

单纯疱疹病毒性脑炎模型中 Toll 样受体的表达及意义

罗涛¹, 柴娟², 经屏¹

摘要 目的:观察 Toll 样受体(TLRs)在单纯疱疹病毒性脑炎(HSE)模型中的表达及意义。方法:小胶质细胞系 BV2 细胞接种 1 型单纯疱疹病毒(HSV-1)液,制作 HSE 细胞模型,实时荧光定量聚合酶链反应检测 HSV-1 感染组与对照组 TLR2、TLR3、TLR9 mRNA 转录水平。**结果:**感染组细胞 TLR2、TLR3、TLR9 mRNA 转录水平显著高于对照组($P<0.01$)。**结论:**小胶质细胞系 BV2 细胞受 HSV-1 刺激后可引起 TLR2、TLR3、TLR9 mRNA 转录水平升高,TLR2、TLR3、TLR9 可能参与了 BV2 细胞对 HSV 的识别。

关键词 单纯疱疹病毒性脑炎;小胶质细胞;Toll 样受体

中图分类号 R741;R741.02 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2019.02.012

罗涛, 柴娟, 经屏. 单纯疱疹病毒性脑炎模型中 Toll 样受体的表达及意义[J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14 (2): 97-99.

单纯疱疹病毒性脑炎(herpes simplex virus encephalitis, HSE)是由单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)引起的脑部炎症,是非流行性脑炎中最常见的类型。HSV 是嗜神经的 DNA 病毒,分为 1、2 两个抗原亚型,近 90% 的 HSE 是由 HSV-1 引起。除病毒直接损伤神经元和胶质细胞外,病毒导致的免疫炎症反应也有关键作用。研究认为固有免疫与适应性免疫应答在机体抗病毒感染过程中发挥了重要作用^[1]。

证据表明 Toll 样受体((Toll-like receptors, TLRs)介导的免疫反应在机体抗病毒感染过程中发挥重要作用^[2]。HSV 感染过程中大量促炎细胞因子的释放是导致 HSE 脑损伤的主要原因。TLRs 可能参与或介导了小胶质细胞对 HSV-1 病毒的识别、对 HSV-1 感染的固有免疫反应和炎症反应过程。本研究将通过 HSV-1 感染小胶质细胞系 BV2 建立 HSE 的细胞模型,观察干预前后细胞 TLRsmRNA 的转录水平。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

BV2 细胞购于北京协和医院;HSV-1 病毒由武汉协和医院病毒室提供;高糖 DMEM 培养基、胎牛血清、0.25%胰酶(含 EDTA)购自 Hyclone 公司,噻唑蓝、二甲基亚砷购自美国 Sigma 公司;Total RNA 提取试剂(RNAiso Plus)、5×PrimeScript[®]RT Master Mix 逆转录试剂盒、SYBR[®]Premix Ex TaqTM II (Perfect Real Time)购于日本 TAKARA 公司。

1.2 方法

1.2.1 BV2 细胞上 HSV-1 病毒滴度测定 BV2 细胞以 1×10^4 的密度接种于 96 孔板,培养至单层生长,吸去培养液,接种连续 10 倍系列稀释的病毒维持液(5%胎牛血清 DMEM 培养基+稀释病毒),感染病毒孔加入含 100 μ L 病毒液的维持液,对照孔

加入 100 μ L 维持液,每组 5 个复孔。细胞培养箱培养。每天观察并记录出现细胞病变的孔数。细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)划分标准:25%细胞病变(+);25%~50%细胞病变(++);50%~75%细胞病变(+++);75%~100%细胞病变(++++)。当细胞病变不再发展时,采用 Reed-Muench 法计算 50%组织细胞感染量(tissue culture infective dose 50, TCID₅₀)。LgTCID₅₀=距离比例×稀释度对数之间的差+高于 50%病变率的稀释度的对数,距离比例=(高于 50%病变率的百分数-50%)/(高于 50%病变率的百分数-低于 50%病变率的百分数)。

1.2.2 分组及处理 将 BV2 细胞以 1×10^5 的密度接种于 6 孔板内,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中继续培养,细胞生长达 60%时,随机分为对照组和 HSV-1 感染组。感染组予 HSV-1 病毒液(100TCID₅₀),病毒作用 6 h 后更换培养基,各组继续培养 24 h 后观察细胞形态并收集细胞进行实验相关数据的测定。

1.2.3 各组 TLR2、TLR3、TLR9 转录水平检测

RNA 制备试剂盒提取组织总 RNA,采用 TAKARA 逆转录及实时荧光定量试剂盒检测各组 TLR2、TLR3 和 TLR9 mRNA 转录水平,以三磷酸甘油醛脱氢酶(GADPH)为内参对照。反应条件:95 $^{\circ}$ C 变性 4 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。每样本设置 3 个复孔,StepOne Software 2.1 软件(Applied Biosystems 公司)分析 PCR 过程各检测样本的 Ct(Threshold cycle)值,Ct 值代表荧光实时定量 PCR 的结果, Δ CT=CT(目的基因)-CT(内参基因), $\Delta\Delta$ CT= Δ CT(感染组)- Δ CT(对照组)。根据公式计算相对表达量= $2^{-\Delta\Delta$ CT}。采用 Primer 5.0 软件设计引物,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件处理数据。符合正态分布以及方差齐性的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用

作者单位

1. 华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院神经内科
武汉 430014

2. 华中科技大学同济医学院附属梨园医院神经内科
武汉 430077

基金项目

湖北省自然科学基金(No. 2016CFB275)

武汉市卫计委项目(No. WX16A02, WX17C08)

收稿日期

2018-08-16

通讯作者

经屏
jing51118@sina.com

独立样本均数 *t* 检验; *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HSV-1 病毒对 BV2 细胞滴度测定

HSV-1 感染 BV2 细胞后, CPE 表现为细胞折光性增强, 突起增多, 胞质内可见空泡, 细胞间距增大。本研究将对数滴度的 HSV-1 感染 BV2 后, 记录 48 h 内细胞形态学变化, TCID₅₀ = 10^{-4.8}/0.1mL, 见表 1。

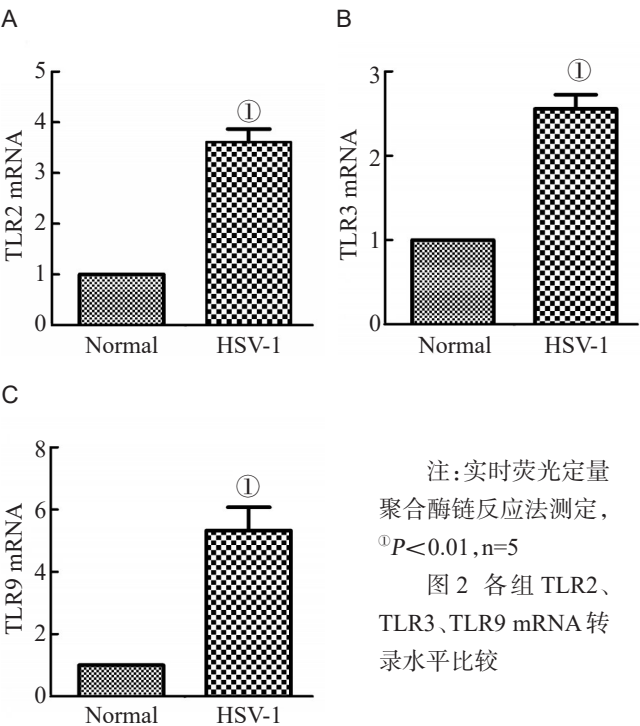
表 1 对数滴度的 HSV-1 感染 BV2 细胞 48 h 后 CPE 变化

培养孔	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
1	++++	++++	++++	+++
2	++++	++++	+++	+++
3	++++	++++	++++	++
4	++++	++++	+++	++
5	++++	++++	++++	+++

培养孔	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	0
1	++	-	-	-	-
2	++	+	-	-	-
3	+	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-
5	-	+	-	-	-

2.2 HSV-1 感染后 BV2 细胞 TLR2、TLR3、TLR9 转录水平变化

HSV-1 感染组 TLR2、TLR3、TLR9 mRNA 转录水平均明显高于对照组 (*P* < 0.01), 见图 2。



3 讨论

HSE 是临床上多发的神经系统感染性疾病, HSV-1 是引起非流行致命病毒脑炎的最常见原因^[3]。目前认为 HSE 的发生可

能与病毒复制的直接作用有关, 还与病毒感染机体后诱导机体的免疫反应有关^[4]。HSV-1 侵入中枢神经系统后小胶质细胞立即被激活, 激发机体固有免疫系统, 诱导复杂的免疫应答过程, 释放一系列炎症介质。TLRs 是一类可激活人体固有免疫应答并在感染早期发挥保护性作用的重要膜受体家族^[5], 小胶质细胞自身有多种 TLRs 位于细胞膜或胞浆内。病毒的核酸或包膜, 作为一种病原体相关分子模式, 可以被 TLRs 识别结合, 启动机体的先天免疫反应和炎症反应^[6]。迄今为止, 已发现 11 种人类 TLRs 和 13 种小鼠 TLRs。TLRs 主要特征为胞外区有富含亮氨酸的重复序列 (leucine rich repeat, LRR) 以及胞内区有与白介素 -I 型受体同源的 Toll/白介素 -1 受体 (Toll/interleukin-1 receptor, TIR) 结构域。LRR 与识别病原体特异结构有关, TIR 是 TLRs 下游信号转导的重要原件。一旦它们与 HSV-1 蛋白或病毒核酸这样的病原体结合, 机体的先天免疫反应被激活, 核因子 Kappa B (nuclear factor-kappa B, NF-κB)、c-Jun 氨基端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 和 p38 蛋白激酶相继被激活, 从而引起趋化因子、促炎细胞因子的产生^[8]。

研究表明, 有多种 TLRs 参与中枢神经系统感染引起的免疫反应。肺炎链球菌脑膜炎中发现 TLR2、TLR4 和 TLR9 mRNA 转录水平增加, 大肠埃希菌脑膜炎中 TLR2、TLR4 和 TLR7 mRNA 转录水平增加^[8]。人类 TLR3、TLR4、TLR7、TLR8 和 TLR9 及鼠 TLR3、TLR4、TLR7 和 TLR9 能触发 I 型干扰素的合成和释放, 在抗病毒免疫中起关键作用^[9]。还有研究发现干扰素-α/β 受体缺陷时, 感染 HSV-2 的缺陷小鼠较野生鼠生殖道病毒复制和疾病进展显著加快, 当给予 TLR3、TLR7 和 TLR9 的激活剂 (合成的双链 RNA, 咪喹莫特和寡核苷酸) 后, 缺陷小鼠的病毒复制, 疾病进展和死亡率无明显改善, 而感染 HSV-2 的野生鼠却有明显改善, 结果表明对抗 HSV 的干扰素的产生是由 TLR3、TLR7 和 TLR9 介导的^[10]。

本研究发现在 HSV-1 感染小胶质细胞后, 感染组 TLR2、TLR3 及 TLR9 mRNA 转录水平较对照组明显增加, 说明 TLR2、TLR3 和 TLR9 可能参与了小胶质细胞对 HSV-1 病毒的识别。研究结果表明 Toll 样受体参与了 HSE 的发病, 尤其是 TLR2、TLR3 和 TLR9 介导了机体对 HSV-1 感染的先天免疫反应和炎症反应过程。小胶质细胞受 HSV-1 病毒感染后, 可能通过 TLR2、TLR3 和 TLR9 激活先天免疫反应, 释放一些细胞因子参与病毒感染后的病理生理过程。但 TLRs 在病毒感染后所起的作用仍有争议, 有报道 TLR2 激活后产生的过度炎症反应对 HSE 是有害的^[4], 另有报道 TLR2 可协同 TLR9 对 HSE 产生保护作用^[11,12]。因此, TLRs 在 HSE 发病过程中作用和机制仍需进一步研究。

参考文献

[1] Piret J, Boivin G. Innate immune response during herpes simplex virus encephalitis and development of immunomodulatory strategies[J]. Rev Med Virol, 2015, 25: 300-319.
[2] Ma Y, He B. Recognition of herpes simplex viruses: toll-like receptors and beyond[J]. J Mol Biol, 2014, 426: 1133-1147.
[3] Whitley RJ, Kimberlin DW. Herpes simplex: encephalitis children and

adolescents[J]. *Semin Pediatr Infect Dis*, 2005, 16: 17-23.

[4] Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, et al. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 1315-1320.

[5] 张苗燕, 殷小平. 一氧化氮对TLR4/NF- κ B信号通路影响的研究进展[J]. *神经损伤与功能重建*, 2017, 12: 48-51.

[6] Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system[J]. *Science*, 2002, 296: 298-300.

[7] Moresco EMY, LaVine D, Beutler B. Toll-like receptors[J]. *Curr Biol*, 2011, 21: R488-R493.

[8] Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity[J]. *Int Immunol*, 2005, 17: 1-14.

[9] Zhang SY, Jouanguy E, Sancho-Shimizu V, et al. Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses[J]. *Immunol Rev*, 2007, 220: 225-236.

[10] Svensson A, Bellner L, Magnusson M, et al. Role of IFN- α/β signaling in the prevention of genital herpes virus type 2 infection[J]. *J Reprod Immunol*, 2007, 74: 114-123.

[11] Sørensen LN, Reinert LS, Malmgaard L, et al. TLR2 and TLR9 synergistically control herpes simplex virus infection in the brain[J]. *J Immunol*, 2008, 181: 8604-8612.

[12] Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family[J]. *Immunol Lett*, 2003, 85: 85-95.

(本文编辑:唐颖馨)

(上接第93页)

central compensation after vestibular neuritis[J]. *Ann Neurol*, 2010, 68: 241-249.

[25] Lacour M, Helmchen C, Vidal PP. Vestibular compensation: the neuro-otologist's best friend[J]. *J Neurol*, 2016, 263 Suppl 1: S54-64.

[26] Suh MW, Lee HJ, Kim JS, et al. Speech experience shapes the speechreading network and subsequent deafness facilitates it[J]. *Brain*, 2009, 132: 2761-2771.

[27] Eysel-Gosepath K, McCrum C, Epro G, et al. Visual and proprioceptive contributions to postural control of upright stance in unilateral vestibulopathy[J]. *Somatosens Mot Res*, 2016, 33: 72-78.

[28] Helmchen C, Klinkenstein JC, Krüger A, et al. Structural brain changes following peripheral vestibulo-cochlear lesion may indicate multisensory compensation[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2011, 82: 309-316.

[29] Hong SK, Kim JH, Kim HJ, et al. Changes in the gray matter volume during compensation after vestibular neuritis: a longitudinal VBM study[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2014, 32: 663-673.

[30] Manzari L, Burgess AM, MacDougall HG, et al. Vestibular function after vestibular neuritis[J]. *Int J Audiol*, 2013, 52: 713-718.

[31] Lacour M. Betahistine treatment in managing vertigo and improving vestibular compensation: clarification[J]. *J Vestib Res*, 2013, 23: 139-151.

[32] Tighilet B, Mourre C, Trottier S, et al. Histaminergic ligands improve vestibular compensation in the cat: behavioural, neurochemical and molecular evidence[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 568: 149-163.

[33] McDonnell MN, Hillier SL. Vestibular rehabilitation for unilateral peripheral vestibular dysfunction[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015, 1: CD005397.

[34] Hillier SL, McDonnell M. Vestibular rehabilitation for unilateral peripheral vestibular dysfunction[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011, 2: CD005397.

[35] Brodovsky JR, Vnenchak MJ. Vestibular rehabilitation for unilateral peripheral vestibular dysfunction[J]. *Phys Ther*, 2013, 93: 293-298.

(本文编辑:唐颖馨)