

Sindbis 病毒的繁殖与宿主细胞 BHK-21 的凋亡*

张小青 裘 霁 丁明孝

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

任显辉 邱殷庆

(香港中文大学解剖学系 香港)

摘 要 详细报道了 Sindbis 病毒诱导 BHK-21 细胞凋亡的过程, 病毒感染 6h 后即可观测到核染色质的断裂, 病毒感染 12h 后染色质可见明显的凝集, 感染后 24h DNA 电泳出现明显的 DNA“阶梯”(DNA ladder)。电镜观察更清楚地显示了凋亡小体形成的某些细节: 在染色质凝集处核外膜突起, 最后与细胞核分离形成凋亡小体。在此基础上将一段病毒非结构蛋白 nsP2 基因克隆到真核表达载体 pMAMneo 中, 并得到瞬间表达, 在其中一些细胞中出现 DNA 断裂这一细胞凋亡的基本特征, 通过对 nsP2 氨基酸序列的分析, 结合以前的实验结果推测 nsP2 可能与诱导细胞凋亡直接相关。

关键词 细胞凋亡, Sindbis 病毒, 非结构蛋白 nsP2

携带有少量遗传信息的病毒如何抑制宿主细胞代谢合成, 病毒究竟通过什么途径最终引起细胞死亡, 这是人们多年来一直关注的问题^[1,2]。1993 年, Levine 等人证明 Sindbis 病毒(以下简称 SbV), 是通过诱导细胞凋亡致细胞病变死亡^[3]。近几年来, 人们又陆续发现一些病毒如人免疫缺陷病毒^[4], 腺病毒^[5], 脊髓灰质炎病毒^[6], 杆状病毒^[7]等也可诱导细胞凋亡, 并发现一些与细胞凋亡有关的基因^[5,7]。然而, SbV 诱导细胞凋亡的细节, 特别是与 SbV 哪一基因有关, 目前尚知甚少。SbV 属披膜病毒科甲病毒属, 它是研究病毒与细胞关系特别是与细胞凋亡关系的较为理想的实验材料。我们曾对其基因结构及在细胞中繁殖的规律做了较为系统的研究^[1,2,8,9], 在此基础上本文进一步探讨 SbV 感染的 BHK-21 细胞中与细胞凋亡的过程和可能的机制。

1 材料和方法

1.1 细胞和病毒的培养

本实验所用 SbV 及兔抗 SbV 非结构蛋白 2 (nsP2) 抗体由美国华盛顿大学医学院 Schlesinger 教授惠赠。培养病毒所用细胞为 BHK-21 传代细胞系。

将病毒接种于长成良好单层的 BHK-21 细胞上, 37℃ 作用 1h 后加入维持液, 血清量为 2%, 其余与培养液相同, pH 调至 7.6。

* 本项研究获国家自然科学基金资助。

本文于 1996 年 5 月 27 日收到。

1.2 细胞凋亡的检测

1.2.1 H33258 荧光染色检测: 病毒感染后 6, 12, 18, 24h 的细胞经 Carnoy 固定液固定 15min, PBS (pH7.4) 清洗后, 用 0.01% H33258 染色 15min, 再经 PBS 清洗后封片, 于 Opton 18 型荧光显微镜下观察(激发波长 395nm)。

1.2.2 细胞 DNA 的提取与电泳分析: 参照 Tolskaya E 等人的方法^[6]。

1.2.3 DNA 断裂的原位检测: 应用 ApopTag™ S7110-KIT 试剂盒 (Oncor 公司生产) 进行 DNA 断裂原位检测。

具体操作如下: 病毒感染后 6, 12, 18, 24h 的细胞经 1% 多聚甲醛于冰浴固定 15min, PBS(pH7.4) 清洗后, 用 0.1% Triton X100-PBS 室温下处理 15min, PBS 清洗后, 加入平衡缓冲液 (Equilibrium buffer) 10min, 然后加入 TDT 酶 (TDT enzyme: Reaction buffer =

1: 2.4) 37 °C 培养 1h, 再用预热的停止 / 洗涤缓冲液 (Stop / Wash buffer: Distilled water = 1:34) 及 PBS 清洗后, 加入荧光素偶联抗 Digoxigenin 抗体 (anti-Digoxigenin Fluorescin: Blocking solution = 1: 1.14), 室温下作用 30min, 经 PBS 清洗后封片, 于 Opton 18 型荧光显微镜下观察(激发波长 510 ~ 550nm)。

1.3 常规超薄切片技术

BHK-21 细胞经 SbV 感染后 6, 12, 18, 24h 后, 用 2.5% 戊二醛与 1% OsO₄ 双固定后, 经梯度丙酮脱水, Epon 812 包埋, 醋酸双氧铀与柠檬酸铅双染色后, 于 JEM-100CX 电镜下观察。

1.4 免疫荧光技术

接种于盖玻片上的细胞, 在病毒感染后用 3% 多聚甲醛于室温下固定 30min, PBS 清洗后用 0.5% Triton X-100 (pH7.4) 处理细胞 5min, 再用兔抗 SbV 非结构蛋白 nsP2 抗体室温下作用 1h, PBS 洗涤后加入 FITC 偶联的羊抗兔

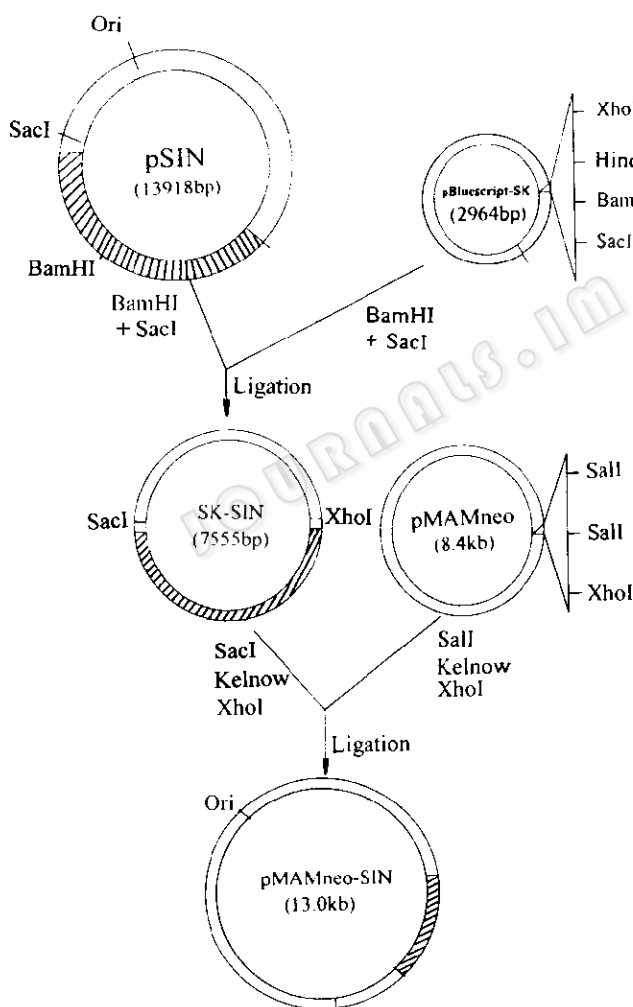


图 1 pMAMneo-nsP2 表达载体的构建

Fig. 1 The construction of expression vector of pMAMneo-nsP2

IgG(军事医学科学院生产)室温下用 30min, PBS 清洗后封片剂封片, 于 Opton 18 型荧光显微镜下观察。

1.5 nsP2 基因的克隆与表达

克隆有 SbV 基因组的质粒 pToto 1000 由 Rice C. M. 博士惠赠。表达载体选用 pMAM-neo。pToto 1000 经 Sac I 和 BamH I 双酶切后回收含 nsP2 基因的 4613bp 片段, 与同样经双酶切的克隆载体 pBluescript-SK 连接, 得中间载体。中间载体经 Sac I 酶切后, Klonow 补齐粘性末端, 再经 Xho I 酶切后电泳回收含 nsP2 基因的 4682bp 片段; 表达载体经 Sal I 酶切后, Klonow 补齐粘性末端, 再以酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀后再经 Xho I 酶切, 碱性磷酸酶处理后与 nsP2 基因的片段连接, 得其表达载体 pMAM-neo-nsP2(图 1)。此表达载体转染细胞后可用甾类激素地塞米松诱导 nsP2 基因的表达。

质粒的转染用脂质体 lipofectin (Gibco 公司生产) 介导。转染诱导 48h 后用 nsP2 抗体结合 FITC 免疫荧光染色检测其表达情况。

2 结果

2.1 SbV 诱导 BHK-21 细胞的凋亡

形态学观察显示病毒感染 6h 后细胞开始出现病变(CPE), 10h 后细胞几乎全部病变, 但至感染 24h 仍有部分病变细胞贴壁。

荧光染料 H33258 对核内 DNA 染色结果显示正常细胞核呈椭圆形染色较均一(图版 I-1), SbV 感染 12h 后在 BHK-21 细胞核周出现明显的染色质凝聚现象(图版 I-2)核开始固缩; 18h 后进一步凝聚成几块染色质块(图版 I-3), 感染 24h 凝聚的染色质形成多个球状小块(图版 I-4)。电镜观察不仅印证荧光染色的结果, 而且进一步显示染色质凝聚及凋亡小体形成过程的某些细节。首先是染色质在核周凝聚, 相邻的核外膜往往向外突出, 核膜间隙增大(图版 II-9 箭头), 随后凝聚的染色质连同核内膜以出芽的方式向外伸展(图 II-10 箭头)最后脱离细胞核(图版 II-11 箭头)形成凋亡小体(图版 II-12 箭头)。在这个过程中核膜与质膜仍保持完整, 凋亡小体外也可见有膜包裹。

DNA“阶梯”的出现是细胞凋亡的一

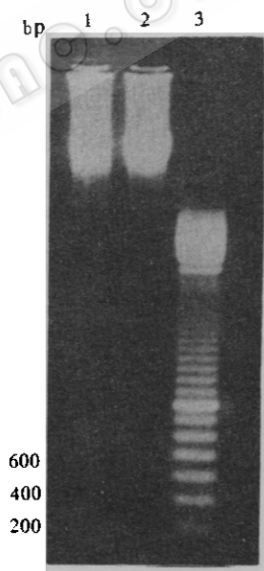


图 2 Sindbis 病毒感染后 BHK-21 细胞总 DNA 在 2% 琼脂糖凝胶电泳中呈现 DNA 阶梯

条带 1 为病毒感染后 24h 的 BHK-21 细胞总 DNA, 出现 DNA 阶梯, 最小 DNA 片段约 200bp; 条带 2 为正常细胞总 DNA; 条带 3 为分子量标记。

Fig. 2 The total DNA of BHK-21 cell infected with Sindbis virus (lane 1) or uninfected (lane 2) were electrophoresed through 2% agarose gels. lane 3 is the DNA marker (The DNA ladder could be seen in lane 1)

个主要的生化指标, 在 SbV 感染后 24h 提取细胞总 DNA。电泳结果显示, 在 SbV 感染的细胞中部分 DNA 断裂成寡核小体长度的 DNA 片段, 出现典型的 DNA“阶梯”(图 2)。

2.2 凋亡细胞的 DNA 断裂的动态检测

DNA 断裂是细胞凋亡的普遍规律。为了研究 SbV 感染过程中宿主细胞 DNA 断裂的动态及其与染色质凝聚的关系, 我们应用 DNA 断裂原位检测技术检测了 SbV 感染不同时间后细胞核内 DNA 断裂情况, 在 SbV 感染 6h 后, 即可在少数细胞中检测到核内 DNA 断裂, 断裂的 DNA 多集中在核周的某些区域内(图版 I-5 右上)。感染 12h 后, 核内出现荧光斑的细胞增多, 断裂 DNA 仍趋于核周边(图版 I-5); 当 SbV 感染到 18h 或 24h 核内的荧光斑的数量与强度明显增加(图版 I-6), 有些细胞整个细胞核被很强的荧光所标记, 同时在外核也能观察到一些球形的荧光斑点(图版 I-6)。虽然病毒感染是同步的, 但细胞染色质 DNA 的断裂却不是同步发生的, 有些细胞 DNA 断裂发生较早, 但有些细胞似乎具有某种“耐受性”, 即使在病毒感染 24h 后仍有约 20%~30% 的细胞检测不到明显的荧光斑; 同一个细胞中断裂的 DNA 在核内分布也并不均匀, 虽多靠近核膜但其荧光强度表现出很大的差异; 而正常细胞中检测不到 DNA 的断裂。

2.3 nsP2 在细胞凋亡中可能的作用

将一段含 nsP2 基因的病毒 cDNA 克隆到真核表达载体 pMAMneo 中得到重组载体 pMAMneo-nsP2。将重组载体 pMAMneo-nsP2 用脂质体转染的方法转染 CHO 细胞, 得到 nsP2 蛋白在细胞中的瞬间表达, 免疫荧光结果表明与 SbV 感染的细胞一样 nsP2 仍能进入细胞核中, 但其 nsP2 蛋白进入核内比例明显增加(图版 I-7)。

应用 DNA 断裂原位检测技术检测 pMAMneo-nsP2 转染的细胞中发现一些细胞呈阳性反应, 其数量与上述 nsP2 蛋白阳性细胞相当, 细胞核内出现较强的荧光斑点, 并且密集排布在核周; 在未转染 nsP2 的对照细胞中呈阴性反应。结果提示 nsP2 可能与细胞凋亡直接相关(图版 I-8)。

3 讨论

越来越多的证据表明, 细胞凋亡与细胞繁殖一样是细胞的一种基本的生命现象, 因此成为当前细胞生物学的研究热点之一^[10]。1993 年, Levine 等人首次证明 SbV 可诱导宿主细胞的凋亡, 但作者对细胞凋亡过程特别是 DNA 断裂动态及凋亡小体形成过程未作报道, 也未曾指出病毒的哪一个基因产物可能与之有关。本文研究结果显示: 细胞核染色质凝聚和 DNA 断裂均从核周开始, 在细胞刚刚出现病变时, 就已发生 DNA 的断裂且 DNA 断裂稍早于染色质凝聚, 可能染色质断裂诱发了染色质凝聚。同时, 我们注意到不同细胞 DNA 断裂的时间与程度并不相同, 在同一细胞中 DNA 断裂也不是均匀分布的, 断裂多在核周的某些区域发生。这可能由于病毒感染后细胞核骨架成分的改变有关, 尤其我们发现其 Lamin 的合成也被大大抑制, Oberhammer 等人发现在神经生长因子缺乏引起的细胞凋亡早期有 DNA 断裂成 50—300kb 大片断的过程并伴随有 Lamin 的降解^[10]。

我们的实验结果显示, nsP2 蛋白可能与细胞凋亡直接相关。首先宿主细胞细胞代谢合成被抑制是细胞凋亡的早期征兆, 我们曾证明 SbV 在感染早期即可迅速抑制细胞 mRNA 和蛋白质的合成, 病毒感染 5h 其 mRNA 合成下降 90%, 以肌动蛋白合成为指

标, 感染 1h 后即下降了 90%, 甚至核基质成分如 lamin 的合成也非常迅速地被抑制^[2]。我们的实验结果还表明, SbV 编码的四种非结构蛋白中只有 nsP2 在病毒感染早期进入细胞核中, 并且它进核的时相与 SbV 对细胞 mRNA 及蛋白质的合成抑制上有明显相关性。我们曾证明 nsP2 具有蛋白酶活性^[9], 这与 *C. elegans* 中的 CED3 及真核细胞中的 ICE 很相似, CED-3 所具有的蛋白酶活性被认为在细胞凋亡中起重要的作用。发现的可诱导细胞凋亡的病毒蛋白腺病毒的 E1A 蛋白与原癌基因产物 c-Myc 是核基质结合蛋白, 我们发现 nsP2 蛋白也是一种核基质结合蛋白^[8], 对 nsP2 的氨基酸序列比较结果表明, nsP2 与可诱导细胞凋亡的 CED3, CED4 的氨基酸序列相似性分别为 44.76% 和 44.3%。而且本实验在导入 nsP2 基因的细胞中出现细胞凋亡的明显特征即染色质的断裂现象, 这为 nsP2 可能诱导细胞凋亡提供进一步的证据。

参 考 文 献

- [1] 梁凤霞, 谢建新, 张 琼, 等. 微生物学报, 1993, 33(3): 161 ~ 165.
- [2] 王小忠, 谢建新, 许晓洁, 等. 微生物学报, 1994, 34(5): 345 ~ 354.
- [3] Levine B, Huang Q, Isaacs J *et al.* *Nature*, 1993, 361: 739 ~ 742.
- [4] Meyaard L, Otto S, Jonker R *et al.* *Science*, 1992, 257: 217 ~ 219.
- [5] Rao L, Debbas P, Sabbatini D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 7742 ~ 7746.
- [6] Toldkaya Y, Romanova L *et al.* *J Virol* 1995, 69: 1181 ~ 1189.
- [7] Clem R, Fechheimer M, Miller L. *Science*, 1991, 254: 1388 ~ 1390.
- [8] Wang X, Ding M. *Cell Res*, 1993, 3: 27 ~ 37.
- [9] Ding M, Schlesiger M. *Virology*, 1989, 171: 280 ~ 284.
- [10] Oberhammer F. *J Cell Biol*, 1994, 126: 827 ~ 837.
- [11] Schwartz L, Osborne B. *Bioessays*, 1994, 16: 387 ~ 389.

THE MUTIPLICATION OF SINDBIS VIRUS AND HOST BHK-21 CELL APOPTOSIS

Zhang Xiaoqing Qu Ji Ding Mingxiao

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

Ren Xianhui Qiu Yingqing

(Department of Anatomy, the Chinese University of Hong Kong, Hong Kong)

Abstract The process of apoptosis of BHK-21 cells induced by Sindbis virus (SbV) infection is reported here in details. The nuclear DNA cleavage can be first detected at 6h after SbV infection, followed by the chromatin margination and condensation at 12h and the DNA ladder can be detected at 24h after infection. The details of apoptosis body's formation can be revealed by electron microscopy: First, the outer nuclear membrane protrudes where the condensed chromatin accumulates, then the chromatin get into the budding area

with the inner nuclear membrane and separate from the nuclear. Progressively, we cloned the gene of SbV nonstructure protein 2 (nsP2) into the eukaryotic expression vector pMAMneo, and it can be expressed transiently. The DNA cleavages, the basic characteristics of apoptosis also can be detected in some cells. Together with the sequence analysis of nsP2 and the other former results, we conclude that the nsP2 may have direct relation with the SbV-induced apoptosis.

Key words Apoptosis, Sindbis virus, nsP2

图版说明

Explanation of plates

图版 I

图 1~4. H33258 染色的正常(1)和 SbV 感染 12h(2), 18h(3) 和 24h(4) 的 BHK-21 细胞中, 细胞染色质凝聚状况的比较, 标尺长 $5\mu\text{m}$; 5~6. 用 DNA 断裂原位检测技术显示 SbV 感染 6h(5a), 12h(5), 18h(6) 后 BHK-21 细胞核内 DNA 断裂的情况标尺长 $5\mu\text{m}$; 7. 免疫荧光显示 pMAMneo-nsP2 转染细胞后, 得到 nsP2 蛋白在细胞中的瞬间表达, nsP2 不仅进入细胞核中并且 nsP2 蛋白进入核内比例明显增加, 标尺长 $20\mu\text{m}$; 8. 用 DNA 断裂原位检测技术显示 pMAMneo-nsP2 转染细胞后, 检测到一些细胞细胞核 DNA 发生断裂, 标尺长 $15\mu\text{m}$.

图版 II

9~12. 电镜观察显示感染 SbV 后, BHK-21 细胞核内染色质高度凝聚, 并趋向于核周(9), 通过核膜出芽(10)脱离细胞核(11)最后形成凋亡小体(12)的过程。标尺长 $1\mu\text{m}$

Plate I

1~4. H33258 stained chromatin of the normal BHK-21 cells(1), comparing with those of SbV-infected cells, 12h(2), 18h(3) and 24h(4) after infection, bar= $5\mu\text{m}$; 5~6. The cleavage of chromosomal DNA could be detected at different time after SbV infection by in situ apoptosis detection technique. 6h(5 inset), 12h(5), 18h(6) after infection, bar= $5\mu\text{m}$; 7~8. Immunofluorescence assay of nsP2 protein expressed in pMAMneo-nsP2 plasmid transfected cells(7), a large amount of nsP2 protein enters the nuclei, bar= $20\mu\text{m}$; Furthermore, the chromosomal DNA cleavage can be detected in some cells by in situ apoptosis detection technique(8).

Plate II

9~12. Electron micrograph shows the process of apoptosis of BHK-21 cells induced by SbV: highly condensed nuclear chromatin accumulates in the region of protruded nuclear membrane(9), then get into the ledge(10, 11) and be separated from the nuclei with the membrane(12), bar= $1\mu\text{m}$.