

## 汉滩病毒感染诱导热休克蛋白70表达\*

R511.02

叶苓\*\*, 杨守京<sup>✓</sup>, 刘彦仿

(第四军医大学病理教研室, 西安 710032)

**摘要:**为了解汉滩病毒感染后细胞的应激反应及 HSP70 的表达与病毒复制的关系, 在汉滩病毒 A9 株感染 Vero-E6 细胞后, 用免疫组织化学及核酸分子原位杂交法, 对细胞 HSP70 基因的表达进行了检测。结果表明, 汉滩病毒感染细胞 4 h 后即可诱导 Vero-E6 细胞表达 HSP70, 表达可持续至感染后 5 d, 且 HSP70 在细胞内的分布也有改变。提示汉滩病毒可直接诱导 HSP70 的高表达。

**关键词:**热休克蛋白; 汉滩病毒; Vero-E6 细胞, 应激反应

**中图分类号:**R373.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5125(2000)02-0106-05

应激反应是原核至真核生物界广泛存在的一种对外界有害刺激的保护性反应, 以表达热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)为特征。已有一些体外实验证实, 细胞在受到某些病毒(包括 DNA 和 RNA 病毒)感染后可以诱导 HSPs 家族不同成员的高表达<sup>[1,2]</sup>。关于汉滩病毒(Hantaan virus, HTV)感染能否诱导 HSPs 表达, 及其与病毒感染之间的关系, 尚未见报道。本实验用汉滩病毒 A9 株感染病毒敏感细胞株 Vero-E6 细胞, 观察并检测了病毒感染后细胞内 HSP70 蛋白表达和分布的改变情况, 以期了解汉滩病毒感染对细胞的影响, 及细胞对汉滩病毒感染的应激反应的意义。

## 1 材料及方法

### 1.1 材料

非洲绿猴肾上皮细胞 Vero-E6 细胞来自中国预防医学科学院病毒所, 本室保存; 汉滩病毒 A9 株乳鼠脑悬液为第四军医大学唐都医院传染科惠赠。鼠抗人 HSP70 McAb 为美国 Santa Cruz 公司产品, 生物素化的羊抗鼠 IgG 及 SABC 试剂盒购自博士德生物制品公司。Dig-随机引物标记及检测试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞感染病毒及模拟感染** 将细胞植于铺有盖玻片的六孔板中, 分别进行:(1)病毒感染组; 待细胞长成单层时, 倾倒掉大部分培养液, 分别接种汉滩病毒 A9 株乳鼠脑悬液 50  $\mu$ L/孔, 置 37  $^{\circ}$ C, 病毒吸附 1 h 后换新培养液, 分别于感染后 4、8、24、72 h 和 5 d 时, 收集被感染细胞, 铺片进行免疫组化染色及原位杂交检测;(2)模拟感染组; 与感染组同时倒掉大部分培养液, 但不加入病毒, 1 h 后换培养液, 与感染组同样时间点收集

收稿日期:1998-12-11, 修回日期:1999-02-25

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770664)

\*\* 作者简介:叶苓(1963年-), 女, 四川省人, 讲师, 博士, 研究方向为分子病理学。

现在工作单位:广州中山医科大学博士后流动站, 邮编 510089

细胞进行相应检测。

1.2.2 免疫组化染色 参照 SABC 试剂盒说明书进行。

1.2.3 原位杂交 质粒 pHSP70 和 pGs 分别含 HSP70 基因 cDNA 片段及 Hantaan 病毒 S 片段 cDNA, 分别经适当酶切, 冻溶法回收特异性片段, 溶于 15  $\mu$ L 无菌三蒸水中, 加热变性后用异羟基洋地黄毒苷酸配基-11-dUTP(Digoxigenin-11-dUTP) 随机引物延伸法标记制备探针。细胞铺片用 0.2 mol/L 盐酸消化, 4% 多聚甲醛后固定, 逐级酒精脱水, 加探针 42  $^{\circ}$ C 杂交 24 h, SSC 反复振荡洗, 逐级酒精脱水, 2% 正常小牛血清封闭, 加碱性磷酸酶标记的抗 Dig 抗体检测, NBT/BCIP 呈色, 核固红染核, 脱水, 透明, 封片。

## 2 结果

2.1 免疫组化 病毒感染组于感染后 4 h 即出现热休克蛋白 70 表达升高, 在多数细胞胞浆内可见棕黄色颗粒(图 1), 感染后 8 h 组, 在核仁区出现阳性信号(图 2), 感染后 24 h 组在胞浆内仍可见棕黄色颗粒, 但信号较前减弱, 且核仁内阳性信号消失, 感染后 72 h 和 5 d 后细胞胞浆内仍有阳性信号, 但强度明显减弱。模拟感染组在相应时间点未见 HSP70 的高表达, 仅可见到个别细胞浆内较弱的棕黄色阳性信号(图 3)。

2.2 原位杂交 感染后 4 h 组即可见细胞内出现较强紫兰色阳性杂交信号(图 4), 8 h 组结果与 4 h 组一致, 以后各组阳性信号减弱至正常水平。而模拟感染组个别细胞内可见较弱的紫兰色阳性杂交信号(图 5)。

## 3 讨论

已有实验证实, 细胞在受到某些病毒(包括 DNA 和 RNA 病毒)感染后可以诱导 HSPs 家族不同成员的过度表达, 但并无统一的形式, HSPs 的诱导与病毒及被感染细胞的类型有关, 机体对不同病毒感染的反应是特异性的。

我们对尸检组织的免疫组化和原位杂交检测表明<sup>[3]</sup>, 在流行性出血热患者尸检组织中有 HSP70 的高表达及 mRNA 水平的增高。为排除活体组织中炎症、免疫反应、细胞因子及局部损伤等因素对 HSP70 表达的影响, 以便独立地观察病毒本身是否直接影响 HSP70 的合成, 本实验用病毒直接感染 Vero-E6 细胞, 并在感染后不同时间点收取细胞, 进行免疫组化染色及原位杂交检测。结果发现, 感染 4 h 后细胞中 HSP70 表达即开始增强, 8 h 组尚可见到核仁内 HSP70 阳性表达, 而模拟感染组则无类似改变, 说明 HTV 感染可直接导致 HSP70 的高表达。本实验还发现, 在病毒感染后 8 h 左右, HSP70 由细胞浆转移至核仁内, 但随着感染时间的延长, HSP70 又可回复至胞浆内。有关热应激细胞中 HSP70 的分布改变已见报道, 并认为 HSP70 可以保护核蛋白免于有害因素所致的蛋白变性<sup>[4]</sup>。目前关于 HTV 感染所致细胞病变的机理有两种观点, 一是免疫复合物致病, 二为病毒直接致病, 关于后一种观点尚有争议。我们的实验发现, 病毒可以直接诱导细胞中 HSP70 的高表达, 提示病毒可以引起细胞内大分子代谢的紊乱, 从一个侧面反映出病毒感染本身也可导致细胞的损伤, 可能在流行性出血热的发病机理中具有重要意义。

## 参 考 文 献

[1] Seddger L, Ruby J. Heat shock response to vaccinia virus infection [J]. J Virol, 1994, 68:4685

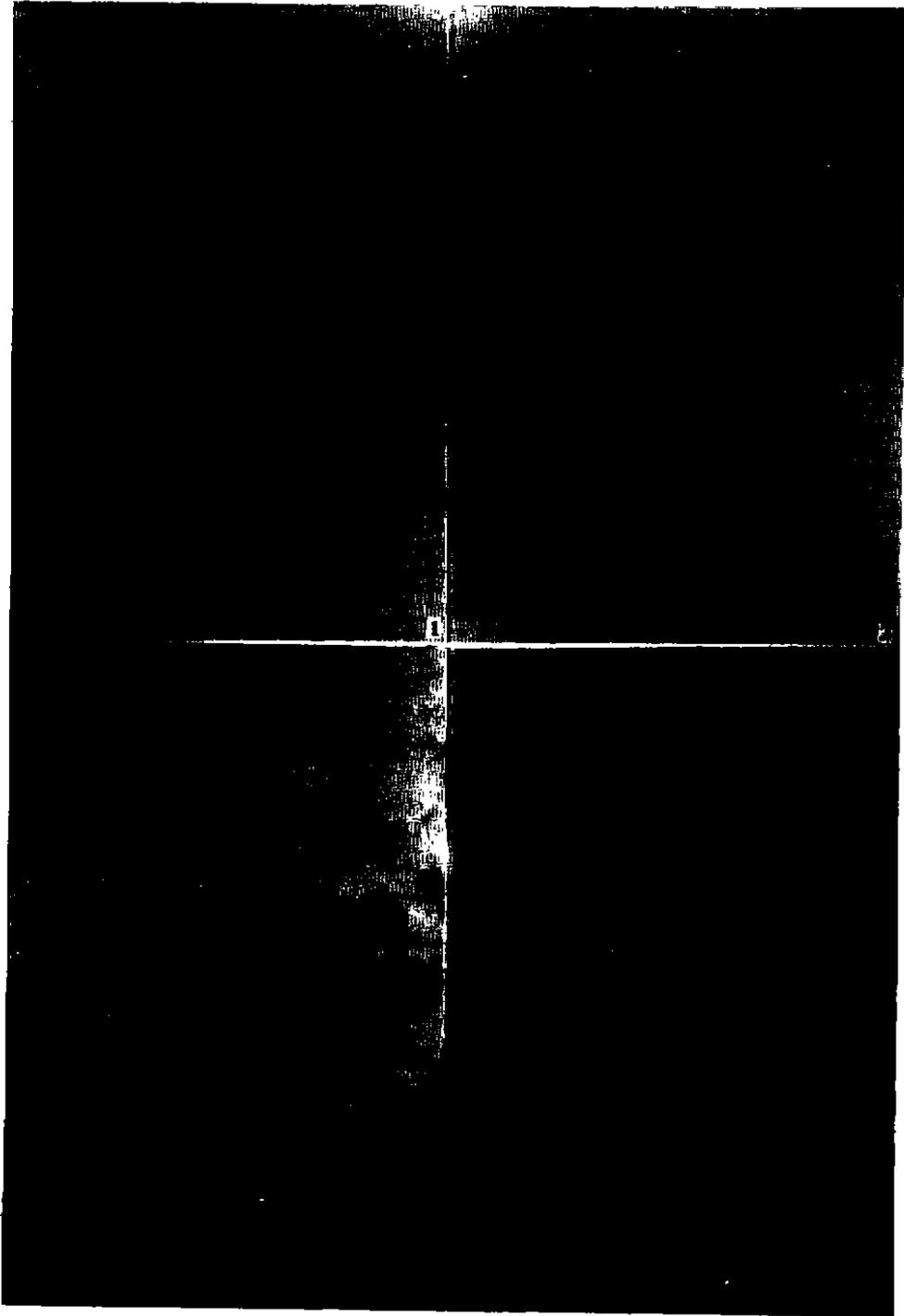


图1 HTV 感染 Vero-E6 细胞 HSP70 免疫组化染色, 示感染后 4 h 细胞浆内 HSP70 阳性。400 ×

图2 HTV 感染 Vero-E6 HSP70 免疫组化染色, 示感染后 8 h 细胞浆及核仁内 HSP70 阳性。400 ×

图 3 模拟感染组 Vero-E6 细胞 HSP70 免疫组化染色, 示 HSP 阴性。200 ×

图 4 HTV 感染 Vero-E6 细胞 HSP70 mRNA 原位杂交检测, 示细胞内紫蓝色阳性颗粒(感染后 4 h)。200 ×

Fig. 1 Immunohistochemistry staining with HSP70 McAb. The cytoplasmic positive staining was observed in the Vero-E6 cells 4 h after HTV infection. 400 ×

Fig. 2 Immunohistochemistry staining with HSP70 McAb. The positive signal was localized in the plasma and nucleoli of Vero-E6 cells 8 h after HTV infection. 400 ×

Fig. 3 Immunohistochemistry staining with HSP70 McAb. The negative staining was showed in the Vero-E6 cells with mock infection. 200 ×

Fig. 4 *In situ* hybridization with HSP70 probe. The positive signal was observed in the HTV-infected Vero-E6 cells (4 h after infection). 200 ×

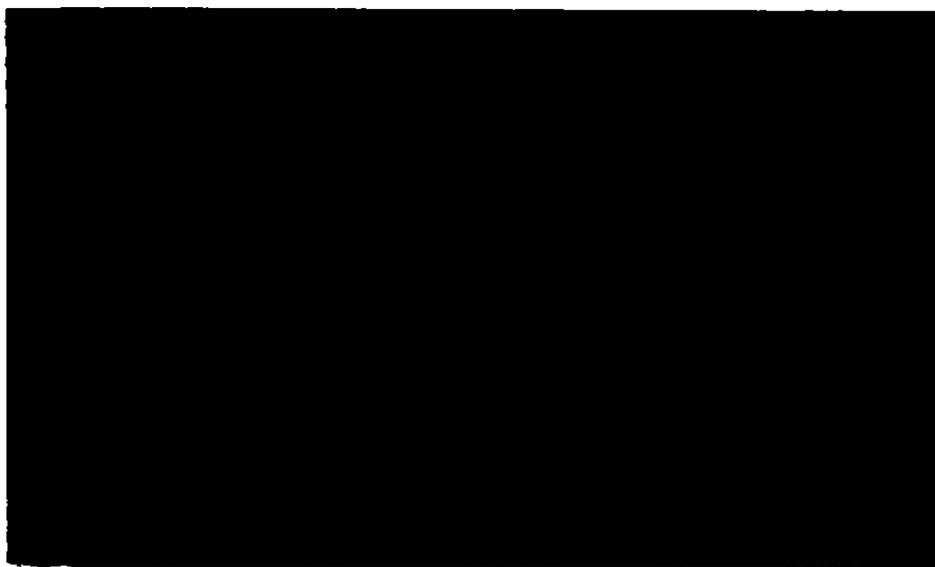


图 5 模拟感染组 Vero-E6 细胞 HSP70 mRNA 原位杂交检测, 细胞浆内阴性。100 ×

Fig. 5 *In situ* hybridization with HSP70 probe

The negative staining was showed in the Vero-E6 cells with mock infection. 100 ×

- [2] Philips B, Abravaya K, Morimoto RI. Analysis of the specificity and mechanism of transcriptional activation of the human hsp70 gene during infection by DNA viruses [J]. J Virol, 1991, 65, 5680
- [3] 叶苓, 刘彦仿, 杨守京. 流行性出血热患者心肌组织中热休克蛋白表达的意义[J]. 第四军医大学学报, 1998, 19(5): 488
- [4] Hayashi Y, Tohnai J, Kobayashi T, *et al.* Translocation of HSP-70 and protein synthesis during continuous heating at mild temperatures in HeLa cells [J]. Radio Res, 1991, 125: 80

## Expression of HSP70 Induced by Infection of Hantaan Virus

YE Ling, YANG Shou-jing, LIU Yan-fang

(Department of Pathology, The 4th Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**Abstract:** In order to investigate the stress response in the cells infected with Hantaan virus and the relationship between the expression of HSP70 and the virus replication, the Vero-E6 cells infected with Hantaan virus (A9 strain) were detected by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. The results show that the expression of HSP70 can be induced in the cells 4 hours after Hantaan virus infection and lasted until the fifth days after infection. The distribution of HSP70 also varied. It suggests that the expression of HSP70 can be induced directly by Hantaan virus.

**Key words:** Heat shock proteins; Hantaan virus; Vero-E6 cells