维普资讯 http://www.cqvip.com

32-37

20172(6)

第12卷第1期 中国病毒学 Vol.12 No.1
1997年3月 VIROLOGICA SINICA Mar. 1997

登革病毒对人血管内皮细胞感染性的研究*

江丽芳 江振友 郭辉玉
(中山医科大学微生物学教研室,广州 510089)

R373.33
R512.802

A

提 要 用登革病毒Ⅱ型(DV_2)感染体外培养和传代的人脐静脉内皮细胞(HUVEC),研究发现,HUVEC是登革病毒的允许性细胞。病毒感染后12 h即可在培养上清中用微量蚀斑法测出病毒,病毒滴度48 h达高峰,以后迅速下降。并发现在一定范围内病毒产量随病毒感染复数(MOI)的增加而增高。间接免疫荧光法证明感染的HUVEC胞浆及胞膜上携带DV_2抗原。电镜和光镜下,感染细胞未见明显的形态和结构改变。

关键词 登革病毒Ⅱ型(DV_2),人脐静脉内皮细胞(HUVEC),感染

登革热 血管内皮细胞

登革病毒感染可引起登革热(DF)、登革出血热及登革休克综合征(DHF/DSS)。其中DHF/DSS以全身毛细血管内皮细胞广泛性肿胀、渗透性增加和出血为主要病理特征,临床上出现高热、广泛性出血和休克等病状、死亡率高[1]。DHF/DSS的发病机理一直是人们研究的重要课题,但至今尚未阐明。一般认为病毒性出血的原因有二,一是病毒直接损伤血管内皮细胞,二是通过免疫反应或是炎症介质而间接影响凝血、止血和血管内皮细胞的功能。登革病毒所致的出血究竟是何种原因目前尚不清楚。以往的研究证明,单核细胞系是登革病毒感染的主要靶细胞,最近也有登革病毒可在人皮肤成纤维细胞上增殖的报道[2]。1978年,Andrews曾初步报道过登革病毒感染血管内皮细胞的研究[3],但以后一直未见进一步报道。登革病毒究竟能否感染人血管内皮细胞?登革病毒与血管内皮细胞的相互作用如何?这是在登革病毒致病机制研究中急需解决的问题。

本研究用人脐静脉内皮细胞为靶细胞,研究登革病毒对血管内皮细胞的感染性,并对感染的条件和时间动力学等因素进行了较系统的观察,证明人血管内皮细胞是登革病毒的敏感性细胞。

材料与方法

1 **毒株** 登革病毒Ⅱ型New Guinea C株,(DV_2, NGC株)1978年由法国巴斯德研究所引进,北京卫生部中国药品生物制品检定所赠送。

2 **新生儿脐带** 由中山医科大学附属第一医院产房提供。

3 **细胞** 白纹伊蚊C6/36细胞由广东省防疫站赠送,本室长期传代和保存。

4 **试剂** 牛视网膜提取物由本室刘乐和教授提供,其它试剂有:RPMI 1640(Gibco公司产品),Hepes(Merck

收稿日期:1996-03-11,修回日期:1996-07-22
* 本项研究由国家自然科学基金资助

维普资讯 http://www.cqvip.com

公司产品),Eagle's MEM(Gibco 公司产品),胰蛋白酶(Gibco 公司产品),羊抗鼠 IgG 荧光抗体(军事医科院产品),甲基纤维素(Sigma 公司产品),ABC 试剂盒(Vector 公司产品)。

5 **人脐静脉内皮细胞的培养和鉴定** 按作者建立的 HUVEC 的培养和传代法进行[4]。主要步骤是:取健康孕妇正常分娩或剖腹产的新生儿脐带约 30 cm,用胰酶－EDTA 灌注冲洗法从脐静脉中获取内皮细胞后,培养于含 H－1640 完全培养基中(含 RPMI 1640, Hepes 10 mmol/L,0.03% L-谷氨酰胺,100 u/mL 青霉素, 100 u/mL 链霉素,50 u/mL 卡那霉素,20%小牛血清,30 u/mL 新生小牛视网膜提取物),待 3～5 d 细胞长成致密单层后用 EDTA 作用 3～5 min 分散细胞,作传代培养,传代比率 1:2～1:3。原代细胞和传代细胞均作内皮细胞鉴定。鉴定方法包括:①倒置相差显微镜下观察细胞形态;②透射电镜下观察内皮细胞 W－P 小体;③ABC 法检测内皮细胞的Ⅷ因子相关抗原(FⅧ$_r$－Ag)。

6 **登革病毒的培养和滴定** 取 DV_2 接种传代 24 h 的白纹伊蚊 C6/36 细胞,37 ℃吸附 60 min,弃上清加 2% FCS Eagle's 维持液,28 ℃培养,待细胞病变达＋＋～＋＋＋时,收获细胞及病毒悬液,低温离心,取上清,分装处理后,置－70 ℃保存。

病毒滴定用本室建立的微量蚀斑法进行。用传代 24 h 的白纹伊蚊 C6/36 细胞接种 24 孔板,每孔细胞数 1×10^6,37 ℃ 5% CO_2 过夜后,弃旧液,加入稀释成 10^{-1}～10^{-7}的病毒悬液,每孔 0.2 mL,每稀释度接种 2 个复孔,37 ℃吸附 2 h 弃感染液,用维持液轻洗两遍,加入 1.2%甲基纤维素 Eagle's 复盖液,37 ℃培养 2～3 d,显微镜下观察空斑形成情况,待空斑大小合适时,弃覆盖液,用 PBS 轻洗三次,再用 0.8%结晶紫染色 5 min,自来水冲洗后,低倍镜下计算每孔蚀斑数及蚀斑形成单位(PFU)。

7 **DV_2 对 HUVEC 的感染性测定**

7.1 DV_2 对原代 HUVEC 的感染性滴定

取原代 HUVEC 接种 24 孔板,每孔细胞数 6×10^4,37 ℃ 5% CO_2 中孵育,待细胞贴壁后,弃上清,感染病毒。DV_2 的感染复数(MOI)为 5 PFU/cell。37 ℃吸附 2 h 后弃去病毒悬液,用 H－1640 维持液轻洗细胞两遍,再加入 H－1640 维持液每孔 0.5 mL,37 ℃5% CO_2 培养。感染病毒后,每天在倒置显微镜下观察细胞形态变化。感染后 48 h 收集细胞,在透射电镜下观察其结构变化。于感染后(0 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h)时分别收集培养上清液,用微量蚀斑法测定病毒生长曲线,并同时收集感染细胞,置于盖玻片上,继续孵育 4～8 h,待细胞贴壁伸展后制成感染细胞片,用间接免疫荧光法检测 DV_2 抗原。

7.2 DV_2 对不同代数 HUVEC 的感染性测定

取同一脐带制备的原代第 5、10、15 代的 HUVEC 接种 24 孔板,每孔细胞数同上,待细胞贴壁后感染 DV_2 病毒感染复数为 5 PFU/cell,感染方法同上,于感染后不同时间收集培养上清液,用微量蚀斑法测定病毒滴度。

8 **不同剂量 DV_2 对 HUVEC 感染性的影响** 取传代 HUVEC 接种 24 孔板,每孔细胞数同上,等细胞贴壁及完全伸展后,弃上清,接种不同感染剂量的 DV_2,病毒感染复数分别为 0.1、1、5、10、50、100 及 200 PFU/cell,每个剂量分别感染 3 孔,感染方法同上,于感染后不同时间收集上清液,用微量蚀斑法测定病毒滴度。

结　果

1 **HUVEC 的显微镜观察** 原代和传代的 HUVEC 在倒置相差显微镜下呈略长的多角形,长成致密单层的细胞呈鹅卵石样排列,透射电镜下见胞浆内含有内皮细胞特征性的 W－P (Weibel－Palade)小体,ABC 染色结果显示胞浆中有内皮细胞的 FⅧr－Ag,说明所培养的细胞为人血管内皮细胞(图 1)。

2 **DV_2 对 HUVEC 的感染性测定** DV_2 感染原代 HUVEC 后,于不同时间收集培养上清液,用微量蚀斑法测定病毒滴度,结果发现,感染后 12 h,细胞开始产生病毒,病毒滴度 48 h 达高

维普资讯 http://www.cqvip.com

峰，此后迅速下降，至感染后120 h病毒滴度已降至很低水平。间接免疫荧光法检测结果表明感染后12 h，开始出现荧光阳性细胞，胞浆及胞膜呈微弱荧光(+)，24 h后荧光强度增加。感染后48～72 h，荧光增强，但荧光强度始终不超过+++。感染细胞在倒置相差显微镜下无明显的细胞病变现象，透射电镜下细胞结构没有明显改变(表1、图2、图3、图4)。

以DV_2感染不同代数(原代、第5代、10代、15代)的HUVEC后，于感染后24和48 h分别收集培养上清液，测定病毒滴度。经统计学分析，发现无显著差异(表2)，说明原代与传至一定代数的HUVEC对DV_2的易感性相同。

表1 DV_2对原代HUVEC的感染性

Table 1 Determination the replication of DV_2 in HUVEC

感染时间 Time after infection (h)	病毒滴度 Virus titre (PFU/ml) × 10^3 ($\bar{x} \pm s$)
0	0
12	0.01±0.01
24	0.32±0.03
48	11.51±1.09
72	5.81±0.59
96	2.42±0.28
120	0.03±0.02

表2 不同代数HUVEC对DV_2的易感性

Table 2 Susceptibility to DV_2 infection was shown in the HUVEC subcultures at different passage levels

HUVEC代数 HUVEC passage	病毒滴度 Virus titre (PFU/ml) × 10^3 24h	48h
原代 primary	0.33±0.05	11.23±1.53
第五代 5th	0.36±0.07	10.78±2.35
第十代 10th	0.34±0.04	10.63±1.11
第十五代 15th	0.32±0.04	10.30±0.75

3 不同剂量的DV_2对HUVEC的感染性 用不同剂量的病毒感染HUVEC的结果表明，随着病毒感染复数的增大，HUVEC的病毒产率也增加。当DV_2的感染复数增至100 PFU/cell时，DV_2在HUVEC中的增殖接近高峰。但当增至200 PFU/cell时，病毒产率不再明显增加(表3)。

表3 不同剂量DV_2感染传代HUVEC的结果

Table 3 Effect of infected passage HUVEC with different doses of DV_2

病毒量 Infection dose (PFU/ml)	病毒滴度 Virus titre (PFU/ml) × 10^3 24 h	48 h	72 h
0.1	0.03±0.01	0.45±1.18	0.28±0.07
1	0.18±0.08	1.40±0.16	0.78±0.20
5	0.36±0.09	11.80±0.85	5.25±0.85
10	1.90±0.23	35.50±4.23	18.25±1.65
50	9.65±0.45	159.00±21.30	90.00±8.40
100	47.60±5.85	382.00±32.10	210.00±18.50
200	55.50±6.90	403.00±35.20	252.00±20.90

讨 论

血管内皮细胞分布广泛，具有重要的生理功能。病毒感染血管内皮细胞引起结构和功能的变化已为人们所关注。目前已发现多种病毒，如单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、肾综合征出血

维普资讯 http://www.cqvip.com

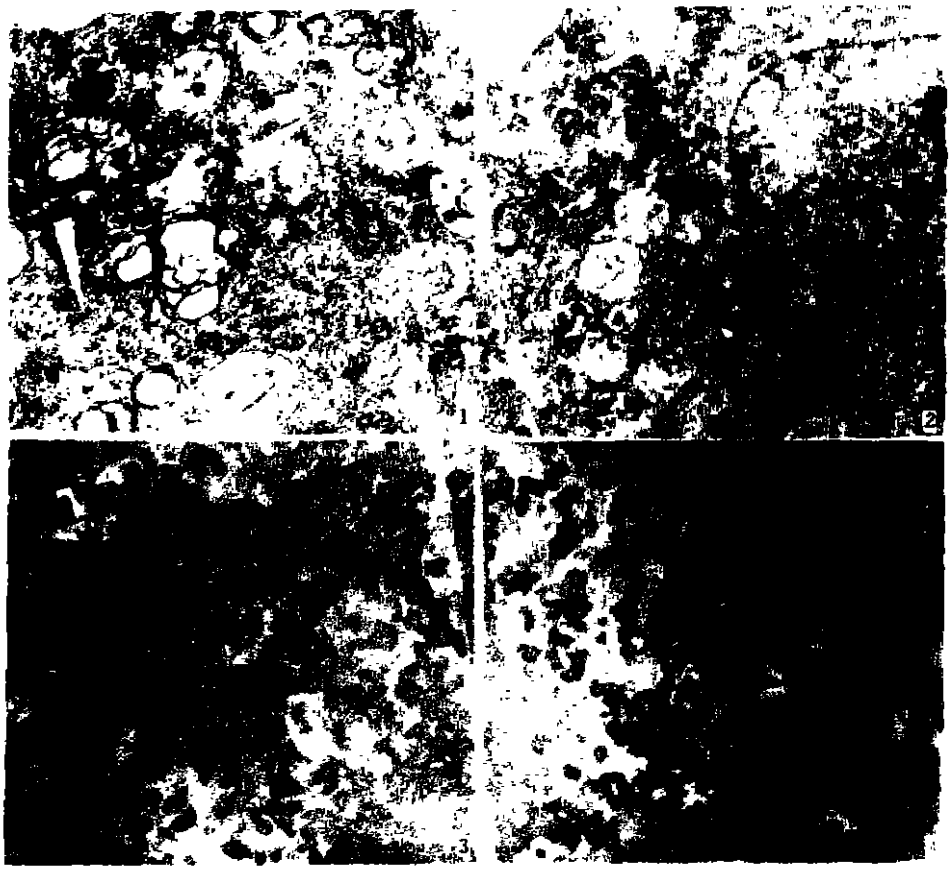

图1　透射电镜下HUVEC的结构观察，胞浆内可见W－P小体（箭头所指）（56000×）

Fig 1　Structure observation of HUVEC under transmission electron microscopy. Presence of intracellular W－P bodies (56000×)

图2　DV_2感染传代HUVEC 48 h后结构观察（42000×）

Fig 2　Structure observation of DV_2 infective subcultures HUVEC by 48 h after infection (42000×)

图3　DV_2感染原代HUVEC48 h后病毒抗原阳性（IFA）（400×）

Fig 3　DV_2 antigen－positive primary HUVEC by 48 h after infection by IFA (400×)

图4　病毒抗原检测阴性对照（IFA）（400×）

Fig 4　DV_2 antigen－negative control (IFA) (400×)

热病毒等可感染人血管内皮细胞，并通过直接或间接的作用引起血管内皮细胞损伤[5]。本研究证明登革病毒也可感染HUVEC，在细胞上表达DV_2抗原，但并不造成明显的形态和结构上的改变，提示DV感染后所出现的血管内皮细胞肿胀、渗透性增加可能不是病毒直接损害所致，而很可能与间接因素有关，因而，有必要对间接因素进行深入和系统的研究。

研究发现传至第5、10、15代的HUVEC仍象原代细胞一样保持对DV_2相同的易感性，证明传代培养的HUVEC也可用于体外DV的感染性研究。但我们发现，体外培养的HUVEC传至20代后增殖速度缓慢，胞浆内空泡增多，尽管增加生长促进剂，细胞仍逐渐衰老脱落，对DV的易感性明显下降。所以用于感染病毒的HUVEC最好是用15代以前生长旺盛的细胞。

维普资讯 http://www.cqvip.com

在不同剂量的 DV_2 对 HUVEC 的感染性测定中，发现随着病毒感染复数的增加，病毒在 HUVEC 中的产量也增加。当病毒感染复数增加到 100 PFU/cell 时，病毒的产量接近高峰，此后增加感染剂量，病毒产量不再明显增加。近年来的研究表明血管内皮细胞可分泌多种细胞因子，如 IFN、TNF、IL－6、IL－8、GM－CSF 等[5]。某些病毒感染也可改变 EC 分泌某些细胞因子的能力[7]。我们的研究也证明登革病毒感染可改变人血管内皮细胞分泌 GM－CSF、TNF_α 和 IL－6 等细胞因子的能力(见另文)。本研究发现病毒滴度在感染后 48 h 达到高峰，以后迅速下降，至 120 h 已降至很低水平，其原因可能与 HUVEC 分泌对病毒有抑制作用的细胞因子有关。

登革病毒的自然宿主是人和猴子等灵长类动物，主要通过埃及伊蚊和白纹伊蚊传播，但登革病毒在体内复制的确切部位尚不清楚[8]。已有报道在登革热患者的淋巴器官和外周血单核细胞中检出登革病毒抗原。亦有登革病毒可在体外培养的单核巨噬细胞和人皮肤成纤维细胞上增殖的报道[9]。我们的研究也证明 DV 可感染人血管内皮细胞，因此提示，易感者经带毒蚊虫叮咬后，病毒增殖的最初部位可能是局部组织的皮肤成纤维细胞和血管内皮细胞，继而扩散致淋巴系统、血液及全身而引起 DF 或 DHF/DSS。登革病毒感染血管内皮细胞在 DHF/DSS 的发病机制中可能起重要的作用。

参 考 文 献

1 Erik A. The dengue viruses. Clin Microbiol Reviews, 1990, 3:385～387

2 Kurane I, Janus J, Ennis FA. Dengue virus infection of human skin fibroblast *in vitro* production of IFN－β, IL－6 and Gm－CSF. Arch Virol, 1992, 124:21～30

3 Andrews BS, Theofilopoulos AN, Peter CJ. *et al*. Replication of dengue and Junin viruses in culture rabbit and human endothelial cell. Infect Immunol, 1978, 20:776～781

4 江丽芳、刘乐和，郭辉玉. 人脐静脉内皮细胞的培养和连续传代. 中山医科大学学报，1993, 14:288～291

5 Span A H M, Mullrs W, Miltenburg AMM *et al*. Cytomegalovirus induced PMN adherence in relation to an ELAM－1 antigen present on infected endothelial cell monolayers. Immunology, 1991, 72:355

6 Abbas AK. Cellular and Molecular Immunology 1st edit, Philadelphia. W. B. Saunders Company, 1991.226

7 孙余华. 动脉粥样硬化免疫发病机制的研究进展. 国外医学免疫分册. 1992, 15(1):16～19

8 Helen K, Aideen M. Detection of dengue virus by *in situ* hybridization. J Virol Meth, 1993, 41:135～146

9 Yang KD. A model to study cytokine profiles in primary and heterologously secondary dengue－2 virus infections. Acta Virologica, 1995, 39:19～21

Study on Dengue Virus Infection of Human Endothelial Cells

Jiang Lifang Jiang Zhenyou Guo Huiyu

(*Dept. of Microbiology, Sun Yat－sen University of Medical Sciences, Guangzhou* 510089)

The replication of dengue－2 virus in cultured human endothelial cells derived from human

维普资讯 http://www.cqvip.com

umbilical veins was demonstrated. The viruses were detected in the supernatant as early as 12 h after infection by microplaque forming assay on C6/36 monolayer cells. The highest viral titers were obtained at 48 h, then rapidly declined to very low titers at 96 h. Dengue-2 virus antigen-positive human endothelial cell were demonstrated by an indirect immunofluorescent assay. No obvious differences in morphology and structure were observed between the virus infected cells and uninfected cells under phase-contrast microscope and transmission electron microscope. Viral production of infeted cells was depended on the multiplicity of infection (MOI). As the viral dose was increased from MOI of 0.1 PFU/cell to 100 PFU/cell, significant increase of viral production was observed.

Key words Dengue virus, Human umbilical vein endothelial cells, Infection

《现代分子病毒学》已经出版发行

董长坦主编的《现代分子病毒学》已于1996年10月由武汉大学出版社出版发行。全书75.3万字、大16开。

《现代分子病毒学》以人和动物病毒为模型,以介绍现代病毒学研究进展为宗旨,较系统地讨论了现代分子病毒学和病毒生物工程的辉煌成就。全书35章,分成三个部分。第一部分:动物病毒分子生物学导论。从病毒和亚病毒的概念入手,讨论了病毒学研究进展,提出了分子病毒学已成为现代病毒学的主要方向的学术观点。第二部分:人和动物病毒家族。结合本书学科特点,采取了按病毒分子结构进行分类的方法,对人和动物病毒各家族成员的分子结构和功能、复制和表达的研究进展,逐一进行了较详细的讨论。第三部分:现代分子病毒学的重要地位。讨论了病毒分子生物学和基因工程在病毒流行病学、致病性病毒的分子诊断、病毒生物工程疫苗、抗病毒因子、核酸和药物,以及病毒基因工程载体研究进展、应用和前景。

为了使读者方便起见,本书利用了必要的插图和表格,列出了一定数量的文献,以便有志者深究的读者可以从中查到很多有价值的出版物。

本书具有一定的学术性和实用性,可作为有关大专院校、研究机构、医院、防疫部门和生产开发部门中,从事病毒学、生物学、分子生物学、微生物学、遗传学、医学、农学和药学工作的教师、研究工作者、医生、兽医师、研究生、大专生等人员的手头参考书。

定价:38元/册。

邮购和汇款地址:武汉市武昌东湖路39号,湖北医科大学病毒研究所。联系人:陈晓老师。邮政编码:430077。**电话:**027-7812138,027-7812140。**开户银行:工行水办 开户名:湖北医科大学基础医学院科技开发部。行号:**825598,**帐号:**8255982490590022095