

## 口蹄疫病毒诱导宿主细胞凋亡的研究\*

吴海祥, 郑从义\*\*, 屈三甫, 郭荆哲, 王燕丽

(武汉大学生命科学院, 湖北武汉 430072)

### Studies on Apoptosis of Host Cells Induced by Foot-and-Mouth Disease Virus

WU Hai-xiang, ZHENG Cong-yi\*\*, QU San-fu, GUO Jing-zhe, WANG Yan-li

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** Apoptosis of PK-15 cells induced by Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) *in vitro* was reported in this paper. Typical cell apoptosis was detected by use of Hoechst 33258 fluorescence probe, agarose gel electrophoresis and *in situ* end-labeling (TUNEL). After PK-15 cells were infected by titration of 4.8 lg TCID<sub>50</sub>/mL FMDV for 32 h, apoptosis characteristics of nuclear condensation, fragmentation, accompanied by apoptotic bodies formation (Hoechst 33258 staining), 180-200 integer-fold sized pieces DNA Ladders (agarose gel electrophoresis) and strong green fluorescence dots (TUNEL) were all exhibited, and cell apoptosis was approximately 20%. In addition, the quantitative analysis of apoptosis in PK-15 cells induced by FMDV showed that apoptosis was correlated with infection of virus, and it was also time-dependent. Results indicate that FMDV can induce apoptosis of host cells and apoptosis plays an important role in the cytopathogenicity effect of FMDV.

**Key Words:** Apoptosis; Foot-and-Mouth Disease virus; Host cell; Cytopathogenicity effect

**摘要:** 本文报道了口蹄疫病毒(Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV)在体外诱导 PK-15 细胞凋亡的研究结果。采用 Hoechst33258 荧光探针、DNA 凝胶电泳、脱氧核糖核酸转移酶诱导的缺口末端标记(TUNEL)技术均检测到了典型的细胞凋亡。结果显示:使用感染性滴度为 4.8 lgTCID<sub>50</sub>/mL 的口蹄疫病毒感染 PK-15 细胞,在培养 32 h 后,荧光探针检测呈现典型的凋亡细胞核固缩和梅花状碎裂核,并伴随有凋亡小体出现,凋亡率约为 20%;DNA 凝胶电泳显示 ladder 梯带;末端标记检测到强绿色荧光标记物结合于凋亡细胞核上。研究结果提示:口蹄疫病毒可以在体外诱导宿主细胞凋亡,细胞凋亡是其致细胞病变死亡的重要途径之一。

**关键词:** 细胞凋亡; 口蹄疫病毒; 宿主细胞; 致细胞病变效应

**中图分类号:** Q255; S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2001)02-0175-05

多细胞生物细胞数动态平衡靠细胞的增殖和死亡这两种对立统一的方式来调节,细胞凋亡在这一过程中起着重要作用。细胞凋亡由基因控制,涉及

一系列信号传导过程,是细胞正常的生理性死亡<sup>[1,2]</sup>。已知包括物理、化学和生物的多种因素均可诱发细胞凋亡。现有研究表明,多数 RNA 病毒

收稿日期:2000-01-26,修回日期:2000-10-09

\* 基金项目:国家教委重点资金资助项目(94-170)

作者简介:吴海祥(1976-),男,安徽枞阳籍,博士生。

\*\* 通讯作者:郑从义(1952-),男,云南华宁县籍,副教授,从事病毒与宿主细胞关系的研究。Correspondence author.

感染可有效诱导宿主细胞凋亡,并且细胞凋亡是很多病毒感染导致细胞病变死亡(CPE)的表现形式之一<sup>[3-6]</sup>。口蹄疫病毒(FMDV)是正链RNA病毒,其流行病学、病原学的研究多有报道,但有关感染诱导宿主细胞凋亡的研究结果国内外均未见报道,本文的研究结果证实了该病毒可诱导宿主细胞凋亡,这为阐明口蹄疫病毒的致病机制提供有力的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养与病毒增殖

PK-15 传代细胞系由 ATCC(美国典型培养物保藏中心)引进,本实验室保藏,细胞生长培养液使用 DMEM(Gibco 公司),含 10% 新生牛血清(杭州四季青公司)、100 u( $\mu$ g)/mL 青霉素、链霉素。感染病毒前,用  $1 \cdot 10^5$  个/mL 接种于  $\phi 60$  mm 平皿,37℃ 饱和湿度的 5%  $CO_2$  培养箱中培养 12~24 h,细胞单层达 70%。

### 1.2 病毒增殖与感染性测定

口蹄疫病毒(FMDV)由本中心保藏,病毒在 PK-15 细胞单层上扩增,采用冻融法破细胞释放病毒并接种细胞单层。经盲传的第三代细胞冻融后 4℃ 4 000 r/min 15 min 离心收集上清,分装保存于 -70℃。病毒原液用 96 孔板按 Reed-Muench 两氏法<sup>[7]</sup>进行感染性滴度测定,滴度为  $6.2 \lg TCID_{50}/mL$ 。

### 1.3 FMDV 诱导宿主细胞凋亡

70% 单层的 PK-15 细胞加 2 mL 病毒悬液于 37℃ 吸附 90 min,吸弃病毒液,加 5 mL MEM 维持液(含 2% 新生牛血清、100 u( $\mu$ g)/mL 青霉素、链霉素),置于  $CO_2$  培养箱中继续培养。实验对照组细胞用无血清 MEM 代替病毒液吸附,其余条件同实验组。培养后根据需要取样分析。

### 1.4 Hoechst33258 荧光探针检测细胞凋亡和凋亡曲线

荧光染色参照文献<sup>[8]</sup>改良荧光染色程序进行:细胞经消化与上清合并,1 000 r/min 10 min 收集, PBS 清洗,甲醇:冰乙酸(3:1)室温固定 20 min,离心后滴片、染色、封片于荧光显微镜(Olympus 公司)下观察凋亡细胞核,随机多点计数,用凋亡指数 AI(凋亡细胞数/总细胞数  $\cdot 100\%$ )表示细胞凋亡率。

用无血清 MEM 5 倍梯度稀释病毒原液,不同滴度的病毒悬液感染 PK-15 细胞培养 24 h 后取样分析 AI,绘制 FMDV 诱导宿主细胞凋亡的滴度曲

线,用获得高 AI 的病毒稀释液感染宿主细胞,不同时间取样,制作 FMDV 诱导凋亡的时间曲线。

### 1.5 细胞 DNA 提取与电泳分析

按照分子克隆实验指南<sup>[9]</sup>和 Tolskaya E<sup>[10]</sup>等人所述方法:800 r/min 离心 10 min 收集细胞, PBS 清洗,加 500  $\mu$ L 细胞裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA (Na)<sub>2</sub>, 100  $\mu$ g/mL Protease K, 0.5% SDS), 56℃ 保温 2 h, 酚法去蛋白, 1/10 体积 3 mol/L NaAc, 2 倍体积无水乙醇过夜沉淀 DNA, 4℃ 12 000 r/min  $\cdot 10$  min 收集沉淀, 风干后以 30  $\mu$ L TE 37℃ 水浴溶解 30 min, 2% 琼脂糖凝胶(5 V/cm)电泳 2 h, UV 灯观察、拍照。

### 1.6 脱氧核糖核酸转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)原位检测 DNA 断裂

使用 Apoalert<sup>®</sup> DNA Fragmentation Assay Kit (Clonotech 公司)原位检测 DNA 断裂。以正常 PK-15 细胞为阴性对照,实验参照文献<sup>[11]</sup>和试剂盒操作手册进行;病毒感染 40 h 收集细胞覆于盖玻片上, 4% 福尔马林 4℃ 固定 25 min, PBS 清洗, 0.2% TritonX-100 溶液冰浴处理 5 min, 清洗后平衡缓冲液室温平衡 10 min, TdT 反应液均匀覆盖细胞 37℃ 饱和湿度培养箱中温育 60 min, 盖玻片浸入 2 $\times$ SSC 终止加尾反应, PBS 清洗、PI 染色, 三蒸水反复清洗, 甘油封片液封片后在荧光显微镜下观察、拍照。

## 2 结果

### 2.1 FMDV 诱导 PK-15 细胞凋亡与凋亡曲线

荧光探针检测结果显示, FMDV 感染 PK-15 细胞培养 32 h 后呈现典型的核碎裂现象(见封 3 彩图版 1-A), 多数碎裂核具有明显的区域性, 核膜仍完整, 表现为细胞凋亡早期现象。而其中有的细胞核形成较为分散的核体, 则是凋亡晚期形成的凋亡小体。正常 PK-15 细胞呈现均匀的核荧光(见封 3 彩图版 1-B)。

根据荧光显微镜计数结果绘制的凋亡曲线如图(图 2)。由图 2-A 可见, FMDV 诱导细胞凋亡与感染性滴度具有密切关系,  $4.8 \lg TCID_{50}/mL$  的病毒悬液感染的细胞在培养 24 h 时细胞 AI 较高, 为 15.8%。时间曲线显示, 细胞 AI 随培养时间不同呈峰形变化, 32 h 达 20% 左右(见图 2-B)。

### 2.2 FMDV 感染 PK-15 细胞出现典型的 DNA 梯状(Ladder)条带

DNA 梯状条带的产生是细胞凋亡的最重要生

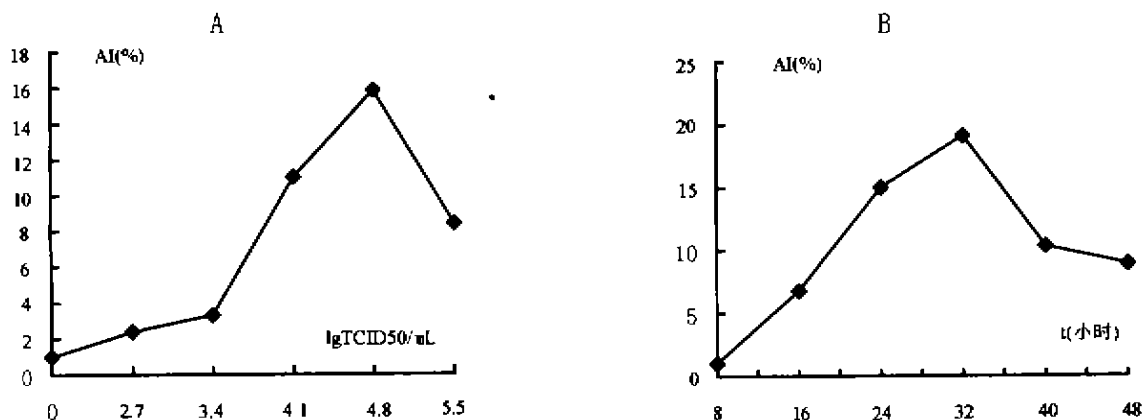


图 2 FMDV 诱导宿主细胞凋亡曲线

Fig 2 Curve of apoptosis-inducing of PK-15 cells infected by FMDV.

A, Titer curve of host cell apoptosis induced by FMDV; B, Time curve of host cell apoptosis induced by FMDV.

化特征之一。细胞凋亡晚期,约 30% 细胞染色体 DNA 在核小体连接处断裂<sup>[12]</sup>,有人认为这是依赖于  $Ca^{2+}$  的核酸内切酶在凋亡信号偶联中被激活,进而在核小体单位之间随机切割而形成。根据裂解的 DNA 核小体间连接片段长短不同,凝胶电泳呈现 180~200 bp 整数倍的梯形图谱。图 3 可以看出,正常对照细胞只有一条基因组总 DNA 带。病毒感染 40 h 呈现典型 Ladder 条带,与标准分子量 DNA 比较可以看出, DNA 裂解片段相邻带之间大约相差 200 bp。

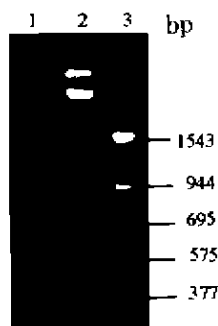


图 3 凋亡细胞 DNA 电泳图谱

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of genome DNA extracted from apoptotic cells

Lane 1, Normal control; 2, Apoptotic PK-15 cells; 3, Molecular Marker.

### 2.3 DNA 断裂的原位检测

凋亡细胞 DNA 双链断裂或只要一条链上出现

缺口而形成的 3'-OH 末端,可在 TdT 酶的介导下,将标记有异硫氰酸荧光素 (FITC) dUTP 衍生物(或其他的标记物)掺入到 3' 末端,以对完整细胞和凋亡小体的 DNA 断裂进行原位标记<sup>[12]</sup>。激发标记物产生荧光即可检测凋亡细胞,准确反映细胞凋亡最典型的生物化学和分子生物学特征。正常细胞几乎没有 DNA 断裂,不能够被标记(封 3 彩图版 4),病毒诱导的凋亡细胞核被标记了 FITC-dUTP 衍生物,在荧光显微镜下呈现较强的绿色荧光,被标记体积较小的是细胞凋亡晚期产生的凋亡小体,正常 PK-15 细胞核只见均匀的 PI 红色荧光。

## 3 讨论

随着九十年代以来对动物病毒诱导宿主细胞凋亡研究的深入,人们逐渐认识到很多动物病毒引起宿主细胞病变效应至少包括有细胞凋亡的因素。通常病毒感染细胞形成 CPE 表现为贴壁细胞病变、脱落、悬浮并聚集成团,细胞内出现不均一颗粒。FMDV 感染引起宿主细胞凋亡也表现为相似的变化,在实验过程中我们曾发现,悬浮细胞中凋亡细胞所占比例较高(结果未显示),而且凋亡曲线所示的动态过程与形态学上 CPE 变化具有平行性:低滴度的 FMDV 在相同的感染时间内未能检测到细胞凋亡,倒置显微镜直接观察 PK-15 单层也没有明显的致细胞病变效应,而高滴度 FMDV 引起急性感染导致细胞坏死,倒置显微镜下可发现细胞几乎全部悬浮且有大量细胞裂解成碎片,凋亡指数显著减少(图

2-A);诱导细胞凋亡的时间曲线显示了 FMDV 诱导宿主细胞凋亡需要一定进程,病毒感染后培养 8 h 没有明显可见的细胞病变,16 h 发现少数细胞病变收缩,24 h 有 30% 左右的细胞悬浮,单层上有明显脱落空斑,32 h 较多细胞悬浮,贴壁细胞大部分收缩变圆,表现典型的 CPE 现象,此时 AI 也达到最高值,40 h 以后大量细胞悬浮,并伴随有较多细胞碎片,此时由于凋亡细胞已濒临裂解,用形态学方法能检测到的凋亡细胞比例亦相应减少(图 2-B)。

细胞凋亡的机制相当复杂,存在多种凋亡相关基因作用。甚至在某些凋亡事件中,依赖于不同凋亡基因的信号传递途径间还会相互影响、相互交织成复杂的信号传递网络<sup>[1,2,12]</sup>。深入研究口蹄疫病毒诱发宿主细胞凋亡及其机制,不仅有理论意义,还有助于人们对口蹄疫的防治。

### 参考文献

- [1] 石熠慧,汤雪明. 细胞凋亡信号的传递途径及其调控[J]. 细胞生物学杂志, 1999, 21(2): 49-53.
- [2] Robert T, Enrico M. Fifth Annual Pezcoller Symposium: Apoptosis[R]. Cancer Research, 1994, 54: 302-305
- [3] 柳杨,陈人胜,潘景轩. 病毒感染与细胞凋亡[J]. 国外医学—微生物学分册, 1995, 18(6): 1-3
- [4] Schultz-Cherry S, Krug R M, Hinshaw V S, *et al*. Induction of apoptosis by influenza virus[J]. Seminars in virology, 1998, 8(6): 491-495.
- [5] Guillem C, Coudronniere N, Robert V, *et al*. Delayed HIV1-induced apoptosis in cells expressing truncated forms of CD4[J]. J Virol, 1998, 72(3): 1754-1761.
- [6] Zhu N L, Khoshnan A, Robert S, *et al*. HCV core protein binds to the cytoplasmic domain of TNFR1 and enhances TNF-induced apoptosis[J]. J Virol, 1998, 72(5): 3691-3697
- [7] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京:科学出版社, 1997. 279-280
- [8] 郑从义,屈三甫,胡国斌. 血液肿瘤细胞凋亡形态学观察的改良荧光染色法[J]. 肿瘤防治研究, 1998, 25(6): 432-433.
- [9] 金冬雁,黎孟枫,等(Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T 著). 分子克隆实验指南[M]. 第二版. 北京:科学出版社. 1992. 463-469
- [10] Tolstaya E, Romanova L, Kolesnikova M, *et al*. Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of Poliovirus[J]. J Virol, 1995, 69: 1181-1189.
- [11] Ramsey-Ewing A, Moss B. Apoptosis induced by a postbinding step of Vaccinia Virus entry into Chinese Hamster Ovary Cells [J]. Virol, 1998, 242: 138-149.
- [12] 杨福海,杨焕明,郑德光,等. 分子生物学前沿技术[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 151-156; 161-170.

吴海祥等：口蹄疫病毒诱导宿主细胞凋亡的研究（正文见P175）

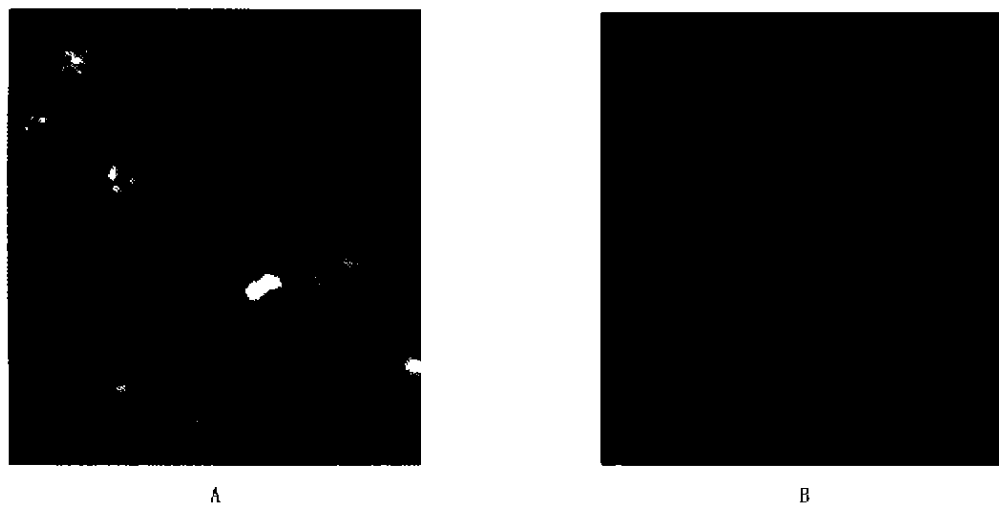


图1 FMDV诱导宿主细胞凋亡的形态学变化（Hoechst33258荧光染色200×）

Fig 1 The nuclear morphological changes of apoptotic cells infected by FMDV (Hoechst33258 stain 200×).  
A. The typical smashed apoptotic nuclei of PK-15 cells post infected 32h by FMDV, B. Normal control.



图4 末端标记检测PK-15细胞凋亡

Fig. 1 Apoptosis detection of PK-15 cells infected by FMDV with TUNEL.  
A. Apoptotic cell nuclei exhibiting strong green fluorescence; B. Even red nuclei of normal cell control