维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 2期
2002年5月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(2):110-113
May 2002

辛德毕斯病毒 YN87448 株与宿主细胞凋亡的研究

黄文丽，章域震，王静林，张海林
(云南省流行病防治研究所病毒室，云南大理 671000)

The Studies on the Host Cell Apoptosis of Yunnan Sindbis Virus

HUANG Wen-li, ZHANG Yu-zeng, WANG Jing-lin, ZHANG Hai-lin
(*Yunnan Institute of Epidemic Diseases Control and Reseached, Dali 671000, China*)

Abstract: The one step growth curve of YN87448 strain virus in BHK21 cell showed that a lot of progeny viruses could be observed at 16 hr. after infection. The titer of virus reached the highest about $10^{-7.0}$TCD50 at 48 hour post infection. The titer of virus is not reduced by Col. The apoptosis was observed by the electron microscope and the DNA ladder was detected by agarose gel eletrophoresis. YN87448 strain virus can cause apotosis in BHK21 cell and mice.

Key words: Yunnan Sindbis virus; Multiplication character; Cell apoptosis

摘要：为了了解云南辛德毕斯病毒在 BHK21 细胞上的生长特性，并观察该病毒在 BHK21 细胞、3d 龄和 2 周龄小白鼠中是否有凋亡反应出现。在接种后不同时间取样，检测病毒的滴度，电镜检测凋亡细胞，检测细胞的 DNA 阶梯。一步生长曲线结果表明病毒在出现 CPE 之前就有大量繁殖。秋水仙素对该病毒的成熟释放没有抑制作用。该病毒对 BHK21、小白鼠均可产生细胞凋亡。

关键词：云南辛德毕斯病毒；生长特性；细胞凋亡
中图分类号：R373.3　**文章标识码**：A　**文章编号**：1003-5125(2002)02-0110-04

1986 年我室从云南西双版纳地区一发热、关节痛患者血清中分离到一株甲病毒(YN87448)，经病毒基因组序列测定和生物学特性研究，确定为辛德毕斯病毒[1,2]。为进一步弄清该病毒的生长及凋亡特性，我们做了以下研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 病毒　YN87448 株病毒是本室于 1986 年从西双版纳州景洪市一发热、关节痛患者血清中分离的。

1.1.2 细胞和动物　BHK21 细胞来源于中国药品生物制品检定所；小白鼠来源于本所动物室。

1.1.3 试剂　IgG 荧光抗体、秋水仙素、水饱和酚、氯仿、异戊醇、RNAase、DNA ladder Marker 等试剂均购于华美生物试剂公司。

1.2 实验方法

1.2.1 一步生长曲线　用 $10^{-3.5}TCD_{50}$ 的新鲜鼠脑悬液接种 60 只已长满细胞的 BHK21 细胞管中，每管 0.1mL 病毒悬液和 0.9mL 的维持液，分别于接种后 0、2、4、6、8、10、12、16、24、39、44、48、72 和 96 h 观察 CPE，每一取样时间设 4 只细胞管，同时制备 IFAT 的抗原片及收获该培养液冻存于−30℃，待测其 $TCID_{50}$。

1.2.2 秋水仙素(Col)对 YN87448 株病毒繁殖的影响　配制不同浓度的 Col 溶液，溶液浓度依次为 10、20、30、50、100mol/L 取每一浓度的 Col 溶液 5mL 加入已长成单层的 BHK21 细胞中，37℃作用 2 h，弃去加入的 Col 溶液，每一小方瓶中加入 $10^{-4.5}$ TCD_{50}的病毒液 0.5mL，同时加入 4.5 mL 的维持液，其 pH 为 7.2，37℃培养 54 h，测定 Col 不同处理浓度的 TCD_{50}。

收稿日期：2001-08-13，修回日期：2001-11-05
作者简介：黄文丽(1963-)，女，云南省大理籍，主管医师，主要从事医学病毒学研究工作。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.3　电镜检测　(1)YN87448 株病毒感染 BHK21 细胞:取 TCD_{50} 为 $10^{-4.5}$ 的新鲜鼠脑病毒悬液 0.5mL 接种于长成单层的 BHK21 细胞的大方瓶中,37℃ 培养,于接种后 6、16、40、48、72 h 收获,3 000r/min离心,弃上清,加入适量的电镜标本固定液,送检观察是否发生细胞凋亡。(2)YN87448 株病毒感染 3d 龄小白鼠:用 TCD_{50} 为 $10^{-7.67}$ 的 YN87448 株病毒的新鲜鼠脑悬液接种 3 d 龄小白鼠,每只小鼠接种 0.025mL,于接种后 16、24、40、64、88 h 处死,取其适当大小的脑组织,放入适量电镜标本固定液,送检观察是否有凋亡细胞。(3)YN87448 株病毒感染 2 周龄小白鼠:用 TCD_{50} 为 $10^{-7.67}$ 的 YN87448 株病毒的鲜鼠脑悬液接种 2 周龄小白鼠,每只小鼠接种 0.03mL,于接种后 24、48、76、106h 处死,同法送电镜检查。

2　结果

2.1　一步生长曲线

一步生长曲线测定结果见图 1。结果表明病毒滴度于接种后 16 h 开始明显增高(TCD_{50} $10^{-5.0}$),至 48 h 为最高(TCD_{50} $10^{-7.0}$)。而细胞病变一般于感染后 40 h 开始出现,至 72 h 最为明显,并开始脱落。

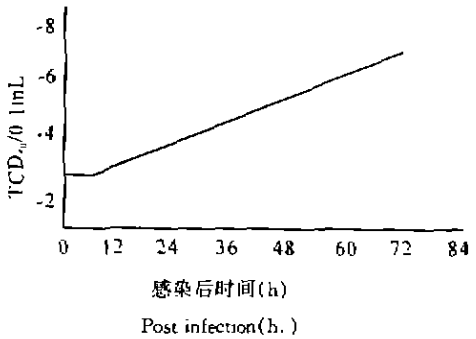

图 1　YN87448 株病毒的一步生长曲线

Fig.1　The growth curve of YN87448 strain virus in BHK21cell

2.2　秋水仙素对 YN87448 株病毒繁殖的影响

五组不同浓度的 Col 对细胞作用后,对病毒滴度未产生任何影响,其病毒的 TCD_{50} 基本相同(表 1)。

2.3　YN87448 病毒对不同年龄的小白鼠和 BHK21 细胞的凋亡作用

2.3.1　3 d 龄小白鼠　凋亡现象,YN87448 株病毒可以引起 3 d 龄小白鼠脑组织发生细胞凋亡,电镜下见早期凋亡细胞胞质浓缩,核染色质凝聚呈块状,边聚(见图 2A);晚期凋亡细胞表现为胞质浓缩,细胞器分辨不清,核染色质凝聚成多个园形小体,个别凋亡小体被周围胶质细胞包绕,周围神经细胞结构正常(见图 2B)。凋亡出现的时间:个别早期凋亡细胞于病毒感染后 16 h 可在电镜下观察到,感染 24 h 后,也只见到少量的神经细胞核出现染色质边集等早期凋亡现象。感染 40 h 后,较易查到凋亡细胞,感染后 66、88 h 凋亡细胞较多,而脑组织变性坏死以 16 h 最为严重。

表 1　不同浓度的 Col 作用后 YN87448 株病毒 TCD_{50} 的测定结果

Table 1　The TCD_{50} of YN87448 strain virus after different concentration Col sreat

Virus	Col 的浓度(Col concentration) (mol/L)					
	100	50	30	20	10	0
YN87448	6.67	6.67	7.0	6.5	7.0	6.67

2.3.2　2 周龄小白鼠凋亡现象:YN87448 株病毒可引起感染的 2 周龄小白鼠脑组织出现凋亡现象,同样表现为早期凋亡细胞胞质浓缩,核染色质凝聚呈块状,边聚;晚期凋亡细胞表现为胞质浓缩,细胞器分辨不清,核染色质凝聚成多个凋亡小体。感染后 24h 可见到个别早期凋亡细胞,凋亡以 48h 多见,24h 次之,76h 未见凋亡出现,106h 仅见个别凋亡细胞。但 76、106h 有较多神经细胞固缩,24、48h 的固缩病变次之,出血、坏死病变仅见于 76 h。

2.3.3　感染后 6h BHK21 细胞:组未见明显的凋亡细胞,16h 见到个别细胞呈早期凋亡表现,40 h 可见到较多的凋亡细胞(图 3A),多数细胞出现凋亡小体(图 3B)。凋亡细胞以 40 h 数量最多,依次为 40h>48h>72h>16h。48、72 h 部分细胞核染色质边集,或形成凋亡样,但胞质水肿,胞膜破裂,考虑为坏死或凋亡后自溶。而其 CPE 于感染后 40h 开始出现,72h 最为严重,有部分细胞开始脱落。

3　讨论

由 YN87448 株病毒的生长曲线看出细胞感染后 16~40h 就有较高滴度的病毒产生,此时细胞还未出现明显病变,没有细胞脱落。感染 48h 后病毒滴度基本不变,为最高,但此时细胞已出现病变,个别细胞开始脱落,至 72h 出现严重的 CPE,大量细胞开始脱落,培养液中混有较多的破碎细胞。图 1

维普资讯 http://www.cqvip.com

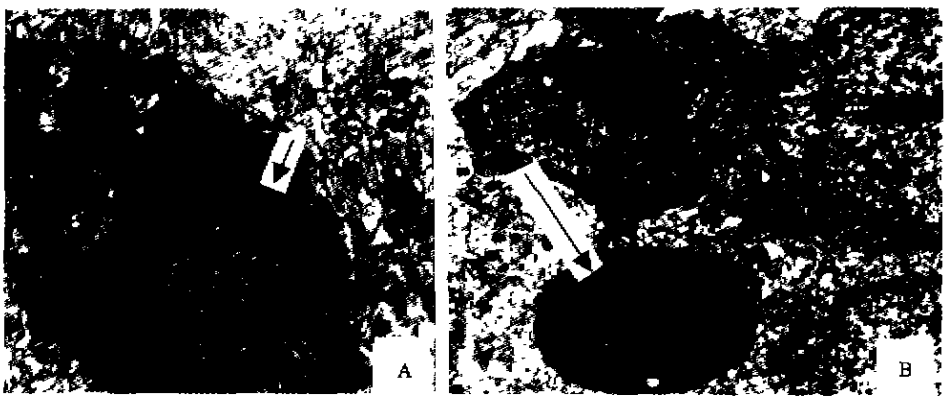

图2 YN87448株病毒感染3d龄小白鼠40h

A,部分神经细胞固缩,核染色质边聚;B,核染色质聚成多个凋亡小体,个别凋亡小体被周围胶质细胞包绕,周围神经细胞结构正常。

Fig 2 3-days-old mice were infected by YN87448 strain virus(40h)

A, The chromain of cell nucleus gather beside the nuclear envelope; B, Apoptotic boby.

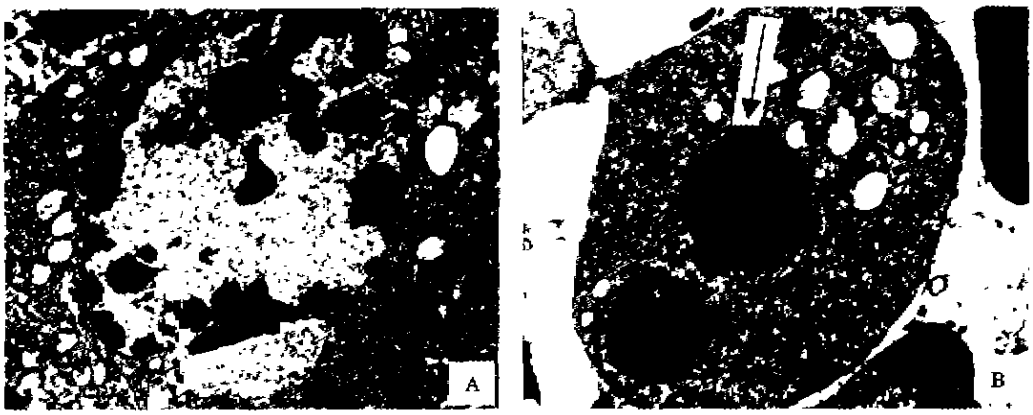

图3 YN87448株病毒感染BHK21细胞(40h)

A,早期凋亡细胞,染色质凝聚,边聚;B,凋亡小体形成。

Fig 3 BHK21 cell were infected by YN87448 strain virus(40h)

A, Early apoptotic cell; B, Apoptotic body.

为病毒提纯时间的选择提供了一个较好的依据,也为该病毒培养繁殖的最佳收获时间提供了依据。

秋水仙素作用结果显示,秋水仙素并未影响病毒颗粒的释放,一般来说,与微管微丝结合的动力蛋白在细胞中囊泡与颗粒物质转运中起着重要作用,而对此有抑制作用的秋水仙素在不同浓度下均未影响病毒的生成,说明该病毒的释放并未依赖于这一转运机制。

细胞凋亡(apoptosis)或程序化死亡(programmed cell death, PCD)是多细胞有机体为调控机体发育,维护内环境稳定,由多基因控制的细胞主动死亡过程。近年来,发现许多病毒可诱导感染细胞凋亡,并直接与这些病毒的CPE有关。病毒的溶解性感染所产生的细胞病变作用(CPE)与细胞凋亡的发生有关,而病毒的持续性感染与病毒抑制细胞凋亡有关。因此病毒感染细胞调亡的研究,对于揭示病毒的致病机理具有非常重要的意义[6]。Sindbis病毒能引起宿主细胞的调亡已有过报告[4]。鉴于YN87448株病毒基因序列和致病性的特殊性[1,2,5],我们对其做了对宿主细胞的凋亡研究。本次凋亡试验显示YN87448株病毒不论对不同年龄的小白鼠,还是BHK21细胞都能产生细胞凋亡作用。YN87448株病毒可引起3 d龄小白鼠发病死亡,但不引起2周龄小白鼠发病。3 d龄小白鼠于感

维普资讯 http://www.cqvip.com

染后 16 h 出现明显的脑组织变性坏死,此时仅观察到个别凋亡细胞,40 h 以后镜下才观察到明显的凋亡细胞。2 周龄小白鼠的脑组织出血、坏死于 76 h 最为明显,而其凋亡细胞以 24、48 h 多见。细胞凋亡在这一发病过程中所起作用应作进一步的研究。

细胞凋亡的调节非常复杂,基于多个基因调节,凋亡的发生可抑制病毒感染细胞炎症的发生,凋亡的抑制对于病毒潜伏期的建立非常重要,凋亡的抑制可能导致病毒的长期慢性感染,所以凋亡影响着疾病的发生和形式[7]。Sindbis 病毒感染细胞凋亡反应的调控基因虽有一些研究,但还不清楚,张小青等报告[4]Sindbis 病毒编码的非结构蛋白 nsP2 可能有诱导细胞凋亡的作用。本次试验为进一步研究辛德毕斯病毒诱发宿主细胞凋亡的调控基因,以及细胞凋亡在疾病的发生发展、转归上的作用,打下了一定的基础。具有重要的理论和实际意义。

参考文献

[1] 周国林,梁国栋,李 蕾,等.我国分离的甲病毒 YN87448 毒株全部结构区基因核苷酸的序列测定及分析[J].病毒学报,1999,15(3):205-211

[2] 周国林,梁国栋,李 蕾,等 中国分离的甲病毒 YN87448 毒株非结构区基因核苷酸的序列测定及分析[J].中华实验和临床病毒学杂志,1999,13(4):314-320.

[3] 姜 泊.细胞凋亡基础与临床[M].北京:人民军医出版社,1999.266-269.

[4] 张小青,裘 雾,丁明孝,等.Sindbis 病毒的繁殖与宿主细胞 BHK21 的调亡[J].微生物学报,1997,37(3):165-170

[5] 周国林,梁国栋,李 蕾,等.我国分离的甲病毒 YN87448 株基因组序列的初步分析[J].中华实验和临床病毒学杂志,1998,12(1):81.

[6] 孔明强.病毒与细胞凋亡[J].国外医学病毒学分册,2001,8(3):78-81

[7] 姜 泊.细胞凋亡基础与临床[M].北京:人民军医出版社,1999.240-245.