

心脏移植并发疱疹病毒 6 型感染

关明旭 吕绳敏

摘要 从 13 例心脏移植病人的外周血淋巴细胞中分离出 2 株疱疹病毒 6 型 (HHV6), 并检测了手术前后病人血清特异性抗-HHV6 IgG 抗体。这 2 株 HHV6 可引起典型的细胞病变。分离的毒株在电镜下可见疱疹类病毒样颗粒。经特异性抗体和 DNA 杂交试验证明, 这两株病毒均属于 HHV6 B 组。病人血清中特异性抗-HHV6 IgG 抗体出现 4 倍或 4 倍以上增长的有 5 例 (39%), 其中包括 2 例病毒分离阳性的病人血清。由于病人在术前血清已是阳性和术后出现有意义效价的增长, 因此试验结果提示心脏移植前后免疫抑制剂的应用可能是造成 HHV6 复发感染的重要原因。

主题词 疱疹病毒 6 型, 人 心脏移植 感染

Heart transplantation complicated with human herpesvirus 6 infection Guan Mingxu, Lu Shengmin.
Virus Lab of Second Hospital of China Medical University, Shenyang 110003

Abstract HHV-6 was isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of heart transplanted recipients cocultured with normal cord blood lymphocytes (CBL). Two of the 13 patients were positive for HHV-6 and none were positive in the normal control group. The virus-infected cells showed a characteristically enlarged, balloon-shaped syncytial cell pathogenic effect (CPE). The positive isolates were confirmed by indirect immunofluorescence assay, electron microscopy and southern hybridization with a 6.9 kb HHV-6 (Z29) BamHI DNA probe. In addition, the positive isolates did not react with monoclonal antibodies against HSV, CMV, VZV and EBV. The two positive isolates were identified as HHV-6 B group. In this study, a series of sera were also screened for specific anti-HHV-6 IgG antibody. Five of the 13 patients showed a fourfold or greater rise in HHV-6 antibody after transplantation including the two from whom viruses have been isolated. The results suggest that the HHV-6 infection was most likely due to reactivation by immunosuppressive therapy since patients's sera were already positive before transplantation. Our results confirm the report that HHV-6 might remain as a latent infection following the primary infection and also demonstrates that HHV-6 as a new member of herpesvirus family might coinfect with other viruses in post-heart transplanted recipients.

Key words Human herpesvirus 6 Heart transplantation Infection

人疱疹病毒 6 型 (HHV6) 是人疱疹类病毒的新成员^[1,2]。是婴儿玫瑰疹的病原体^[3], 并与淋巴增生性疾病和免疫缺陷病人感染等多种疾病有关^[4,5]。最初从免疫缺损病人外周血淋巴细胞 (PBMC) 中发现^[6], 后来相继从器官移植病人, 肾^[7]、肝^[8]、骨髓^[9]和正常人唾液^[10]中分离到。由于各地分离的毒株之间存在差异, 人们建议将 HHV6 分为两组, A 组代表株为 GS 株, B 组代表株为 Z29 株。

血清流行病学资料揭示 HHV6 的感染在正常人群中比较普遍^[11]。病毒在原发感染后

时引起复发感染。我们从心脏移植病人的外周血淋巴细胞中分离到 HHV6 B 组病毒, 并结合血清学结果分析了手术前后免疫抑制剂的应用与 HHV6 的复发感染及心脏移植后并发 HHV6 感染的关系。

1 材料和方法

1.1 临床标本 1991 年 7 月至 12 月从加拿大渥太华市民医院心脏移植中心收集到 13 例心脏移植前后的 30 份静脉血和 30 份正常人血液标本。按常规方法分

离出 PBMC 用于病毒分离。另外收集病人手术前后的连续血清共 52 份作为测定抗-HHV6 IgG 抗体的标本, 和 30 份正常人血清做对照。

1.2 病毒分离 将正常脐带血淋巴细胞(CBL)做为共同培养细胞, 在含有 10% 胎牛血清、PHA-P 5 μ g/ml (Sigma)、IL-2 2U/ml (Sigma) 和常规抗菌素的 RPMI 1640 培养基(Sigma) 中培养, 3 天后加入新鲜的病人 PBMC 标本, 每日观察细胞病变(CPE), 每 3 天换液 1 次。

1.3 免疫荧光试验和电镜检查 当 HHV6(Z29)感染 CBL 的 CPE 达 80% 以上时收集细胞, 用 pH7.4 的 PBS 洗 2 次, 制成抗原片。用抗-HHV6 特异性血清、抗巨细胞病毒(CMV)、EB 病毒(EBV)、单纯疱疹病毒 I 型(HSV1)、单纯疱疹病毒 II 型(HSV2)和抗水痘-带状疱疹病毒(VZV)的单克隆抗体(MAb)做常规间接免疫荧光染色, 第二抗体为羊抗人 IgG 荧光结合物。同时将有 CPE 的细胞按常规处理, 电镜检查。

1.4 Southern 印迹杂交试验 按 Josephs^[12]方法从有 CPE 的细胞中提取病毒 DNA。杂交探针是 HHV6 (Z29 株)6.9kb BamH I 片段, 由美国疾病控制中心的 P. P. Pellett 教授提供 pkms 13 重组质粒。探针用寡核苷酸标记的试剂盒(Pharmacia)标记, 杂交条件按说明规定。

1.5 血清学检测 取 20 μ l 倍比稀释的病人血清加在 HHV6(Z29)抗原片上, 按常规进行间接免疫荧光试验。

2 结果

2.1 病毒分离与鉴定 将 13 例病人的 30 份 PBMC 标本与正常 CBL 共同培养, 其中 2 例病人的 PBMC 出现 CPE。正常对照标本病毒分离为阴性。分离阳性的 2 株病毒大约在 10~14 天出现 CPE。经特异性抗体、电镜和 DNA 杂交试验证明, 这 2 株病毒均为 HHV6 B 组病毒, 与抗-CMV, HSV, EBV 和 VZV 的 MAb 均未出现交叉反应。其中 1 株病毒经多次传代仍能出现稳定明显的 CPE(图 1)。其特异性免疫荧光试验呈阳性反应(图 2)。电镜下可见典型的疱疹病毒样颗粒(图 3)。其 DNA 可与 HHV6 (Z29) BamH I DNA 探针出现明显的杂交反应(图 4)。

2.2 抗-HHV6 IgG 抗体水平的变化 病人



图 1 HHV6 感染细胞的显微镜观察结果

Fig. 1 HHV-6 infected cells showed a characteristically enlarged balloon-shaped syncytial CPE under electron microscope



图 2 临床标本分离毒株的 IFA 鉴定结果

Fig. 2 Identification of HHV-6 isolated from clinical sample by IFA



图 3 电镜下的 HHV-6 颗粒 $\times 82800$

Fig. 3 Electron microscopy of HHV-6 particles isolated from heart transplanted recipient $\times 82800$

(GMT)为 56, 术后 GMT 为 1744。正常对照组 GMT 为 67。其中 5 例病人血清抗-HHV6 IgG 抗体在术后出现 4 倍或 4 倍以上增长占 28.6%。图 5 显示了此 5 例病人在血清特异性抗

效价高,同时病毒分离阳性。病人抗体效价一般在术后 1 个月后出现明显变化。

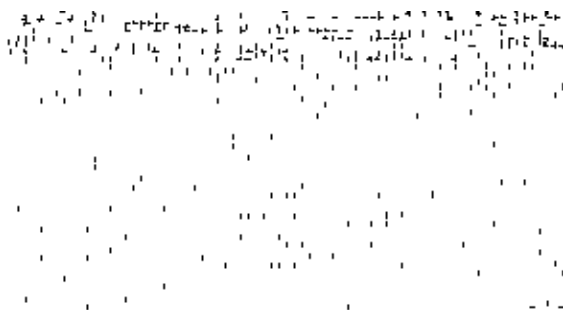


图 4 Southern 印迹杂交结果

1: 分离株 1; 2: 分离株 2; 3: 标准株 (Z29); 4: 正常 CBL

Fig. 4 Southern hybridization of clinical HHV-6 DNA by using a Dig-labeled 6.9 kb HHV-6 (Z29) BamHI DNA fragment

1: patient 1; 2: patient 2; 3: HHV6 (Z29); 4: normal CBL

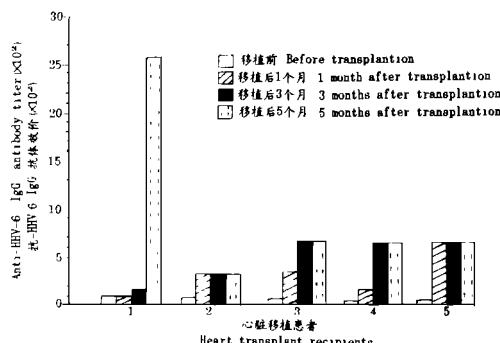


图 5 心脏移植病人手术前后血清抗-HHV6 IgG 抗体的变化

Fig. 5 Comparison of anti-HHV-6 IgG antibody titer in 5 heart transplanted recipients in pre-and post-transplantation

3 讨论

病毒分离是一种十分可靠的病毒学诊断手段,目前 HHV6 分离工作中的主要问题是缺乏对 HHV6 增殖敏感的细胞系。用 DNA 检测的手段比病毒分离方法更灵敏、可靠。但从临床角度分析, DNA 检测的手段在低病毒血症时对临床治疗上的指导意义不大,因为病毒 DNA 的存在不能说明病毒是活动性感染。

我们测定了病人血清中特异性 IgG 抗体水平, 13 例病人中 5 例术后有抗-HHV6 IgG 抗体效价出现 4 倍或 4 倍以上增长, 其中 2 例病毒分离同时阳性, 这 2 例病人术前抗-HHV6 抗体已是阳性。提示手术前后免疫抑制剂的应用可能是使潜伏的病毒复发感染的重要原因, 证明了 HHV6 是心脏移植病人术后并发感染的又一新成员。

参 考 文 献

- 1 Salahuddin SZ, Ablashi D V, Markham P D, et al. Isolation of new virus, HBLV in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*, 1986, 234: 596.
- 2 Ablashi D V, Salahuddin SZ, Josephe S F, et al. HBLV (or HHV-6) in human cell lines. *Nature*, 1978, 329: 207.
- 3 Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, et al. Identification of human herpes virus 6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*, 1988, 1: 1065.
- 4 Yamanishi K. Human herpes virus 6. *Microbiol Immunol*, 1992, 36: 551.
- 5 Lopez C, Pellett P, Stewart J, et al. Characteristics of human herpes virus 6. *J Infect Dis*, 1988, 157: 1271.
- 6 Biberfeld P, Petren A L, Eklund A, et al. Human herpesvirus 6 in sarcoidosis and lymphoproliferative disorders. *J Med Virol*, 1988, 21: 49.
- 7 Asno Y, Yoshikama T, Suga S, et al. Human herpesvirus 6 harboring in kidney. *Lancet*, 1989, 2: 1391.
- 8 Ward K N, Gray J J, Efstathiou S. Brief report: primary human herpesvirus 6 infection in a patient following liver transplantation from a seropositive donor. *J Med Virol*, 1989, 28: 69.
- 9 Carrigan D, Drobysk W B, Rissler S K, et al. Interstitial pneumonitis associated with human herpesvirus 6 infection after marrow transplantation. *Lancet*, 1991, 338: 147.
- 10 Harnett G B, Fatt T T, Pietroboni G R, et al. Frequent shedding of human herpesvirus 6 in saliva. *J Med Virol*, 1990, 30: 128.
- 11 Ranger S, Patillaud S, Denis F, et al. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 in pregnant women from different parts of the world. *J Med Virol*, 1991, 34: 194.
- 12 Josephe S F, Ablashi D V, Salahuddin SZ, et al. Molecular studies of HHV-6. *J Med Virol*, 1988, 21: 179.