

· 简 报 ·

巨细胞病毒诱导骨髓基质成纤维细胞增殖

朱春浓, 黄 耘, 李晓瑜

(中山医科大学附属第一医院儿科, 广东 广州 510080)

关键词: 巨细胞病毒; 基质细胞; 成纤维细胞

中图分类号: R373.9

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2000)06-0478-03

巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)在人群中感染普遍,对免疫抑制人群如骨髓移植病人、艾滋病病人危害严重,可引起严重的骨髓造血抑制等多器官损害。骨髓基质细胞是造血微环境的重要组成部分,可以调节造血细胞的增殖和分化。已有文献表明,CMV感染骨髓基质细胞后,使基质细胞对造血细胞的支持能力明显下降,但机理尚不清楚,可能与骨髓基质细胞分泌功能异常有一定的关系^[1]。成纤维细胞是骨髓基质细胞的主要成分,我们观察了CMV对人骨髓基质成纤维细胞增殖的作用,以进一步了解CMV对骨髓基质细胞的影响。

1 材料和方法

1.1 骨髓基质成纤维细胞的培养

骨髓单个核细胞取自本院胸外科肺部疾患的病人手术中切除的肋骨,共23例,包括肺癌、支气管扩张症、肺不张等。肺癌患者骨质未受侵犯,未发现肿瘤转移,所有病例外周血象正常。骨髓基质成纤维细胞集落(CFU-F)的培养方法参见文献[2]。成纤维细胞传代2~3次后备用。

1.2 CMV来源

CMV从病人体内分离,由广州市儿童医院病毒室常汝虚主任惠赠,已经血清学鉴定。再用PCR(试剂盒购自深圳晶美)方法检测CMV-DNA,用免疫组化(EnVisionTM+System 购自美国DAKO)检测CMV早期即刻抗原(IEA),结果证实为CMV。

1.3 CMV的灭活

将CMV置于冰上,距紫外灯5cm,照射40min^[1]。

1.4 CMV感染骨髓基质成纤维细胞

CMV剂量按实验要求,加于成纤维细胞层上,37℃孵育2h,再用PBS洗去多余的CMV病毒颗粒,换新鲜培养液继续培养^[1]。

1.5 CMV感染后骨髓基质成纤维细胞数量的测定

将培养的成纤维细胞用胰蛋白酶消化后,调整细胞浓度为 1×10^5 /mL,接种在96孔培养板,每孔100 μ L,37℃,0.05 CO₂孵育过夜。细胞成层后予CMV感染,继续培养。感染后第1天,第3天,第5天分别检测活细胞的数量。每孔加入20 μ L四甲基偶氮唑盐(MTT 5g/L),再培养4h。吸取培养上清,加入二甲基亚砷(DMSO),每孔200 μ L,使甲臞颗粒溶解。在酶标仪上测定吸光度A,波长570nm,参考波长630nm。以上实验每实验点均重复3孔。

1.6 统计学分析

应用t检验对实验数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 CMV感染骨髓基质成纤维细胞

用TCID₅₀(能使50%的细胞感染的CMV剂量)CMV加在骨髓基质成纤维细胞层上后,24h CMV-IEA阳性,120h CMV-IEA强阳性,几乎100%为阳性细胞,说明用上述方法可使CMV感染成纤维细胞,并在其中复制,骨髓基质成纤维细胞是本实验CMV的容许细胞。经紫外线灭活的CMV加在成纤维细胞层上后,24h CMV-IEA阴性,120h CMV-IEA仍为阴性。

收稿日期: 2000-04-06

作者简介: 朱春浓(1956-),女,广东河源人,主管技师。

©1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 CMV 感染骨髓基质成纤维细胞的形态学改变

将不同剂量: $TCID_{50}$ 、 $100 TCID_{50}$ 、 $500 TCID_{50}$ 、 $1\ 000 TCID_{50}$ 的 CMV 分别感染骨髓基质成纤维细胞后,在倒置镜下直接观察细胞的形态。结果在感染后 24 h, $TCID_{50}$ 可以引起细胞从培养皿壁脱落、肿胀,而 $100 TCID_{50}$ 以下的剂量感染后 120 h 细胞形态在倒置镜下没有明显的改变。

2.3 CMV 对骨髓基质成纤维细胞增殖的作用

本实验室以往的实验表明细胞的数量与吸光度 A 值成正比($r = 0.991$)^[3],因此细胞的数量可以用吸光度 A 来表示,结果见表 1。

2.3.1 CMV 的剂量与骨髓基质成纤维细胞增殖的关系 将不同剂量的 CMV 感染骨髓基质成纤维细胞后,观察细胞的增殖情况,结果在 100

$TCID_{50} \sim 1\ 000 TCID_{50}$ 的剂量范围中,CMV 感染均可以诱导细胞的增殖,且细胞的增殖与 CMV 的剂量大小无明显关系,各剂量组之间 A 值差别无统计学意义。

2.3.2 CMV 感染的时间与骨髓基质成纤维细胞增殖的关系 CMV 感染骨髓基质成纤维细胞后第 1 天、第 3 天、第 5 天观察细胞增殖的情况,感染后第 1、3、5 天,细胞的数量均明显高于未感染组。提示 CMV 诱导细胞增殖的作用持续时间较长,至少 5 d 以上。

2.3.3 紫外线灭活的 CMV 与骨髓基质成纤维细胞的关系 加入灭活 CMV 后第 1 天、第 3 天、第 5 天骨髓基质成纤维细胞数量均明显高于未加入灭活 CMV 组。说明灭活的 CMV 也有诱导骨髓基质成纤维细胞增殖的作用。

表 1 CMV 感染后骨髓基质成纤维细胞数的变化

Table 1 The number of bone marrow stromal fibroblast after CMV infected ($A, \bar{x} \pm s$)

Dose of CMV	n	1 d		3 d		5 d	
		Non-infected/infected(group)		Non-infected/infected (group)		Non-infected/infected (group)	
$100 TCID_{50}$	10	0.361±0.11/	0.466±0.18 ¹⁾	0.391±0.13/	0.498±0.23 ¹⁾	0.476±0.13/	0.591±0.25 ¹⁾
$500 TCID_{50}$	8	0.397±0.07/	0.480±0.16 ¹⁾	0.413±0.12/	0.538±0.22 ¹⁾	0.512±0.10/	0.598±0.19 ¹⁾
$1\ 000 TCID_{50}$	5	0.441±0.06/	0.590±0.12 ¹⁾	0.458±0.10/	0.617±0.16 ¹⁾	0.528±0.06/	0.702±0.14 ¹⁾
Inactive CMV	3	0.472±0.01/	0.667±0.04 ¹⁾	0.579±0.03/	0.728±0.02 ¹⁾	0.597±0.02/	0.761±0.03 ¹⁾

1) Compared with non-infected group, $P < 0.05$

3 讨论

3.1 CMV 对骨髓基质成纤维细胞的感染

在本实验的培养体系中,所培养的细胞主要是骨髓基质成纤维细胞,成纤维细胞通常是 CMV 的易感细胞之一。本实验中 CMV 感染骨髓基质成纤维细胞后,用 PCR 方法和免疫组化的方法可以在感染的细胞中检出 CMV-DNA 和 IEA,证明所分离的 CMV 可以感染骨髓基质成纤维细胞,并在其中复制。但小剂量 CMV 并不引起明显的细胞破坏。

3.2 CMV 诱导骨髓基质成纤维细胞增殖

CMV 感染细胞后可以诱导细胞凋亡和增殖,例如 CMV 可诱导造血细胞凋亡,促进血管内皮细胞和血管平滑肌细胞增殖^[4,5]。CMV 对骨髓基质细胞的增殖或凋亡的作用目前未见报道,在本实验中,CMV 感染骨髓基质成纤维细胞后,可以诱导基

质细胞明显增殖,但增殖的机理尚不清楚,可能与 CMV 的基因产物对细胞基因转录的调控有关。CMV 的即刻早期基因(IEG)可以使细胞周期蛋白 E、A、B 表达增高,刺激细胞的有丝分裂^[6]。

CMV 的结构蛋白在 CMV 开始复制前就可以对细胞的增殖及功能代谢有增强作用。结构蛋白 pp71 可以刺激蛋白激酶活化,触发信号传导通路,使细胞的基因启动子活化而引起基因的转录^[7]。pp65 也可以快速进入受染的细胞核内,参与染色质的缩合,影响细胞分裂的全过程^[8]。在本实验中,用紫外线灭活 CMV 加在骨髓基质成纤维细胞层上后,细胞中 IEA 阴性,但也可以诱导成纤维细胞的增殖,提示可能 CMV 的结构蛋白对成纤维细胞的增殖也有一定的诱导作用。

3.3 CMV 诱导骨髓基质成纤维细胞增殖的意义

CMV 诱导细胞增殖是 CMV 感染的重要病理之一,例如 CMV 诱导心血管内皮细胞和血管平滑

肌细胞增殖是 CMV 致动脉粥样硬化的组织基础^[4,5],是导致心、肺移植失败的重要原因。CMV 感染骨髓基质细胞后,虽然可以诱导成纤维细胞增殖,但细胞分泌功能紊乱,促进造血的细胞因子分泌减少,抑制造血的细胞因子分泌增多^[1],因此支持造血的能力仍降低。CMV 感染所致骨髓基质成纤维细胞增殖是否是某些恶性血液病骨髓纤维化的原因之一,目前还不清楚,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Lagneaux L, Delforge A, Snoeck R, *et al.* Human cytomegalovirus increases constitutive production of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor by bone marrow stromal cells [J]. *Blood*, 1996, 87(1): 59.
- [2] 姜学英. 骨髓成纤维祖细胞. 见: 唐佩弦, 杨天楹. 造血细胞培养技术[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1985. 147~160.
- [3] 李晓瑜, 欧阳颖, 林穗珍, 等. 脑活素诱导大鼠小脑颗粒神经元死亡的研究[J]. *中华医学杂志*, 2000, 80(2): 104.
- [4] Lemstrom K, Koskinen P, Krogerus L, *et al.* Cy-

tomegalovirus antigen expression, endothelial cell proliferation, and initial thickening in rat cardiac allografts after cytomegalovirus infection [J]. *Circulation*, 1995, 92(9): 2594.

- [5] Yonemitsu Y, Kaneda Y, Komori K, *et al.* The immediate early gene of human cytomegalovirus stimulates vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 231(2): 447.
- [6] Salvant B S, Fortunato E A, Spector D H. Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription [J]. *J Virol*, 1998, 72(5): 3729.
- [7] Liu B, Stinski M F. Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements [J]. *J Virol*, 1992, 66(7): 4434.
- [8] Dal Monte P, Bessia C, Landini M P, *et al.* Expression of human cytomegalovirus ppUL83 (pp65) in a stable cell line and its association with metaphase chromosomes [J]. *J Gen Virol*, 1996, 77(Pt 10): 2591.

(编辑 关淡庄)

(上接第 431 页)

参考文献:

- [1] Kantor J, Irvine K, Abrams S, *et al.* Antitumor activity and immune response induced by a recombinant carcinoembryonic antigen-vaccinia virus vaccine [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1992, 84(14): 1084.
- [2] Tsang K Y, Zarella S, Nieroda C A, *et al.* Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(13): 982.
- [3] McAneny D, Ryan C A, Beazley R M, *et al.* Results of a phase I trial of a recombinant vaccinia virus that expresses CEA in patients with advanced colorectal cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 1996, 3(5): 495.
- [4] 杨洁, 罗超权, 卢方安, 等. 人癌胚抗原重组痘苗病毒的构建和制备 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(1): 54.
- [5] 卢方安, 黄冰, 杨洁, 等. CEA-重组痘苗病毒预防 CEA 阳性肿瘤的动物实验研究 [J]. *癌症*, 1999, 18

- [6] 卢方安, 杨洁, 罗超权, 等. CEA-重组痘苗病毒治疗 CEA 阳性肿瘤的实验研究 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1999, 6(4): 302.
- [7] 雷虹, 曹雪涛, 于益芝, 等. 重组腺病毒介导 IFN- γ 基因转染的巨嗜细胞体外免疫效应功能分析 [J]. *中国免疫学杂志*, 1997, 13(3): 131.
- [8] 彭涛, 刘晓波, 田伏洲, 等. MTT 比色法中应采用分析纯二甲基亚砷作为甲替溶剂 [J]. *中国免疫学杂志*, 1999, 15(4): 180.
- [9] Hodge J W, McLaughlin J P, Abrams S I, *et al.* Admixture of a recombinant vaccinia virus containing the gene for the costimulatory molecule B7 and a recombinant vaccinia virus containing a tumor-associated antigen gene results in enhanced specific T-cell responses and antitumor activity [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(16): 3598.
- [10] Lorenz M G, Kantor J A, Schlom J, *et al.* Anti-tumor immunity elicited by a recombinant vaccinia virus expressing CD70(CD27L) [J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(7): 1095.

(编辑 张敏瑞)