

单纯疱疹病毒小鼠腹腔感染模型—耐受 性与耐受机理的探讨

张兴权

(中国医学科学院抗菌素所, 北京)

MODEL OF INTRAPERITONEAL INFECTION BY HERPES SIMPLEX VIRUS IN MICE

Studies on Resistance and Mechanism of Resistance

Zhang Xing-quan

(Institute of Antibiotics, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

单纯疱疹病毒小鼠腹腔感染模型已广泛用于抗病毒防御机制, 抗病毒化疗和抗病毒免疫治疗等项研究中。该模型虽则简单易行, 但小鼠对感染反应性不同, 有的敏感, 有的耐受, 这不仅牵涉到病毒免疫学基本理论, 而且左右具体试验结果。本文就影响耐受性的因素及耐受性产生的机制做一简要介绍。

一、试验感染中年龄的影响

早在1929年Andervant^[1]首次报告小鼠对腹腔感染单纯疱疹病毒的敏感性随年龄而变化。他给3只乳鼠(14天)和4只成年鼠腹腔接种0.1ml病毒, 3只乳鼠5天内全部死亡, 而4只成年鼠7日内仅3只死亡。小鼠死前有麻痹及脑炎症状, 脑内可查到疱疹病毒。Kilbourne等^[2]1951年也报告, 给乳鼠及成年鼠腹腔和脑内感染单纯疱疹病毒, 乳鼠产生无力, 共济失调及麻痹症状, 5—6天全部死亡。成年鼠惊厥及死亡只发生于脑内注射, 腹腔感染者既无惊厥, 又很少死亡。Johnson^{[3][4]}1963与1964年连续报告, 给4—5天龄的杂种小鼠腹腔接种100LD₅₀单纯疱疹病毒, 4天后小鼠产生脑炎症状, 并于随后的24小时内死亡。病毒血症始于感染后2—5小时, 可持续到死前, 同时病毒迅速在肝脾中增殖。成年鼠LD₅₀为乳鼠1000倍, 感染24小时肝脾中查到微量病毒, 48小时后脏器中已查不到病毒了。更有意义的是Zawatzky^[5]1982年报告, 新生的C57BL/6小鼠对腹腔感染单纯疱疹病毒高度敏感, LD₅₀为 2×10^6 PFU/ml, 而C57BL/6纯种成年鼠则耐受, LD₅₀至少为新生鼠1000倍以上^[6]。

前述表明, 无论是杂种还是纯系乳鼠总比成年小鼠对疱疹病毒腹腔感染更敏感。

二、试验感染鼠种与病毒毒株的影响

Lopez^[7]1975年首次指出某些纯系成年鼠对腹腔感染单纯疱疹病毒敏感,而另外一些,特别是C57BL/6小鼠则有明显耐受性。他给11种3—4个月雄性纯系鼠腹腔注射0.1ml疱疹I型病毒,测得LD₅₀见表1。这11种小鼠的敏感性可分为3组:耐受组(LD₅₀为10⁶PFU);中度敏感组(LD₅₀为200—1000PFU);敏感组(LD₅₀为70—100PFU)。Lopez还用另外三株以及3个野株的病毒进行了同样试验,获得了类似结果。Kirchner^[8]1978年也证实了Lopez的实验结果。

表1 纯系小鼠对单纯疱疹病毒I型的耐受性

Table 1 Resistance of inbred mouse strains to HSV-1

鼠种	H ₂ 型	LD ₅₀ HSV-1 (P.F.U)
AKR	K	10 ^{1.0}
SWR	q	10 ^{1.0}
A	a	10 ^{1.33}
DBA	d	10 ^{1.83}
CBA	k	10 ^{2.34}
BALB/c	d	10 ^{2.34}
C3H/He	k	10 ^{3.0}
C57BR	k	10 ^{3.0}
C57BL/6	b	>10 ⁶
C57BL/Ks	d	>10 ⁶
C57BL/10	b	>10 ⁶

1980年Armerding^[9]等报告,给八种纯系小鼠腹腔接种单纯疱疹II型病毒,小鼠在6—12天内死亡,死前有脑炎症状,从LD₅₀的差异可看出小鼠对病毒的敏感性不同(表2)。

令人感兴趣的是Claus等^[10]1980年发现,预先用非致病的HSV-1ANG腹腔感染小鼠,4—24小时后经腹腔感染致病的HSV-1Wal则小鼠死亡率显著降低。1979年Zawatzky等^[11]指出纯合子无毛小鼠与其表现正常的同代小鼠经腹腔感染单纯疱疹病毒,无毛小鼠对病毒的敏感性不高于正常小鼠,而在低感染量时,无毛小鼠死亡率低于正常小鼠。应指出有关的试验结果并不一致,Worthington^{[12][13]}1975及1980年两次试验指出,无毛小鼠对单纯疱疹病毒腹腔感染反应更敏感。

上述结果表明不是所有成年鼠均耐受单纯疱疹病毒的腹腔感染,有些纯系鼠如C57BL是高度耐受型,而AKR小鼠则为高度敏感型。这种耐受与敏感反应对单纯疱疹I II型及不同株病毒的感染基本上是一致的。

表2 纯系鼠对单纯疱疹Ⅰ型病毒的耐受性

Table 2 Resistance of inbred mouse strains to HSV-2

鼠种	H ₂ 型	LD ₅₀ HSV-2(P.F.U)	
SWR/J	q	7.9×10 ¹	敏感
AKR/J	k	2.0×10 ²	
DBA/2Han	d	1.6×10 ³	
CBA/J	k	2.7×10 ³	中度
BALB/c/A Bom	d	1.0×10 ⁴	
A/J	a	1.5×10 ⁴	耐受
DBA/1J	q	1.6×10 ⁴	
C57BRc/Han	k	2.0×10 ⁴	
C3H/Bi/Mai	k	3.2×10 ⁴	耐受
C57BL/KS.J	k	4.0×10 ⁴	
SJL/J	s	1.3×10 ⁵	耐受
C3H/He/Han	k	1.0×10 ⁵	
C3H/Tif Bom	k	2.5×10 ⁵	
C57BL/10SeCr/Bom	b	3.2×10 ⁵	
C57 BL/10J	b	≥10 ⁶	
C57BL/6J	b	≥10 ⁶	
C3H/HeJ	k	≥10 ⁶	

三、耐受性的产生机理

对于耐受性的产生,多年来人们用代谢和激素的改变,抗体反应,抑制物质的产生,解剖学的发展,干扰素诱生以及遗传性差异等来解释,但至今原因未完全搞清。目前大部分学者认为巨噬细胞 NK 细胞活性及干扰素的滴度起主要作用。

1. 巨噬细胞的作用 1964年, Johnson^[4]将 8 周成年鼠与 4 日龄乳鼠的巨噬细胞体外感染单纯疱疹病毒,用荧光抗体染色查到感染后 4 小时胞浆中出现病毒抗原。成年鼠巨噬细胞于感染后 72 小时不见进一步变化,而乳鼠巨噬细胞于感染后 8 小时向周围扩散,10 小时后周围 2—3 个细胞内出现荧光,12 小时后已有 10 个周围细胞被感染,72 小时后形成大片荧光细胞。他认为对病毒耐受的屏障不在血脑中间,是在腹腔巨噬细胞上。Zisman 等^[14] 1970 年报告,用石英粉尘和抗巨噬细胞血清处理小鼠,使感染单纯疱疹病毒的这种小鼠死亡率从 18% 上升到 73%—93%,同时也加速了病毒在血液及组织中的散播。Hirsch 等^[15] 将大量未激活的成年鼠腹腔巨噬细胞转种到乳鼠腹腔中,可延长存活时间;如用激活的巨噬细胞,可使乳鼠死亡率从 85% 降至 20% (P<0.05)。他们还发现成年鼠巨噬细胞更有效地阻止完全的病毒颗粒从细胞中释放和增加吞噬作用。

至于疱疹病毒在鼠巨噬细胞中复制受限制的机理还很少报告。1970 年 Jack 等^[16]发现单纯疱疹病毒基因在鼠巨噬细胞中可积极地表达,可产生病毒特异的蛋白。但由于 DNA 量不足或结构缺损以及病毒衣壳合成不充分,致使病毒装配出问题,造成流产复制。此外一些装配好的毒粒亦被巨噬细胞溶酶体破坏,这些无疑阻止了病毒在鼠体内的致病作用。目前人们一致认为腹腔巨噬细胞是阻止疱疹病毒感染的第一道防线。

2. 干扰素的作用 Hirsch^[15]1969年证明成年鼠巨噬细胞比乳鼠产生较多干扰素,从而提出干扰素可能在耐受现象中起重要作用。Gresser^[17]和Zawatzky^[6]1976和1982年先后发现抗干扰素血清可以破坏小鼠对单纯疱疹的耐受性。1978年Kirchner^[8]等给C57BL/6, B6D2F, Ba/2, A/J小鼠腹腔注射单纯疱疹病毒, 5天后检查用 β -propiolactone诱生的4种鼠脾细胞内干扰素滴度,发现前两种耐受型鼠脾细胞诱生干扰素的能力远远高于后两种敏感型小鼠。1981年Zawatzky^[18]等给B₆, D₂小鼠腹腔感染 10^7 PFU HSV-1, 8小时后B₆小鼠血清干扰素大于1000单位,而D₂小鼠干扰素仅100单位,但24小时后二者无显著差别。更有意义的是1982年Zawatzky^[6]报告,给1周及8周的C57BL/6乳鼠及成年鼠腹腔注射 2×10^8 PFU单纯疱疹病毒,发现二者腹腔渗出细胞诱生干扰素能力相距甚远,分别为10—20及1280单位/毫升。但个别学者也持不同看法,如Collier^[19]1983年的试验指出小鼠对腹腔感染疱疹病毒的敏感性并不明显地与诱生干扰素能力有关。应强调的是不少学者如Rosmussen^[20]1978年指出,与疱疹病毒对应的诱生干扰素的人淋巴细胞不是T细胞,可能是B细胞。Zawatzky未公开发表的资料指出C57BL/6鼠脾细胞经HSV-1诱生出的干扰素对抗 \odot 血清加补体的处理不敏感。Lopez^[21]1980年用⁸⁹Sr处理C57BL/6鼠来破坏依赖骨髓细胞的功能,则小鼠对病毒感染更敏感。这些表明依赖骨髓的B细胞可能介导对单纯疱疹病毒感染的抵抗,限制感染扩散到中枢神经系统。

3. NK细胞的作用 越来越多的证据表明NK细胞在原发病毒感染中扮演重要角色。前文提及小鼠预先感染非致病的HSV-1ANG可以保护小鼠腹腔再感染HSV-1-Wal, Claus^[10]有证据表明HSV-1ANG比HSV-1Wal是更好的NK细胞激活剂。1980年Armerding^[9]给10种纯系鼠腹腔感染 10^5 PFU HSV-2, 24小时后检查每只鼠NK细胞活性,发现2个敏感鼠NK细胞活性是低的,3个中度耐受和3个高度耐受鼠NK细胞活性是高的。但到感染后4天,所有小鼠表现出高的NK细胞活性。Engler等^[22]1981年报告,给10—14周龄的C57BL/6小鼠腹腔注射 10^6 或 10^7 单纯疱疹病毒,18小时后腹腔渗出细胞及脾细胞中NK细胞活性显著增高,用抗 \odot 血清处理,可减少70%NK细胞活性。Zawatzky^[6]1982报告,给C57BL/6乳鼠与成年鼠腹腔注射HSV-1, 24小时后检查NK细胞活性,发现成年鼠比乳鼠NK细胞活性高5—6倍。他们还研究了不同龄小鼠感染24小时后NK细胞活性(表3)。

表3 感染HSV-1的C57BL/6小鼠腹腔NK细胞活性与干扰素诱生对年龄的依赖性

Table 3 Age dependency of NK cell activity and interferon production in the peritoneal cavity of HSV-1-infected C57BL/6 mice

年 龄 (天)	NK细胞活性 (% specific lysis)	干扰素滴度 (IU/ml)
7	5	20
15	8	20
19	15	20
24	27	250

从表3可以清楚地看到NK活性与年龄有明显关系。应指出几乎所有的学者一致认为NK细胞活性的增高不是病毒感染的直接结果,小鼠腹腔感染单纯疱疹病毒后,首先

诱生干扰素,随之激活NK细胞。

4. 抗体和T细胞的作用 特异的体液和细胞免疫对小鼠腹腔感染单纯疱疹病毒的耐受性起什么作用存在争议。1970年Hirsch^[15]给乳鼠输入 10^7 成年鼠淋巴细胞后,未见到明显保护乳鼠腹腔感染疱疹病毒。Kirchner^[8]1978年比较全面研究了小鼠试验感染后体液和细胞免疫反应,发现不同纯系小鼠感染疱疹病毒后死亡数有显著差异,但耐受型C57BL/6与敏感型DBA/2两种鼠血清中和抗体IgG与巨噬细胞抑制因子等差异不大(表4,表5)。这些试验表明特异体液和细胞免疫不起主要作用。然而也有相反的报告。Nahmias^[23]和Zisman^[14]1969与1970年先后报告,给小鼠静脉注入抗淋巴细胞血清可延长其腹腔感染单纯疱疹病毒的存活日。1983年Sethi^[24]预先用环磷酰胺处理腹腔感染 5×10^6 PFU单纯疱疹病毒的BALB/C小鼠,可造成100%小鼠死亡。如果该小鼠于感染前24小时静脉输入 10^7 克隆化疱疹病毒特异的细胞毒T淋巴细胞,可显著减少死亡,并大大延长存活期。Larsen^[25]1983年报告将疱疹病毒体内外致敏的鼠脾细胞被动输入正常或免疫抑制小鼠,可保护致命的单纯疱疹病毒腹腔感染,并证明具有细胞毒活性的Lyt-2阳性细胞在保护中起主导作用。Rouse^[26]1985年进一步证明IL-2增加细胞毒T淋巴细胞作用,进一步提高了保护能力。

许多学者证实无毛小鼠比正常小鼠更易受单纯疱疹病毒的攻击。Isao^[27]1982年报告高浓度的抗疱疹病毒血清可以延长单纯疱疹病毒感染小鼠的生存日。他们将完整的人r-

表4. 用ELISA检测小鼠体内抗HSV血清抗体IgG滴度

Table 4. Titres of IgG serum antibodies against HSV in mice as determined by ELISA

鼠种	抗体滴度			
A/J	320,	320,	320,	320,
AKR	320,	320,	320,	320,
Balb/c	320,	320,	320,	320,
B6	1280,	320,	320,	320,
B6D2F1	1280,	320,	320,	320,
D2	320,	320,	320,	320,

表5. 感染HSV7天小鼠脾细胞MIF的产生

Table 5. Production of MIF by spleen cells of HSV-infected mice 7 days after infection

脾细胞来源	HSV剂量(P.F.U.)	MIF测定
非免疫B6小鼠	—	1±4
免疫B6小鼠	10^6	38±5
	10^4	19±4
非免疫D2小鼠	—	3±4
免疫D2小鼠	10^6	36±4
	10^4	17±3

球蛋白输给正常及缺乏补体C₃的无毛小鼠,均收到显著延长生活日效果,但提纯的F(ab')₂并无保护作用。这些结果表明对小鼠腹腔感染疱疹病毒的抗体介导的保护作用需要完整的IgG分子中Fc段。1984年Steve^[28]等也报告无毛BALB/C小鼠腹腔自然杀伤细胞毒活

性比C57BL/6小鼠高,但当BALB/C, C57BL/6小鼠于感染6—14天产生抗体时,无毛小鼠却不能在此期间产生ADCC抗体,如给小鼠被动输入高滴度抗疱疹病毒ADCC抗体,可显著保护致命的感染($P < 0.001$)。对特异的体液和细胞免疫在保护作用上的不同结果应予进一步澄清。

5. 遗传因素的影响 1975年Lopez^[7]首次证明纯种小鼠对单纯疱疹病毒毒株有遗传耐受性,该耐受性具有显性特点。用异体抗胸腺细胞血清, r-球蛋白与巨噬细胞毒处理小鼠,可减少耐受性。Lopez^[29]1978年将第一代耐受鼠骨髓细胞移植给敏感的,射线照射过的亲代鼠,产生的骨髓嵌合体小鼠增加对单纯疱疹病毒的耐受性。这些试验表明耐受性受免疫反应基因控制。1980年Lopez^[30]用敏感与耐受鼠回交试验证明,耐受性由多基因控制,起主导作用的是两个独立的基因位点。因为H-2亚区含有提供宿主对某些抗原反应的免疫反应基因,所以曾考虑H-2在耐受性上可能起关键作用。但Lopez用同种小鼠回交试验证明主要组织相容位点不能影响小鼠对单纯疱疹病毒的耐受性。近十几年来,许多学者用细菌^{[31]、[32]},立克次体^[33],寄生虫^[34]和病毒^[35-37]进行研究后指出,机体对这些微生物的耐受由主要组织相容复合物外部的基因控制,而且不依赖T细胞,表明非H-2基因介导这些病原耐受性的非T细胞的功能。尽管做了大量工作,但到底几个基因位点控制小鼠对腹腔感染单纯疱疹病毒的耐受性以及这些位点的准确位置并未搞清。

四、小结

上述试验已充分证明小鼠对单纯疱疹病毒腹腔感染的耐受性与年龄有关,乳鼠比成年鼠反应敏感。不是所有的成年鼠都具有耐受性,某些纯系鼠如C57BL/6耐受性最强,AKR最敏感,BALB/C小鼠居中。耐受性是由多个非H-2免疫反应基因控制的;巨噬细胞激活,干扰素滴度及NK细胞功能在耐受性中起重要作用。特异的体液和细胞免疫功能在耐受性上的作用越来越受重视,但尚有争论。总之,早期主要由巨噬细胞, NK细胞及诱生干扰素起作用,随之B细胞介导的依赖T细胞的抗体生成及病毒激活的细胞毒T淋巴细胞也扮演重要角色。

基于上述事实,笔者认为用此模型研究机体抗疱疹病毒防御机理,抗病毒化疗及免疫治疗时,不仅要考虑攻击病毒的毒株及剂量,还要选用合适,敏感的年幼小鼠,同时做严格对照试验,否则不准确的结果会以偏盖全,导致不正确的结论。

参 考 文 献

- [1] Andervont, H.B., 1929, *J. Infect. Dis.* 44:383
- [2] Kilbourne, E.C. et al., 1951, *J. Immun.* 67:321
- [3] Johnson, R.T., 1964, *J. Exp. Med.* 119:343
- [4] Johnson, R.T., 1964, *J. Exp. Med.* 120:359
- [5] Zawatzky, H. et al., 1982, *J. Gen. Virol.* 50:23
- [6] Kirchner, H. et al., 1978, *Zeitschrift für Immunitätsforschung und Experimentelle Therapie* 154:147
- [7] Lopez, C., 1975, *Nature*, 258:152
- [8] Kirchner, H. et al., 1978, *Cell Immunol.* 40:204
- [9] Armerding, D. et al., 1981, *Immunobiol.* 158:369
- [10] Claus, H. et al., 1981, *Virol.* 62:159
- [11] Zawatzky, R. et al., 1979, *Cell Immunol.* 47:424
- [12] Worthington, M.G. et al., 1976, *Ires, Medical Science* 3:370
- [13] Worthington, M.G. et al., 1980, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 165:462
- [14] Zisman, B. et al., 1970, *J. J. Immunol.* 104(5):1155
- [15] Hirsh, M.S. et al., 1970, *J. Immunol.* 104(5):1160
- [16] Stevens, J.G. et al., 1971, *J. Exp. Med.* 133:19
- [17] Gresser, I.J., 1976, *Exp. Med.* 144:1316
- [18] Zawatzky, R., 1981, *J. Gen. Virol.* 53:31
- [19] Collier, L.H. et al., 1983, *J. Gen. Virol.* 64:1483
- [20] Rasmussen, L. et al., 1978, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75:4467
- [21] Lopez, C. et al., 1980, *Infect, Immun.* 128:(3):1028
- [22] Engler, H.J., 1981, *J. Gen. Virol.* 55:25
- [23] Nahmias, A.J. et al., 1969, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 132:696
- [24] Sethi, K. et al., 1983, *J. Virol.* 64:443
- [25] Larsen, H.S. et al., 1983, *Infect. Immun.* 41(1):197
- [26] Rouse, B. J., 1985, *J. Immunol.* 134(2):926
- [27] Isao, H. et al., 1982, *Microbiol. Immunol.* 26(6):497
- [28] Steve, K. et al., 1984, *Microbiol. Immunol.* 28(4): 439
- [29] Lopez, C., 1978, Immunological nature of genetic resistance of mice to herpes simplex virus type-1 infection, p. 775-778. In C. De the, W. henle, and F. Rapp(ed.), *Oncogenesis and herpesviruses III*. International Agency for Research, Lyon, France.
- [30] Lopez, C., 1980, *ImmunoGenetics* 11: 87
- [31] Planf, J. et al., 1976, *J. Infec. Dis.* 133: 72
- [32] Cheers, C. et al., 1978, *Infec. Immun.* 19: 755
- [33] Groves, M. et al., 1978, *Infec. Immun.* 19: 583
- [34] Brodley, D.J. et al., 1974, *Nature* 250: 353
- [35] Lindenmann, 1964, *J. Proc. Soc. Exp Biol. Med.* 116: 506
- [36] Kumer, V., 1974, *J. Exp. Med.* 134: 1093
- [37] Darnell, M.B., 1976, *J. Infec. Dis.* 129: 240