DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.21.023
第26卷第21期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 21
1940 2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)21-1940-04

# 登革病毒特异性T细胞在DHF/DSS发病中作用的研究

万颖杰,张俊磊,王嘉丽,安 静 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038)

提 要:目的 研究登革病毒特异性T细胞在登革病毒致病中的作用。方法 首先把培养的HepG2移植到严重联合免疫功能不全(SCID)小鼠体内,建立HepG2-grafted SCID(HepG2-SCID),然后将该小鼠分为3组:①A组:登革病毒特异性T细胞(2D42)接种后次日,腹腔内接种$10^6$pfu的Ⅱ型登革病毒(DEN2);②B组:正常小鼠胸腺细胞(NMT)接种后次日,腹腔内接种DEN2;③C组:腹腔内接种DEN2。观察感染后各组动物的死亡率、病毒血症及主要脏器的病理变化。结果 接种2D42细胞+感染的小鼠,80%出现明显的临床表现,并在感染后12.8 d死亡,剩余的20%小鼠有一过性的临床表现,然后从疾病中恢复,并存活在3个月以上。而接种NMT+感染或单纯感染的小鼠,死亡率均为100%。A组和B组小鼠血清中的病毒滴度和主要脏器的病理变化发生率明显高于C组。结论 DEN-T细胞有保护机体免受病毒侵害和加重病情进展的双重作用,而NMT细胞只有加重病情的单一作用。

关键词:登革病毒;登革病毒特异性T细胞;SCID小鼠
中图法分类号:R373.33;R392.11;R512.8 文献标识码:A

# Dengue virus specific T cells are involved in the pathogenesis of dengue virus infection

WAN Ying-jie, ZHANG Jun-lei, WANG Jia-li, AN Jing (Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: **Objective** To study the roles of dengue (DEN) virus specific T cells in the pathogenesis of DEN virus infection. **Methods** 2D42 cells, DEN virus specific $CD8^+$ cell clones, were employed to investigate their *in vivo* function in DEN virus infection using an animal model. HepG2 was implanted into mice with severe combined immunodeficiency disease (HepG2-SCID) for the establishment of HepG2-SCID model. The animals were divided into 3 groups: Group A: HepG2-SCID mice were inoculated with 2D42 cells and then infected with DEN virus type 2 (DEN2) intraperitoneally; Group B: HepG2-SCID mice were inoculated with normal mouse thymuscytes (NMT) and then intraperitoneally infected with DEN2; Group C: HepG2-SCID mice were intraperitoneally infected with DEN2 alone. The mortality, viremia, and frequency of histopathological changes in the major organs of mice in the three groups were observed after infection. **Results** After inoculation of 2D42 cells, 80% infected mice showed severe clinical signs and died at the average 12.8 d after infection. The others only had transient manifestations, and then recovered from the disease and survived for more than 3 months. In contrast, after inoculation of NMT and/or DEN2 alone, 100% mortality rate was noted in these two groups. High viremia and frequency of histopathological changes in the major organs were observed in the mice in groups A and B. **Conclusion** Our data support both protective and pathogenic roles for DEN-specific $CD8^+$ T cells in DEN virus infection.

**Key words**: dengue virus; dengue specific T cell; SCID mice

登革病毒(DEN)是登革热(dengue fever, DF)和登革出血热/登革休克综合征(dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome, DHF/DSS)的病原体,它有4个血清型即DEN-1, 2, 3, 4。DF和DHF/DSS在病毒感染初期症状相似,均表现为发热、皮疹、关节痛等,但在退热后DF病人病情好转,不留后遗症,而DHF/DSS病人病情急转直下,表现为血管通透性增高,有效循环血容量减少,甚至休克,病死率可达5%。近年来虽然DHF/DSS发病率有明显增加之趋势,但其确切的发病机制尚未阐明。临床研究表明,DHF病人血中TNF、IL-2、INF等细胞因子的水平和$CD4^+$和$CD8^+$细胞活性明显高于DF病人,而且可溶性$CD4^+$和$CD8^+$受体水

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170848, 30300303)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170848, 30300303)
作者简介:万颖杰(1965-),女,重庆市人,实验师,主要从事登革病毒致病机制方面的研究。电话:(023)68752239
通信作者:安 静,电话:(023)68752239, E-mail: anjing60@yahoo.com.cn
收稿日期:2004-02-24;修回日期:2004-05-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

平也相应增加, 这表明登革特异性 T 细胞(DEN-T)可能在 DHF/DSS 的发生中起重要作用[1]。

$CD8^+$ T 细胞是抗病毒感染中主要的 T 细胞监视系统。实验研究表明: 小鼠登革病毒特异性 $CD4^+$、$CD8^+$淋巴细胞(DEN-T)反应规律与人类的十分相似, 因而, 通过分析小鼠 DEN-T 细胞在 DHF/DSS 发生中的作用, 可以了解人类 DEN 感染症的发生机制。已知 HepG2 细胞是肝癌细胞株, 并对 DEN 易感, 我们将 HepG2 移植到 SCID 小鼠, 建立的 HepG2 grafted severe combined immunodeficient (HepG2-grafted SCID)小鼠 DEN 病毒感染模型[2], 为此, 本研究利用该模型, 观察了 DEN-$CD8^+$ T 细胞在 DEN 病毒致病过程中的作用。

## 1　材料与方法

### 1.1　动物

14 周龄雌性 SCID 小鼠(C. B.-17/Icr Tac-scid), 购自日本东京 Clea Co, 无菌条件下饲养。用于分离正常胸腺细胞(Normal mouse thymuscytes, NMT)的 C. B.+17/Icr Tac 小鼠, 为 4 周龄、雌性(日本东京 Clea Co)。

### 1.2　细胞

DEN-T 细胞株(2D42): 从 BALB/c(H2d)小鼠脾脏分离、克隆而得(由美国 University of Massachusetts Medical Center 的 Rothman 博士惠赠)[3], 为 $CD8^+$ 表型, 有杀伤活性, 识别 Den-2 非结构蛋白 NS3 的第 296 至 310 位氨基酸残基。2D42 细胞于 RPMI1640 培养基(含 10%小牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、10 mmol/L Hepes、50 μmol/L 巯基乙醇、10% IL-2 和抗生素)、5% $CO_2$ 培养箱、37 ℃ 条件下培养, 每周更换培养液 2 次。

### 1.3　正常小鼠胸腺细胞的分离

无菌操作取出小鼠胸腺, 剪碎后收集于注射器内, 然后推出, 针头由粗到细(G 18~24), 反复数次后便可得到胸腺细胞的单细胞悬液。

### 1.4　病毒材料

从登革热病人血清分离的Ⅱ型登革病毒(DEN2, Tr1751)由大谷博士(National Institute of Infectious Diseases, Japan)赠送。在蚊虫细胞系(C6/36)中增殖, −80 ℃ 贮存。

### 1.5　实验设计

HepG2-grafted SCID 小鼠模型的建立: HepG2 细胞于 DMEM 培养液(含 10%小牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺和抗生素)、37 ℃ 条件下培养至单层, 制成单细胞悬液。以每只小鼠 $1\times10^7$ 个细胞注射至脾脏。通过测定小鼠血清中人白蛋白水平, 确认移植是否成功。

移植后 5~6 周, HepG2-SCID 小鼠分为 3 大组(表 1), 实施下列实验: A 组: 35 只小鼠, 按每只小鼠 $1\times10^7$ 个细胞数, 腹腔中接种 2D42 细胞; 次日腹腔内接种 DEN2($10^6$ pfu/ml)病毒感染小鼠。其中, 15 只小鼠用于观察发病率和死亡率(A1 组); 20 只用于检测血清病毒滴度和观察病理组织学变化(A2 组)。B 组: 32 只小鼠, 按每只小鼠 $1\times10^7$ 个细胞数, 腹腔内接种 NMT; 次日腹腔内接种 DEN2($10^6$ pfu/ml)感染小鼠。其中, 12 只小鼠用于观察发病率和死亡率(B1 组); 20 只用于检测血清病毒滴度和观察病理组织学变化(B2 组)。C 组: 30 只小鼠, 腹腔内接种 DEN2($10^6$ pfu/ml)感染小鼠(不接种 T 细胞)。同样分 C1 组(10 只小鼠)和 C2 组(20 只小鼠), 用于与上述相同的实验目的。

表 1　实验设计

Tab 1　Scheme of experiment

| Group | n | Characteristics | Purpose of experiment |
|---|---|---|---|
| A1 | 15 | 2D42 cells inoculation+DEN-2 | Mortality observation |
| A2 | 20 | 2D42 cells inoculation+DEN-2 | Taking samples of blood and organs |
| B1 | 12 | NMT inoculation+DEN-2 | Mortality observation |
| B2 | 20 | NMT inoculation+DEN-2 | Taking samples of blood and organs |
| C1 | 10 | DEN-2 | Mortality observation |
| C2 | 20 | DEN-2 | Taking samples of blood and organs |

### 1.6　临床指标的检测

各组动物均于感染后每日观察发病情况。并分别于感染后 3, 5, 8 d 及麻痹发生或临近死亡时(day of paralysis onset, DP), 在乙醚麻醉下, 从心脏和/或臂丛血管采取血液样本, 同时取脑、肝、脾、肺和小肠样本。血液样本用于病毒滴定的检测(蚀斑法)。脏器标本用于病理检查的组织标本, 首先用 4%甲醛固定, 然后按标本制作常规处理标本, 进行 HE 染色, 光学显微镜观察。

## 2　结果

### 2.1　临床表现

如表 2 所示, 感染早期, 3 组小鼠均出现皮毛不整和脊柱后侧凸等临床症状; 感染后期, 部分小鼠有后肢或前肢麻痹及少量腹水。在 A1 组的 15 只小鼠中, 80%小鼠在感染后第 12.8 天死亡(11~14 d), 且较少出现麻痹, 其余小鼠(20%)出现临床症状后, 逐渐从疾病中恢复, 并存活 3 个月以上。B1 组小鼠临床症状出现较早, 并且 100%小鼠在感染后 9.2 d 死亡(8~11 d), 明显早于 A1 组; C1 组小鼠病情进展缓慢, 感染后期 100%出现后肢麻痹, 在感染后 17.4 d(14~19 d)死亡, 较 A1 组和 B1 组明显为迟。

表 2　生存率与死亡率

Tab 2　Survival rate and mortality rate

| Group | n | No. of death(%) | No. of survival (%) | Death time (d) |
|---|---|---|---|---|
| A1 | 15 | 12 (80) | 3 (20) | 12.8 |
| B1 | 12 | 12 (100) | 0 | 9.2 |
| C1 | 10 | 10 (100) | 0 | 17.4 |

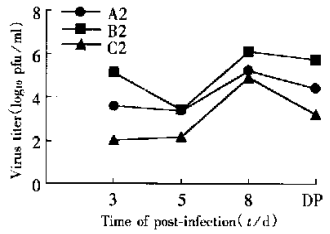
Mouse was ip-inoculated with $10^6$ pfu of DEN-2/mouse

### 2.2　感染后病毒血症的实时变化

各组小鼠血清中 DEN 病毒滴度的变化趋势基本一致(图 1), 在 A2 组, 从感染后 3 d 开始, 83%小鼠检测出病毒血症, 其病毒滴度大约是 $10^{3.6}$ pfu/ml, 在感染后第 5 天和第 8 天, 100%小鼠检测出病毒血症, 病毒滴度分别为 $10^{3.8}$ ~ $10^{5.2}$ pfu/ml。然而, 在 B2 和 C2 小鼠出现肢体麻痹时, A2 组小鼠仅有 67%小鼠检测出病毒血症, 病毒滴度为 $10^{3.2}$ pfu/ml, 在而剩余的 33%小鼠血清中未检测到病毒。在 B2 和 C2 组小鼠, 感染后 3 d, 病毒

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的检出率分别是60%和40%，感染后5 d，B2组为100%，C2组为60%，从感染后第8天到死亡，两组小鼠病毒血症的检出率均为100%，但B2组小鼠血清病毒滴度明显高于C2组，略高于A2组。




DP：Day of paralysis onset

图1 各组小鼠血清中登革病毒滴度的变化

**Fig 1 Viremia in the mice in each group**

## 2.3 感染后病理组织学变化

3组小鼠病理组织学变化如图2所示：在A2组，肝脏组织切片来自20只小鼠，60%的小鼠出现病理组织学改变包括淤血、出血、肝细胞凋亡、水肿和不同程度的脂肪样变。感染后期在部分小鼠可见肝细胞点状坏死。脑组织切片是由19只小鼠制成，可见不同程度的淤血、点状出血和水肿。在19只小鼠的肺组织切片中，均可见炎性改变和弥散性出血，肺毛细血管不同程度充血。小肠和胃切片来自20只小鼠，30%的小鼠小肠淤血、出血和粘膜坏死；15%的小鼠有胃粘膜点状出血。B2组小鼠各脏器的组织标本来自18～20只小鼠，其病理组织学变化和发生率与A2组相似。

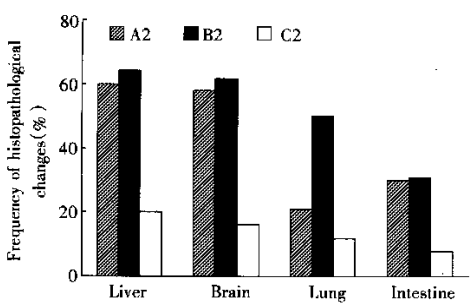



图2 感染后3组小鼠主要脏器病理变化发生率比较

**Fig 2 Frequency of histopathological changes in several organs of mice after infection in each group**

在C2(单纯DEN2感染)组的20只小鼠中，可见相似的病理组织学改变。然而，在几种组织中病理组织学改变的发生率明显低于A2和B2组。

## 3 讨论

DHF/DSS的发病机制尚不完全清楚。以往的研究大都集中在抗体增强作用现象和病毒毒力方面。然而，最近的几项研究表明[4,1]：$CD8^+$ T细胞可能在DEN的致病过程中，特别是在DHF/DSS的发生中起重要作用。由于DEN2的NS3蛋白是DEN和其它黄病毒属的大多数病毒的主要抗原，而2D42T细胞是$CD8^+$表型，并识别DEN2的NS3蛋白的氨基酸序列第296至310位抗原决定簇[5～7]，所以该实验选用2D42T细胞作为DEN-T细胞的代表，观察其在DHF/DSS发病中的作用。

本研究的结果表明：接种2D42T细胞后，A1组15只小鼠显示出完全不同的疾病转归，80%的小鼠表现出严重的临床症状，并在感染后平均12.8 d死亡，比C1组小鼠死亡时间为早，而剩余的20%小鼠在出现临床症状后，从疾病中恢复并存活3个月以上。与A2组相比，B2组出现病症的时间和死亡时间均较早，而且无一小鼠因接种胸腺细胞而受到保护，免于死亡。C2组小鼠疾病进展相对缓慢，出现病症的时间和死亡时间均较A2和B2组为晚，但同B2组一样，死亡率也为100%。感染后各组小鼠的病毒血症及主要脏器病理变化也明显不同，在A2组和B2组小鼠血清中病毒滴度高于C2组小鼠，并且大多数小鼠的主要脏器如肝脏、肺脏有明显的出血、水肿及肝细胞坏死等病理变化，但A2组的小部分小鼠却在感染后期恢复了正常，而B2组100%小鼠却无一在感染后期恢复。与A2和B2组比较，C2组小鼠主要脏器病理改变的发生率明显低于A2和B2组。根据上述结果该研究认为在DHF/DSS的发病中，登革特异性T细胞具有保护和加重病情的双重作用，而正常小鼠的胸腺细胞只有加重病情的单一作用。

登革特异性$CD8^+$ T细胞保护作用的机制是比较容易理解的，因为这些细胞可以通过杀伤感染细胞和分泌抗病毒的细胞因子如INF等，清除病毒的感染。但该细胞促进疾病发展的机制尚不十分清楚。以往我们对登革病毒在神经系统的传播机制和对神经元的损伤特点进行了研究[7～9]，发现接种T细胞后，神经系统的损伤更加明显，我们认为可能是2D42T细胞或NMT在清除组织细胞中感染的DEN病毒的同时，造成了组织损害，如何控制机体的免疫反应在恰到好处的水平，保护机体组织免受损害，是今后的研究课题[10]。

## 参考文献：

[1] Kurane I, Innis B L, Nimmannitya S, *et al*. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue[J]. J Clin Invest, 1991, 88(5): 1473－1480.

[2] An J, Kimura-Kuroda J, Hirabayashi Y, *et al*. Development of a novel mouse model for dengue virus infection[J]. Virology, 1999, 263(1): 70

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

－77.
[3] Rothman A L, Kurane I, Ennis F A. Multiple specificities in the murine $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell response to dengue virus[J]. J Virol, 1996, 70(10): 6540－6546.
[4] Gagnon S J, Ennis F A, Rothman A L. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human $CD4^+$ cytotoxic T-lymphocyte clones[J]. J Virol, 1999, 73(5): 3623－3629.
[5] Kurane I, Okamoto Y, Dai L C, *et al*. Flavivirus-cross-reative, HLA-DR15-restricted epitope on NS3 recognized by human $CD4^+CD8^-$ cytotoxic T lymphocyte clones[J]. J Gen Virol, 1995, 76(Pt 9): 2243－2249.
[6] Spaulding A G, Kurane I, Ennis F A *et al*. Analysis of murine $CD8^+$ T-cell clones specific for the dengue virus NS3 protein: flavivirus cross-reactivity and influence of infecting serotype[J]. J Virol, 1999, 73(1): 398－403.
[7] 周德山, 安 静, 王嘉丽. 登革病毒在中枢神经系统传播机制的研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(4): 396－400.
[8] 安 静, 周德山, 张俊磊. 经脑感染后登革病毒在小鼠脊髓分布特点的研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(4): 401－403.
[9] An J, Zhou D S, Kawasaki K, *et al*. The pathogenesis of spinal cord involvement in dengue virus infection[J]. Virchows Arch, 2003, 442(5): 472－481.
[10] Rothman A L, Ennis F A. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever[J]. Virology, 1999, 257(1): 1－6.

（编辑 陈聪连）

文章编号: 1000-5404(2004)21-1943-01

# 个案与短篇

# 卵巢巨大畸胎瘤合并足月妊娠 1 例

# A case report of giant ovarian teratoma concomitant with term pregnancy

王 琳, 常 青, 江 露 （第三军医大学西南医院妇产科, 重庆 400038）

## 1 临床资料

患者, 女, 32 岁, 因孕 39 周, 腹腔巨大肿瘤, 呼吸困难不能平卧 20 d, 于 2004-02-11 日入院。3 月前曾在当地医院 B 超检查, 提示右卵巢肿瘤。入院查体: 腹部高度膨隆, 患者只能半卧位, 子宫高 37 cm, 腹围 115 cm, 胎心 142 次/ min。中上腹部扪及一巨大包块。B 超示: 胎头双顶径 8.7 cm, 胎盘Ⅱ极。中上腹部探及一巨大囊性占位, 35 cm× 30 cm× 34 cm, 囊内见菜花状实性回声, 9.7 cm× 3.6 cm, 囊液内见细点状回声。入院初步诊断: ① 孕 39 周, 孕 5 产 1, 胎儿宫内发育受限。② 右卵巢巨大肿瘤。

## 2 结果

虽然考虑胎儿宫内发育受限, 新生儿出生体重可能较低, 但孕妇因妊娠足月子宫及腹腔肿瘤巨大, 隔肌上抬致呼吸困难, 不能平卧, 于入院 3 d 后行剖宫产术, 术中顺利娩出一女活婴, 体质量 1 755 g, 身长 45 cm, 立即评 9 分, 因呼吸急促, 呻吟, 足月低体重儿转儿科治疗。缝合子宫切口后探查腹腔: 中上腹发现一巨大囊肿, 最大直径 35 cm, 囊肿上端达剑突下, 囊肿包膜光滑完整, 表面血管丰富, 腹腔其它脏器未见转移灶。吸出咖啡色囊液 7 000 ml, 行右附件切除术。剖视囊肿, 见囊壁多个菜花状赘生物, 见皮脂及少量毛发。术中冰冻病理检查: 右卵巢成熟性畸胎瘤伴坏死。石蜡切片病理报告: 右卵巢成熟囊性畸胎瘤伴成熟脑组织。

## 3 讨论

畸胎瘤是包含至少 2 个胚层的胚胎性肿瘤, 80%为良性。卵巢畸胎瘤好发于生育期妇女, 妊娠期发生率为 0.15%, 肿瘤直径多< 10 cm[1]。B 超诊断准确率可达 97.5% ~ 98.7%, 并发症包括肿瘤扭转、破裂、恶变等。若肿瘤直径< 6 cm, 无并发症发生, 可保守治疗, 待足月分娩后再手术。妊娠期由于子宫增大, 可能使并发症的发生率增加。此外, 若肿瘤阻塞产道, 可使分娩受阻。文献[2]报道 1 例卵巢畸胎瘤嵌入后穹隆, 致产程活跃期停滞。若肿瘤巨大, 易发生扭转及破裂[3]。中孕期合并卵巢畸胎瘤, 若肿瘤直径> 6 cm 以手术切除为宜。因少部分肿瘤为未成熟畸胎瘤, 而术前无法确定, 如盲目等待至足月分娩可能延误手术时机。本例入院前 3 个月在当地 B 超检查就已发现卵巢肿瘤, 未及时手术, 肿瘤生长迅速, 妊娠足月时肿瘤囊液已达 7 000 ml, 质量 7 kg, 实属少见。肿瘤压迫子宫, 导致胎儿宫内发育受限, 新生儿体质量仅 1 755 g, 若中孕期手术, 则不致于影响胎儿发育。

关键词: 畸胎瘤; 卵巢肿瘤
中图法分类号: R737.31 文献标识码: B

## 参考文献:

[1] Sherard G, Hodson C, Williams H, *et al*. Adnexal masses and pregnancy: a 12-year experience[J]. Am J Obstet Gynecol, 2003, 189(2): 358－362.
[2] 熊良优, 陈朝红. 足月妊娠合并卵巢畸胎瘤嵌入后穹隆 1 例[J]. 中国临床医生, 2004, 32(1): 60－61.
[3] 王文玲, 张 颖, 秘亚萍, 等. 腹腔巨大畸胎瘤合并 1 例[J]. 武警医学院学报, 2000, 9(3): 207.

（编辑 陈聪连）

作者简介: 王 琳(1964－), 女, 四川省巴中市人, 博士, 副教授, 主要从事子宫内膜异位方面的研究, 发表论文 27 篇。电话: (023)68765399

收稿日期: 2004-07-13; 修回日期: 2004-09-13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net