

## 自发转化的人胎肝细胞株对细小病毒

## H-1 感染敏感性的变化\*

林万敏 徐磊 马承武 万山红 罗祖玉

(复旦大学生命科学学院 上海 200433)

细小病毒(parvovirus)是一类无囊膜单链DNA病毒,因病毒粒子较小而得名。病毒直径为20 nm左右,基因组大小约为5 kb,按其在寄主细胞内增殖是否需要帮助病毒,可分为腺联病毒(Adeno-associated virus, AAV)和自主性细小病毒(Autonomous parvovirus)。H-1是一种自主性细小病毒,它的增殖只依赖寄主细胞的功能而毋须帮助病毒。

发现细小病毒对肿瘤或转化细胞的抑制作用,是从本世纪60年代后期开始的<sup>[1]</sup>。大量研究已表明,细小病毒H-1、MVM (minute virus of mice)等对一些自发的或用各种因子诱发的肿瘤或转化细胞具有抑制作用<sup>[2-7]</sup>。目前关于这一作用机理的研究正在不断深入之中。

本实验室在多年研究细小病毒H-1抗肿瘤作用的过程中,发现人胎肝细胞HuL-1在发生了自发转化后,对细小病毒H-1感染的敏感性同时发生了变化,本文报道了从细胞和分子水平对此进行研究的结果。

## 材料与方 法

## 一、细胞

HuL-1是从国外引进的人胎肝细胞株<sup>[8]</sup>,培养条件为含10%小牛血清的RPMI 1640培养基,37℃。

## 二、病毒

H-1基本上按Tattersall等<sup>[9]</sup>的方法制备。实验室中常用于制备H-1病毒的宿主细胞之一是NB-K(用SV 40转化的新生儿肾细胞)。其大致过程为:待NB-K细胞贴壁长至对数期时用少量H-1病毒感染细胞,数天后细胞裂解并释放病毒(吸附于细胞碎片上)。

收集病毒,然后经氯化铯密度梯度超离心进行浓集和纯化。得到的病毒经透析后(透析液:50 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L EDTA, pH 8.7)用空斑法测定其滴度。病毒母液中病毒量用空斑形成单位(Plaque Forming Unit, PFU)表示,1 PFU代表1个有感染力的病毒颗粒。病毒感染细胞的大致步骤是,在用PBS液洗涤过的培养瓶中加入所需的病毒量(体积为1 ml),经37℃培养1小时后,再加入培养基继续培养,感染复数moi (multiplicity of infection)等于感染用的PFU值与被感染细胞数之比。除非特别表明,本研究中有实验采用的moi为5 PFU/每个细胞。

## 三、细胞转化的测定

1. 细胞软琼脂集落形成率测定。参考有关文献<sup>[3]</sup>进行,在直径6 cm的培养皿内植入250和500只细胞,琼脂浓度为0.3%。

2. 裸小鼠体内成瘤检测。在4周龄的BALB/AC裸小鼠肩部皮下注射HuL-1细胞,注射量为 $1.2 \times 10^7$ 细胞/0.1 ml/只,逐日观察成瘤情况。

3. 移植瘤的组织切片观察。将在裸小鼠体内形成的实体瘤取出,用甲醛固定、石蜡包埋、切片(4—5 μm)后经HE染色,进行读片和拍摄。

## 四、HuL-1细胞对H-1病毒感染敏感性测定

1. 细胞存活率的测定。细胞经不同的moi量的H-1病毒感染后,以500只/皿的数量接种,培养10天后,用姬姆萨液染色,计数细胞集落,将感染组与对照组的比值作为存活率。

2. H-1病毒在HuL-1细胞中的增殖检测。这一工作包括以下三部分。

\* 国家自然科学基金和教委博士点基金资助。

Ikenaga教授、Rommelaere教授和Cornelis教授分别赠送了HuL-1细胞、pULB 3514质粒和抗NS-1蛋白抗体,郑秀英同志、董荣春教授帮助进行了病理切片和观察,钱贞宝同志协助进行了裸鼠实验,谨在此表示谢意。

H-1 DNA 在细胞中的复制: 本实验参照 Dispersed cell assay<sup>[10]</sup>进行。基本过程是, 在病毒感染后的一定时间收集细胞, 并转移到硝酸纤维膜上( $10^6$ 细胞/膜), 膜片经碱处理使细胞破碎并使 DNA 变性, 然后将膜片与  $^{32}\text{P}$  标记的含 H-1 DNA 序列的探针杂交, 以膜片上的放射性强度作为测定的 H-1 DNA 的相对量。本实验所用的含 H-1 DNA 片段的质粒 pULB 3514 由比利时布鲁塞尔自由大学 Rommelaere 教授惠赠, 用缺口翻译法进行标记。杂交条件为  $65^\circ\text{C}$ , 过夜, 杂交液中标记物强度为  $2 \times 10^7 \text{cpm}/50$  膜片。本实验以病毒感染后 30 小时与 2 小时测得的 H-1 DNA 量之比作为 H-1 DNA 复制程度的指标。

非结构蛋白 NS-1 基因的表达: 本实验参照 Cornelis<sup>[11]</sup>所描述的方法进行。简言之, 在 H-1 感染细胞后 16 小时, 以  $^{35}\text{S}$ -甲硫氨酸对培养物进行蛋白标记 ( $0.2 \text{ mCi}/10^6$  细胞/皿), 然后以 RIPA 液 (TrisHCl, pH 7.4,  $10^{-2} \text{ mol/L}$ ; NaCl,  $0.15 \text{ mol/L}$ ; EDTA,  $10^{-3} \text{ mol/L}$ ; Triton x 100, 1%; 脱氧胆酸钠, 0.1%; SDS, 0.1%; aprotinin, 0.5%) 裂解细胞, 再加入抗 NS-1 抗体 (由比利时布鲁塞尔自由大学 Cornelis 教授惠赠, 系用含 NS-1 DNA 部分序列的质粒在细菌中表达的多肽对兔子免疫得到的抗血清<sup>[12]</sup>) 进行免疫反应, 反应物再以 protein A-sepharose 沉淀, 并对沉淀物进行高温裂解得到游离的 NS-1 蛋白, 然后经 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳、凝胶抽干和对感光胶片曝光观察结果。

病毒抗原的产生: 这一工作参考有关文献<sup>[3]</sup>进行, 其大致过程如下:  $5 \times 10^6$  细胞经 H-1 感染后, 每隔 5 小时分别收集上清培养基 ( $50 \mu\text{l}$ ) 和细胞 (全部)。细胞悬浮在  $100 \mu\text{l}$  PBS 液中, 经反复冻融裂解, 离心后取上清液 ( $50 \mu\text{l}$ ) 与前述上清培养基同时在 96 孔板上进行血凝试验。样品用 PBS 液按 1:1 比例逐级稀释成  $2^0$ — $2^7$  8 个不同的稀释度, 每一稀释度为  $25 \mu\text{l}$ , 然后在每孔中加入  $25 \mu\text{l}$  新鲜的 5% 豚鼠红细胞液 (悬浮在 PBS 液中), 置  $4^\circ\text{C}$  中静止数小时后观察血凝现象, 以出现血凝的最大稀释度作为相当的抗原量, 用血凝单位 (HU) 表示。本法测得的抗原包括完整的病毒粒子及病毒空壳。

## 结 果

### 一、HuL-1 细胞的转化状态

软琼脂集落测定表明, HuL-1 细胞的集落形成率, 以三个培养皿的平均值表示为

20.1%。

裸小鼠体内成瘤情况: 接种后 10—15 天, 3 只小鼠背部均见硬结节突起 (图 1)。第 25 天杀死其中 1 只, 剥离出肿块, 其体积约为  $0.8 \times 0.5 \times 0.5 \text{ cm}^3$ 。在无菌条件下剪碎此肿块, 用胰酶消化, 可以得到单细胞悬液, 这些细胞可以再贴壁和传代, 在显微镜下的形态与 HuL-1 细胞并无不同。另两只荷瘤鼠随着瘤块的长大而最终在 35 天后死去。



图 1 BALB/AC 裸小鼠皮下注射 HuL-1 细胞 ( $1.2 \times 10^7$ ) 后 25 天形成的肿块 (箭头所指)。

上述裸鼠体内瘤块的组织切片显示符合癌细胞的病理特点 (见图版): 细胞形态大小不一, 核浆比例明显增大, 可见多数核分裂相, 细胞呈团块状生长, 其周围有不完整的纤维组织包绕, 部分细胞已向周围呈浸润性生长, 组织内见部分细胞呈小片状坏死。

综合上述资料, 可以认为本实验使用的 HuL-1 细胞已发生恶性转化。

### 二、HuL-1 细胞对 H-1 病毒感染的敏感性

图 2 表明, 随着感染的 moi 增大, 细胞的存活率同步下降, 说明 H-1 病毒的特异性感染抑制了 HuL-1 细胞的生长。H-1 DNA 相对含量的检测表明, 感染后 30 小时与 2 小时 HuL-1 细胞中的 H-1 DNA 含量之比达 27.1, 说明细胞对病毒 DNA 的扩增表现出很大容许性。图 3 则是 H-1 非结构蛋白 NS-1 基因的表达情况。A、B、C 代表的分子量分别为 88、84 和 80 kD, 均属 NS-1 蛋白, 表明在 HuL-1 细胞中存在着为 NS-1 蛋白基因表达的条件。

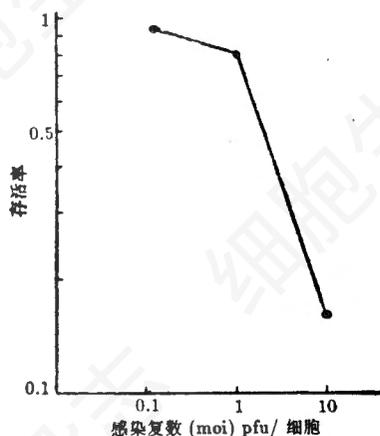


图2 HuL-1细胞经不同moi的H-1病毒感染后的存活曲线。细胞感染后10天测定，每一点是3瓶细胞的平均值。

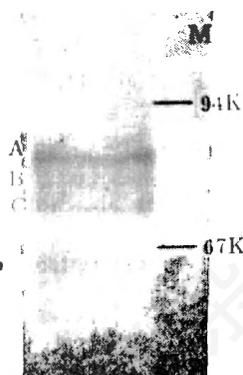


图3 HuL-1细胞中H-1病毒NS-1蛋白(A、B、C)的表达。M, 标准蛋白分子量, moi = 5 pfu/细胞, 曝光时间为24小时。

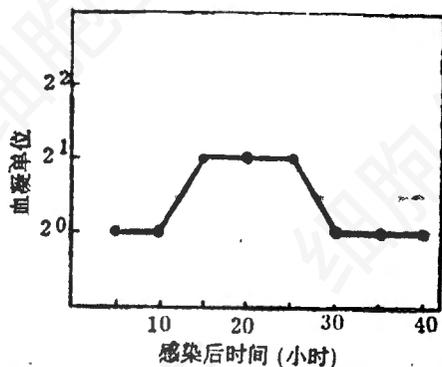


图4 HuL-1细胞中H-1病毒抗原检出的动力学过程。moi = 5 pfu/细胞。

血凝试验表明, 在上清培养基中检测不到H-1抗原, 其原因可能是浓度太低的缘故。但在细胞裂解物中, 却可检测到H-1抗原(图4), 并在感染后15—25小时达到最大值。

## 讨 论

众所周知, 体外正常肝细胞株的建立是尚未完全解决的问题。虽然HuL-1细胞在建株时的染色体数已呈异常<sup>[8]</sup>, 但在我们实验室早期(1987)的工作中仍显示出正常细胞的一些特性, 如在软琼脂中不能形成集落<sup>[3]</sup>。现在经过数年的传代、培养, HuL-1细胞已发生了明显的恶性转化, 本研究进行的软琼脂集落试验、裸鼠体内成瘤试验以及组织切片观察都证实了这一点。细胞在体外长期培养过程中发生自发转化是常见的现象, 有意义的是, 这一转化伴随着细胞对H-1病毒由不敏感<sup>[3]</sup>到敏感, 再次证实了细小病毒H-1对转化细胞有选择性的抑制作用。这一工作和我们实验室以前进行的一系列研究<sup>[3,5,7,13]</sup>一样, 表明了H-1病毒用于防治某些肿瘤的可能性。自然, 在谈到这一点的时候不能不关注到病毒DNA与宿主细胞DNA的相互关系。如果病毒DNA以整合的方式与宿主细胞DNA发生作用, 那么在其发挥对转化或肿瘤细胞抑制作用的同时, 还存在着干扰正常细胞基因表达并通过细胞分裂将这种破坏性因子传到子代的可能性, 这将成为利用细小病毒防治肿瘤的一个重要的制约因素。不过资料表明<sup>[14]</sup>, 至少在结构上与H-1很相近的细小病毒MVM的DNA是不整合到细胞基因组中的。

关于细小病毒对肿瘤或转化细胞抑制作用的机制, 现在尚不是很清楚。目前一般认为, 敏感细胞和抗性细胞在病毒的进入上并无差异<sup>[15]</sup>, 差异是表现在以后的过程中。关于细小病毒DNA在细胞中的扩增对病毒产生细胞毒的作用, 实验结果颇不一致。在一些敏感细胞中观察到细小病毒DNA的大量扩增<sup>[15]</sup>, 而在另一些研究中敏感细胞和抗性细胞在DNA

扩增水平上并无显著差异<sup>[11]</sup>。同样也有人提出<sup>[16]</sup>，细小病毒是否完成其增殖周期，即是否产生完整的病毒也不是病毒产生细胞毒的必要条件。目前较一致的实验结果是，就细小病毒 H-1、MVM 而言，病毒非结构蛋白 NS-1(可能还有 NS-2)是产生细胞毒的决定因素<sup>[17,18]</sup>。本文结果表明，H-1 病毒对转化了的人胎肝细胞 HuL-1 的抑制作用，既与病毒 DNA 的大量扩增有关，也与 NS-1 蛋白基因的表达有关。此外，由于检测到了病毒抗原，也不能排除产生完整病毒颗粒的可能作用，对此我们将进一步观察。

### 摘 要

H-1 属自主性细小病毒，对相当多种类的体内外生长的肿瘤细胞和转化细胞有抑制作用。本文报道了人胎肝细胞株 HuL-1 在其发生自发转化后，对 H-1 病毒感染的敏感性同时发生了变化的结果。

HuL-1 细胞经数年体外培养后其性状发生了明显变化，在 0.3% 软琼脂中的集落形成率达 20.1%，在裸小鼠体内能形成实体瘤，且瘤块的组织切片显示出癌细胞的特性。与此同时，HuL-1 细胞对 H-1 病毒的感染表现出一定的敏感性。而 HuL-1 细胞在数年前并不表现出转化细胞的特性，对 H-1 感染也是不敏感的。结果显示，HuL-1 细胞对 H-1 敏感性的提高与其本身的自发转化是密切相关的。

本文研究了上述敏感性的可能机制。结果表明，受感染细胞存活率的下降，伴随着病毒抗原的产生，也伴随着 H-1 DNA 复制量的明

显增加，以及 H-1 非结构蛋白 NS-1 基因的表达。

### 参 考 文 献

- [1] Toolan, H. W., 1967, *Nature*, 214: 1036.
- [2] Toolan, H. W., 1982, *Cancer Res.*, 42: 2552.
- [3] 苏兆众等, 1987, 中国科学(B 辑), 4: 403
- [4] Dupressoir, T. et al., 1989, *Cancer Res.*, 49: 3203.
- [5] 郭兰萍等, 1988, 细胞生物学杂志, 10 (3): 125.
- [6] Chen, Y. Q. et al., 1986, *Cancer Res.*, 46: 3574.
- [7] Lin Wanmin et al., 1989, *Chinese J. Cancer Res.*, 1: 15.
- [8] Katsuta, H. et al., 1980, *Japan. J. Exp. Med.*, 50: 329.
- [9] Tattersall, P. et al., 1976, *J. Virol.*, 20: 273.
- [10] Lavi, S., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78: 6144.
- [11] Cornelis, J. J. et al., 1990, *J. Virol.*, 64: 2537.
- [12] Cotmore, S. F. and Tattersall, P., 1986, *J. Virol.*, 58: 724.
- [13] 严尚军等, 1992, 中国细胞生物学学会第五次会议论文摘要汇编, p. 124.
- [14] Richards, S. F. and Armentrout, R. W., 1979, *J. Virol.*, 30: 397.
- [15] Chen, Y. Q. et al., 1989, *Carcinogenesis*, 10: 163.
- [16] Guatte, E. et al., 1990, *J. Virol.*, 64: 458.
- [17] Brandenburger, A. et al., 1990, *Virology*, 174: 576.
- [18] Caillet-Fauquet, P. et al., 1990, *EMBO J.*, 9: 2989.

**书讯** 《图解哺乳动物发育工程实验方法》译自世界著名生物工程教授菅原七郎的近期著作，内容新颖、丰富、图文并茂，简明易懂。该书以图解方式详细介绍哺乳动物发育工程的基础理论，介绍从体外受精到胚胎生成、分割与移植、多倍体胚胎的制作、染色体分析、外来基因导入等数 10 项实验方法。同时还详细介绍该工程实验过程中所需的各项设备、器械以及所需试剂的制备等。书后附有各种培养液的配方和多种哺乳动物生殖生理资料。本书可供医学、细胞学、生物学、遗传学、遗传工程和畜牧兽医的专业人员及从事有关专业的开发工作者阅读参考。本书由南京大学出版社出版，定价 25 元。如欲购买请与南京大学环境科学系孔志明联系，邮编：210008。