文章编号:1000-5404(2010)18-1925-04

论著

人 α 防御素-5 多肽体外抗单纯疱疹Ⅱ型病毒作用的研究

陈 芳,王艾平,申明强,陈 默,许 杨,王 崧,粟永萍,程天民,王军平 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

【摘要】 **目的** 探讨人 α 防御素-5(human α-defensin-5, HD-5)多肽体外抗单纯疱疹Ⅱ型病毒(herpes simplex virus type 2, HSV-2)的作用及其机制。**方法** 以绿猴肾细胞(Vero)为宿主细胞,采用 CCK-8 法首先分析 10 ~ 200 μg/ml 浓度范围内 HD-5 多肽的细胞毒性,再以 HSV-2 感染 Vero 细胞,分别于感染前后和感染的同时加入 100 μg/ml 的 HD-5 多肽,72 h 后测定细胞保护率,结合细胞病变效应观察,分析 HD-5 抗 HSV-2 的作用效果和起效环节,并通过改变培养基中血清的浓度,观察血清对 HD-5 抗病毒作用的影响。**结果** 在 100 μg/ml 浓度以内,HD-5 多肽几乎无细胞毒性,提前或同时加入 HD-5 多肽可以显著抑制 HSV-2 病毒引起的细胞病变反应、提高细胞保护率($P < 0.01$),而在 HSV-2 感染 2 h 后加入 HD-5 多肽对 Vero 细胞的保护作用不明显($P > 0.05$);血清浓度会显著影响 HD-5 多肽的抗 HSV-2 活性,血清浓度越高,HD-5 多肽对细胞的保护率越低。**结论** HD-5 多肽在体外具有显著的抗 HSV-2 感染活性,其作用机制主要是通过干扰病毒对细胞的粘附、侵入而发挥作用。

【关键词】 防御素类;疱疹病毒 2 型, 人;Vero 细胞;体外研究
【中图法分类号】 R-33;R373.11;R977.6 **【文献标志码】** A

Human α-defensins-5 against herpes simplex virus type 2 *in vitro*

Chen Fang, Wang Aiping, Shen Mingqiang, Chen Mo, Xu Yang, Wang Song, Su Yongping, Cheng Tianmin, Wang Junping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department of Radiation Medicine, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of human α-defensin-5 (HD-5) against herpes simplex virus type 2 (HSV-2) in Vero cells cultured *in vitro*. **Methods** Cytotoxicity of HD-5 at various concentrations (10 to 200 μg/ml) on cultured Vero cells was determined by CCK-8 assay. HD-5 of 100 μg/ml was added into the culture medium of Vero cells before, simultaneously, or after the cells were infected with HSV-2. The effects of HD-5 against HSV-2 were analyzed by CCK-8 assay, and cytopathic effect (CPE) was observed at 72 h after HSV-2 infection. Meanwhile, the influence of serum concentration on the antiviral activity of HD-5 was also evaluated. **Results** No obvious cytotoxic effect of HD-5 was found in cultured Vero cells within the concentration of 100 μg/ml. At a fixed dose of 100 μg/ml, HD-5 showed significant protective effect on Vero cells against HSV-2 ($P < 0.01$), when it was added before or simultaneously with HSV-2 infection. While, the protective effect was not observed when it was added in 2 h after HSV-2 infection ($P > 0.05$). The antiviral activity of HD-5 was markedly reduced as the concentration of serum in the medium was increased. **Conclusion** HD-5 has significant antiviral activity against HSV-2 *in vitro*, probably through reducing adherence and host cell invasion of the virus.

【Key words】 defensins; herpesvirus 2, human; Vero cells; *in vitro*

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771892) and the Academician Foundation of Chongqing (CSTC2007AB5022). Corresponding author: Wang Junping, Tel: 86-23-68752283, E-mail: wangjunp@yahoo.com

防御素(defensins)是在植物、昆虫、两栖类、鸟类和哺乳动物体内发现的一组具有抵抗外界微生物侵害的小分子多肽。根据分子内半胱氨酸的位置和连接方式、前体性质以及表达位置的差异,哺乳动物防御素可分为 α、β 和 θ 防御素 3 种类型[1,2]。目前在人体内共发现 6 种 α 防御素,分别为中性粒细胞来源的 Defensin Neutrophil Peptide (HNP)-1、HNP-2、HNP-3 和 HNP-4 以及从小肠 Paneth 细胞发现的 HD-5 和 HD-6[1,3]。

【基金项目】 国家自然科学基金(30771892);重庆市院士基金(CSTC2007AB5022)
【通信作者】 王军平,电话:(023)68752283,E-mail:wangjunp@yahoo.com

人α防御素-5(human α-defensin-5, HD-5)除了存在于肠道组织外,在生殖道黏膜上皮也有特异性高表达。因此,人们推测HD-5在抵抗生殖道病毒感染过程中可能发挥着一定的作用[4],但这方面的研究报道比较缺乏。本实验对HD-5体外抗单纯疱疹Ⅱ型病毒(herpes simplex virus type 2, HSV-2)的作用进行了初步研究,并对其作用机制进行了探讨,为进一步解读HD-5的生物学功能提供实验依据,同时也为寻找新型抗病毒药物奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

改良型RPMI1640培养基(美国HyClone公司),0.25%胰酶(美国HyClone公司),胎牛血清(美国Gibco公司),96孔U型培养板(Coster公司),CCK-8试剂盒(日本Dojindo公司),细胞计数仪(美国BD公司),酶标仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 实验材料

1.2.1 HD-5多肽 HD-5多肽委托杭州中肽生化有限公司合成(干粉状),用灭菌超纯水配制,-70 ℃保存,临用时用RPMI1640培养基稀释至所需浓度。

1.2.2 细胞 绿猴肾细胞株(Vero细胞)由第三军医大学军事预防医学院军队流行病学教研室惠赠。细胞生长液:1640培养基+10%胎牛血清,常规培养;细胞维持液:除血清降为2%外,其余同生长液。

1.2.3 病毒 单纯疱疹Ⅱ型病毒株(HSV-2病毒株),由第三军医大学基础医学部微生物教研室惠赠。病毒经Vero细胞活化增殖,细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)达75%以上时收获,毒种保存于-70 ℃。病毒滴度的测定:取上述制备好的毒株,做10倍稀释(10^{-15} ~ 10^{-1}),将各稀释度的毒株接种于已长成单层细胞的96孔培养板中,每个稀释度4个复孔,同时设正常细胞对照。定期观察CPE,测定HSV-2病毒半数组织细胞感染剂量($TCID_{50}$)。

1.3 实验方法

1.3.1 CCK-8法检测HD-5多肽的细胞毒性 Vero细胞经胰酶消化后,以含10%胎牛血清的1640培养液制成5×10^4/ml细胞悬液,加入96孔培养板中,每孔100 μl,24 h后弃生长液加入不同稀释度的HD-5多肽(10、50、100、150、200 μg/ml),每个稀释度设6个复孔,同时设正常细胞作为空白对照组。置于5% CO_2、37 ℃培养箱中连续培养72 h后每孔加入CCK-8试剂10 μl,再于37 ℃培养箱中培养3 h后使用酶标仪于490 nm波长检测细胞光密度值并计算Vero细胞的存活率。

细胞存活率=实验组平均光密度值/空白对照组平均光密度值×100%

1.3.2 HD-5多肽对病毒黏附、侵入及复制的影响作用分析 于HSV-2病毒感染Vero细胞后的不同时间点加入100 μg/ml HD-5多肽,37℃培养72 h后CCK-8法检测细胞保护率,显微镜下观察CPE。具体分组如下:①病毒黏附作用干预组:先将100 μg/ml HD-5多肽与Vero细胞混匀,再加入HSV-2病毒液,于4 ℃孵育5 h后弃培养液,再加入维持液,37 ℃培养72 h后观察CPE,并检测细胞保护率。②病毒侵入作用干预组:将HSV-2病毒与100 μg/ml HD-5多肽混合加入已接种Vero细胞的培养板中,于37 ℃孵育2 h后弃培养液,再加入维持液,37 ℃培养72 h后观察CPE,并检测细胞保护率。③病毒复制作用干预组:将HSV-2病毒加入已接种细胞的培养板中,于37 ℃孵育2 h后吸出病毒液,再加入用维持液配制的100 μg/ml HD-5多肽,37 ℃培养72 h后观察CPE,并检测细胞保护率。同时设正常细胞对照、HSV-2病毒对照组。

细胞保护率=(实验组平均光密度值-HSV-2病毒对照组平均光密度值)/(正常细胞对照组平均光密度值-HSV-2病毒对照组平均光密度值)×100%

1.3.3 血清对HD-5多肽抗病毒的影响 分别以含0%、2%、10%、20%胎牛血清的1640培养液制成2×10^4/ml细胞悬液,于HSV-2病毒感染Vero细胞的同时加入100 μg/ml HD-5多肽,直接于37 ℃培养72 h后检测细胞光密度值,计算细胞保护率。

1.4 统计学分析

所有数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析,组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 HD-5多肽的细胞毒性

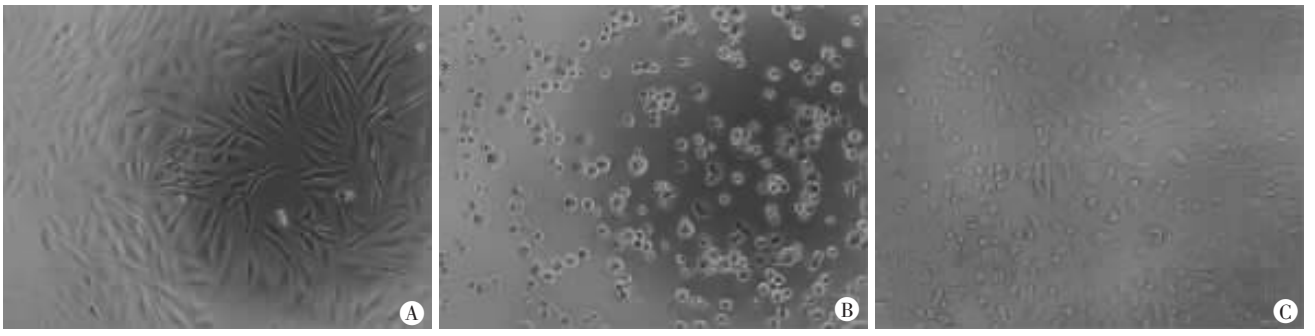
在浓度≤100 μg/ml范围内,HD-5多肽对Vero细胞的增值不会产生显著影响,显微镜下也未发现Vero细胞形态发生明显改变,100 μg/ml的HD-5作用后,Vero细胞的存活率为(97.5±1.0)%,与空白对照组(100%)比较无显著差异($P>0.05$);当HD-5多肽的浓度在150 μg/ml和200 μg/ml时,细胞的存活率分别下降至(85.9±2.0)%和(77.7±1.0)%,显著低于空白对照组($P<0.05$)。因此,我们确定HD-5多肽的无毒剂量范围为≤100 μg/ml。

2.2 HD-5多肽抗HSV-2病毒的作用

2.2.1 病毒毒力 HSV-2病毒株的$TCID_{50}=10^{-4}$,即每孔接种100 μl滴度为10^{-4}的病毒可使50%细胞发生明显病变。实验时采用病毒的浓度为100 $TCID_{50}$。

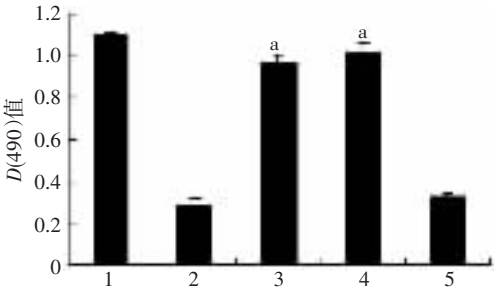
2.2.2 HD-5多肽抑制细胞病变的作用 Vero细胞在HSV-2病毒感染48 h后细胞形态发生明显改变,细胞肿胀、变圆,细胞壁出现皱褶、加厚,细胞质内颗粒增多、固缩,相互融合形成葡萄串状或星状,并有脱裂、碎裂现象出现;而在病毒感染的同时加入HD-5多肽(100 μg/ml),细胞病变明显受到抑制(图1)。提示HD-5多肽能显著抑制HSV-2病毒引起的细胞病变。

2.2.3 HD-5多肽对HSV-2病毒的黏附、侵入及复制的抑制作用 当病毒与细胞在4 ℃孵育时,病毒与细胞只发生黏附反应,而不会向细胞中侵入,此时加入HD-5多肽可以显著抑制HSV-2病毒的毒性作用,细胞光密度值显著高于病毒对照组($P<0.01$),其对Vero细胞的保护率为(83±4)%;当病毒、多肽与细胞同时在37 ℃孵育时,病毒可以向细胞中侵入,此时HD-5多肽也能够显著抑制HSV-2病毒的毒性作用,细胞光密度值显著高于病毒对照组($P<0.01$),其对Vero细胞的保护率为(89±5)%;当病毒与细胞在37 ℃孵育2 h后,病毒已经完全侵入到细胞中并开始复制,此时再加入HD-5多肽对病毒的毒性作用无明显抑制作用(图2)。



A：空白对照组；B：HSV-2 病毒对照组；C：100 μg/ml HD-5 处理组

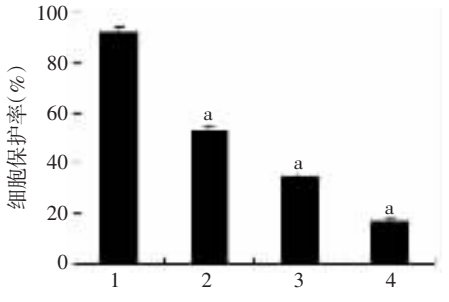
图 1　倒置显微镜观察 HSV-2 所致细胞病变及 HD-5 多肽的干预作用　（×200）



1：空白对照组；2：HSV-2 病毒对照组；3：HD-5 对 HSV-2 黏附作用干预组；4：HD-5 对 HSV-2 侵入作用干预组；5：HD-5 组对 HSV-2 复制作用干预组；a：$P<0.01$，与病毒对照组比较

图 2　HD-5 多肽对 HSV-2 病毒黏附、侵入、复制的影响

2.2.4　血清浓度对 HD-5 多肽抗 HSV-2 病毒的影响　CCK-8 法结果显示，血清浓度越高，HD-5 多肽对细胞的保护率越低，各血清浓度的细胞保护率均显著低于无血清对照组（$P<0.01$）。说明在实验体系中加入血清可显著削弱 HD-5 多肽的抗病毒功效。具体见图 3。



1：无血清组；2：2% 血清组；3：10% 血清组；4：20% 血清组

a：$P<0.01$，与无血清组比较

图 3　不同血清浓度对 HD-5（100 μg/ml）抗病毒的影响

3　讨论

人们对防御素的最初认识是基于其广谱、强效且不诱导细菌产生耐药的抗菌活性，但后来研究发现，除了抗菌活性外，大部分防御素还具有抗真菌、抗螺旋体以及抗病毒的作用[5,6]。尤其是防御素的抗病毒作用越来越引起人们的关注，有研究发现体内防御素表达和分泌的减少可能与人类免疫缺陷病毒（HIV）及肝炎病毒感染的发生密切相关[7]。由于防御素是一种内源性分子，本身具有识别病原微生物与机体正常细胞的能力，所以在有效剂量范围内防御素不会对人体正常细胞产生明显毒性。此外，研究表明防御素分子可以通过阻碍病毒颗粒黏附和侵入靶细胞、抑制病毒复制以及直接破坏病毒包膜（此项作用仅限于披膜病毒）等多环节、多层次发挥抗病毒作用，这就使得防御素被用来进行抗病毒时基本不会产生耐药现象[8,9]。正因如此，防御素的研制与开发在病毒感染防治方面具有诱人的应用前景。

HSV-2 主要的感染途径是生殖道，其感染与先天性畸形、流产、宫颈癌、脑炎等多种疾病相关[10]。已知，HD-5 在人体内的主要表达和分泌部位是肠道和生殖道黏膜上皮，因此，人们推测它很可能在机体防御肠道和生殖道病原微生物感染过程中发挥着重要作用。

本实验采用 CCK-8 法，重点观察了 HD-5 在体外是否具有抗 HSV-2 的作用，并对其起作用的关键环节进行了探讨。CCK-8 法的原理和 MTT 法相似，但与 MTT 法相比，CCK-8 法更灵敏、稳定，结果也更可信，现已广泛用于细胞增殖测定、毒性分析、药物筛选及肿瘤药敏试验中。本实验结果显示：HD-5 对 Vero 细胞不存在明显的毒副作用，在抗病毒活性浓度范围内几乎不会影响 Vero 细胞的活力；当 HD-5 提前或与病毒同时加入时，其显示出较强的抗 HSV-2 病毒活性，能够明显阻滞 HSV-2 病毒感染导致的细胞病变，而当病毒感染 2 h 后，再加入 HD-5 对 Vero 的保护效果不明显。从而表明，HD-5 抗 HSV-2 起效的主要环节在于阻滞病毒与宿主细胞的结合和向宿主细胞的侵入，而对于病毒的复制无明显抑制作用。

已知细胞和病毒的外膜分子的主要成分都是糖蛋白，当病毒感染细胞时，糖蛋白在细胞和病毒表面迅速分散，使得病毒紧紧黏附在细胞膜上，然后病毒包膜与

细胞膜融合，病毒随即将其遗传物质插入到细胞中。文献[11]报道一种θ防御素能够与细胞和病毒的外膜糖蛋白发生交叉结合，阻断了病毒与细胞膜之间的黏附，使病毒无法感染细胞，没能进入细胞的病毒就会被机体免疫系统的杀死。因此，我们推测HD-5可能也会通过竞争结合糖蛋白而阻止病毒与细胞发生黏附和侵入。至于HD-5是否可以通过间接的免疫调节作用而对病毒复制发挥抑制效应，尚需进一步深入探讨。

本实验研究结果还发现，HD-5的抗HSV-2活性受培养体系中血清浓度的影响，血清浓度越高，HD-5的抗病毒活性越弱。文献[12]报道血清中的某些特殊蛋白分子能够与人α防御素分子结合并削弱其抗病毒活性，而且防御素分子与这些蛋白分子的结合能力可能与其氨基酸位点组成有关，如HNP-1与糖分子的结合力就显著高于HNP-4，这就使得在血清存在情况下HNP-4的抗病毒活性明显强于HNP-1。因此我们推测，可能是血清中的某些蛋白分子结合并中和了HD-5的抗病毒活性位点，从而使得其抗病毒能力显著下降。

本研究通过体外细胞实验证实了HD-5能够通过阻滞病毒结合并侵入宿主细胞而具有显著的抗HSV-2病毒作用，为其进一步开发和应用提供了实验依据。

参考文献：

[1] Menendez A, Brett Finlay B. Defensins in the immunology of bacterial infections[J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(4): 385 - 391.

[2] Doss M, White M R, Tecle T, *et al*. Interactions of alpha-, beta-, and theta-defensins with influenza A virus and surfactant protein D[J]. J Immunol, 2009, 182(12): 7878 - 7887.

[3] Schneider J J, Unholzer A, Schaller M, *et al*. Human defensins[J]. J Mol Med, 2005, 83(8): 587 - 595.

[4] Porter E, Yang H, Yavagal S, *et al*. Distinct defensin profiles in Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis urethritis reveal novel epithelial cell-neutrophil interactions[J]. Infect Immun, 2005, 73(8): 4823 - 4833.

[5] Lehrer R I. Multispecific myeloid defensins[J]. Curr Opin Hematol, 2007, 14(1): 16 - 21.

[6] Kim C, Kaufmann S H. Defensin: a multifunctional molecule lives up to its versatile name[J]. Trends Microbiol, 2006, 14(10): 428 - 431.

[7] Kuhn L, Trabattoni D, Kankasa C, *et al*. Alpha-defensins in the prevention of HIV transmission among breastfed infants[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2005, 39(2): 138 - 142.

[8] Chang T L, Vargas J Jr, DelPortillo A, *et al*. Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity[J]. J Clin Invest, 2005, 115(3): 765 - 773.

[9] Dugan A S, Maginnis M S, Jordan J A, *et al*. Human alpha-defensins inhibit BK virus infection by aggregating virions and blocking binding to host cells[J]. J Biol Chem, 2008, 283(45): 31125 - 31132.

[10] Berrington W R, Jerome K R, Cook L, *et al*. Herpes Simplex Virus Type 2 Infection in Young Adult Women: Risk Factors for Infection and Frequency of Viral Shedding. Clinical correlates of herpes simplex virus viremia among hospitalized adults[J]. Clin Infect Dis, 2009, 49(9): 1295 - 1301.

[11] Leikina E, Delanoe-Ayari H, Melikov K, *et al*. Carbohydrate-binding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins[J]. Nat Immunol, 2005, 6(10): 995 - 1001.

[12] Wu Z, Cocchi F, Gentles D, *et al*. Human neutrophil a-defensin 4 inhibits HIV-1 infection *in vitro*[J]. FEBS Lett, 2005, 579(1): 162 - 166.

（收稿：2010-04-09 修回：2010-05-19）

（编辑 张 维）

我校卞修武教授、黄跃生教授当选重庆市“两江学者”特聘教授

经过设岗单位初审、主管部门复审、市内外院士专家评审、社会公示和市委人才工作领导小组审议，并报市委、市政府审批，重庆市首期16位“两江学者”特聘教授（专家）正式出炉。我校西南医院病理学与病理生物学专业卞修武教授、烧伤外科学黄跃生教授名列其中。

“两江学者”是目前重庆市最高层次的人才引进计划。该计划在高等院校、科研院所和企事业单位等设置特聘教授、特聘专家岗位，面向海内外招揽高层次学术技术精英，用8年时间引进特聘教授和特聘专家100个，首期设置特聘岗位25个。特聘岗位设置期为4年。主要在汽车摩托车、电子信息、石油天然气化工、装备制造、材料工业、综合能源、现代农业等重点产业领域，机械工程、电气工程、生物医学工程等重点学科领域，及宜居、畅通、森林、平安、健康“五个重庆”建设等相关领域中设置岗位。特聘教授和特聘专家，实行岗位聘任制和荣誉终身制，按需设岗、公开选聘、合同管理、终身荣誉。

卞修武教授、黄跃生教授均为我刊常务编委。在此，编辑部特向2位教授表示衷心的祝贺！