HSV-2 阴道感染并诱导小鼠阴道粘膜上皮细胞凋亡

陈保平¹,陈道平²,林雨霖³,周峰³,张尉英³,刘军³,陈敏诲^{3**} (1.武汉大学医学院中心实验室,湖北武汉 430071; 2 武汉大学医学院病理学教研室,湖北武汉 430071; 3.武汉大学医学院病毒所,湖北武汉 430071)

Apoptosis of Vaginal Epithelial Cells Induced by Infection of HSV-2 in Mice

CHEN Bao-ping¹, CHEN Dao-ping², LIN Yu-lin³, ZHOU Feng³ ZHANG Wei-ying³, LIU Jun³, CHEN Min-hui³**

(1. Department of Electron Microscopy, Medical College, Wuhan University;

- 2. Department of Cell Biology, Virus Resarch Institute, Medical College, Wuhan University;
- 3. Department of Pathology, Medical College, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: Recently some reports have shown that some viruses could induce apoptosis of infected cells in uitro to limit their spread. To clarify the effect of HSV-2 strain 333 on induction of apoptosis and its morphological characters in vaginal epithelia the mice were infected with the virus intravaginally, and killed at the intervals between day 1-11 post infection (P. I.). The vaginas were taken and fixed in 10% neutral formalin for paraffinembeding section and TUNEL staining to demonstrate apoptosis. The results were as follows. Numerous apoptotic cells appeared in the epithelia on the first day of infection, the number of the apoptotic cells reached to a high level on day 2-11 P.I.. At early stage of apoptosis, the cell nuclei displayed normal, but their chromatin were stained by TUNEL staining. When the chromatin condensed and migrated to the periphery, then left a blank space in the center of the nuclei. The apoptotic area spread widely, occupying 1/4-2/4 of the vaginal epithelia. At the same time, the necrotic areas and herpetic vesicles in the epithelia could be found to restrict only in some areas not as widely as the apoptotic areas and were surrounded by the apoptotic areas The apoptotic cells fell off into the vaginal lumen without forming apoptotic bodies and phagocyosis. The results showed that the HSV-2 strain 333 could induce apoptosis and necrosis of vaginal mucosal epithelia at the same time in mice. The apoptosis might play an important role in limiting both the range of viral spreading and the production of progeny virus.

Key words: HSV-2 strain 333; TUNEL staining; Apoptosis; Necrosis; Mice

摘要:最近的报道指出,某些病毒有诱导体外细胞调亡的作用,借以限制病毒的扩散。为探讨 HSV-2 在体内诱导细胞凋亡的效果及其形态学特点,用 HSV-2 333 抹感染小鼠阴道,于感染后不同天数处死动物,取其阴道,固定于10%中性福尔马林,TUNEL 末端标记染色显示调亡的细胞,光镜下进行原位观察。结果显示:感染后的第1天粘膜上皮内即出现大量的调亡细胞,第2天至11天凋亡细胞的数量及在上皮内的分布范围达最高水平。早期的凋亡细胞见于感染后所有标本,其核染色质形态及分布似正常细胞,但它被 TUNEL 标记杂成棕黄色:晚期的凋亡细胞亦见于所有标本,其胞核缩小,染色质浓缩并在核周边集聚,核中心空化。载有凋亡细胞的上皮在阴道粘膜上分布很广,最广的可占全阴道上皮的 2/3。同时可见 HSV-2 引起的上皮细胞坏死及疱疹形成,二者均由凋亡细胞包

收稿日期:2001-03-13,修回日期:2001-07-06

作者简介:陈保平(1957-),女, 湖北武汉籍, 主任技师, 从事病毒形态研究。

^{***} 通讯作者:陈敏海(1923-), 男. 湖北枣阳糖, 教授, 主要从事官颈癌的病毒病因研究。Correspondense author.

围。凋亡细胞不断地由上皮表面脱落至阴道,未见凋亡小体及吞噬现象。结果提示,HSV-2 333 株阴道感染可同时诱导细胞坏死及凋亡,细胞凋亡可能在限制病毒产生子代及限制感染区域扩展起重要作用。

关键词: HSV-2; TUNEL 染色;细胞凋亡; 小鼠

中图分类号: Q253 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)01-0001-05

凋亡是一种由于各种生理性或非生理性刺激所引起的细胞主动死亡,它具有一定的形态学特征及生化过程,包括细胞收缩,从基质脱落,染色体于核小体间断裂并浓缩,最后细胞碎裂为凋亡小体而被吞噬,在机体内不引起炎症反应^[1,2]。细胞凋亡除了对机体体形的形成和保持起重要作用外,为保护机体不受损害,对清除含有突变基因或经病毒感染的细胞也很重要。

目前对病毒感染与细胞凋亡之间的关系很重视,并将凋亡视作一种对病毒的防御机制^[3]。在已发表的报道中,以探讨病毒诱导凋亡及抑制凋亡的有关基因为多,且多以体外培养细胞为研究对象,对体内感染诱导凋亡的原位研究很少。HSV-2 阴道感染过去重视它的溶细胞及潜伏感染,未曾提到诱导细胞凋亡的作用。据 O'Brien 1998 年发表的综述^[3],至少有 [7 种病毒的抑制凋亡蛋白已被确定,还就这些病毒诱导凋亡的途径及 P₅₃的作用做了图示,但末提到 HSV-2。1999 年 Asano 报道了野生型HSV-2 感染小鼠角膜不诱导凋亡,其 US3 基因缺陷突变株则可诱导凋亡,指出 US3 是 HSV-2 的抗凋亡基因^[4]。

由于 HSV-2 是常见的感染阴道的病毒,被视作性病毒,对其阴道感染诱导的凋亡及抗凋亡(溶解性感染)特点进行研究有助于临床诊断,治疗及预防。因此我们就 HSV-2 333 株的阴道感染诱导的凋亡及其限制感染的形态学进行了原位研究。

1 材料与方法

1.1 动物

雌性昆明种小鼠(K、W、1级)24 只,体重 18g± 1.0g,由湖北省医学科学院购得。共分8组,包括对照组,每组3只。用普通条件饲养。实验组动物分别于病毒感染后不同天数(1、2、4、5、6、7、11d)连同对照动物断颈致死,取其阴道,固定于中性福尔马林.石蜡包埋切片,供 H-E 染色及未端标记染色之用。

1.2 病毒

HSV-2 333 株购自中国药品生物制品检定所、

在 Vero 细胞上增殖, TCIO₅₀为 105.8/mL。根据毒性试验, 将其稀释 6 倍, 用 0.03mL 稀释被吸入明胶小块, 然后塞入小鼠阴道, 直抵宫颈, 每鼠感染 1 次。对照小鼠以 PBS 代替病毒作模拟感染。

1.3 末端标记染色

即 TUNEL 染色, 按 Boehringer mannheim 试剂 盒(Cat. No. 1684617)说明进行操作。具体步骤如 下:(1)将预先制备的石蜡切片脱蜡,按常规经过二 甲苯、各级酒精到蒸溜水。(2)蛋白酶 K(20µg/mL) 于 10mmol/L Tris-HCI 缓冲液(pH7,4),37℃ 孵育 30min。(3)PBS 洗 2×2min。(4)0.3%H 0 于甲醇 液,室温 30min,以抑制内源性过氧化物酶。(5)PBS 洗 2×2min, 加 0.1% Triton-x100(于 0.1% 柠檬酸 钠)于标本上, 4℃ 2min, 以增加细胞渗透性。(6) PBS 洗 2 < 2min, 将标本周围水分吸干, 加 50 al TUNEL混合反应被于标本上,在温室内 37℃ 孵育 60min。(7)PBS 洗 3×2min, 将标本周围水分吸干, 加 50μl POD 标记的抗萤光抗体、37℃ 孵育 30min。 (8) PBS 洗 2 × 2min, 加 100 μl DAB 液、室温显色 10min。(9) PBS 洗 2×2min, 苏木精复染, 常规脱 水,透明,封片、供镜检。

2 结果

小鼠阴道经 HSV-2 感染后出现的主要病理组织学改变是:粘膜上皮细胞坏死及细胞凋亡。同时固有膜内有以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润。这些改变从病毒接种的第1天开始持续到实验结束时(感染后 11d)仍未消失。有些动物有较强的反应。一般而言,在病毒感染的第4~5天,病变最为明显。对照小鼠未发现这些变化。

关于 HSV-2 引起的细胞坏死亦即病毒溶解性 感染的形态特点与细胞凋亡不同;首先是细胞肿胀, 可见核内病毒包含体。随后出现分叶核白细胞上皮 内浸润,细胞溶解,疱疹形成。在疱疹内有细胞坏死 碎片,分叶核白细胞及炎性渗出液。用未端标记染色核不着色,借以与凋亡细胞相区分。以下仅就HSV-2 诱导的粘膜上皮细胞的凋亡形态特点、分布及其与坏死灶(疱疹)的关系进行描述。

2.1 凋亡细胞特点

调亡细胞的核经 TUNEL 染色(末端标记染色) 呈棕黄色、非调亡细胞核不着色,但经苏木精复染成蓝色。从病毒感染的第 1 天至 11 天均可见上皮内有调亡细胞,它们以群体出现,彼此连接,很少孤立、散在。在细胞凋亡的早期,细胞核并不固缩,呈正常核的外观,染色质细丝均匀地分布于核内(图 1 - A)。随后调亡细胞核明显固缩,染色较深,染色质细丝不能分辩,染色质在核周边集聚,核中心呈空白透明区,形似面窝状(图 1-B)。在调亡区内可见一些核固缩的调亡细胞从上皮表面脱落,很少见到调亡小体的形成和吞噬现象(图 1-C)。

2.2 凋亡细胞在上皮内的分布

阴道粘膜上皮系复层扁平上皮,一般可分表层、中层及底层(包括基底层和傍基底层)。在病毒感染第1天的标本上,可见到凋亡细胞与非凋亡细胞混合存在于上皮各层之中,数目较少。第2天开始即可见成群的凋亡细胞分布于上皮的所有细胞层中,彼此相连接(图1-A、B、D)很少孤立存在。仅有少数标本可见凋亡细胞只在表层或只在基层,与感染天数无明显关系。

2.2 具有凋亡细胞的上皮在阴道内的分布

在病毒感染后 2~11 d 取材的阴道切片上,粘膜上皮呈现 3 种不同的外观,一是细胞凋亡区,以凋亡细胞为主的上皮区,它在粘膜中的分布范围很广泛,可占粘膜的 1/4 到 2/3;二是细胞坏死区,可见局灶性细胞坏死,包括疱疹形成,仅占上皮的较小范围;三是外观正常区,无凋亡细胞及坏死灶。坏死区总是被凋亡区包围或限制。经常见到疱疹由凋亡细胞群包围,有时见到坏死区与凋亡区之间出现裂隙将二者隔离,像是限制溶解性感染继续发展(图 1-D)。凋亡区远较坏死区分布广泛,二者的范围比例在各标本间稍有差别。

在对照动物标本上未发现上皮凋亡区及坏死区

(图1-E)。

3 讨论

本实验显示当 HSV-2 333 株感染小鼠阴道时 同时诱导了阴道粘膜上皮细胞广泛的凋亡及局灶性 上皮细胞坏死,即溶解性感染。最近一些研究[5]将 调亡视作宿主细胞对各类野生型病毒感染的反应, 由于感染细胞的主动地提前死亡(凋亡)可以限制病 毒子代的产生。本实验报道的由 HSV-2 阴道感染 同时诱导的上皮细胞的凋亡与坏死,及前者限制后 者的原位观察结果,加强了这一观点。本实验结果 与 Hata 等[6] 报道的有关野生型 HSV-2 能诱导 HEP-2 细胞凋亡的结果相似,但与 Asano 等的实验 结果不同,该实验显示野生型 HSV-2 186 感染小鼠 角膜不诱导凋亡,其 US3 缺陷突变株才可诱导。本 实验应用的是 HSV-2 333 株感染阴道。这可能与 HSV-2 病毒株和感染器官不同有关。又有报道^[7] 野生型 HSV-2 虽有抑制凋亡的基因, 但不能抑制由 紫外线照射或 fas 抗体诱导的 Vero 和 Jurkat 细胞 凋亡。这一事实启示人们若应用某些诱导凋亡剂来 限制阴道 HSV-2 感染将成为可能。

根据本实验观察,由 HSV-2 诱导的小鼠阴道粘膜上皮经 TUNEL 染色显示在凋亡细胞早期,胞核无固缩现象,形如正常,随后发生核固缩,染色质边集,核中心空化,形似面窝,最后单个或成片的从上皮脱落到至阴道,而末见凋亡小体及吞噬现象。据此特点,经 TUNEL 染色的人阴道刮片,根据凋亡细胞的发现可能会有助于 HSV-2 或其它病毒感染的诊断。当然要与生理或其它刺激所诱导的凋亡相区别。

目前检测细胞凋亡的方法有光镜观察,透射电镜的观察,流式细胞术, DNA 电泳法及脱氧核糖核酸末端转移酶介导的原位缺口末端标记法(TUNEL法)等,本实验采用了 TUNEL法,它是分子生物学与形态学相结合的研究方法,对完整的单个凋亡细胞进行原位染色,能准确地反应凋亡细胞生物化学和形态学特征,因而在细胞凋亡原位研究中已被广泛采用^[8]。

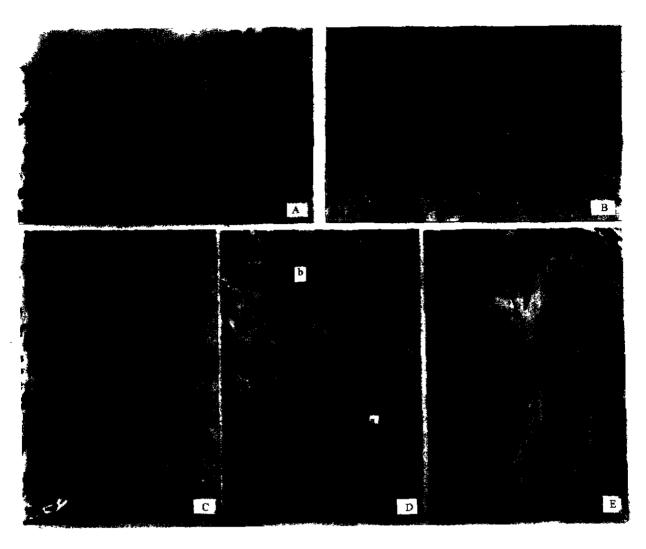


图 1 HSV-2 阴道感染并诱导小鼠阴道粘膜上皮细胞凋亡

A. HSV-2 感染后 2d, 粘膜上皮内所有调亡细胞的核染成棕黄色(此处为深黑色)(†)、非调亡细胞的核为淡灰色(†)(被苏木精复染)。此标本显示在早期的调亡细胞的核中染色质仍呈均匀分布, 仅有少数调亡细胞的核染色质浓缩并集聚于核膜下(†)。固有膜内的炎性漫润细胞被苏木精深染成蓝色(黑色)(* 400); B, HSV-2 感染后 4d。调亡细胞之核呈深黑色(†)、非调亡细胞之核呈浅灰色(†)。二者混合分布于上皮各层。片中很多晚期调亡细胞的核染色质浓缩并于核周边集取(* 400); C, HSV-2 感染后 7d, 许多晚期调亡细胞位于粘膜上皮表层, 有些与附着上皮分离(†),呈脱落外观(* 200); D, HSV-2 感染后 11d。示上皮调亡区与坏死区交界。在图片的左侧为上皮坏死区(*),坏死上皮区与固有膜分离。右侧为上皮调亡区,由调亡细胞(核为深黑色)组成。它与坏死区之间出现裂隙(†),以限制溶解性感染继续发展(* 200); E, 以生理盐水模拟病毒感染(对照小鼠)。上皮细胞核对 TUNEL 染色不着色, 仅被苏木精淡染。上皮表面的淋巴细胞被苏木精浓染(* 100)。

Fig. 1 Mucosa of mouse vagina, photomicrograph showing apoptotic cells

A. Two days after infection with HSV-2. Apoptotic cells with yellow-brown (deeply dark) nuclei in epithelia (†), while the nuclei of non-apototic ones were lightly grey (†). Here the chromatin were evenly distributing in nuclei of the early apoptotic cells. The chromatin of a few apoptotic cells of late stage (*) condensed and migrated to the nuclear periphery. The inflammatory cells in the propriate membrane were stained blue (deep dark) by haematoxylin(× 400); B, Four days after infection with HSV-2. Showing numerous apoptotic cells of late stage (†). Their nuclear chromatin condensed and migrated to the nuclear periphery. There was a mix of apoptotic (†) and non-apoptotic (†) cells at the different layers of epithelium(× 400); C, Seven days after infection with HSV-2. Showing numerous apoptotic cells of late stage were located at superficial layer of the mucosal epithelium, some of them seemed to detach from the epithelium (†) (× 200); D. Eleven days after infection with HSV-2. Showing the apoptotic area of epithelium (a) bounded by the necrotic one (*). There was a break between the two areas. The break would limit spreading of lytic infection of the virus (> 200); E, No infection with HSV-2. (control) Showing the epithelial cells without staining by TUNEL and no necrosis to be found. The nuclei of epithelial cells were stained deeply dark (× 100).

参考文献

- [1] White E. Life, death and the pursuit of apoptosis [J]. Genes and Development, 1996, 10(1):1-15.
- [2] Vaux D L, Strasser A. The molecular biology of apoptosis [3] Proc Nat Acad Sci USA, 1996, 93(6):2239 - 2244.
- [3] O'Brien V Virus and apoptosis [J] J Gen Virol, 1998, 79(7): 1833-1845.
- [4] Asano S, Honda T, Goshima F, et al. US3 protein kinase of herpes simplex virus type 2 plays a role in protecting corneal ep-

- ithelial cells from apoptosis in affected mice [J]. J Gen virol, 1999, 80(9):51-66.
- [5] Young L S, Dawson C W, Ellopoulos A G. Viruses and apotosis[J]. British Medical Bulletin, 1977, 53(3):509 521.
- [6] Hata S, Koyama A H, Shiota H, et al. Antiapoptotic activity of herpes simplex virus type 2; the role of US3 protein kinase gene.
 [1]. Microbes Infect, 1999, 1(8):601 - 607.
- [7] Jerome K R, Fox R, Chen Z, et al. Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, US5 and US3
 [J] J Virol, 1999, 73(11):8950 8957

第四军医大学实验动物中心 SPF 实验部 向国内外上等级课题开放公告

第四军医大学实验动物中心是一个集繁育、科研、教学及成果转化为一体的在编单位。中心 SPF 饲育部可提供包括裸鼠、C₅₇、BALB/c、昆明小鼠、Wistar、SD 大鼠等 20 个品系不同等级的实验动物,其中裸鼠月供量为 500 只,年供量 6000-8000 只。特设恒河猴、小香猪与毕格犬培育基地,面向全国提供合格动物。本中心实验部向社会提供各种细胞瘤株、荷瘤鼠。转基因实验室里配置有转基因显微注射仪、细胞核移植融合仪专供克隆动物课题使用。本中心附设有细胞室、无菌动物实验室、水平层流实验室与 P₃ 级负压实验室, P₃ 级实验室专用于爱滋病或人兽共患烈性传染病病原的研究, 1-3 层共计 29 个独立单元,一次性可供 100 多个课题同步开展工作,实验结束后可出具本中心的正式(非复印件)实验报告和 SPF 动物等级证与设施合格证。曾承接包括英国曼彻斯特大学和法国在内的合作课题数十项。来自重庆、广州、合肥、贵阳、上海与北京等高等院校博士和博士后课题 30 多项正在实施、本中心将以"三满意"、"五保证"为服务宗旨、竭诚欢迎全国友邻科研院、校、所的科技人员使用本中心提供的上等级动物,荷瘤鼠与瘤株细胞扩充专用转瓶机,温室和实验室。

本中心细胞库可提供细胞株与荷瘤株如下:

肝瘤细胞株(HePG₂;HCC-9724);乳腺癌细胞株(SKBr-ZHL;ER-30;MCF-7);胃癌细胞株(M、G、C);骨髓瘤细胞株(SP₂₀);白血病瘤细胞株(L_{1210});皮肤黑色素瘤细胞株(A_{375});腹水瘤细胞株(S_{180});小鼠肝癌细胞株(H_{22});大鼠肝癌细胞株(Walker;CBHR-7919);绿猴肾细胞(vero)与恒河猴肾细胞株(MA-104);犬肾细胞(MDck);猪肾细胞株(LBKS);猫肾细胞(F-81)。

饲育部联系电话:(029)3374787 联系人:姜春陵

实验部联系电话:(029)3374792 联系人:李 杰

项目主持人: 动物中心主任李六金 手机: 13709180100

网址:http://www.fmmu.sn.cn/web/anim

E-mail: siyidashiyanbu-6@163.com

传真:(029)2532045 邮编:710032

地址:西安市长乐西路第四军医大学实验动物中心