

诱导凋亡:脊髓灰质炎病毒致细胞病变的机制

李艳平 胡云章 胡凝珠 邵聪文 何继宏 瞿素 梁燕 钱亚屏

(中国医学科学院、中国协和医科大学 医学生物学研究所 昆明 650107)

病毒与宿主细胞的关系,特别是病毒感染最终通过什么机制引起宿主细胞死亡,是人们多年来一直关注的问题^[1,2]。细胞凋亡是在一定的生理或病理条件下,遵循自身的程序,通过基因调控,激活内源性的核酸内切酶,发生细胞自动消亡的过程^[3]。细胞凋亡作为生命的基本现象之一受到广泛重视,对其机理和应用的研究已渗透到生命科学的各个领域,成为当今生命科学领域的研究热点^[4]。特别是为研究病毒与宿主细胞关系提供了新的思路。近年来报道了许多病毒,如杆状病毒、人免疫缺陷病毒、麻疹病毒、鸡贫血病毒、疱疹病毒、腺病毒等可以通过诱导凋亡导致细胞死亡^[5,6]。但这一机制是否具有普遍性? S. K. Chiou 等^[7]发现通过抑制 E1B 缺陷型腺病毒引起的凋亡,可以提高病毒的产量。这是否提示在疫苗生产中,可以通过抑制凋亡达到提高产量的目的?

Ⅲ型脊髓灰质炎减毒活疫苗(中Ⅲ-2)是我国自行研制的减毒活疫苗,是无包膜单链 RNA 病毒,在生产中发现当其感染细胞后出现典型的细胞病变(Cytopathic effects, CPE)特征:早期细胞由长梭形收缩为圆形,细胞表面出芽;中期细胞从培养壁上脱落;晚期细胞破裂释放出病毒。这一现象是否可能与凋亡有关? 本文用脊髓灰质炎减毒活疫苗株(中Ⅲ-2)感染我国自己建立、并经卫生部批准已用于生物制品生产的人胚肺二倍体成纤维细胞株(KMB17)^[8],研究其诱导 CPE 的机制。

材料与方 法

一、细胞及病毒

1. 人胚肺二倍体细胞株 KMB17:由医学生物学研究所提供。

2. 脊髓灰质炎病毒减毒株(中Ⅲ-2):由医学生物学研究所提供。

3. 凋亡细胞膜成分变化的 Annexin V 联合 PI 法检测试剂盒:ANNEXIN V FITC KIT 由 IMMUNOTECH A COULT COMPANY (Marseille France) 提供。

二、细胞及病毒培养

将代次为 20—30 代、正常生长的人二倍体细胞(KMB17)用胰蛋白酶消化后分种于塑料培养瓶中(T25 Corning),细胞生长营养液为:新生牛血清 10%、MEM 水解乳蛋白混合液 85%、谷氨酰胺 2%、卡拉霉素 1%。37℃ 培养三天、细胞长成汇流状单层后,倾弃生长营养液,加入不含血清的病毒液后(浓度 0.6—0.8ml 病毒液/150ml 培养液;MOI 为 5),置 37℃ 吸附 1 小时后,加入含 2% 血清的营养液 35℃ 培养。

三、病毒感染 KMB17 细胞后感染性滴度及细胞存活率检测

将病毒感染的细胞分别于 12 小时、24 小时、36 小时、48 小时用胰酶消化后收集,一式两份,一份用台盼兰染色计数活细胞比率;另一份用微量组织培养技术测定其感染性滴度。其过程是,将样品按 10 倍稀释,取稀释之病毒 5—6 个稀释度,用定量加样器加入 96 孔微量培养板。每个稀释度加 4 孔,每孔 0.025ml,然后,每孔加入浓度为 $5-10 \times 10^3/0.1\text{ml}$ 的 HEP-2 细胞悬液 0.1ml,盖上盖子后置 5%CO₂ 培养箱(34.5℃ ± 0.5)培养 7 天。第 7 天用倒置显微镜检查细胞病变 CPE。其结果以 Kärber 法计算微量培养感染性滴度(MTCD₅₀/ml)。

四、取样

整个试验取样分为两个阶段,第一阶段在光学显微镜下观察,出现典型 CPE 特征:细胞圆缩时,将正常梭

1999 年 3 月 4 日收到,2000 年 2 月 9 接受。

形形态对照细胞及变成圆形的细胞用胰蛋白酶消化后加入 0.1mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS),离心弃上清、加入 70%的冷乙醇固定细胞,保存于-20℃备用^[9]。第二阶段当出现圆缩脱落细胞裂解时用胰蛋白酶消化收集所有细胞于 70%的冷乙醇固定,保存于-20℃备用^[9]。用于流式细胞仪检测的样品只用 PBS 保存。

五、凋亡细胞膜成分变化的 Annexin V 联合 PI 法检测

将不同时间收集的细胞经磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗两次后,按操作说明书加入 Annexin V 缓冲液洗一次,再用吸附缓冲液悬浮。检测前加入 Annexin V FITC 培养 10 分钟,用含 1.5mmol/L CaCl₂ 的培养基洗细胞除去未吸附的 Annexin V FITC,最后加入 propidium iodide(PI)工作液冰浴 15 分钟,将细胞置激发光为 480nm 波长的 EPICS XL 流式细胞仪(Coulter, Hialeah, Fla. USA)检测。每个样品检测 10⁴ 细胞,重复三次。用 Lysis I 软件分析结果。同时以无病毒感染的细胞为对照。

六、DNA 断裂的凝胶电泳分析

将收集的细胞加入 1ml 裂解液(100mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 25mmol/L EDTA, 0.5% SDS, 0.2mg/ml proteinase K), 56℃裂解 4 小时后,用等体积的饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提一次,再用氯仿异戊醇(24:1)抽提。抽提上清加入冷无水乙醇沉淀 DNA, 4℃、14000g 离心 30 分钟,冷无水乙醇洗两次,室温下干燥后加入 10mmol/L Tris-HCl, pH7.5, mmol/L EDTA, 0.5mg/ml RNase, 37℃消化 2 小时。用 1%琼脂、40V 电压电泳, Ethidium bromide 染色后观察^[10]。

七、光学显微镜观察

在不同的培养时间,将经过 Poliovirus(中Ⅲ-2)感染的细胞及未感染正常生长的细胞置于 Olympus 相差显微镜下观察。正常的 KMB17 细胞是细梭形,细胞失去梭形形态、先圆缩,随后从培养瓶壁上脱落。

八、荧光显微镜观察

将离心收集的圆缩细胞与吖啶橙(AO)混合后涂于载玻片上,置于 Zeiss axioplan 荧光显微镜下观察^[11]。用成像处理系统(Astromed/Visilog. PC486DX2, 66MHz VL),水银灯作为激发光源、470-490nm 滤光片及 500nm 双色光栅。荧光显色通过 520-550 滤光片成像。

结 果

1. 脊髓灰质炎病毒感染人二倍体细胞

KMB17 后的病毒繁殖与细胞存活率关系

从图 1 可看出,Ⅲ型脊髓灰质炎病毒(中Ⅲ-2)感染人二倍体细胞 KMB17 后的病毒繁殖与细胞存活率成反比例关系,随着病毒繁殖量不断增大,细胞的存活率由最初(0 小时)97%逐渐下降,到 48 小时病毒微量培养病毒感染性滴度达最高值(10⁷ CCID₅₀/ml),而细胞存活率仅为 19%左右。

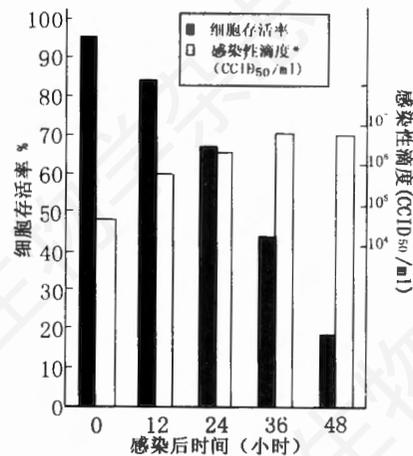


图 1 脊髓灰质炎病毒感染 KMB17 后感染性滴度与细胞存活率关系

2. 人二倍体细胞 KMB17 经脊髓灰质炎病毒感染后的形态特征

人二倍体细胞长成汇流状单层(图版图 A),经Ⅲ型 Poliovirus(中Ⅲ-2)感染后 24 小时,光学显微镜下可见正常梭形的细胞体积缩小,细胞由长梭形逐渐圆缩,细胞间出现空隙,部分细胞脱落至溶液中(图版图 B)。细胞经吖啶橙染色荧光显微镜下观察结果显示未感染病毒正常细胞核除核仁及异染色质染色较深外染色质均一(图版图 D),而经感染病毒的细胞核出现凝缩、染色质集中于核膜周边(图版图 C)。电镜结果进一步证明凋亡时核染色质凝缩后分布于核膜边缘(图版图 F),进而形成凋亡小体(图版图 H)。而在感染后 48 小时脱落至溶液中细胞裂解时,电镜观察发现细胞已崩解成碎片(图版图 G),呈典型坏死特征,这一形态改变说明Ⅲ型

Poliovirus (中Ⅲ-2) 感染人二倍体细胞 (KMB17) 后, 早期诱导的 CPE 是细胞凋亡过程, 晚期导致细胞二级坏死 (Secondary Necrosis)。

3. 流式细胞仪检测

流式细胞仪被认为是当今检测细胞凋亡最敏感、最可靠的检测方法。研究证明在细胞凋亡早期位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸外翻至细胞外侧, 利用对磷脂酰丝氨酸具高度亲和力的磷脂蛋白 (Annexin V) 可检测出早期凋亡细胞, 而且与 PI 染色法联合应用可区分出凋亡细胞与坏死细胞。因此该法比 TUNEL 法更具特

异性。汇流状细胞经 Poliovirus 感染后 24 小时出现圆缩, 用 Annexin V 联合 PI 法检测发现 70.5% 的细胞出现在第四区域 (凋亡区), 仅有 1.8% 的细胞出现在第二区域 (坏死区); 而未受病毒感染的对照细胞 (98%) 则出现在第三区域 (正常区), 说明此时 Poliovirus 感染引起的主要是凋亡 (图 2-A、B)。而在 Poliovirus 感染后 48 小时, 63.3% 的细胞位于第二区域 (坏死区)、16.6% 的细胞位于第四区域 (凋亡区)、15.6% 位于正常细胞区域 (正常区), 说明此时 Poliovirus 感染引起的主要是坏死 (图 2-C)。

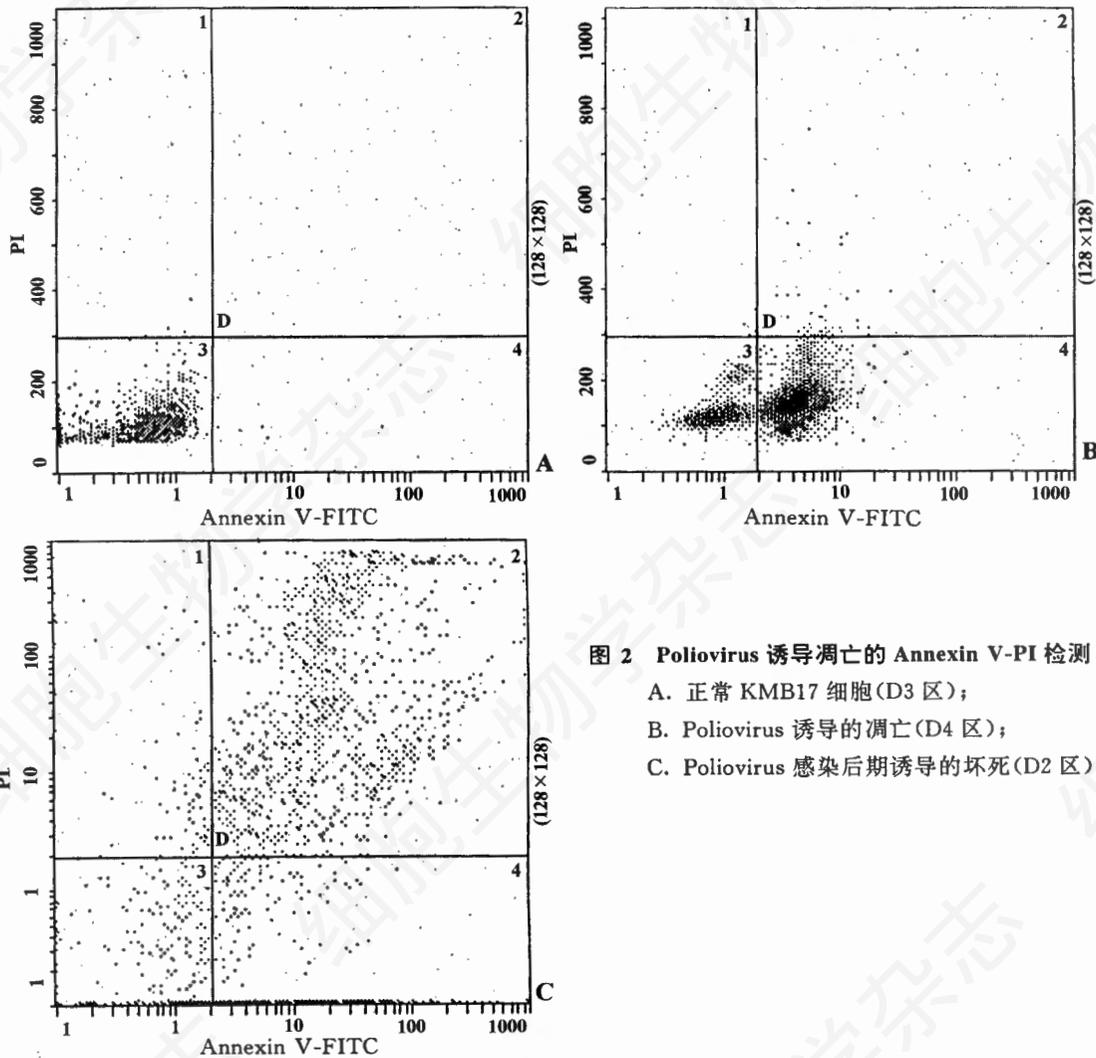


图 2 Poliovirus 诱导凋亡的 Annexin V-PI 检测

- A. 正常 KMB17 细胞 (D3 区);
- B. Poliovirus 诱导的凋亡 (D4 区);
- C. Poliovirus 感染后期诱导的坏死 (D2 区)。

4. 生化特征

DNA 电泳显示汇流状细胞经 Poliovirus 感染后染色体 DNA 出现断裂,但不是典型的梯形电泳。而正常对照则未出现 DNA 断裂(图 3)。

讨 论

细胞凋亡是不同于细胞坏死的细胞死亡方式。二者在形态、生理特征及生化性质上有明显差异,在凋亡过程中呈现细胞间联系中断,细胞质密度增大,体积缩小,染色质固缩分离并趋向于核膜形成新月状进而出现有膜包被的凋亡小体,其生化特征是 DNA 断裂形成寡核小体大小的片段,在 DNA 电泳上出现梯形^[12]。目前,通常以五个指标综合确定细胞凋亡,即光镜下细胞圆缩、荧光镜下细胞核凝缩甚至裂解成凋亡小体、DNA 电泳呈梯形、电镜下核异染色质凝缩于核膜边缘呈新月状。流式细胞仪检测在凋亡早期出现的膜内侧的磷脂酰丝氨酸外翻至外侧,并能有效地区别凋亡与坏死。所有检测方法中最敏感的方法是 Annexin V 联合 PI 法。

脊髓灰质炎减毒活疫苗病毒(中Ⅲ-2)感染人胚肺二倍体成纤维细胞(KMB17)后病毒的繁殖与细胞存活率成反比:病毒繁殖率低时细胞存活率高、病毒繁殖率高时细胞存活率低,说明细胞的死亡是由病毒感染引起。从形态发生的角度看在病毒感染至细胞裂解的过程中细胞形态变化分为两个阶段:第一段是病毒(中Ⅲ-2)感染人胚肺二倍体成纤维细胞(KMB17)后至细胞裂解前为止。在这一阶段出现典型的细胞病变(CPE)特征:细胞由长梭形收缩为圆形,体积缩小,最终脱落至溶液中。我们用细胞凋亡检测方法研究发现,这一病变过程实际上是一个凋亡过程,具典型的凋亡特征:光镜下细胞圆缩、体积缩小;荧光镜下染色质固缩在核膜边缘(图版图 F)、进而出现凋亡小体(图版图 H);流式细胞仪检测出现凋亡比率高达 70.5%;染色体 DNA 断裂但 DNA 电泳未呈现典型的梯形。胡

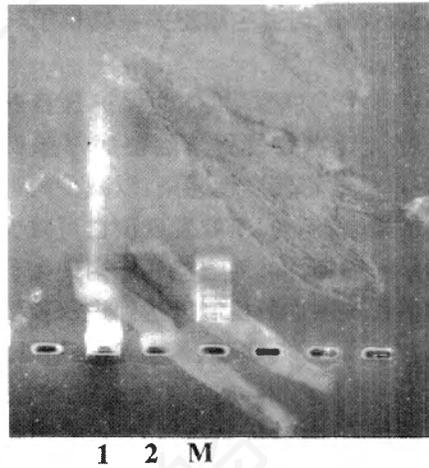


图 3 Poliovirus 诱导凋亡的 DNA 电泳结果

1. Poliovirus 诱导的 DNA 断裂;
2. 正常 KMB17 细胞的 DNA 未断裂;
- M. DNA Marker.

庆柳等发现凋亡时有的成纤维细胞不出现典型的梯形电泳,而呈现随机断裂^[13],说明 DNA 梯形电泳与细胞本身的遗传特性有关。第二阶段是细胞裂解,用电镜及 Annexin V 联合 PI 法证明这一裂解过程是二级坏死(Secondary Necrosis)过程。过去的研究发现,随着凋亡过程的发展,在凋亡后期常引起二级坏死^[14]。Poliovirus 诱导的二级坏死与一般坏死的区别主要是:病毒诱导的二级坏死前经过一个凋亡阶段,后期发展为坏死,时间过程较慢;而一般由强烈环境压力引起的坏死则不经凋亡阶段直接引起细胞崩解坏死,时间过程较时间过程较短、快。

过去对 Poliovirus(中Ⅲ-2)引起的 CPE 认识只停留在形态学的水平,我们的结果证明 Poliovirus 感染人胚肺二倍体成纤维细胞(KMB17)后细胞形态变化分为两个阶段:第一阶段是致 CPE 过程,导致形态学上特有的细胞圆缩、体积缩小等 CPE 特征,其本质是 Poliovirus 诱导细胞凋亡;第二阶段是 Poliovirus 诱导细胞二级坏死,以利于释放子代病毒。

Poliovirus 感染细胞后诱导凋亡为进一步研究 Poliovirus 与宿主细胞关系提供了一条新思路。

从进化的角度看,机体为保护自身进化发展了一套通过凋亡过程清除被病毒感染的细胞,并且造成病毒流产性感染,以减少病毒进一步感染的机制,例如,研究发现凋亡可减少病毒的繁殖量和感染性。而一些病毒则进化了一套抑制宿主细胞凋亡的机制以达到进一步繁殖的目的。如丙型肝炎病毒、腺病毒、SV40 等^[6]。Antoni 等^[15]发现通过抑制人免疫缺陷病毒(HIV)诱导的凋亡,从而提高 HIV 的病毒繁殖量,并进一步引起持续性感染。Chiou 等^[7]证明抑制 E1A 缺陷型腺病毒诱导的凋亡提高了病毒繁殖量。Clem^[16]发现凋亡能降低杆状病毒的体外繁殖量和体内感染性。提示抑制凋亡是提高病毒产量的一条途径。我们的研究证明脊髓灰质炎病毒(中Ⅲ-2)在人二倍体成纤维细胞(KMB17)中的繁殖实际上是一个诱导凋亡过程。这一结果提示,在脊髓灰质炎减毒活疫苗生产中通过抑制凋亡有可能提高该病毒疫苗的产量。

摘 要

用脊髓灰质炎病毒(Poliovirus)减毒活疫苗株(中Ⅲ-2)感染人二倍体胚肺成纤维细胞株(KMB17)后,细胞形态变化分为两个阶段:第一阶段是致 CPE 过程,导致形态学上特有的细胞圆缩、体积缩小等 CPE 特征,经光学显微镜、荧光显微镜、细胞流式仪、电子显微镜、DNA 凝胶电泳分析,证明该疫苗株诱导的细胞病理改变具典型的凋亡特征:细胞圆缩、细胞核浓缩破裂、核染色质凝缩后分布于核膜边缘、绝大部分细胞出现在凋亡区域、DNA 断裂。表明脊髓灰

质炎病毒诱导的 CPE 本质是一个诱导细胞凋亡过程;第二阶段是 Poliovirus 诱导细胞坏死。进一步提示有可能通过抑制细胞凋亡提高脊髓灰质炎减毒活疫苗的产量。

关键词: 脊髓灰质炎病毒 细胞病变 细胞凋亡

参 考 文 献

- [1] 梁凤霞等,1993,微生物学报,33:161-165.
- [2] 王小忠等,1994,微生物学报,34:345-354.
- [3] Zhou T, et al., 1995, *J. Clin. Immunol.*, 15: 1-6.
- [4] Linda J. M And Jean M, 1998, *Science*, 281: 1301-1302.
- [5] Vincent O. B., 1998, *J. Gen. Virol.*, 79: 1833-1845.
- [6] Esolen, L. M., et al., 1995, *J. Virology*, 169:3955-3958.
- [7] Chiou, S. K. and W. Eileen, 1998, *Virology*, 244:108-118.
- [8] Guo R., Y., et al., 1981, *Proc. Chinese Acad. Med. Sci.*, 3:226-230.
- [9] 周剑峰等,1997,癌症,16:248-253.
- [10] Fumio F, et al., 1998, *Experimental Cell Research*, 242:92-99.
- [11] 熊琛等,1998,同济医科大学学报,19:120-124.
- [12] Majno, G. and I. Joris., 1995, *Am. J. Pathol.*, 146:3-6.
- [13] 胡庆柳等,1998,细胞生物学杂志,20:76-78.
- [14] Honda O, et al., 2000, *Int. J. Oncol.*, 16: 283-288.
- [15] Antoni B A, et al., 1995, *J. Virol.*, 69:2384-2392.
- [16] Clem R J and L K. Miller., 1993, *J. Virol.*, 67:3730-3738.

APOPTOSIS: A MECHANISM FOR POLIOVIRUS TO INDUCE CYTOPATHIC EFFECTS

LI Yan Ping HU Yun Zhang HU Ning Zhu SHAO Cong Wen
HE Ji Hong Qu Su LIANG Yan QIAN Ya Ping
(Institute of Medical Biology, 650107, Kunming, PRC)

ABSTRACT

In order to study the relationship between cytopathic effects and apoptosis, we used type-III live attenuated Poliovirus vaccine (Strain: Zhong III-2) to infect the human diploid fibroblast (KMB17) in culture. There were two kinds of different morphological changes occurred during the whole infection by Poliovirus. At the first stage, the typical CPE appeared, the confluent KMB17 fibroblast rapidly shrank and disintegrated 24 hours after Poliovirus infection, through the analysis of light microscopy, fluorescent light microscope, electronic microscopy, flow cytometer and DNA electrophoresis, it were demonstrated that the CPE cells showed the typical apoptotic characteristics of cellular shrinkage, nuclear shrinkage, crescent chromatin around nuclear membrane, DNA breakage (although not typical ladder type). At the second stage, the characteristics of secondary necrosis appeared, cellular lysis and chromatin breakdown were detected by electronic microscopy and flow cytometer. In conclusion, we demonstrated that Poliovirus causes both apoptosis and secondary necrosis in cell culture, the CPE caused by Poliovirus is actually the apoptosis in human diploid fibroblast (KMB17).

Key words: Cytopathic effects Apoptosis Human embryonic lung diploid fibroblast

钙结合蛋白 D-9K 基因原核表达载体的构建、 表达产物纯化及其多克隆抗体的制备*

柯碧霞** 王健 沈卫英 高建民** 申庆祥***

(上海市计划生育科学研究所 上海 200032 **福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

钙结合蛋白(Cabp)D-9k 是小鼠着床时子宫内膜腔上皮和腺上皮分泌的蛋白,最早在小鸡壳腺体和大鼠的小肠中发现^[1]。由于 CabpD-9k 是跨细胞 Ca^{2+} 运输的介质,介导 Ca^{2+} 信号转导,在促进胚胎发育^[2],滋养层细胞分化,诱导蜕膜反应,以及提高着床效率中起重要的作用^[3,4]。所以研究子宫内膜 Ca^{2+} 信号转导已成为哺乳动物子宫生物学的重要研究对象,并认为有可能通过免疫干扰着床而达到抗生育的效果。

为制备抗 CabpD-9k 抗体和探索 CabpD-9k 在着床中的作用机理,首先必须分离纯化得

到足够量的 CabpD-9k。为此,拟采用基因重组技术制备 CabpD-9k。我们构建了含 CabpD-9k- β hCG cDNA 的表达质粒,并在大肠杆菌中表达,先制备含 CabpD-9k- β hCG 融合蛋白的包涵体,进而在 AKTA explorer(Pharmacia)中低压液相分析系统上,利用 RESOURCETMRPC(反向

本文 2000 年 1 月 21 日收到,4 月 6 日接受。

* WHO 资助项目(编号 97826)和国家重点基础研究规划项目(编号 G1999055903)。

*** 通信联系人。