

# 人类疱疹病毒7型感染脐血 单个核细胞产生 TNF- $\alpha$ \*

R 373.11

彭光勇 姚堃<sup>✓</sup> 任强 季晓辉

(南京医科大学微生物教研室, 南京 210029)

**摘要** 用生物活性法, 检测人类疱疹病毒7型 Glasgow 株和南京地方株 YY<sub>5</sub> 及 HHV-6 GS 株感染单个核细胞培养上清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的水平。结果发现, HHV-7 也能较强烈地诱生 TNF- $\alpha$ , 但达到峰值时间(3~4 d)迟于 HHV-6 GS 株(2 d); 在感染 24 h 上清中, GS 株产生 TNF- $\alpha$  量明显多于 YY<sub>5</sub> 株、Glasgow 株产生量( $P < 0.05$ ), 三者与未感染单个核细胞比较都存在显著差异( $P < 0.05$ ), 但 Glasgow 株和 YY<sub>5</sub> 株之间无差异( $P > 0.05$ )。结果表明, HHV-6、HHV-7 都能通过刺激单个核细胞产生 TNF- $\alpha$  而发挥免疫调节功能。

**关键词** 人类疱疹病毒6型(HHV-6), 人类疱疹病毒7型(HHV-7), 肿瘤坏死因子- $\alpha$ , 病毒感染  
HHV-7, TNF- $\alpha$ , 免疫学特征, 脐血, 单个核细胞

人类疱疹病毒7型(HHV-7)是继 HHV-6 之后发现的又一亲淋巴细胞的人类  $\beta$ -疱疹病毒。1990年 Frenkel 等首先从健康人外周血单个核细胞(PBMC)中分离出 RK 株<sup>[1]</sup>, 随后陆续报道从慢性疲劳综合症(CFS)患者、婴儿急疹(ES)、肾移植病人等 PBMC 中及健康人唾液中分离出 HHV-7 多株。目前有关 HHV-7 基因结构和功能研究较多, 但对其免疫学特征及其致病机理研究甚少。我们对 HHV-7 南京地方株 YY<sub>5</sub> 及 Glasgow 标准株、HHV-6 GS 株感染脐血单个核细胞, 诱生 TNF- $\alpha$  情况进行了研究, 并对其免疫机理作了初步探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒

1.1.1 HHV-6 GS 标准株 由香港大学微生物教研室惠赠, 在 HSB<sub>2</sub> 及 JJHAN 细胞株上传代。

1.1.2 HHV-7 Glasgow 标准株 由香港大学 Dr. Pei Ris 提供, 在 SuPT<sub>1</sub> 细胞上传代。

1.1.3 YY<sub>5</sub> 株 我室从一肾病患儿唾液中分离的南京地方株<sup>[2]</sup>。取患者唾液 2~3 mL, 用抗生素处理放 4℃ 过夜, 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 者继续传代。并通过电镜观察、特异性单克隆抗体 K-R<sub>4</sub> 免疫荧光染色, 对 SupT<sub>1</sub>、HSB<sub>2</sub>、JJHAN 3 个 T 淋巴细胞株的不同亲嗜性及特异性巢式 PCR 基因扩增等作鉴定。

### 1.2 细胞

1.2.1 人脐血单个核细胞(CBMCs) 南京妇幼保健院提供脐血, 肝素抗凝, Ficoll 分离, 在淋巴细胞生长液中培养。

1.2.2 成人外周血单个核细胞(PBMCs) 取健康成人外周血, 其分离培养方法同 CBMCs。

收稿日期: 1998-12-03, 修回日期: 1999-05-20

\* 本课题由江苏省自然科学基金资助(BK97051)

1.2.3 SupT<sub>1</sub>、HSB<sub>2</sub>、JJHAN 细胞系 均来自香港大学微生物教研室,本室传代培养。

1.2.4 L<sub>929</sub>细胞 南京军区军事医学研究所提供,本室传代培养。

### 1.3 试剂

1.3.1 淋巴细胞培养液 20%新生牛血清的 RPMI 1640,含 PHA 40  $\mu$ g/mL, IL-2 10 u/mL,谷氨酰胺 2 mmol/L,青、链霉素各 100 u/mL。

1.3.2 TNF 标准品 为重组人 TNF- $\alpha$ ,南京大学生化系惠赠。

1.3.3 TNF- $\alpha$  单克隆抗体 第四军医大学免疫学教研室惠赠,中和试验工作浓度为 1:50。

### 1.4 方法

1.4.1 标本的处理 用淋巴细胞生长液调分离的 CBMCs 或 PBMCs 为  $2 \times 10^6$  细胞/mL,接种病毒量为 100 TCID<sub>50</sub>/mL,并以同一批 CBMCs 或 PBMCs 同样条件作为未感染细胞对照,收集感染后的 24、48、72、96、120 h 培养上清, -70  $^{\circ}$ C 冻存待测。

1.4.2 TNF 生物活性法检测 参考文献[3]。L<sub>929</sub>细胞长成单层后用 0.02% EDTA 消化,调细胞浓度  $5 \times 10^5$  细胞/mL 加入 96 孔细胞培养板中,100  $\mu$ L/孔,37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 孵育 18 h 后去上清,加入倍比稀释的标本及标准品 100  $\mu$ L/孔,同时加入 2  $\mu$ g/mL 放线菌素 D,100  $\mu$ L/孔,37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 孵育 18 h 后去上清,结晶紫染色 20 min,流水洗净细胞外结晶紫,用结晶紫抽提液 100  $\mu$ L/孔溶解,5 min 后 570 nm 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。

### 1.5 数据统计处理

采用两样本均数比较的 t 检验。

## 2 结果

### 2.1 HHV-6 GS 株、HHV-7 Glasgow 株、YY<sub>5</sub> 株诱导 CBMCs 产生 TNF- $\alpha$ 动力学特征

结果见图 1。可看出在病毒感染 CBMCs 24 h 后,HHV-6 GS 株即能明显诱导 TNF- $\alpha$  产生,48 h 左右达高峰,以后逐渐下降;而 HHV-7 YY<sub>5</sub> 及 Glasgow 株在 24 h 时产生 TNF- $\alpha$  量明显少于 GS 株,峰值出现时间也迟于 GS 株,Glasgow 株在第 3 天出现峰值,YY<sub>5</sub> 在第 4 天才出现峰值。由此可见,HHV-6、HHV-7 感染 CBMCs 都较强诱导 TNF- $\alpha$ ,但情况各不相同。本结果取三批不同 CBMCs 所测的平均值,三批均呈同样的趋势。

### 2.2 HHV-6 GS 株、HHV-7 Glasgow、YY<sub>5</sub> 株及同一批 CBMCs 对照组产生 TNF- $\alpha$ 的相互比较

表 1 是 GS、Glasgow、YY<sub>5</sub> 三株病毒感染 CBMCs 24 h 产生 TNF- $\alpha$  结果。从中可以看出,此时 GS 组诱导 TNF- $\alpha$  量最多 ( $139.9 \pm 81.7$  u/mL),明显多于 Glasgow 组 ( $53.0 \pm 38.7$  u/mL) 和 YY<sub>5</sub> 组 ( $63.3 \pm 37.6$  u/mL) ( $P < 0.05$ );三者与未感染组 ( $22.3 \pm 18.1$  u/mL) 比较,都存在显著差异 ( $P < 0.05$ );但 glasgow 组同 YY<sub>5</sub> 组诱导 TNF- $\alpha$  量无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

表 1 病毒接种后 24 h GS、Glasgow 及 YY<sub>5</sub> 诱导 CBMCs 产生 TNF- $\alpha$  情况

Table 1 TNF- $\alpha$  induction of GS, Glasgow and YY<sub>5</sub> strains in CBMCs at 24 h postinfection  
(n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

组别 Groups	TNF- $\alpha$ 活性(u/mL) Activity of TNF- $\alpha$ (u/mL)
GS + CBMCs	$139.9 \pm 81.7^{**}$
Glasgow + CBMCs	$53.0 \pm 38.7^{* \Delta}$
YY <sub>5</sub> + CBMCs	$63.3 \pm 37.6^{* \Delta}$
CBMCs	$22.3 \pm 18.1$

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs CBMCs  $\Delta P < 0.05$  vs GS + CBMCs

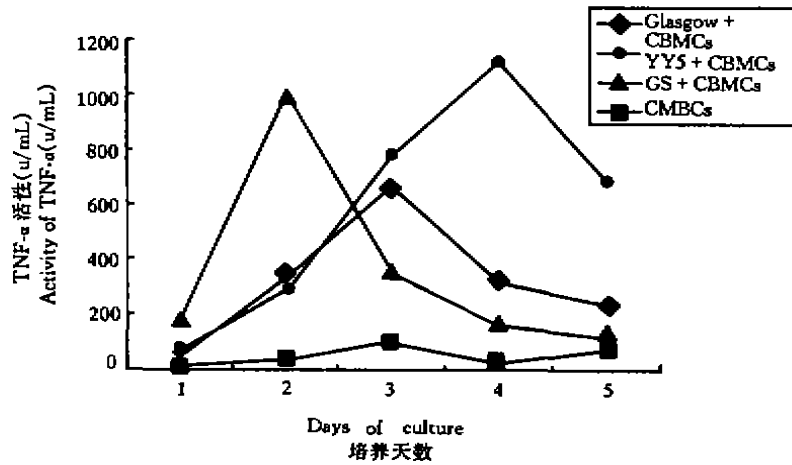


图1 HHV-6 GS株、HHV-7 Glasgow、YY5株感染CBMCs产生TNF-α动力学特征

Fig.1 Kinetics of TNF-α in infected culture supernatants induced by HHV-6 GS, HHV-7 Glasgow, YY5 strains

2.3 HHV-7 Glasgow株、YY5株感染PBMCs产生TNF-α

HHV-7两病毒株分别感染PBMCs, 48 h后收集上清, 测得结果显示HHV-7感染PBMCs也能诱生TNF-α。YY5产生量为 $212.3 \pm 142.1$  u/mL, 稍低于其感染CBMCs产生TNF-α量 $295.9 \pm 188.0$  u/mL ( $P > 0.05$ ); 但Glasgow株感染PBMCs产生TNF-α量为 $147.5 \pm 69.8$  u/mL, 显著低于其感染CBMCs产生的量 $666.7 \pm 166.7$  u/mL ( $P < 0.01$ )。这可能是由于PBMCs同CBMCs在细胞组成上差异及病毒感染率不同所致<sup>[3]</sup>。

2.4 TNF-α单抗对待检标本中产生TNF-α的中和作用

用工作浓度1:50的TNF-α单克隆抗体中和YY5株、Glasgow株感染CBMCs的上清, 中和前后结果证实, HHV-7感染CBMCs诱生的是TNF-α。见图2。

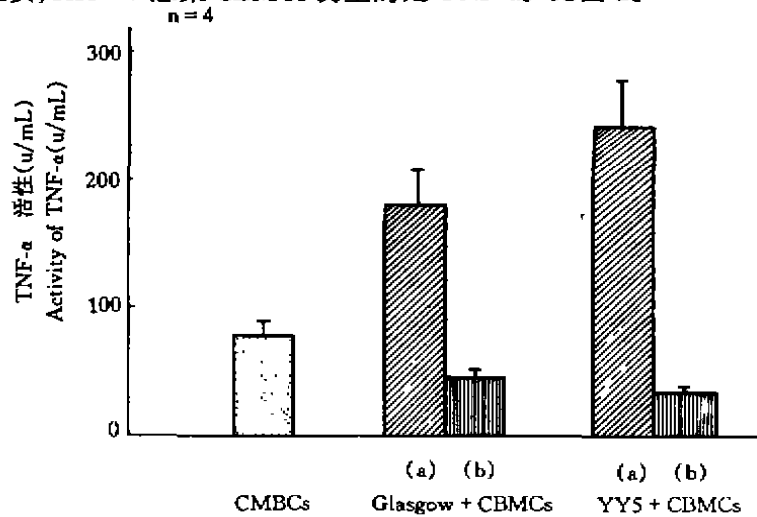


图2 TNF-α McAb对感染上清TNF中和情况

Fig.2 Neutralization of TNF in infected supernatants by McAb to TNF-α  
a: Amount of TNF before neutralization b: Amount of TNF after neutralization

### 3 讨论

HHV-7 是近年发现的人类  $\beta$ -疱疹病毒,同 HHV-6 一样普遍潜伏存在于人体中。目前除 ES 外<sup>[4]</sup>,还没有发现任何一种疾病同 HHV-7 存在着必然联系。HHV-7 细胞亲嗜性比较单一,仅亲嗜 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T 淋巴细胞,且 CD<sub>4</sub> 分子是 HHV-7 特异性受体<sup>[5]</sup>,感染后能否引起细胞因子水平的改变,目前还未见报道。本研究从 HHV-7 Glasgow 株、YY<sub>5</sub> 株感染 CBMCs 产生 TNF- $\alpha$  角度来探讨 HHV-7 感染对免疫因素的影响。研究结果证实,HHV-6、HHV-7 感染 CBMCs 和 PBMCs 后都能引起大量的 TNF- $\alpha$  分泌,HHV-6 诱生 TNF- $\alpha$  产生峰值时间(2 d 左右)早于 HHV-7 到达峰值时间(3~4 d)。人类疱疹病毒科其它病毒诱生 TNF- $\alpha$  情况各不相同,Gosselin 等<sup>[6]</sup>报道 HSV<sub>1</sub> 感染 PBMCs 后,TNF- $\alpha$  分泌量第 7 天达到峰值;而 EBV 则抑制 TNF- $\alpha$  产生。范萍等<sup>[3]</sup>研究了 HHV-6 CN<sub>5</sub>、CN<sub>8</sub>、CN<sub>10</sub> 南京地方株及 GS 株体外诱导 CBMCs 及 PBMCs 产生 TNF- $\alpha$  情况同本研究报道一致。揭示了这些病毒虽属于同一病毒科,但对免疫系统功能的影响各不相同,从而诱导或抑制细胞因子的产生。

TNF- $\alpha$  是一个重要的炎症因子,主要是由巨噬细胞产生,其次由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生,在病毒感染急性期,通过各种机制发挥重要的抗病毒作用。TNF- $\alpha$  能使巨噬细胞激活,表达 MHC-I、II 类抗原及 ICAM-1 等分子增加,促使其向感染部位趋化,并分泌 IL-12 等来激活 NK 细胞,共同发挥抗病毒作用<sup>[7,9]</sup>。另外,TNF- $\alpha$  能使病毒感染细胞合成大量 Cu/Zn SOD,介导氧自由基反应,损伤感染的细胞,达到显著的抗病毒活性<sup>[8]</sup>。近来较多研究发现,TNF- $\alpha$  还能通过与病毒感染细胞上的 TNF R<sub>1</sub>(P<sub>55</sub>)结合,介导细胞凋亡,导致清除病毒的效应。Inoue 等<sup>[10]</sup>报道,HHV-6 感染 JJHAN 细胞后,能诱导感染和未感染细胞膜上 P<sub>55</sub> 大量表达,从而发挥由 TNF- $\alpha$  介导的细胞凋亡,控制病毒进一步感染。TNF- $\alpha$  在抵抗 HHV-7 感染过程中的确切机制,目前还不甚清楚。

有一点值得重视,TNF- $\alpha$  抗病毒效应与病毒感染细胞的成熟程度及感染阶段密切相关。Stein 等<sup>[11]</sup>研究 CMV 感染单核细胞系发现,在成熟单核细胞 THP-1 中,TNF- $\alpha$  发挥重要抗病毒作用;而在不成熟单核细胞株 U<sub>937</sub>、HL-60 中,TNF- $\alpha$  可刺激潜伏的 CMV IE 基因 启动子/增强子 转录,使 CMV 复制增加,并重新活化。同样的情况在 HIV 感染不成熟的粒细胞、巨噬细胞中也得到证实。Walev 等<sup>[12]</sup>报道,在长期感染 HSV-1 小鼠体内,TNF- $\alpha$  一直保持较高水平,并能把潜伏在三叉神经的 HSV-1 激活,增强其复制。这些特点可能与临床致病机理密切相关。HHV-6、HHV-7 长期潜伏感染,现在较多发现在一些免疫抑制病人及各种移植病人中,其易被激活而导致临床疾病,可能与某些细胞因子激活潜伏的病毒有关。

总之,HHV-7 感染 CBMCs 能较强地诱生 TNF- $\alpha$ 。我们初步认为,在感染早期,TNF- $\alpha$  可能通过各种机制,发挥抗病毒作用;感染后期,TNF- $\alpha$  和其它因子一起在该病毒的潜伏、激活以及致病中发挥着重要作用,其确切机制有待进一步证实。

### 参 考 文 献

- 1 Frenkel N, Schiener E. C, Wyatt LS *et al.* Isolation of a new herpesvirus from human CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1990. 87(1):748-752

- 2 姚望, 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. 南京医科大学学报, 1998, 18(3): 170~172
- 3 范萍, 姚望, 季晓辉等. 人类疱疹病毒 6 型可诱导 TNF- $\alpha$ . 中国病毒学, 1996, 11(4): 338~342
- 4 Tanaka K, Kondo T, Torigoe S *et al.* Human herpesvirus 7: Another causal agent for roseola (exanthem subitum). *J Pediatr*, 1994, 125(1): 1~5
- 5 Lusso P, Secchiero P, Crowley RW, *et al.* CD<sub>4</sub> is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: Interference with human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(5): 3872~3876
- 6 Gosselm J, Flamand L, Addario MD *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): 1849~1856
- 7 Mark T, Helse, Herbert W *et al.* The T-cell-independent role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in macrophage activation during murine cytomegalovirus and herpes simplex virus infection. *J Virol*, 1995, 69(2): 904~909
- 8 Lidbury B A, Ramshaw IA, Rolph MS *et al.* The antiviral activity of tumor necrosis factor on herpes simplex virus type 1: role for a butylate by daoxyanisole sensitive factor. *Arch Virol*, 1995, 140(4): 703~719
- 9 Mizutani KI, Ito M, Kamiya H *et al.* Inhibition of Varicella-Zoster Virus glycoprotein expression by peripheral blood mononuclear cells. *Microbio Immunol*, 1995, 39(3): 217~220
- 10 Inoue Y, Yasukawa M, Fujita S. Induction of T-cell apoptosis by human herpesvirus 6. *J Virol*, 1997, 71(5): 3751~3759
- 11 Stein J, Volk HD, Liebenthal C *et al.* Tumor necrosis factor stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells. *J Gen Virol*, 1993, 74(5): 2333~2338
- 12 Walek J, Podlech J, Falke D. Enhancement by TNF- $\alpha$  of reactivation and replication of latent herpes simplex virus from trigeminal ganglia of mice. *Arch Virol*, 1995, 140(6): 987~992

## Human Herpesvirus 7 Induces Tumor Necrosis Factor Alpha in Umbilical Cord Blood Mononuclear Cell Cultures

Peng Guangyong    Yao Kun    Ren Qiang    Ji Xiaohui

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

**Abstract** The production of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) induced by human herpesvirus 7 (HHV-7) Glasgow strain and Nanjing local strain YYS and HHV-6 GS strain in umbilical cord and peripheral blood mononuclear cells cultures was studied by means of biological activity assay. It was observed that HHV-7 is another strong inducer of TNF- $\alpha$ . HHV-7-infected cultures reached the maximal level of TNF- $\alpha$  at 3 to 4 days postinfection, which is later than that of HHV-6 (2 days postinfection). Compared with HHV-6, the amounts of TNF- $\alpha$  in HHV-7-infected cultures are smaller at 24 h postinfection ( $P < 0.05$ ), but the amounts of them are all higher than that of uninfected cells ( $P < 0.05$ ), and there is no difference between Glasgow and YYS strain ( $P > 0.05$ ). These results indicated that HHV-6 and HHV-7 can exert immunomodulatory by stimulating the CBMCs to produce TNF- $\alpha$ .

**Key words** Human Herpesvirus 6, Human Herpesvirus 7, Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ), Viral Infection