

Ⅱ型登革病毒对人骨髓巨核祖细胞集落生长的影响

林东军* 梁锦华 林桂真

(附属第三医院血液病研究室)

提 要 采用人骨髓巨核祖细胞体外半固体培养技术,观察14例次Ⅱ型登革病毒(D_2V)对巨核祖细胞集落(CFU-MK)生长的影响,与对照组进行比较,显示 D_2V 感染组CFU-MK产率明显减少,经统计学处理差别有非常显著意义,从而证实体外 D_2V 能抑制巨核祖细胞增殖。这提示登革出血热病人的出血和血小板减少与巨核细胞受该病毒抑制有关。

关键词 巨核细胞;巨核细胞集落形成单位;人巨核祖细胞培养;甲基纤维素半固体培养基;

Ⅱ型登革病毒;登革出血热;血小板减少

中图分类号 R251 2.8; R552

登革出血热是登革热一种严重类型,临床上主要特征为皮肤粘膜及多个器官发生出血,在病程的初期常常有粒细胞减少,血小板减少和骨髓巨核细胞减少或消失表现^[1,2],病死率较高。鉴于目前 D_2V 对CFU-MK生长的影响,作者在国内外文献中尚未见报道,且该病血小板减少的原因还不十分明了,故作者采用巨核祖细胞培养技术来观察 D_2V 在体外对人骨髓CFU-MK生长的影响,以阐明该病血小板减少的原因。

材 料 与 方 法

骨髓标本来源 巨核祖细胞培养共14例次,骨髓标本全部取自于胸外科手术切除的肋骨,供髓者无肿瘤细胞的骨髓转移,无化疗或放疗史,造血系统基本正常。

病毒来源 D_2V 为新生儿内亚株,病毒原液是由中山医科大学微生物教研室提供。感染滴度为 $10^{-5.5}$ 个半数组织培养感染量(TCID₅₀),于-70℃冰箱保存备用。上述病毒原液经56℃,加热30分钟即为灭活的 D_2V 原液。

实验方法 人骨髓CFU-MK培养采用Messner的甲基纤维素法加以改良^[3]。体系组

成为:0.9%甲基纤维素、30%去血小板血浆、5%植物血凝素刺激的单个核细胞培养液、 5×10^{-5} mol/L 2-巯基乙醇、每毫升含有 1×10^5 个骨髓单个核细胞(BMMC)和适量的IMDM培养液。每个体系分别接种在两个35mm×10mm的Petri培养皿中。放在37℃,5%CO₂、100%湿度条件下的CO₂培养箱中培养14天。

实验分组 按自身配对比较设计进行分组。实验组A:为正常人骨髓CFU-MK培养,不加任何处理因素作为空白对照;实验组B:在CFU-MK培养体系中加入1%灭活的 D_2V 原液,以排除 D_2V 原液中的杂质对CFU-MK生长的影响;实验组C:在CFU-MK培养体系中加入100TCID₅₀ D_2V 原液,感染方式为持续性感染。

结果观察及统计分析方法 在培养的第14天从CO₂培养箱取出,放在倒置显微镜下观察并计数,≥3个巨核细胞为1个CFU-MK集落,取两个平皿的均值。计数后用毛细吸管将CFU-MK取出涂片,用瑞氏-姬姆萨染色和抗人血小板糖蛋白单克隆抗体(SZ-21, SZ-2)免疫荧光染色,鉴定证实所培养的细胞为巨核细胞。结果资料用配伍组资料的两两比较秩和检验进行统计学分析^[4]。

* 硕士研究生

结 果

D₂V 对人骨髓 CFU-MK 生长影响 结果
见表 1。

表1 D₂V对人骨髓 CFU-MK 生长的影响

配伍组号	实验组(集落数/10 ⁵ BMMC)		
	A	B	C
1	34.0	26.0	0.0
2	11.0	10.0	0.0
3	23.0	31.0	2.0
4	12.0	9.0	0.0
5	14.0	11.0	0.0
6	3.5	2.5	0.0
7	17.0	15.5	1.5
8	17.5	21.0	2.5
9	8.5	9.0	2.5
10	14.5	10.0	3.5
11	11.5	13.5	3.5
12	7.5	9.0	0.5
13	16.0	12.5	1.0
14	19.0	11.5	4.0
秩次	1	2	3
Ri	37	33	14

表2 配伍组资料的两两比较秩和检验

对比组	两秩和之差	a	差的标准误	q	P
1与3	23	3	3.742	6.147	<0.01
1与2	4	2	3.742	1.069	>0.05
2与3	19	2	3.742	5.078	<0.01

从表中的结果可知空白对照组与 D₂V 感染组 CFU-MK 之间的差异有显著性 ($P < 0.01$), 而空白对照组与 D₂V 灭活组 CFU-MK 之间的差异无显著性 ($P > 0.05$), 这表明 D₂V 原液对 CFU-MK 生长的抑制作用是 D₂V 而不是 D₂V 原液中的杂质。

讨 论

病毒感染骨髓导致巨核细胞减少或结构的破坏, 而引起血小板减少, 已有不少的报道。最近, 在 AIDS 血小板减少的发病机制的研

究中, 发现人类免疫缺陷病毒可以直接感染巨核细胞, 使巨核细胞发生畸变, 进而导致血小板减少^[4,5]。登革病毒在体内引起人骨髓巨核细胞的改变也已有报道。一些学者通过对登革出血热病人的骨髓检查, 发现在疾病的最初 1~4 天骨髓增生低下, 骨髓中的巨核细胞亦有减少或消失, 并伴有细胞的空泡变性和退行性变, 7~8 天后, 逐渐恢复正常^[1,2,6]。在体外登革病毒对人骨髓 CFU-MK 生长的影响尚没有报道。而登革病毒对人骨髓 CFU-GM 和 CFU-E 生长的抑制作用, 已被证实^[7,8]。本文研究结果显示 D₂V 在体外能示登革出血明显抑制人骨髓 CFU-MK 集落生长, 从而提高病人的血小板减少与该病毒抑制骨髓巨核细胞的增殖有关。这种抑制作用是病毒直接损伤巨核细胞或者是免疫异常的间接因素所致, 则有待今后阐明。

参 考 文 献

1. Nelson ER, et al. Hematologic findings in the 1960 hemorrhagic fever epidemic (dengue) in Thailand. Am J Trop Med Hyg 1964;13:642
2. Bierman HR, et al. Hematodepressive virus disease of Thailand. Ann Intern Med 1965;62:867
3. 邢佩霓, 等. 人骨髓巨核祖细胞体外半固体培养研究. 中华血液学杂志 1988;9(11):665
4. Zucker-Franklin D, et al. Megakaryocytes of human immunodeficiency virus-infected individuals express viral RNA. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:5595
5. Zucker-Franklin D, et al. Internalization of human immunodeficiency virus type I and other retroviruses by megakaryocytes and platelets. Blood 1990;75(10):1920
6. 叶子青, 等. II型登革病毒对人骨髓造血功能的影响. 中华血液学杂志 1990;11(2):93
7. 叶子青, 等. I型登革病毒对 CFU-GM 及 CFU-L 作用的研究. 中华血液学杂志 1990;11(3):152
8. 刘元生, 等. I型登革病毒对骨髓红系造血细

胞影响。中山医科大学学报 1991;12(1):29

生出版社,1990:243~245

9. 倪宗瓚主编. 医学统计学. 北京: 人民卫

(1991-04-04收稿 1991-09-12修回)

THE EFFECT OF DENGUE-2 VIRUS ON COLONY FORMING UNIT-MEGAKARYOCYTE GROWTH

Lin Dongjun

Liang Jinhua

Lin Guizhen

(Hematological Research Unit, Third Affiliated Hospital)

The human marrow megakaryocyte culture technique was used to detect the effect of Dengue-2 virus on colony forming unit-megakaryocyte (CFU-MK) growth 14 cases in vitro. In dengue-2 virus group showed significant suppression in CFU-MK growth as compared to normal control. It suggests that the hemorrhage and thrombocytopenia observed in patients with dengue hemorrhagic fever be due to the inhibition of megakaryocyte by the virus.

Key words megakaryocyte; colony forming unit-megakaryocyte; human megakaryocytic progenitor culture; methylcellulose semi-solid culture medium; Dengue-2 virus; dengue hemorrhagic fever; thrombocytopenia