维普资讯 http://www.cqvip.com

第6卷第3期 1991年9月
中国病毒学 VIROLOGICA SINICA
Vol.6 No.3 Sept.1991

I型单纯疱疹病毒(HSV-I)体外抗体应答及IFNr的调节

季明春* 周瑶玺 姚堃

(南京医学院微生物学教研室，南京 210029)

提 要

以纯化、灭活的HSV-I为抗原，体外致敏洗涤过的健康成人外周血淋巴细胞，37℃孵育12天，细胞培养上清中的特异性抗体用ELISA法测定。11例血清HSV-I抗体阳性成人的淋巴细胞接受灭活HSV-I抗原致敏后，培养上清中均能检出特异性抗体，抗体类型为IgG(26.6±23ng/ml)，体外产生的特异抗体水平与原血清抗体水平无相关性(R=0.45，P>0.05)。同法刺激新生儿淋巴细胞，不能诱生任何类型的HSV-I抗体。在本实验系统中，特异性抗体应答是一个蛋白质的全新(de novo)合成过程，应答水平和体外致敏用的病毒抗原量有明显剂量依赖关系，最适刺激抗原量为108ng/ml。HSV-I抗体应答需要T、B细胞的相互作用，两类细胞单独均不能诱导特异性HSV-I抗体应答。在本实验系统中加入适量重组人γ干扰素，能增强抗体应答水平，过高剂量起抑制作用。

关键词：HSV-I 体外致敏 淋巴细胞培养 特异性抗体

近年来许多学者试图利用各种抗原，建立诱导B淋巴细胞原发或继发性抗体应答的体外致敏模型，此项研究国内尚未见报道。本文以纯化、UV灭活HSV-I为抗原，体外致敏人外周血淋巴细胞(PBL)，诱导特异性抗体应答，并观察重组人γ-干扰素(rhIFNγ)对抗体应答的影响。现将结果报告如下。

材料与方法

一、制备淋巴细胞悬液：取献血员(25—50岁)外周血，按常规分离单个核细胞，将其调至1×10^7/ml，取5ml分置于φ10cm玻璃平皿中，粘附2小时后吸出细胞悬液，以少量培养液轻洗两次，调节细胞浓度至5×10^6/ml，即为去巨噬细胞的淋巴细胞悬液，非特异性酯酶染色巨噬细胞≤5%。在部分实验中，按Saxon[1]介绍的AET-SRBC花环法进一步分离T、B细胞，非T细胞悬液中E花环形成细胞≤2%。

二、病毒：HSV-I(Stoker株)、HSV-Ⅱ(Sav株)由中国预防医学院病毒所提供，CMV(AD 169株)由南京儿童医院病毒室提供。

三、纯化和灭活HSV-I：按Powell描述的方法纯化HSV-I[2]。简言之，原代新生兔肾细胞单层以HSV-I(Stoker株)感染，感染复数(MOI)为10，待出现Ⅲ～Ⅳ细胞病变时收获，冻融细

本文对1990年12月17日收到，1991年1月14日修回。
国家自然科学基金资助项目。
*现在地址：扬州医学院微生物学教研室，扬州225001

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞，用超声波细胞粉碎器100W、10分钟破碎细胞，低速离心去细胞碎片。感染细胞上清中加40%PEG（MW6000），使终浓度为8%，4℃过夜，10000r/m 60分钟，沉淀物以STE缓冲液混悬。将上述浓缩病毒液轻铺在预平衡的10—70%蔗糖不连续密度梯度液上，50000g离心2小时(Beckman LT-55型超速离心机，SW28转子），在40%土蔗糖梯度液中出现一狭窄乳白色区带，用梯度收集器（Hitcha-cfu）分段收集，经核酸蛋白仪检测，乳白色区带处出现一高蛋白吸收峰(图1)，取样作醋酸铀负染，透射电镜观察发现大量病毒粒子。收集此部分加适量PBS混悬后，20000r/m 120分钟沉淀病毒粒子，沉淀物用PBS混悬，测定病毒蛋白含量。取纯化病毒液4ml置φ10cm平皿中，用GZX-A高效紫外线消毒器（5000μW/cm²）照射6分钟，距离5cm，不断轻摇平皿，经UV灭活HSV-Ⅰ接种BHK-21细胞，72小时不出现细胞病变。本文中以此纯化灭活HSV-Ⅰ作为体外免疫刺激剂。

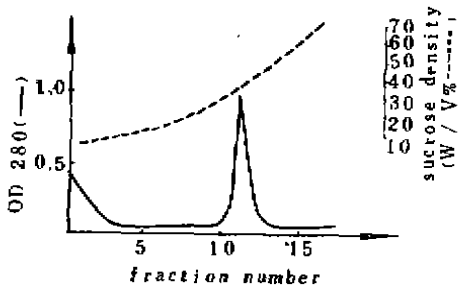

图1 纯化HSV超速离心结果

Fig1 Analytical result of HSV particles ultracentrifugation

四、体外致敏淋巴细胞：RPMI1640细胞培养液按本室常规配制[3]。PBL被培养在24孔细胞板中，最终体积1ml/孔，细胞密度为2×10^6/ml，同时加入HSV-Ⅰ抗原，置37℃ 5%CO_2孵箱中培养12天，收获上清—20℃贮存，待测特异性抗体。

五、淋巴细胞增殖能力：MTT比色法见[4]。

六、ELISA间接法检测HSV-Ⅰ抗体：以灭活纯化HSV-Ⅰ包板，每孔10μg/0.1ml，4℃过夜，洗涤液洗三次，加入细胞培养上清和一组已知浓度的标准化阳性参考血清。阳性参考血清按Stevens介绍的方法[5]标准化。37℃ 2小时，洗三次后分别加入HRP标记的羊抗人IgG抗体或鼠抗人μ链McAb，37℃ 2小时，洗三次，加入OPD、H_2O_2混合液，37℃ 20分钟后终止反应，测定OD值。每份待检标本设三复孔，取OD均值从标准曲线上查得所含特异性抗体含量，以ng/ml表示。1∶100稀释的阳性参考血清分别用等量HSV-Ⅰ（1μg/ml）、HSV-Ⅱ（10^6TCID）37℃吸收1小时，检测吸收后血清中抗HSV-Ⅰ IgG。结果见表1，HSV-Ⅰ对特异抗体检出阻断率达96.9%，而HSV-Ⅱ没有明显影响，说明检测HSV-Ⅰ抗体的ELISA间接法是高度特异的。

表1 检测抗HSV-Ⅰ IgG ELISA法的特异性[a]

Table 1 Specificity of ELISA for anti-HSV-Ⅰ IgG antibody assay

包被病毒 Virus used to coat plates	加在阳性血清中的阻断病毒 Virus added with positive serum		
	—	HSV-Ⅰ	HSV-Ⅱ
HSV-Ⅰ	82	2.8(3.1%)[b]	64.9(79.1%)

a.抗HSV-Ⅰ IgG抗体含量以ng/ml表示。

b.括号内数字为占对照孔抗HSV-Ⅰ IgG含量的百分数。

a.Arithmetic mean of IgG anti-HSV-1 antibody in ng/ml

b.Parentheses denote the percentage of the activity of specifical antibody relative to control incubation without adsorbed virus

七、淋巴因子：重组人γ干扰素由上海生物制品所提供。

维普资讯 http://www.cqvip.com

结　果

一、特异抗体的产生：表2表明灭活HSV-Ⅰ能在体外致敏PBL，诱生特异性HSV-Ⅰ抗体。若同时加蛋白合成抑制剂Actinomycin D，细胞培养上清中不能检出HSV-Ⅰ抗体；不加HSV-Ⅰ灭活病毒抗原刺激的PBL对照培养上清中也不能测到特异抗体。以上结果说明在本实验系统中HSV-Ⅰ抗体的诱生是一个蛋白质的全新（de novo）合成过程。

表2　HSV-Ⅰ诱导不同个体外周血淋巴细胞体外合成抗HSV-Ⅰ IgG*

Table 2　IgG anti-HSV-1 antibody produced in cultures of human PBL stimulated with HSV-1

	个体1 Individual 1	个体2 Individual 2	个体3 Individual 3
(对照培养液)Control	<1.0	<1.0	<1.0
HSV-Ⅰ	16.8±4.6	29.9±6.1	41.7±5.15
HSV-Ⅰ+Actinomycin D	<1.0	<1.0	<1.0

*2×10⁶/ml PBL分别单独用细胞培养液、加HSV-Ⅰ抗原(108ng/ml)或/和Actinomycin D (10μg/ml)培养12天，检测培养上清中抗HSV-Ⅰ IgG含量(ng/ml).

2×10⁶ PBL were cultured for 12 days with media alone, 108 ng/ml of U. V. inactivited HSV-1 with or without 10 μg/ml Actinomycin D. Arithmetic mean of IgG anti-HSV-1 antibody in ng/ml ±SD.

二、抗原剂量依赖性：5例PBL HSV-Ⅰ抗体诱生的结果见图2。HSV-Ⅰ抗原浓度低于27ng/ml即能诱生特异抗体，抗体应答高峰的刺激抗原浓度为108ng/ml，进一步增加抗原浓度，抗体应答能力反大大降低，因而选108ng/ml HSV抗原为最适刺激抗原。用不同剂量的灭活HSV-Ⅰ抗原刺激PBL，72小时后测定细胞增殖程度，在27—270 ng/ml抗原范围内，细胞增殖程度逐渐增高并达到坪值。

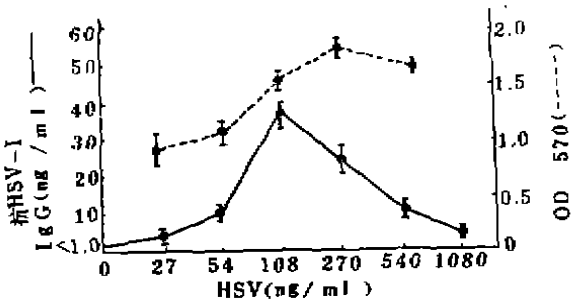

图2　不同剂量HSV-Ⅰ对HSV-Ⅰ抗体应答和细胞增殖的影响

Fig2　Antigen dose dependence of anti-HSV-1 antibody response and PBL proliferation

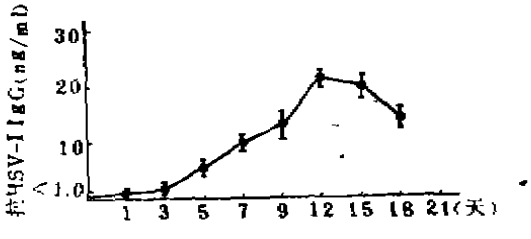

图3　抗HSV-Ⅰ IgG产生时相

Fig3　Dynamic of IgG anti-HSV-1 antibody production

维普资讯 http://www.cqvip.com

三、抗体应答时相：在灭活 HSV-Ⅰ体外致敏 PBL 后不同时间收集细胞培养上清，检测特异抗体。抗原刺激的最初 3 天无特异抗体产生，随培养时间延长，抗HSV-I IgG 含量逐步增高，12天左右高峰，随之又趋降低。3 例PBL抗体应答时相见图 3。选择抗原刺激后的第12天为培养上清收获时间。

四、细胞培养上清中剩余抗原对抗体检测的影响 以不同量 HSV-Ⅰ抗原阻断经 PWM 激活的淋巴细胞培养上清中特异抗体的检测，1∶100 稀释的抗原制备细胞上清作对照。如图 4 所示，阻断抗原低于270ng/ml 不能明显抑制特异HSV-Ⅰ抗体检出。

五、HSV-Ⅰ诱生抗体的特异性 将 HSV-Ⅰ致敏的细胞培养上清用等量 HSV-Ⅰ、HSV-Ⅱ、CMV 吸收后检测 HSV-Ⅰ抗体，结果见表 3。HSV-Ⅰ明显抑制特异性抗体检出，而HSV-Ⅱ和CMV对HSV-Ⅰ抗体检出影响不大或甚微，说明灭活 HSV-Ⅰ诱生的抗体是针对刺激抗原的。

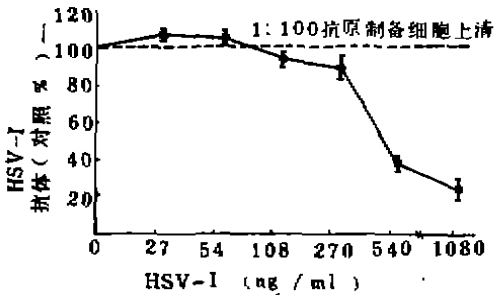

图 4 剩余抗原对细胞培养上清中HSV-1抗体检测的影响

Fig4 Effect of residual antigen on detection of antibody to HSV-1 in the culture supernatant

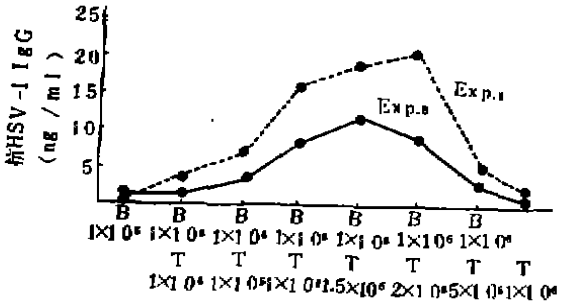

图 5 不同比例B、T细胞产生特异性IgG的比较

Fig5 T cell dependence of the anti-HSV-I antibody response of human PBL

表3 HSV-1抗原诱生抗体的特异性

Table 3 Specificity of the antibody produced in cultures stimulated by HSV-1

致敏病毒 Immunizative virus	吸收病毒[a] Adsorbed virus	抗HSV-I IgG(ng/ml) IgG antibody anti-HSV-1	
—	—	<1.0	
HSV-Ⅰ	—	17.8	
HSV-Ⅰ	HSV-Ⅰ	1.39	(7.8)[b]
HSV-Ⅰ	HSV-Ⅱ	10.16	(57.0)
HSV-Ⅰ	CMV	16.3	(91.5)

a.HSV-1、HSV-Ⅱ、CMV 吸收剂量分别为 1000ng/ml，10^6TCID50/ml，10^4TCID50/ml。

b.占未经吸收病毒处理上清特异抗体含量的百分数。

a.Supernatant fluids were adsorbed with same volume antigen: HSV-1 1000 ng/ml, HSV-2 10^6 TCID50/ml, CMV 10^4TCID50/ml

b.Numbers in parentheses are the percentage of control without an added adsorbed antigen

维普资讯 http://www.cqvip.com

六、HSV-Ⅰ抗体应答的T细胞依赖性　T、B分别单独用灭活HSV-Ⅰ致敏，细胞培养上清中几乎测不到特异抗体。在B细胞中加入一定比例的T细胞，特异性抗体含量随T细胞比例增高而增高，最适T、B细胞比例为1∶1.5～2（见图5）。

七、特异性抗体的Ig类型　分别测定11例成人PBL受HSV-Ⅰ抗原致敏后的细胞培养上清中抗HSV-Ⅰ IgM和IgG含量（图6）。11例成人PBL细胞培养上清中均能测到不同水平抗HSV-Ⅰ IgG（26.6±23ng/ml），而抗HSV-Ⅰ IgM均低于1.0 ng/ml。这11例成人血清抗HSV-Ⅰ IgG均阳性，见表4；而淋巴细胞体外抗体应答能力和血清抗体滴度之间并无相关性（R=0.45，P>0.05）。8例新生儿脐血淋巴细胞按同样条件用HSV-Ⅰ抗原刺激，不能诱生任何类型的HSV-Ⅰ抗体。

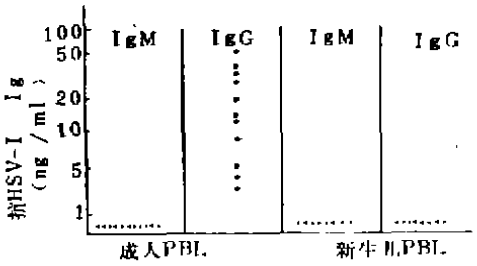

图6　外周血淋巴细胞(PBL)体外诱生抗HSV-Ⅰ抗体Ig类型

Fig6 Immunoglubin type of anti-HSV-I antibody produced in cultures of PBL

表4　健康成人外周血淋巴细胞的体外HSV-Ⅰ抗体应答

Table 4　HSV-I Specific antibody response of PBL from different healthy individuals

供体 Donor	抗HSV-Ⅰ IgG IgG anti-HSV-I antibody		
	血清滴度 Serum titre	培养上清中抗体(ng/ml) Anti HSV-I antibody in supernatant	体外抗体诱生 In vitro antibody synthesis
1	1∶51200	52.6	+
2	1∶400	5.6	+
3	1∶6400	28.8	+
4	1∶1600	41.7	+
5	1∶12800	74.9	+
6	1∶1600	9.8	+
7	1∶6400	3.6	+
8	1∶12800	18.4	+
9	1∶3200	37.9	+
10	1∶1600	4.3	+
11	1∶800	15.2	+

八、重组人γ干扰素对HSV-Ⅰ体外抗体应答的影响

1．重组人γ干扰素对抗体应答的增强作用　将rh IFNγ加入HSV-Ⅰ抗原体外致敏体系中，发现其能增强特异性抗体应答（图7）。最适剂量为10μ/ml，增加rh IFNγ浓度，其增强作用反见减弱，过高剂量则起抑制作用。在缺少HSV-Ⅰ抗原致敏的情况下，rh IFNγ不能单独诱导特异性抗体应答。

2．重组人γ干扰素为迟发性增强因子　于HSV-Ⅰ体外致敏外周血淋巴细胞的不同时相（0—4天），加入终浓度为10μ/ml的rhIFNr，结果用图8表示。rhIFNr在抗

维普资讯 http://www.cqvip.com

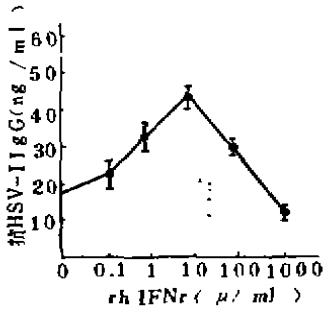

图7 重组人IFNr增强HSV-I抗体应答

Fig7. rhIFNγ enhance anti-HSV-I antibody response in vitro

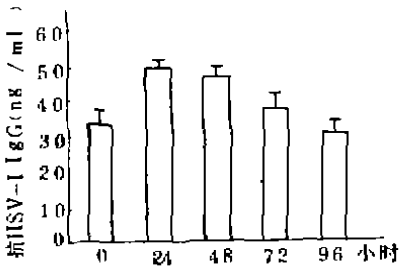

图8 不同时相rhIFNr对HSV-I抗体应答的影响

Fig 8 Delayed effect of rhIFNγ on anti HSV-I antibody production

原致敏后的第24—48小时加入，其增强特异性抗体应答作用最强。

讨 论

人类是HSV的自然宿主。在我国人群中HSV传播极为广泛，从14岁到成人血清HSV-I抗体阳性率高达93.3%。血清抗体阳性提示在生命过程中曾受过HSV-I感染或抗原刺激，因此对多数健康成人来说，其外周血淋巴细胞被灭活HSV-I抗原致敏是接受再次抗原刺激，HSV-I抗体应答属特异性再次应答。在本实验系统中，HSV-I抗原体外诱生特异性抗体Ig类型主要为IgG，符合再次免疫应答的一般规律。正常新生儿脐血淋巴细胞不能对HSV-I体外刺激产生抗体应答，和yarchoan[6]以流感病毒为抗原体外致敏新生儿淋巴细胞的结果一致，因而可进一步说明成人外周血淋巴细胞HSV-I抗体应答是继发性免疫应答。

血清HSV-I抗体阳性的成人外周血淋巴细胞能在体外接受HSV-I抗原刺激产生应答，表明外周血中存在特异性循环记忆细胞。由于不同个体曾受HSV-I抗原刺激的强度和频度不同，外周血中循环记忆细胞的数量和反应能力势必存在很大差异，从而表现为体外HSV-I抗体诱生水平的差别。

体外HSV-I抗体应答需要T淋巴细胞辅助，依赖T、B细胞间的相互作用，因为完整的HSV病毒抗原属于T细胞依赖性抗原，B细胞单独接受HSV-I抗原刺激不能产生抗体应答。

T细胞对B细胞功能的影响是错综复杂的，并受到许多可溶性细胞因子的调控，B细胞的增殖分化需要某些细胞因子作为辅助信号。IFNr是由活化的T细胞分泌的淋巴因子之一，能作用于多种细胞，具有广泛生物学活性。我们在建立HSV-I体外致敏模型的基础上，观察重组人γ干扰素对HSV-I抗体应答的影响。rhIFNγ对HSV-I抗体应答有调节作用，当致敏体系中含适量rhIFNγ时，抗体应答水平显著提高，增加rhIFNγ浓度却导致高剂量抑制效应出现，Snapper等人也曾发现类似现象[7]，可能由于高剂量rhIFNγ所产生的抗淋巴细胞增殖效应所致。rhIFNγ增强HSV-I抗体应答有一定时相效应，在抗体应答的细胞增殖期rhIFNγ能发挥更大的促进作用。

维普资讯 http://www.cqvip.com

以往研究HSV体液免疫主要依靠检测血清抗体水平，要在细胞水平研究HSV诱导的体液免疫应答，进一步了解HSV抗体诱生及免疫调节等机制，建立一个体外致敏模型是十分重要的。HSV-Ⅰ体外致敏模型的建立，无论对我们了解正常和疾病状态下特异抗体应答及调节机制，还是将其用于人单克隆抗体制备的研究均具有一定的现实意义。

参考文献

〔1〕Saxon A. et al., 1976, *J Immunol Methods* 12：285.

〔2〕May B. W. J. et al., 1985, Virology—a practical approach, IRL press, Oxford, pp207.

〔3〕王明伦，1989，病毒学杂志 3：278。

〔4〕Mosmann T., 1983, *J Immunol Methods* 65：55.

〔5〕Stevens R.H. et al., 1978, *J clin Invest* 62：1154.

〔6〕Yarchoan P. et al., 1983, *J Immunol* 131：1222.

〔7〕Snapper G.M. et al., 1988, *J Immunol* 140：2121.

Specific HSV-Ⅰ Antibody Production in Vitro by Human Peripheral Lymphocytes and Enhancement by IFNγ

Ji Ming-chun　Zhou Yao-xi　Yao Kun

(Department of Microbiology, Nanjing Medical College, Nanjing 210029)

Human peripheral blood lymphocytes from normal adult donors were stimulated in vitro by UV-inactived Herpes simplex virus type Ⅰ (HSV-Ⅰ) as an antingen, incubated in 37℃ for 12 days. Specific anti-HSV-Ⅰ antibody was measured by ELISA. Anti-HSV antibody of IgG type was produced in vitro in all 11 individuals (26.6±23ng/ml) whose sera were sero-positive to HSV-Ⅰ. Newborn lymphocyte cultures failed to induce anti-HSV-Ⅰ antibody of IgG or IgM type after stimulation. The anti-HSV-Ⅰ antibody response of lymphocytes was shown to be antigen dependent and antigen specific. In this experimental system, anti-HSV-Ⅰ antibody production in vitro was result from de novo protein synthesis. Optimal antigen for specific response was observed at a certain concentration of 108ng/ml. Specific HSV-Ⅰ antibody response was suppressed while increasing concertration of HSV-I antigen in culture. The antibody response to HSV-I requires cooperation between T and B cells. On the basis of studying HSV-I immunization in vitro, we added rhIFNγ into this experimental system. It was demonstrated that rhIFNγ can enhance anti-HSV-I antibody response in vitro and be a late acting helper factor.

Key words: HSV-I　Sensitization in vitro　Culture of lymphocytes　Specific antibody