

感染流行性出血热病毒的正常人骨髓 细胞膜脂和酶生物活性的研究

曾令兰 罗端德[✓]蔡淑清 刘薇 杨渝珍· 郭劲松

(同济医科大学协和医院传染病教研室, 武汉 430022)

R512.802

A 提 要 采用疏水性荧光探针 DPH(1, 6, -二苯基-1, 3, 5, -已三烯)标记感染了流行性出血热病毒的正常人骨髓细胞的细胞膜, 根据荧光偏振值的变化推导出膜脂流动性, 同时通过细胞组化染色定量方法, 测定细胞内酸性磷酸酶(ACP)和琥珀酸脱氢酶(SDH)的活性。动态观察 1、6、24、72 h 培养后的淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞, 发现感染后细胞膜脂的流动性明显降低, 并随培养时间的延长而明显, 和正常对照组比较有显著性差异($P < 0.05 \sim 0.01$)。通过组化染色和显微分光光度计单细胞扫描定量认为: 感染细胞在培养开始的 72 h 内 ACP、SDH 升高, 120 h 后明显下降, 和正常相比亦有显著差异($P < 0.05$), 这与病毒侵犯和细胞机能的受损程度有关。

关键词 流行性出血热病毒, 骨髓细胞, 细胞膜脂流动性, 细胞内酶活性

细胞膜脂的流动度与细胞的增殖和恶性度有关, 在肿瘤细胞逃避生长控制的发病机理中有重要意义^[1]。迄今尚未有人研究过流行性出血热病毒感染正常人骨髓细胞后细胞膜脂流动性的变化, 病毒感染骨髓细胞后细胞内酶活性的变化亦研究较少, 为此我们进行了有关研究, 现将结果报道如下。

材料和方法

1 细胞培养

脐前或脐后上棘穿刺, 取正常志愿献髓员骨髓液 10 ml, 肝素抗凝, 用比重为 1.077 的 Ficoll-Hypaque 分离出淋巴细胞; 比重为 1.84 的 Ficoll-Hypaque 分离出中性粒细胞; 用单个核细胞贴壁 24 h 的方法分离出单核细胞, 分别用 Hanks 液洗 3 次, 调整细胞数为 $1 \cdot 10^7$ 个/ml, 置于培养瓶中悬浮培养, 加入 RPMI 1640 培养液 10 ml (内含 10% 小牛血清, 100 ng PHA), 置于 37℃, 5% 浓度的 CO₂, 100% 湿度的 CO₂ 培养箱中培养。

2 病毒接种

2.1 病毒制备 感染流行性出血热陈株的鼠脑组织(安徽省医学科学院提供), 经 Vero-E6 细胞传代 4 次收获, 反复冻溶 3 次, 离心后取病毒悬液于 E₆ 细胞上滴定, 其滴度为 4.5 log TCID₅₀ (Reed-Muench 方法), 置于 -60℃ 备用。

2.2 接种方法 三种细胞分别培养 3 d 后, 离心弃上清, 直接种入陈株病毒悬液 1 ml, 放 37℃ 作用 1 h, 重新加入含 10% 小牛血清, 100 ng PHA 的 RPMI 1640 10 ml, 继续培养 1、6、24、72 h, 同步设无病毒感染的同样基质的正常人同种骨髓细胞作对照。

3 细胞膜脂流动性的测定

将培养后的细胞调至到 $6 \cdot 10^6$ /ml, 其中活细胞占 90% 以上(台盼蓝拒染测定)。制备好的细胞悬液, 按

本文于 1995 年 4 月 3 日收到, 7 月 7 日修回

• 同济医科大学实验中心分子生物学研究室 武汉 430022

每管 0.5 ml 分装于试管中,于 37℃ 保温 30 min 后,加入 0.5 ml DPH(1,6,-二苯基-1,3,5-乙三烯)工作液,继续保温 30 分钟进行标记。

4 荧光偏振度的测量

选择 Hitachi-850 型荧光分光光度计“POLARIZATION”项目,具体按操作说明书进行,仪器自动处理数据,直接给出偏振值,细胞膜脂流动度(F),按公式: $F = (P_{max}/Pr - 1)/Pr$ 计算。其中 Pr 代表荧光偏振度测量值, P_{max} 代表理论极限值($P_{max} = 0.5$),Pr 值与 F 值呈反比关系^[1]。

5 细胞组化染色与定量

按经改良的 Gomori ACP 和 Pearson SDH 法染色,在光镜下依细胞化学反应的颜色深浅进行定性观察,并用 Rechart-Jung-Untvar 型(德国)显微分光光度计透射光进行单细胞扫描,测定细胞化学酶定量,每片随机测定 50 个细胞,取其吸收光度均值进行两组细胞酶定量的动态比较。

结 果

动态观察 1、6、24、72h,三种细胞荧光偏振值和细胞膜脂流动度的变化见表 1。均是感染组细胞膜脂的流动性低于未感染组($P < 0.05 \sim 0.01$)。

表 1 三种细胞荧光偏振值和细胞膜脂流动性的动态变化 ($\bar{X} \pm S$)

Tab 1 Dynamic change for values of fluorescence polarization and cellular membrane lipid fluidity in three kinds of cell

		1h		6h		24h		72h	
		Pr	F	Pr	F	Pr	F	Pr	F
淋巴细胞 Lymphocyte	感染组 Infected group	0.283 ± 0.002	2.709	0.224 ± 0.004	5.500	0.261 ± 0.004	3.503	0.306 ± 0.001	2.071
	未感染组 Noninfected group	0.271 ± 0.002	3.118*	0.221 ± 0.001	6.491*	0.182 ± 0.003	9.600**	0.196 ± 0.004	7.913**
中性粒细胞 Granulocyte	感染组 Infected group	0.243 ± 0.001	4.352	0.192 ± 0.004	8.350	0.204 ± 0.001	7.112	0.239 ± 0.004	4.869
	未感染组 Noninfected group	0.173 ± 0.003	10.925**	0.129 ± 0.005	22.290**	0.149 ± 0.003	19.810**	0.155 ± 0.005	14.365**
单核细胞 Monocyte	感染组 Infected group	0.203 ± 0.002	7.207	0.183 ± 0.002	9.466	0.269 ± 0.003	3.192	0.288 ± 0.008	2.555
	未感染组 Noninfected group	0.201 ± 0.001	7.405	0.142 ± 0.001	17.754**	0.148 ± 0.001	16.070**	0.159 ± 0.004	13.408**

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

感染组与未感染组细胞膜脂流动度的比值见表 2。三种细胞均是流动度随病毒感染的时间增加而逐步降低,其中淋巴细胞在 24 h 变化最为明显,中性粒细胞在 1 到 72 h 的培养时间中缓慢下降,在整个培养期间均处于较低值水平,而单核细胞在 6、24 h 变化明显,72 h 后明显低于淋巴细胞和中性粒细胞。

表 2 三种感染细胞和未感染细胞膜脂流动性的比值

Tab 2 The ratio for cellular membrane lipid fluidity in three kinds of infected and noninfected cells

	1h	6h	24h	72h
淋巴细胞 Lymphocyte	0.868	0.847	0.365	0.261
中性粒细胞 Granulocyte	0.398	0.374	0.359	0.339
单核细胞 Monocyte	0.973	0.533	0.198	0.189

用显微分光光度计,分别以波长 480 nm 和 570 nm,扫描点为 0.25 μ 进行单细胞扫描,分别测定 ACP 和 SDH 吸收光度,通过电子计算机处理各酶染细胞的各扫描点数据,求出每个细胞的吸收光度均值。在 ACP 组,24 h 测定值出现差异,病毒组较正常组高,72h 更高,120h 明

显低于正常,统计学处理 P 均 < 0.05 。在 SDH 组结果亦是如此(P 均 < 0.05)(见表 3)。

表 3 ACP,SDH 吸收光度均值

Tab 3 The averages of absorbed light degree for ACP and SDH

	ACP			SDH		
	24	72	120h	24	72	120h
正常组 Normal group	4440	9961	1495	1722	4820	1634
病毒组 Virus group	8507*	10887*	623'	3418'	5745'	746'

* $P < 0.05$

讨 论

许多疾病都伴有细胞膜脂质成分和流动性的变化,利用荧光偏振这种新的物理实验技术探索这种变化在诊断和研究疾病进展中的意义已引起临床医师的高度兴趣。根据文献报道,白血病、淋巴瘤、小儿呼吸窘迫症时,细胞脂质流动性均有明显变化^[2]。

在正常情况下,完整的细胞膜动力学变化具有两个特征:(1)膜脂及其引起的膜流动性变化的不均一性;(2)膜脂流动度的改变与存在的蛋白之间的相互作用。细胞膜的各种重要功能(包括能量转换、物质运送、信息传递)都与膜的流动性密切相关,它的异常往往导致细胞病变的发生^[3];以往对流行性出血热感染细胞膜的流动性变化注意不够,这主要是缺乏可靠的实验手段。DPH 偏振度的变化能较客观地反映膜流动性的总体变化规律。根据我们的研究,在四个不同时期培养后,三种细胞感染组膜流动性均明显降低,表明正常骨髓细胞感染了流行性出血热病毒后,病毒的侵犯影响了细胞膜脂的正常分布或完整性,使它的蛋白和脂质发生量和质的变化,从而影响正常功能。

随着培养时间的逐步延长,感染后细胞与未感染细胞膜脂流动度的比值逐步降低,这与病毒侵犯的程度有关;侵犯越深,膜脂流动度的比值越明显下降,然而各类细胞对病毒侵犯的敏感性不同。病毒感染后,淋巴细胞培养 24 h,膜脂流动度的比值进一步明显下降,但与单核细胞相比敏感性要低,后者培养 6 h 后膜的活动度就有异常,这也和其他人的试验相符合。姚氏认为流行性出血热病毒(EHFV)A₀ 株能够在体外培养的人外周血细胞中繁殖,单核细胞对该病毒的敏感性高于淋巴细胞^[4]。然而单核细胞和中性粒细胞亦有所不同,前者的下降是一个突然的过程,而后者的下降是一渐进、缓慢的过程。前者下降幅度明显,后者下降幅度从病毒感染后始终位于较低水平。这种细胞成分的差异对于病毒感染反映的异质性在流行性出血热发病机理中具有一定的意义,说明中性粒细胞是病毒感染的主要靶细胞,和我们以前的观察相一致^[5]。

ACP 活性变化可反映溶酶体的机能状态,SDH 的活性变化反映线粒体的机能状态,当细胞病变或损伤时,两者的活性发生变化,首先是溶酶体膜受到损伤,致使溶酶体中的大量水解酶释至胞液,可直接作用于细胞膜,使其通透性增高,加速细胞内酶的释出,同时线粒体嵴断裂,外膜破坏,线粒体酶释至胞浆。本实验结果提示:EHFV 对正常人骨髓细胞有损害作用,病毒致使溶酶体和线粒体发生病变,ACP 和 SDH 释入胞浆,使细胞失活不可逆损伤,且这些酶不断外溢到培养上清中,致使后期细胞内酶活性下降或消失^[6]。

参 考 文 献

- 1 杨渝珍, 郝天玲, 钱明, 等. 正常和恶性淋巴细胞膜的流动性及其对 PHA, CnA 刺激的反应性. 同济医科大学学报 1989; 4:250
- 2 Shinitzky M, Barenholz Y. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim biophys Acta*, 1978;515:367
- 3 Yanovich S. Dynamic parameters of membrane lipids in normal and leukemic human lymphocytes isolated from peripheral blood and bone marrow. *Cancer Res*, 1978;38:4654
- 4 姚小剑, 俞永新. 流行性出血热病毒在各种鼠类巨噬细胞和人外周血的细胞培养中的增殖. 病毒学杂志, 1988;1:41
- 5 曾令兰, 罗端德, 李淑莉等. 流行性出血热病毒体外感染正常人骨髓中三种细胞的研究. 中华实验和临床病毒学杂志, 1992;6:435
- 6 罗端德, 曾令兰, 蔡淑清等. 流行性出血热病毒对正常人骨髓细胞致病变作用. 中华传染病杂志, 1994;12:131

Study on Biologic Activity for Membrane and Enzyme of Normal Bone Marrow Cells Infected with Epidemic Hemorrhagic Fever Virus

Zeng Linglan Luo Duande Cai Shuqing *et al.*

(*Union Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430022*)

Using DPH fluorescence probe, the membrane of normal bone marrow cells infected with epidemic hemorrhagic fever virus (EHFV) was labeled. The membrane lipid fluidity could be counted according to change of value of fluorescence polarization. At the same time, using cyto-histochemical staining quantitative method, the cellular ACP and SDH were detected. The results showed: (1) The Lymphocyte, monocyte and granulocyte were observed dynamically after cultured 1, 6, 24, 72 hours. The membrane lipid fluidity of infected cells appeared obviously low. There were significant differences statistically ($p < 0.05-0.01$). (2) By cytohisto-chemical staining and microspectrophotometer quantitating, before cultured 72 hours, ACP and SDH in infected cells raised. However, after 120 hours, their values were decreased. Also, there were significant ($P < 0.05$). It could be related with virus invasion and damage degree of cellular function.

Key words Epidemic Hemorrhagic Fever Virus, Bone Marrow Cell, Cellular Membrane Lipid Fluidity, Intracellular Enzymic Activity