

## 口蹄疫病毒感染 BHK-21 细胞的代谢热谱研究\*

吴继彬<sup>1</sup>, 刘欲文<sup>2</sup>, 张恒<sup>2</sup>, 顾潮江<sup>1</sup>, 郑从义<sup>1\*\*</sup>, 屈三甫<sup>1</sup>, 汪存信<sup>2</sup>, 常惠芸<sup>3</sup>

(1. 武汉大学生命科学院, 湖北武汉 430072; 2. 武汉大学化学与分子科学学院, 湖北武汉 430072; 3. 中国农科院兰州兽医研究所, 甘肃兰州 730046)

## Microcalorimetric Study of Foot-and-mouth disease virus Infecting BHK-21 Cell

WU Ji-bin<sup>1</sup>, LIU Yu-wen<sup>2</sup>, Zhang Heng<sup>2</sup>, GU Chao-jiang<sup>1</sup>, ZHENG Cong-yi<sup>1\*\*</sup>,  
QU San-fu<sup>1</sup>, WANG Cun-xin<sup>2</sup>, CHANG Hui-yun<sup>3</sup>

(1. College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 3. Lanzhou Veterinary Research Institute CAAS, Lanzhou 730046, China)

**Abstract:** Both microcalorimetric measurement analysis by using LKB2277 bioactivity monitor and traditional method used in one-step growth curve in virology were carried out on BHK-21 cell line infected by FMDV (Foot-and-Mouth Disease Virus). The results show that microcalorimetric study can be applied in virus infection research through measuring metabolic energy released from BHK-21 cell and BHK-21 cell infected by FMDV. Meantime this microcalorimetric method provided a kind of new dynamic continuous analysis method on the virus infection research.

**Key words:** Foot-and-mouth disease virus(FMDV); BHK-21 Cell; One step growth curve; Microcalorimetric curve

**摘要:** 本文应用高灵敏度的 LKB2277 生物活性检测仪测定 FMDV 感染 BHK-21 细胞的代谢热谱, 并与传统方法测定的一步生长曲线进行比较, 二者具有显著的相似性。结果表明, 微量热法通过对细胞及其受病毒感染的细胞体系代谢热的测定, 能有效地监测病毒在宿主细胞内增殖的过程。该方法还提供了一种动态连续分析病毒感染增殖的新手段。

**关键词:** 口蹄疫病毒 (FMDV); BHK-21 细胞; 一步生长曲线; 代谢热谱

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 03-0283-05

微量量热分析方法测定的是细胞代谢过程的热量变化, 它反映了细胞能量代谢过程的变化总和。细胞培养条件的变化 (如 pH、渗透压、温度、氧等), 选择压力的改变 (加入药物、微量元素等) 均会导致细胞代谢的产热量发生改变, 产热改变量的大小直接反映了细胞代谢过程受影响的程度。因而, 微量量热法可以定性、定量地用于细菌、动物细胞甚至线粒体等细胞器的代谢过程研究<sup>[1-3]</sup>。高灵敏度微量热仪能给出病毒结构及其稳定性方面的信息, 对这些信息的整理和分析不仅可以给出病毒本身结构与功能的关系、病毒感染的动力学和热

力学等基本特征, 对病毒感染的机理的认识以及病毒性疾病的防治也有很重要的意义<sup>[4]</sup>。目前病毒学微量热研究主要集中在病毒结构与病毒稳定性的关系上, 尚未涉及病毒感染宿主细胞量热变化的连续观察研究, 而这一过程正是我们研究所关注的。

口蹄疫 (Foot-and-Mouth Disease, FMD) 一直是世界上最为严重的家畜传染病之一, 主要危害猪、牛、羊等偶蹄动物。其病原口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 属小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 口蹄疫病毒属 (Aphthovirus), 有 A、O、C、SAT I、SAT II、SAT III 及

收稿日期: 2002-11-20, 修回日期: 2003-01-08

\* 基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目“973”(G1999011904)

作者简介: 吴继彬 (1973-), 男, 江苏镇江籍, 硕士研究生, wujibin 163@163.com

\*\* 通讯作者. Correspondence author. Tel: 027-87682319, Email: cctcc@whu.edu.cn.

Asia I 共 7 个血清型, O 型 FMDV 是亚洲地区的主要流行型<sup>[5-7]</sup>。本文采用 LKB2277 生物活性检测仪连续测定了 O 型 FMDV 在 BHK-21 细胞中增殖过程的热谱曲线, 并与 FMDV 繁殖的一步生长曲线比较, 研究了二者的相关性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞: 叙利亚仓鼠肾细胞系 (BHK-21 c-13), 购自美国 ATCC, 由武汉大学中国典型培养物保藏中心保藏并提供。培养基采用 MEM (GIBCO 公司生产), 含 10% (V/V) 热灭活小牛血清, pH7.2~7.3。BHK-21 细胞置于 T-25 塑料培养瓶 (Costar Co. U. S. A.) 中常规传代, 补充 5% CO<sub>2</sub>, 拧紧瓶盖置于 37℃ 恒温培养箱培养。

1.1.2 病毒: O 型口蹄疫病毒 (FMDV OBG15, BHK-21 细胞增殖的细胞毒) 由中国农科院兰州兽医研究所提供。

1.1.3 仪器: 微量热仪 LKB2277 生物活性检测系统 (Thermometric AB, 瑞典)。

### 1.2 方法

1.2.1 病毒滴度测定 (根据 Reed-Muench 两氏法<sup>[8]</sup>, 测定并计算病毒滴度 TCID<sub>50</sub>/mL)

96 孔板接种 BHK-21 细胞 (培养基 MEM, 10% 血清, 无双抗), 24h 后细胞 90% 铺满, 吸取病毒 FMDV 0.1mL (16 TCID<sub>50</sub>), 用无血清的 MEM 培养基作 10 倍梯度稀释。病毒稀释液接毒 (0.1mL/孔), 重复 8 孔, 吸附 90min 后, 无血清 MEM 培养基洗去未吸附的病毒, 加入含 2% 血清的 MEM 培养基。37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养 48h 后, 观察细胞病变孔数, 记录结果, 并计算其滴度 TCID<sub>50</sub>/mL。

1.2.2 病毒繁殖一步生长曲线的测定

用改良的 Bachrach 方法测定<sup>[6]</sup>, 24 孔板接种 BHK-21 细胞 (培养基 MEM, 10% 血清, 无双抗), 24h 后细胞 90% 铺满, 接种病毒 FMDV, 用无血清 MEM 培养基洗去未吸附的病毒, 加入含 2% 血清的 MEM 培养基。37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养, 间隔时间 (见图 1) 取上清, 检测上清液病毒的滴度 (TCID<sub>50</sub>/mL)。

预备 6 块处于对数生长期 BHK-21 细胞的 96 孔板, 按程序接毒。每个稀释度 8 个重复。稀释液用无血清的 MEM 培养基作 10 倍梯度稀释。0.1mL 病毒稀释液接毒, 吸附 90min 后, 用无血清 MEM 培养基洗去未吸附的病毒, 加入含 2% 血清的 MEM 培养基。37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养 48h 后, 观察细胞病变,

记录结果, 并计算其相对应的病毒滴度 TCID<sub>50</sub>/mL。

同时平行做 3 组数据取均值, 以 FMD 病毒滴度 TCID<sub>50</sub> 的对数为纵坐标, 取样时间作为横坐标, 绘出 FMDV 感染 BHK-21 细胞的一步生长曲线。

1.2.3 BHK-21 细胞代谢热谱的测定<sup>[9]</sup>

接 BHK-21 细胞于 T-25 细胞培养瓶中, 待细胞长成 80% 以上单层时, 吸尽培养瓶中的培养基, 加入 0.25% 胰酶溶液消化, 细胞脱壁后, 加入培养基终止消化。充分悬浮细胞, 显微计数, 调整细胞浓度为  $5.0 \times 10^4$ /mL。无菌条件下取 1mL 细胞悬液于 3mL 安瓿瓶中, 补加 5% CO<sub>2</sub> 后封口。样品安瓿瓶和装有 1mL 无菌培养基的参比安瓿瓶置于微热量计监测器中进行不间断测定, 记录细胞的生长代谢热谱。实验条件: 实验温度为 37.00℃。放大器选用 30μW, 记录走纸速度为 0.2mm/min。

1.2.4 FMDV 感染 BHK-21 细胞后的热谱测定

量热实验所用的细胞浓度固定为  $1.0 \times 10^5$ /mL。当细胞生长并进入对数期, 打开安瓿瓶, 吸尽培养基, 加入一定滴度的 FMDV, 37℃ 吸附 1h 后吸尽安瓿瓶中的病毒液, 加入 1mL MEM 培养液, 补加 5% CO<sub>2</sub> 后封口。将此实验安瓿瓶和装有 1mL 无菌培养基的参比安瓿瓶置于微热量计监测器中进行不间断地培养测定, 测定的曲线即为 FMDV 感染细胞过程的代谢热谱。实验条件: 实验温度为 37.00℃。放大器选用 30μW, 记录走纸速度为 0.2mm/min。

1.2.5 热谱曲线的绘制

热谱曲线以热功率 P (μW, 微瓦) 为纵坐标, 培养时间 (t, 小时) 为横坐标, 在整个实验周期内由走纸记录仪自动记录, 连续在线检测得到。以热谱曲线对时间进行积分 (即热谱曲线下的面积) 即得到整个实验过程中测定体系的总代谢产热量。

## 2 结果

### 2.1 FMD 病毒一步生长曲线

根据 Reed-Muench 法, 测定感染上清的病毒滴度 (即 TCID<sub>50</sub>/mL), 得病毒一步生长曲线 (图 1)。图 1 显示, FMDV 吸附侵染 BHK-21 细胞的潜伏期为 12h 左右; 18~40h 为病毒高速增殖及裂解期, 其间, 细胞培养液中的病毒滴度急剧上升而达到最大值  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL; 之后病毒滴度有所下降; 而到细胞全部裂解后, 上清液的病毒滴度在  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL 左右。病毒在经过一个高峰以后, 病毒滴度会下降, 这是因为在 37℃ 的培养基里, 无细胞的培养基中病毒的滴度会随时间延长有所降低 (数据未列出)。

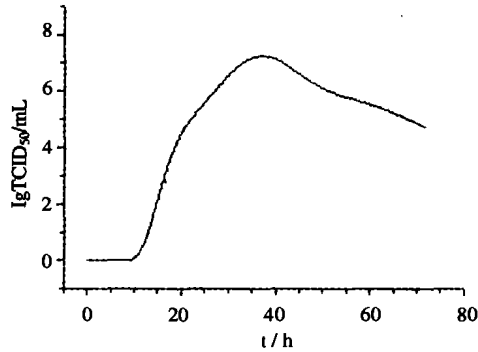


图 1 口蹄疫病毒繁殖的一步生长曲线

Fig.1 FMDV One step growth curve

2.2 BHK-21 细胞及病毒感染细胞体系的热谱曲线

采用微量热仪连续测定了 BHK-21 细胞和 FMDV 感染 BHK-21 细胞的代谢热谱。图 2 所示, FMDV 感染 BHK-21 细胞的代谢热谱与正常 BHK-21 细胞相比明显不同。正常 BHK-21 细胞的代谢热功率在培养初期先缓慢增加, 随后逐渐下降, 但在细胞整个生长过程中, 代谢热功率的变化较为平稳。而 FMDV 感染 BHK-21 细胞经过一个很短的潜伏期, 代谢热功率急剧上升, 随后缓慢下降至最低点。相对于正常细胞, 受病毒感染的细胞的代谢热功率有显著的变化。

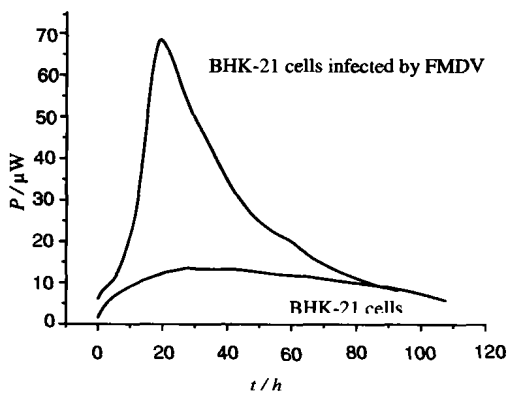


图 2 正常 BHK-21 细胞生长代谢及其感染 FMDV 过程的代谢热谱

Fig.2 Metabolic microcalorimetric curves of BHK-21 cell and BHK-21 cell infected by 10<sup>0</sup>FMDV

2.3 BHK-21 细胞及 FMDV 感染的代谢热谱分析

我们计算了整个实验期间总的产热量(Q)与平均热功率(P<sub>mean</sub>)的大小, 它们的数值连同整个过程的最大产热功率(P<sub>mas</sub>)一起列于表 1。表 1 的数据显示, FMDV 增殖感染 BHK-21 细胞的总产热量是正

常 BHK-21 细胞的 2.23 倍, 平均产热功率是正常 BHK-21 细胞的 2.72 倍, 最大热功率是正常 BHK-21 细胞的 5 倍。细胞总产热量、平均产热功率、最大热功率比正常细胞分别增加了 125.9%、172.2%、403.6%。

表 1 FMDV 感染 BHK-21 细胞的热谱分析

Table 1 Comparison analysis of microcalorimetric curves between BHK-21 cell and BHK-21 cell infected by FMDV

	Q/J	P <sub>mean</sub> /μW	P <sub>max</sub> /μW
BHK-21 细胞	4.10	10.1	13.7
BHK-21 cell			
感染 BHK-21 细胞	9.16	27.5	69.0
infected BHK-21 cell			
FMDV 感染后增加 %	125.9	172.2	403.6
FMDV infection increase %			

Q: Quantity of heat; P<sub>mean</sub>: mean thermal power; P<sub>max</sub>: maximum thermal power

2.4 不同稀释度 FMDV 感染 BHK-21 细胞的热谱曲线

图 3 的结果显示, 正常 BHK-21 细胞的代谢热功率经过约 30h 的增长后, 逐渐下降到一个稳定的热功率; 当感染病毒后, 整个体系的产热功率曲线随时间增加而急剧增加, 最大产热功率远大于正常 BHK-21 生长代谢的最大热功率; 而后, 产热功率又随时间增加而衰减。从图 3 中也可看出, 不同稀释度的病毒感染细胞后其对应的热谱曲线的峰高和出峰时间均表现出有规律的变化趋势。

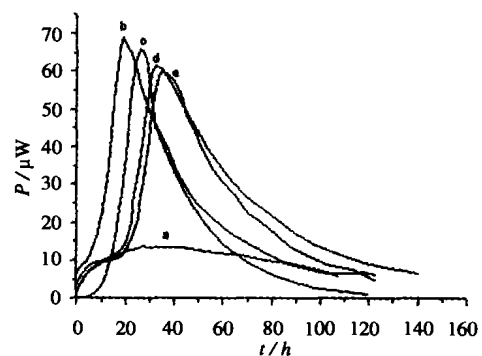


图 3 不同稀释度 FMDV 感染 BHK-21 细胞的热谱曲线  
a, 正常 BHK-21 细胞; b, 原液 FMDV 感染; c, 10<sup>-2</sup> 稀释度 FMDV 感染; d, 10<sup>-3</sup> 稀释度 FMDV 感染; e, 10<sup>-4</sup> 稀释度 FMDV 感染

Fig.3 Metabolic microcalorimetric curves of BHK-21 cell infected by different concentrations FMDV

a, Control BHK-21 cell; b, BHK-21 cell infected by undiluted FMDV; c, BHK-21 cell infected by 10<sup>-2</sup> diluted FMDV; d, BHK-21 cell infected by 10<sup>-3</sup> diluted FMDV; e, BHK-21 cell infected by 10<sup>-4</sup> diluted FMDV.

## 2.5 不同初始浓度病毒感染过程的热谱曲线分析

根据图3热谱曲线的特点,我们采用指数增长模型(对数形式),  $\ln P_t = \ln P_0 + k \cdot t$

对不同稀释度病毒感染过程的产热功率曲线进行了分析,结果见表2。

分析结果说明病毒在细胞内扩增从而导致代谢热功率急剧增加的一步放热过程可以用指数增长模型来描述。

表2 不同稀释度 FMDV 感染 BHK-21 细胞与 BHK-21 细胞对比的热谱曲线分析

Table 2 Metabolic microcalorimetric analysis of BHK-21 cell infected by different concentrations FMDV

Dilution of FMDV	$k/h^{-1}$	R	$P_{max}/\mu W$
Undiluted	0.132	0.995	69.0
$10^{-2}$	0.198	0.975	65.8
$10^{-3}$	0.0938	0.973	61.3
$10^{-4}$	0.127	0.996	60.0
Control BHK-21 cell	\	\	13.7

注:  $k$ , 指数增长期速率常数; R, 相关系数;  $P_{max}$ , 最大热功率。

Note:  $k$ , rate coefficient of exponential increase phase; R, correlation coefficient;  $P_{max}$ , maximum thermal power.

## 3 讨论

生物生理活动各层次上的生物化学反应都伴随着能量的转移和热的产生,量热法研究生命体系获取的代谢热的数据反映的是整个体系所有的净变化。病毒由于缺乏增殖所需的酶系统,在细胞外不能生长,也不能以分裂方式进行繁殖,只有在感染敏感宿主细胞后,利用宿主细胞的酶、能量(ATP)合成系统、核糖体、细胞因子以及大分子合成的前体,才能复制病毒基因组及病毒的蛋白质组份完成自身的生命活动,这其中任意过程都会伴随着代谢热的产生,同时也会影响宿主细胞自身的代谢热变化<sup>[2]</sup>。比较图1和图2发现,一步生长曲线中0~12hr为病毒合成的潜伏期,18~40hr是装配、释放成熟FMDV粒子的高峰期,40hr以后病毒滴度逐渐下降。并且一步生长曲线与FMDV感染BHK-21细胞代谢热谱曲线一步放热的变化趋势基本吻合。从图2、表1可以看出FMDV感染对BHK-21细胞的影响非常显著,细胞总产热量、平均产热功率、最大热功率分别比正常细胞增加了125.9%、172.2%、

403.6%。病毒感染细胞导致某些生物化学反应速度的加快,细胞代谢热功率急剧增加,宿主细胞的生理活动因此变得紊乱,而这可能就是导致宿主细胞病变死亡的主要原因<sup>[8]</sup>。这表明,微量热计连续动态地监测病毒感染细胞整个体系热量变化的过程,不仅可以反映出细胞内的生理活动水平在感染病毒前后总的变化趋势,而且可以从另一层面了解病毒在宿主细胞内的增殖情况。

采用微量热法进一步测定了不同稀释度的FMDV感染BHK-21细胞后的热谱曲线(图3),可以看出,随着病毒稀释度的增大,被病毒感染细胞的热谱峰的峰高(表2:  $P_{max}$ )以及出峰的时间均呈现出有规律的变化,即病毒稀释度越大,出峰的时间就越晚,峰高就越低,说明热谱曲线可以反映出病毒感染剂量的变化;同时,我们利用指数增长模型  $\ln P_t = \ln P_0 + k \cdot t$  (对数形式)拟合的结果(表2的相关系数)也说明口蹄疫病毒感染BHK-21细胞的热谱曲线产热增长期的一步放热方式能够较好地符合指数增长模型。对图1与图3进行比较分析,口蹄疫病毒感染BHK-21细胞的一步生长曲线和对应热谱曲线的一步放热方式吻合,两者具有平行的关系,热谱曲线的峰高与病毒感染的剂量对应,出峰的时间与病毒感染细胞的潜伏期对应,说明热谱曲线不仅能够反映病毒感染细胞后的增殖情况,而且能够揭示病毒感染剂量的变化,表现为病毒感染的滴度越大,峰就越高,出峰时间就越早。这就很好地说明微量热计连续动态地监测病毒感染细胞整个体系热量变化的过程,不仅可以反映出细胞内的生理活动水平在感染病毒前后总的变化趋势,了解病毒在宿主细胞内的增殖情况,而且能够反映病毒感染剂量的变化,另外,微量热法连续的动态分析也优于传统的间隔时间取样测定病毒滴度绘制病毒繁殖的一步生长曲线的不连续方式。

可见,尽管细胞感染病毒以后,细胞内发生的各种生物化学反应十分复杂,微量热计仍可连续、有效地测定病毒感染细胞整个过程的总的代谢变化趋势。更为重要的是它能够提供实时动态连续的数据从而反映病毒在细胞内增殖情况,为进一步的研究提供参考数据。不言而喻,在细胞水平上研究抗病毒药物和一些抗病毒化学制剂的作用机制和效用,该方法也大有用武之地。

## 参考文献

- [1] Backman P, Kimura T, Schon A, et al. Effect of pH-variations on the kinetics of growth and energy metabolism in cultured T-lymphoma

- cells: a microcalorimetric study [J]. *J Cell Physiol*, 1992, 150: 99-103.
- [2] Feng Y, Luo Z F, Qu S S, *et al.* Study on the thermosensitivity of tumor cells by microcalorimetry [J]. *Thermochim Acta*, 1997, 303: 203-207.
- [3] Liu Y W, Wang Z Y, Liu Y, *et al.* Microcalorimetry study on the effect of Nd (III) ion on metabolism of mitochondria isolated from fish liver tissue [J]. *J Thermal Analysis and Calorimetry*, 2001, 65:761-767.
- [4] Beezer A E. *Biological Microcalorimetry* [M]. *Thermochemica Acta*, 1990, Vol.172, Special Issue; *Biological Calorimetry-A collection of invited papers dedicated to Professor Ingemar Wadsö on the occasion of his 60th Birthday*, Academic Press, 1980.
- [5] Bachrach H L. Foot and mouth Disease Virus [J]. *Annu. Rev. Microbiol*, 1968, 22: 201-244.
- [6] Bachrach H L, Callis J J, Hess W R, *et al.* A Plaque Assay for Foot-and-Mouth Disease Virus and Kinetics of Virus Reproduction [J]. *Virology*, 1957, 4: 224-236.
- [7] Samuel A R, Knowles N J, Kitching R P, *et al.* Molecular analysis of foot-and-mouth disease type O viruses isolated in Saudi Arabia between 1983 and 1995 [J]. *Epidemiol Infect*, 1997, 119: 381-389.
- [8] 殷震, 刘景华. *动物病毒学* [M], 第二版, 北京, 科学出版社, 1997.
- [9] Liu Y W, Wang C X, Zheng C Y, *et al.* Microcalorimetric study of the metabolism of U-937 cells undergoing apoptosis induced by the combined treatment of hyperthermia and chemotherapy [J]. *J Thermal Biology*, 2002, 27:129-135.