

人巨细胞病毒对红系祖细胞的影响

陈健良, 何政贤, 李建英, 李 琨, 王清文, 邹小兵, 黄略峰

(中山医科大学附属第三医院儿科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨人巨细胞病毒(HCMV)对红系祖细胞(CFU-E)的分化和增殖的影响,并初步探讨其作用机制。【方法】取15例脐血标本,用红系祖细胞单向半固体培养技术,观察3种不同浓度的HCMV AD169株对CFU-E集落形成的影响,用PCR和RT-PCR检测集落中的HCMV DNA与late mRNA。【结果】3个感染组的CFU-E均减少,与正常对照组比较,分别为11.46%、21.88%、34.45% ($P < 0.05$),显示CFU-E集落数与HCMV感染浓度有关,病毒感染浓度越高,抑制程度越大。CFU-E集落细胞中的HCMV DNA均为阳性,而late mRNA为阴性。【结论】HCMV AD169株可直接感染红系祖细胞,并抑制其分化与增殖,该抑制作用可出现于仅有病毒潜伏的细胞。

关键词: 巨细胞病毒; 红系祖细胞; 聚合酶链反应

中图分类号: R373.9; R551.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2000)05-0372-04

The Effect of Human Cytomegalovirus on Erythroid Progenitor

CHEN Jian-liang, HE Zheng-xian, LI Jian-ying, LI Kun,
WANG Qing-wen, ZOU Xiao-bing, HUANG Lue-feng

(Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of HCMV on the differentiation and proliferation of erythroid progenitor, and its mechanism tentatively. 【Methods】 15 samples of cord blood, with semi-solid CFU-E hemopoietic progenitor culture system, 3 concentrations of HCMV AD169 were surveyed to determine the impact on the CFU-E colony formation DNA and late mRNA with PCR and RT-PCR separately in the colony cells. 【Results】 Compared with normal group, the decrease of the CFU-E colonies in HCMV infection groups was 11.46%, 21.88%, 34.45% ($P < 0.05$); shown that CFU-E is associated with concentration, the higher the HCMV concentration, the more the CFU-E colony decrease. HCMV DNA detected in colony cells from three viral infection groups was positive, but the tests of HCMV late mRNA were negative. 【Conclusion】 HCMV AD169 can directly infect erythroid progenitor and suppress its differentiation and proliferation. This suppression may occur in the cells only with HCMV latency.

Key words: cytomegalovirus; erythroid progenitor cells; polymerase chain reaction

血液系统是人巨细胞病毒(HCMV)感染的主要受累部位之一。健康HCMV携带者骨髓造血祖细胞中可检出内源性HCMV DNA;它可在敏感细胞中重新激活和复制。近年应用细胞集落形成分析法,发现HCMV不但可直接感染造血祖细胞,而且对其分化与增殖产生抑制作用,但其机制尚未明

确¹。熊伟、何政贤,等²报告: HCMV AD169株能直接感染人骨髓粒-巨噬系造血祖细胞(CFU-GM),并抑制其集落形成,经原位聚合酶链反应(ISPCR)方法证实HCMV对造血祖细胞的直接感染。我们则继续进行HCMV对红系祖细胞影响的探讨。应用红系祖细胞单向半固体培养体系,对脐

收稿日期: 1999-08-20

基金项目: 广东省科委(重点)科技项目(96-25)资助课题

作者简介: 陈健良(1964-),男,广州人,医学硕士,主治医师

血单个核细胞进行培养,并设多个实验分组分别加入不同浓度的HCMV AD169实验株,观察红系祖细胞(CFU-E)集落形成和数量变化,拟阐明病毒对红系祖细胞分化与增殖的影响。并用PCR方法检测集落细胞中的HCMV DNA,试图证实病毒对红系祖细胞的直接作用;用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测集落细胞中HCMV晚期(late)mRNA,以窥视HCMV在红系祖细胞内的转录、复制活动,初步探讨病毒对红系祖细胞影响的作用机理。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 脐血标本 15份脐血标本由本院产房提供,取自正常足月顺产新生儿断脐后的胎盘段脐带。其母亲健康,HBsAg阴性。每份标本均经本实验室常规PCR方法检测HCMV DNA阴性,ELISA法HCMV IgM阴性。

1.1.2 病 毒 HCMV AD169株原液由中国预防医学科学院病毒研究所病种室提供。滴度为: 10^{-7} ml 50%感染单位(TCID₅₀)/mL。

1.1.3 引 物 参考Chee M等设计^[3],针对病毒复制晚期出现的主要衣壳蛋白(MCP)编码基因设计的一对引物序列:5'GTG ATC CGA CTG GCG GAA AA 3'(正义),5'GAG CGC GTC CAC AAA GTC TA 3'(反义)。该编码基因在多个实验株和野株HCMV都具有高度保守。由中山医科大学达安基因诊断中心合成,并作PAGE纯化。

1.2 方 法

1.2.1 PCR 检测^[4] 细胞经裂解液处理后,按苯酚-氯仿-异戊醇提取方法进行两次DNA提取。加入Taq DNA聚合酶、PCR缓冲液、正义引物、反义引物。变性94℃1 min,退火60℃1 min,引物延伸72℃1 min。共40个循环,末次循环引物延伸延长至10 min。反应产物在含溴化乙锭的30 g/L琼脂糖凝胶中电泳,紫外灯下观察,产物长度为263 bp。

1.2.2 RT-PCR 检测^[4,5] 首先用异硫氰酸/酸酚一步法取细胞总RNA;有核细胞在匀浆过程中被变性液破膜、溶解,变性液中有抑制RNase活性的作用,并溶解蛋白质和核酸;经酸酚-氯仿将RNA抽提至水相,与DNA和蛋白质分离后,经异丙醇沉

淀回收总RNA。然后加入AMV逆转录酶、dNTP、逆转录酶缓冲液、反义引物、RNasin,42℃反应60 min,95℃5 min灭活逆转录酶,完成逆转录反应,合成cDNA第一条链。再进行PCR扩增,步骤与反应产物观察同上(方法1.2.1)。

1.2.3 实验过程与结果观察 常规密度梯度法分离脐血单个核细胞。加入EPO、小牛血清、巯基乙醇、甲基纤维素,建立红系祖细胞培养体系^[6]。以 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 3种不同浓度的HCMV感染体系中的造血祖细胞,并设置空白和灭活病毒(mock)对照,共分5组。37℃,体积分数为5% CO₂,全湿培养5~7 d,用倒置显微镜直接观察培养皿中红系集落,集落细胞数达8个以上为CFU-E集落;以低倍镜对各培养皿CFU-E集落进行计数,对各组数据间差异进行统计学分析。集落细胞经用40 g/L多聚甲醛固定后吸取到玻片上,常规Wright-Giemsa染色,高倍油镜下确认为各期红系细胞。收集CFU-E集落细胞,清洗2次后进行PCR和RT-PCR检测。

2 结 果

2.1 各实验分组CFU-E集落计数

15份脐血标本进行实验,各实验分组CFU-E集落计数表示为:均数±标准差(表1)。与空白对照组比较,灭活病毒组CFU-E集落数轻微减少,3个病毒感染组CFU-E集落数均出现不同程度的减少。方差分析和各实验分组间两两比较结果显示:灭活病毒组CFU-E集落数与空白对照组差别无统计学意义,各病毒感染组间及其与空白对照组、灭活病毒组间的差别均有统计学意义。与灭活病毒组作比较,3个病毒感染组的CFU-E集落减少程度依次为11.46%、21.88%、34.45%,其中病毒感染浓度较高组,减少程度较大。

表1 HCMV对CFU-E集落形成的影响

Table 1 Effect of HCMV on CFU-E colony formation (CFU)

Groups	Range	$\bar{x} \pm s$
Control	930~2 538	1 582.7±466.7
Mock	1 002~2 385	1 535.5±410.3
10^{-5} HCMV	896~2 103	1 359.5±369.8
10^{-4} HCMV	886~1 930	1 199.5±329.0
10^{-3} HCMV	740~1 614	1 006.5±297.1

2.2 CFU-E 集落细胞 PCR 检测

病毒感染组显示一条特定分子量 DNA 片段的条带, 长度为 263 bp, 与所设计引物应扩增的 DNA 片段的长度一致, 表明集落细胞中存在着 HCMV DNA; 而空白对照组、灭活病毒组未出现 HCMV DNA 的特异扩增条带(图 1)。

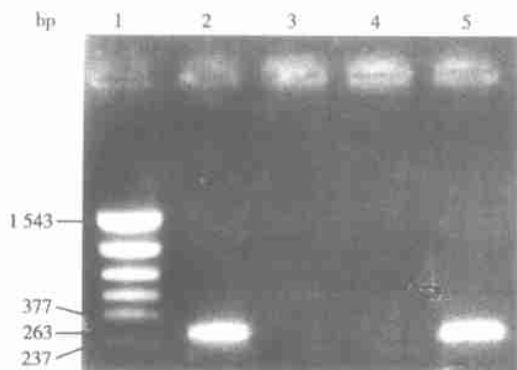


图 1 CFU-E 集落细胞中 HCMV DNA PCR 检测结果

Fig. 1 Detection by PCR of HCMV DNA in CFU-E colony cells

(Lane 1 DNA ladder; lane 2 10^{-5} HCMV; lane 3 mock; lane 4 control; lane 5 HCMV control)

2.3 CFU-E 集落细胞 RT-PCR 检测

各病毒感染组均未出现 HCMV cDNA 的扩增条带, 表明集落细胞中无 HCMV 晚期转录。作为阳性对照, 受 HCMV 感染人胚肺成纤维细胞的 RNA 提取物可扩增出长度为 263 bp 的 HCMV 特异性 cDNA 片段, 说明该细胞中存在病毒转录(图 2)。

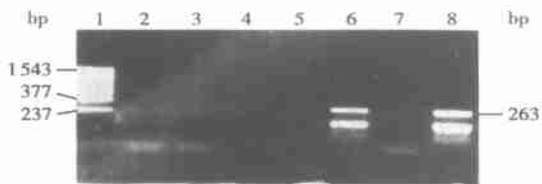


图 2 CFU-E 集落细胞中的 HCMV late mRNA RT-PCR 检测结果

Fig. 2 Detection by RT-PCR of HCMV late mRNA in CFU-E colony cells

(Lane 1 DNA ladder; lane 2 PCR on RNA from 10^{-3} HCMV; lane 3 RT-PCR on RNA from 10^{-3} HCMV; lane 4 PCR on RNA from 10^{-3} HCMV (liquid culture); lane 5 RT-PCR on RNA from 10^{-3} HCMV (liquid culture); lane 6 RT-PCR on RNA from HCMV-infected HEF fibroblast(positive control); lane 7 PCR on RNA from HCMV-infected HEF fibroblast; lane 8 PCR on DNA from HCMV-infected HEF fibroblast)

3 讨论

3.1 HCMV 对红系祖细胞分化、增殖的影响

根据细胞集落分析法原理, 每个细胞集落均由一个祖细胞分化增殖而成。实验结果显示: 病毒感染组 CFU-E 的集落形成均出现不同程度的减少, 表明: HCMV AD169 实验株对脐血红系祖细胞分化增殖具有抑制作用。

多个研究小组曾观察到 HCMV 对早期红系祖细胞(Brust Forming Unit-Erythroid, BFU-E)有抑制作用, 仅有个别报告对 CFU-E 亦有抑制作用。MacKintosh FR, 等^[7]报告 HCMV AD169 株和临床分离株对人 BFU-E 明显抑制, 而 CFU-E 未受影响。本实验结果表明: HCMV AD169 实验株对脐血 CFU-E 具有抑制作用。可能是造血祖细胞来源不同。有研究报告认为脐血造血祖细胞较骨髓造血祖细胞更原始, 具有更强的扩增潜能^[8], 对促红细胞生成素更敏感^[9]; 因此, 体系中对促红细胞生成素(EPO)敏感的红系祖细胞分化和增殖相对活跃, 使 HCMV 对其抑制的效应较显著。

体系中 CFU-E 集落形成的受抑制程度为 11.46%~34.45%, 抑制程度与病毒感染浓度有关, 病毒感染浓度越高, 抑制程度越大。其他研究也有类似结果^[5,7], 但其相关关系的研究需要更详细的感染浓度分组和数据分析, 目前尚未见报道。

HCMV 症状性感染常有贫血。本研究和其他体外研究结果提示: 除溶血性因素外, 红系祖细胞分化、增殖受到抑制而导致的成熟红细胞生成减少, 可能是贫血的另一重要因素。

3.2 HCMV 对红系祖细胞的直接感染

应用 PCR 方法检测病毒感染组红系集落细胞 HCMV DNA 均为阳性, 表明 HCMV 可直接感染红系祖细胞, 而且经历分化增殖后的子代细胞中仍存在着该病毒 DNA。

本实验中对红系集落细胞的 RT-PCR 检测结果均为阴性, 表明红系集落细胞中没有 HCMV 的晚期转录和复制, 病毒处于潜伏状态。其原因可能是: ①受检测的红系集落细胞已充分分化、增殖, 接近成熟, 包括病毒在内的 DNA 转录活动已基本停止。Movassagh M, 等^[5]研究发现: HCMV 在造血祖细胞中的晚期转录仅限于带有抗原 CD³⁴⁺ 的较

原始造血祖细胞。有研究认为 HCMV 只在造血祖细胞分化时才出现病毒转录和复制。②HCMV 直接感染红系祖细胞后, 仅在其中潜伏, 或成为顿挫性感染, 不出现产毒性复制^[1]。

3.3 HCMV 抑制红系祖细胞分化增殖作用机制

以上已阐明 HCMV 对红系祖细胞的直接感染和抑制, 但未发现转录、复制活动, 说明该抑制作用可出现于仅有病毒潜伏的细胞。因此推测: HCMV 对造血祖细胞的抑制出现于病毒感染后和病毒蛋白质合成之前, 可能与造血祖细胞对病毒被膜蛋白(如 pp65、pp71、pp150 等)的吸收和处理有关, 并干扰和阻碍造血祖细胞的正常新陈代谢, 或减低其对细胞因子(如 EPO 等)的效应, 使细胞分化、增殖活动被抑制^[1]。

间接作用机制可包括: HCMV 可通过感染和抑制参与机体造血的骨髓基质细胞、或调节细胞(T 淋巴细胞、单核细胞), 或使机体对受感染细胞产生特异性免疫反应, 导致造血祖细胞及相关细胞被抑制或破坏^[7, 10]。本实验体系中仅加入来自正常新生儿脐血的单个核细胞, 可包括 T 淋巴细胞、单核细胞和血管内皮细胞, 但不含骨髓基质细胞和特异性免疫细胞, 可能存在调节细胞参与对红系祖细胞的抑制, 但有待进一步证实。

参考文献:

[1] Sindre H, Tjornfjord G E, Rollag H, *et al.* Human cytomegalovirus suppression of and latency in early hematopoietic progenitor cells[J]. *Blood* 1996 88(12):

4526.

[2] 熊伟, 何政贤, 王清文, 等. 巨细胞病毒对人骨髓粒-巨噬系祖细胞生长的影响[J]. *中华血液学杂志*, 1999, 20(3): 143.

[3] Chess M, Rudolph S-A, Plachter B, *et al.* Identification of the major capsid protein gene of human cytomegalovirus[J]. *J Virol* 1989, 63(3): 1345..

[4] 王申五主编. 基因诊断技术—非放射性操作手册[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993. 166~174.

[5] Movassagh M, Gozlan J, Senechal B, *et al.* Direct infection of CD³⁴⁺ progenitor cells by human cytomegalovirus: evidence for inhibition of hematopoiesis and virus replication [J]. *Blood*, 1996 88(4): 1277.

[6] 葛忠良. 造血细胞的培养和测定技术[M]. 见: 杨景山主编. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1990. 282~322.

[7] MacKintosh F R, Adlish J, Hall S W, *et al.* Suppression of normal human hematopoiesis by cytomegalovirus in vitro[J]. *Exp Hematol*, 1993, 21(2): 243.

[8] 黄绍良, 李文益, 侯玲玉, 等. 人胎盘粒单系和红系祖细胞体外培养观察[J]. *中国实用儿科杂志*, 1994, 9(4): 225.

[9] 尹振尧, 王瑜, 郭瑞清. 脐血造血祖细胞培养及细胞周期的研究[J]. *中华血液学杂志*, 1994, 15(4): 181.

[10] Busch F W, Mutter W, Koszinowski U H, *et al.* Rescue of myeloid lineage-committed preprogenitor cells from cytomegalovirus-infected bone marrow stroma[J]. *J Virol*, 1991, 65(2): 981.

(编辑 关淡庄)

(上接第 359 页)

[3] Mulder J W R, Kruyt P M, Sewnath M, *et al.* Colorectal cancer prognosis and expression of exon-6 containing CD44 proteins[J]. *Lancet*, 1994, 344(8935): 1470.

[4] Kainz C H, Kohlberger P, Sliutz G, *et al.* Splice variants of CD44 in human cervical cancer stage I B to II B[J]. *Gynecol Oncol*, 1995, 57(3): 383.

[5] Hennessy C, Henry J A, May F E B, *et al.* Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer and

association with good prognosis[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1991, 83(4): 281.

[6] Yamaguchi A, Urano T, Goi T, *et al.* Expression of human nm23-H1 and nm23-H2 protein in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 1994, 73(9): 2280.

(编辑 黄小延)