文章编号: 1001-0580(2008)01-0058-04 中图分类号: R 373 文献标志码: A 【论 著】

人类疱疹病毒 - 6 型包膜胆固醇对病毒感染作用

李咏梅[1],李宏伟[2],王雪松[3]

摘 要: 目的 研究人类疱疹病毒 - 6 型(HHV - 6A)包膜胆固醇在病毒感染宿主细胞过程中的作用。**方法** 用不同浓度甲基-β-环糊精(MβCD)作用于 HHV - 6A GS 株,经 20 %蔗糖缓冲液梯度离心,去除甲基-β-环糊精并纯化病毒,分别感染 HSB - 2 和 Jurkat 细胞,采用免疫荧光实验(IFA),流式细胞术及免疫蛋白杂交等方法检测病毒在去除胆固醇后,对宿主细胞的结合、融合、进入的影响。**结果** 当 HHV - 6A 包膜胆固醇被 10 mmol/L 甲基-β-环糊精去除后,未检测到抗-即时早期蛋白(IE1)的表达,其感染性遭到破坏,但可以部分被外源性胆固醇所恢复,50 mmol/L 的外源胆固醇就可以使经 2.5 mmol/L MβCD 处理的病毒部分恢复其感染力。与未经 MβCD 处理的 HHV - 6A 比较,病毒尚能结合宿主细胞,其结合能力稍微受到了影响,但病毒不能进入靶细胞,其感染性及诱导细胞融合的能力显著减弱。**结论** HHV - 6A 包膜胆固醇在细胞融合过程中起着重要作用,同时也是病毒进入宿主细胞的关键因素。

关键词: 人类疱疹病毒 - 6 型;包膜;胆固醇;宿主细胞

Role of cholesterol in envelope of human herpesvirus - 6A on virus infectivity *LI Yong-mei, Li Hong-wei, WANG Xue-song. College of medical laboratory, Beihua University (Jilin 132013, China)*

Abstract: Objective To study the role of cholesterol in the envelope of human herpesvirus - 6 (HHV - 6) when they enter host cells. **Methods** HHV - 6A GS strains were treated with different concentrations of methyl - β - cyclodextrin (MβCD). The treated virus was subjected to ultracentrifugation through a 20 % sucrose cushion to remove MβCD and purified virons, then HSB - 2 and Jurkat cells were infected by treated HHV - 6A respectively. The roles of HHV - 6A binding host cells, induced cell - fusion and the ability of entry were examined by using IFA, flow cytometry and Western blotting post HHV - 6A cholesterol depletion. **Results** When cholesterol was removed from HHV - 6 virions with 10mmol/L MβCD, the expression of IE1 was not detected, the infectivity was abolished, but it could be partially rescued by the addition of exogenous cholesterol. 50 mmol/L may partially restored the infectivity of HHV - 6 treated with 2.5 mmol/L MβCD. Compared with untreated with MβCD, HHV - 6 binding was affected slightly by MβCD treatment. In contrast, envelope cholesterol depletion markedly affected HHV - 6 infectivity and HHV - 6 - induced cell fusion. **Conclusion** Cholesterol present in the HHV - 6 envelope plays a prominent role in the fusion process and is a key component in viral entry.

Key words: human herpesvirus 6; envelope; cholesterol; host cells

已有资料证实,病毒包膜脂类的存在与病毒的吸附和侵入有关[1,2]。本研究前期观察结果表明,采用甲基-β-环糊精(MβCD)作用于人类疱疹病毒 6 型 A(HHV-6A),可使包膜胆固醇含量明显下降[3]。为进一步探讨包膜胆固醇在病毒侵入宿主细胞过程中的作用,本文观察去除 HHV - 6A 包膜胆固醇后,病毒与靶细胞结合、融合及进入靶细胞的状态,以及外源性补充胆固醇后 HHV - 6A 感染力的变化。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)病毒株与细胞株:HHV - 6A GS 株;易感的 T 细胞株 HSB - 2 和 Jurkat 细胞株;脐带血单核细胞(CBMCs)(日本大阪大学医学部微生物室惠赠)。(2)试剂:细胞培养液 10 %小牛血清(FCS,美国 Sigma 公司);RPMI1640(自行配置);病毒包膜糖蛋白单克隆抗体(gQ,gL,gO 等)及抗 IE1 单克隆抗体(日本大阪大学医学部细菌室);甲基-β-环糊精(MβCD)和二氢胆固醇(美国 Sigma 公司),蛋白免疫印迹试验(Western blotting,WB)试剂(日本 TaKaRa 公司)。(3)仪器设备:Optima™ TL X 超速离心机(美国 BECKMAN 公司);荧光显微镜(NIKON ECLIPSE E 600,公司日本);X 光片曝光成像系统(日本富士公司);CO_2 培养箱(日本 SANYO 公司)。

1.2 方法

1.2.1 感染细胞、病毒纯化及病毒包膜胆固醇去除 HHV - 6A 感染 HSB - 2 细胞、纯化病毒制备及病毒包膜胆固醇去除均按文献[3]进行。

1.2.2 不同处理条件对 HHV - 6A 结合靶细胞的影响 (1)将 HSB - 2 细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,并保持在冰上 30 min;用 10 mmol/L 的 MβCD 处理经蔗糖密度梯度纯化的 HHV - 6A 病毒体,再用 20 %蔗糖溶液 70 000 r/min 离心 2h 去除 MβCD 并再纯化病毒,用 RPMI1640 液 500 μl 悬浮纯化的病毒体,然后将病毒体与 HSB - 2 细胞混合,分为 PBS,0,10 mmol/L MβCD 3 组,4 ℃培养 60 min,收获细胞备用;37 ℃培养 40min 感染细胞,继续培养 18h,收获细胞备用。分别将上述 4 ℃培养 60 min,37 ℃培养 18h 所收获的细胞洗涤 2 次,固定染色,用抗 - gB 单克隆抗体进行免疫荧光检测(IFA),比较不同条件下病毒与宿主细胞结合的程度;(2)取上述 37 ℃培养 18 h 病毒体感染的 HSB-2 细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次,超声波破碎细胞后,进行十二烷基磺酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后用抗-即时早期蛋白(immediately early protein1,IE1)单克隆抗体做 WB 以检测 IE1 的表达。(3)将病毒体与 HSB-2 细胞混合后,细胞洗涤 2 次,用抗-gB 和抗-gQ1 单克隆抗体处理细胞,采用流式细胞仪检测病毒与细胞结合量的变化。(4)MβCD 处理后病毒感染 Jurkat 细胞:取经 MβCD 去除胆固醇的 HHV-6A,感染 Jurkat 细胞,感染后 6 h,取细胞进行免疫荧光(IFA)检查和倒置显微镜观察;感染后 20h 进行免疫印迹(WB)检测 IE1 的表达。

1.2.3 外源性胆固醇补充实验 为检测 MβCD 去除胆固醇的作用是否不可逆,将 HHV - 6AGS 用 2.5 mmol/L 的

作者单位: 1. 北华大学医学检验学院,吉林 132013; 2. 吉林省吉林市中心医院; 3. 吉林省吉林市卫生局卫生监督所
作者简介: 李咏梅(1964 -),女,吉林人,教授,博士,研究方向:分子病毒学。

MβCD ,37 ℃作用 1 h 之后 ,分别给予 50 ,100 ,200 mmol/ L 的外源性胆固醇即二氢胆固醇 ,再培养 1h ,将处理过的病毒经 20 %蔗糖溶液 70 000 r/ min 离心 2 h ,去除 MβCD ,用 500 μl 含 10 %FCS 的 RPMI 1 640 液重悬病毒并用 0. 22 μm 的滤器过滤。然后感染细胞 ,分别检测病毒与细胞融合程度和 IE1 表达的恢复水平。

2　结　果

2. 1　不同处理条件对 HHV - 6A 与靶细胞结合程度的影响(图 1～图 3)　图 1 可见 ,经和未经 MβCD 处理的病毒体尽管都能与细胞结合 ,但表现不同。经 10 mmol/ L MβCD 处理的病毒体与 HSB - 2 细胞 4 ℃培养 60 min 后 , IFA 检查结果显示 ,与细胞结合的病毒体较未经 MβCD 处理的减少。转入 37 ℃继续培养 18 h 后的 IFA 结果显示 ,经 10 mmol/ L MβCD 处理的病毒感染细胞中未见有病毒蛋白 gB 的表达 ,表明没有病毒进入宿主细胞。图 2 可见 ,用 10 mmol/ L MβCD 处理的病毒体未检测到 IE1。图 3 流式细胞仪检测结果表明 ,经 MβCD 处理过的病毒结合靶细胞的量减少。

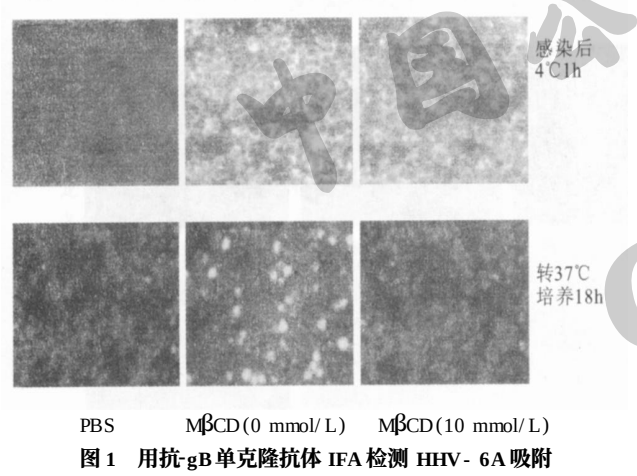


图 1　用抗-gB 单克隆抗体 IFA 检测 HHV- 6A 吸附 HSB- 2 细胞的比较

2. 2　不同浓度 MβCD 处理病毒感染 Jurkat 细胞的变化

2. 2. 1　融合程度变化(图 4)　图 4 可见 ,与未经 MβCD 处理的病毒体相比较 ,经不同浓度 MβCD 处理后的病毒体 ,在 Jurkat 细胞后 ,可减少感染细胞的融合 ,而且随着 MβCD 浓度的增加 ,融合细胞量显著减少(图 4a) ,倒置显微镜下也显示细胞与细胞融合形成大细胞的比例 ,随着 MβCD 浓度的增加而显著降低(图 4b) 。

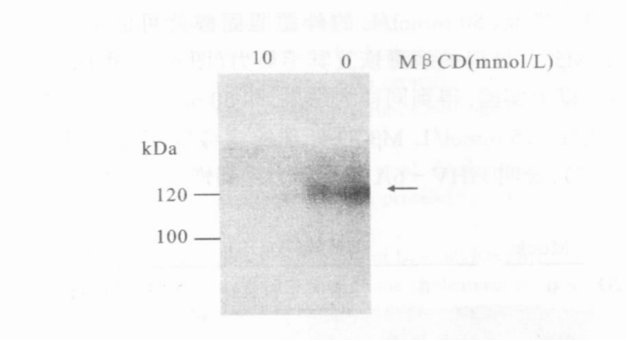
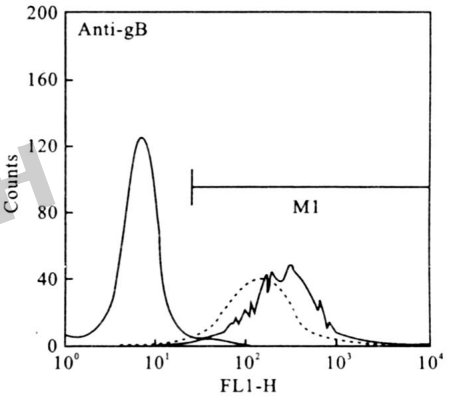


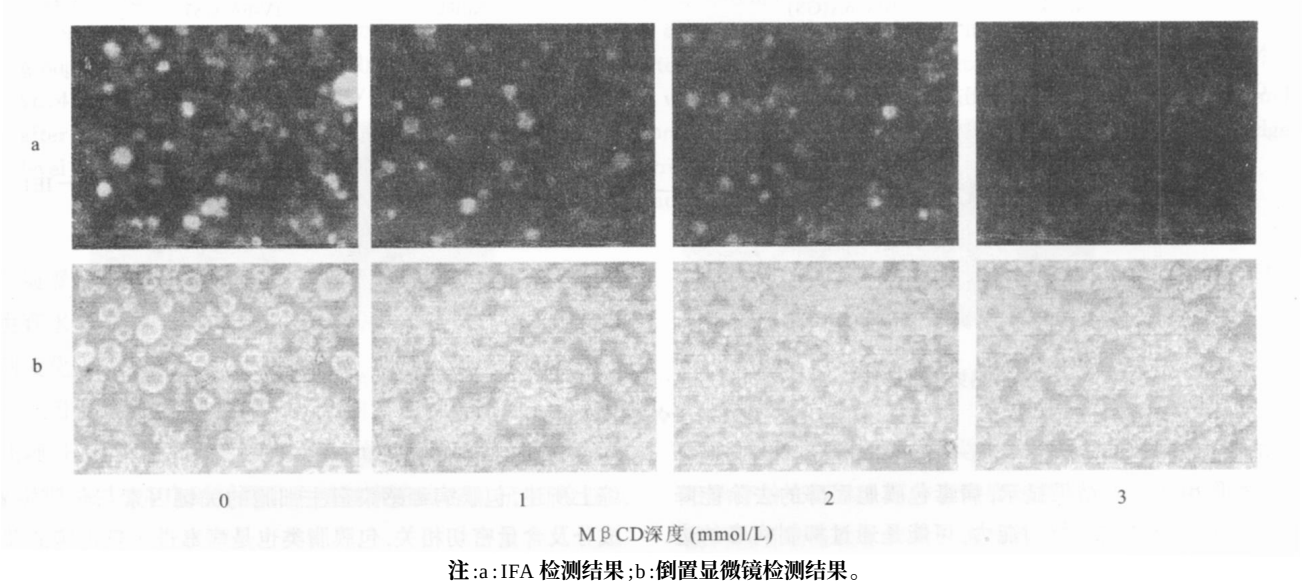
图 2　用抗-即时早期蛋白(抗-IE1) 单克隆抗体 WB 检测病毒 IE1 的表达

2. 2. 2　感染细胞 IE1 的表达(图 5)　图 5 可见 ,2 mmol/ L 的 MβCD 就可导致 IE1 的表达显著降低 ,3 mmol/ L MβCD 处理的 HHV - 6 ,几乎检测不到 IE1 表达。



注: —未处理的病毒体; ……MβCD 处理过的病毒体。

图 3　抗-gB 单克隆抗体处理细胞后的流式细胞仪检测结果



注:a:IFA 检测结果;b:倒置显微镜检测结果。

图 4　不同浓度 MβCD 处理的 HHV-6A 感染 Jurkat 细胞融合程度变化

2. 3　胆固醇补充实验　经 MβCD 处理的 HHV - 6A 给予外源性二氢胆固醇后 ,HHV - 6A 诱导的细胞融合及 IE1 的表

达均可得到恢复,50 mmol/L 的外源胆固醇就可以使经 2.5 mmol/L MβCD 处理的病毒恢复其感染力(图 6)。用 HSB - 2 细胞重复以上实验,得到同样的结果,即 50 mmol/L 的胆固醇也可以使经 2.5 mmol/L MβCD 处理的病毒恢复表达 IE1 的能力(图 7);表明 HHV - 6A 的感染力得到恢复。

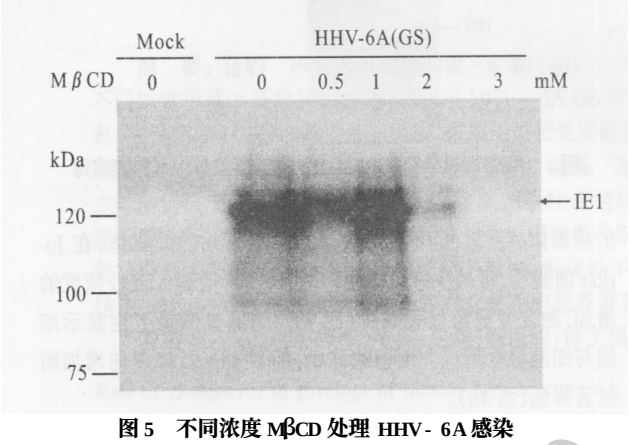
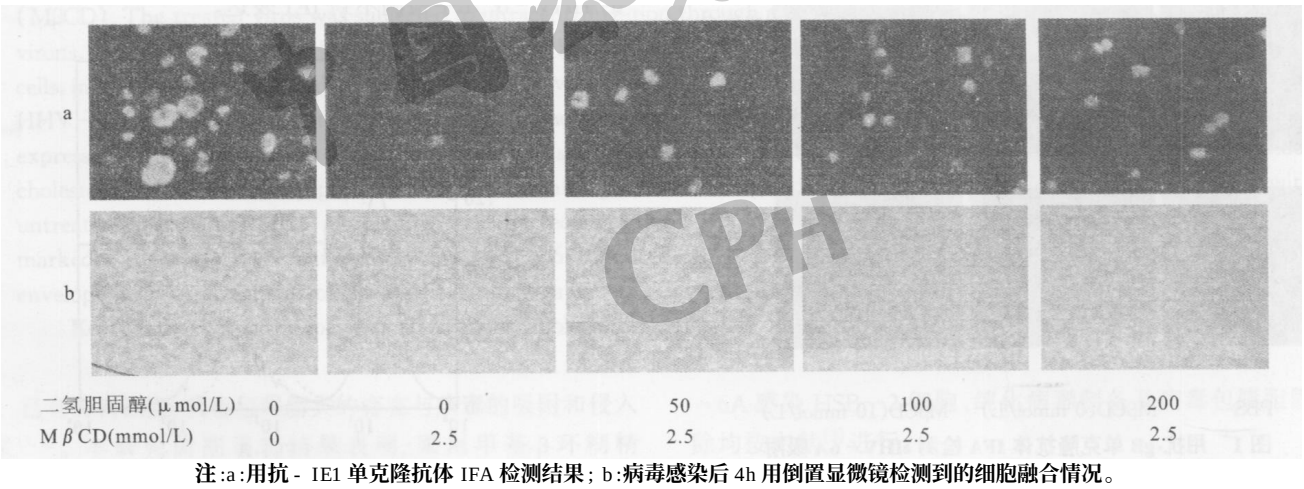


图 5 不同浓度 MβCD 处理 HHV - 6A 感染 Jurkat 细胞 20 h 后 IE1 表达水平

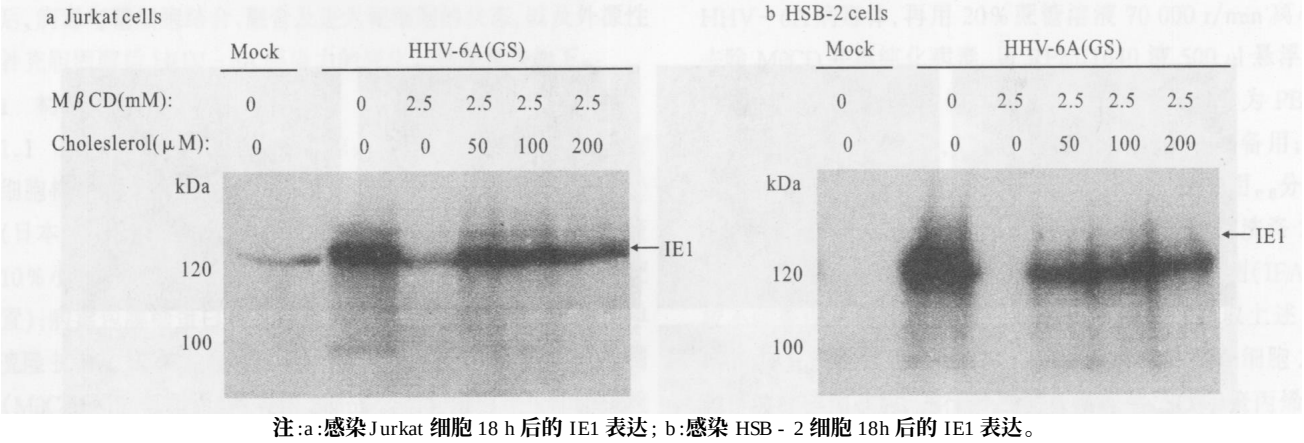
3 讨 论

研究表明,HHV - 6A 包膜糖蛋白复合体可与 T 细胞(HSB - 2) CD46 结合[4,5],主要是 HHV - 6A 包膜糖蛋白 gH - gL - gQ1 - gQ2(glycoprotein H - glycoprotein L - glycoprotein Q1 - glycoproteinQ2)复合体作为配体与人类细胞 CD46 结合[6]。使其在进入宿主细胞前就能引起细胞融合而出现多核巨细胞。即时早期蛋白 IE1 是由 HHV - 6A U1102 基因编码,含有 941 个氨基酸的蛋白质,是病毒进入细胞后最先表达的蛋白,一般在病毒感染后 4h 可以被检测到微量,大量被检测到是在感染后 12 h 以后,此种蛋白质在病毒建立增殖性感染、复活潜伏性感染及逃避免疫识别中起着关键性作用[7,8]。本文观察了去除 HHV - 6A 包膜胆固醇和补充外源性胆固醇后,HHV - 6A 与靶细胞结合、融合以及进入靶细胞,病毒 IE1 表达的影响等变化。结果表明,通过使用膜胆固醇结合药物 MβCD 处理病毒后,HHV - 6A 病毒体虽仍然能与靶细胞结合,却不能进入靶细胞。10 mmol/L MβCD 即可完全抑制病毒 IE1 的表达及细胞与细胞的融合;补充外源性胆固醇后可部分恢复 HHV - 6A 的感染性及细胞融合,表明 HHV - 6A



注:a:用抗 - IE1 单克隆抗体 IFA 检测结果;b:病毒感染后 4h 用倒置显微镜检测到的细胞融合情况。

图 6 不同浓度 MβCD 处理 HHV - 6A 感染 Jurkat 细胞和补充外源性胆固醇后的细胞变化



注:a:感染 Jurkat 细胞 18 h 后的 IE1 表达;b:感染 HSB - 2 细胞 18h 后的 IE1 表达。

图 7 抗 - IE1 mAb Western blotting 检测结果

包膜胆固醇如同其他有包膜病毒一样,对病毒诱导细胞融合起了重要作用[9,10]。结果显示,病毒包膜胆固醇的去除能降低 HHV - 6 感染宿主细胞的能力,可能是通过抑制病毒的进入而实现的。同时去除包膜胆固醇可以显著影响 IE1 表达及病毒诱导的细胞融合,其机制可能是由于胆固醇的缺如影响了病毒包膜 - 细胞膜,宿主细胞膜 - 细胞膜的融合而阻碍了病毒进入靶细胞,由于缺少胆固醇的包膜坚硬性降低,对糖蛋白的支撑作用松弛,松弛的包膜基底不能介导良好的融合而使病毒进入宿主细胞,甚至影响其与细胞的结合。

综上所述,包膜病毒感染宿主细胞的关键因素与包膜胆固醇成分及含量密切相关,包膜脂类也是病毒进入靶细胞的关键。

参考文献

〔1〕 Waarts B - L ,Bittman ,R Wilschut J. Sphingolipid and cholesterol dependence of alphavirus membrane fusion: lack of correlation with lipid raft formation in target liposomes[J].J Biol Chem ,2002 ,277(41) :38141 - 38147.

〔2〕 Bender F C, Whitbeck J C, Ponce de Leon M, et al. Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry[J]. J Virol, 2003, 77(17): 9542 - 9552.
〔3〕 李咏梅, 孙敏, 王大海. 人类疱疹病毒 6 型包膜胆固醇去除及糖蛋白的表达[J]. 中国公共卫生, 2008) (待发表).
〔4〕 Santoro F, Kennedy P E, Locatelli G, et al. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6[J]. Cell, 1999, 99(7): 817 - 827.
〔5〕 Mori Y, Seya T, Huang H L, et al. Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46 [J]. J Virol, 2002, 76(13): 6750 - 6761.
〔6〕 Akkapaiboon P, Mori Y, Sadaoka T, et al. Intracellular processing of human herpesvirus 6 glycoproteins Q1 and Q2 into tetrameric complexes expressed on the viral envelope[J]. J Virol, 2004, 78 (15): 7969 - 7983.
〔7〕 Annie Grave, Jean Gosselin and Louis Flamand. Human herpesvirus 6 immediate - early 1 protein is a sumoylated nuclear phosphoprotein colocalizing with promyelocytic leukemia protein - associated nuclear bodies[J]. J Biol Chem, 2002, 277(22): 19679 - 19687.
〔8〕 Stanton R, Fox JD, Caswell R, et al. Analysis of the human herpesvirus - 6 immediate - early 1 protein[J]. J Gen Virol, 2002, 83 (pt 11): 2811 - 2820.
〔9〕 Guyader M, Kiyokawa E, Abrami L, et al. Role for human immunodeficiency virus type 1 membrane cholesterol in viral internalization[J]. J Virol, 2002, 76(20): 10356 - 10364.
〔10〕 Viard M, Parolini I, Sargiacomo M, et al. Role of cholesterol in human immunodeficiency virus type 1 envelope protein - mediated fusion with host cells[J]. J Virol, 2002, 76(22): 11584 - 11595.

收稿日期: 2007-05-08　(孔繁学编辑　刘铁校对)

文章编号: 1001-0580(2008)01-0061-02　**中图分类号**: R 194.1　**文献标志码**: A　**【健康促进】**

新婚及待孕夫妇优生教育干预效果分析 *

唐毅[1], 汪勤[1], 正玲玲[1], 章蕤[1], 李华文[1], 董琳[2]

摘　要: **目的**　对新婚与待孕夫妇实施多种宣教结合优生筛查方式, 探讨有效的干预模式。**方法**　选择深圳市龙岗街道 526 名新婚与待孕夫妇作为干预对象, 将其分为干预组、宣教组和对照组, 通过问卷调查方式, 了解干预前后各组对象对优生知识认识的改变。**结果**　3 组对象问卷调查干预前得分基本相同, 干预组、宣教组、对照组对出生缺陷认识得分差异无统计学意义; 干预后, 干预组、宣教组、对照组得分在 58～68 分者分别占 98.4 %(179/182), 78.5 %(135/172), 11.6 %(20/172), 差异有统计学意义。**结论**　优生筛查结合多种宣教方式可显著提高特需人群的优生知识水平, 可有效预防出生缺陷的发生。

关键词: 优生筛查; 干预模式; 特需人群

Analysis on effect of eugenics and heredity education on newly - married women and prognant women

TANG Yi, WANG Qin, ZHENG Ling-ling, et al. Family Planning Service Center, Longgang District Shenzhen (Shenzhen 518116, *China)*

Abstract: **Objective**　To explore effective intervention models, propaganda educations, combining eugenic screening were implemented to the population with special need. **Methods**　To choose 526 newly - married women and pregnant women in Longgang district of Shenzhen as intervention objects, and randomized group into intervention group, education group and control group. At last to understand the change to eugenic knowledge before and after the intervention through a questionnaire survey. Intervention group and education group were proceeded propaganda educations, at same time the former was accepted eugenic screening, whereas control group had not any measures. Education effects can be determined by the score of questionnaires, of which maximum score was 68. **Results**　There were no evident differences before intervention, scores of the three groups were almost same ($P > 0.05$), Scores of 58～68 for intervention group, education group and the control group were 98.4 %(179/182), 78.5 % (135/172) and 11.6 % (20/172), which pronounced statistics differences ($P < 0.05$) before and after intervention. **Conclusion**　Eugenic screening, combining propaganda educations can significantly increase the knowledge level for population with special need. It also can prevent occurrence of the birth defect.

Key words: eugenic screening; intervention models; population with special need

随着经济的快速发展, 人口和计划生育工作已进入稳定低生育水平, 居民的生活理念和生活方式及生育需求发生了深刻变化。2005 年, 针对深圳城市化初期当地居民思想意识与生活习惯, 开展了建立城市化初期居民出生缺陷干预宣教模式项目, 对新婚与待孕夫妇(简称特需人群)进行重点干预, 实施优生筛查, 并全面开展了主殖健康遗传咨询、产前检查以及孕期保健知识的综合教育, 探索特需人群对优生知识可接受性的综合教育模式, 以满足他们对生育调节方法呈现出多元化趋势的需求。

1　对象与方法

1.1　**对象**　选择深圳市龙岗区龙岗街道常住人口中新婚与待孕育龄夫妇 526 名作为研究对象。年龄为 19～28 岁, 73 % 被调查者准备在 1 年内妊娠生育。以居住地便于集中学习为分组原则, 采用自愿报名方式, 将辖区内 9 个居委会的新婚、待孕育龄夫妇 526 人根据开展宣传工作先后顺序分为: 干预组、宣教组与对照组。其中干预组女性 92 人, 男性 90 人, 共计 182 人; 宣教组女性 87 人, 男性 85 人, 共计 172 人; 对照组

*基金项目: 深圳市龙岗区科技局项目(2005 - 19)
作者单位: 1. 深圳市龙岗区龙岗街道计生服务中心, 518116;
2. 中国计划生育学杂志社编辑部
作者简介: 唐毅(1963 -), 男, 江苏人, 副主任技师, 本科, 主要从事临床医学检验以及出生缺陷预防研究工作。