

# 登革病毒对人树突状细胞感染性的研究

江振友<sup>1</sup>\* 史毓杰<sup>1</sup> 孙晗笑<sup>2</sup>

(暨南大学<sup>1</sup> 医学院微生物学与免疫学教研室<sup>2</sup> 基因组药物研究所 广州 510632)

**摘 要** 探讨登革病毒对人树突状细胞(DC)的感染性。人外周新鲜血常规分离单核细胞,经细胞因子 GM-CSF、IL-4 诱导培养成 DC,通过形态学特征、细胞表型和淋巴细胞刺激能力鉴定。用登革病毒 2 型(DV2)感染 DC,于作用后 6h、24h、48h、72h、96h 分别收集上清液和细胞,用甲基纤维素微量空斑试验测定病毒滴度,间接免疫荧光法检测细胞上病毒抗原表达,透射电镜观察病毒在细胞内的定位。病毒感染后 6h 即可在培养上清中测出病毒,病毒滴度在 48h 达到高峰,以后逐渐下降。间接免疫荧光法证明感染的 DC 胞浆及胞膜上携带病毒抗原。透射电镜下在病毒感染 48h 后 DC 胞浆内可见大量病毒颗粒。树突状细胞是登革病毒感染的靶细胞,病毒可感染 DC 并产生大量病毒颗粒,可能在其发病机制中起重要作用。

**关键词** 登革病毒 人树突状细胞 感染

中图分类号:R392 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)04-0598-03

登革病毒(Dengue virus, DV)是登革热(Dengue fever, DF)、登革出血热(Dengue hemorrhagic fever, DHF)及登革休克综合征(Dengue shock syndrome, DSS)的病原体。已知免疫应答在决定其疾病严重程度中起重要作用,而树突状细胞(Dendritic cells, DC)是目前所知的机体内功能最强的抗原呈递细胞(Antigen presenting cell, APC),是激发初始 T 细胞反应的唯一刺激因子,同时可产生一系列细胞因子和其它化学介质参与免疫调节,因此在免疫应答中占据特殊的地位。但有关 DC 在登革病毒感染中的作用目前研究较少,本研究以人髓系树突状细胞为靶细胞,研究登革病毒对其感染性,并对感染条件及时间动力学等因素进行系统观察,为确定人 DC 是否是 DV 生长的允许性细胞。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 毒株和细胞** DV2 病毒标准株(New Guinea C 株, NGC 株),本教研室冻存,使用前将病毒在 C6/36 细胞上传代并采用微量病毒空斑法滴定病毒滴度(PFU/mL),病毒滴度为  $2 \times 10^7$  PFU/mL。白蚊伊蚊(C6/36)细胞株,本教研室长期传代和冻存。

**1.1.2 主要试剂** 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor, GM-

CSF)、重组人白细胞介素-4(Recombinant human interleukin 4, rhIL-4)(深圳晶美公司),鼠抗人 CD1a 单克隆抗体、鼠抗人 CD80 单克隆抗体、鼠抗人 CD40 单克隆抗体、鼠抗人 HLA-DR 单克隆抗体(Ancell 公司),新生小牛血清(杭州四季青公司),RPMI1640、DMEM(Gibco 公司),淋巴细胞分离液(天津 TBD 研究所),SABC 试剂盒(武汉博士德公司),FITC 标记的羊抗鼠 IgG(Sigma 公司)。

### 1.2 树突状细胞的体外诱导培养和鉴定

参照文献[1]的方法,其中用淋巴细胞分离液分离的单个核细胞在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养时间延长至 6h 以获得更多的单核细胞,加细胞因子 GM-CSF 和 IL-4 诱导培养 7~10d 收集细胞并鉴定。鉴定方法包括(1)倒置相差显微镜和透射电镜观察细胞形态;(2)免疫组化(ABC 法)测定细胞表面分子 CD1a、CD40、CD80、HLA-DR;(3)刺激同种淋巴细胞增殖反应测定其功能状态,具体方法参照文献[2]。

### 1.3 登革病毒感染人 DC 的病毒滴度测定

DV2 用 4% FCS 的 DMEM 配成  $2.5 \times 10^6$  pfu/mL,取 0.2mL 接种到含  $5 \times 10^4$ /孔 DC 的 24 孔板中,37℃ 吸附 2h 后弃感染上清,4% FCS 的 RPMI1640 洗两遍,每孔加 4% FCS 的 RPMI1640 培养液 0.5mL,分别于感染后 6h、24h、48h、72h、96h 收集上清,待测病毒滴度。病毒滴度测定参照文献[3]方法,采用甲基纤

基金项目:国家 863 计划(2003AA219060);广东省医学科研基金(A2005340)

\* 通讯作者。Tel 86-20-85220257; Fax 86-20-85221343; E-mail: jzhy@jnu.edu.cn

作者简介:江振友(1963-)男,皖舒城县人,副教授,硕士,主要从事病毒致病与免疫的分子生物学研究。E-mail: jzhy@jnu.edu.cn

收稿日期:2004-12-13,修回日期:2005-04-20

纤维素微量空斑试验法。

1.4 间接免疫荧光法检测

病毒感染方法同上,于收集上清同时收集感染细胞,置于玻片上,干燥后4℃丙酮固定10min,PBS清洗5次,每次5min,加1:10稀释的鼠抗DV抗体(一抗),PBS清洗5次,加FITC标记的羊抗鼠IgG(二抗),免疫荧光显微镜下观察,未感染DC作阴性对照。感染DV的C6/36细胞作阳性对照。

1.5 透射电镜观察登革病毒在感染DC内的定位

病毒感染方法同上,收集感染24h、48h、72h的DC置于离心管中,4%小牛血清的RPMI1640洗两遍,1000r/min离心10min,去上清。沿管壁加入2.5%戊二醛,4℃固定30min。4℃PBS液清洗2h,离心后去上清液。离心管内加入0.3mL 37℃ 2%的琼脂糖液,形成细胞琼脂凝胶预包埋块。1%四氧化钼4℃固定2h。丙酮梯度脱水,按常规方法渗透包埋,制成超薄切片,透射电镜观察并照相,未感染DC作阴性对照。

2 结果

2.1 DC体外培养和鉴定

单核细胞培养3d出现细胞聚集成散在的细胞集落,随着时间延长细胞从聚体脱落呈悬浮生长,培养7d左右可见到大量典型的树突样突起的悬浮细胞,形态呈圆形、网球拍形、不规则形等,体积比单核细胞大1~1.5倍(图版Ⅲ-A-a)。电镜观察可见细胞表面有大量不规则突起(图版Ⅲ-A-b),免疫组化显示,90%以上细胞表达DC特异性标志CD1a(91%),同时DC高表达HLA-DR(92%)、CD40(79%)和CD80(81%) (图版Ⅲ-A-c、d、e)。与对照组相比,树突状细胞明显促进同种淋巴细胞的增殖,DC按不同比例与同种淋巴细胞混合均产生强大的

刺激和促增殖能力(图1)。DC刺激同种淋巴细胞增殖反应表明本法获得的DC具有强大的促进淋巴细胞增殖能力。

2.2 感染DC上清病毒滴度的测定

病毒感染树突状细胞后6h,细胞开始产生病毒,病毒滴度48h达到高峰,以后逐渐下降(表1)。

表1 DV2 对人树突状细胞的感染性( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 1 The replication of DV2 in DC( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Time of after infection/h	Virus titre( pfu/mL $\times 10^3$ )
6	0.287 $\pm$ 0.055
24	1.581 $\pm$ 0.521
48	10.417 $\pm$ 0.802
72	3.217 $\pm$ 0.952
96	0.954 $\pm$ 0.104

2.3 感染DC中登革病毒抗原的检测

病毒感染24h出现荧光阳性细胞,48h达到高峰,在DC胞浆及胞膜上出现片状或颗粒性绿色荧光(图版Ⅲ-A-f)。

2.4 透射电镜下病毒在细胞内的定位

病毒感染24h在胞浆内可见到病毒颗粒,感染48h胞浆内出现大量病毒颗粒(图版Ⅲ-B-a、b)。

3 讨论

登革病毒的自然宿主是人和猴子等灵长类动物,但登革病毒在体内复制的确切部位目前仍不清楚<sup>[4]</sup>。所有的免疫效应细胞如巨噬细胞、单核细胞及非免疫细胞如血管内皮细胞、皮肤成纤维细胞、脑细胞等均被报道是潜在的宿主细胞<sup>[5~7]</sup>,然而这些细胞都不能有效的呈递抗原给T细胞。树突状细胞是主要抗原呈递细胞,在感染后可以从外周组织迁移至淋巴结,并活化CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T细胞<sup>[8,9]</sup>。目前已发现多种病毒如HIV、巨细胞病毒、麻疹病毒等可以在树突状细胞内增殖复制<sup>[10]</sup>,由于髓系DC分布在表皮和上皮,是免疫应答的始动者,因此很可能是登革病毒经蚊虫叮咬后引起机体发生最初免疫反应的主要细胞。

我们在体外实验中用登革病毒感染人树突状细胞后6h即可在培养上清中测出病毒,48h病毒滴度达到高峰,以后逐渐下降。感染细胞表达病毒抗原,以48h细胞阳性数量最多,荧光最强,胞浆内可见片状、大颗粒状阳性荧光。在透射电镜下观察病毒感染不同时间段的树突状细胞,同样发现随感染时间延长,病毒颗粒逐渐增多,在病毒感染后48h即

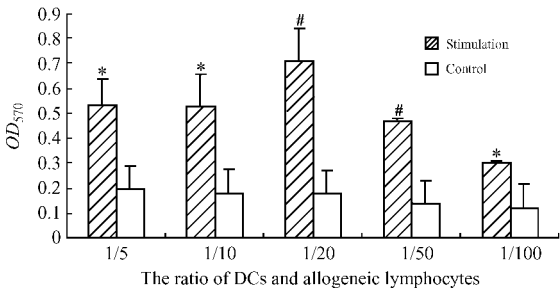


图1 DC刺激淋巴细胞增殖反应( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig.1 DC stimulated the proliferation of allogeneic lymphocytes( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

\*  $P < 0.05$ ; #  $P < 0.01$  vs control.

病毒滴度高峰时期的树突状细胞的胞浆里发现了大量病毒颗粒,其直径在 40 ~ 50nm,与登革病毒直径大小范围一致,并与病毒滴度及免疫荧光数据相一致,说明在体外登革病毒能够感染人树突状细胞并产生高滴度的病毒,因此有力地证实人树突状细胞很可能是登革病毒感染的重要早期靶细胞。

我们的研究还发现登革病毒感染可促进树突状细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-6<sup>[11]</sup>,提示病毒滴度在后期的下降可能与 DC 分泌对病毒有抑制作用的细胞因子有关。由此推论,易感者经带毒蚊虫叮咬后,病毒首先在位于表皮的树突状细胞内复制增殖,并传递抗原给初始 T 细胞,诱发免疫应答,与此同时,病毒也可在局部组织的皮肤成纤维细胞、血管内皮细胞内复制、扩散至全身,以及分泌一系列细胞因子、炎性分子等,从而导致 DF 或 DHF/DSS。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Romani N, Gruner S, Brang D, *et al.* Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*, 1994, **180**( 1 ): 83 - 93.
- [ 2 ] 李用国,罗云萍,梁增伟,等.人外周血树突状细胞的体外培养扩增.重庆医科大学学报 2001, **26**( 1 ): 1 - 3.
- [ 3 ] 江丽芳,江振友,郭辉玉.六种细胞因子对登革病毒感染人血管内皮细胞的影响.中华微生物学与免疫学杂志,1997, **17**( 2 ): 135 - 139.
- [ 4 ] Killen H, O'Sullivan M A. Detection of dengue virus by *in situ* hybridization. *J Virol Methods*, 1993, **41**( 2 ): 135 - 146.
- [ 5 ] 江丽芳,江振友,郭辉玉.登革病毒对人血管内皮细胞感染性的研究.中国病毒学,1997, **12**( 1 ): 32 - 37.
- [ 6 ] Desprès P, Frenkiel M P, Ceccaldi P E, *et al.* Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent Dengue viruses. *J Virol*, 1998, **72**( 1 ): 823 - 829.
- [ 7 ] Marianneau P, Cardona A, Edelman L, *et al.* Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death. *J Virol*, 1997, **71**( 4 ): 3244 - 3249.
- [ 8 ] Banchereau J, Steinman R M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, **392**( 6673 ): 245 - 252.
- [ 9 ] Nishioka Y, Hua W, Nishimura N, *et al.* Genetic modification of dendritic cells and its application for cancer immunotherapy. *J Med Invest* 2002, **49**( 1-2 ): 1 - 17.
- [ 10 ] Oldstone M B. Viral persistence: mechanisms and consequence. *Curr Opin Microbiol*, 1998, **1**( 4 ): 436 - 441.
- [ 11 ] 史毓杰,江振友.登革病毒感染促进人树突状细胞分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$  的研究.中国病理生理杂志,2005, **21**( 6 ): 1203 - 1206.

## Study on Dengue virus infection of human dendritic cells

JIANG Zhen-you\* SHI Yu-jie SUN Han-xiao

( Department of Microbiology and Immunology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China )

**Abstract**: To study Dengue virus ( DV ) infection of human dendritic cell ( DC ). Monocyte isolated from healthy human peripheral blood were incubated in medium with GM-CSF and IL-4 for more than 7 days. DCs were then collected and identified by transmission electron microscope, immunohistochemistry and lymphocytes stimulatory ability. Dengue virus type II ( DV-2 ) were infected with human dendritic cell ( DC ) *in vitro*, culture supernatants and cells were collected by different time postinfection ( 6h, 12h, 24h, 48h, 72h ). Viral titers were evaluated by microplaque forming assay on C6/36 monolayer cells, DV antigen in human dendritic cells were demonstrated by an indirect immunofluorescent assay ( IFA ). Localization of DV in DC was observed under a transmission electron microscope. The viruses were detected in the culture supernatants as early as 6h after infection; the highest viral titers were obtained at 48h, and then declined to very low titers at 96h. DV-2 antigen was detected in infected DC by IFA. After infection for 48h, DV particles were obvious in cystic vesicle, vacuoles. Human dendritic cells are targets of dengue virus infection. DV could efficiently infect DC and produce virus particles, DC possibly plays a role in the pathogenesis of DV infection.

**Key words**: Dengue virus, Human dendritic cells, Infection