

323 329

3

R373.11

人类疱疹病毒7型体外生长特点的研究*

彭光勇¹, 姚堃¹, 任强¹, 季晓辉¹, 乐美兆²¹(南京医科大学微生物与免疫学教研室, 南京 210029)²(解放军第八一医院电镜室, 南京 210002)

摘要:研究了人类疱疹病毒7型(HHV-7)南京株 YY5 在脐血单个核细胞(CBMCs)及 SUPT1 细胞株上生长特点。观察病毒感染细胞后不同时间病变效应程度, 记数死亡细胞百分率, 间接免疫荧光染色记数抗原表达阳性细胞数, 并用透射电镜观察病毒感染细胞超微结构变化及病毒复制不同时期的特点。结果发现: HHV-7 在 CBMCs 及 SUPT1 上出现 CPE 时间迟于 HHV-6, 且 CPE 程度也低于 HHV-6; HHV-7 在 SUPT1 细胞上尽管有 CPE 及抗原表达, 但很难找到成熟的病毒颗粒; 电镜下, 病毒主要存在于肿胀的病变细胞内, 且病毒感染细胞常出现核染色质聚集, 核固缩, 及胞浆细胞器空泡化, 细胞裂解等特点; 成熟的 HHV-7 颗粒直径约 170-190 nm, 核衣壳约 90-100 nm, 核衣壳内致密核心约 40 nm, 核衣壳与包膜之间是丰富的被膜约 30-35 nm, 包膜上有刺突。HHV-7 常发现无核心的病毒颗粒。

关键词:人类疱疹病毒6,7型; 病毒复制; 细胞病变效应; 生长特点**中图分类号:** R373.11 | **文献标识码** | **文章编号:** 1003-5125(2000)04-0323-07

人类疱疹病毒7型(Human herpesvirus 7, HHV-7)是1990年由Frenkel等首次从健康人外周血单个核细胞(PBMC)中分离出, 是继HHV-6后又一新的人类 β -疱疹病毒^[1]。目前研究发现, 尽管HHV-6和HHV-7的DNA序列同源性达50-60%, 氨基酸序列同源性也高达53.4%, 且抗原性亦有部分交叉^[2]; 但体外生长特点存在一定的区别, HHV-7细胞亲嗜性不如HHV-6那样广泛, 仅感染CD4⁺T淋巴细胞, 感染后能使细胞表面CD4分子明显下调, 且CD4分子是HHV-7特异性受体^[3-4], 脐血单个核细胞(CBMCs)是其体外培养最佳细胞, 另SUPT1细胞株是HHV-7唯一敏感细胞株。我室于1998年从肾病患者及健康人唾液中分离出HHV-7南京地方株YY1、YY2、YY5、YY6四株^[5]。本文研究了YY5株在CBMCs及SUPT1细胞上生长特点及病毒的超微结构, 为今后进一步研究HHV-7打下基础。

1 材料与方法

1.1 病毒和细胞

1.1.1 YY5株: 我室从一肾病患者唾液中分离的HHV-7南京地方株^[5]。取患儿唾液2-3 mL, 用抗生素处理放4℃过液, 2000 r/min离心20 min, 取上清接种于已用PHA预刺激的CBMCs中, 逐日观察, 出现CPE者

收稿日期: 1999-09-06, 修回日期: 1999-11-05

* 基金项目: 江苏省自然科学基金资助(BK97051)

作者简介: 彭光勇(1970年-), 男, 江苏建湖县人, 博士生, 主要从事病毒免疫研究工作。

继续传代,并通过生长特点、电镜、特异性单克隆抗体 KR-4 免疫荧光染色、对 SUPT1、HSI32、JJHAN 3 个 T 淋巴细胞株的不同亲嗜性及特异性巢式 PCR 基因扩增结果等作鉴定。

1.1.2 人脐血单个核细胞(CBMCs):南京妇幼保健院提供脐血,肝素(62.5 u/mL)抗凝,Ficoll 分离,在淋巴细胞生长液中培养。培养条件:20%新生牛血清的 RPMI1640,含 PHA 40 μ g/mL,IL-2 10 u/mL,谷氨酰胺 2 mmol/L,青、链霉素各 100 u/mL。

1.1.3 SUPT1 细胞系:来自何杰金氏淋巴瘤患儿,为不成熟 T 淋巴母细胞株,香港大学微生物系惠赠,用含 10%新生牛血清的 RPMI 1640 传代培养。

1.2 试剂

PHA:广州市生化制品厂产品(10 mg/支)。rIL-2:Sigma 公司产品。HHV-7 单克隆抗体 KR-4:日本大阪大学医学部山西弘一教授惠赠,浓度 1 mg/mL。异硫氰酸荧光素标记羊抗鼠 IgG 抗体:上海华美生物制品公司产品,工作效价 1:50。台盼蓝试剂:Sigma 公司产品。

1.3 标本处理

将 SUPT1 细胞及 PHA 预刺激的 CBMCs 调浓度为 1×10^6 细胞/mL,接种 100 TCID₅₀/mL YY5 病毒,用含 5%胎牛血清 RPMI1640 维持液培养。分别于接种后不同天数,观察细胞病变效应(CPE)程度;收集感染细胞进行台盼蓝染色计数死细胞数;调细胞数至 1×10^4 /mL,制成细胞涂片;并于 CPE 最明显时收集细胞,制超薄切片电镜观察。

1.4 死细胞计数

用 0.4%台盼蓝试剂染细胞 1 min,于光镜下计数 500 个细胞,计算死细胞百分率。

1.5 间接免疫荧光染色

用上述制成的细胞涂片,冷丙酮固定 10 min,10%小牛血清的 PBS 封闭 20 min,加入 HHV-7 KR-4 单抗 37 $^{\circ}$ C 45 min,PBS 洗涤,加入异硫氰酸荧光素标记羊抗鼠 IgG 第二抗体 37 $^{\circ}$ C 45 min,0.01%伊文斯蓝复染 20 s,PBS 冲洗,自然干燥后荧光显微镜下观察。红色细胞为阴性细胞,明亮的黄绿色细胞为阳性细胞,数 500 个细胞并计算阳性细胞百分率。

1.6 电镜观察

取出现明显 CPE 的感染 SUPT1 细胞和 CBMCs,3000 r/min 30 min,弃上清,沿管壁缓缓加入 4%戊二醛(pH7.4 PBS 缓冲液配制)固定,用 1%锇酸后固定,0.1 mol/L PBS 漂洗,梯度酒精脱水,环氧树脂 Epon 812 浸透包埋,聚合后行超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅染色,透射电镜观察。

2 结果

2.1 HHV-7 YY5 在 CBMCs 及 SUPT1 细胞形成 CPE 特点

稳定传代的 YY5 株在预激活的 CBMCs 约第 4 天开始出现 CPE,以后逐渐增加,约在第 6-8 天 CPE 细胞出现 40%左右;同时开始出现细胞皱缩变小,折光性减低,胞浆内颗粒增多,细胞开始裂解,出现大量细胞碎片,到第 8 天死亡细胞达 31.5%(见表 1)。初次分离的病毒在 PHA 预刺激的 CBMCs 中,接种后 8-14 d 才出现 PCE,10 d 左右 CPE 细胞达到高峰。典型的 CPE 为:细胞形态变圆,透亮,折光性强,体积明显增大,成气球样变,多个巨大细胞可融合成合胞体(见图 1)。

稳定传代的 YY5 株接种 SUPT1 细胞,接种后第 3 天开始出现少量 CPE 细胞,于第 8-10 天 CPE 细胞达到峰值,细胞病变特点同在 CBMCs 上类似(见图 1,表 1)。

2.2 HHV-7 YY5 在 SUPT1 细胞上抗原表达情况

用 HHV-7 单抗 KR-4 免疫荧光染色发现,在肿胀的病变细胞及合胞体上出现强烈明亮的黄绿色荧光,但荧光阳性细胞百分数低于相应时间的 CPE 百分数(见图 1,表 1)。

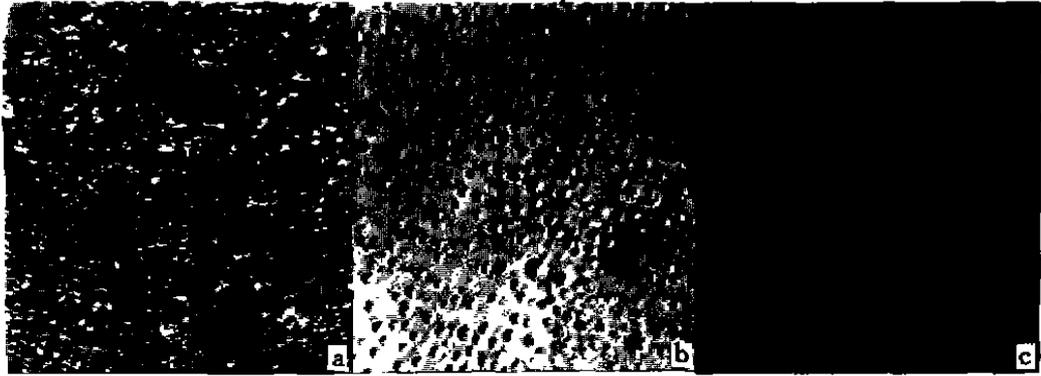


图 1 YY5 株在 CBMCs(a)及 SUPT1 细胞(b-c)上病变效应。a. YY5 感染引起细胞气球样变及形成合胞体($\times 200$); b. 形成大的气球样细胞($\times 200$); c. HHV-7 单抗荧光染色阳性大细胞($\times 800$)

Fig. 1 CPE of YY5 in CBMCs (a) and SUPT1 (b-c) cells.

a. showing ballooning cells ($\times 200$) and Forming syncytia ($\times 200$);

b. Showing densely granulated giant cells ($\times 200$);

c fluorescent McAb staining of YY5 infected giant cell ($\times 800$).

表 1 YY5 株在 SUPT1 及 CBMCs 上生长情况

Table 1 Growth characteristics of YY5 in SUPT1 cells and CBMCs

细胞(cells) 天数(days)	SUPT ₁ cells				CBMCs			
	D3	D5	D8	D10	D2	D4	D6	D8
细胞病变效应 (CPE)	±	+	2+	2+ ⁺	-	+	2+	2+
死亡细胞(%) (% dead cells)	3.4	9.8	16.6	21.5	5.0	7.5	19.0	31.5
荧光阳性细胞(%) (% Fluorescing cells)	2.3	8.4	17.5	25.0	ND	ND	ND	NIJ

±: CPE cells < 5%; +: CPE cell 5-25%; 2+: CPE cells 25-40%; 2+⁺: CPE cells 40-60%. ND: Not detected.

2.3 电镜观察

2.3.1 细胞的改变

电镜观察发现,成熟病毒颗粒主要存在于肿胀的细胞浆中或合胞体内,完整合胞体细胞出现多形态的核,细胞核内异染色质聚集成团块状,靠近核膜,核成固缩状;细胞浆内光滑的囊泡状结构增多,同时可见大量空泡(见图 2a, 4b)。许多大的合胞体空泡化增多,使细胞膜逐渐断裂,出现典型的细胞溶解特征。小的单个散在的细胞内很少见到病毒颗粒,小细胞裂解少见,偶见呈凋亡状态。在少数大细胞的胞浆内,可见到电子致密小体(180-300 nm),这些致密小体有一层很薄的膜,里面填充大量的致密物质,可能是由于病毒复制合成过多的结构蛋白所致^[10](见图 2b)。

2.3.2 病毒的改变

在 SUPT1 细胞上,我们观察了 6 份标本,在核内见到病毒核衣壳样颗粒(见图 3),但核衣壳内的核心并不明显,在胞浆及细胞外都没找到成熟的 HHV-7 病毒颗粒,提示 HHV-7 在 SUPT1 细胞上存在着复制的缺陷。在 CBMCs 上可见到复制各期的 HHV-7 病毒颗粒。成熟

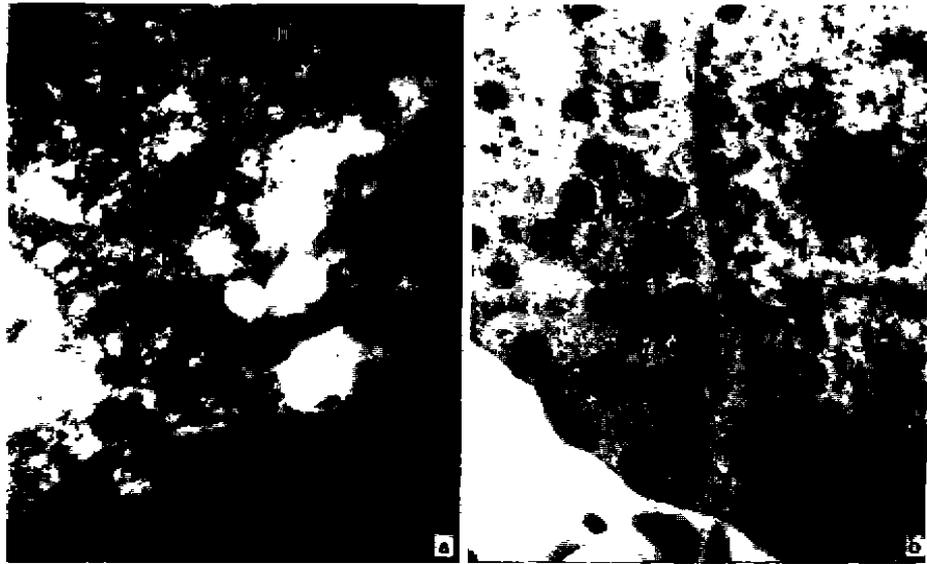


图2 a. YY5 感染的细胞显示核染色质聚集, 向核膜靠拢, 胞浆空泡化。胞浆中有一被膜包着的病毒颗粒($\times 33,000$)。b. 胞浆中电子致密小体($\times 33,000$)

Fig.2 a. YY5 infected cells showing chromatin clumping and margination, vacuolized cytoplasm, and a tegument-coated virion free in the cytoplasm ($\times 33,000$). b. Cytoplasmatic electron-dense bodies ($\times 33,000$).

的 HHV-7 核衣壳直径约 90~100 nm, 里面是一个致密的核心约 40 nm, HHV-7 病毒的核心呈多形状, 大多数呈环状, 部分呈“Z”形及颗粒状核心, 核衣壳外是一层很丰富的被膜 (tegument), 约 30 nm, 布满核衣壳与包膜之间, 被膜外是病毒的包膜, 包膜上有许多刺突, 整个成熟的病毒颗粒直径约 170~190 nm。我们还观察到许多没有核心或核衣壳的成熟 HHV-7 病毒颗粒, 说明 HHV-7 在装配过程中出现了差错 (见图 4, 5)。

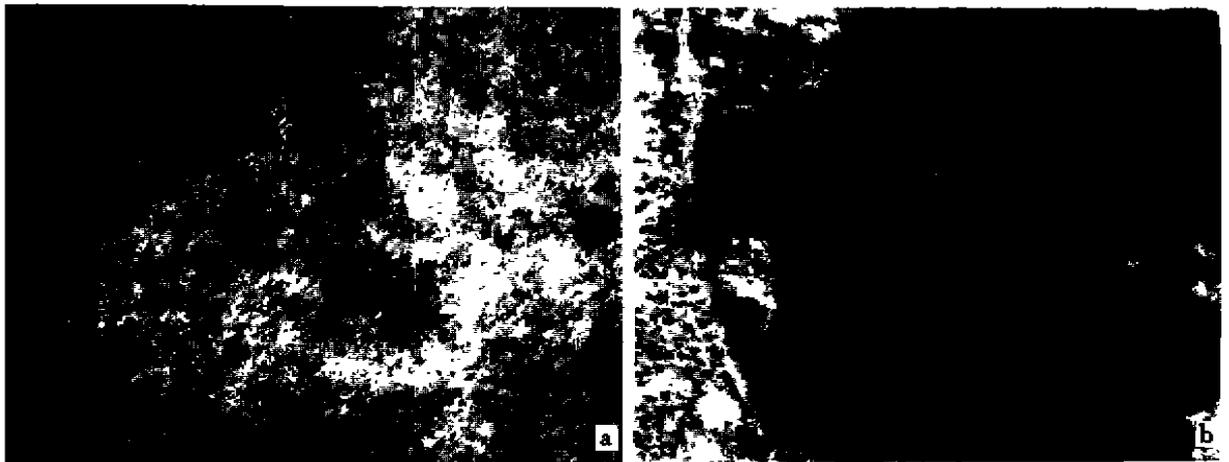


图3 a. 细胞核内病毒“核衣壳样颗粒”, 核心不明显($\times 33,000$)。b. 有一正准备穿核膜的“核衣壳样颗粒”, 无被膜包裹($\times 33,000$)

Fig.3 a. Intranuclear “nucleocapsids-like granules” with undistinct cores ($\times 33,000$). b. A “nucleocapsid-like granule” drawing close to nuclear membrane without tegument ($\times 33,000$).

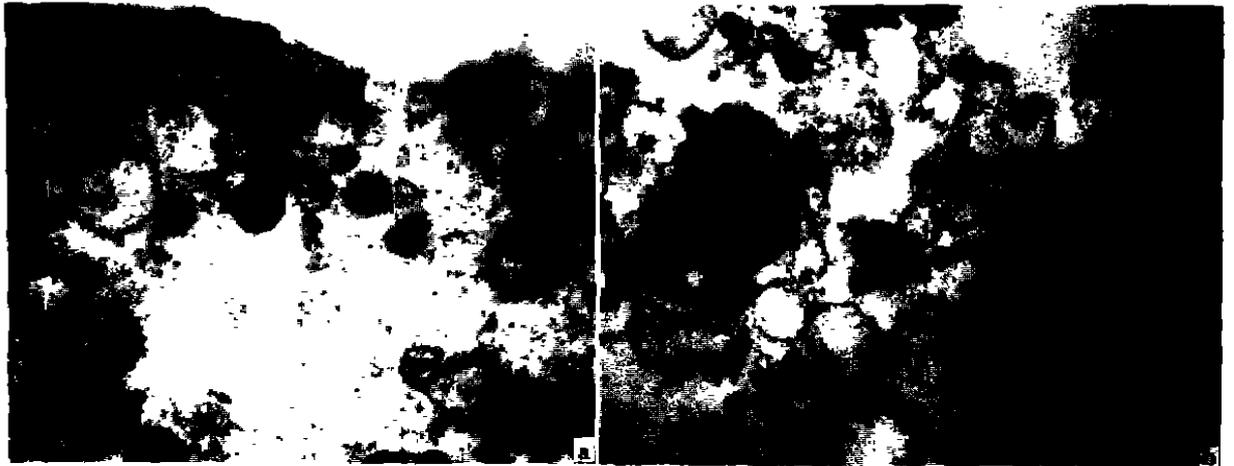


图 4 a. 胞浆内具有不同形状核心的病毒颗粒 ($\times 33,000$)。

b. 胞浆内见有核心和无核心的病毒颗粒,同时可见胞浆大量空泡形成 ($\times 33,000$)

Fig. 4 a. Virions in the cytoplasm with cores of different shapes ($\times 33,000$).

b. Virions in the cytoplasm with or without visible core, and vacuolization of cytoplasm ($\times 33,000$).



图 5 示崩解细胞浆内的病毒颗粒 ($\times 33,000$)

Fig. 5 Virions in the cytoplasm of a necrosis cell ($\times 33,000$)

HHV-7 核衣壳的装配是在细胞核内进行,可能是通过核膜时获得被膜,因为我们观察到核膜边正准备穿核膜的病毒核衣壳并没见到带有被膜(见图 3b)。在细胞浆内,带有被膜的 HHV-7 颗粒常以出芽方式进入光滑的囊泡状细胞器内,HHV-7 可能从该囊泡内获得包膜,或者囊泡状结构是 HHV-7 载体,使之向细胞膜靠拢,成熟颗粒然后以出芽方式释放出细胞外^[10],我们没有观察到此现象。

3 讨论

HHV-6, HHV-7 是近年发现的人类 β -疱疹病毒,两者都能感染淋巴细胞,都以潜伏状态普遍存在于人体中。在 PHA 预刺激的 CBMCs 原代培养中,HHV-7 CPE 出现时间(8-12 d),显著迟于 HHV-6(5-8 d);反复传代后,CPE 高峰时间相对缩短,HHV-7 为 4-8 d,而 HHV-6 在 24 h 即可出现 CPE,3-5 d 为 CPE 最高峰;在 CPE 量上,HHV-7 无论在 CBMCs 还是 SUPT1 细胞,其 CPE 高峰时仅达 40% 左右,而 HHV-6 在 CBMCs 及敏感细胞株 HSB2 和 JJHAN 上,高峰时 CPE 可达 80%^[5-7],可见 HHV-7 体外增殖程度明显低于 HHV-6,电镜下不易找到 HHV-7 病毒颗粒也证实了这一点。在 HHV-7 YY5 感染的 SUPT1 细胞中,HHV-7 抗原表达的荧光细胞数低于 CPE 的细胞数,这可能与单抗性质及病毒感染引起非特异性 CPE 有关^[7]。

本实验发现,YY5 感染 CBMCs 可引起细胞气球样变及形成大的合胞体,且病毒主要在合胞体细胞中复制,并使合胞体细胞裂解。间接免疫荧光染色 SUPT1 细胞发现,大的合胞体上出现荧光强度显著高于小的细胞,说明有大量 HHV-7 抗原表达。Secchiero^[8]等研究发现,HHV-7 感染 CD4⁺ T 细胞和 SUPT1 细胞,病毒感染细胞大量裂解坏死,而小细胞很少发现病毒颗粒且主要通过凋亡而死亡,这同本文观察结果相一致。另外本实验还发现,尽管 SUPT1 是 HHV-7 敏感细胞株,病毒感染后出现明显的 CPE 及荧光染色表达大量的 HHV-7 抗原,但奇怪的是,在 SUPT1 细胞上病毒复制主要停留在核衣壳阶段,很难发现成熟的病毒颗粒,提示 HHV-7 在 SUPT1 细胞上可能存在着复制缺陷,要获得高滴度成熟的 HHV-7 还需在 CD4⁺ 的成熟淋巴细胞上培养^[9-10]。

在超微结构上,成熟的 HHV-7 病毒颗粒和 HHV-6 非常相似,但 HHV-7 比 HHV-6 有着更为丰富明显的绒毛状被膜^[10]。另外 HHV-7 经常发现无核心的病毒核衣壳,而 HHV-6 较为少见,这可能一方面 HHV-7 本身复制存在着缺陷,导致无 DNA 装配,另一方面可能是病毒感染触发了细胞凋亡而干扰病毒 DNA 复制,导致形成许多空的病毒核衣壳^[8,10];另在胞浆中见到由病毒过多合成结构蛋白而形成的致密小体,进一步说明 HHV-7 在体外生长极易受各种因素的影响,而发生流产性复制,其确切的原因有待于进一步研究。

HHV-7 主要潜伏于唾液腺中,是健康人唾液中栖居的微生物之一,目前除婴儿急疹外,还没发现其它任何疾病同 HHV-7 存在着必然的关系^[5]。本文为进一步研究 HHV-7 致病性及免疫学特性奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS, *et al.* Isolation of a new herpesvirus from CD4⁺ T cells [J]. *Proc Natl Sci USA*, 1990, 87(1):748
- [2] Singer O, Frenkel N. Human herpesvirus 7 (HHV-7) DNA analyses of clones spanning the entire genome [J]. *Arch Virol*, 1997, 142:287-303
- [3] 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 cell [J]. *J Immunol*, 1994, 152(3):5768-5774
- [4] Lusso P, Secchiero P, Crowley RW, *et al.* CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: Interference with human immunodeficiency virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(4):3872-3876

- [5] 姚莹,任强,彭光勇,等.人类疱疹病毒7型南京株的分离及初步鉴定[J].南京医科大学学报,1998,18(3):170-172
- [6] 陈斌,姚莹,周瑞翌,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[J].中国病毒学,1996,11(2):125
- [7] Osman H.K, Wells C, Baboonian C, *et al.* Growth characteristics of Human herpesvirus 6: Comparison of antigen production in two cell lines [J]. J Med Virol, 1993, 39:303-311
- [8] Secchiero P, Flamand L, Gibellini D, *et al.* Human herpesvirus 7 induces CD4⁺ T cell death by two distinct mechanisms: Necrotic lysis in productively infected cells and apoptosis in uninfected or nonproductively infected cells [J]. Blood, 1997, 90(1):4502-4512
- [9] Secchiero P, Berneman Z N, Gallo R. C, *et al.* Biological and molecular characteristics of Human herpesvirus 7: In vitro growth optimization and development of a syncytia inhibition test [J]. Virology, 1994, 202:506-512
- [10] Klussmann J. P, Krueger E, Sloots T, *et al.* Ultrastructural study of human herpesvirus 7 replication in tissue culture [J]. Virchows Arch, 1997, 430(5):417-426

Studies on Growth Characteristics of Human Herpesvirus 7 *in vitro*

PENG Guang-yong, YAO Kun, REN Qiang, *et al*

(Department of Microbiology and Immunology, Nanjin Medical University, Nanjin 210029, China)

Abstract: The growth characteristics of Human herpesvirus 7 local strain YY5 were investigated in cord blood mononuclear cells (CBMCs) and CD4⁺ lymphoblastic cell line-SUPT1. Virus growth was demonstrated by cytopathic effect (CPE), percentage of dead cells count, indirect immunofluorescence test with viral antigen expression at different days post infection. At the same time, ultrastructural appearance of infected cells and of HHV-7 in various period were investigated by transmission electron microscopy. The results are as follows: (1) The CPE peak time of HHV-7 was latter than that of HHV-6, and CPE of HHV-7 was less pronounced. (2) Although the CPE was obvious and the viral antigen was found in SUPT1 cells, mature virus particles were hardly observed intra and extra these cells. (3) The virions mainly laid in the giant syncytia. HHV-7 infected cells exhibited heterochromatin clumping and margination or pyknosis, vacuolized cytoplasm, discontinuation of the plasma membrane and necrosis. (4) Mature virus particles were approximately 170~190 nm in diameter, with capsid of 90~100 nm, which had a electron dense core about 40 nm, and a tegument between capsid and envelop, about 30~35 nm, and spikes on the surface of envelope. The nucleocapsids of HHV-7 without a visible core were frequently found.

Key words: Human herpesvirus 6 and 7; Viral replication; Cytopathic effect, Growth characteristic