

登革热的抗体依赖性感染增强的体外实验研究

岳耀斐 潘 玥 杨丽娟 陈俊英 赵玉娇 孙强明

摘 要 **目的** 建立异型登革热病毒(DENV)感染所产生的抗体依赖感染增强作用(ADE)的体外实验研究模型。**方法** 将梯度稀释的抗-Ⅱ型登革热膜前蛋白 prM 单克隆抗体与Ⅲ型登革热病毒(MOI=3)于 37℃、5% CO₂ 培养箱内孵育 90 min 形成抗体-病毒复合物后感染 K562 细胞,通过间接免疫荧光染色,real-time PCR 检测 DENV 抗原在细胞内的表达增强。**结果** 抗体依赖增强作用(ADE)的效果取决于抗体浓度。稀释度为 1/2560 的抗体与 DENV 结合共同感染 K562 后,细胞内登革热病毒抗原的免疫荧光染色结果有明显增强,real-time PCR 检测的结果也进一步证实了 K562 细胞内登革热病毒数量显著增加。**结论** 成功建立了登革热病毒的异型抗体依赖感染增强作用的体外研究模拟,为后续的 ADE 作用机制的研究提供了可靠的研究模型和实验基础。

关键词 登革热病毒 抗体依赖性的感染增强作用(ADE) K562 细胞

Research on Antibody - dependent Enhancement of Dengue Virus Infection in vitro. Yue Yaofei, Pan Yue, Yang Lijuan, Chen Junying, Zhao Yujiao, Sun Qiangming. Chinese Academy of Medical Science Peking Union of Medical College Institute of Medical Biology, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Yunnan 650118, China

Abstract Objective To establish the research model of antibody - dependent enhancement of dengue virus infection in vitro. **Methods** The virus - antibody complexes were prepared by mixing anti - dengue premembrane(prM)antibodies with viruses (MOI=3) for 90 min at 37°C before adding to the K562 cells suspension for infection. Then the infection of dengue virus in K562 cells were detected by indirect immunofluorescence stain and real - time PCR. **Results** It was found that the ADE effect was concentration - dependent. The strongest antibody - dependent enhancement (ADE) of dengue virus infection occurred when antibodies dilution were at 1/2560, but not at others. The infection of dengue virus was significantly enhanced according the results of indirect immunofluorescence stain and Real - Time PCR. **Conclusion** The model of antibody - dependent enhancement of dengue infection in vitro is established successfully. It will provide reliable experimental basis for the research on the mechanism of ADE of dengue virus.

Key words Dengue virus; Antibody - dependent enhancement of virus infection(ADE); K562 cell

登革热病毒(dengue virus, DENV)属于黄病毒科黄病毒属,由埃及伊蚊和白纹伊蚊传播^[1~3]。目前世界上 100 多个国家有登革热流行,约 25 亿~30 亿人受其威胁,每年新增约 1 亿感染病例及 24000 人死亡。在临床上可引起登革热、登革出血热和登革休克综合征^[4,5]。

登革热有 4 种血清型,分别为 DENV I、DENV II、DENV III、DENV IV,初次感染其中一种型别的登革热病毒后,机体会产生针对此型病毒的特异性抗

体^[6]。如再次感染该型病毒,病毒抗原与抗体形成免疫复合物,与单核-吞噬细胞表面的 Fc 受体或补体结合,在这些细胞中大量复制并且毒力增强,出现抗体依赖性感染增强作用(ADE),导致血管通透性增加、血浆外渗、血容量减少,血液浓缩和休克等一系列病理变化^[7~13]。由于初次感染产生的型特异性抗体不仅对其他型别的登革热病毒没有交叉免疫保护作用,甚至在异型病毒二次感染时还可能增强病毒的感染,导致更为严重的 DHF/DSS,给登革热病毒的疫苗研究带来了很大的挑战和困难^[14]。因此有关登革热 ADE 作用的探讨对于登革热的治疗、预防及疫苗的相关研究具有重要意义。

登革出血热和登革休克综合征(DHF/DSS)的发病机制一直是国内外研究的重点,但至今尚未完全阐明,绝大多数学者认为,抗体依赖的感染增强作用是 DHF/DSS 重要的发病机制。本研究通过抗Ⅱ型登革热 prM 单克隆抗体,与Ⅲ型登革热病毒共同孵育后

基金项目:云南省科技厅社会发展科技计划项目(2011CA016);中国医学科学院病原生物学研究所中央级公益性科研院所科研业务费项目(2009IPB102);中国医学科学院医学生物学研究所引进人才项目(IMB2009RC01)

作者单位:650118 昆明,中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所、云南省重大传染病疫苗研发重点实验室

通讯作者:孙强明,研究员,博士生导师,电子信箱:qmsun1972@yahoo.com.cn

形成抗体-病毒复合物,然后感染 K562 细胞(细胞表面仅存在 FcγR II),进行登革热感染的抗体依赖增强作用的体外模拟实验,获得了预期的效果,为体外研究登革热抗体依赖性感染增强作用及登革热病毒感染引起的登革出血热和登革休克综合征的作用机制提供可靠的模型和实验基础。

材料与方法

1. 病毒株: DENV III D9964, 由广东省疾病预防控制中心惠赠。

2. 细胞株: C6/36 细胞(本实验室保存), 人慢性骨髓性白血病细胞 K562(云南省肿瘤医院肿瘤研究所惠赠)。

3. 试剂: Eagle's MEM 培养液, PRMI 1640 培养液(均购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司), III 型登革热人源抗血清(英国国家生物制品检定所 NIBSC code: 02/274); FITC 标记的羊抗人 IgG [生工生物工程(上海)有限公司], 抗登革热 prM 单克隆抗体(mouse monoclonal to dengue virus Prm glycoprotein. (ab41473), Abcam 公司)。

4. 病毒在 C6/36 细胞上的适应培养及鉴定: 将 C6/36 按常规传代培养, 在其长成单层后接种登革热病毒 DENV III, 接种 7 天后, 细胞病变约 90% 时收获病毒悬液连续进行传代, 并通过免疫荧光染色和 RT-PCR 鉴定。将收获的第 9 代病毒悬液于 -20℃ 冻融 2 次, 4000r/min 4℃, 离心 10min, 取上清, 然后置于 -20℃ 保存备用。

5. 病毒悬液 TCID₅₀ 的测定: 用 MEM 维持液将 DENV III 做 10 倍系列稀释, 每个稀释度设 8 个复孔, 每孔加入 C6/36 (细胞数约为 1.5×10^4) 和 DENV III 各 80μl, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养 7 天, 以使感染细胞在第 7 天病变达 50% 以上的稀释度作为判定结果。

6. 病毒感染细胞: 将 DENV III, 以 MOI = 1、3、5 分别感染 K562 细胞, 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养, 感染后 72h 选取细胞悬液通过间接免疫荧光染色观察病毒增殖情况。

7. 体外 ADE 的模拟: 将 II 型 DENV 抗-prM 单克隆抗体用 1640 维持液以 1/40960 ~ 1/160 系列稀释^[6], 分别与 DENV III (MOI = 3) 结合, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱内孵育 90min 后将形成的抗体-病毒复合物感染 K562 细胞, 37℃、5% CO₂ 孵育 2h 后补充 1640 维持液继续培养 72h。

8. 间接免疫荧光染色: 分别将细胞悬液从 6 孔板转到离心管中, 800r/min 离心 5min, 弃上清, 加入固定液, 每管 500μl, 于 4℃ 固定 30min。用 PBS 洗 3 次, 每次 3min。最后 1 次洗涤留取约 60μl PBS, 将细胞悬起, 滴到已置入 6 孔板中的盖玻片上。稍晾干后加封闭液每孔 2ml, 37℃ 封闭 30min。PBS 洗 2 次, 每次 5min, 随后加入 1:200 稀释的一抗(III 型登革热人源抗血清), 4℃ 过夜。PBS 洗 2 次, 每次 5min。加入 1:250 稀释的二抗(FITC 标记的羊抗人 IgG) 37℃ 避光 1h。PBS 洗 2 次, 每次 5min(避光)。甘油封片后在荧光显微镜下观察结果并照相。

9. 反转录: 按照 AXYGEN 公司的 AXY/Prep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒说明提取 RNA。采用登革热病毒通用引物(中华人民共和国行业标准 WS216-2008): D1: 5' - TCAATATGCTGAAACGCGGCGAAACCG - 3', D2: 5' - TTG-CACCAACAGTCAATGCTCTTCAGGTTTC - 3' 使其反转录为 cDNA, 温度设置为 50℃ 30min, 95℃ 2min, 于 -20℃ 保存。

10. Real-time PCR: 根据参考文献[15]采用登革热病毒通用引物, DENV - FP: 5' - TAGAGAGCAGATCTCTGATGAA - 3', DENV - RP: 5' - TGAGAATCTCTTCGCCAAC - 3', 以反转录所形成的 cDNA 为模板, 根据 One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit II (perfect real-time) 试剂盒说明书建立 PCR 反应体系, 25μl 的反应体系为: 12.5μl 2 × One Step SYBR® RT-PCR Buffer, 1μl PrimeScript 1 Step Enzyme Mix, 6.5μl 无 RNA 酶去离子水(RNase Free dH₂O), 上下游引物各 1μl, cDNA 模板 3μl。反应条件为: 95℃ 15s, 50℃ 15s, 72℃ 15s, 共 40 个循环。每个稀释度的样品分别设 3 个复孔。荧光定量仪器型号为 CFX96™ real-time System(Bio-Rad)。

结 果

1. 病毒效价 TCID₅₀ 测定: 根据 96 孔板细胞病变结果, 按照 Karber 法计算出感染性效价 TCID₅₀ 值为: $10^{-7.75}$ 。

2. 病毒感染细胞的免疫荧光染色: DENV III 以 MOI = 1、3、5 分别感染 K562 细胞 72h 后, 固定细胞并进行免疫荧光染色, 结果显示以 MOI = 3 的病毒感染的细胞有相对较强免疫荧光染色, 而以 MOI = 1、5 的病毒数感染的细胞染色结果较弱(图 1)。

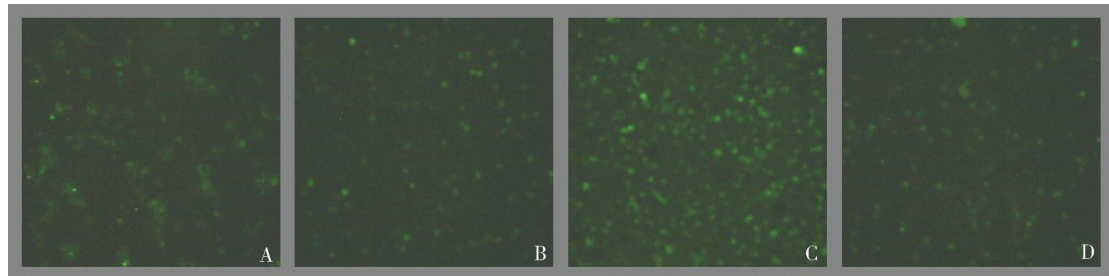


图 1 DENV III 感染 K562 后的免疫荧光染色结果

分别以 MOI = 1、3、5 感染 K562, 72h 后进行免疫荧光染色。A. 为正常细胞染色结果; B. 以 MOI = 1 的 DENV III 感染细胞后的染色结果; C. 以 MOI = 3 的 DENV III 感染细胞后的染色结果; D. 以 MOI = 5 的 DENV III 感染细胞后的染色结果

3. 体外 ADE 的间接免疫荧光染色结果:与未加抗体的实验组相比,被亚中和效价的抗体 - DENV Ⅲ病毒复合物(抗体稀释度 1/2560)感染后的 K562 细胞,登革热抗原免疫荧光染色结果最强,其他稀释度

的抗体与病毒孵育形成的抗体病毒复合物感染 K562 细胞后,登革热抗原免疫荧光染色的结果较弱或未被染色(图 2)。

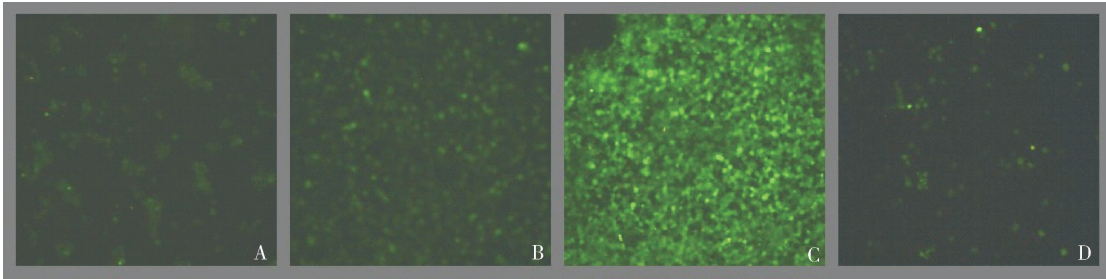


图 2 抗体 - DV Ⅲ病毒复合物感染 K562 后的免疫荧光染色结果

将Ⅱ型 DENV 抗 - prM 单克隆抗体以 1/40960 ~ 1/160 系列稀释,分别与 DENV Ⅲ(MOI = 3)结合形成抗体 - 病毒复合物后感染 K562,72h 后进行免疫荧光染色;A. 正常细胞染色结果;B. 未加抗体的 DENV Ⅲ感染细胞染色结果;C. 稀释度为 1/2560 的抗体 - DV Ⅲ病毒复合物感染细胞后的染色结果;D. 稀释度为 1/40960 的抗体 - DV Ⅲ病毒复合物感染细胞后的染色结果

4. real - time PCR:登革热病毒 - 抗体复合物感染 K562 细胞,72h 后收获细胞,提取病毒 RNA,根据 One Step SYBR ® PrimeScript ® RT - PCR Kit Ⅱ (Perfect Real Time) 试剂盒说明书,进行 real - time PCR 反应。抗体稀释度为 1/2560 的登革热病毒 - 抗体复合物感染的 K562 细胞样本反应管的 Ct 平均值最小,即其所对应的模板起始拷贝数最高(图 3、图 4)。

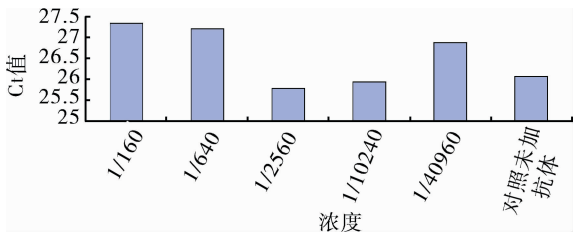


图 3 各稀释度抗体对应的 Ct 平均值

将抗 DENV Ⅱ Prm 单克隆抗体以 1/160 - 1/40960 系列稀释,分别与 DENV Ⅲ(MOI = 3)结合形成抗体 - 病毒复合物后感染 K562,每个稀释度设置 3 个复孔,各稀释度的 Ct 平均值依次为: Ct_{1/160} = 27.33, Ct_{1/640} = 27.19, Ct_{1/2560} = 25.78, Ct_{1/10240} = 25.93, Ct_{1/40960} = 26.86, Ct_{对照} = 26.07

讨 论

成熟的登革病毒颗粒呈球形,其核衣壳含单股正链 RNA,大小约为 11kb,含有 1 个开放阅读框(ORF),编码 3 种结构蛋白(核蛋白 C、膜结合蛋白 M 和包膜蛋白 E)和 7 种非结构蛋白。prM 蛋白是一种糖蛋白,为 M 蛋白的前体,在病毒成熟过程中 prM 糖蛋白经特异性酶切后形成 M 蛋白,它能导致病毒感染增强,并形成毒粒的表面结构。

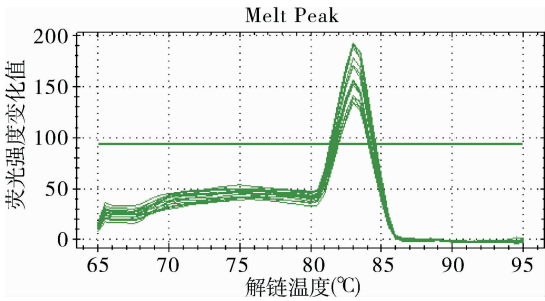


图 4 登革热病毒 - 抗体复合物感染 K562 细胞样品的 real - time PCR 融解曲线

将Ⅱ型 DENV 抗 - Prm 单克隆抗体以 1/160 ~ 1/40960 系列稀释,分别与 DENV Ⅲ(MOI = 3)结合感染 K562 后进行 real - time PCR,每个稀释度设置 3 个复孔,得到 18 条融解曲线

抗登革热 prM 单克隆抗体可以识别 DENV 的膜前蛋白和自身抗原如 HSP60,并利用这种双特性使病毒结合到 FCR⁺或 FCR⁻的细胞上并在细胞内大量增殖。本实验采用 FCR⁺的 K562 细胞(细胞表面仅存在 FcγR Ⅱ)来模拟体外登革热病毒 ADE。

实验研究发现交叉反应性抗登革热 prM 抗体可以提高 DENV 对 K562 细胞的感染率,且抗体依赖增强作用的强度取决于抗体浓度及登革热血清型。本实验通过免疫荧光染色和 real - time PCR 检测 DENV 在细胞内的增殖。分别用 MOI = 1、3、5 的 DENV 感染 K562 细胞,染色结果显示 MOI = 3 的病毒感染效果最好,正常细胞有少量呈非特异性染色,但不影响结果观察。而系列稀释的抗体与 MOI = 3 病毒结合感染细胞后的染色结果显示,抗体稀释度为 1/2560

时的感染率有显著增强,并通过 real-time PCR 的 Ct 平均值进一步证实了病毒感染率的增强。

因 real-time PCR 实验过程中采用的样本为病毒感染细胞悬液后提取的核酸,故不需要设置标准曲线及内参,只需通过 Ct 值相对定量模板量。起始拷贝数越多, Ct 值越小。本实验中抗体稀释度为 1/2560 时的 Ct 平均值最小,即此稀释度的抗体-DV Ⅲ复合物感染 K562 后的病毒模板起始拷贝数最多,病毒感染率最强。在免疫荧光染色过程中,稀释度为 1/10、1/40、1/160、1/163840 的抗体与病毒结合感染细胞后,镜下染色结果显示这些稀释度的细胞均呈规律性脱落。原因未明,有待继续研究讨论。

本实验中我们通过摸索 DENV Ⅲ对 K562 的最佳感染条件及不同稀释度的抗体与 DENV Ⅲ结合感染 K562 的最佳稀释度建立了 DENV 的体外 ADE 模型,为体外研究登革热病毒抗体依赖性感染增强作用及登革热病毒感染引起的登革出血热和登革休克综合征的作用机制提供可靠的模型和实验基础。在后续的试验中我们将以此模型为基础对其进行蛋白质组学研究,结果将另文报道。

参考文献

- 1 Chunya P, Poonsook K, Nuanpan K, *et al.* Novel anti-dengue monoclonal antibody recognizing conformational structure of the prM-E heterodimeric complex of dengue virus [J]. J Med Virol, 2008, 80(1):125-133
- 2 Janjoree N, Sansanee N, Chunya P, *et al.* Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis[J]. Virus Research, 2010, 147(2):275-283
- 3 Susana V, Didy R, Rafael B, *et al.* Kinetics of dengue virus NS1 protein in dengue 4-confirmed adult patients[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2010, 68(1):46-49
- 4 Liao HW, Xu J, Huang J. FasL/Fas pathway is involved in dengue virus induced apoptosis of the vascular endothelial cells[J]. Journal of Medical Virology, 2010, 82(8):1392-1399

- 5 Alegria L, Nereida V, Luz ME, *et al.* Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue[J]. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2010, 104(1):16-23
- 6 Kobporn B, Bonnie MS, Timothy HB, *et al.* Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection[J]. Journal of Virology, 2008, 86(6):3939-3951
- 7 Pathama K, Mingkwan P, Nitwara W, *et al.* Dengue infection of monocytic cells activates ER stress pathways, but apoptosis is induced through both extrinsic and intrinsic pathways[J]. Virology, 2011, 409(2):189-197
- 8 Eduardo JM, Ana MS, Marli TC, *et al.* Alternative complement pathway deregulation is correlated with dengue severity[J]. Plos One, 2009, 4(8):e6782
- 9 Panisadee A, Anja F, Richard EH, *et al.* Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1[J]. JEM, 2010, 207(4):793-806
- 10 Erin M, Camilo AS, Syd J, *et al.* complement protein C1q inhibits antibody-dependent enhancement of flavivirus infection in an IgG subclass-specific manner[J]. Cell Host & Microbe, 2007, 2(6):417-426
- 11 Amanda TC, Elzinandes LA, Alessandro SM, *et al.* Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, 2009, 104(8):1091-1099
- 12 Panisadee A, Nuntaya P, Sansanee N, *et al.* Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral Protein NS1 and complement[J]. Journal of Infectious Diseases, 2006, 193(8):1078-1088
- 13 Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update[J]. Lancet Infect Dis, 2002, 2(1):33-42
- 14 Chunya P, Tanapan P, Nathaporn U, *et al.* The development of a novel serotyping-NS1-ELISA to identify serotypes of dengue virus[J]. JCV, 2011, 50(4):314-319
- 15 朱玉兰,王佃鹏,甄胜西,等.登革热病毒 RNA 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J].热带医学杂志,2009,9(11):1244-1246

(收稿日期:2012-02-27)

(修回日期:2012-03-21)

丙酸氟替卡松鼻喷雾剂对儿童过敏性鼻炎血清 VCAM-1、IL-4、IL-12 表达水平的研究

王 斌 王 戩 刘 锋 周水森

摘 要 目的 探讨儿童过敏性鼻炎患者血清血管细胞间黏附分子-1(VCAM-1)、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院耳鼻咽喉头颈外科

通讯作者:刘锋,电子信箱:doctor_fliu@163.com