

# HHV-6 体外感染对外周血单个核细胞 IL-6、IL-8 的 诱生和 NK 活性的影响\*

范萍 姚堃 季晓辉 周瑶玺

R511.02

(南京医科大学微生物学教研室, 南京 210029)

**A 摘要** 采用生物活性法和/或酶联免疫吸附法以及乳酸脱氢酶释放法,研究了人类疱疹病毒 6 型(HHV-6)南京地方株 CN8 对外周血单个核细胞(PBMCs)的 IL-6、IL-8 的诱生和 NK 活性的影响,并与国外的 GS 株作比较。结果发现,HHV-6 CN8、GS 两株病毒感染均可诱导 PBMCs 产生 IL-8,48 h 达到峰值。两株病毒所诱生的 IL-8 水平并无显著性差异( $P > 0.05$ ),并可抑制 IL-6 的产生,但 GS 株的抑制作用强于 CN8 株( $P < 0.05$ )。HHV-6 体外感染 12~24 h 可以增强 NK 活性,且 CN8 株诱导的 NK 活性高于 GS 株( $P < 0.05$ ),之后 NK 活性逐渐减弱。以上结果提示:HHV-6 感染可以通过诱生细胞因子和改变 NK 活性而影响人的免疫功能,而 A 组的 GS 株对免疫功能的抑制作用大于 B 组的 CN8 株。

**关键词** 人类疱疹病毒 6 型,外周血单个核细胞,白细胞介素-6,白细胞介素-8,自然杀伤活性

体外实验已证实人类疱疹病毒 6 型(HHV-6)主要感染 CD4<sup>+</sup> T 细胞、B 细胞、单核-巨噬细胞和 NK 细胞。由于 HHV-6 主要感染免疫活性细胞,因此研究 HHV-6 对人类免疫功能的影响就显得非常必要。我室 1994 年从南京婴幼儿急疹(ES)患儿外周血单个核细胞(PBMCs)中分离出三株 HHV-6 南京地方株 CN5、CN8 和 CN10<sup>[1]</sup>。在研究 HHV-6 CN8 株体外感染可诱生 TNF<sup>[2]</sup>的基础上,进一步研究其体外感染对 PBMCs 的 IL-6、IL-8 的诱生及 NK 活性的影响,结果如下:

## 材料和方法

### 1 HHV-6 毒株

1.1 HHV-6 GS 株 由香港大学微生物学教研室惠赠。

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获得<sup>[1]</sup>。

### 2 细胞

2.1 正常新生儿脐血单个核细胞(CBMCs) 健康产婴的脐带血由南京市妇产医院产房提供。用肝素抗凝,淋巴细胞分离液分离。细胞浓度为  $2 \times 10^6$ /mL。培养条件:20% 新生牛血清 RPMI1640,含 PHA 50  $\mu$ g/mL,IL-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  $^{\circ}$ C,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。

收稿日期:1996-10-21,修回日期:1997-01-21

\* 国家及省科委自然科学基金资助课题

2.3 B<sub>9</sub>细胞 苏州医学院免疫学教研室张学光教授惠赠。用含 250 pg/mL 的 IL-6, 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养。用于检测 IL-6。

2.4 K562 为 NK 杀伤靶细胞, 用含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养, 用于检测 NK 活性。

### 3 试剂

3.1 PHA 广州市生化制品厂产品(10 mg/支)。

3.2 IL-6 标准品 由苏州医学院免疫学教研室张学光教授惠赠。

3.3 IL-6、IL-8 双抗体夹心 ELISA 检测试剂盒 第四军医大学免疫学教研室提供。

3.4 LDH 释放法检测 NK 活性的试剂 氧化型辅酶 I, 吩噻二甲酯硫酸盐, 硝基氟化四氮唑兰, Sigma 产品, 均由本室尤丽芬教授惠赠。

### 4 IL-6 测定

4.1 生物活性法 B<sub>9</sub> 细胞培养 3 天后, 用不含 IL-6 的 RPMI1640 液洗涤 2 次以除去残存的 IL-6, 细胞浓度为  $5 \times 10^5$  个/mL, 加入 96 孔板 100  $\mu$ L/孔。再加入倍比稀释的标准品和待检样本 100  $\mu$ L/孔。37℃ 5% CO<sub>2</sub> 孵育 72 h 左右, 以对照组细胞 100% 死亡为标准。然后做 MTT 染色检测 OD 值, MTT 试验按常规操作<sup>[3]</sup>。以不同含量的 IL-6 标准品所测得的 OD 值及其对应的 IL-6 含量作标准曲线, 再根据待检标本的 OD 值从标准曲线上求出相应的 IL-6 含量。

4.2 ELISA 按试剂盒说明书操作。

### 5 IL-8 检测

ELISA 法, 按试剂盒说明书操作。

### 6 NK 活性检测

采用改良的 LDH 释放法检测细胞毒试验<sup>[4]</sup>。

### 7 统计学处理

采用配对 t 检验。

## 结 果

### 1 HHV-6 体外感染抑制 CBMCs IL-6 的分泌

1.1 HHV-6 感染对 CBMCs IL-6 分泌的影响 见表 1。CBMCs HHV-6 感染组所产生的 IL-6 水平比 CBMCs 未感染组产生的 IL-6 水平低, 且有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 其中 GS 感染组对 IL-6 分泌的抑制作用较 CN8, 感染组强 ( $P < 0.05$ )。

将 27 份标本生物活性法和 ELISA 所测得的两组对应值作直线回归分析, 结果显示  $r = 0.984$  ( $P < 0.001$ ), 表明两种方法检测结果密切相关。

1.2 无 PHA 刺激条件下 HHV-6 感染对 CBMCs IL-6 分泌的影响 见表 2。HHV-6 在 PHA 刺激后的 CBMCs 上生长较好, 但 PHA 可以刺激 CBMCs 分泌 IL-6。为了排除 PHA 对病毒感染的 CBMCs 分泌 IL-6 的干扰, 在无 PHA 刺激的情况下, 再次检测 HHV-6 对 CBMCs IL-6 分泌的影响, 发现 IL-6 总体水平比有 PHA 刺激时稍有下降, 但 HHV-6 仍然抑制 IL-6 分泌。

### 2 HHV-6 体外感染后可诱生 IL-8

2.1 HHV-6 感染对 CBMCs 分泌 IL-8 的影响 见表 3。HHV-6 GS 株和 CN<sub>8</sub> 株体外感染都可以诱生高水平的 IL-8, 与对照组比较有显著性差异 ( $P < 0.001$ ) 而两株病毒间诱生水平无差异 ( $P > 0.1$ )。

2.2 HHV-6 感染状态下 IL-8 分泌的动力学特征 见图 1。

表 1 HHV-6 感染 48 h 后对 IL-6 分泌的影响

Tab1 Effects of HHV-6 infection on IL-6 induction in CBMCs culture at 48h after inoculation

样本号 No. of cases	生物活性法 Biological activity assay (u/mL)			酶联免疫吸附 ELISA (pg/mL)		
	CBMC <sub>s</sub>	GS + CBMC <sub>s</sub>	CN8 + CBMC <sub>s</sub>	CBMC <sub>s</sub>	GS + CBMC <sub>s</sub>	CN8 + CBMC <sub>s</sub>
1	882	625	676	897	731	796
2	1807	1543	1662	1695	1598	1673
3	1735	1637	1702	1834	1403	1786
4	1371	1157	1250	1526	1238	1358
5	2327	1764	1896	2431	1916	1973
6	951	902	928	963	957	964
7	1114	974	950	1217	993	1015
8	2480	1803	1962	2370	1907	1942
9	1734	1710	1653	1856	1801	1836
均值(X±SD) Mean value	1600±570.89	1346±437.41'	1409±468.64" <sup>△</sup>	1632±556.83	394±441.40'	1483±458.16' <sup>△</sup>

\* 与未感染的 CBMCs 组比较, P<0.001  
 \* Compared with control group of CBMCs, P<0.001  
 △与 GS 感染的 CBMCs 组比较, P<0.05  
 △Compared with the group of CBMCs infected with GS strain, P<0.05

表 2 无 PHA 刺激时 HHV-6 对 IL-6 的影响  
(生物活性法)

Table 2 Effect of HHV-6 infection on IL-6 induction in CBMCs culture with no PHA (MTT)

样本号 No. of cases	CBMC <sub>s</sub> pg/mL	CN <sub>8</sub> + CBMC <sub>s</sub> pg/mL
1	1740	1598
2	1873	1620
3	1608	1289
4	1749	1617
5	1872	1836
6	1003	997
均值(x±SD) Mean value	1640±328	1492±299'

\* 与未感染的 CBMCs 组比较, P<0.05  
 \* Compared with control group of CBMCs, P<0.05

表 3 HHV-6 感染 48 h 后 CBMCs 培养上清中的 IL-8 含量

Table 3 IL-8 induction by HHV-6 in CBMCs 48 h after inoculation

样本号 No. of cases	IL-8 (pg/mL)		
	GS + CBMC <sub>s</sub>	CN8 + CBMC <sub>s</sub>	CBMC <sub>s</sub>
1	1373	1669	602
2	1349	2236	438
3	1793	1820	368
4	1046	1303	435
5	1069	1536	359
6	2236	2003	426
7	1734	1093	476
8	1239	1770	459
均数(X±SD)	1479±410"	1665±398 <sup>△</sup> "	455±75

\* 与未感染的 CBMCs 组比较, P<0.001  
 \* Compared with control group of CBMCs, P<0.001  
 △与 GS 感染组比较, P>0.1  
 Compared with the group of GS strain - infected CBMCs, P>0.1

3 HHV-6 体外感染对 NK 活性的影响

HHV-6 GS 与 CN8 感染成人外周血单个核细胞(ABMCs)24 h 后, 与对照组比较, NK 活性比对照组高, 其中 CN8 组的 NK 活性又高于 GS 组。但 72 h 之后三组的 NK 活性均有所降低, 且 CN8 和 GS 感染组与对照组之间的 NK 活性水平已无显著性差异(见表 4)。

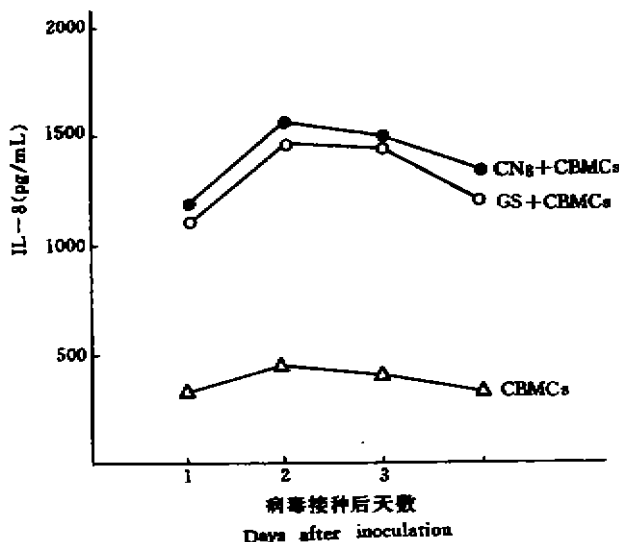


图1 HHV-6 诱生 IL-8 动力学特征

Fig 1 Kinetics of IL-8 induction by HHV-6 infected CBMCs

表4 HHV-6 感染对成人外周血细胞(ABMCs)NK 活性影响

Table 4 Effect of HHV-6 infection on the NK activity of adult peripheral blood mononuclear cells (ABMCs)

样本号 No. of cases	病毒接种后不同时间的细胞毒指数(%)					
	Index of cytotoxicity at different time after HHV-6 inoculation					
	48h			72h		
	GS+ ABMCs	CN8+ ABMCs	ABMCs	GS+ ABMCs	CN8+ ABMCs	ABMCs
1	12.00	37.50	11.39	10.00	12.00	9.10
2	18.00	19.00	12.70	11.30	9.80	9.30
3	20.00	35.00	12.48	9.45	13.60	11.20
4	17.05	28.00	13.71	10.36	9.40	12.70
5	22.00	39.00	10.52	11.02	10.60	11.40
均值(X±SD) Mean value	17.80±3.77*	31.70±8.26*△	12.16±1.23	10.43±0.75*	11.08±1.72#△	10.74±1.52

\* 与对照组比较, P<0.05  
\* Compared with control group of ABMCs, P<0.05  
△与GS组比较, P<0.05  
△Compared with the group of GS strain infected ABMCs, P<0.05

# 与对照组比较, P>0.05  
# Compared with control group of ABMCs, P>0.05  
☆与GS组比较, P>0.05  
☆Compared with the group of GS strain infected ABMCs, P>0.05

## 讨 论

从对 IL-6、IL-8 的诱生及对 NK 活性的影响的角度,研究了 HHV-6 对人类免疫功能的影响。结果证实 HHV-6 GS 株(A 型)、CN<sub>8</sub> 株(B 型)皆能诱生 IL-8,在 48 h 达到峰值,二者诱生水平无显著性差异。但 HHV-6 感染可抑制 IL-6 的分泌,其中 GS 株的抑制作用比 CN<sub>8</sub> 株强。HHV-6 感染早期可以激发 NK 活性的增高,其中 CN<sub>8</sub> 株的激发作用比 GS 株强,

但随着时间的延长,NK活性即逐渐减弱。

国外研究认为,HHV-6的A型毒株致病性强。A型的U<sub>1102</sub>株感染CD4<sup>+</sup>T细胞后,使细胞表面CD3表达明显减少,而B型的Z29株则无此作用,并认为A型毒株可导致T细胞免疫功能缺陷<sup>[5]</sup>。结果证实,A型的GS株对IL-6的诱生抑制作用比B型的CN8株强,而激发NK活性的水平则较低。从而支持国外指出的A型株比B型株更易引起人的免疫功能异常的观点。

HHV-6感染可抑制IL-6的分泌,有学者认为是由HHV-6的DNA或病毒复制引起,用磷乙酸(PAA)抑制DNA的复制后可提高IL-6的分泌量<sup>[6]</sup>。由于IL-6是一种重要的免疫分子,可促进B细胞分化和Ig分泌,与IL-2、IFN- $\gamma$ 等协同促进CTL分化,体外试验已证实IL-6可以提高LAK细胞扩增的能力和杀伤能力,具有抗癌活性。HHV-6感染人外周血之后,淋巴细胞对IL-6诱生能力受到抑制,这可能导致机体在抗病毒、抗癌等方面免疫力有所减弱,特别是在免疫异常患者体内的作用将更明显。

IL-8是新近发现的主要由单核细胞产生的一种中性粒细胞趋化因子,IL-8可趋化和激活中性粒细胞,并刺激中性粒细胞产生白三烯B<sub>4</sub>(LTB<sub>4</sub>)而使皮下血浆渗出,IL-8可以明显趋化IL-2活化的NK细胞<sup>[7]</sup>,关于HHV-6对IL-8诱生的影响,此前尚未见国内外报道,本研究首次证实HHV-6GS株和CN8株都可诱生IL-8。推测该炎性介质与ES患儿皮疹的发生(LTB<sub>4</sub>)及部分病例外周血中中性粒细胞明显增高等有重要作用,同时还可以趋化粒细胞、T细胞等免疫细胞,在HHV-6感染恢复方面可能具有重要作用。

Takahashi等<sup>[8]</sup>1992年研究了13例ES患儿急性期和恢复期NK的反应性,发现只有在急性期NK活性明显增强,特别是在发疹期。我们的体外研究结果与其基本一致。由于NK为抗病毒免疫的重要因素,因此急性期病毒激发的NK活性增强有利于病毒的清除。NK活性的增强可能与病毒诱生IL-1 $\beta$ <sup>[6]</sup>、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ 、IL-8等细胞因子有关。我们已证实,HHV-6感染可促进TNF- $\alpha$ <sup>[2]</sup>、IFN- $\alpha$ (资料待发表)、IL-8的诱生,在实验中还发现用TNF- $\alpha$ 单抗、IFN- $\alpha$ 单抗可部分减弱HHV-6激发的NK活性,但随着感染时间的延长,细胞因子分泌减少及病毒感染导致的溶细胞性损伤<sup>[9]</sup>,NK活性将逐渐减弱。

根据我们的实验结果可以推测HHV-6感染早期主要诱导免疫细胞产生TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ 、IL-8等因子,并可提高NK活性,促进机体对病毒的清除;但HHV-6也可通过抑制IL-6的分泌和其它一些机制造成机体免疫功能的抑制。因此,HHV-6感染可诱生细胞因子和改变NK活性,对病毒感染的发展和结局有重要作用。

### 参 考 文 献

- 1 陈斌,姚望,周瑶望等.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
- 2 范萍,姚望,李晓辉等.人类疱疹病毒6型可诱生TNF- $\alpha$ .中国病毒学,1996,11(4):338-342
- 3 武竹国主编.实用临床免疫学检验.南京:江苏科技出版社,1989.161
- 4 黄永芳,付苓,周燕.LDH释放法与形态学法测定细胞毒的对比研究.上海免疫学杂志,1989,9(1):16
- 5 Furukawa M, Yasukawa M, Yakushijin. Y *et al.* Distinct effects of human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 on surface molecule expression and function of CD4 T cells. J Immunol, 1994, 152 (12):5768
- 6 Flamand L, Gosselin J, D Addario M *et al.* Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha, but

- not interleukin - 6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Virol*, 1991, 65(9):5105
- 7 金伯泉主编. 细胞和分子免疫学. 西安:世界图书出版公司, 1995. 142
- 8 Takahashi - k, Segal E, Kondo T *et al*. Interferon and natural killer cell activity in patients with exanthem subitum. *Pediatric Infect Dis J*, 1992, 11(5):369
- 9 Luss P, Malhat MS, Garizano DA *et al*. Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6. *Nature*, 1993, 362(6419): 458

## Effect of HHV - 6 Infection on Cytokines IL - 6, IL - 8 Induction and NK Activity of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells

Fan Ping    Yao Kun    Ji Xiaohui    Zhou Yaoxi

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

The effects of HHV - 6 infection *in vitro* on cytokines such as IL - 6, IL - 8 synthesis and NK activity of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were studied by comparing CN8 strain with GS strain. Interleukin - 8 (IL - 8) could be detected as early as 24 h, plateaued at 48h or so by ELISA. There were significant differences of IL - 8 level between the control group and HHV - 6 GS or CN8 strain infection groups. Comparing with uninfected cells, synthesis of IL - 6 in infected cells was inhibited slightly determined by biological activity assay and ELISA. The inhibition activity of GS strain was significantly higher than that of CN8 strain. By LDH releasing assay, activity of NK was augmented 24 h after infection, then gradually decreased. The NK activity stimulated by GS strain was lower than that of CN8 strain. All these results indicated that HHV - 6 could disturb function of human immunological cells and immunity inhibition activity of GS strain (A variant) was more remarkable than that of CN8 strain (B variant).

**Key words** Human Herpesvirus type - 6, Peripheral blood mononuclear cell, Interleukin - 6, Interleukin - 8, Natural killer activity