

HSV-1 突变株 M6 感染人支气管上皮细胞后对巨噬细胞介导的免疫反应的影响

张振潇^{1,2)}, 张晶晶¹⁾, 廖芸^{1,2)}, 李丹丹^{1,2)}, 李恒^{1,2)}, 刘龙丁^{1,2)}

(1) 中国医学科学院 & 北京协和医学院医学生物学研究所;

2) 病毒疫苗研发系统创新研究重点实验室, 云南昆明 650118)

[摘要] **目的** 探究 1 型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus type 1, HSV-1)突变株 M6 感染人支气管上皮细胞(16HBE 细胞)后对巨噬细胞介导的免疫反应的影响。**方法** 用 HSV-1 感染 16HBE 细胞分析培养液中细胞因子的变化; 将巨噬细胞与被 HSV-1 毒株感染的 16HBE 细胞的上清液共培养并通过尾静脉回输至小鼠体内, 分别第 1、3、7、28、56、90 天对小鼠淋巴结细胞因子表达水平、脾脏 T 细胞比例变化、小鼠中和抗体表达水平以及特异性 T 细胞反应进行检测。**结果** 16HBE 细胞被 HSV-1 突变株感染后, 上清液中募集和激活巨噬细胞相关的细胞因子均较高水平表达但略低于野毒株组; 尾静脉回输实验后, 突变株组小鼠淋巴结炎症因子、趋化因子和 T 细胞的比例随时间发生了不同的变化, 并引起了弱于野毒株组的体液免疫和强于野毒株组的特异性 T 细胞免疫反应, 且仅极少数与野毒株组具有显著性差异($P < 0.05$)。**结论** 16HBE 细胞被 HSV-1 突变株 M6 感染后能够释放募集和激活巨噬细胞的细胞因子, 使巨噬细胞携带 HSV-1 突变株的特异性活化信息, 激活了宿主的免疫系统, 诱导了宿主的体液免疫和细胞免疫。

[关键词] 1 型单纯疱疹病毒; 人支气管上皮细胞; 巨噬细胞; 突变株

[中图分类号] R373.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)07-0006-08

Effects of HSV-1 Mutant Strain M6 on Macrophage-Mediated Immune Response after Infecting Human Bronchial Epithelial Cells

ZHANG Zhenxiao^{1,2)}, ZHANG Jingjing¹⁾, LIAO Yun^{1,2)}, LI Dandan^{1,2)}, LI Heng^{1,2)}, LIU Longding^{1,2)}

(1) Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming Yunnan 650118; 2) Key Laboratory of Systemic Innovative Research on Virus Vaccine, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** To explore the impact of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) mutant strain M6 on macrophage-mediated immune responses after infecting human bronchial epithelial cells (16HBE cells). **Methods** HSV-1 infection of 16HBE cells was conducted to assess cytokine alterations in the culture medium; Macrophages were co-cultured with supernatants from HSV-1-infected 16HBE cells and subsequently reintroduced into mice via tail vein infusion. Cytokine expression levels in mouse lymph nodes, changes in spleen T cell proportions, mouse neutralizing antibody levels, and specific T cell responses were measured on days 1, 3, 7, 28, 56, and 90. **Results** Following infection of 16HBE cells with the HSV-1 mutant strain, cytokine expression in the supernatant, associated with macrophage recruitment and activation, was elevated, albeit slightly lower than that observed in the wild-type strain group. Following the tail vein infusion experiment, the mutant strain group

[收稿日期] 2024-03-27

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82171817); 云南省自然科学基金资助项目(202301AS070066)

[作者简介] 张振潇(1999~), 男, 山东济南人, 在读硕士研究生, 主要从事疱疹病毒的感染与免疫研究工作。

[通信作者] 刘龙丁, E-mail: longdingl@gmail.com; 李恒, E-mail: liheng@imbcams.com.cn

exhibited temporal changes in the proportions of inflammatory factors, chemokines, and T cells within the mouse lymph nodes, resulting in weaker humoral immunity compared to the wild-type strain group, yet eliciting stronger specific T cell responses, with only a few parameters showing significant differences from the wild-type strain group ($P < 0.05$). **Conclusion** 16HBE cells infected with the HSV-1 mutant strain M6 can release cytokines that recruit and activate macrophages, allowing macrophages to carry specific activation information of the HSV-1 mutant strain, activating the host's immune system and inducing the host's Humoral immunity and cellular immunity.

[**Key words**] Herpes simplex virus 1; Human bronchial epithelial cells; Macrophages; Mutant strain

1 型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus type 1, HSV-1)属于疱疹病毒科 α 亚科^[1]。在感染部位,例如口腔和生殖器,单纯疱疹病毒 1 型可引起疼痛的水泡或溃疡病变^[2]。目前被批准的抗 HSV-1 药物如阿昔洛韦等只能消除症状,相关疫苗的临床研究也未能提供应用性意义的结果^[3]。病毒感染时,上皮细胞通常是病毒的第 1 个接触点和进入点^[4-5],通过分泌趋化因子将巨噬细胞等免疫细胞招募到感染部位,从而协调先天性和适应性免疫反应^[6-7]。巨噬细胞被激活后可以吞噬并破坏病毒颗粒和受感染的细胞^[8],或将抗原呈递给 T 细胞以激活适应性免疫反应^[9]。在现有的研究中,有许多团队完成了针对 HSV-1 感染过程中免疫细胞发挥作用的相关研究: Ghiasi 团队完成了 T 细胞^[10-11]和巨噬细胞^[12-13]在 HSV-1 感染中的作用研究; Zhang J 团队完成了 HSV-1 感染树突状细胞的免疫表型特征的实验^[14]。但 HSV-1 感染的事实是上皮细胞是第 1 个被感染的目标^[15]。显然,目前缺乏免疫细胞在上皮细胞被 HSV-1 感染情况下引起机体免疫反应的影响研究。因此在本研究中,笔者探究了 16HBE 细胞被 HSV-1 感染后对巨噬细胞引起的免疫反应,并主要分析了团队通过 CRISPR-Cas9 基因编辑技术构建的突变株 M6^[16]相比 HSV-1 野毒株引起该免疫反应的特点;通过对 HSV-1 突变株 M6 的研究,来探索其在激发保护性免疫反应方面的能力。研究结果表明,HSV-1 突变株 M6 感染 16HBE 细胞后能够产生对巨噬细胞影响的免疫分子,巨噬细胞受到该影响后引发宿主产生一定程度的免疫反应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠共计 36 只购自北京维通利华实验动物有限公司,饲养于中国医学科学院医学生物学研究所(CAMS IMB)的无特定病原体设施里,保持了 12 h 的光/

暗循环,并能自由取食和饮水,均由专业团队负责照料。本研究通过 CAMS IMB 动物伦理委员会的批准(DWSP202312015)。

1.1.2 细胞 非洲绿猴肾细胞(Vero 细胞,培养基为 MEM,补充有 10% 的新生牛血清)、小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7 细胞,培养基为 DMEM,补充有 10% 胎牛血清)、人支气管上皮细胞(16HBE 细胞,培养基为 DMEM,补充有 10% 的胎牛血清)均由中国医学科学院病毒疫苗研发系统创新研究重点实验室保存并提供,培养基中包含 10% 100 U/mL 青霉素和 100mg/mL 链霉素,培养环境为 37 °C 5% 的 CO₂ 培养箱。

1.1.3 病毒 HSV-1 野生型毒株和突变型毒株 M6 均由中国医学科学院病毒疫苗研发系统创新研究重点实验室保存并提供。本研究已经通过中国医学科学院医学生物学研究所生物安全处的生物安全审核并获得批准(SWAQ20221201)。

1.2 动物实验

BALB/c 小鼠被随机分为 2 组,每组有 18 只小鼠。具体操作如下:首先 16HBE 细胞被毒株感染 24 h,然后取上清液与巨噬细胞(流式细胞术从小鼠脾脏中分选获得)共培养 24 h,最后将其以 $3 \times 10^5/100 \mu\text{L}$ 通过尾静脉回输至小鼠体内。其中 2 组毒株分别为 HSV-1 野毒株和 HSV-1 突变株 M6。每天观察小鼠并提供舒适的生活环境。过继回输后 1、3、7、28、56、90 d 进行一系列免疫学表型检测。

1.3 细胞因子 RT-qPCR 检测

使用 TRIzol 试剂提取总 RNA,并使用 One-Step SYBR Prime Script™ PLUS RT-PCR 试剂盒进行 mRNA 转录水平测定。小鼠 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参基因。基因表达表示为相对于空白对照组样品中的水平的倍数变化($2^{-\Delta\Delta Ct}$)。

1.4 流式分析

淋巴结中的淋巴细胞用无菌 PBS 缓冲液重悬并计数,细胞浓度调整至 1×10^6 cells/100 μL ,并分装至 1.5 mL EP 管中。加入 2 μL 流式抗体混匀

后避光静置 30 min, 设置单染管和空白管用于流式细胞参数的调整。加入 1 mL PBS 离心弃上清重复 2 次。用 400 μ L PBS 溶液重悬细胞, 并在流式细胞仪上进行检测并用 FlowJoV 10.8.1 软件对结果进行分析。

1.5 中和抗体实验

准备好血清样品(1:2 开始连续对半稀释 5 次)、病毒样品以及 2×10^5 cells/mL 的 Vero 细胞悬液。在 96 孔板中每孔加入 50 μ L 病毒样品和 50 μ L 血清稀释液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后将细胞悬液以 100 μ L/孔加入板中。37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 孵育 7 d 监测细胞病变效应(cytopathic effect, CPE), 以评估血清中的中和抗体滴度。设置细胞对照组(不病变)和病毒对照组(病毒原液全部病变, 10 倍稀释部分病变、100 倍稀释无病变)以验证实验的准确性和可靠性。

1.6 酶联免疫斑点测定

按照 ELISpot 试剂盒的说明书要求进行检测, 每个孔加入 200 μ L 无菌 PBS 洗涤 3 次, 随后每个孔加入 200 μ L 无血清培养基室温活化 30 min, 然后拍干。实验组加入刺激物(gB498-505, SSIEFARL) 10 mg, 并设置添加 PHA 的阳性对照组、不加刺激物的阴性对照组和只加培养基的空白对照组。加入分离并稀释好的淋巴细胞悬液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳培养箱中培养 36 h。随后完成孵育、显影、计数工作。

1.7 统计学处理

所有的统计分析均使用 GraphPad Prism 9.51, 并生成统计分析图。为了评估在不同时间点野毒株组与突变株组的效应及其间的差异, 采用双因素重复测量方差分析(two-way repeated measures ANOVA)。此分析考虑了 2 个因素: 毒株类型(野毒株与突变株)和时间点。设定了 $\alpha = 0.05$ 的显著性水平, 即 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 16HBE 细胞被 HSV-1 突变株感染后分泌的细胞因子情况分析

采用多重细胞因子检测试剂盒测定 HSV-1 以 MOI=0.1 感染 16HBE 细胞 24 h 后细胞培养液中的细胞因子表达情况, 见图 1。研究表明, 16HBE 被 HSV-1 感染后趋化因子如 MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES 的水平显著增加($P < 0.05$), GM-CSF 和白介素的水平相较对照组也有明显升

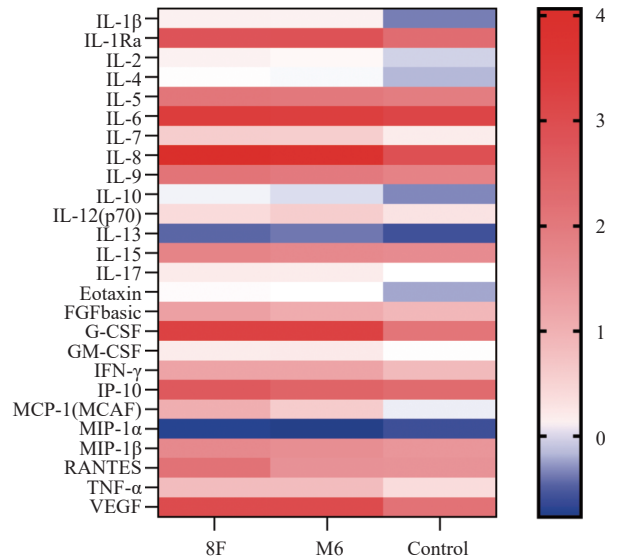


图 1 HSV-1 2 种毒株感染 16HBE 细胞 24 h 后细胞因子表达水平的变化

Fig. 1 Changes in cytokine expression levels after infection of 16HBE cells with two HSV-1 strains for 24 hours

2 种毒株感染后均引起了各类细胞因子的不同变化。热图结果经过了归一化处理, 具体方法是对数据采用了对数转换取其 \log_{10} 值, 从而更有效地展示数据的变化范围和趋势。

高($P < 0.05$), 具有生物学意义。虽然 2 种毒株都能引起这些变化, 但突变株 M6 引起的细胞因子水平略低于野毒株。

这些结果表明, 16HBE 细胞被 HSV-1 感染时, 引起了强烈的局部免疫和炎症反应, 发挥了积极的免疫调节作用。

2.2 突变株组处理后的巨噬细胞引起的炎症反应分析

为了研究上述过程能否使巨噬细胞携带足够的信息以建立抗病毒免疫, 将上清液与从小鼠脾脏中流式分离出的巨噬细胞共培养 24 h, 随后以 3×10^5 cell/100 μ L 的细胞浓度将这些处理过的巨噬细胞通过尾静脉回输到 BALB/c 小鼠中, 并在第 1、3、7、28、56 和 90 天检测淋巴结中的炎症因子转录水平, 见图 2。发现前 7 d 变化最明显的炎症因子是 IL-6, IL-6 是早期炎症反应因子, 其早期升高反映了体内正在积极响应感染或损伤, 见图 2A。除此之外, GM-CSF 的反应速度也很快, 可以促进炎症反应, 增强巨噬细胞和树突状细胞的功能, 见图 2B。相对的, 其他炎症因子如 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-10、TGF- β 在回输后第 28 d 时表达水平较高, 此时炎症反应较强, 见图 2C、2D。值得注意的是, 突变株 M6 引起了比野毒株更强的 TNF- α 、IFN- γ 反应, 见

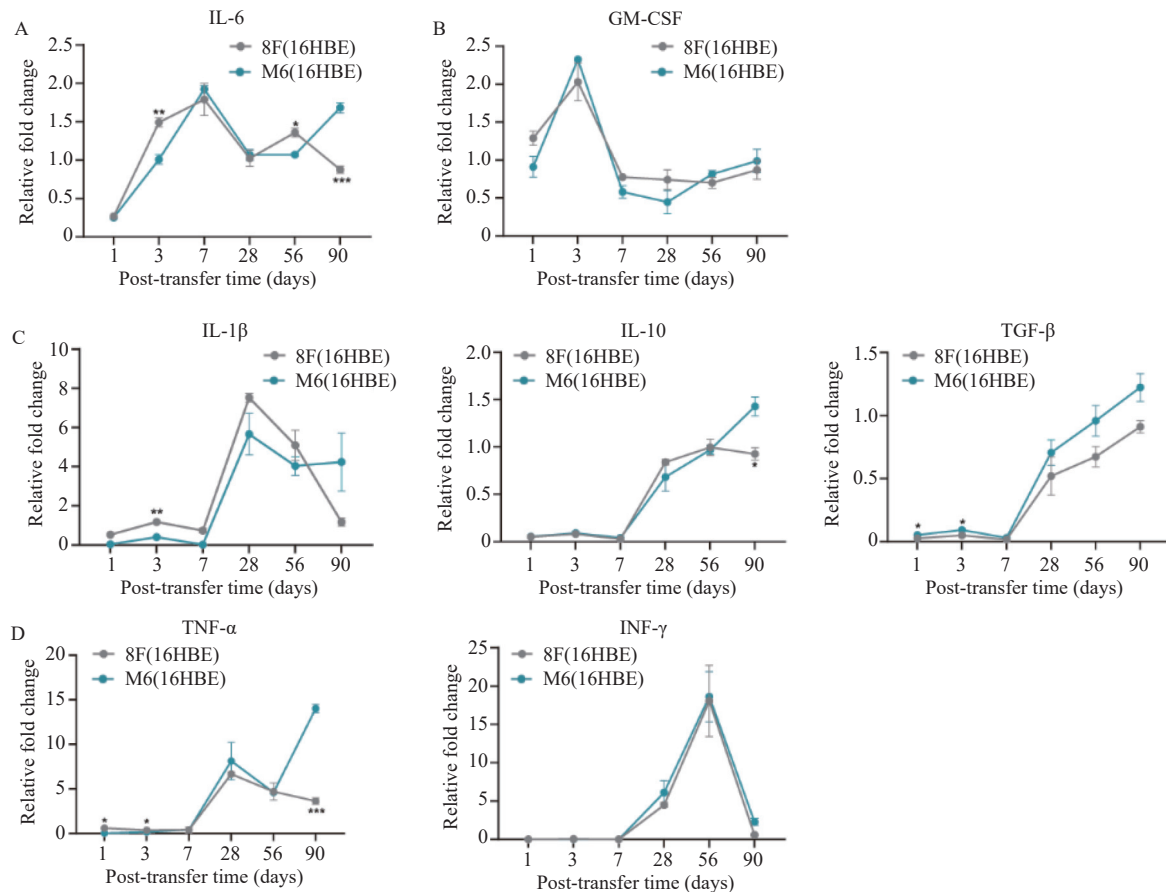


图2 尾静脉回输实验后不同时间点小鼠的淋巴结中炎症因子的变化情况

Fig. 2 Changes in inflammatory factors in lymph nodes of mice at different time points after tail vein reinfusion experiment
A: 淋巴结 IL-6 的变化情况; B: 淋巴结 GM-CSF 的变化情况; C: 淋巴结 IL-1 β 、IL-10、TGF- β 的变化情况; D: 淋巴结 TNF- α 、INF- γ 的变化情况。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图2D。

这些结果表明, 回输处理后的巨噬细胞激活了小鼠的免疫系统, 并且仅少数时间点的细胞因子表达水平的差异具有统计学意义($P < 0.05$), 说明突变株具有和野毒株相似的刺激细胞因子分泌的能力。

2.3 突变株组处理后的巨噬细胞能够产生高水平趋化因子并且募集免疫细胞

基于上述结果, 对回输后 90 d 内的淋巴结的免疫细胞中趋化因子的表达水平进行了分析。发现趋化因子 CCL2、CCL5、CXCL9 和 CXCL10 在第 28 d 表达水平较高, 见图 3A, 可能涉及免疫细胞招募过程, 尤其是 T 细胞和巨噬细胞。趋化因子较为延迟的升高可能反映了体内对病原体信息的持续识别或处理, 从而促进免疫系统持续激活。随后, 对淋巴结中的 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞也进行了分型, 见图 3B。CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的变化和趋化因子水平的变化并不完全一致, 见图 3C。回输后第 1 周 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞在淋巴结细胞中的占比较高, 但随后两者的占

比都逐步下降, 而趋化因子表现为前期表达水平低, 大约第 4 周时表达水平最高。第 28 天时, CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞占比的差异均具有统计学意义($P < 0.05$), 反映了不同毒株在形成免疫记忆方面的差异。

2.4 突变株组处理后的巨噬细胞引起的中和抗体水平情况

对小鼠血清中和抗体水平的变化进行了检测, 见图 4A。HSV-1 野毒株处理组引起的中和抗体水平较高, 突变株引起的中和抗体水平并不强烈。第 28 天时野毒株中和抗体水平达到顶峰随后缓慢下降, 而突变株第 28 天才检测到微量的中和抗体水平, 第 56 天时虽有升高但仍然表现为低水平, 第 90 天时抗体水平又降低, 见图 4B。每个时间点, 中和抗体表达水平的差异均具有统计学意义($P < 0.05$), 说明突变株引起了较弱的体液免疫。

2.5 突变株组处理后的巨噬细胞引起的分泌 IFN- γ 和 IL-4 的 ELISpot 反应

利用 HSV-1 特异性肽段对脾脏淋巴细胞进行了 IFN- γ 和 IL-4 的 ELISpot 反应测定。发现突

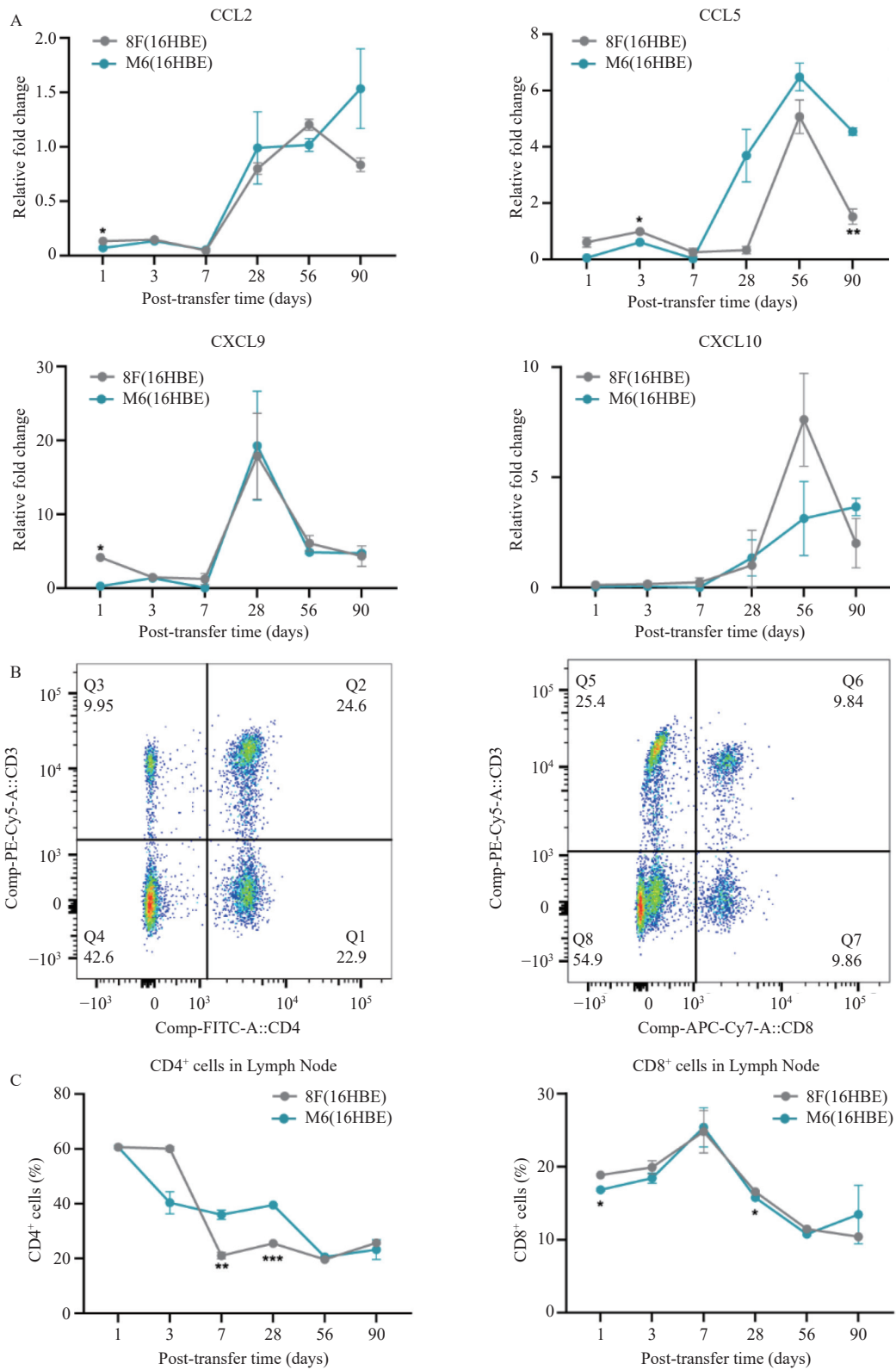


图 3 尾静脉回输实验后不同时间点小鼠的淋巴结中趋化因子的变化情况及 T 细胞的分型情况

Fig. 3 Changes in chemokines and T cell typing in lymph nodes of mice at different time points after tail vein infusion experiment

A: 淋巴结主要趋化因子的变化情况; B: CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的分型策略; C: 淋巴结 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的变化情况。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001。

变株 M6 处理组引起了比野毒株更强烈的细胞免疫反应。2 种毒株处理组引起的 IFN- γ 反应前

28 d 时均为不断升高, 第 56 天、第 90 天时已检测不到 IFN- γ 反应, 见图 5A。而 2 组的 IL-4 反

应前 7 d 时表达水平升高, 随后缓慢下降, 见图 5B。突变株与野毒株的 ELISpot 反映仅少数时间点的

差异具有统计学意义($P < 0.05$), 说明减毒株诱导了与突变株相似的 IFN- γ 和 IL-4 反应。

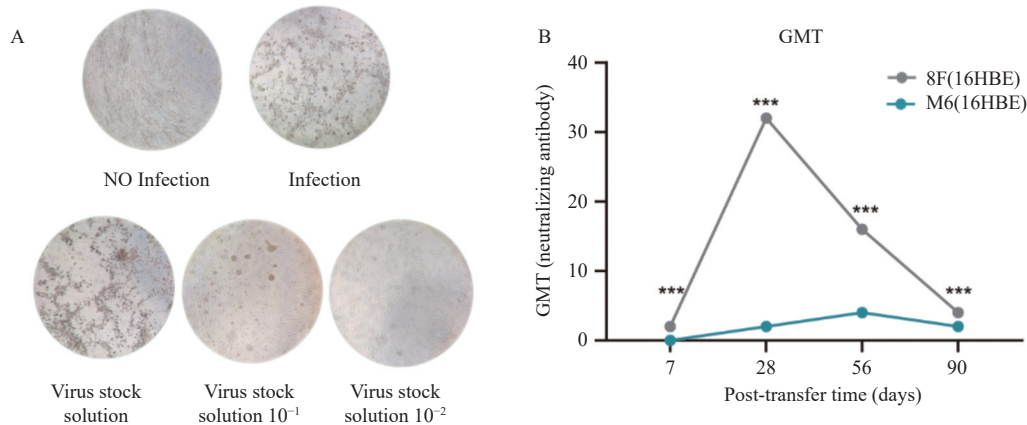


图 4 尾静脉回输实验后不同时间点小鼠血清的中和抗体水平的变化情况

Fig. 4 Changes in neutralizing antibody levels in mouse serum at different time points after the tail vein infusion experiment

A: 中和抗体检测标准; B: 血清中和抗体的变化情况。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

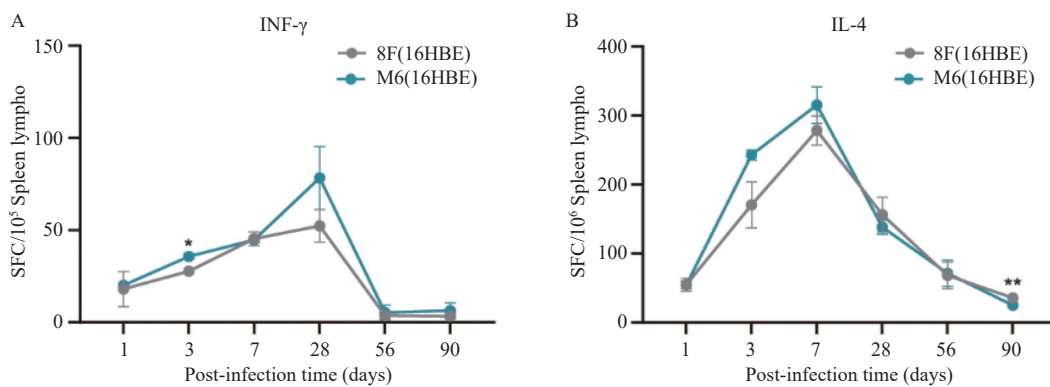


图 5 尾静脉回输实验后不同时间点小鼠脾脏细胞的 IFN- γ 、IL-4 的 ELISpot 反应

Fig. 5 ELISpot response of IFN- γ and IL-4 in mouse spleen cells at different time points after tail vein infusion experiment

A: 小鼠脾脏细胞的 IFN- γ 的 ELISpot 反应; B: 小鼠脾脏细胞的 IL-4 的 ELISpot 反应。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

3 讨论

HSV-1 感染者的免疫系统在消除病毒和阻止再次感染方面表现出较弱的效能^[17]。减弱的免疫反应主要归因于病毒编码的蛋白质对先天和适应性免疫反应的干扰^[18]。这种干扰降低了免疫系统清除病毒和防御外来感染的能力, 进而对抗病毒药物和疫苗的开发构成挑战^[19]。因此, 深入理解病毒如何操控免疫系统, 破坏其防御机制, 对于制定有效的抗病毒策略至关重要。

在现有的研究中, 许多团队聚焦于 HSV-1 感染时免疫细胞的作用。比如, Zhang J 的团队对于受 HSV-1 感染的树突状细胞在先天免疫和适应性免疫的作用进行了研究^[14]; Ghiasi 团队对于 M1、

M2 巨噬细胞在 HSV-1 感染中的作用进行了研究^[20]。但 HSV-1 感染人体的事实是, 上皮组织细胞往往是病毒首先接触或感染的细胞类型, 被感染的上皮组织细胞能释放信号分子吸引免疫细胞如巨噬细胞到感染部位, 紧接着这些免疫细胞发挥其免疫作用。这就提出了 1 个问题: 被 HSV-1 感染的上皮细胞募集的巨噬细胞在免疫反应中会诱导什么结果。

笔者在研究中使用了团队构建的 HSV-1 突变株 M6, 在探究上述问题的同时, 检测突变株 M6 是否能激活巨噬细胞介导的免疫反应。笔者分析了 16HBE 细胞被 HSV-1 感染时培养液中细胞因子的变化, 发现其中与募集和激活巨噬细胞相关的细胞因子均较高水平表达。此外, 还通过流式

细胞术将小鼠脾脏中的巨噬细胞分选出来, 并与被 HSV-1 感染的 16HBE 细胞的上清液进行共培养, 模拟病毒的实际感染过程。同时, 本研究将这些处理过的细胞尾静脉回输到小鼠体内, 重点观察淋巴结中炎症因子和趋化因子的变化, 以及淋巴结中 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的占比变化。

结果表明这些携带 HSV-1 野毒株或突变株信息的巨噬细胞均可以激活炎症因子和趋化因子的表达, 其中 MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES 能吸引单核细胞, MCP-1 在吸引单核细胞的同时, 还能将单核细胞转变为巨噬细胞或树突状细胞, 而粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF 能够刺激巨噬细胞生成、成熟, 并且可以增强巨噬细胞的功能; 除此之外, 白细胞介素水平提高能够影响炎症反应及抗病毒活动, 并且使得淋巴结中 T 细胞比例发生变化。

早期 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞表达水平较高, 可能是由于巨噬细胞携带的信息直接激活了 T 细胞, 此时即使趋化因子水平不高, T 细胞也能通过直接与抗原呈递细胞的相互作用被激活和扩张。而趋化因子水平的后期上升可能是对早期 T 细胞反应的一种调节或延续, 反映了免疫系统的需求转变, 从直接的细胞介导免疫反应转向更长期的免疫调节和维护。这可能与持续的抗原刺激、炎症维持或组织修复过程有关。随着时间的推移, CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞可能从淋巴结迁移执行其效应功能, 导致它们在淋巴结中的比例下降。同时, 趋化因子的上升可能是为了吸引新的免疫细胞(如记忆细胞或新的效应细胞)来维持或加强免疫监视和反应。这种动态变化揭示了回输巨噬细胞引起的免疫反应的时序性调整和多层次调节机制, 说明被 HSV-1 感染的 16HBE 细胞上清液处理后的巨噬细胞携带的信息能够通过不同阶段的免疫细胞和分子因子协同作用, 有效应对持续的感染压力, 同时维护免疫平衡和组织稳定。

笔者对这些小鼠血清的中和抗体水平进行了测定。有趣的是, 突变株 M6 引起了弱于野毒株的中和抗体水平, 这可能是因为经处理的巨噬细胞携带了病毒特异性抗原并在回输后呈递了这些抗原, 这促进了 B 细胞反应, 导致中和抗体的产生。野毒株可能因为其更高的毒力和免疫原性, 在早期就引发了较强的中和抗体反应。相比之下, 突变株引起的中和抗体反应出现延迟, 可能是因为其免疫原性较低, 需要更长时间才能激发足够强的免疫反应。

笔者又对以及脾脏细胞 IFN- γ 、IL-4 的

ELISpot 反应进行测定, 这些携带 HSV-1 毒株信息的巨噬细胞也可以引起略强于野毒株的特异性 T 细胞反应。这可能反映了突变株激发了更强烈的细胞介导免疫和辅助性 T 细胞反应。这可能是因为突变株在体内持续时间更长, 提供了更持久的抗原刺激。

综上所述, 人支气管上皮细胞被 HSV-1 突变株 M6 感染后能够释放募集和激活巨噬细胞的细胞因子, 使得巨噬细胞携带 HSV-1 毒株的信息, 激活宿主的免疫系统, 诱发宿主的体液免疫和细胞免疫反应。这种由上皮细胞向巨噬细胞的直接信号转导, 可能涉及新发现的跨膜蛋白或未知的细胞内信号通路, 这为深入研究 HSV-1 的免疫逃逸机制提供了新线索。总之, 这些发现揭示了上皮细胞在 HSV-1 感染时的重要作用以及巨噬细胞接收被感染的上皮细胞的信号激活免疫系统的作用, 强调了 HSV-1 突变株 M6 在免疫调节中的复杂作用, 增进了对 HSV-1 突变株 M6 作为潜在疫苗载体的免疫原性和免疫激活能力的理解。

[参考文献]

- [1] Kwon H, Bai Q, Baek H-J, et al. Soluble V domain of Nectin-1/HveC enables entry of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) into HSV-resistant cells by binding to viral glycoprotein D[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(1): 138-148.
- [2] Johnston C, Magaret A, Son H, et al. Viral shedding 1 year following first-episode genital HSV-1 infection[J]. *Jama*, 2022, 328(17): 1730-1739.
- [3] Sharma D, Sharma S, Akojwar N, et al. An insight into current treatment strategies, their limitations, and ongoing developments in vaccine technologies against herpes simplex infections[J]. *Vaccines (Basel)*, 2023, 11(2): 206.
- [4] Ravindra N G, Alfajaro M M, Gasque V, et al. Single-cell longitudinal analysis of SARS-cov-2 infection in human airway epithelium identifies target cells, alterations in gene expression, and cell state changes[J]. *PLoS Biol*, 2021, 19(3): e3001143.
- [5] Kim S R. Viral infection and airway epithelial immunity in asthma[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 9914.
- [6] Kolli D, Velayutham T S, Casola A. Host-viral interactions: Role of pattern recognition receptors (PRRs) in human pneumovirus infections[J]. *Pathogens*, 2013, 2(2):

- 232–263.
- [7] Liu C, Zhang X, Xiang Y, et al. Role of epithelial chemokines in the pathogenesis of airway inflammation in asthma[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 6935–6941.
- [8] Yu S, Ge H, Li S, et al. Modulation of macrophage polarization by viruses: Turning off/on host antiviral responses[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 839585.
- [9] Carty S A. Immunology 101: Fundamental immunology for the practicing hematologist[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2021, 2021(1): 281–286.
- [10] Hirose S, Wang S, Jaggi U, et al. IL-17A expression by both T cells and non-T cells contribute to HSV-IL-2-induced CNS demyelination[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1102486.
- [11] Jaggi U, Wang S, Tormanen K, et al. Role of herpes simplex virus type 1 (hsv-1) glycoprotein k (gk) pathogenic cd8(+) t cells in exacerbation of eye disease[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2895.
- [12] Jaggi U, Matundan H H, Yu J, et al. Essential role of m1 macrophages in blocking cytokine storm and pathology associated with murine hsv-1 infection[J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(10): e1009999.
- [13] Mott K, Brick D J, van Rooijen N, et al. Macrophages are important determinants of acute ocular hsv-1 infection in immunized mice[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(12): 5605–5615.
- [14] Zhang J, Xu X, Duan S, et al. Characterization of the immunologic phenotype of dendritic cells infected with herpes simplex virus 1[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 931740.
- [15] Verzosa A L, McGeever L A, Bhark S J, et al. Herpes simplex virus 1 infection of neuronal and non-neuronal cells elicits specific innate immune responses and immune evasion mechanisms[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 644664.
- [16] Xu X, Feng X, Wang L, et al. A HSV1 mutant leads to an attenuated phenotype and induces immunity with a protective effect[J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(8): e1008703.
- [17] La Rosa F, Agostini S, Bianchi A, et al. Herpes simplex virus-1 (HSV-1) infection induces a potent but ineffective ifn- λ production in immune cells of ad and pd patients[J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 286.
- [18] He T, Wang M, Cheng A, et al. Host shutoff activity of vhs and sox-like proteins: Role in viral survival and immune evasion[J]. *Virol J*, 2020, 17(1): 1–11.
- [19] Zhao J, Qin C, Liu Y, et al. Herpes simplex virus and pattern recognition receptors: An arms race[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 613799.
- [20] Lee D H, Ghiasi H. Roles of m1 and m2 macrophages in herpes simplex virus 1 infectivity[J]. *J Virol*, 2017, 91(15): e00578–17..