

α . γ 干扰素在HSV-Ⅱ持续感染中的抑毒效应

姚堃 周瑶玺 吴筱玲 周峰 程宝庚* 唐竹萍*

(南京医学院微生物教研室, 南京)

提 要

用 HSV-Ⅱ 感染 K562 细胞系, 以后连续传代, 培养上清液传至 2—3 代检测不出感染力, 4 代以后感染力在 10^3 TCD₅₀。连续至 12 代共 74 天, 不仅在 K562 细胞上建立了 HSV-Ⅱ 的持续感染模型, 而且观察到 α . γ 干扰素和 IL₂ 粗制品对这种持续感染的抑制效应。通过上清液感染力检测, 电镜观察、死活细胞计数、病毒包涵体检出, 初步得到如下结论: 大剂量 α . γ 干扰素可完全抑制持续感染的建立, 不产生有感染性病毒颗粒。而 IL₂ 的粗制品能减低 K562 的感染力。但不能完全抑制病毒复制。

HSV-Ⅱ 在人类可引起长期潜伏感染, 当机体细胞免疫功能减弱或长期使用免疫抑制剂后, HSV 可以重新激活。在体外细胞培养中病毒持续感染模型的建立, 有助于了解体内持续感染的机理及各种免疫因素在持续感染中所起的作用。本文报道 K562 细胞培养中 HSV-Ⅱ 持续感染模型的建立及干扰素对其影响。

材 料 和 方 法

(一) 细胞和培养基: 1. 人胚肌皮纤维母细胞传代株: 按常规二倍体细胞培养传代法。本室自建株, 用于病毒滴定。

2. K562 细胞株: 由美国引进, 在本室传二年以上。供 HSV-Ⅱ 感染用。

(二) 病毒: HSV-Ⅱ Sar 株, 由湖北医学院病毒研究所赠予。病毒在人肌皮纤维母细胞上感染力为 10^{-5} 。毒株保存于 -70°C 低温冰箱备用。

(三) 干扰素和白细胞介素-2 (Interleukin-2; IL₂):

1. 干扰素纯制品: IFN- α 活性单位 10^6 /ml; IFN- γ 活性单位 10^8 /ml。从美国引进, 保存于 -70°C 备用。

2. 粗制人白细胞介素-2: 正常人末梢血单个核细胞 1×10^6 /ml, 按常规 PHA 刺激制备。上清用 pH2.0 酸化 1 小时, 调至中性, 再放 70°C 水浴热处理 1 小时, 去除 IFN- γ 的活性, 即为 IL₂ 粗制品。

3. 猿细胞分泌的 IL₂ 即 MLA₁₄₄ 细胞株培养上清。此株长臂猿淋巴瘤细胞株产生单一的淋巴因子, 接近人 IL₂。

(四) 活细胞检测: 用 1% 台盼兰染色液, 着色者为死细胞, 不作色者为活细胞。

(五) 电镜检查: 用持续感染的第 3 代和第 7 代及干扰素处理的同代培养物, 以戊二醛固定, 作超薄切片电镜检查。

本文于 1987 年 12 月 11 日收到。*南京医学院电镜室

表. 加入不同浓度 IFN- α 、IFN- γ 和 IL₂ 对持续感染的影响
Table. Effect of addition of IFN- α , IFN- γ and IL-2 on the Persistent infection of HSV

培养基中含不同 浓度 IFNs, IL ₂	各代培养上清 NSV-II 感染力 TCD ₅₀											
	1代	2代	3代	4代	5代	6代	7代	8代	9代	10代	11代	12代
10000u/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IFN- α 1000u/ml	-	-	-	-	-	-	1 × 10	1 × 10	1 × 10	1 × 10	1 × 10	1 × 10
100u/ml	-	-	-	-	1 × 10	1 × 10 ²	1.1 × 10 ²	1.2 × 10 ²	1.5 × 10 ²	1.5 × 10 ²	1 × 10 ³	1.3 × 10 ³
10000u/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IFN- γ 1000u/ml	-	-	-	-	-	1 × 10	1 × 10	1 × 10	1 × 10	1 × 10	1 × 10	1 × 10
100u/ml	-	-	-	-	1 × 10	1 × 10 ²	1 × 10 ²	1.3 × 10 ²	1.3 × 10 ²	1.3 × 10 ²	1 × 10 ³	1.5 × 10 ³
IFN(α + γ): α :1000u/ml γ :100u/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
粗制品 (1:10)	-	-	-	-	1 × 10	1 × 10	1 × 10	1 × 10	1 × 10 ²	1.1 × 10 ²	1.3 × 10 ²	1.3 × 10 ²
IL ₂ MLA144(1:10)	-	-	-	-	1 × 10	1 × 10	1 × 10	1 × 10	1 × 10 ²	1.5 × 10 ²	1.2 × 10 ³	1.35 × 10 ³
HSV-II 传代培养物对照	-	-	-	1 × 10	1 × 10	1 × 10 ²	1.1 × 10 ²	1.5 × 10 ²	1.5 × 10 ²	1.3 × 10 ³	1.5 × 10 ³	1.75 × 10 ³

结 果

(一) HSV-II 不同病毒用量对持续感染的建立和影响: 结果表明初次感染病毒用量以 10³TCD₅₀ 为适宜量。以 HSV-10³TCD₅₀ 感染 K₅₆₂ 细胞 4 代、7 代、10 代培养物在人胚肌皮纤维母细胞上作感染力检测, 其感染力 4 代为 1 × 10, 7 代为 1 × 10², 10 代为 1.5 × 10³。在人胚肌皮纤维母细胞上作感染力检测的同时, 作 H.E 染色, 可见到很多嗜酸性核内包涵体。

(二) 不同浓度的 α 、 γ 干扰素、IL₂ 对持续感染的影响: 结果见表。

从表中可见未经任何处理的各代培养上清作为病毒对照, 感染力稳定在 10³TCD₅₀。IFN α 10000u/ml、IFN- γ 10000 u/ml 及 IFN- α 1000u/ml 加 IFN- γ 100u/ml 都能完全抑制病毒复制, 在培养上清中测不出病毒感染活性。粗制 IL₂ 和 MLA₁₄₄ 上清能减低病毒感染力, 但不能完全抑制病毒复制。此现象的机理尚待探讨。

(三) 经 IFN- α 10000u/ml 处理 48 小时, 再感染 HSV-II 的 K₅₆₂ 及传代培养基中均含 IFN- α 和未经干扰素处理而感染 HSV-II 的 K₅₆₂ 培养物取 3 代、7 代作电镜检查, 结果如下: 干扰素处理的和不处理的第 3 代均为阴性。第 7 代培养物经干扰素处理的为阴性, 而未经处理的病毒对照组见到 K₅₆₂ 细胞的胞浆内有较多典型的成熟病毒颗粒。见照片 (2), 受染的 K₅₆₂ 细胞中高尔基体扩张蜕变, 髓样变性及胞浆内大量脂肪滴样物积聚, 经 1% 苏丹三染色, 证明是大量的脂肪滴, 这是蜕变标记之一。



图1 未感染HSV-II的K562细胞(×7800)
Fig1. uninfected K562 cells (×7800)

图2 感染HSV-II的K562细胞内积聚大量病毒颗粒(×60000)
Fig2. Accumulation of large amount of HSV virions in the infected K562 cell (×60000)

讨 论

Rinaldo 1978年报道用 HSV-II 感染 K₅₆₂ 能稳定地传132天,有完整病毒复制。感染水平为 $5.8 \log_{10} \text{pfu/ml}$, 感染20天活细胞直线下降^[1,2,3,4]。在我们实验中也有类似的情况,活细胞比例在60%左右,而加入干扰素后的活细胞保持在90%以上。急性HSV感染人胚肾细胞只要500u/ml的干扰素就有明显抑制作用,在病毒持续性感染中干扰素有无作用,至今尚无肯定的报道。我们经多次重复发现在各传代培养基中加 IFN- α 10000 u/ml 和 IFN- γ 10000u/ml 及 IFN- α 1000u/ml 加 IFN- γ 100u/ml 能得到完全抑制的效果,不出现病毒复制。提示 IFN- α 和 IFN- γ 二者在病毒持续性感染中有协同抗病毒作用,比单一的 IFN- γ 要减少 100 倍的用量。如果在培养的前 3 代培养基中含干扰素,以后各代不加,或者只在 HSV-II 感染前用干扰素处理一次,结果发现:只有在各代培养物中均加入干扰素才能完全抑制病毒增殖。至于 IL₂ 能推迟病毒复制周期和降低病毒的感染力,其机理尚待研究。IL₂ 在机体内的免疫调节上起到重要的作用,它可直接作用 T 和 B 淋巴细胞,因此可能有希望成为一种治疗因子。Rouse^[5] 报道体内注射 IL₂ 能增强对 HSV 感染的免疫力。

参 考 文 献

- [1] Rinaldo, C.R., et al., 1979, *Inf.Imm.*25(2): 521-525
- [2] Mahy, B.W.et al., 1985, *B.M.B.*41(1): 50-55
- [3] Mims, B.W.et al., 1984, *Viral Pathogenesis and Immunol.* Blackwell Sci.Pub. London
P: 200-253
- [4] Roumillat, L.F.et al., 1980, *Inf.Imm.*29(2): 671-677
- [5] Rouse, B.T., et al., 1985, *J.Immunol.*134(2): 926-929

Inhibitory Effect of IFN- α and IFN- γ on the Persistent Infection of HSV- II

Yao Kun Zhou Yao-xi Wu Yiu-ling Zhau Fun
Cheng Bao-geng* Tang Zhu-ping*

(Faculty of Microbiology of Nanjing Medical College, Nanjing)

K₅₆₂ cells were challenged with HSV- II virus and then cultured for successive reproduction. In the supernatants of the culture no virus was tested in the 2nd and 3rd generations, but in the 4th generation the virus titer was found to be around 10³ TCD₅₀. The culture was carried on smoothly for 12 generations in 74 days. We observed not only the whole course of the persistent infection of HSV- II on K₅₆₂ cells, but also the influence of IFN- α , IFN- γ and crude interleukin 2 on the persistent infection. Through the measurement of virus titers of the culture supernatant, electro-microscopic observation, counting the number of dead and living cells in the persistent culture, we got the following preliminary conclusion: large doses of IFN- α and IFN- γ can inhibit the development of such persistent infection completely without the production of infectious virus, whereas the crude IL2 can reduce the infectivity but cannot inhibit completely the replication of the virus.