50  $\mu$ g/mL,  $\beta$ -2 10 u/mL, 青、链霉素分别为 100 u/mL。接种病毒量为  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL, 并以同一批 CBMCs 同样培养作为未感染细胞对照。收集感染后 24 h、48 h、72 h 的培养上清, 冻存于 -80℃, 待检。
- 2.2 成人外周血单个核细胞(ABMCs) 取健康成人外周血, 其分离、培养、收集方法同 CBMCs。
- 2.3 L<sub>929</sub> 细胞, 用含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 传代培养。

## 3 试剂

- 3.1 LPS (10  $\mu$ g/mL) sigma 产品。
- 3.2 TNF- $\alpha$  双抗体夹心桥联酶免疫吸附检测试剂盒 北京邦定生物工程公司提供。
- 3.3 TNF- $\alpha$  单抗 第四军医大学免疫学教研室金伯泉教授惠赠。中和试验工作浓度为 1:100。

本文于 1996 年 3 月 27 日收到, 6 月 12 日修回

• 本文为国家和省教委自然科学基金资助课题

3.4 TNF- $\alpha$  标准品 为重组人 TNF- $\alpha$  纯品, Sigma 产品。

#### 4 TNF 测定

4.1 生物活性法 按文献<sup>[7]</sup>, 略有改变, 简述如下: L<sub>929</sub> 细胞长成单层后用 0.25% 的胰酶消化, 用 Hank's 液洗去胰酶, 调细胞浓度为  $5 \times 10^6$  细胞/mL, 加入 96 孔细胞培养板中, 每孔 100  $\mu$ L。37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 孵育 18 h 后去除上清液, 加入倍比稀释的标本以及标准品 100  $\mu$ L/孔。同时每孔加入 2  $\mu$ g/mL 放线菌素 D 培养液 100  $\mu$ L/孔。37  $^{\circ}$ C 孵育 18 h 后去上清, 甲醇固定 30', 结晶紫染色 20 min, 流水洗净细胞外结晶紫, 用结晶紫抽提液 (0.1 mol/L 磷酸氢二钠与 95% 乙醇等量混合) 100  $\mu$ L/孔溶解 5 min 后, 置酶标仪 (DG3022) 用 570 nm 滤色片测 OD 值。TNF 活性单位即 50% 细胞存活时的最高稀释孔 OD 值在标准曲线上的对应数值, 再乘以稀释倍数。

4.2 免疫学检测 采用双抗体夹心桥联酶免疫吸附试验, 按试剂盒说明书操作。

#### 5 数据处理

采用统计学直线回归的方法得出标准曲线。每份标本设双复孔并重复两次取其均值。试验组与对照组 TNF- $\alpha$  含量比较采用 t 检验。

## 结 果

1 HHV-6GS 株和 CN<sub>8</sub> 株诱导 CBMCs 产生 TNF- $\alpha$  以及同一批 CBMCs 对照组产生 TNF- $\alpha$  相互比较 结果见表 1。

表 1 病毒接种后 24 h HHV<sub>6</sub>GS、CN<sub>8</sub> 株诱导 CBMCs 产生 TNF $\alpha$

Table 1 TNF- $\alpha$  induction of HHV-6 GS and HHV-6 CN8 in CBMCs at 24h after inoculation

标本号 No. of samples	生物活性法 ( $\mu$ /mL) biological activity assay			酶联免疫吸附法 (pg/mL) ELISA		
	GS + CBMCs	CN8 + CBMCs	CBMCs	GS + CBMCs	CN8 + CBMCs	CBMCs
1	574	496	36	884	969	36
2	489	737	39	598	873	12
3	513	566	41	931	766	32
4	749	909	36	694	965	21
5	676	756	43	767	512	51
6	429	612	31	839	909	20
7	503	436	33	903	963	31
8	465	565	24	665	565	42
均值 ( $\bar{X} \pm SD$ ) mean value	549 $\pm$ 110*	624 $\pm$ 155* $\Delta$	35 $\pm$ 6	785 $\pm$ 123*	815 $\pm$ 184* $\Delta$	30 $\pm$ 12

\* 与 CBMCs 对照组比较  $P < 0.001$

\* Compared with control group of CBMCs,  $P < 0.001$

$\Delta$  与 GS 组比较  $P > 0.1$

$\Delta$  Compared with GS strain infection group,  $P > 0.1$

将 24 份标本所测得的生物活性法和 ELISA 法两组对应值作直线回归分析, 结果显示  $r = 0.867 (P < 0.001)$ , 建立直线回归方程  $y = 69.29 + 1.1667X$ 。

2 HHV-6 CN8 株诱导 CBMCs 产生 TNF $\alpha$  的动力学特征 结果见图 1。

3 HHV<sub>6</sub>CN8 诱导成人外周血单个核细胞 (ABMCs) 产生 TNF $\alpha$  的结果

HHV<sub>6</sub>CN8 诱导 ABMCs 产生 TNF $\alpha$  (183  $\pm$  58), 与同一批未感染的 ABMCs 产生的 TNF $\alpha$

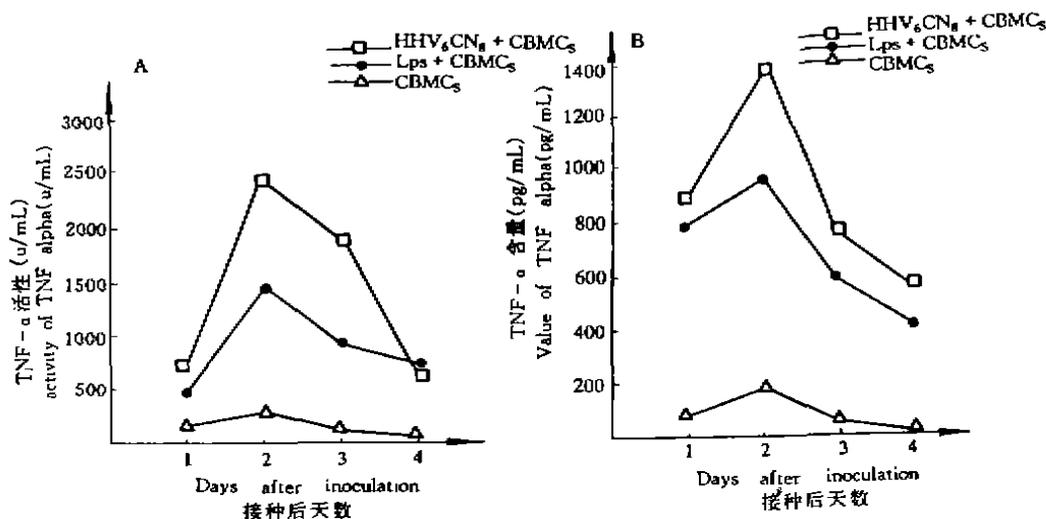


图 1 HHV<sub>6</sub>CN8 株诱导 CBMC<sub>5</sub> 产生 TNF-α 的动力学特征

A 生物活性法; B 酶联免疫吸附法

Fig 1 Kinetics of TNF alpha in infected culture supernatants induces by HHV-6 CN8 strain

A biological activity assay; B ELISA

(17 ± 6) 比较有显著性差异 (P < 0.01), 但比 HHV<sub>6</sub>CN8 诱导 CBMC<sub>5</sub> 产生 TNFα 量 (634 ± 135) 少, 二者之间有显著性差异 (P < 0.05)

4 南京分离株 CN<sub>5</sub>、CN<sub>8</sub>、CN<sub>10</sub> 诱生 TNFα 水平比较

CN<sub>5</sub>、CN<sub>8</sub>、CN<sub>10</sub> 24 h 诱生水平 (u/mL) 分别为 659 ± 131、624 ± 155、587 ± 146, 三株间无显著性差异 (P > 0.05)。

5 TNFα 的单抗 (McAb) 对待检标本的中和作用 见表 2。

表 2 TNFα 的 McAb 对上清中 TNF 的中和

Table 2 Neutralization of TNF in supernatants by McAb to TNFα

样本号 No. of Samples	TNF 活性 (u/ml) Activity of TNF (u/ml)		
	单抗 McAb	无单抗 No McAb	阴性对照 Negative group
1	2.5	196	2.02
2	3.6	237	2.43
3	2.1	166	1.96
4	2.3	212	1.87
5	2.2	336	2.01
6	3.4	265	2.31
均值 (x̄ ± SD) Mean value	2.68 ± 0.65 <sup>*△</sup>	235 ± 59.86	2.10 ± 0.22

▪ 与未加 McAb 组比较 P < 0.05

\* Compared with the group without McAb P < 0.05

△ 与阴性对照组比较 P > 0.1

△ Compared with the group of negative control p > 0.1

## 讨 论

业已证实 HHV-6 为婴儿急疹(Exanthem subitum, ES)的致病因子<sup>[1]</sup>。但 HHV-6 导致 ES 的发病机理目前仍未清楚。本研究主要从 HHV-6GS 株和 HHV-6 南京地方株体外诱生 TNF- $\alpha$  的角度探讨 HHV-6 对人类免疫因素的影响。此前, Gosselin 等<sup>[4,8]</sup>曾研究了人类疱疹病毒科的病毒对 TNF 的诱生情况,发现 HSV-1 感染外周血单个核细胞,在感染后第 5 天细胞分泌 TNF- $\alpha$  的量显著增多,到第 7 天时达到峰值;而 EBV 则抑制 TNF- $\alpha$  的产生。以后又进一步比较了 HHV-6 GS 株与 HSV-1、EBV 诱生 TNF- $\alpha$  的特点,发现 HHV-6 GS 株对 TNF- $\alpha$  诱生作用最强,明显超过 HSV-1。当用 EBV 或 HSV-1 合并 HHV-6 GS 株感染细胞时,HHV-6 GS 株诱生 TNF- $\alpha$  的水平明显受抑。这些结果揭示不同的疱疹病毒在诱生 TNF- $\alpha$  上具有不同的特点。本研究证实 HHV-6 GS 株与 CN 株皆能在体外诱导 CBMCs、ABMCs 产生 TNF,两株诱导能力相近,HHV-6 CN<sub>5</sub>、CN<sub>8</sub>、CN<sub>10</sub> 诱生 TNF 水平亦无显著性差异。LPS 是强有力的 TNF- $\alpha$  诱生剂,本结果显示 LPS 可以提高 TNF- $\alpha$  产量 6 倍,但 HHV-6 GS 和 CN<sub>8</sub> 株诱生 TNF- $\alpha$  水平在一定阶段可显著超过 LPS。另一方面,HHV-6 诱导 CBMCs 产生 TNF- $\alpha$  的量比诱导 ABMCs 产生的量高,这可能与 CBMCs 表达的病毒抗原更多有关。因为 HHV-6 在 CBMCs 中复制量比在 ABMCs 中多,HHV-6 感染 CBMCs 后,细胞表面病毒抗原阳性率比感染 ABMCs 高<sup>[9]</sup>。Flamand 等<sup>[5]</sup>发现加热灭活(56℃, 30')后 HHV-6 不能诱生 TNF- $\alpha$ ,但超声灭活(265 nm, 1 h)的 HHV-6 仍可以诱生 TNF- $\alpha$ ,用磷乙酸(PAA)100  $\mu$ g/mL 抑制 HHV-6 DNA 复制,对 HHV-6 诱生 TNF- $\alpha$  无影响。说明 HHV-6 是否复制与产生 TNF- $\alpha$  之间无直接相关性,但与其不耐热的结构蛋白或病毒颗粒的完整性有关。进一步提示 HHV-6 对人类的致病性很可能通过完整的结构蛋白或病毒颗粒诱生细胞因子而发挥作用。

HHV-6 GS 株 CN 株诱生 TNF- $\alpha$ ,该细胞因子为重要的内源性致热源,体外诱生 48~72 h 达到峰值,与 ES 患儿临床发热症状出现的时间相一致。患儿的高热很可能与病毒诱生 TNF- $\alpha$  有关。大剂量的 TNF- $\alpha$  引起细胞坏死也可致病。同时, TNF- $\alpha$  又具有抗病毒活性,所以该疾病的自限性表现也可能与 TNF- $\alpha$  有关。据此初步推测 HHV-6 诱生 TNF- $\alpha$  等细胞因子在 ES 的发病与恢复方面既有致病作用,又有免疫防护作用。这方面仍有待进一步深入研究加以证实。

本研究检测 TNF- $\alpha$  采用生物活性法和 ELISA 两种方法相对照。两种方法各有特点,互为补充。前法结果反映待检样本中的 TNF 活性,但影响检测结果的因素较多,对标本的新鲜程度要求高,若标本存放较久或者反复冻融,以及检测时靶细胞生长情况都会影响检测值。后一方法稳定性较好,但反映的是 TNF- $\alpha$  总含量,不能反映其生物活性状态。将两种方法相结合,尽管少数标本结果有所差异,但总体上使实验结果更为可靠。本实验所用两法检测结果比较  $r=0.867$ ,作直线回归,表明两法检测结果相关性很高。在生物活性检测法中,由于 TNF- $\alpha$  McAb 可以完全中和所测样本中 TNF 的活性,故可确认所测的 TNF 为  $\alpha$  型。

## 参 考 文 献

- 1 Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K *et al*. Identification of Human Herpesvirus 6 as a casual agent for exanthem subitum. *Lancet*, 1988, 1(8594):1065
- 2 Horvat RT, Parmely MJ, Chandran B. Human herpes virus 6 inhibits the proliferative responses of human peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis*, 1993, 167(6):1274
- 3 Kikuta H, Nakane A, Lu H *et al*. Interferon induction by human herpesvirus 6 in human mononuclear cells. *J Infect Dis*, 1990, 162(1):35
- 4 Gosselin J, Flamand L, D'Addario M *et al*. Modulatory effects of Epstein - Barr, Herpes Simplex, and Human Herpes - 6 Virus infections and coinfection on cytokine synthesis. *J Immunol*, 1992, 149(1):187
- 5 Flamand L, Gosselin J, D'Addario M *et al*. Human Herpesvirus 6 induces interleukin - 1 $\beta$  and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin - 6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Virol*, 1991, 65(9):5105
- 6 陈斌,姚莹,周瑶玺等.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. *中国病毒学*, 1996;11(2):125 ~ 131
- 7 Flik DA, Gifford GE. Comparison of *in vitro* cell cytotoxic assays for Tumor Necrosis Factor. *J Immunol Methods*, 1984, 68(1 ~ 2):167
- 8 Gosselin J, Flamand L, D'Addario M *et al*. Infection of peripheral blood mononuclear cells by herpes simplex and Epstein - Barr viruses. Differential induction of interleukin 6 and tumor necrosis factor - alpha. *J Clin Invest*, 1992, 89(6):1849

### The Production of TNF- $\alpha$ Induced by HHV - 6 *in Vitro*

Fan Ping    Yao Kun    Ji Xiaohui    Zhou Yaoxi

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

There are high levels of TNF- $\alpha$  in the supernatants of lymphocyte culture infected with HHV - 6 GS strain and the Nanjing local strains. TNF- $\alpha$  was detected by two methods: biological activity assay using L929 cells and ELISA. HHV - 6 can induce TNF- $\alpha$  within 24 h, maximal release of TNF- $\alpha$  occurred during 48 h to 72 h post infection and then gradually decreased. The level of TNF- $\alpha$  in infected culture supernatants is far higher than that of uninfected cells ( $P < 0.001$ ). In this case, there is almost no difference between local strain and strain GS ( $P > 0.1$ ). Three local strains have same result. Specific monoclonal antibody against TNF- $\alpha$  can completely neutralize the activity of TNF in the supernatants of these cells infected with HHV - 6. The levels of TNF- $\alpha$  induced by HHV - 6 is much higher than that induced by LPS as a positive control.

**Key words** Human Herpes Virus Type - 6, Tumor Necrosis Factor Alpha, Induction