

柯萨奇 B 组病毒在 Hep-2 细胞内增殖特性的研究

杨占秋 刘建军 肖红 文利 郭淑芳

(湖北医科大学病毒研究所, 武汉 430071)

宋婕萍

(湖北省妇幼保健院遗传中心, 武汉 430060)

摘要 采用 IFA、RT-PCR 法观察了柯萨奇 B 组病毒(CBV)5 型在 Hep-2 细胞内的增殖动态。CBV 感染细胞后 4 h 可检出病毒 RNA, 8 h 可检出病毒抗原, 12 h 可观察到细胞病变, 20 h 可检出病毒颗粒。结果为 CBV 增殖特性的研究提供了新的资料, 并指出 PCR 是监测 CBV 增殖的敏感方法。

关键词 柯萨奇 B 组病毒, 增殖, 聚合酶链反应 **CBV**

柯萨奇病毒属小 RNA 病毒科的肠道病毒属, 根据其致病性不同将其分为 A、B 两组, 其中柯萨奇 B 组病毒(Coxsackie B virus, CBV)包括 6 种血清型。CBV 感染与心肌炎等多种疾病有关, 但发病机制仍不清楚。为了观察 CBV 的增殖特性, 我们用免疫荧光(IFA)、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)观察了 CBV₅ 在 Hep-2 细胞内的增殖动态。

1 材料与方方法

- 1.1 **细胞与病毒** Hep-2 细胞和 CBV-5 均为本室保存, RK-13 购于中国医学科学院医药生物技术研究所。
- 1.2 **引物** 参照文献[1]设计, 其序列选自 CBV 基因组 5'非编码区, 由上海细胞生物所合成, 上游引物序列为 5'-CCCCGACTGAGTATCAATA-3', 下游引物序列为 5'-GCAGTTAGGATTAGCCGCAT-3'。
- 1.3 **病毒增殖动态观察** 病毒感染细胞后 4、8、12、16、20、24 h, 收获感染细胞, 部分用 IFA 检查病毒抗原, 部分用 RT-PCR 检查病毒 RNA, 同时观察致细胞病变作用(CPE)和感染细胞内的病毒颗粒。
- 1.4 **IFA 法** 参照文献[2], 电镜检查为常规法。
- 1.5 **病毒核酸提取** 按文献[3, 4]改良, 采用碘化钠-异硫氰酸胍-氯仿法提取 CBV RNA, 即取 200 μ L 培养细胞悬液依次加入 100 μ L 6 mol/L 碘化钠, 100 μ L 4 mol/L 异硫氰酸胍, 400 μ L 氯仿/异戊醇。12 000 r/min 离心 12 min 后, 取上清至另一离心管中, 加入 0.6 倍体积异丙醇, 室温 15 min 沉淀 CBV RNA, 再次 12 000 r/min 离心 12 min, 弃上清, 沉淀以 70% 乙醇洗 1 次后, 溶于 20 μ L 无 RNA 酶的水中, -20 $^{\circ}$ C 存放备用。同法制备阴性对照模板。
- 1.6 **cDNA 合成** cDNA 合成反应体积为 25 μ L, 包括 50 mmol/L pH8.3 Tris·HCl, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L 鲑精 DNA, 0.2 mmol/L dNTP, 20 pmol/L 下游引物, 2.5 u AMV 逆转录酶, 25 u RNA 酶抑制剂以及 5 μ L 模板。反应在 42 $^{\circ}$ C 45 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 5 min。
- 1.7 **PCR 扩增** 取上述 cDNA 溶液 10 μ L 加入至总体积为 50 μ L 的反应体系中, 包括 20 mmol/L pH8.3 Tris·HCl, 20 mmol/L MgCl₂, 25 mmol/L 硫酸胺, 0.5 mg/mL 明胶, 25% 甲酰胺, 0.2 mmol/L dNTP, 20 pmol/L 上游引物, 10 pmol/L 下游引物, 1.5 u Taq DNA 聚合酶。反应体系用 60 μ L 液体石蜡覆盖。循环反应参数为 94 $^{\circ}$ C

收稿日期: 1998-02-26, 修回日期: 1998-07-02

* 湖北省“八·五”重点课题资助

1 min, 53 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.5 min, 循环 35 次, 最后 72 ℃ 8 min. 扩增产物经 2% 琼脂糖电泳后在紫外透射仪上观察结果。

2 结果

2.1 CBV 增殖特性的观察

应用 IFA、RT-PCR 对 CBV₅ 接种 Hep-2 细胞后, 对不同时间的病毒抗原和病毒 RNA 进行了检测, 结果见表 1、图 1 和图 2。从结果可知, 病毒 RNA 首先被检出, 此后用 IFA 法可检测到感染细胞内的病毒抗原, 光镜所见的 CPE 在感染后 12 h 可见。同时, 我们将 CBV₅ 接种 RK-13 细胞, 同步观察不同时间内病毒抗原、病毒 RNA、CPE 均为阴性。

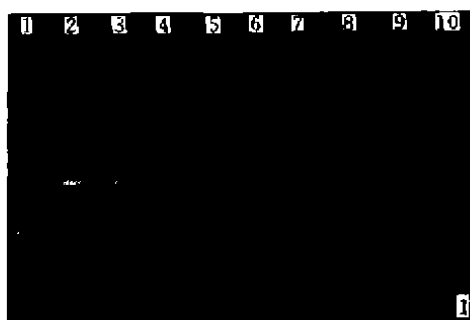


图 1 CBV₅ 感染细胞后不同时间 RNA 的检测

Fig. 1 The detection of CBV5 RNA in Hep-2 cells by RT-PCR
Line 1: water control; Line 2 to 7: CBV RNA on 4, 8, 12, 16, 20, 24 hours in postinfection; Line 8: DNA marker; Line 9: negative control; Line 10: reagent control

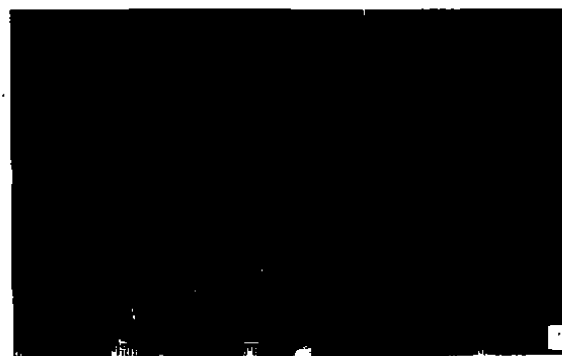


图 2 CBV₅ 感染细胞后的免疫荧光检测

Fig. 2 The detection of CBV5 type antigen in Hep-2 cells infected with CBV by IFA
Showing positive fluorescence of virus antigen in plasma

表 1 CBV₅ 感染细胞不同时间 CPE、CBV 抗原及 CBV RNA 动态

Table 1 The detection of viral antigen, CPE and CBV RNA in different infection time

感染时间 Time of infection (h)	细胞类型 Cellular type					
	Hep-2			RK-13		
	CPE	CBV 抗原 CBV antigen	CBV RNA	CPE	CBV 抗原 CBV antigen	CBV RNA
4	-	-	+	-	-	-
8	-	+	+	-	-	-
12	+	+	+	-	-	-
16	++	++	+	-	-	-
20	+++	+++	+	-	-	-
24	+++	+++	+	-	-	-

* Illustration of CPE: "-" means non-CPE; "+" means CPE of 25% cells; "++" means CPE of 50% cells; "+++ means CPE of more 80% cells.

* * Illustration of IFA: "-" means non-fluorescence; "+" means positive fluorescence of 25% cells; "++" means positive fluorescence of 50% cells; "+++ means positive fluorescence of 80% cells

2.2 病毒对细胞的作用

CBV₅ 感染细胞后 12 h, 细胞出现 CPE, 细胞园缩, 折光性增强, 胞浆颗粒增加, 部分园缩细胞从瓶壁上脱落。病毒感染细胞后 20 h, 电镜下观察细胞出现明显的感染特征, 胞浆空泡化, 线粒体肿胀变性, 内质网扩张, 核固缩, 异染色质增多并趋向核膜周围(图 3A), 胞浆中可见排列不规则的病毒颗粒, 圆形, 无囊膜, 直径约 20~30 nm(图 3B)。

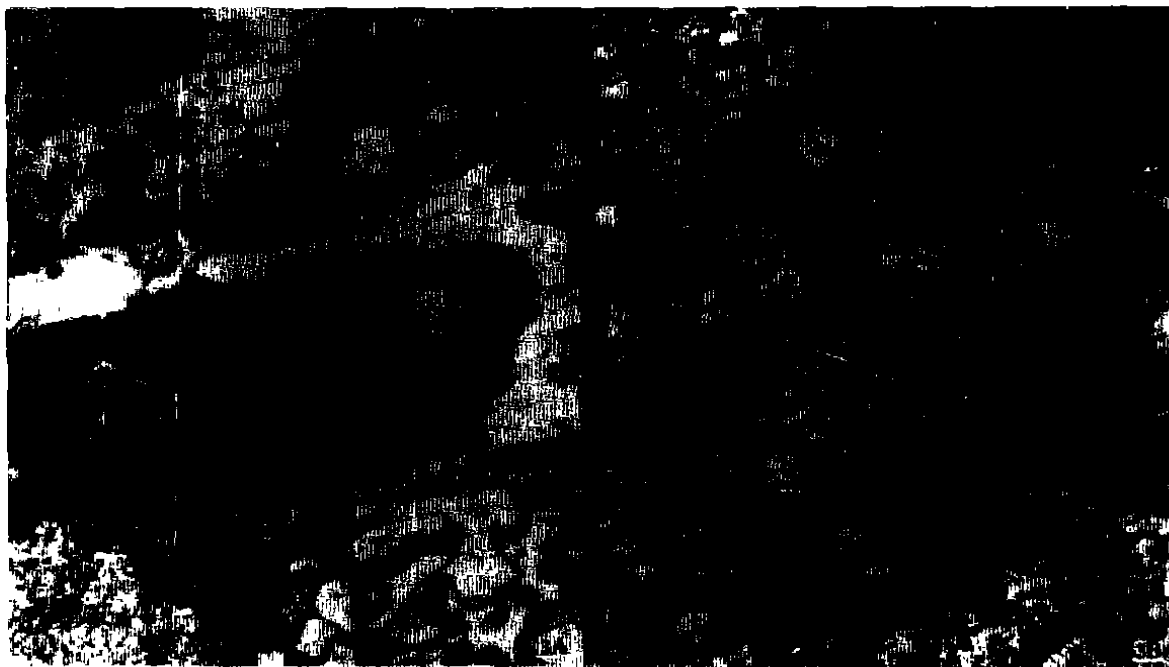


图3 CBV₅ 感染 Hep-2 细胞的超微结构

Fig. 3 The change of ultrastructure of Hep-2 cells infected with CBV5

A. nuclear degeneration, vesicle-like change in plasma; B. viral particles in cytoplasm (Bar = 80 nm)

3 讨论

迄今, 关于 CBV 的致病性研究已有较多的报道, 但其致病机制仍不清楚, 国内外学者对 CBV 与细胞相互作用的关系所知甚少。为此, 我们利用细胞学、免疫学和基因检测技术从不同侧面观察了 CBV5 在 Hep-2 细胞内的增殖动态。研究发现 CBV 感染细胞后 4 h 即可检测到病毒 RNA。这一结果与 Martin 等^[5]的报道一致, 他们指出小 RNA 病毒核酸在病毒吸附细胞 2.0~3.5 h 后开始合成。Lycke^[6]也指出小 RNA 病毒(脊髓灰质炎病毒)RNA 在病毒感染细胞后 2 h 大量合成。我们的这一发现是符合小 RNA 病毒的增殖特征的。为了证明病毒感染细胞后 4 h 的 RNA 是新合成的还是接种时残存的病毒 RNA, 我们同步检测了 CBV 感染非允许性细胞(RK-13)4 h 的 RNA 为阴性, 这也进一步说明病毒感染细胞 4 h 的 RNA 可能是新合成的。

对不同方法的比较研究发现, RT-PCR 在病毒感染细胞 4 h 后即可检测到 CBV RNA, 而

IFA 法在病毒感染后 8 h 检测到 CBV 抗原, CPE 则在 12 h 出现, 这表明基因检测技术在检测病毒感染方面最为敏感。

目前报道的 CBV RNA 提取方法主要有两种: 蛋白酶 K-酚-氯仿法和异硫氰酸胍-酚-氯仿法^[7-9]。这两种方法提取 RNA 均需置 -70 ℃ 2 h 或 -20 ℃ 过夜沉淀 RNA, 所需时间长, 不便于快速检测。我们根据 Loparev 等的报道用碘化钠提取 DNA 的方法^[4], 结合异硫氰酸胍-酚-氯仿法, 建立了碘化钠-异硫氰酸胍-氯仿法提取 CBV RNA, 并进行了三种提取方法的比较, 结果表明三种方法制备的 RNA 均可用于 PCR 扩增, 效果一致(资料未显示)。而我们的方法提取的 RNA 只需置室温 15~30 min, 且不需蛋白酶 K、苯酚等试剂, 说明我们的方法具有快速、价廉、安全等特点, 可推广应用。

参 考 文 献

- 1 Severini V, Mestroni L, Falaschi A *et al*. Nested polymerase chain reaction for high sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(5):1345~1349
- 2 杨占秋, 蒋文玲, 朱宝莲. 单纯疱疹病毒的免疫荧光点片法及其应用. *蚌埠医学院学报*, 1985, 10(2):175~177
- 3 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162(2):156~159
- 4 Loparev VN, Cartas MA, Monkton CE *et al*. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cells lines to identify infectious agent. *J Virol Method* 1991, 34(2):105~112
- 5 Martin EM. Replication of small RNA virus. *Br Med Bull*, 1967, 23(2):192~197
- 6 Philipson L. Replication, transcription and translation of RNA virus. In: Lycke E *et al* ed. *Textbook of medical virology*. England: Butterworth & Co Ltd, 1981. 57~63
- 7 Gow JG, Behan VHM, Clements GB *et al*. Enteroviral RNA sequences detected by polymerase chain reaction in muscle of patients with positive fatigue syndrome. *Br Med J*, 1991, 302(6778):692~696
- 8 Weiss LM, Movahed LA, Billing ME *et al*. Detection of coxsackievirus B3 RNA in myocardial tissues by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 1991, 138(2):497~503
- 9 Chapman NM, Tracy S, Gaunt CJ *et al*. Molecular detection and identification of enteroviral using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. *J Clin Microbiol*, 1990, 28(5):843~850

Propagation Characteristics of Coxsackie B Virus in Hep-2 Cells

Yang Zhanqiu Song Jieping Liu Jinjun *et al*

(*Virus Research Institute, Hubei Medical University, Wuhan 430071*)

Abstract The dynamic change of coxsackie B virus (CBV) 5 type propagation was studied in Hep-2 cells by immunofluorescence assay, reverse transcription polymerase chain reaction and cytological methods. The results showed that CBV RNA could be detected at 4 hours in postinfection, viral antigen was positive at 8 hours and cytopathic effect could be found at 12 hours. The viral particles could be observed at 20 hours in postinfection. These results provided new data for observation of CBV propagation, also, it indicated that the reverse transcription polymerase chain reaction was a sensitive technique for monitoring CBV propagation.

Key words Coxsackie B virus, Propagation, Polymerase chain reaction