

痘苗病毒诱导 HeLa 细胞的凋亡

364-26X

2877.4
225

张小青 陆宇 丁明孝

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘要 痘苗病毒感染 HeLa 细胞后形态学上出现了较典型的细胞凋亡特征, 电泳分析显示出 DNA 阶梯, 用 DNA 断裂原位检测技术发现其染色质断裂主要存在于核周, 与染色质凝聚位置相似。

关键词 细胞凋亡, 痘苗病毒, HeLa 细胞

细胞凋亡 (Apoptosis) 是由细胞自身基因调控的一种主动的“自杀”过程。这一概念的提出和理解的逐渐深入, 如同细胞周期的概念一样使人们对细胞的生长分化、个体发育直到死亡的全过程, 对多种病理、毒理损伤机理的认识都发生了根本性的改变^[1], 并成为当今生物学及医学研究的热点之一。病毒感染为什么会导导致细胞死亡一直是人们不断探索的问题, 近几年来人们才发现某些病毒可通过诱导细胞凋亡的途径来杀死细胞, 并发现一些与这一过程相关的病毒基因^[2-5]。那么这一途径是否具有一定的普遍性? 我们在深入研究辛德毕斯病毒 (Sindbis virus) 诱导细胞凋亡^[6]的同时, 对痘苗病毒 (Vaccinia virus) 感染的细胞进行了研究, 实验结果表明痘苗病毒感染 HeLa 细胞后无论形态学观察还是生化指标方面均出现了典型的细胞凋亡的特征。

材料与方法

1 细胞与病毒的培养

培养痘苗病毒所用细胞为 HeLa 传代细胞系。

将痘苗病毒接种于长成良好单层的 HeLa 细胞上, 37℃ 吸附 1 h 后, 加入维持液 (含 2% 犊牛血清, 其余成分与培养液同), 调 pH 至 7.4 左右。病毒感染复数 (m. o. i) 为 50 PFU/细胞。

2 H33258 荧光染色检测技术

病毒感染后不同时间的细胞经 Carnoy 固定液固定 15 min, PBS (pH 7.4) 清洗后, 用 0.01% H33258 染色 15 min, 再经 PBS 清洗后封片, 于 Opton 18 型荧光显微镜下观察 (激发波长 395 nm)。

3 DNA 断裂的原位检测

应用 ApopTag™ S7110-KIT 试剂盒 (Oncor 公司 1994 生产) 进行 DNA 断裂原位检测。

具体操作如下: 病毒感染后不同时间的细胞经 1% 多聚甲醛于冰浴固定 15 min, PBS (pH 7.4) 清洗后, 用 0.1% Triton X100-PBS 室温下处理 15 min, PBS 清洗后, 加入平衡缓冲液 (Equilibrium buffer) 10 min, 然后加入 TDT 酶 (TDT enzyme; Reaction buffer = 1:2.4) 37℃ 温育 1 h, 再用预热的停止/洗涤缓冲液 (Stop/Wash buffer; Distilled water = 1:34) 及 PBS 清洗后, 加入荧光素偶联抗 Digoxigenin 抗体 (anti-Digoxigenin Fluorescin:

Blocking solution = 1:1.14), 室温下作用 30 min, 经 PBS 清洗后封片, 于 Opton18 型荧光显微镜下观察(激发波长 510-550 nm)。

4 常规超薄切片技术

HeLa 细胞经痘苗病毒感染后, 用 2.5% 戊二醛与 1% OsO₄ 双固定点, 经梯度丙酮脱水, Epon812 包埋, 切片厚度为 50-70 nm, 经醋酸双氧铀与柠檬酸铅双染色后, 于 JEM-100CX 电镜下观察。

5 细胞 DNA 的提取与电泳分析

参照 Ishida 等人的方法^[5]

结 果

1 痘苗病毒的形态发生与宿主细胞病理变化

电镜观察在病毒感染 4 h, 细胞形态无明显变化; 感染 12 h 的细胞胞质中出现了病毒工厂及少量病毒粒子; 在感染 24 h 和 36 h 的细胞中大量病毒粒子存在于病毒工厂中或释放到细胞外(图 1), 此时最为明显的细胞病变是染色质趋向核周, 并高度凝聚形成电子致密的团块(图 2), 光镜下多数细胞出现 CPE; 感染 48 h 后, 病变细胞大量脱落。

用 H33258 染色可更清楚地显示出染色质的变化: 在痘苗病毒感染 HeLa 细胞 0、24、36、48 h 后, 分别取样作荧光染色(H33258)检测(图 3-5)。正常的 HeLa 细胞, 除浅染的核仁和深染的异染色质外细胞核染色较均匀(图 3); 痘苗病毒感染 24 h 后, 染色质明显地在核周凝聚(图 2 右上), 有些呈新月状; 感染 36 h 后, 染色质进一步凝聚成几块(图 4); 感染 48 h 后, 凝聚的染色质分离成数小块(图 5)。

痘苗病毒感染后, HeLa 细胞的细胞核及染色质的形态变化呈现出较为典型的细胞凋亡的特征, 显示痘苗病毒可能诱导 HeLa 细胞的凋亡。

2 病毒感染的 HeLa 细胞染色质 DNA 断裂并出现 DNA 阶梯

根据 H33258 染色结果在痘苗病毒感染 48 h 后提取其总 DNA, 同时以正常 HeLa 细胞的总 DNA 作为阴性对照, 进行电泳分析, 结果表明正常细胞 DNA 条带位于胶板的上缘, 而病毒感染的细胞中出现了明显的 DNA 阶梯, 以约 200 bp、400 bp、600 bp 和 800 bp 的方式逐渐递增, 但并非所有的 DNA 都降解成小分子量的 DNA 阶梯。DNA 阶梯的出现是细胞凋亡的一个主要的生化指标。

3 DNA 断裂的原位检测

痘苗病毒感染后, 对断裂的染色质 DNA 进行末端荧光标记以检测它在核内的降解程度和分布, 结果表明在病毒感染 24 h 即可在多数细胞中看到核内存在特异的黄绿色荧光斑点, 说明其 DNA 发生断裂(图 6), 光斑在核内呈明显不均匀分布, 在不同的细胞中, 其核内呈现的荧光光斑的强度与数量各不相同, 但断裂的 DNA 多靠近核膜与染色质的凝聚块类似。正常的 HeLa 细胞呈阴性反应, 观察不到核内特异荧光斑点。

讨 论

细胞死亡可分为两种基本类型, 细胞凋亡和细胞坏死(Necrosis)。二者在生理特征及生化性质上有明显的差异, 在细胞凋亡过程中, 首先细胞间联系中断, 细胞质密度增大, 体积减小, 染色质固缩分离并趋向核膜进而出现有膜包被的程序死亡小体, 其生化特征是 DNA 断裂形

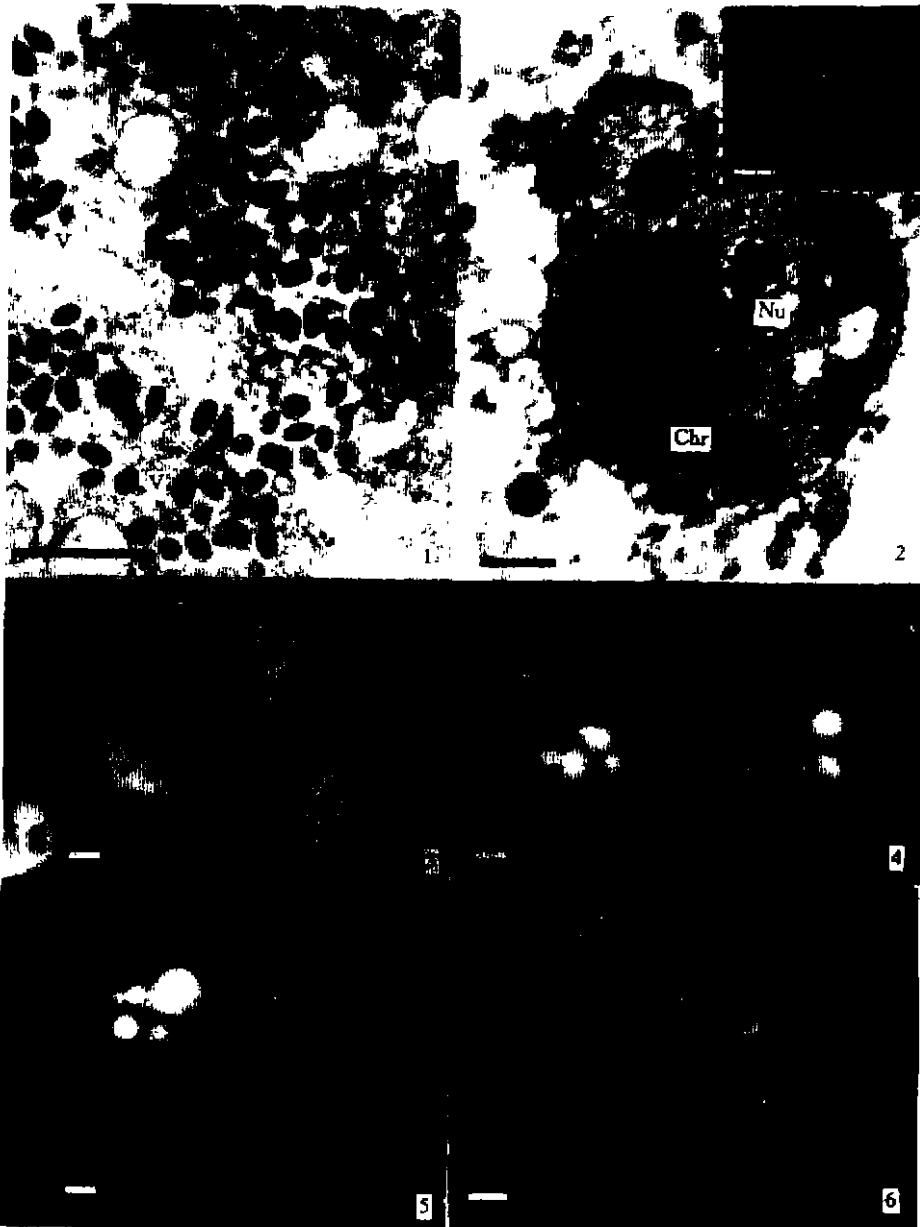


图1 电镜观察显示痘苗病毒感染24 h后, HeLa细胞的胞质中产生大量病毒粒子(V), 标尺长 $1\mu\text{m}$ 。

图2 电镜观察显示感染痘苗病毒24 h后, HeLa细胞核(Nu)内染色质(Chr)高度凝聚, 并趋向于核周, 标尺长 500nm ; 右上为H33258染色光镜照片显示染色质的凝聚, 标尺长 $5\mu\text{m}$ 。

图3~5 H33258染色的正常细胞(图3)和病毒感染36 h(图4)和48 h(图5)的HeLa中, 细胞染色质凝聚状况的比较, 标尺长 $5\mu\text{m}$ 。

图6 病毒感染24 h后, 用DNA断裂原位检测技术显示HeLa细胞核内特异的荧光斑点, 标尺长 $5\mu\text{m}$ 。

Fig. 1 Electron micrograph shows many vaccinia virus particles (V) existing in the cytoplasm of infected HeLa cell at 24 h after in-

fection. bar = 1 μ m

Fig. 2 Electron micrograph shows highly condensed chromatin(Chr) near the nuclear membrane of HeLa cell, 24 h after infection bar = 500 nm; inset: H33258 staining of the condensed chromatin under light microscope bar = 5 μ m.

Fig. 3~5 H33258 staining of the chromatin of normal HeLa cells (Fig. 3) comparing with those of 36 h (Fig. 4) and 48 h (Fig. 5) after infection. bar = 5 μ m.

Fig. 6 The cleaved chromosomal DNA near the nuclear membrane of HeLa cells 24 h after infection was revealed by *in situ* apoptosis detection technique bar = 5 μ m.

成寡核小体大小的片段,在 DNA 电泳上常可见到典型的阶梯形状(Ladder pattern)^[1]。我们的实际结果表明,痘苗病毒感染的 HeLa 细胞,无论从形态学和染色质的变化还是 DNA 降解等方面,均出现了比较典型的细胞凋亡现象,说明痘苗病毒也可引起 HeLa 细胞发生细胞凋亡,而且与已发现的流感病毒、杆状病毒、辛德必斯病毒及 HIV 等诱导细胞凋亡类似^[2-9]。

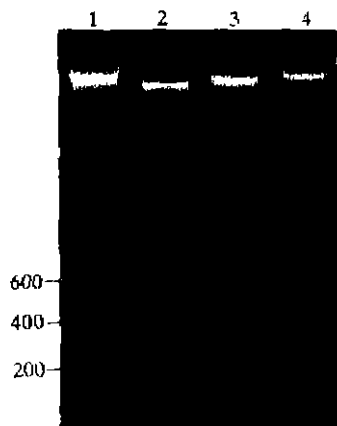


图 7 痘苗病毒感染后 HeLa 细胞 DNA 在 2% 琼脂糖凝胶电泳中呈现 DNA 阶梯。条带 1、3 为病毒感染的 HeLa 细胞总 DNA, 出现 DNA 阶梯, 最小 DNA 片段约 200 bp; 条带 4 为正常 HeLa 细胞总 DNA; 条带 2 为 λ /Hind III DNA 分子量标记。

Fig. 7 The total DNA of HeLa cell infected with vaccinia virus (lanes, 1, 3) or uninfected (lane 4) were electrophoresed through 2% agarose gel. lane 2 is the λ /Hind III DNA marker. The DNA ladder could be seen in lane 1 and lane 3.

然而,在细胞凋亡中只有少量染色质 DNA 降解成 DNA 阶梯大小的片段,且在某些情况下染色质 DNA 只发生随机的单链断裂,这时 DNA 电泳不能出现“阶梯”图案^[10]。我们采用 DNA 断裂原位检测技术不仅可更灵敏地检测出 DNA 的断裂,而且还可显示 DNA 断裂的程度及断裂 DNA 在核内的分布。我们的结果显示在病毒感染 24 h 即可清楚的显示核内断裂的 DNA,其分布呈团块状且靠近核周。此后染色质凝聚和分离更加明显,很可能 DNA 的断裂加速了染色质的凝聚过程。同时,在细胞群体中虽然病毒同步感染细胞,但每个细胞的染色质的凝聚与断裂状况却并非同步,这在很大程度上可能反映了细胞的状态不同。

此外,对痘苗病毒这样一类 DNA 病毒来说, DNA 电泳分析难以区分细胞核 DNA 降解片段和复制中可能存在的病毒 DNA 小片段,而原位标记可清楚地显示断裂的 DNA 存在细胞核内。

病毒感染诱导宿主细胞凋亡现象近几年才被发现和提出,对于其作用机理、生物学意义等诸多方面都尚不清楚,因而,本实验证实痘苗病毒感染可诱导细胞凋亡,无疑为这一领域的研究增添了一些新资料。痘苗病毒是已知的最大的、繁殖过程非常复杂的病毒。因此无论从理论上还是从痘苗病毒作为基因工程载体的角度上都值得进一步探索。

参 考 文 献

- 1 David L. Apoptosis: the molecular basis of cell death. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991, 5 - 46
- 2 Rao L, Sabbatini P, Hockenbery D *et al* . The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, 89: 7742 - 7746
- 3 Rollie J, Katze M, Lara L *et al* . Control of programmed cell death by the Baculovirus genes p35 and iap. *M C B*, 1994, 25: 5212 - 5222
- 4 Chou J, Sheldon P. The γ_1 34.5 gene of herpes simplex virus I precludes neuroblastoma cell from triggering total shutoff of protein synthesis characteristic of programmed cell death in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 3266 - 3270
- 5 Ishida Y, Fey E, Wan K M *et al* . Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*, 1992, 11: 3887 - 3895
- 6 张小青, 裘霁, 丁明孝. Sindbis 病毒繁殖与宿主细胞的凋亡. *微生物学报*, 1997, 37(3): 165 - 170
- 7 Levine B, Huang Q, Isaacs J *et al* . Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the bcl-2 cellular oncogene. *Nature*, 1993, 361: 739 - 742
- 8 Hinshaw V S, Olsen C W, Dybdahl N *et al* . Apoptosis: a mechanism of cell killing by Influenza A and B viruses. *J Virol*, 1994, 68: 3667 - 3673
- 9 Anne G, Bernard K, Sylviane M *et al* . The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. *Virology*, 1991, 185: 829 - 939
- 10 Tomei L D, Yves R, Evans D *et al* . Apoptosis in C3H/10T1/2 mouse embryonic cells: Evidence for internucleosomal DNA modification in the absence of double strand cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 853 - 887

Studies on Apoptosis of HeLa Cell Induced by Vaccinia Virus

Zhang Xiaoqing Lu Yu Ding Mingxiao

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

Abstract After infecting with Vaccinia virus, HeLa cells manifest typical morphological characters of apoptosis, and the electrophoretogram of their chromosomal DNA shows the ladder pattern. *In situ* apoptosis detection reveals that the location of the DNA cleavage is near the nuclear membrane, where chromatin condensation also occurs.

Key words Apoptosis, Vaccinia virus, HeLa cell