

甲型与乙型流感病毒诱导肿瘤细胞凋亡的比较

桂 芳¹, 张卓然², 段于峰¹, 周志航², 滕兰菊¹, 李争鸣¹

Difference of Apoptosis in Tumor Cells Induced by Influenza A and B Viruses

GUI Fang¹, ZHANG Zhuo-ran², DUAN Yu-feng¹, ZHOU Zhi-hang², TENG Lan-ju¹, LI Zheng-ming¹

1. Huaihua Medical College, Huaihua 418000, China; 2. Department of Microbiology of Dalian Medical University

Abstract Objective To observe and compare the difference of apoptosis in tumor cells induced by different influenza viruses. Methods The shapes of HeLa cells in different time were observed in the electron microscope after they were infected by influenza virus type A1, B and ultraviolet exposure virus respectively. We used Annexin V-FITC staining flow cytometry (FCM) to observe the percentage of apoptosis. Results Typical apoptosis in HeLa cells were observed in microscope after infected by influenza viruses type A1 and B 24 hours. The percentage of apoptosis increased along with time expanded and culminated from 12 to 24 hours. The maxima of the percentage of apoptosis induced by influenza virus type B, A1, ultraviolet exposure influenza B virus (UV-B) and ultraviolet exposure influenza A1 virus (UV-A1) come to 38.65%, 23.94%, 18.20% and 10.05% respectively. There have significant difference between influenza A1 and B virus ($P < 0.01$). Conclusion Influenza B virus is more strong than influenza A virus in the ability of inducing apoptosis. More over, the ultraviolet exposure influenza virus perhaps still has the certain ability of inducing apoptosis in HeLa cells. Compared with the influenza A virus, influenza B virus have greater research and application value in the treatment of cancer.

Key words : Influenza virus; Tumor cell; Apoptosis

摘要 目的 观察并比较不同流感病毒诱导肿瘤细胞凋亡能力的差异。方法 A1、B 型流感病毒及经紫外线照射后的病毒分别感染 HeLa 细胞,于不同时间取 HeLa 细胞分别在电镜下观察细胞的形态, Annexin V-FITC 染色流式细胞仪检测凋亡百分率。结果 A1 亚型及 B 型流感病毒作用于 HeLa 细胞后 24 h,电镜下可见细胞凋亡的特征性改变,且凋亡百分率随时间延长而增高,于 12~24 h 达高峰,其中 B 型流感病毒的凋亡诱导率最高达 38.65%,A1 亚型最高为 23.94%。紫外线照射后的 B 型流感病毒 (UV-B) 最高达到 18.20%,UV-A1 最高达到 10.05%,A1 亚型与 B 型相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 B 型流感病毒诱导肿瘤细胞凋亡的能力比 A 型流感病毒强,而且经紫外线照射后的流感病毒可能仍然具有一定的诱导细胞凋亡能力;在肿瘤治疗方面,B 型流感病毒比 A 型流感病毒具有更大的研究和应用价值。

关键词 : 流感病毒; 肿瘤细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R73-3 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)09-0675-03

0 引言

细胞凋亡是细胞在生理或病理信号刺激下,启动自身凋亡相关基因而发生的主动“自杀”过程。近年来的许多研究表明,流感病毒可诱导多种细胞发生细胞凋亡,包括其容纳细胞和非容纳细胞,特别是 A 型流感病毒研究较多。由于流感病毒可诱导多种肿瘤细胞发生细胞凋亡,因此为肿瘤治疗提供了一

个新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒与细胞

流感病毒(A1/京防 86-1、B/沪防 93-1)均购自武汉大学中国典型培养物保藏中心; HeLa 细胞为大连医科大学微生物教研室保存的传代细胞。

1.1.2 主要试剂与仪器

Annexin V-FITC apoptosis detection kit 试剂盒购自 BD 公司。透射电子显微镜 (JEM-2000 EX), 流式细胞仪 (FACSVantage TMSE), 酶标仪 (model 3550, biorad 公司)。

收稿日期: 2006-07-24; 修回日期: 2006-10-12

基金项目: 湖南省教育厅青年基金资助项目(04B049)

作者单位: 1. 418000 湖南怀化医学高等专科学校; 2. 大连医科大学微生物教研室

作者简介: 桂芳(1971-), 女, 硕士, 副教授, 主要从事基础微生物学的研究

1.2 方法

1.2.1 病毒培养

将流感病毒 A1 亚型和 B 型分别接种于 9~11 日龄鸡胚尿囊腔,35 孵育 48~72 h, 收获尿囊液经 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液检测血凝效价, 取血凝效价 >1 640 的尿囊液低温保存备用。

紫外线照射的流感病毒对照制备方法: 分别将流感病毒液 2 ml 置于无菌小试管内, 置于紫外灯下 40 cm 处照射 30 min。

1.2.2 HeLa 细胞凋亡的形态学检测

HeLa 细胞用 RPMI-1640 生长液传代培养, 待长至 80% 单层时, 将 A1 亚型及 B 型流感病毒用维持液稀释至 1/64, 各取 0.5 ml 分别感染细胞, 37°C 吸附 1 h, 换维持液, 于感染后 24 h 观察细胞病变, 并收集细胞, 立即加入 2.5% 戊二醛固定, 经脱水、包埋、切片、枸橼酸铅和醋酸铀双染色后在透射电镜下观察细胞的超微结构改变。同时设不加病毒的阴性对照。

1.2.3 Annexin V-FITC/ PI 染色检测细胞凋亡

分别取效价为 1/64 的 A1 亚型及 B 型流感病毒 0.5 ml 接种至长成 80% 单层的 HeLa 细胞, 37°C 吸附 1 h, 弃去病毒液, 加入维持液 1 ml。于接种后 4、8、12、24、48 h 收集细胞, 用冷 PBS 洗涤 2 次, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml, 取 100 μ l 进行染色, 流式细胞仪检测细胞凋亡。同时设不加病毒的阴性对照及经紫外线照射的流感病毒 (A1 及 B) 对照。

1.3 统计学分析

采用 SPSS12.0 统计软件, 凋亡百分率的比较用 *t* 检验法。

2 结果

2.1 流感病毒诱导 HeLa 细胞凋亡的形态学观察

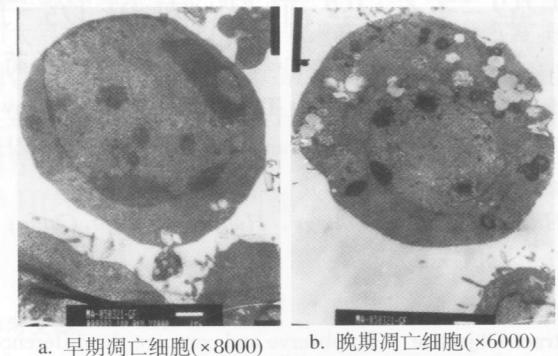
2.1.1 A1 亚型流感病毒作用于 HeLa 细胞后的形态学观察

A1 亚型流感病毒作用于 HeLa 细胞后 24 h, 透射电镜下显示早期凋亡细胞, 细胞表面微绒毛消失, 体积缩小, 染色质浓集并靠近核膜, 形成新月状体, 见图 1a, 另有部分晚期凋亡细胞, 表现为核体积进一步缩小, 染色质聚集, 胞浆内出现空泡, 见图 1b。

2.1.2 B 型流感病毒作用于 HeLa 细胞后的形态学观察

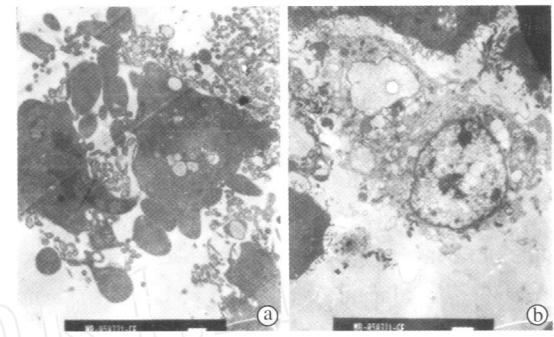
B 型流感病毒作用于 HeLa 细胞后 24 h, 倒置显微镜下可见明显的细胞病变效应, 透射电镜下显示大部分细胞均已进入凋亡晚期, 表现为细胞微绒毛消失, 胞核浓缩、碎裂, 形成多个凋亡小体, 见图 2a, 有部分细胞出现了继发性坏死、细胞肿胀、空泡

化, 见图 2b。



a. 早期凋亡细胞($\times 8000$) b. 晚期凋亡细胞($\times 6000$)

图 1 A1 亚型流感病毒作用于 HeLa 细胞后 24 h 的超微结构变化



a. 晚期凋亡细胞($\times 5000$) b. 继发性坏死细胞($\times 6000$)

图 2 B 型流感病毒作用于 HeLa 细胞后 24 h 的超微结构变化

2.2 Annexin V-FITC/ PI 染色流式细胞仪检测结果

A1 亚型、B 型及经 UV 照射后的流感病毒 (UV-A1、UV-B) 分别作用于 HeLa 细胞后, 于 4、8、12、24、48 h 分别检测细胞凋亡, 按下式计算凋亡百分率。

凋亡百分率 = 凋亡百分率检测值 - 阴性对照凋亡百分率

检测结果发现病毒感染后 4 h 开始出现细胞凋亡, 且凋亡百分率随时间延长而增高, 于 12~24 h 达高峰, 之后凋亡百分率下降, 而坏死细胞百分率逐渐增加。其中 A1 亚型流感病毒诱导细胞凋亡在 24 h 达高峰, 凋亡百分率为 $(23.94 \pm 3.01)\%$, B 型流感病毒在 12 h 达高峰, 凋亡百分率为 $(38.65 \pm 3.44)\%$, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。经紫外线照射后的两种流感病毒也具有一定的诱导细胞凋亡的能力, 在 12 h 时凋亡百分率最高, UV-A1 为 $(10.05 \pm 1.79)\%$, UV-B 为 $(18.20 \pm 2.26)\%$, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (见图 3)。

3 讨论

细胞凋亡是机体生长发育、细胞分化和病理状

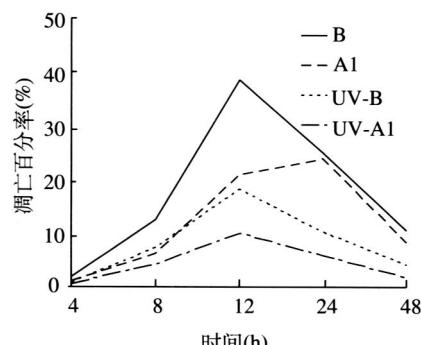


图 3 流感病毒诱导肿瘤细胞凋亡百分率曲线

态下细胞自主性死亡的过程,它参与机体内的许多生理或病理过程。研究表明,细胞凋亡的抑制与肿瘤的发生、发展及其对治疗的耐受都有着密切的关系。因此,探索各种诱导肿瘤细胞凋亡的途径成为人们研究肿瘤治疗的一个新方向。

流感病毒可以诱导多种细胞发生细胞凋亡,包括其容纳细胞(MDCK)和非容纳细胞,如 HeLa 细胞、Raji 细胞、支气管上皮细胞、淋巴细胞等,其中研究得较多的是 A 型流感病毒^[1-4]。本研究发现,A1 亚型及 B 型流感病毒均可诱导 HeLa 细胞凋亡,而且 B 型流感病毒诱导细胞凋亡的能力比 A1 亚型更强,两者有极显著性差异。当 A1 亚型流感病毒作用于 HeLa 细胞后 24 h,透射电镜下显示部分为早期凋亡细胞,其细胞表面微绒毛消失,细胞体积缩小,染色质浓集并靠近核膜,形成新月状体;而 B 型流感病毒作用于 HeLa 细胞后 24 h 即可见明显的细胞病变效应,此时大部分细胞均已进入凋亡晚期,甚至有部分细胞出现了继发性坏死,细胞肿胀、空泡化等。从诱导时间来看,流感病毒作用后 4 h 开始出现细胞凋亡,12~24 h 时的细胞凋亡百分率达到高峰,之后随着坏死细胞增多,凋亡百分率开始下降。与此同时,经紫外线照射的 A1 亚型与 B 型流感病毒作用于 HeLa 细胞后,流式细胞仪也同样检

测到了一定的凋亡率,其中,UV-B 最高达到 18.2%,UV-A1 最高达到 10.05%。提示经紫外线作用后的流感病毒可能仍具有一定的诱导细胞凋亡的能力。但其他报道认为紫外线灭活后的流感病毒不能诱导细胞凋亡^[5],是否因照射方法或各毒株对紫外线的敏感性不同而产生这种差异,对此尚需进一步研究。流感病毒诱导细胞凋亡一方面是其致病的一个重要机制^[6,7],另一方面也提示在肿瘤的治疗方面可能具有一定的应用价值。

综上所述,B 型流感病毒诱导肿瘤细胞凋亡的能力比 A1 亚型流感病毒强,而且经紫外线照射后的流感病毒仍然具有一定的诱导 HeLa 细胞凋亡的能力。在肿瘤治疗方面,B 型流感病毒比 A 型流感病毒可能具有更大的研究和应用价值,对此尚需作进一步实验加以证实。

参考文献:

- [1] Takizawa T. Influenza virus infection and apoptosis[J]. Nippon Rinsho, 2003, 61(11): 2001-2005.
- [2] 李虹,李华林,李婉宜,等.流感病毒诱导肿瘤细胞凋亡及其机制的研究[J].四川大学学报(医学版),2003,34(3):409-412.
- [3] Mori I, Komatsu T, Takeuchi K, et al. In vivo induction of apoptosis by influenza virus[J]. J Gen Virol, 1995, 76(11): 2869-2873.
- [4] 王欢,吴中明.甲型流感病毒 H3N2 诱导狗肾传代细胞凋亡的研究[J].遵义医学院学报,2005,28(2):109-111.
- [5] Price GE, Smith H, Sweet C. Differential induction of cytotoxicity and apoptosis by influenza virus strains of differing virulence[J]. J Gen Virol, 1997, 78(11): 2821-2829.
- [6] Hinshaw VS, Olsen CW, Dybdahl-Sissoko N, et al. Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses [J]. J Virol, 1994, 68(6): 3667-3673.
- [7] Ito T, Kobayashi Y, Morita T, et al. Virulent influenza A viruses induce apoptosis in chickens[J]. Virus Res, 2002, 84(1-2): 27-35.

[编辑:贺文;校对:杨卉]