

Raji细胞培养中HSV持续感染模型的建立 及免疫因素 (TNF IFNs) 对它的影响

张明 陈慎宝 丁如宁 周瑶玺

(南京医学院微生物学教研室, 南京 210002)

提 要

本文观察 HSV 持续感染 Raji 细胞培养物 150 天。发现整个感染过程似可分为两个阶段: 急性期 (前 30 天) 和稳定期 (30 天以后)。在急性期上清液中 HSV 滴度达 $10^{6.0} \cdot \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, 病毒抗原阳性细胞达 21%, 死细胞达 42%; 在稳定期病毒和细胞处于相对平衡状态, 上清液中 HSV 滴度在 $10^{3.5-4.2} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, 病毒抗原阳性细胞约占 5—10%, 感染细胞与对照细胞在生长特性上无明显差异。用 rIFNs、rIL-2 和 TNF 处理稳定期的细胞培养物, 发现 TNF 和 rIFN α 能明显抑制 HSV 的复制, rIFN γ 作用较弱, 去除上述因子 5 天后又恢复到处理前水平。rIL-2 无明显作用。用 HSV 抗体处理上述细胞培养物上清液中病毒和病毒抗原阳性细胞都消失, 且在去除抗体后连续观察 50 天仍未出现。本实验为体外研究 HSV 持续感染提供了一个有用的模型。

关键词: 单纯疱疹病毒 Raji 细胞持续感染 肿瘤坏死因子 干扰素 抗体

用单纯疱疹病毒 (Herpes Simplex Virus, HSV) 持续感染淋巴样细胞建立的模型来研究病毒与细胞间的相互关系有如下优点: (1) 不需附加其它条件如温度、抗体、抗病毒药物等。(2) 淋巴细胞是 HSV 复制的非允许细胞, 其情形与神经细胞有若干相似之处; (3) 该类细胞为悬浮培养, 能在体外无限期生长, 这就允许在不打断细胞正常生长的情况下, 对细胞标本进行各种实验观察^[1-3]。

本文用 Raji 细胞建立了 HSV 持续感染的模型, 并在此基础上研究了重组 α 干扰素 (rIFN α)、重组 γ 干扰素 (rIFN γ)、重组白细胞介素 2 (rIL-2) 及肿瘤坏死因子 (TNF) 和 HSV 抗体等免疫因素对该模型的影响。为 HSV 慢性感染的免疫机理增添数据, 国内外尚未见相类似的报道。

材 料 与 方 法

(一) 细胞培养

Raji 细胞由中国预防医学科学院北京病毒所提供。培养基为 RPMI 1640 + 10% 新生小牛血清 + 2mmol/L 谷氨酰胺以及每毫升含青霉素 100 单位、链霉素 100 微克和庆大霉素 40 单位。细胞传代方法为每 4 天传代一次, 使新鲜培养液中细胞浓度约为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。

BHK 细胞由南京农业大学提供。培养基同上, 单层法传代培养。

本文于 1989 年 11 月 3 日收到
国家自然科学基金资助项目

(二) 病毒

HSV 毒种由中国预防医学科学院病毒研究所提供, BHK 细胞传代扩增, 其感染滴度约为 10^7 TCID₅₀/ml, -80℃ 冰箱保存。

病毒滴定用微量单层细胞病变法, 在 96 孔培养板 (Linbro) 中进行。以 50% 组织培养感染量 (TCID₅₀/ml) 表示感染效价。

(三) 兔抗 HSV 抗体及荧光标记抗 HSV 抗体的制备

取健康雄性家兔, 角膜划痕接种活 HSV, 10 天后皮内多点注射该病毒。间隔一周重复一次, 连续 3 次。末次注射后 10 天心脏采血, 所得血清即粗制兔抗 HSV 抗体。中和效价在 1:320 以上, -20℃ 冰箱保存备用。该血清用饱和硫酸铵盐析法粗提, 然后荧光标记。去除游离荧光素后 4℃ 冰箱避光保存。用于病毒抗原阳性细胞的检出。

(四) HSV 感染 Raji 细胞

取生长旺盛的 Raji 细胞, 离心, RPMI 1640 洗二次, 加入 HSV 并使 MOI=1.0, 37℃ 孵育 60 分钟并不时摇动细胞瓶。病毒吸附后离心细胞洗二次以去除游离的病毒, 然后调细胞浓度为 1×10^5 /ml, 37℃ 培养。培养容器用 30ml 瓶, 每瓶装细胞悬液 5ml。以后每 4 天换液, 调整细胞数为 1×10^5 /ml。另取部分 Raji 细胞不接种病毒, 同法培养作为对照。

活细胞计数用 0.1% 台盼蓝染色排除法。

每隔一定时间取少量细胞悬液样本, 计数活细胞; 部分样本离心, 其上清置 -80℃ 冰箱备以后测 TCID₅₀/ml; 细胞沉淀涂片固定后冰箱内干燥保存备以后检测 HSV 抗原阳性细胞。

(五) 免疫荧光法测 HSV 抗原阳性细胞

取 HSV 感染的 Raji 细胞及对照细胞, 离心, pH7.5 PBS 洗三次, 细胞沉渣分布于小孔镀膜片上, 空气干燥, 丙酮固定 10 分钟, 用 1:16 稀释的前述荧光抗体 (含 0.01% 的伊文思蓝) 染色。37℃ 45 分钟湿盒孵育, pH7.5 PBS 洗三次 (震荡, 每次 5 分钟), 蒸馏水过一次, 干燥后荧光显微镜下观察, 数 500 个细胞, 计数荧光阳性细胞百分率。

(六) 电镜标本的制备与观察

HSV 持续感染 50 天的 Raji 细胞, 洗后沉渣以 5% 戊二醛处理 2 小时。洗涤后以酒精、丙酮逐级脱水, 618 环氧树脂包埋, LKB-2088V 型超薄切片机切片, 醋酸铀、柠檬酸铅双染后于 Philips EM-400 型透射电镜下观察。

(七) TNF, rIL-2 与 IFNs 来源

TNF 由第二军医大学微生物学教研室纯化并提供; 重组 IFNs 由上海生物制品所提供; 重组 IL-2 由中国科学院上海生化所提供。

结 果**(一) 持续感染模型的建立****1. Raji 细胞感染 HSV 后的细胞生长变化:**

本试验中, HSV 以 MOI=1.0 的剂量感染 Raji 细胞, 每 4 天换液 1 次, 连续观察 150 天。整个感染过程似可分为两个阶段——急性期 (前 30 天) 和稳定期 (30 天以后)。在急性期, HSV 感染的细胞增殖很慢; 活细胞数明显下降, 与对照组相比仅占 58% 左右; 30 天后感染细胞的生长情况同对照组接近, 40 天后二者无明显差异, 见图 1。

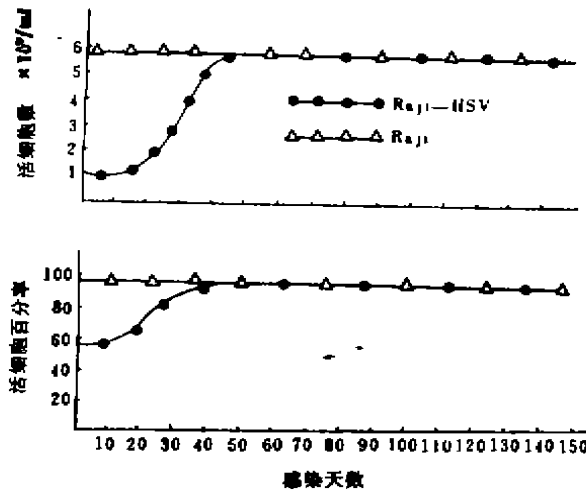


图 1. HSV 感染 Raji 细胞后活细胞数的变化

Fig 1. Viability of Raji cells after HSV infection

2. 病毒产生：感染细胞培养物，急性期上清中病毒滴度可达 $10^{6.2}$ TCID₅₀/ml，稳定期维持在 $10^{3.5-4.2}$ TCID₅₀/ml 左右，见图 2。

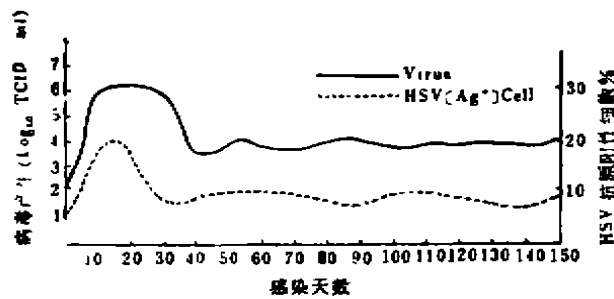


图 2. HSV 感染 Raji 细胞后上清内病毒滴度及荧光阳性细胞的动态变化

Fig 2. The kinetics of virus production and HSV antigen-positive cells after HSV infected Raji cells

3. 免疫荧光阳性细胞：感染后 24 小时即可检测到荧光阳性细胞，急性期约占 21%，稳定期约占 5—10% 左右，见图 2、图 3。

4. 电镜观察，HSV 持续感染 50 天的 Raji 细胞培养物电镜标本中，仅在少数细胞内发现 HSV 颗粒，核内或浆内均可出现。带 HSV 颗粒的 Raji 细胞大部分形态仍正常，见图 4。

(二) 各种免疫因素对持续感染 HSV 的 Raji 细胞的影响

HSV 持续感染 50 天的细胞培养物，离心，调细胞浓度 2×10^5 /ml，分别混悬于含 1000u/ml TNF，2000u/ml rIFN α ，2000u/ml rIFN γ ，2000u/ml rIL-2 和终浓度为 2% 兔抗血清（曾于 56℃ 灭活 30 分钟）的新鲜培养液中。每 2 天换液一次并维持培养液中

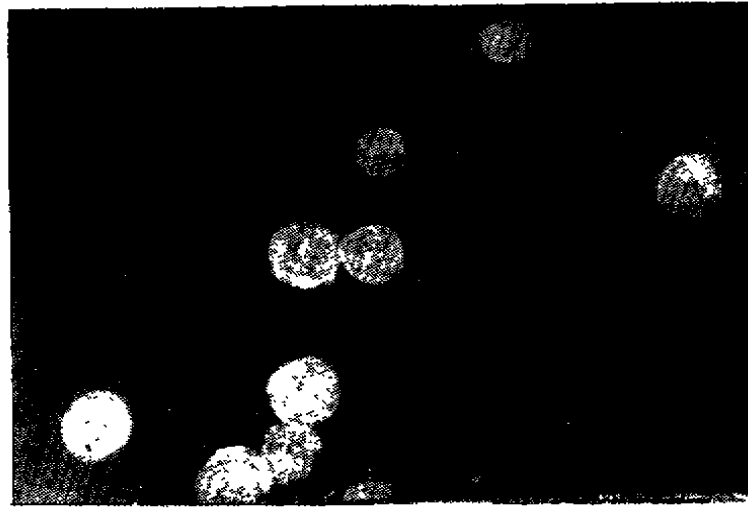


图3. HSV 荧光抗原阳性的 Raji 细胞

Fig 3. HSV infected Raji cells stained by FA technique



图4. HSV 感染的(左)及对照(右) Raji 细胞的电镜照片(放大24000倍)

Fig 4. Electron micrograph of HSV infected Raji cells(left) and uninfected controls(right) X24000

各免疫因子如上述浓度。11天后,离心,去上清, RPMI1640 洗一次,调细胞浓度到 $1 \times 10^5/\text{ml}$,混悬于不含上述因子的培养基中。比较观察的结果可见 TNF, $r\text{IFN}\alpha$ 和抗 HSV 抗体都能明显抑制持续感染中病毒的复制,在去除 TNF 和 $r\text{IFN}\alpha$ 4—5 天后 荧光

阳性细胞和细胞外病毒很快恢复到处理前水平, 见图5、图6。而在去除抗体后荧光阳性细胞和细胞外病毒仍未重新出现, 直到停用抗体后50天依然如此。rIFN γ 作用较弱, rIL-2无明显作用。

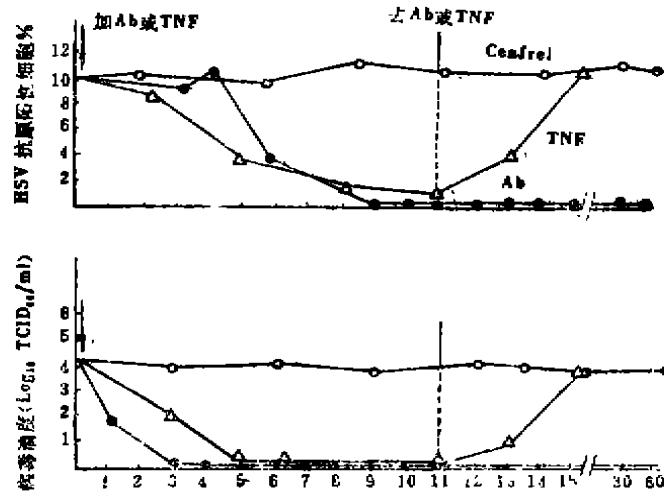


图5. TNF 和抗HSV 抗体对持续感染 HSV 的 Raji 细胞的作用;
Fig 5. Effect of TNF and HSV antibody on the HSV persistent infected Raji cells.

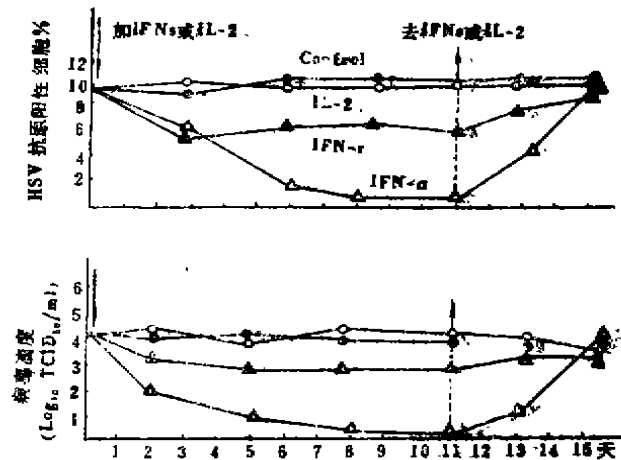


图6. rIFN α , rIFN γ 和 rIL-2 对持续感染 HSV 的 Raji 细胞的作用;
Fig 6. Effect of rIFN α , rIFN γ and IL-2 on the HSV persistent infected Raji cells

讨 论

研究 HSV 慢性感染以及免疫因素对其影响乃是当前热门研究领域之一。本实验中用 Raji 细胞建立的持续感染模型有其特点; (1)在 进入稳定期后病毒与

细胞之间的相对平衡较稳定, 感染细胞与对照细胞的活细胞数无差异, Rinaldo 等所描述的感染细胞周期性危象的现象^[2]在我们实验中未曾见到, 这可能因我们所用的细胞不同所致; (2) 上清中病毒量较高, 这为利用该模型进行深入一步的研究提供了便利。

关于 HSV 持续感染淋巴样细胞的机理, 目前仍不十分清楚, 推测可能与缺损性干扰毒粒 (defective interfering particle, DIP) 及内源性干扰素等抗病毒物质有关。我们未作这方面的研究。

许多临床观察和实验都证明 HSV 的感染类型与人体的免疫因素有关^[4]。本实验证明在体外 HSV 持续感染的细胞模型中亦存在这种影响。IFN α 的作用明显优于 IFN γ , 这是因为 IFN α 有较强的抗病毒作用, 而 IFN γ 有较强的免疫调节作用。IL-2 的活性主要只表现在免疫调节作用上。本实验为体外的 Raji 细胞持续感染模型, 不存在体内的那种多种免疫因素及细胞的相互作用, 故 IFN γ 仅表现出较弱的抑制 HSV 作用, IL-2 则没有这种作用。

肿瘤坏死因子具有多种生物学活性如抑制及杀伤肿瘤细胞、诱发炎症反应、参与免疫调节及促进某些细胞因子的分泌等。此外, 还有明显的抗病毒作用。如 J. Mestan 等用重组 TNF 处理某些细胞, 发现其对多种病毒 (如 HSV、腺病毒、鼠脑心肌炎病毒及牛滤泡性口炎病毒) 有抑制作用。但该作用受到细胞遗传特点的限制。有些细胞 (如 Hep-2、HEL、WI-38 以及 MEF) 在 TNF 处理后能建立较强的抗病毒状态, 而有些细胞 (如 Hela、BUD-8、WISH、L929 等) 在用 TNF 处理后不能建立抗病毒状态^[5]。本实验中用 TNF 处理 HSV 持续感染的 Raji 细胞, 5 天后细胞外病毒即检测不到, 抗原阳性细胞也明显减少, 证明在 Raji 细胞培养中, 单独用 TNF 对持续感染的 HSV 也有明显的抑制作用。关于 TNF 的抗病毒机制, 多数学者认为主要通过两个方面: 一是诱导未感染的细胞产生抗病毒状态; 二是选择性地杀伤病毒感染的靶细胞。虽然前者与 IFN 类似, 但目前认为二者是通过不同的途径发挥抗病毒作用的^[6]。

参 考 文 献

- [1] Yukihiro Nishiyama et al., 1979, *J Virol* 31: 841-44.
- [2] Rinaldo C.R. et al., 1979, *Infect Immun* 25: 521-25.
- [3] Lehtinen M et al., 1986, *Arch Virol* 87: 107-118.
- [4] Steve Koh et al., 1985, *J Infect Dis* 152(3): 435-40.
- [5] Mestan J et al., 1986, *Nature* 323: 818-819.
- [6] Grace H.M. Wong et al., 1986, *Nature* 323: 819-822.

The Establishment of Persistent Infection of Herpes Simplex Virus in Raji Cell and the Effects of TNF, IFNs and Antiserum to It

Zhang Ming Chen Sheng-bao Ding Ru-ning Zhou Yao-xi

(Department of Microbiology, Nanjing Medical College, Nanjing)

Persistent infection of herpes simplex virus(HSV) had been maintained in human B lymphoblastoid(Raji) cells for 150 days. The whole course of the persistent infection can be divided into two phases: acute(within 30 days p. i.) and persistent stable(30 days later p. i.). In the acute phase, the virus in the supernatant reached $10^{8.2}$ TCID₅₀/ml, HSV antigen positive cells (HSV Ag⁺ cell) detected by immunofluorescence reached 21% and the percentage of dead cells reached 42%. In the stable phase, the virus and Raji cells became relatively balanced: virus in the supernatant ranged $10^{3.5-4.2}$ TCID₅₀/ml, HSV Ag⁺ cell ranged 5—10% and the dead cell was less 5% (the same as controls). Treating the cell culture with recombinant interferons(rIFN α , rIFN γ), recombinant interleukin 2(rIL-2) and tumor necrosis factor(TNF) respectively, we found that TNF and rIFN α inhibited the virus replication markedly while so did rIFN γ but weakly and rIL-2 had no effects. Removing the factors 5 days later, the virus and HSV Ag⁺ cells gradually recovered as controls. Treating the cultures with anti-HSV serum, the virus and Ag⁺ cells were diminished and undetectable. After removing the antibody, the virus and its Ag⁺ cells no longer repeated and so did continuously for 50 days. These studies provided an useful model for research on HSV persistent infection in vitro in many aspects.

Key words: HSV Raji cell Persistent infection TNF IFN Antibody