

## 蓝舌病毒 HbC<sub>3</sub> 株对小鼠乳腺癌 MA-782 细胞的感染特性\*

梁 科, 董长垣\*\*, 胡 俊, 张蔚英, 陈 杰

(武汉大学医学院 病毒学国家重点实验室, 湖北武汉 430071)

### The Infectivity of Bluetongue Virus Strain HbC<sub>3</sub> to MA782 Cell

LIANG Ke, DONG Chang-yuan, HU Jun, ZHANG Wei-ying, CHEN Jie

(National Key Laboratory of Virology, Medical School, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

**Abstract :** To investigate the characteristics and the mechanism of bluetongue virus strain HbC<sub>3</sub> (BTV-HbC<sub>3</sub>) infecting MA782 malignancy *in vitro*, BTV-HbC<sub>3</sub> was used to infect MA782 cell, and the cytopathic effects (CPE) was observed. Transmission electron microscope (TEM) was introduced to study changes of ultrastructure. Immunohistochemical staining was used to observe the expressed viral protein in tumors and organs. TUNEL staining was taken to detect the apoptosis of MA782 cells induced by BTV-HbC<sub>3</sub>. The results indicated that MA782 cell was sensitive; Lots of virus particles were found in cytoplasm by TEM; Viral protein expressed in cell membrane and cytoplasm; and early apoptosis cells were found by TUNEL staining. All these results showed that BTV-HbC<sub>3</sub> could infect and replicate in MA782 cells efficiently *in vitro*.

**Key words :** Oncolytic virus; Bluetongue virus strain-HbC<sub>3</sub> (BTV-HbC<sub>3</sub>); MA782 cell; Apoptosis

**摘要 :** 体外研究蓝舌病毒湖北株 3 (BTV-HbC<sub>3</sub>) 对鼠乳腺癌细胞 MA782 的感染性并探讨 BTV-HbC<sub>3</sub> 靶向性溶癌机制。观察 MA782 细胞感染 BTV-HbC<sub>3</sub> 的病变效应 (CPE); MTT 法研究病毒致细胞病变率的特征; 透射电镜观察感染病毒后细胞超微结构的变化; 免疫组化研究病毒蛋白在细胞内的表达特点; 凋亡染色 (TUNEL 法) 观察病毒诱导细胞凋亡的情况; 流式细胞仪测定病毒对 MA782 细胞周期的影响。结果证明 BTV-HbC<sub>3</sub> 感染 MA782 细胞后有明显的细胞病变效应; 病毒蛋白主要表达在细胞的胞膜及胞浆内; 凋亡染色发现大量的凋亡细胞; 流式细胞仪可见明显的亚二倍体峰。故认为 BTV-HbC<sub>3</sub> 在体外能有效的感染 MA782 细胞, 并能诱导 MA782 细胞凋亡。

**关键词 :** 溶癌病毒; 蓝舌病毒湖北株 3 (BTV-HbC<sub>3</sub>); MA782 乳腺癌细胞; 凋亡

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)02-0153-04

蓝舌病毒 (Bluetongue Virus, BTV) 是呼肠孤病毒科环状病毒属的代表种, 主要感染羊及野生反刍动物, 未见引起人类疾病。蓝舌病毒湖北株 (BTV-HbC<sub>3</sub>) 是我室首次在湖北省分离得到的蓝舌病毒株<sup>[1,2]</sup>。本室在对其溶癌作用研究中发现<sup>[3]</sup>: 该病毒可以在体外感染和杀死多种肿瘤细胞, 如人宫颈癌 Hela 细胞、人星形胶质瘤 U251 细胞、人肺癌 A549 细胞和 SPC-A<sub>1</sub> 细胞, 而对人正常细胞如人胚肺细胞、人气管平滑肌细胞等无感染性。对小鼠

荷 S180 腹水瘤及裸鼠荷人肝癌 Herp-3B 有靶向性治疗作用。本室还初步证实蓝舌病毒湖北株对小鼠荷 MA782 乳腺癌具有杀伤作用<sup>[4]</sup>。本实验主要深入研究 BTV-HbC<sub>3</sub> 体外对小鼠乳腺癌 MA-782 细胞感染特性, 探讨 BTV-HbC<sub>3</sub> 溶癌的机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

中国蓝舌病毒湖北株 (BTV-HbC<sub>3</sub>), 小鼠乳腺

收稿日期: 2005-09-21, 修回日期: 2005-11-30

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271471)

作者简介: 梁 科 (1978-), 男, 湖北随州籍, 硕士研究生, 主要从事溶癌病毒的研究。

\*\* 通讯作者: 董长垣 (1949-), 男, 湖北籍, 教授, 主要从事溶癌病毒研究。Corresponding author: Tel: 027-87331787, E-mail: dchangyuan@163.com

癌细胞 (MA782), Vero 细胞均为本室保存。DMEM 培养基 (GIBCO 公司); 胎牛血清 (郑州三利公司); 三甲基噻唑二苯基四唑溴盐 (MTT) (SIGMA 公司); 碘化吡啶 (PI) (天源生物制品有限公司); 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体 (二抗) 及 DAB 显色试剂盒 (福州迈新公司); 凋亡染色试剂盒 (武汉博士德公司)。

## 1.2 病毒的增殖及病毒悬液的制备

在 Vero 细胞上按本室常规方法增殖病毒<sup>[2]</sup>, 收获病毒滴度为  $10^4$ TCID<sub>50</sub>/mL, -80 储存备用。

## 1.3 BTV-HbC<sub>3</sub> 感染后细胞病变的观察

用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 MA782 细胞, 待细胞长至 70%~80% 汇合时, 吸弃培养液。接种 1mL BTV-HbC<sub>3</sub> 于培养瓶, 37 吸附 1h, 弃病毒液。以含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养液维持培养, 同时将未感染对照细胞以相同条件维持培养。每 6h 观察一次。

## 1.4 细胞感染 BTV-HbC<sub>3</sub> 后的电镜观察

0.25% 胰酶消化接种 BTV-HbC<sub>3</sub> 36h 后的 MA782 细胞, PBS 吹打取出。4000r/min 离心 15 min, 2.5% 戊二醛溶液固定作超薄切片。透射电镜 (TEM) 观察细胞内病毒颗粒和感染 BTV-HbC<sub>3</sub> 后细胞超微结构变化。

## 1.5 BTV-HbC<sub>3</sub> 感染细胞的免疫组化分析

在 HeLa 细胞上增殖 BTV-HbC<sub>3</sub>, 经常规提取纯化的 BTV-HbC<sub>3</sub> 制备抗原免疫家兔, 以获得兔抗 BTV-HbC<sub>3</sub> 的多克隆抗体 (一抗)。将 MA782 细胞进行爬片培养。待细胞长至 70%~80% 汇合时接种在 Vero 细胞上增殖的 BTV-HbC<sub>3</sub>。36h 后取下爬片, 4% 多聚甲醛固定, 依文献<sup>[5]</sup>记载方法进行免疫组化操作。

## 1.6 MTT 法比色法检测感染病毒后细胞的存活率

接种 MA782 细胞于 96 孔板, 24h 细胞长至汇合后接种 BTV-HbC<sub>3</sub>, 滴度分别为  $10^0$ ~ $10^4$ 。36h 后用 MTT 比色法检测细胞活性。MTT 使用浓度为 0.5mg/mL, 每孔 50  $\mu$ L。37 孵育 4h, 结晶产物用酸化的异丙醇 (pH=6.0) 溶解。在酶标仪上检测每孔吸光度 (OD<sub>570</sub>), 计算每孔细胞存活率。

## 1.7 PI 单染色检测 BTV-HbC<sub>3</sub> 对细胞周期的影响

接种 BTV-HbC<sub>3</sub> 于 MA782 细胞, 36h 后将培养液上清取至离心管, 1000r/min 离心 5 min, 取沉淀 1; 0.25% 胰酶消化贴壁细胞, PBS 吹打取出, 1000r/min 离心 5 min, 取沉淀 2。合并沉淀 1 和沉淀 2, 以 70% 冷乙醇固定。将固定的细胞离心后, PBS 重悬, 经 10  $\mu$ g/mL RNase 处理并加入 10  $\mu$ g/mL 的 PI 染色, 流式细胞仪分析细胞周期。

## 1.8 病毒感染细胞的凋亡染色分析

爬片培养 MA782 细胞, 待细胞长至 70%~80%

汇合时接种 BTV-HbC<sub>3</sub>; 同步培养阴性对照细胞。24h 后取下爬片, 4% 多聚甲醛固定。按试剂盒说明书操作, DAB 显色。细胞核内有棕色颗粒者为凋亡阳性细胞。感染病毒组和阴性对照组各取 10 张爬片进行染色, 每张爬片拍摄 5 个高倍视野 ( $\times 200$ ), 每个视野记数 100 个细胞中凋亡阳性的细胞的个数, 以平均计算阳性细胞数所占的百分比作为凋亡细胞阳性的指数 (Apoptosis Index, AI), 比较分析两组 MA782 细胞凋亡情况。

## 1.9 实验数据的统计学分析

实验数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{X} \pm S$ ) 表示, 采用 SPSS11.5 统计软件进行分析。细胞病变率的比较用方差分析, 凋亡指数的比较用 *t* 检验,  $P < 0.05$  被认为有显著性。

## 2 结果

### 2.1 BTV-HbC<sub>3</sub> 感染细胞病变效应、MTT 分析及细胞超微结构的观察

接种 BTV-HbC<sub>3</sub> 24h 后 MA782 细胞出现病变, 36h 达高峰。24h 时, 病变的 MA782 细胞表现为: 细胞内出现大量的颗粒, 一些细胞收缩变圆, 间隔变大, 轮廓增强。36h 时, 更多细胞变圆, 部分细胞脱落, 漂浮, 破碎死亡。还有的细胞变得细长, 出现“拉丝”现象。经 MTT 比色法分析 BTV-HbC<sub>3</sub> 对 MA782 细胞的病变率可见: 随着 BTV-HbC<sub>3</sub> 的浓度降低, MA782 的存活率升高, 显示病毒的量与细胞的存活率有量效关系。经统计学分析表明: 不同浓度的 BTV-HbC<sub>3</sub> 感染的 MA782 细胞 36h 后的存活率有显著性差异。在电镜下可见超微结构变化明显, 表现为: 细胞浆中有大量由内质网扩张形成的大小不等的空泡, 并可观察到大量的病毒, 完整的病毒约为直径 70nm 的球状颗粒 (图 1A)。除完整的病毒颗粒外, 尚可见较多的病毒空衣壳。镜下还可见大量的细胞核碎裂, 染色质边聚, 而细胞膜完整, 该现象为凋亡细胞的典型表现 (图 1B)。

### 2.2 BTV-HbC<sub>3</sub> 感染细胞的免疫组化分析

BTV-HbC<sub>3</sub> 在感染 MA782 细胞 36h 后病毒蛋白表达阳性, 病毒蛋白主要在胞膜和胞浆中表达。阳性着色特征为: 胞膜染色呈不连续的棕褐色, 胞浆则为大量的棕褐色颗粒 (图 2)。

2.3 BTV-HbC<sub>3</sub> 感染细胞的凋亡染色及半定量分析  
对感染病毒的 MA782 细胞爬片的凋亡染色, 揭示出 BTV-HbC<sub>3</sub> 感染细胞后可以诱导大量的 MA782 细胞凋亡, 主要表现为: 胞核内有棕色颗粒, 而对照组仅见零星的凋亡细胞 (图 3)。

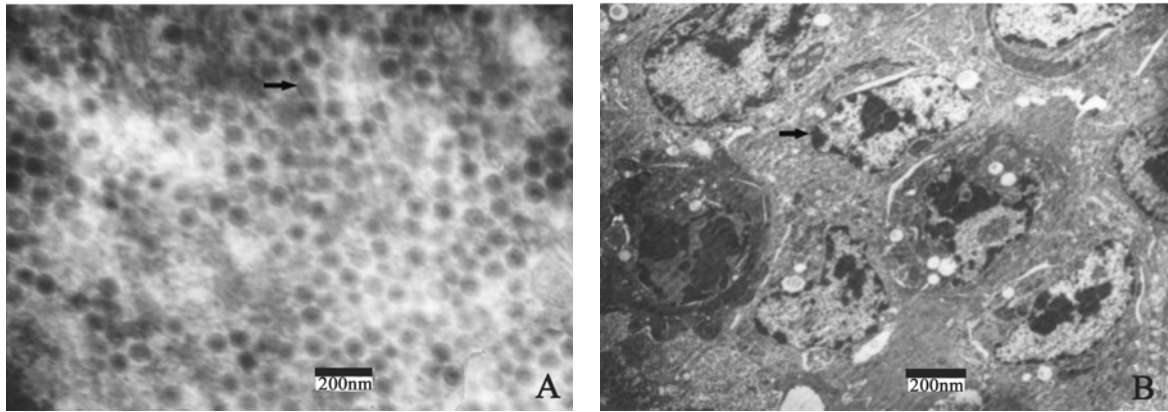


图 1 MA782 细胞感染 BTV-HbC<sub>3</sub>36h 后超微结构的变化  
Fig.1 The ultra structure changes of MA782 at 36 hpi

A : Lots of virus particles were found in cytoplasm, the endoplasmic reticulum dilated into huge vacuoles(Black arrow showed virus particle).B : Condensed chromatin at the nuclear margin were found in many cells, cell membranes were intact (Black arrow showed nuclear).

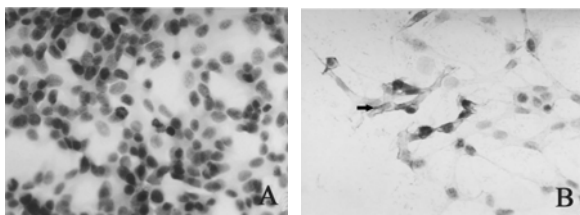


图 2 感染 BTV-HbC<sub>3</sub>36h 前后的 MA782 细胞的免疫组化  
Fig.2 Immunohistochemical staining of MA782 at 36 hpi  
A : Control MA782 cell. B : Virus protein expressed in cell membrane and cytoplasm. Black arrow showed virus protein express as brown.

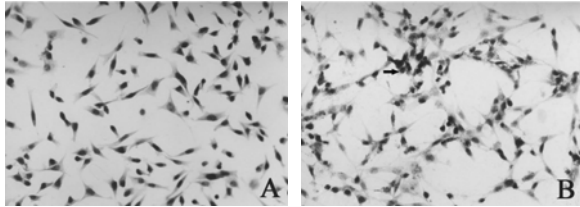


图 3 感染 BTV-HbC<sub>3</sub>24h 的 MA782 细胞的凋亡染色(TUNEL)  
Fig.3 UNEL staining of MA782 at 24 hpi  
A : Control MA782 cell. There were few apoptosis cells. B : Post infection 24h.Lots of apoptosis cells can be observed,The nucleus of apoptosis cells appear brown.Black arrow showed apoptosis cell.

经统计学分析，染病毒的 MA782 细胞组凋亡指数显著高于阴性对照组 ( $P < 0.01$ )，结果如表 1。

表 1 不同处理组间凋亡指数 (AI) 的比较

Comparison of AI positive group with that of negative			
Cell	Samples (n)	AI (%)	P
Infected with BTV-HbC <sub>3</sub>	10	57.384 ± 6.320	P < 0.01
Control	10	1.460 ± 0.459	

#### 2.4 BTV-HbC<sub>3</sub> 对细胞周期的影响

感染 BTV-HbC<sub>3</sub>36h 后的 MA782 细胞与阴性对照组相比细胞周期明显左移。在细胞 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期前有明显的亚二倍体峰 (subG<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期)，处于此期的细

胞比率为 85.1%，而阴性对照组处于此期的细胞比率为 1.9%。而且感染 BTV-HbC<sub>3</sub> 组 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期及所占的比率明显低于阴性对照组，G<sub>2</sub> 期及 M 期的细胞所占的比例也减少，在细胞周期图中代表这两期的峰几乎不可见 (图 4)。

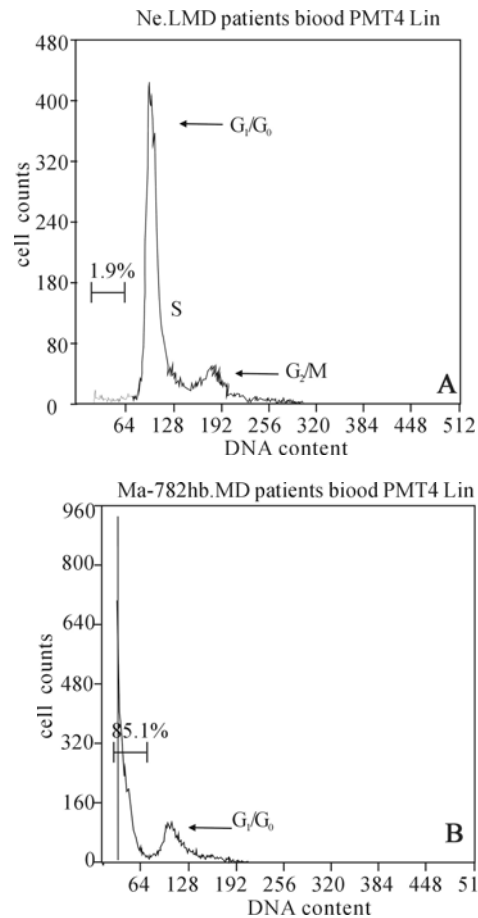


图 4 MA782 细胞接种 BTV-HbC<sub>3</sub>36h 各期 DNA 含量  
Fig.4 DNA content in different phase of MA782 cell

A : Negative control.Most of cells were in G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase, The percentage of cells in sub-G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase was 1.9%. B : Post infection 36h.Great sub-G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> wave appeared in cell cycle chart, The percentage of cells in sub-G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase was 85.1%, The wave of G<sub>2</sub>/M was disappeared.

### 3 讨论

当前肿瘤治疗最大的难点是放、化疗与手术治疗均缺乏靶向性。近年来溶癌病毒的发展给这一难题带来了曙光。溶癌病毒能靶向性感染某些肿瘤细胞,通过不同的途径使肿瘤死亡,而对正常的细胞无害,如与 BTV-HbC<sub>3</sub> 同科不同属的呼肠孤病毒(Reovirus)就能感染 Ras 基因激活的肿瘤细胞,并使之死亡<sup>[6]</sup>。

本室在研究 BTV-HbC<sub>3</sub> 的靶向性溶癌作用时发现:其能有效的使小鼠所荷 MA782 乳腺癌发生消退,而对小鼠的正常器官未见明显损害。本实验研究发现:BTV-HbC<sub>3</sub> 在感染 MA782 细胞后出现明显的 CPE,通过对接种病毒的 MA782 细胞的免疫组化分析,病毒蛋白主要表达在胞膜及胞浆内,尤其是在胞浆内表达较高。透射电镜下研究感染 BTV-HbC<sub>3</sub> 的 MA782 细胞的超微结构特征也支持本研究中的免疫组化分析。我们可以得出以下结论:BTV-HbC<sub>3</sub> 在体外能有效的感染 MA782 细胞,并能其中复制和表达病毒蛋白。MTT 法研究还发现不同浓度的 BTV-HbC<sub>3</sub> 对 MA782 细胞均有杀伤作用,且不同浓度的 BTV-HbC<sub>3</sub> 感染 MA782 细胞后会导导致被感染细胞呈现不同的存活率。

国内外对溶癌病毒抗肿瘤的机理进行了广泛而深入的研究,对其有了一定的认识,有些溶癌病毒是通过在细胞内复制直接裂解细胞如腺病毒和单纯疱疹病毒;有些溶癌病毒是通过产生一些细胞毒性的蛋白使肿瘤细胞死亡如腺病毒就能产生 E3 及 E4ORF4 两种细胞毒性蛋白杀伤肿瘤细胞;还有的病毒如呼肠孤病毒通过裂解肿瘤细胞和诱导肿瘤细胞凋亡两种方式使肿瘤细胞死亡<sup>[7,8]</sup>。

本次实验通过多种手段探讨了 BTV-HbC<sub>3</sub> 在体外感染 MA782 细胞后,MA782 细胞死亡的方式,以进一步研究 BTV-HbC<sub>3</sub> 溶癌的分子机理。本实验发现:感染 BTV-HbC<sub>3</sub>36h 的 MA782 细胞在透射电镜下超微结构呈现为广泛而典型的凋亡表现,而流式细胞仪分析感染病毒的 MA782 细胞的细胞周期可见感染 BTV-HbC<sub>3</sub>36h 的 MA782 细胞与阴性对照组相比 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期前有明显的亚二倍体峰,此峰出

现多被认为凋亡现象的典型表现,且感染 BTV-HbC<sub>3</sub>36h 的 MA782 细胞处于该期的细胞比率高达 85.1%。此外我们在感染 BTV-HbC<sub>3</sub>24h 的 MA782 细胞进行凋亡染色(TUNEL 法)发现存在大量早期凋亡细胞,与之相比阴性对照组仅见零星早期凋亡细胞。由以上结果揭示了 BTV-HbC<sub>3</sub> 在体外通过诱导 MA782 乳腺癌细胞进入凋亡而使 MA782 细胞死亡。而且本研究室在通过移植动物模型研究 BTV-HbC<sub>3</sub> 体内靶向性抗 MA782 乳腺癌时发现 BTV-HbC<sub>3</sub> 在体内亦通过诱导 MA782 乳腺癌细胞进入凋亡而实现抗肿瘤(另文发表)。有关于 BTV-HbC<sub>3</sub> 诱导 MA782 乳腺癌细胞凋亡的细胞分子机理和信号通路,尚有待于我们进一步研究。

### References

- [1] Dong Changyuan. Isolation of bluetongue virus and investigation of its epidemiology in china [A]. Abstract of Third International Symposium on double-strand RNA virus [C]. Hawaii, USA, 1990.
- [2] Dong C Y, Chen Xiao, Yan Y F (董长垣, 陈晓, 严银钊) *et al.* Proliferative and genetic characteristic of bluetongue HbC<sub>3</sub> [J]. Acta Academiae Medicinae Hubei (湖北医科大学学报), 1999, 20 (1): 7-9.
- [3] Xiao A T, Dong C Y, Zhang W Y, (肖安涛, 董长垣, 张蔚英) *et al.* Studies on infectivity of bluetongue virus strain HbC<sub>3</sub> to several human and animal cells [J]. Virologica Sinica (中国病毒学), 2004, 19 (4): 249-352.
- [4] Luo Xiang, Dong C Y, Guo S F, (罗翔, 董长垣, 郭淑芳) *et al.* Bluetongue virus therapy of MA782 breast adenocarcinoma grown subcutaneously in mice [J]. Medical Journal of Wuhan University (武汉大学学报医学), 2004, 25 (4): 272-274.
- [5] Norman K L, Coffey M C, Hirasawa K, *et al.* Revirus oncolysis of human breast cancer [J]. Human Gene Therapy, 2002, 13: 641-652
- [6] Strong J E, Coffey M C, Tang D, *et al.* Revirus therapy of tumors with activated Ras pathway [J]. Science, 1998, 282: 1322-1334.
- [7] Mullen T, Tanabe K K. Viral oncolysis [J]. The Oncologist, 2002, 7: 106-109.
- [8] Tyler K L, Clarke P, DeBiasi R L, *et al.* Reviruses and the host cell [J]. TRENDS in Microbiology, 2001, 9:560-564.