

单纯疱疹病毒性角膜炎的发病机制

邹文进¹, 刘祖国²

基金项目:国家自然科学基金(No. 81160119); 广西自然科学基金(No. 2012GXNSFAA053107); 广西高等学校立项科研项目(No. 201204LX064)

作者单位:¹(530021) 中国广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院眼科;²(361005) 中国福建省厦门市, 厦门大学医学院眼科研究所

作者简介:邹文进, 毕业于中山大学, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼表疾病。

通讯作者:邹文进. bigstone168@163.com

收稿日期:2013-03-07 **修回日期:**2013-05-27

Pathogenesis of herpes simplex keratitis

Wen-Jin Zou¹, Zu-Guo Liu²

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81160119); Guangxi Natural Science Foundation, China (No. 2012GXNSFAA053107); Guangxi College Scientific Research Project of China (No. 201204LX064)

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Eye Institute of Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China

Correspondence to: Wen-Jun Zou. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. bigstone168@163.com

Received:2013-03-07 **Accepted:**2013-05-27

Abstract

• Herpes simplex keratitis (HSK) is one of the most common ocular diseases, which is caused by Herpes simplex virus. More than 90% individuals have been infected with herpes simplex virus (HSV) in his lifetime. HSV establishes both neuronal latency and corneal latency. Stressful stimuli such as UV radiation, fever, stress, hypothermia, hyperthermia and surgical manipulation of the trigeminal ganglia can cause reactivation. The corneal lesions after HSV infection is mainly the result of the immunoreaction in which CD4⁺ cells appeared to be mediating the pathology, with CD8⁺ cells seemingly playing a protective role.

• **KEYWORDS:** herpes simplex virus; keratitis; latency; reactivation; immunopathogenesis

Citation: Zou WJ, Liu ZG. Pathogenesis of herpes simplex keratitis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(6):1131-1133

摘要

单纯疱疹病毒性角膜炎(herpes simplex keratitis, HSK)是一种常见的眼部疾病,由单纯疱疹病毒(herpes simplex

virus, HSV)感染引起。人群中超过 90% 的人曾经感染过 HSV。HSV 可以在神经组织及角膜组织长期潜伏。在适宜的刺激下,如紫外线照射、发热、精神压力、高温、低温、手术等,病毒活化增殖导致 HSK。HSV 感染引起的免疫反应是造成角膜组织损害的主要机制。HSK 的免疫反应主要是由 CD4⁺ 细胞介导的,而 CD8⁺ 细胞对病毒感染具有保护作用。

关键词:角膜炎;疱疹性;潜伏;复发;免疫发病机制

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.06.18

引用:邹文进,刘祖国.单纯疱疹病毒性角膜炎的发病机制.国际眼科杂志 2013;13(6):1131-1133

0 引言

单纯疱疹病毒性角膜炎(herpes simplex keratitis, HSK)是一种常见的眼部疾病,由单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)感染引起。人群中感染 HSV 的基数非常大。据国外资料,大部分人在儿童时期已经感染 HSV,到 60 岁时,有超过 90% 的人感染了 HSV 并且潜伏起来^[1],但是仅有少部分人会因 HSV 活化增殖导致 HSK^[1-3]。HSV 感染眼部的特点是原发感染后病毒潜伏于三叉神经节或角膜,终生保持复发致角膜病变反复发作的能力^[4],最终因角膜溶解或瘢痕化导致失明^[1,5]。现在 HSK 已经成为发达国家导致角膜盲的一个主要原因^[1,3,6,7]。了解 HSV 潜伏感染及发病机制,对防治 HSK 具有重要的意义。

1 HSV 的特点及其复制过程

HSV 分为两型,即 HSV-1 和 HSV-2。两型疱疹病毒均属于 Alpha 型单纯疱疹病毒家族。两型病毒各有不同的宿主细胞,但是均具有快速的增殖周期,并能够在神经元中建立潜伏感染^[8]。

HSV 属于 DNA 病毒。HSV 病毒的核衣壳为 20 面体结构,内有线性双链 DNA 结构。核衣壳外有包膜,病毒的糖蛋白突起于包膜的表面。包膜与核衣壳之间的无定形物质为病毒的结构蛋白与调节蛋白^[8]。

HSV 的复制是病毒基因严格调控的结果。HSV 的基因组按功能分为极早期基因、早期基因和晚期基因。极早期基因编码病毒基因表达的调节蛋白。早期基因编码与病毒复制有关的功能蛋白。晚期基因编码病毒的结构蛋白。病毒的复制首先是极早期基因的表达,继而引起早期基因和晚期基因的表达,如此循环往复,病毒源源不断地进行 DNA 复制、蛋白质合成,最后组装成病毒颗粒释放,细胞崩解。HSV 一旦感染细胞即启动基因表达的级联反应,它需要经过一系列的事件启动极早期基因的表达。首先,在核内病毒的结构蛋白 VP-16 与宿主细胞的两个蛋白:Oct-1 (octamer binding protein-1)、HCF (host cell factor) 形成三联体,然后再结合到病毒 DNA 的 TAATGARAT 基序上,TAATGARAT 基序位于极早期基因 ICP (infected cell protein) 4、ICP0、ICP22、ICP27 及 ICP47

的启动子上。然后启动表达相应蛋白,调节病毒基因的表达,其中 ICP0 是一个主要的调节蛋白^[1,9]。

2 HSV 的潜伏感染和复发

人是 HSV 在自然界的唯一宿主。HSV 感染人体的完整周期包括四个时相。首先,在原发感染时病毒进入宿主体内,在原发病灶复制,如眼睛、皮肤等。接着,病毒进入神经末梢并通过轴浆运输逆行到达神经元胞体。在神经元胞体内病毒的复制受到抑制,病毒建立潜伏感染,此时检测不到病毒复制。当人体处于应激状态、月经期或紫外线照射,病毒的抑制状态被打破,病毒在神经元胞体内复制,并顺着轴浆流到达神经支配区域,在原发病灶或其附近导致病损^[8,10]。

HSV 可以感染多种类型的人体细胞,但是神经细胞是 HSV 建立潜伏感染的细胞之一。研究表明 90% 的人体可在三叉神经节找到 HSV-1 的 DNA^[11]。HSV 在神经细胞既可以引起急性感染又可以建立潜伏感染。病毒感染的早期即发现一部分神经细胞感染病毒后病毒继续复制导致急性感染,而另一部分神经细胞感染病毒后病毒潜伏下来^[12]。HSV 潜伏感染的建立需要在病毒复制的早期立即进行阻断。HSV 潜伏感染是极早期基因不能成功启动表达的结果。VP16 是启动病毒复制的一个主要因素。此外还需要两个宿主因素 Oct-1 和 HCF 一起结合形成三联体才能启动极早期基因的表达。因此,影响上述因素均可促进病毒的潜伏感染。目前尚未清楚为何 HSV 仅在神经细胞潜伏。VP16 是病毒核衣壳与包膜之间的结构蛋白,有人推测在 HSV 核衣壳沿神经纤维逆轴浆流转运至细胞核时,没有足够的 VP16 进入细胞核,因而无法启动极早期基因的表达^[13]。此外,Oct 家族的其它成员可以竞争性抑制 Oct-1 的作用。证据来源于共转染表达 Oct-2 的质粒导致剂量依赖性的 VP16 活性下降,而且可以证实 Oct-2 特异性地结合于极早期基因的启动子。这些发现与其它观察结果有较好的一致性,即神经生长因子,至少在体外证实,是 HSV 建立和维持潜伏感染所必需,而且神经生长因子可以强烈地诱导 Oct-2 mRNA 的表达。也有不同的假设认为神经细胞不是存在抑制因子 Oct-2,而是缺乏刺激因子 Oct-1^[8]。HCF 还有一个重要的作用是将 VP16 转运至细胞核。与其它细胞相反,神经细胞的 HCF 均位于胞浆,导致 VP16 不能进入胞核启动病毒基因的表达。研究表明促进 HSV 活化增殖的刺激因素亦可促进 HCF 转移进入细胞核,提示可促进极早期基因的表达^[13]。

HSV 潜伏感染最显著的标志是潜伏相关转录本 (the latency associated transcripts, LATs) 的表达。病毒潜伏感染过程中病毒基因组持续表达 LATs,其他基因均处于沉默状态。LATs 主要包括 2.0kb 和 1.5kb 的 RNAs,位于细胞核内,来源于 8.3kb RNA 的剪切产物。8.3kb RNA 起源于对 IOPO 基因的反义转录。并非所有的 HSV 潜伏时都表达 LATs。LAT- 的 HSV 变异株也可建立潜伏感染。自从人们发现了 LATs 基因组成的特殊性后,人们推测 LATs 通过反义机制抑制 IOPO 蛋白的产生。证据表明 LATs 通过抑制 IOPO 的合成减少神经元急性感染的数量,从而有利于建立潜伏感染。实验显示,2.0kb LATs 的表达可以抑制感染细胞内 IOPO 调控的胸苷激酶启动子的活性,而胸苷激酶是 HSV 病毒复制所必需。Sawtell 和 Thompson 发现感染 LAT- 的病毒株比感染 LAT+ 的病毒株有更多数量的急性感染细胞数^[1,13]。LATs 的功能与

建立潜伏、病毒活化及抑制病毒复制、减少神经细胞凋亡有关。LATs 并非病毒建立潜伏所必需,也非病毒活化所必需,但是 LATs 阴性的毒株活化较阳性者显著减少^[1,14,15]。

角膜是另一个 HSV 在人体的潜伏部位。已有多个实验室在人或动物的静止期角膜基质炎标本中找到 HSV 的 DNA,但不伴有 LATs 的转录,这明显有别于 HSV 在神经细胞的潜伏。然而,有人推测角膜中的 DNA 可能是潜伏于三叉神经节细胞的 HSV 经过复制,然后随轴浆流扩散至角膜^[1,8,16]。

现在还有研究发现,原发性感染患者的血浆中可以找到 HSV-1 的 DNA^[17]。因此,HSV 如何在人体建立潜伏、潜伏的部位以及如何如何在人体间传播尚有许多值得探索的地方。

当体内正常的生理环境遭到扰乱时,潜伏在神经细胞内的 HSV 就会激活,导致 HSK 复发。例如人们给鼠胚胎背根神经节细胞(体外培养,培养基加入神经生长因子)接种 HSV,病毒很快复制并引起细胞死亡,加入 DNA 合成抑制剂如无环鸟苷则可以显著抑制病毒复制。但是,培养基中仅仅撤除神经生长因子 1h,或者加入蛋白激酶的激活物,就可检测到病毒激活复制。还有热休克或在体外培养体系中加入地塞米松都可以引起 HSV 激活。HSV 激活的确切机制尚不清楚。HSV 潜伏过程中检测不到 VP16 和 IOPO,因此 HSV 激活的早期可能是通过其它途径进行的。HSV 建立潜伏感染的神经细胞内所含的 HSV 基因组拷贝从一个到数千个不等。HSV 激活的效率与神经节内所含的病毒 DNA 总量有关,即表现为神经节中含 HSV DNA 的神经细胞数量与平均每个神经细胞所含的 HSV 基因组的拷贝数^[13]。临床研究发现长期服用阿昔洛韦可以减少 HSK 的复发^[18]。

3 HSK 的免疫损害机制

尽管 HSV 的复制直接造成角膜组织细胞的崩解,从而导致组织破坏,但是 HSV 感染引起的免疫反应才是造成角膜组织损害的主要机制。HSV 对角膜上皮、基质以及内皮均可造成损害。HSV 引起的上皮损害具有自限性,一般不会对角膜造成永久性的损害。HSV 在角膜上皮细胞内复制导致上皮细胞崩解并释放出病毒感染邻近的上皮细胞而引起树枝状的上皮病变,病变继续发展并相互融合则形成地图状溃疡。盘状角膜炎由角膜内皮损害引起,通常伴有角膜基质水肿。有学者利用盘状角膜炎患者的房水培养出 HSV,因此推测是 HSV 在角膜内皮细胞内复制导致内皮细胞崩解,引起角膜水肿。然而,动物实验证明,向预先用 HSV 致敏的动物角膜基质注射 HSV 抗原可产生盘状角膜炎,而且去除了多形核白细胞的兔模型角膜病变明显减轻。临床观察到盘状角膜炎使用皮质类固醇激素后病情迅速好转,说明迟发型的超敏反应在盘状角膜炎的发病起重要的作用。HSV 引起的角膜基质炎也是免疫机制介导的病变。比较树枝状角膜炎患者和角膜基质炎患者分离到的病毒株,后者在体外扩增时表达大量的糖蛋白 C 和糖蛋白 D。糖蛋白 C 是对 HSK 特异的记忆性的细胞毒性 T 细胞的免疫显性抗原。糖蛋白 D 可结合中和抗体并在体外引起大量的 B 淋巴细胞增殖^[6,8]。

病变组织的病理表现支持上述观点。HSK 患者的角膜基质有大量的炎症细胞浸润,包括多形核白细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和浆细胞,主要是巨噬细胞和表达 T 细胞

决定簇的细胞,以巨噬细胞明显占优势。T细胞中又以CD4⁺细胞为最多,继之CD8⁺细胞。病变角膜中还有少量的自然杀伤细胞^[8,19,20]。

动物实验也证实了HSV引起的角膜损害是机体免疫系统参与的结果,而并非仅仅是病毒复制所造成的直接损害,如HSV感染SCID小鼠或裸鼠都不会导致角膜炎。这两种小鼠都是免疫缺陷小鼠。SCID小鼠不能表达抗原特异性的受体,因而缺乏功能性T细胞或B细胞。裸鼠缺乏胸腺,T细胞不能正常发育成熟,因而缺乏功能性的T细胞。当这两种小鼠输入了经过HSV致敏的小鼠的脾细胞后再感染HSV,则两者均发生了角膜炎。说明输入的免疫活性细胞是导致这两种免疫缺陷小鼠发生单纯疱疹病毒性角膜炎的关键。Russell做了更进一步的试验,他在输入这些经过致敏的小鼠脾细胞之前去除了T细胞,结果7只裸鼠中只有1只发生了角膜炎,而输入未分离的脾细胞的7只裸鼠全部都发生了角膜炎。结合其他试验,很多学者认为原发性的HSK是T细胞介导的疾病。当前房注入HSV-1诱导前房免疫相关偏离现象时,抗HSV-1的细胞免疫反应,以及原发性的HSK都受到了抑制。但是到底是CD4⁺细胞还是CD8⁺细胞介导了这些免疫反应?进一步的实验说明了这个问题。研究者在让裸鼠或SCID小鼠感染HSV-1之前分别给他们输入了CD4⁺细胞和CD8⁺细胞,结果只有输入CD4⁺细胞的小鼠发生了角膜炎。同样地,正常的小鼠去除了CD4⁺细胞后再感染HSV-1,则HSK的免疫病理现象明显减轻或消失了。相反地,去除了CD8⁺细胞的小鼠HSK加重,并且发生脑脊髓炎几率也增加了。由此可以看出,HSK的免疫反应主要是由CD4⁺细胞介导的,而CD8⁺细胞对病毒感染具有保护作用^[8,19,20]。

B淋巴细胞在HSK发病中的作用不是主要的。据报道,与12号染色体上的Igh-1位点有关的基因对决定老鼠的种系是否对HSV易感至关重要。利用高滴度的针对不同的HSV-1糖蛋白的单克隆抗体可以预防鼠HSK的发生。这些单克隆抗体的预防作用不需要CD4⁺或CD8⁺细胞的参与。其机制可能是抗体的中和作用和抗体依赖性的细胞毒作用^[8]。

HSK是HSV与机体免疫系统相互作用的结果。炎症的早期即有角膜上皮基底细胞、基质细胞及内皮细胞表达ICAM-1。它可促进白细胞和血管内皮细胞的黏附及免疫活性细胞在血管外的富集。随着ICAM-1的表达,上述三种角膜细胞均可检测到表达HLA-DR抗原(正常情况下不表达)。HLA-DR抗原为抗原提呈、激活T淋巴细胞所必需。T细胞一旦激活就会释放出更多的炎症因子,加强ICAM-1和HLA-DR抗原的表达,进一步放大免疫炎症反应。研究表明,在TNF- α 、IL-1 β 或IFN- γ 的作用下,角膜组织可迅速表达ICAM-1。但是角膜组织只是在IFN- γ 的作用下才会表达HLA-DR抗原。一项研究显示HLA-DR抗原的表达在严重的角膜病变中更为显著。炎症因子对HSK发病有重要影响。如通常感染HSV不发病的小鼠在感染HSV之前给予抗IFN- α 或IFN- β 的单抗,则小鼠发生中到重度的角膜基质炎。又如小鼠感染KOS病毒株之前给予重组IFN- α ,则小鼠不发生角膜基质炎。对于HSV感染,机体激发的免疫反应目的也是抑制病毒复制,消灭病毒感染细胞从而消灭病毒,但是过强的免疫反应会造成机体损伤^[8]。

众所周知,不同的HSV病毒株可以引起不同形式的

HSK,同样地不同体质的机体免疫系统可以不同程度地干扰HSK的疾病进程。因此,HSV感染引起的疾病实际上是病毒毒力与机体免疫系统比势的结果。机体免疫力下降,则无法抑制病毒的复制,引起感染急性发作;而对HSV感染表现出过强的免疫反应,则因为过强的炎症反应导致机体组织受损。因此,准确的把握疾病的本质,在临床工作中采取适当的干预措施,调节机体的免疫力,抑制病毒的复制,使双方达到最佳的平衡点,才能达到既抑制病毒复制,又避免过强的免疫反应,最终达到控制疾病的治疗目的。

参考文献

- 1 Al-Dujaili LJ, Clerkin PP, Clement C, et al. Ocular herpes simplex virus: how are latency, reactivation, recurrent disease and therapy interrelated? *Future Microbiol* 2011;6(8):877-907
- 2 Albert DM, Jakobiec FA, editors. Principles and Practice of Ophthalmology. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co., USA. 2000: 846-893
- 3 Knickelbein JE, Hendricks RL, Charukamnoetkanok P. Management of Herpes Simplex Virus Stromal Keratitis: An Evidence-based Review. *Surv Ophthalmol* 2009;54(2):226-234
- 4 李莹. 单纯疱疹病毒性角膜炎的临床特点及诊疗思维. *眼科* 2012; 21(3): 157-161
- 5 Remeijer L, Maertzdorf J, Buitenwerf J, et al. Corneal herpes simplex virus type 1 superinfection in patients with recrudescing herpetic keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(2):358-363
- 6 史伟云. 重视单纯疱疹病毒性角膜炎内皮型的诊治. *中华眼科杂志* 2011;47(1): 4-6
- 7 Farooq AV, Shukla D. Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update. *Surv Ophthalmol* 2012;57(5):448-462
- 8 Pepose JS, Leib DA, Stuart PM, et al. Herpes simplex virus diseases: anterior segment of the eye. Mosby-Year Book Inc; Missouri, USA: 1996:905-932
- 9 Efsthathiou S, Preston CM. Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Research* 2005;111:108-119
- 10 Cunningham AL, Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, et al. The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J Infect Dis* 2006;194(Suppl 1):S11-S18
- 11 Hill JM, Ball MJ, Neumann DM, et al. The high prevalence of HSV-1 DNA in human trigeminal ganglia is not a function of age or gender. *J Virol* 2008;82(16):8230-8234
- 12 赵格, 谢立信. 单纯疱疹病毒性角膜炎中HSV-1潜伏感染的研究进展. *国际眼科纵览* 2010;34(6):380-384
- 13 Preston CM. Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *Journal of General Virology* 2000;81:1-19
- 14 Steiner I, Spivack JG, Lirette RP, et al. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts are evidently not essential for latent infection. *EMBO J* 1989;8(2):505-511
- 15 Toma HS, Murina AT, Areaux RG Jr, et al. Ocular HSV-1 latency, reactivation and recurrent disease. *Semin Ophthalmol* 2008; 23(4):249-273
- 16 谢立信, 李绍伟, 董晓光, 等. 单纯疱疹病毒1型功能性基因在角膜内潜伏感染的实验研究. *中华眼科杂志* 2000;36(1):36-39
- 17 Juhl D, Mosel C, Nawroth F, et al. Detection of herpes simplex virus DNA in plasma of patients with primary but not with recurrent infection: implications for transfusion medicine? *Transfus Med* 2010;20(1):38-47
- 18 Uchoa UB, Rezende RA, Carrasco MA, et al. Long-term acyclovir use to prevent recurrent ocular herpes simplex virus infection. *Arch Ophthalmol* 2003;121(12):1702-1704
- 19 尹婕, 黄振平. 单纯疱疹性角膜炎的免疫发病机制. *眼科研究* 2007;25(3):233-236
- 20 Rowe AM, StLeger AJ, Jeon S, et al. Herpes keratitis. *Prog Retin Eye Res* 2013;32(1):88-101