

HSV体外感染对IgG产生的抑制作用和 TNF及r-IFN对它的影响

曹志惠 陈慎宝 丁如宁 周瑶玺

(南京医学院微生物教研室, 南京 210005)

提 要

本文观察了体外 HSV-I 感染对人淋巴细胞增殖、分化, 产生免疫球蛋白的影响。HSV-I 能感染 PWM 刺激的人扁桃体淋巴细胞, 并抑制其增殖和免疫球蛋白 (IgG) 的产生, 感染实验组的 IgG 产量较对照组明显降低 ($P < 0.005$)。HSV-I 感染后, 上清中可检出一定量的病毒, 其滴度为 $10^{3.2} - 10^{5.7}$ TCID₅₀/ml; 直接免疫荧光法检出病毒抗原阳性细胞为 3%—8.5%。在感染实验系统中加入重组的 IFN $_{\alpha}$ (r-IFN $_{\alpha}$)、IFN $_{\gamma}$ (r-IFN $_{\gamma}$) 和纯化的肿瘤坏死因子 (TNF), 观察到 r-IFN $_{\alpha}$ 和 TNF 均有一定程度抗病毒作用, 部分解除 HSV-I 对 IgG 产生的抑制作用。和对照组相比, 差异显著 ($P < 0.01$)。r-IFN $_{\gamma}$ 对 HSV-I 的感染和 IgG 产生几乎无作用 ($P > 0.05$), 但 r-IFN $_{\gamma}$ 对 TNF 有协同作用: 抑制病毒增殖和解除 HSV-I 对 IgG 产生的抑制, 比单独用 TNF 组更为显著 ($P < 0.01$)。

关键词: 单纯疱疹病毒 人淋巴细胞 免疫球蛋白G产生 肿瘤坏死因子 干扰素

Berg (1961)^[1]首次报道麻疹病毒能感染体外培养的人外周血白细胞。七十年代以后, 随着淋巴细胞纯化, 核酸杂交以及 DNA 转染等技术的发展, 证实多数人类病毒在体内、外能感染人淋巴细胞, 并且病毒感染可影响淋巴细胞的功能, 如: 麻疹病毒、流感病毒感染能抑制免疫球蛋白产生^[2], 而 EB 病毒感染则可激活和转化 B 细胞, 增强免疫球蛋白的合成^[3]。近来研究指出, I 型单纯疱疹病毒 (HSV-1) 能感染活化的人淋巴细胞, 并产生低滴度的病毒^[4]。至于这种感染对免疫球蛋白产生的影响, 国内外尚未见报道。本文建立了 HSV-1 体外感染人淋巴细胞的模型, 这种感染介于增殖和非增殖型感染之间, 或称为低度增殖感染, 即只有少数细胞感染, 多数细胞不感染^[4,6]。我们用它来观察此种感染对人淋巴细胞增殖、产生免疫球蛋白 (IgG) 的影响, 以及 IFN $_{\alpha}$ 、IFN $_{\gamma}$ 和 TNF 在这实验系统中的作用。

材 料 和 方 法

一、淋巴细胞悬液的制备: 扁桃体细胞悬液按本室常规^[6]制成, 并用一次粘附法去除巨噬细胞。方法如下: 上述细胞悬液分装于扁瓶中, 37℃, 5% CO₂ 2 至 3 小时后, 吸出未吸附细胞至 24

本文于 1989 年 11 月 1 日收到, 1991 年 1 月 24 日修回。
国家自然科学基金资助项目。

孔细胞培养板中, 每孔含细胞数为 1×10^5 /ml。

二、HSV-I感染: 扁桃体淋巴细胞培养物和 r -IFN $_{\alpha}$ 、 r -IFN $_{\gamma}$ 、TNF中加入美洲商陆(PWM, Sigma公司出品)刺激浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, 刺激培养3天, 加入HSV-I(HK $_3$ ·RK $_2$ 株, 北京病毒所提供)感染复数MOI=2, 第4至9天检测上清中IgG含量, 病毒感染滴度(TCID $_{50}$ /ml)以及检测淋巴细胞增殖和病毒抗原阳性细胞数; 于PWM刺激起始即分别加入适当剂量的重组的 α -干扰素(r -IFN $_{\alpha}$)、重组的 γ -干扰素(r -IFN $_{\gamma}$) (由上海生物制品所提供)及纯化TNF(第二军医大学提供), 培养3天, 加入HSV-I, 第7天测上清中IgG含量和病毒感染滴度, 并设不感染的对照组。

三、免疫荧光检查: HSV-I感染家兔(1次角膜接种, 2次皮内接种), 取血清, 其中中和效价 $>1:320$, 提取兔血清IgG, 用异硫氰酸标记, 即为荧光标记抗体, 用直接荧光法测HSV-I抗原阳性细胞, 并计算阳性细胞的百分率。

四、细胞增殖检测: 参照Mosmann的报道^[7], 以MTT比色分析法检测淋巴细胞的增殖。

五、IgG的检测: ELISA双抗体夹心法, 按照Harfast报道的方法加以改良^[8]。

结 果

一、PWM刺激浓度的选择: 预备实验中分别取4种PWM刺激浓度: $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$, 测第7天上清中IgG含量。观察10例扁桃体淋巴细胞IgG最大产量的PWM浓度。7例为 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, 2例为 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$, 1例为 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$, 因此选PWM $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 为最佳刺激浓度。

二、HSV-I感染对IgG产生的影响: PWM刺激3天后, 加入HSV-I(MOI为2), 测第4至9天上清中IgG产量。感染组的IgG量较对照组明显下降($P < 0.005$), 说明HSV-I对淋巴细胞产生IgG有抑制作用, 见图1。

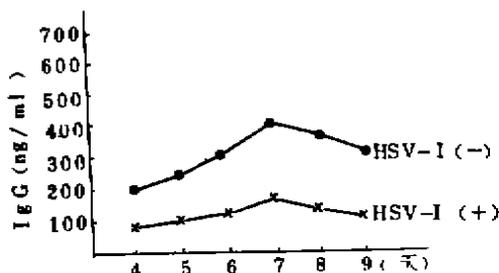


图1 HSV-I感染对IgG产生的影响
Fig 1 The effect of HSV-I infection on production of IgG

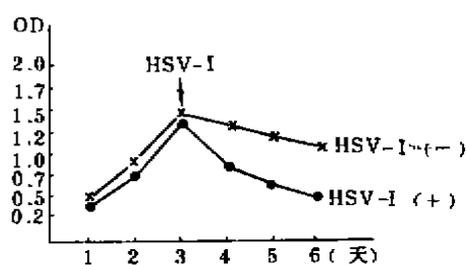


图2 HSV-I感染对人扁桃体细胞增殖的影响
Fig 2 Effect of HSV-I infection on the cellular proliferation of tonsillar cells

三、人扁桃体淋巴细胞HSV-I感染特征: 用MTT比色分析法观察HSV-I对淋巴细胞增殖的影响, 见图2。

感染组的淋巴细胞增殖明显低于未感染组, 这与国外研究报道相同^[4]。

淋巴细胞感染HSV-I 1~6天后, 检测荧光阳性细胞数, 峰值(约8.5%)出现于感染后3~4天, 1~2天, 5~6天的阳性细胞数均较低(约3~5%)。此结果与国外报道相符, HSV-I感染后约5%的淋巴细胞表达病毒抗原^[4], TCID $_{50}$ 法测定上清中病毒感染

滴度为 $10^{3.2}-10^{5.7}$ TCID₅₀/ml。

四、r-IFN α 、r-IFN γ 、TNF对HSV-I抑制作用的解除: 在感染试验系统中, 培养开始即分别加入r-IFN α (1000IU/ml)、r-IFN γ (1000IU/ml)、TNF(1000IU/ml), 后两者联合(r-IFN γ 1000IU/ml+TNF1000IU/ml)应用。第7天测IgG量。r-IFN α 、TNF部分解除HSV-I的抑制效应($P<0.01$), r-IFN γ 则几无解除作用($P>0.05$), r-IFN γ 、TNF联合应用, 具有协同作用($P<0.01$), 见图3。

本实验还观察了不同剂量的上述淋巴、单核因子对HSV-I复制的影响。r-IFN α 、TNF均明显抑制HSV-I的复制, 抑制作用呈剂量依赖关系。r-IFN γ 抑制作用微弱, 但与TNF联合应用, 两者有明显协同作用, 见图4。

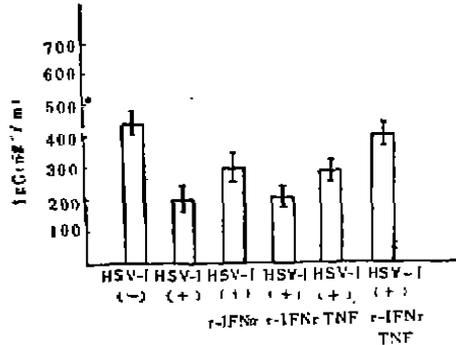


图3 干扰素和肿瘤坏死因子对感染细胞产生IgG的影响
Fig3 Effect of IFN and TNF on IgG production of infected cell culture

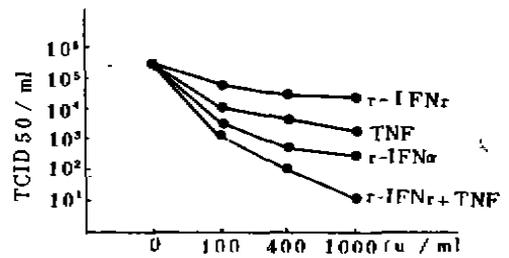


图4 不同剂量的干扰素和肿瘤坏死因子对病毒增殖的影响
Fig4 Effect of IFN and TNF in different concentrations on virus replication

讨 论

淋巴细胞对各种病毒感染的敏感性是不同的, 大致分为下述几种情况^[4,5]: 1. 允许病毒复制并可释放感染性病毒颗粒, 即增殖型感染, 如脊髓灰质炎病毒; 2. 病毒可感染细胞, 只有部分细胞表达病毒抗原, 而不能复制完整的病毒, 即非增殖型感染, 如流感病毒; 3. 病毒根本不能感染细胞, 如腺病毒; 4. 静止细胞不能感染病毒, 经促分裂剂处理, 活化的细胞方能产生完整病毒, 但产量不大, 只有部分细胞产生病毒, 单纯疱疹病毒(HSV)即属于此种情况。因此, HSV感染淋巴细胞是介于增殖型与非增殖型感染之间。

本实验在培养扁桃体淋巴细胞时, 将其粘附细胞(主要为巨噬细胞)去除, 因为在IgG产生时, 巨噬细胞宜少量存在, 过多或无均不适宜^[9]。用一次粘附法去除不彻底, 尚余1~2%即满足PWM刺激产生IgG的反应^[10], 故本实验用一次粘附法除去粘附细胞。

PWM刺激培养淋巴细胞3天, 淋巴细胞的活化、增殖达高峰^[4], 本实验观察到, 此时加入HSV-I, 可获得最佳感染, 淋巴细胞增殖和产生IgG反应均明显受到抑制。PWM刺激较早期或较晚期加入HSV-I, 抑制效应均较弱, 因为PWM刺激早期, 淋巴细胞尚未活化, HSV-I不能在其中增殖; PWM刺激晚期, 淋巴细胞已大量分化, HSV-I不

能抑制分化成熟的淋巴细胞产生免疫球蛋白⁽⁴⁾。

某些淋巴、单核因子对HSV-I的抑制效应有解除作用。IFN α 抗病毒作用大于IFN γ 。近来证实 TNF 亦具有抗病毒活性,其可能机制为:1.增强未感染病毒细胞的抗病毒能力;2.杀伤病毒感染细胞;3.抑制病毒介导的细胞病变⁽¹¹⁾。TNF 单独有抗病毒作用,若与 IFN γ 联合应用,则具有协同抗病毒作用,可能是由于IFN γ 可诱导增强TNF受体表达的缘故⁽¹²⁾。本实验研究发现,单独TNF可部分解除HSV-I的抑制,HSV-I感染滴度下降,并呈剂量依赖关系,而与IFN γ 联合应用,则有明显的协同抗病毒作用,与国外近年实验结论相符。

参 考 文 献

- (1) Berg, R.B., 1961, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*106:581.
- (2) Paolo Casali, et al., 1984, *J.Exp.Med.*159:1322.
- (3) Posen, A., et al., 1977, *Nature* 287:52
- (4) RÜliger, W., et al., 1984, *J.Immun.*132:914.
- (5) Denman AM, et al., 1974, *Proc Roy Soc Med.*67:1219.
- (6) 瞿涤等, 1983, 上海免疫学杂志, 3:218.
- (7) Mosmann, T., 1983, *J.Immunol.Method.*65:55
- (8) Harfast, B., et al., 1981, *J.Immunol* 127:2146.
- (9) Rosenstreich, D.L., et al., 1978, *J.Immunol.*116:131.
- (10) Rosenberg, S.A., et al., 1979, *J.Immunol.* 122:926.
- (11) Mestam, J., et al., 1986, *Nature.*323:816.
- (12) Grace, H.W. et al., 1986, *Nature.*323:819.

Inhibitory Effect of HSV Infection in Vitro on IgG and Effect of TNF and r-IFN on It

Cao Zhi-hui et al

(Dept. of Microbiology, Nanjing Medical College, Nanjing 210005)

We successfully established a system in vitro that HSV-I infected human tonsillar lymphocytes. Tonsillar lymphocytes prestimulated with PWM(10 μ g/ml) were infected by living HSV-I, so as to their proliferation and IgG synthesis were abated significantly($P<0.005$). In the supernatants, the infective titers of HSV-I were about $10^{5.2}$ — $10^{6.7}$ TCID₅₀/ml, number of viral antigen positive cells about 3%—8%. We found that some lymphokine and monokine can dampen the inhibition of infection of infectious HSV-I. The effect of purified recombinant IFN- α was stronger than that of IFN- γ ($p<0.01$). The purified tumor necrosis factor (TNF) also abated alone the inhibition of HSV-I markedly, so that IgG synthesis enhanced more highly than that without adding TNF ($P<0.01$). TNF in combination with IFN- γ caused a larger increasing in IgG synthesis than that observed for TNF alone ($P<0.01$) or IFN- γ alone($P<0.01$). This result showed that the activity of TNF had dramatically synergized with IFN- γ .

Key words, Herpes simplex virus Human lymphocytes IgG production Tumor necrosis factor Interferon