

251-256

6848(10)

几种细胞因子对 HSV-1 感染单核巨噬细胞的影响^{*}

季晓辉 姚堃 李焕娣 周瑶玺

(南京医科大学微生物学教研室, 南京 210029)

R373.11

A 摘要 以 HSV-1 接种人单核细胞系 U₉₃₇ 和小鼠腹腔巨噬细胞, 并在接种前后分别以不同的细胞因子处理。经病毒滴定、免疫荧光试验检测病毒抗原及多聚酶链反应技术检测病毒基因, 研究了细胞因子对 HSV-1 感染单核巨噬细胞的影响。结果证实, TNF- α 50 u/mL, M-CSF 200 u/mL, IFN- γ 1000 u/mL, IFN- α 1000 u/mL 均能增强单核巨噬细胞对 HSV-1 的抗性, 加速细胞对 HSV-1 DNA 的清除, 抑制病毒抗原的表达; 并能拮抗 LPS 对 HSV-1 在单核巨噬细胞中表达的促进作用。

关键词 单纯疱疹病毒, 单核巨噬细胞, 细胞因子

细胞因子在抗病毒免疫中有重要意义^[1]。单核巨噬细胞既能产生多种细胞因子, 又是多种细胞因子作用的靶细胞, 在抗病毒免疫中也起重要作用。前文报道人单核细胞系 U₉₃₇ 细胞对 HSV-1 感染具有天然抗性, LPS 则能削弱这种抗性, 促进感染的发生发展^[2]。现进一步研究肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)、 α 和 γ 干扰素 (IFN- α , γ) 等细胞因子对 HSV-1 感染 U₉₃₇ 和小鼠腹腔巨噬细胞的影响。

材料和方法

1 细胞及其培养

U₉₃₇ 细胞; 小鼠腹腔巨噬细胞: 自 3 周龄 Balb/C 小鼠腹腔分离, 以贴壁培养去除非巨噬细胞; 乳兔肾 (PRK) 细胞单层: 按常规^[3]制备。用 10% 新生牛血清 RPMI 1640 营养液 (谷氨酰胺 2 mmol/L, 青、链霉素各 100 u/mL) 于 37 °C、5% CO₂ 中培养。

2 病毒

HSV-1 SM44 株。在 PRK 细胞单层传代。

3 细胞因子及其中和单抗

基因重组人肿瘤坏死因子 α (rhTNF- α): 南京大学生化系徐贤秀教授惠赠; 纯化的人尿巨噬细胞集落刺激因子 (hM-CSF): 南京大学生化系朱德煦教授惠赠; 基因重组人 γ 干扰素 (rhIFN- γ), 上海生物制品研究所产品; 基因重组人 α 干扰素 (IFN- α) 及其中和单抗、rhTNF- α 中和单抗: 均由第四军医大学免疫室金伯泉教授惠赠。

4 HSV-1 感染细胞及细胞因子对其影响的观察

4.1 U₉₃₇ 细胞 取生长良好, 以含或不含处理因素的营养液培养 3 d 的 U₉₃₇ 细胞调其浓度为 10⁵ 细胞/mL, 接种 HSV-1, MOI=1 TCID₅₀/细胞。37 °C 1 h 后洗涤细胞 2 次除去游离病毒。再以原先相同的营养液调至原细胞浓度, 分装于细胞培养瓶, 5 mL/瓶, 37 °C 培养。定时换液: 先摇匀细胞, 取 2 mL 待检, 再以原先相同的营

本文于 1995 年 10 月 30 日收到, 1996 年 2 月 5 日修回

* 江苏省教委优秀青年教师科研基金资助课题

养液补足原体积,并调 pH。离心待检样品,上清-70℃冻存,备作病毒滴定,沉淀细胞经洗涤后-20℃冻存,备作 PCR 检测病毒 DNA;并以部分细胞涂片,备作病毒抗原检测。每组实验均设双份,取均值。

4.2 鼠腹腔巨噬细胞 将贴壁的鼠腹腔巨噬细胞重悬,以含或不含处理因素的营养液配成 5×10^6 细胞/mL 浓度的悬液,种于 24 孔细胞培养板,1 mL/孔。培养 3 d 后接种 HSV-1, MOI=1 TCID₅₀/细胞。37℃ 吸附 1 h 后轻洗 2 次去除游离病毒,加原先相同的营养液 37℃ 培养。适时换液、调 pH。定期按孔收集培养上清液,-70℃ 冻存,备作病毒滴定。

4.3 病毒滴定 病毒 DNA 检测和病毒抗原测定:分别采用微量 PRK 单层细胞病变法、PCR 法和间接免疫荧光法。操作要点与前文报道相同,见参考文献^[2]。

结 果

1 TNF- α 、M-CSF、IFN- γ 和 α 对 HSV-1 感染的 U₉₃₇ 细胞培养中病毒滴度、病毒 DNA 持续存在时间及病毒抗原阳性细胞百分率的影响 见表 1、2。

表 1 细胞因子对 HSV-1 感染的 U₉₃₇ 细胞培养中病毒滴度及 PCR 法所测 U₉₃₇ 细胞中病毒 DNA 存留时间的影响

Tab 1 Effect of cytokines on the viral titer of HSV-1 infected U₉₃₇ cell culture and the duration time of viral DNA infected U₉₃₇ cells detected by PCR

组号 No. of group	处理条件 Different treatments			病毒滴度(TCID ₅₀ /mL) Viral titer(TCID ₅₀ /mL)		病 毒 DNA 存 留时间 Duration time of viral DNA (d)
	脂多糖 Lps 20 μ g/mL	细胞因子 Cytokine	细胞因子抗体 Antibody to cytokine	均值(最高—最低) Mean(max—min)	可测出时间(d) Duration time of de- tectable viral titer (d)	
1	-	-	-	$10^{-1.35}(10^{-2.1-0.2})$	10	14
2	+	-	-	$10^{-2.56}(10^{-3.5-0.7})$	28	32
3	-	TNF- α 50 u/mL	-	$10^{-0.9}(10^{-1.3-0.5})$	4	7
4	-	TNF- α 50 u/mL	anti-IFN- α	$10^{-0.75}(10^{-0.9-0.6})$	4	7
5	+	TNF- α 50 u/mL	-	$10^{-0.8}(10^{-1.8-0.2})$	14	14
6	+	TNF- α 50 u/mL	anti-TNF- α	$10^{-2.42}(10^{-3.5-0.1})$	32	32
7	+	M-CSF 200 u/mL	-	$10^{-2.12}(10^{-2.8-1.6})$	10	11
8	+	M-CSF 200 u/mL	anti-IFN- α	$10^{-1.95}(10^{-2.7-0.4})$	10	11
9	-	M-CSF 200 u/mL	-	$10^{-1.25}(10^{-1.6-0.9})$	4	4
10	-	M-CSF 200 u/mL*	-	$10^{-1.53}(10^{-2.3-0.3})$	7	10
11	+	IFN- γ 1000 u/mL*	-	$10^{-1.1}(10^{-2.1-0.2})$	7	7
12	+	IFN- α 1000 u/mL*	-	$10^{-1.2}(10^{-2.0-0.4})$	7	7
13	+	IFN- α 1000 u/mL*	anti-IFN- α	$10^{-2.58}(10^{-3.3-1.0})$	28	32

* added 3 days after inoculation 病毒接种三天后加入

表2 细胞因子对 HSV-1 接种 U₉₃₇ 细胞后病毒抗原阳性细胞百分率的影响Tab 2 Effect of cytokines on the viral antigen positivity of HSV-1 - inoculated U₉₃₇ cells

组号 No. of group	处理条件 Different treatment			病毒接种后不同时间病毒抗原阳性百分率 Percentage (%) of virus antigen positivity at different days after inoculation				
	脂多糖 Lps 20 µg/mL	细胞因子 Cytokine	细胞因子抗体 Antibody to cytokine	4 d	7 d	14 d	21 d	28 d
1	-	-	-	48	34	8	2	0
2	+	-	-	62	48	44	28	18
3	-	TNF-α 50 u/mL	-	33	10	3	0	0
4	-	TNF-α 50 u/mL	anti-IFN-α	28	15	4	0	0
5	+	TNF-α 50 u/mL	-	38	18	8	0	0
6	+	TNF-α 50 u/mL	anti-TNF-α	51	61	42	39	13
7	+	M-CSF 200 u/mL	-	29	9	9	0	0
8	+	M-CSF 200 u/mL	anti-IFN-α	38	13	6	0	0
9	-	M-CSF 200 u/mL	-	5	3	0	0	0
10	-	M-CSF 200 u/mL*	-	26	9	4	0	0
11	+	IFN-γ 1000 u/mL*	-	25	12	0	0	0
12	+	IFN-α 1000 u/mL*	-	37	13	0	0	0
13	+	IFN-α 1000 u/mL*	anti-IFN-α	59	51	36	25	15

* added 3 days after inoculation 病毒接种三天后加入

2 TNF-α、IFN-γ 和 α 对 HSV-1 感染的小鼠腹腔巨噬细胞培养中病毒的影响 见图 1、2。

讨 论

1 TNF-α 对单核巨噬细胞中 HSV-1 复制的抑制

TNF-α 对大多数感染上皮类、成纤维类细胞的病毒,包括 HSV,具有直接的抗病毒作用^[1,4]。本研究证实它也能抑制 HSV-1 对单核巨噬细胞的感染。实验结果显示,以 TNF-α 50 u/mL 持续处理经和未经 LPS 刺激的 U₉₃₇ 细胞,接种 HSV-1 后病毒滴度的下降、病毒 DNA 的清除及病毒抗原的消失均显著加快(表 1~2 中的 1、2、3、5 组),这一作用可被 TNF-α 中的单抗所阻断(表 1~2 中 6 组),表明 TNF-α 有促进 U₉₃₇ 细胞培养中 HSV-1 清除的作用,也能拮抗 LPS 对 HSV-1 增殖的促进作用。在鼠腹腔巨噬细胞培养系统中 TNF-α 也呈一定剂量依赖关系加速 HSV-1 的灭活清除(图 1)。然而, TNF-α 在 U₉₃₇ 细胞中的抗 HSV-1 作用不被 IFN-α 的中和单抗所阻断,提示这一作用不是通过诱生内源性 IFN-α 来实现的。这与国外的报道相一致^[4]。

2 M-CSF 对 HSV-1 感染 U₉₃₇ 细胞的抑制作用

Lee 等^[5]1987 年采用 1000~2000 u/mL M-CSF 可完全保护小鼠巨噬细胞免受 VSV 的攻击致病效应。姚堃等^[6]报道了 M-CSF 对 10 种(型)常见呼吸道病毒所致 CPE 的抑制作

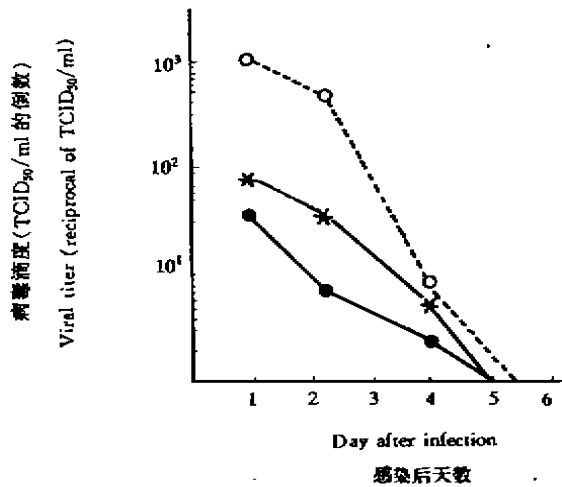


图1 rhTNF- α 加速 Balb/c 小鼠腹腔定居巨噬细胞所感染的 HSV-1 的清除。(O—O): 未经 rhTNF- α 处理的腹腔定居巨噬细胞; (*—*) 以 rhTNF- α 100 u/mL 和 (●—●) 500 u/mL 处理的腹腔定居巨噬细胞。

Fig 1 Viral clearance accelerated by rhTNF- α in HSV-1-infected, peritoneal Res M ϕ from Balb/c mice. (O—O): Peritoneal Res M ϕ without rhTNF- α treatment; (●—●): or treated with rhTNF- α 500 u/mL, or (*—*): 100 u/mL.

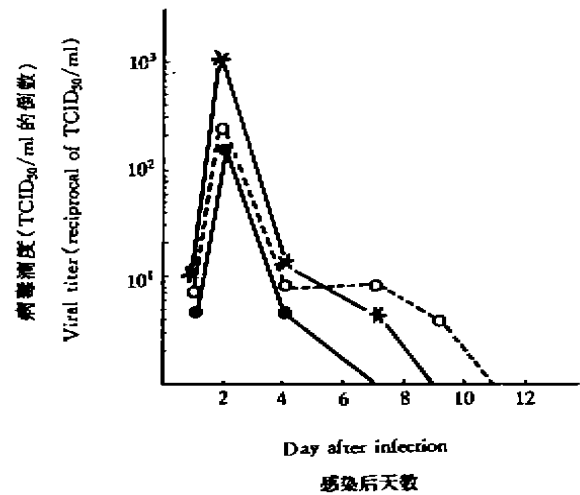


图2 rhIFN- α , rhIFN- γ (1000 u/mL) 对 Balb/c 小鼠腹腔定居的巨噬细胞清除所感染的 HSV-1 的影响。(O—O): LPS 20 μ g/mL 处理的腹腔定居巨噬细胞, 未经 IFN 处理; (*—*): 经 LPS 和 IFN- α 同时处理; (●—●): 经 LPS 和 IFN- γ 同时处理。

Fig 2 Effect of rhIFN- α or rhIFN- γ , (1000 u/mL), on the viral clearance from HSV-1-infected peritoneal Res M ϕ of Balb/c mice. (O—O): Res M ϕ treated with LPS (20 μ g/mL), but without IFN; or (*—*); simultaneously with LPS and IFN- α , or (●—●): simultaneously with LPS and IFN- γ .

用。本文证实 M-CSF 对 HSV-1 感染 U₉₃₇ 细胞具有抑制作用。本研究结果显示, U₉₃₇ 细胞如持续培养于含 200 u/mL M-CSF 的营养液中, 接种 HSV-1 后病毒滴度的下降、病毒 DNA 及抗原的消失要比未经 M-CSF 处理的对照组迅速得多(表 1~2 中 1、9 组); 即使是 HSV-1 接种 3 天后才将 M-CSF 加入营养液, 仍能抑制病毒的表达、加速病毒的清除(表 1~2 中 1、10 组); 而且 M-CSF 还能拮抗 LPS 对病毒增殖的促进作用(表 1~2 中 2、7 组)。M-CSF 的抗病毒机理尚不清楚。Lee 等^[5]认为是通过诱生内源性 IFN- α/β , 因为 IFN- α/β 的抗体可中和其抗病毒活性。但究竟是 IFN- α 还是 β 在其中起作用? 在本研究中, IFN- α 中和单抗与 M-CSF 同时处理, U₉₃₇ 细胞接种 HSV-1 后病毒滴度、病毒 DNA 清除时间及病毒抗原表达的动力学均无明显的改变(表 1~2 中 7、8 组), 提示 M-CSF 在 U₉₃₇ 细胞上的抗 HSV-1 作用似与诱生内源性 IFN- α 无关。但是否与诱生 IFN- β 有关, 抑或存在其它的抗病毒机制, 尚需进一步研究。

3 IFN 对单核巨噬细胞中 HSV-1 复制的抑制

众所周知 IFN 能抑制病毒的增殖。本研究结果显示, 无论是 LPS 刺激的 U₉₃₇ 或鼠腹腔巨噬细胞, 接种 HSV-1 3 d 后再以 IFN- α 或 γ 1000 u/mL 处理, 均能促进细胞对病毒的清除。

U₉₃₇细胞培养中病毒产量及产毒时间显著减少,病毒 DNA 清除加速,病毒抗原表达受抑(表 1~2 中 2、11、12 组),IFN- α 的这一作用可被其相应中和单抗所封闭(表 1~2 中 2、12、13 组)。鼠腹腔巨噬细胞中病毒滴度较未经 IFN 处理的对照组提前 2 d(IFN- α)~4 d(IFN- γ) 降至测不出水平(图 2)。这一结果表明,IFN 能抑制单核巨噬细胞中 HSV-1 的复制,阻止 LPS 刺激的促病毒增殖作用。一般认为,与 IFN- α 相比,IFN- γ 抗病毒作用较弱,而这一作用的种属特异性较高。本研究中 IFN- γ 对人 U₉₃₇ 细胞和小鼠腹腔巨噬细胞均有抑制 HSV-1 感染的作用。这可能是 IFN- γ 作为单核巨噬细胞激活因子增强了单核巨噬细胞灭活、清除 HSV-1 的活性。近年来,IFN- γ 的直接抗病毒作用正受到高度关注^[1]。

4 细胞因子在抗病毒领域的应用前景

细胞因子常具有多方面的生物学活性。它们的抗病毒活性日益引起人们的兴趣。近年来不仅在体内外证实了 TNF- α 、M-CSF、IFN 等细胞因子的抗病毒活性,更发现了 IFN- γ 、TNF- α 具有不依赖体内其他免疫因素(包括 CTL 细胞)的直接抗病毒活性^[1]。由于临床抗病毒化疗发展受制,细胞因子的应用为抗病毒治疗提供了新的途径。本研究结果从一个新的角度为 TNF- α 、M-CSF、IFN- γ 和 α 今后用于临床病毒感染的治疗提供了实验依据,即它们可以增强单核巨噬细胞的抗病毒活性,从而促进机体对病毒感染的清除及其自身的恢复。可以相信,不久的将来,细胞因子的应用成为抗病毒感染治疗的重要手段之一。尤其是基因重组细胞因子,因其制备简便,成本低,为将来的大规模运用提供了可能。

参 考 文 献

- 1 季晓辉. 细胞因子在抗病毒免疫中作用的研究进展. 国外医学微生物学分册, 1995, 18(1): 1
- 2 季晓辉, 姚 莹, 李焕娣等. 人单核细胞系 U₉₃₇ 和 T 细胞系 HSB₂ 细胞的 HSV-1 感染. 中国病毒学, 1995, 10(3): 209
- 3 戴华生等编著. 新实验病毒学. 第一版. 北京: 中国学术出版社, 1983. 30~35
- 4 Feduchi E, Carrasco L. Mechanism of inhibition of HSV-1 replication by tumor necrosis factor and interferon γ . Virology, 1991, 180(2): 822
- 5 Lee MT, Warren MK. CSF-1-induced resistance to viral infection in murine macrophages. J Immunol, 1987, 138(9): 3019
- 6 姚 莹, 周瑶玺, 吴筱玲等. 人集落刺激因子-1(CSF-1)对常见呼吸道病毒的抑制作用. 病毒学杂志, 1990, 5(4): 347

Effect of Cytokines on the Infection of Monocyte - Macrophages with HSV - 1

Ji Xiaohui Yao Kuen Li Huandi Zhou Yaoxi

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

In vitro human monocyte - line U₉₃₇ cells and mouse peritoneal macrophages were inoculated with HSV - 1, which were persistently treated with different cytokines since several days before or after inoculation. The effect of these cytokines on the infection of monocyte - macrophages with HSV - 1 was studied by virus titration, indirect immunofluorescent test for viral antigen and polymerase chain reaction technique for viral DNA in infected cells. The results showed that TNF - α 50 μ /mL, M - CSF 200 μ /mL, IFN - γ 1000 μ /mL and IFN - α 1000 μ /mL all enhanced the resistance of monocyte - macrophages to HSV - 1 infection, accelerated the clearance of virus DNA and inhibited the expression of viral antigen in the cells, moreover, they were antergic to the enhancement activity of LPS for the virus replication in monocyte - macrophages.

Key words Herpes Simple Virus, Monocyte - macrophage, Cytokine