

253-256
人类疱疹病毒6型感染细胞免疫学特性研究*

姚堃 季晓辉 赵有宏 丁如予 周瑶奎

(南京医科大学微生物学教研室, 南京 210029)

摘要 采用间接免疫荧光法、APAAP法及MTT法,研究了人类疱疹病毒6型(HHV-6)中国南京地方株CN5感染细胞病毒抗原表达的形态学和动力学特征、CD抗原表达阳性细胞百分率的变化及PHA诱导的细胞增殖反应的变化。结果显示,CN5感染脐血单个核细胞(CBMCs)后8~12h即可在细胞内检出病毒抗原,至接种后48h,病毒抗原阳性细胞可达36%;CN5感染CBMCs和成人外周血单个核细胞(PBMCs)后可引起两者CD3阳性细胞减少、CD4阳性细胞增多,而对CD2、CD8、CD45 RA阳性细胞百分率未见明显影响;CN5感染细胞裂解液对PHA诱导的PBMCs增殖反应具有抑制作用,这种抑制作用与该裂解液的蛋白浓度之间呈一剂量依赖关系,且可被HHV-6抗血清所逆转。

关键词 人类疱疹病毒6型(HHV-6), 感染细胞, 免疫学特性

人类疱疹病毒6型(HHV-6)自1986年首次分离^[1]以来,已被证实为婴幼儿急疹(exanthem subitum, ES)的主要病原因子,并因其嗜淋巴细胞特性受到广泛重视。根据其体外生长特点、对单抗的反应性及限制性内切酶酶切图谱等方面的特征可分为A、B两型^[2]。我室姚堃、陈斌等1994年报告从南京ES患儿PBMCs中分离出新的疱疹样病毒,鉴定为HHV-6 B型株^[3]。其中3株在体外培养中稳定传代,分别命名为CN5、CN8、CN10。随后研究了它对TNF- α 、IFN- α 、IL-6及IL-8等细胞因子的诱生和NK活性的影响^[4-6]。本研究以地方分离株CN5为代表,研究HHV-6感染人单个核细胞后病毒抗原表达的形态学和动力学特征、CD抗原表达阳性细胞百分率的变化及PHA诱导的细胞增殖反应的变化,以便为进一步研究HHV-6的致病性和免疫性提供参考。

材料与方 法

1 材料

1.1 病毒株 HHV-6南京地方株CN5,由我室从ES患儿急性期外周血单个核细胞中分离培养获得,在人CBMCs上传代培养。

1.2 细胞 ① CBMCs:健康产婴脐带血由南京市妇产医院产房提供,肝素抗凝,淋巴细胞分离液密度梯度离心分离单个核细胞。细胞浓度为 2×10^6 /mL。培养条件:20%新生牛血清RPMI 1640,含PHA 5 μ g/mL,IL-2 10 u/mL,青、链霉素各100 u/mL,谷氨酰胺2 mmol/L,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂进行培养。② PBMCs:取自健康成人外周血,其分离培养方法同CBMCs。

1.3 主要试剂 CD2、CD3、CD4、CD8、CD45 RA单抗,T细胞亚群检测试剂盒,羊抗兔荧光抗体均为北京邦定公司产品;MTT为Fluka产品;PHA为Sigma产品;Sepharose 4B、溴氰为瑞典Pharmacia产品。

收稿日期:1998-02-09,修回日期:1998-05-04

* 国家及省教委自然科学基金资助课题

2 方法

- 2.1 提取病毒抗原 以CN5株感染CBMCs,待CPE达50%~70%时离心收获细胞;快速冻融3次并超声粉碎;低速离心后取上清4℃ 40 000 r/min超速离心2h时。收获沉淀为病毒抗原。
- 2.2 制备抗血清 以上述病毒抗原加弗氏完全佐剂按常规方法免疫健康成年家兔。末次注射后10d放血,分离血清。以该抗血清通过偶联正常CBMCs裂解物的Sepharose 4B层析柱,以亲和层析法吸除抗细胞成份抗体。经吸收的抗血清再经Sephadex G25分子筛浓缩。以常规方法对抗血清作中和试验确定其效价。
- 2.3 间接免疫荧光法检测病毒抗原表达 CN5株感染CBMCs后分别于4、8、12、24、48h离心收集细胞,涂片。未感染的CBMCs以同法处理作为对照。用常规方法作间接免疫荧光染色,1:2000伊文思兰复染1min。荧光显微镜下观察200个细胞,计算病毒抗原阳性细胞百分率。
- 2.4 APAAP法检测CD抗原 取CN5株感染48h的CBMCs、PBMCs涂片,以同一批未感染细胞涂片作对照。采用T细胞亚群检测试剂盒,以APAAP法检测CD2、CD3、CD4、CD8、CD45 RA阳性细胞,具体操作按说明书进行。显微镜下观察200个细胞,计算阳性细胞百分率。
- 2.5 MTT法检测PHA诱导的细胞增殖反应 取未经超离心的CN5株感染CBMCs裂解液,以紫外线灭活16 J/m² 10 min。未感染CBMCs裂解液以同法处理作对照。用紫外分光光度计作蛋白定量,并调整至所需浓度。将2×10⁶个/mL的PBMCs加入96孔细胞培养板,100 μL/孔。每孔再加入裂解液、PHA(终浓度5 μg/mL)各50 μL。同时设空白对照、PHA对照。37℃、5%CO₂培养48h。于培养终止前4h加MTT试剂,按常规方法进行细胞增殖检测。

结 果

1 兔抗HHV-6 CN5株特异性多克隆抗体的获得及其荧光染色

以CN5株病毒抗原免疫所获得的抗血清,经亲和层析法吸除其中抗细胞成份抗体后,对病毒作中和试验,中和效价为1:32。在间接免疫荧光试验中只对感染细胞起反应,使细胞内染上黄绿色特异荧光;而对未感染细胞则无反应,细胞经伊文思兰染成红色,显示了满意的特异性。间接免疫荧光试验中的效价为1:4。特异荧光初见于核内呈斑块状,继而出现于胞浆中及细胞膜上,以后布满整个细胞。在涂片操作过程中感染细胞形成的合胞体极易破坏,致细胞裂解,裂解物呈荧光阳性的不规则碎片,或呈点状,或呈钩状。感染后8~12h即可见明显的病毒抗原阳性细胞,其百分率在感染后24h达14%、48%h达36%。

2 感染对CD抗原阳性细胞百分率的影响

CN5株感染8例CBMCs、5例PBMCs后48h对细胞CD抗原阳性率的影响结果见表1。

表1 感染对脐血和成人外周血单个核细胞CD抗原阳性百分率的影响

Table 1 Effects of infection on CD-Ag positive cell percentages of CBMCs and PBMCs

CD-抗原	平均CD抗原表达阳性细胞百分率(均数+标准差) Average value (X+SD) of percentages of CD-Ag positive cells			
	脐血单个核细胞(n=8) CBMCs(n=8)		成人外周血单个核细胞(n=5) PBMCs(n=5)	
	感染 Infection	未感染 Control	感染 Infection	未感染 Control
CD2	67.14±5.51	65.35±6.84	72.30±3.06	71.42±3.08
CD3	51.19±8.89*	67.74±6.17	44.07±6.27*	62.02±8.05
CD4	49.80±8.06*	41.02±6.99	56.17±2.36*	42.37±2.44
CD8	25.22±4.41	23.93±3.60	23.38±2.49	23.29±2.45
CD45RA	71.04±2.21	71.07±2.78	63.71±3.09	63.09±12.09

*: 与对照组比较, P<0.05. Compared with control group, P<0.05.

3 感染对 PHA 诱导的 PBMCs 增殖的抑制

3.1 CNS 株感染的 CBMCs 裂解液, 在 1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白浓度水平上, 对 PHA 诱导的 9 例 PBMCs 增殖反应的影响见表 2。

表 2 蛋白浓度 1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的感染细胞裂解液对 PBMCs 增殖反应的影响

Table 2 Effect of cell lysate on proliferation of PBMCs of adult

组别 No. of group	处理因素 Treatment factor	平均 570 nm 处吸光度(均数 + 标准差) Average value (X + SD) of 570 nm absorption
1	PHA	0.480 + 0.154
2	PHA + 感染细胞裂解液 PHA + infected cell lysate	0.325 + 0.110 * #
3	PHA + 正常细胞裂解液 PHA + normal cell lysate	0.415 + 0.143 *

* : 与 PHA 对照组比较, $P < 0.05$ Compared with PHA control group, $P < 0.05$

: 与正常细胞裂解液比较, $P < 0.05$. Compared with the group of normal cell lysate, $P < 0.05$.

3.2 感染细胞裂解液蛋白浓度对增殖抑制强度的影响结果见图 1。

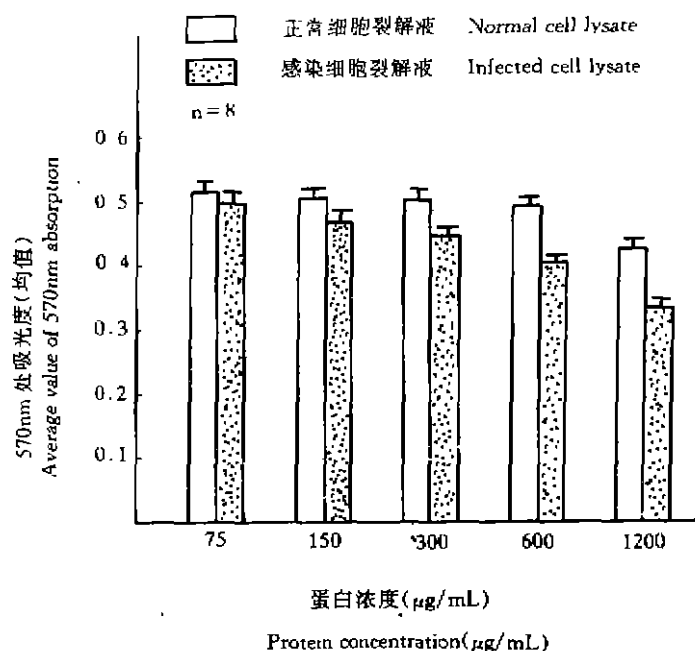


图 1 感染细胞裂解液不同蛋白浓度对 PBMCs 增殖反应的影响

Fig 1 Effect of protein concentration of infected cell lysate on proliferation of PBMCs

以裂解液蛋白浓度的对数与相应的 A 值进行相关分析, 结果显示, 感染细胞裂解液蛋白浓度与 A 值呈负相关, $r = -0.968$, $p < 0.05$; 而对照细胞裂解液蛋白浓度与 A 值之间相关性不明显, $r = -0.517$, $p > 0.05$ 。

3.3 兔抗 HHV-6 CNS 抗血清, 对 1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白浓度的感染细胞裂解液抑制 PBMCs 增殖

反应。其影响见表3。

表3 兔抗HHV-6抗血清对感染细胞裂解液抑制PBMCs增殖作用的影响
Table 3 Effect of rabbit antiserum to HHV-6 CN5 strain on suppressive proliferation of PBMCs by the infected cell lysate

分组(每组3例) Groups(each n=3)	570 nm 处吸光度均值 Mean of 570 nm absorption	与对照组的比率(%) Ratio to control(%)
PHA 刺激组 PHA-stimulated	0.642 ± 0.036	100
PHA + 感染细胞裂解液 PHA + infected cell lysate	0.420 ± 0.044	65.2
PHA + 感染细胞裂解液 + 1:4 抗血清 PHA + infected cell lysate + 1:4 antiserum	0.543 ± 0.051	84.6

讨 论

1 HHV-6 抗血清的制备与纯化

HHV-6 以细胞间接触感染为主要传播方式,细胞内病毒较培养上清中高 10~100 倍。在提取病毒抗原时,我们选择了反复冻融加超声粉碎的方法,以便细胞内病毒成分充分释放。但其中必然混有细胞成分,因而免疫血清中同时含有病毒抗体和细胞抗体。为除去细胞抗体,用偶联了正常细胞成分的亲和层析柱对抗血清进行纯化。该抗血清在免疫荧光试验中获得了较满意的效果。这一方法可为今后这方面的工作提供一些有益的参考。

2 感染后细胞中病毒抗原的表达

在实验中观察到的 CN5 株感染后 CBMCs 中病毒抗原表达的特点,与国外文献报道的 HHV-6 抗原表达的特点基本一致^[3]。我们还发现,CN5 感染后细胞病变的程度与抗原表达的情况并不一致。例如,感染后 48 h,细胞病变范围已达 70%~80%,而荧光阳性细胞只占 30%~40%。其原因是,疱疹病毒感染后出现的这种大气球样细胞病变,并不需要感染性病毒颗粒的直接参与,而与感染过程中释放的某种病毒代谢产物有关^[7]。表明细胞病变的程度并不能反映病毒复制的情况。

3 CN5 株感染对 CD 抗原表达的影响

淋巴细胞表面 CD 抗原的表达是淋巴细胞分化的一个重要标志。实验发现,CN5 株感染 CBMCs、PBMCs 48 h 后均可导致 CD3 阳性细胞减少、CD4 阳性细胞增多,CD2、CD8、CD45 RA 表达细胞的百分率未见明显改变。这一结果提示,HHV-6 感染可通过降低 CD3 表达阳性细胞百分率、提高 CD4 表达阳性细胞百分率,影响淋巴细胞乃至机体的免疫功能^[8]。关于 CD3 减少、CD4 增多的原因,目前尚不清楚。

4 CN5 株感染对 PBMCs 增殖的影响

本研究显示,CN5 感染细胞裂解液,对 PHA 引起的 PBMCs 增殖反应,具有裂解液蛋白浓度依赖的抑制作用,且可被免疫血清部分解除;正常 CBMCs 裂解液在 1200 μg/mL 高蛋白浓度下,对 PBMCs 的增殖也有一定程度的抑制,但随着蛋白浓度的降低,其强度迅速减弱,剂量依赖关系不明显。Horvat 等^[9]也报道了类似结果。感染细胞裂解液对淋巴细胞增殖反应的抑制作用,或许可以反映病毒感染对免疫功能的抑制性影响。淋巴细胞增殖受抑的机制尚

不清楚,推测可能存在某种与细胞相关的抑制蛋白,正常细胞内即有一定水平的表达,HHV-6感染后表达量显著增高,从而出现明显的细胞增殖抑制作用。

参 考 文 献

- 1 Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD *et al.* Isolation of a new virus, HBLV, in patient with lympho-proliferation disorders. *Science*, 1986, 234 (4776): 596
- 2 范萍,姚望,周瑶玺. 人类疱疹病毒 6 型的分群及其意见. 国外医学微生物学分册, 1996, 11(2): 8
- 3 陈斌,姚望,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
- 4 范萍,姚望,季晓辉等. 人类疱疹病毒 6 型可诱生 TNF- α . 中国病毒学, 1996, 11(4): 338
- 5 范萍,姚望,季晓辉等. 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. 中国病毒学, 1997, 12(3): 229
- 6 姚望,范萍,季晓辉等. 人类疱疹病毒 6 型刺激人脐带血单个核细胞产生 α -干扰素的研究. 上海免疫学杂志, 1998, 18(1): 23
- 7 Darlington RW, Granoff A. Replication: biological aspects. In: Kaplan AS ed. *The herpesviruses*. New York: Academic Press Inc. 1973: 112
- 8 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
- 9 Horvat RT, Parmely MJ, Chandran B *et al.* Human herpesvirus 6 inhibits the proliferation response of human peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis*, 1993, 167(6): 1274

Studies on Some Immunological Properties of HHV-6 Infected Cells

Zhao Bei Yao Kun Ji Xiaohui *et al*

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

Abstract The local strain of human herpesvirus 6 (HHV-6), named CN5, was used to study some immunological properties of infected cells. By the methods of indirect immunofluorescence test, APAAP and MTT, the morphological and kinetic character of viral antigen expression, the changes of CD-antigens expressions and the cellular proliferation reaction induced by PHA were detected. The viral antigens were appeared in cord blood mononuclear cells (CBMCs) 8 - 12 hours after infection. By 48 hours positive cells reached 36%. After CN5 infection, in both cases of CBMCs and adult peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), the CD3 positive cells decreased while the CD4 positive cells increased. No significant changes were found in the percentages of CD2, CD8 and CD45 RA positive cells. CN5-infected cell lysates inhibited the proliferation of PBMCs induced by PHA in a protein concentration-dependent pattern, and this inhibition could be partially eradicated by the antisera to HHV-6.

Key words Human herpesvirus (HHV-6), Infected cells, Immunological characters