

## 汉滩病毒诱导小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞凋亡的初步研究

高娟, 杨守京\*\*, 刘彦仿

(第四军医大学病理学教研室, 陕西西安, 710032)

Preliminary Study of Apoptosis of SP2/0 Cells Induced by *Hantaan virus*

GAO Juan, YANG Shou-jing\*\*, LIU Yan-fang

(Department of Pathology, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China)

**Abstract:** To study the apoptosis of malignant carcinoma cells induced by *Hantaan virus*, SP2/0 cells cultured in vitro were infected with *Hantaan virus*. Their apoptosis profiles were detected using Giemsa staining, flow cytometry and immunohistochemistry staining. Giemsa staining showed typical apoptotic changes in infected cells; Apoptosis peaks were detected by flow cytometry; Immunohistochemistry staining showed apparent increase of Fas and FasL expression in infected cells compared with normal cells. The results suggest that *Hantaan virus* could induce SP2/0 cells in vitro to undergo apoptosis which might be associated with Fas and FasL.

**Key Words:** *Hantaan virus*; SP2/0 cells; Apoptosis; Fas/FasL

**摘要:** 为研究汉滩病毒对肿瘤细胞的诱导凋亡作用, 以一定量病毒悬液感染体外培养的 SP2/0 细胞, 接种后一定时间将细胞消化用片行 Giemsa 染色观察凋亡细胞核的变化, 制细胞悬液以流式细胞仪测细胞周期, 并用免疫组化的方法检测凋亡分子 Fas 和 FasL 的表达。结果显示经病毒诱导后细胞出现生长特性及形态学变化, Giemsa 染色观察到典型凋亡细胞; 流式细胞仪显示有凋亡峰出现; 免疫组化检测到感染后 SP2/0 细胞中 Fas 和 FasL 表达明显升高。该结果表明汉滩病毒可诱导体外培养 SP2/0 细胞凋亡, 其发生可能与凋亡分子 Fas 和 FasL 有关。

**关键词:** 汉滩病毒; SP2/0 细胞; 凋亡; Fas/FasL

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 04-0315-03

细胞凋亡 (apoptosis) 又称程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD), 是指在一定生理和病理情况下机体为维护内环境的稳定, 通过基因调控而使细胞主动有序的消亡过程, 既可自发发生, 也可由特殊介导体或在一定条件下诱导发生。它在维持组织器官的正常形态和功能方面起着非常重要的作用。近年来研究发现越来越多的病毒可诱导细胞凋亡, 病毒感染常常可致多种基因表达及蛋白酶激活而引起细胞凋亡<sup>[1]</sup>。本实验就汉滩病毒诱导体外培养 SP2/0 细胞凋亡情况进行研究并初步探讨了其发生机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞的准备和诱导

体外培养 SP2/0 细胞 (本校免疫学教研室惠赠) 至约  $1 \times 10^7$  个, 收集细胞 1 000r/min 离心去上清。将 100LD<sub>50</sub> 汉滩病毒 (*Hantaan virus*, HTNV) 76-118 株 (本室保存) 用 RPMI1640 (GBICO 公司) 以 1:10 稀释后, 取 1mL 吹打重悬离心的细胞并接种于细胞培养瓶, 37°C 诱导 2h, 离心弃去病毒液, 换用含 2% 小牛血清 (FCS) 的 RPMI1640 (2% FCS 1640) 4mL 重悬细胞并置于 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 的条件下继续培养, 第 10 天收集细胞检测凋亡指标。对照组细胞以不含病毒的 RPMI1640 吸附 2h 后, 换用 2% FCS 1640 培养收集检测同前。

### 1.2 凋亡的检测

1.2.1 细胞形态学观察: 于倒置显微镜下直接观察细胞形态及生长情况; 诱导 10d 后取部分细胞用片,

收稿日期: 2002-12-13, 修回日期: 2003-03-03

作者简介: 高娟 (1979-), 女, 湖北省籍, 硕士生, 研究方向为分子免疫病理学。

\*\* 通讯作者: 杨守京 (1965-), 男, 山东省籍, 教授, 博士。Correspondence author. E-mail: syang@mcw.edu

按赵一岭等改良微波姬姆萨 (Giemsa) 染色法<sup>[2]</sup>进行细胞染色, 在光镜下进一步观察细胞核的变化。

1.2.2 流式细胞仪分析细胞周期: 离心制备单细胞悬液 ( $1 \times 10^6$ ), PBS 洗涤后以 70% 乙醇 4° C 固定过夜。次日以 PBS 洗 2 次, 常规 PI 染色, 静置 10min, 于流式细胞仪 (美国 Coulter 公司, EPICS-ELITE-ESP 型) 行细胞周期分析, 检测 G1 期、S 期和 G2 期细胞所占百分比, 并观察是否存在亚二倍体峰 (凋亡峰) 及其所占比例。

### 1.3 Fas 和 FasL 的免疫组化检测

细胞片至蒸馏水洗, 室温入含 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 80% 甲醇 40min 阻断内源性过氧化物酶活性, 2% 正常羊血清 37° C 1h 封闭非特异性抗体结合位点, 分别加兔抗 Fas 多克隆抗体 (pAb) (即用型, 迈新公司) 及兔抗 FasL pAb (即用型, 迈新公司) 以 37° C 孵育 1h, PBS 振洗 5min  $\times$  3 次, 用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔型 DAKO Envison<sup>TM</sup> 检测, 0.05% 3' 3' 二氨基联苯胺 (DAB) 和 0.009% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色。用无关抗体和

PBS 作替代及空白对照。正常对照组染色同上。

## 2 结果

### 2.1 凋亡细胞的形态学观察

实验组在倒置显微镜下观察到部分细胞皱缩体积缩小, 折光性减弱。Giemsa 染色光镜下观察, 实验组细胞形态改变, 密度减低, 部分细胞出现核固缩深染, 胞浆减少甚至消失, 此即凋亡细胞, 并可观察到凋亡小体 (彩版 I 图 1)。对照组未见明显变化。

### 2.2 流式细胞仪检测结果

对照组细胞在 DNA 直方图上表现为 G0/G1、S、G2、M 期, 其 G1%、S% 及 G2% 分别为 26.3、23.6、50.0; 与之相比, 实验组中 G1% 升高至 41.8, 而 S%、G2% 分别降低至 14.7 和 43.5, 并在 G1 峰左侧出现一亚二倍体细胞群的峰型 (亚 G1 峰, 即凋亡峰), 凋亡细胞占总数的 3.4% (图 2)。说明细胞在感染病毒后发生凋亡。

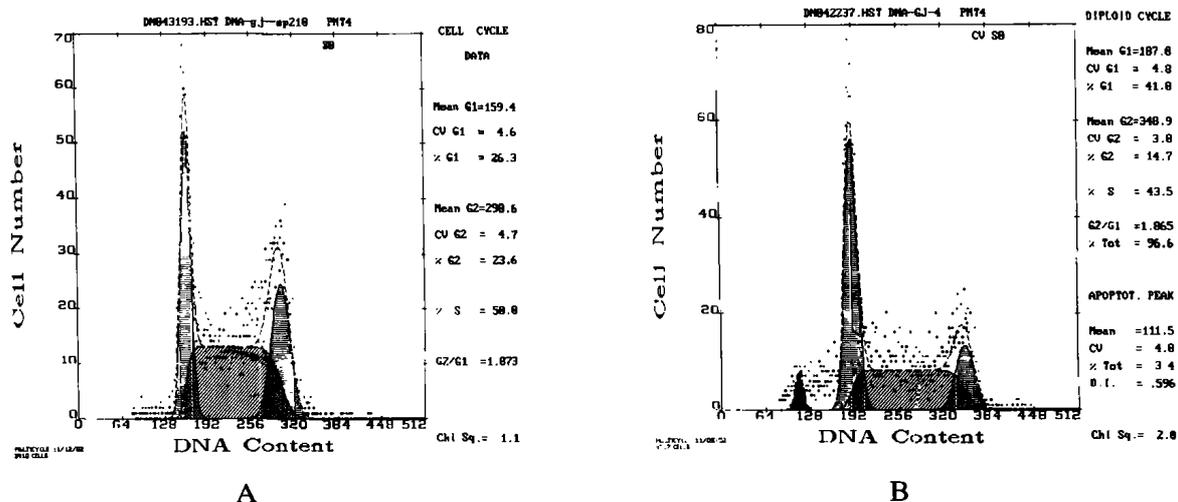


图2 正常与病毒感染的 SP2/0 细胞周期检测结果

A, 对照组表现为 G0/G1、S、G2、M 期; B, 实验组 G1 增多, 而 S、G2 减少, 并在 G1 峰左侧出现一亚二倍体细胞群的凋亡峰型。

Fig.2 FCM results of normal and the infected SP2/0 cells

A, The controlled team shows standard G0/G1、S、G2、M cycle; B, The experimented team has specific apoptotic cell cycle: the percentage of cells in G1 increases, cells in S and G2 decrease, and there is a apoptotic peak on the left of G1 peak.

### 2.3 免疫组化染色结果

Fas、FasL 在部分正常 SP2/0 细胞胞浆中有微弱表达, 在实验组中表达 Fas 和 FasL 的细胞增多, 而且阳性程度明显增强, 表现为胞浆中的棕黄色颗粒信号, 呈强阳性, 以 Fas 为著 (彩版 I 图 3)。

## 3 讨论

汉坦病毒 (Hantavirus, HV) 是引起包括肾综合征出血热 (HFRS) 和肺综合征出血热 (HPS) 在内的人类汉坦病毒出血热的致病病毒, 病毒通过对靶细胞直接作用、诱导机体免疫反应以及由

此引发的一系列继发因素参与该病发病机制。我们在研究该病毒的致病机理时发现该病毒不但可以感染其易感宿主的组织细胞, 还可以感染几种肿瘤细胞如 SP2/0 细胞及胃癌 7901 细胞(另有实验结果证实感染汉滩病毒的这两种细胞胞浆中有病毒核蛋白的明确表达)。

本实验通过对体外培养 SP2/0 细胞感染汉滩病毒后行凋亡指标检测, 发现感染早期在倒置显微镜下即可观察到细胞形态学及生长特性的变化; Giemsa 染色光镜下观察找到核固缩深染、胞浆减少甚至消失的凋亡细胞; 流式细胞仪检测细胞周期在 G1 峰左侧出现凋亡峰, 证实汉滩病毒诱导 SP2/0 细胞发生凋亡; 在感染细胞上进行 Fas 和 FasL 免疫组化染色显示有明显的阳性信号, 提示该凋亡的发生可能与 Fas 系统有关。

近年来的研究表明病毒感染和细胞凋亡之间有着密切的联系。从病毒与宿主的相互关系看, 被病毒感染的细胞发生凋亡可能是机体抗病毒的一种防御机制, 有助于宿主细胞限制或减慢病毒的扩散; 而亦有可能是病毒感染导致组织细胞损伤的重要机制<sup>[3]</sup>。研究中发现汉滩病毒诱导肿瘤细胞发生凋亡的结果, 提示凋亡可能是该病毒致病的机制之一; 由于实验是在肿瘤细胞上进行, 也可解决能否将该病毒作为肿瘤凋亡的诱导物的问题。

本实验结果显示这种凋亡的诱导可能是通过 Fas 途径。我们推测, 病毒感染细胞后诱导细胞的 Fas 和 FasL 表达增加并将产物转运至细胞表面, 细胞间的 Fas 和 FasL 相互作用从而启动凋亡过程。至于病毒入侵后如何促进 Fas 和 FasL 的表达

并启动凋亡仍需进一步研究, 可以推测在这一启动过程中, 相关病毒基因的表达和相应蛋白的合成及其与宿主的作用起着关键性的作用<sup>[4-6]</sup>, 而且感染中高表达的细胞因子也直接或间接的参与该过程中<sup>[7]</sup>。在基因和蛋白水平上对此进行进一步探讨, 可以对该病毒感染细胞后细胞内信号转导的研究提供帮助, 从而有助于揭示病毒致病机理, 同时也可作为肿瘤的治疗提供新的思路。

## 参考文献

- [1] Devireddy L R, Jones C J. Activation of caspases and p53 by bovine herpesvirus 1 infection results in programmed cell death and efficient virus release[J]. *J Virol*, 1999, 73: 3778-3788.
- [2] 赵一岭, 黄高升, 李玉松, 等. 改良微波姬姆萨染色法在病理诊断中的应用体会[J]. *临床与实验病理学杂志*, 1998, 14: 194-195.
- [3] Kang Ju-Il, Park S-H, Lee P-W, *et al.* Apoptosis is induced by Hantaanviruses in Cultured Cells[J]. *Virology*, 1999, 264: 99-105.
- [4] Tanner J E, Alfieri C. Epstein-Barr virus induces Fas (CD95) in T cells and Fas ligand in B cells leading to T-cell apoptosis[J]. *Blood*, 1999, 94: 3439-3447.
- [5] Bartz S R, Emerman M. Human immunodeficiency virus type 1 Tat induces apoptosis and increases sensitivity to apoptotic signals by up-regulating FLICE/caspase-8[J]. *J Virol*, 1999, 73: 1956-1963.
- [6] Li-Weber M, Laur O, Dern K, *et al.* T cell activation-induced and HIV tat-enhanced CD95(APO-1/Fas) ligand transcription involves NF-kappaB[J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30: 661-670.
- [7] Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, *et al.* Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis[J]. *J Virol*, 1998, 72: 3691-3697.

## 彩版 I

高娟,等. 汉滩病毒诱导小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞凋亡的初步研究(正文见第 315 页)

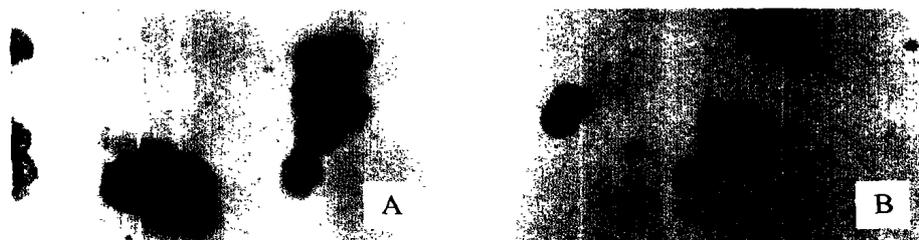


图 1 正常及病毒感染 10d 的 SP2/0 细胞 Giemsa 染色( $\times 400$ )

A. 正常细胞; B. 感染细胞中出现凋亡小体, 表现为体积变小, 核深染浓集, 胞浆呈嗜酸性红染。

Fig.1 Giemsa staining of normal and the infected SP2/0 cells( $\times 400$ )

A, Normal cells; B. Infected cells showed apoptotic changes: the reduced size, the condensed nuclear and the acidophilic cytoplasm.

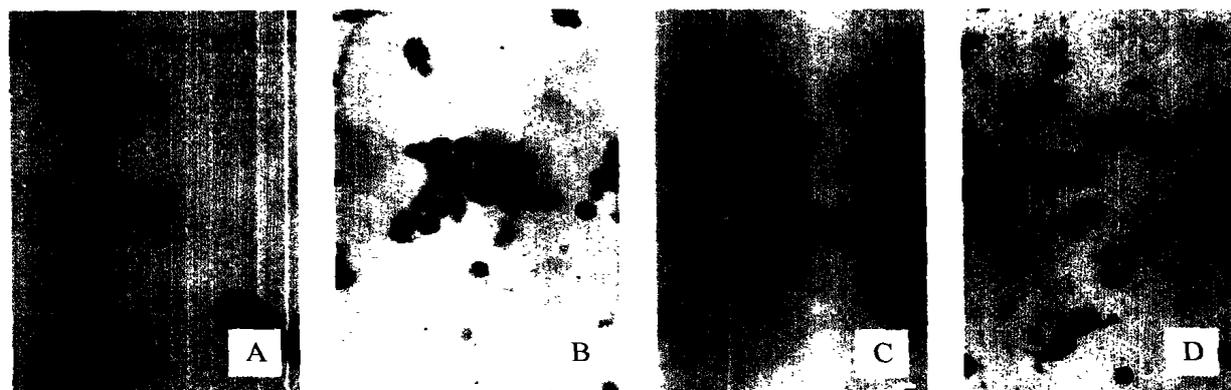


图 3 病毒感染的 SP2/0 细胞 Fas 和 FasL 免疫组化染色( $\times 400$ )

Fas(A)、FasL(C)在部分正常 SP2/0 细胞胞浆中有微弱表达;病毒感染后 Fas(B)和 FasL(D)表达明显增强,均呈棕黄色强阳性定位于细胞胞浆中,以 Fas 更显著。

Fig.3 Immunohistochemical staining of Fas and FasL in normal and the infected SP2/0 cells( $\times 400$ )

Fas(A) and FasL(C) have slight expression in some of normal SP2/0 cells. In the infected cells, the expressions of both Fas(B) and FasL(D) have increased dramatically. The strong positive signals were localized in cytoplasm and Fas is more apparent.