

文章编号: 1000-5404(2007)03-0219-03

## 论著

# 甲型流感病毒 H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> 诱导人子宫内膜腺癌细胞凋亡的实验研究

王欢, 吴中明, 马锐, 王玉 (遵义医学院基础医学部微生物学教研室, 遵义 563003)

**摘要:** 目的 探讨甲型流感病毒 H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> 对人子宫内膜腺癌细胞系 (endometrial adenocarcinoma cell lines, JEC) 细胞的凋亡诱导作用及机制。方法 取不同血凝单位的 H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> 感染 JEC 细胞, 经 HE 染色、琼脂糖凝胶电泳以及流式细胞术等方法检测细胞凋亡情况, 并用免疫细胞化学法检测 H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> 对 JEC 细胞 Fas, FaL 及 TGF- 表达的影响。结果 感染后的 JEC 在形态上呈现凋亡变化; 电泳出现梯状条带; 流式细胞术显示细胞凋亡率随病毒感染时间的延长而降低, 且有随着病毒浓度增加而增高的趋势。免疫细胞化学法示: 病毒感染后 JEC 细胞的 Fas 染色增强, TGF- 染色减弱, 但 FaL 始终没有表达。结论 甲型流感病毒 H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> 能够诱导 JEC 细胞凋亡, 此作用与病毒浓度及感染时间有一定关系, 其机制可能与 Fas 和 TGF- 的表达有关。

**关键词:** 甲型流感病毒; 细胞凋亡; 人子宫内膜腺癌细胞系

**中图分类号:** R737.13; R73-362; R737-33

**文献标识码:** A

## Apoptosis of endometrial adenocarcinoma cell line JEC induced by influenza virus H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>

WANG Huan, WU Zhong-ming, MA Rui, WANG Yu (Department of Microbiology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

**Abstract:** Objective To study the apoptosis-inducing effects and mechanisms of influenza virus A H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> on a self-established endometrial adenocarcinoma cell line JEC. Methods JEC cells were infected with different concentrations of H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>, the apoptosis were detected using the HE staining, DNA agarose gel electrophoresis and flow cytometry. The expressions of Fas, FaL and TGF- were examined by immunocytochemical staining. Results After infection, the JEC cells showed the morphological apoptosis; DNA agarose electrophoresis demonstrated a ladder-like pattern of DNA fragments; FITC/PI stained FCM showed the apoptotic rate of JEC had been decreased along with the prolonging of infected time and elevated with the increase of the virus concentrations. Immunocytochemical staining showed that enhanced expression of Fas, attenuated expression of TGF-, and no expression of FaL after H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> infection. Conclusion Influenza virus A H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> can induce JEC cells to apoptosis in time- and concentration- dependent manners, which may be related with the expressions of Fas and TGF-.

**Key words:** influenza virus A; apoptosis; endometrial adenocarcinoma cells

流感病毒是急性呼吸道传染病流行性感冒 (简称流感) 的病原体, 研究表明, 用不同型或亚型的流感病毒感染不同的细胞可以出现凋亡现象, 并且还发现流感病毒在体内也能引起细胞发生凋亡<sup>[1-3]</sup>。目前, 关于流感病毒诱导细胞凋亡的机制有多种看法, 认为与 Fas, FaL, TGF-, PKR, NSI, NA, PB1-F2 等都有关系, 但其中 Fas, FaL 与 TGF- 这 2 条途径受到较多关注<sup>[4]</sup>。人子宫内膜腺癌细胞系 (endometrial adenocarcinoma

cell lines, JEC) 是本室建立的 1 株人子宫内膜腺癌细胞系<sup>[5]</sup>。本研究用甲型流感病毒 H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> 感染 JEC 细胞, 对细胞凋亡情况及机制进行研究, 除对流感病毒致病机制的研究具有一定意义之外, 也为肿瘤治疗提供新思路奠定了基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

JEC 细胞由本实验室建立保存; H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> 型流感病毒由本实验室保存; RPM 11640 为 Gibco 公司产品; 新生牛血清购于上海第二医科大学; Annexin-V FITC/PI 试剂盒购于晶美生物工程公司; 兔抗 Fas, FaL 及 TGF- 均为 Santa Cruz 公司产品。

#### 1.2 方法

1.2.1 病毒培养及效价测定 将流感病毒接种于 9~11 d 龄鸡胚 (受精卵购于遵义市养殖场, 于 38℃ 条件下进行孵育)

基金项目: 教育部重点基金 (03118); 贵州省科技厅基金 (02-3059)

Supported by the Foundation of State Education Ministry of China (03118) and the Research Project Foundation of Sci & Tech Department of Guizhou Province (02-3059)

作者简介: 王欢 (1977-), 女, 湖北省黄冈市人, 硕士研究生, 讲师, 主要从事肿瘤免疫方面的研究。电话: (0852) 8609545, E-mail: huanwang2002@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-02-27; 修回日期: 2006-04-12

尿囊腔,35 孵育 48~72 h,然后将鸡胚置 4 冰箱中过夜,次日以无菌操作收获尿囊液,用 3 000 r/min 离心 15 min 以除去沉淀。取少量上清进行血凝试验,确定其血凝效价大于 1 640 后,将余下上清分装,置 -80 储存。

1.2.2 病毒感染细胞 取对数生长期的细胞,经 0.25% 胰蛋白酶消化后,用血细胞计数板计数,按  $5.0 \times 10^5$  /孔细胞数接种于 6 孔培养板中。待大部分细胞贴壁后弃去原培养液,加入含有病毒的维持液于 37 °C CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 1 h 弃去孔中液体,用无 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 的 PBS 洗 1 次,每孔加入 2 ml 维持液继续于 CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。

### 1.2.3 细胞凋亡的检测

1.2.3.1 HE 染色 将细胞以  $3.0 \times 10^4$  /孔的浓度接种至预先放有无菌盖玻片的 6 孔板中制成细胞爬片,然后用浓度为 64 U/m 的病毒进行感染(感染方法同前),于病毒感染后 12 h 取出细胞爬片进行 HE 染色。

1.2.3.2 DNA 提取及琼脂糖凝胶电泳 按 DNA 提取试剂盒说明书提取经病毒感染的细胞 DNA,1.5% 琼脂糖凝胶电泳,条件为:60 V,5 h,然后用凝胶成像分析系统检测电泳结果并拍照。

1.2.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 于病毒感染一定时间后收集细胞,按 Annexin-V FITC/PI 试剂盒说明书进行操作,制备样品,然后上机检测细胞凋亡率。

1.2.4 免疫细胞化学法检测 JEC 细胞 Fas、FasL 以及 TGF- $\beta$  的表达变化 细胞爬片的制备及病毒感染方法同前,于病毒感染后 24 h 进行免疫细胞化学染色。

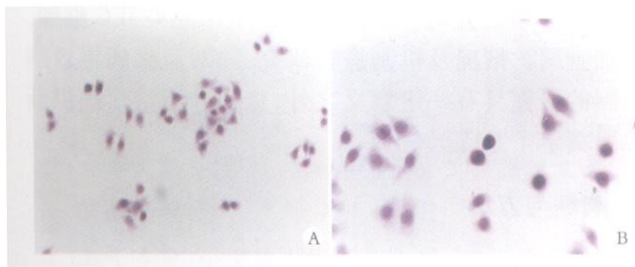
### 1.3 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 12.0 统计软件对计量资料进行方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 HE 染色结果

正常生长的细胞在光镜下观察呈不规则形,细胞质丰富,细胞核为圆形或卵圆形,内有多个核仁(图 1A);受病毒感染发生凋亡的细胞,出现体积缩小,细胞质减少、染色质浓缩深染等变化(图 1B)。

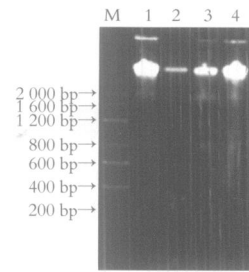


A: 正常细胞 (HE  $\times 400$ ); B: 凋亡细胞 (HE  $\times 1 000$ )

图 1 JEC 细胞光镜观察结果

### 2.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

在 64 U/ml 及 128 U/ml 组出现了凋亡特征性的 DNA “Ladder 带”,而对照组及 32 U/ml 组则无明显 DNA “Ladder 带”的出现(图 2)。



M: 标准; 1: 阴性对照组; 2~4: 32、64、128 U/ml 诱导 6 h

图 2 流感病毒感染的 JEC 细胞 DNA 电泳图

### 2.3 流式细胞术检测结果

病毒感染后各组的细胞凋亡率随着病毒浓度的增加而升高(表 1)。6 h 的各組与对照组相比均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),除 64 U/ml 组和 128 U/ml 组的组间无差异 ( $P > 0.05$ )外,其余各組间比较均有显著性差异 ( $P < 0.05$ );24 h 的各組中除 32 U/ml 组以外,其余各組与对照组相比均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),除 32 U/ml 组与 64 U/ml 组之间组间无差异 ( $P > 0.05$ )外,其余各組间比较均有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。在同一病毒浓度条件下,细胞凋亡率随着感染时间的延长而降低。除 256 U/ml 组外,其余各組比较均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

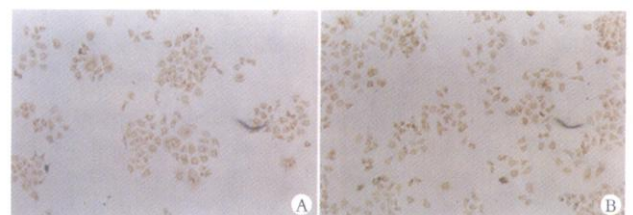
表 1 流感病毒感染 JEC 后的细胞凋亡率 [ $n=3$ , ( $\bar{x} \pm s$ ) %]

病毒浓度 (U/ml)	6 h	24 h
0	3.55 $\pm$ 0.52	2.48 $\pm$ 0.36 <sup>e</sup>
32	7.70 $\pm$ 0.85 <sup>a</sup>	2.98 $\pm$ 0.36 <sup>f</sup>
64	14.88 $\pm$ 1.68 <sup>bc</sup>	4.24 $\pm$ 0.24 <sup>af</sup>
128	17.10 $\pm$ 1.64 <sup>bc</sup>	11.19 $\pm$ 0.73 <sup>bcdf</sup>
256	21.15 $\pm$ 2.65 <sup>bcd</sup>	19.66 $\pm$ 0.92 <sup>bcd</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ ,与 0 U/ml 组比较; c:  $P < 0.05$ ,与 32 U/ml 组比较; d:  $P < 0.05$ ,与 64 U/ml 组比较; e:  $P < 0.05$ , f:  $P < 0.01$ ,与 6 h 比较

### 2.4 JEC 细胞 Fas、FasL 以及 TGF- $\beta$ 表达情况的检测

2.4.1 Fas 表达 镜下 Fas 阳性染色主要位于细胞质内,与阴性对照组相比,病毒组 Fas 阳性反应强度增加,染色变深(图 3A、B)。经图像分析系统软件分析平均光密度值,阴性对照组为 (0.147  $\pm$  0.022),病毒组为 (0.242  $\pm$  0.019)。结果显示:与阴性对照组相比,病毒组的平均光密度值升高,差异显著 ( $P < 0.01$ )。

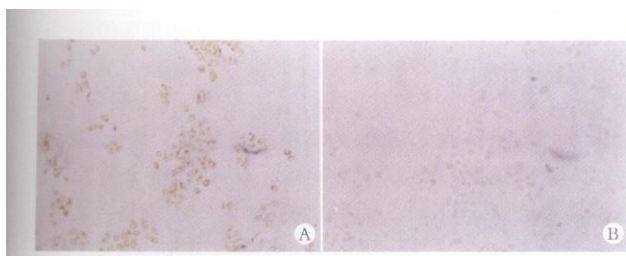


A: 阴性对照组; B: 病毒组

图 3 Fas 在 JEC 细胞中的表达情况 (S-P  $\times 200$ )

2.4.2 FasL表达 镜下观察 FasL在阴性对照组及病毒组中均无表达。

2.4.3 TGF- $\beta$ 表达 在阴性对照组中,镜下 TGF- $\beta$ 阳性染色主要位于细胞质内,而在病毒组中,表达明显降低,基本无表达(图4A、B)。经图像分析系统软件分析平均光密度值,阴性对照组为(0.156 $\pm$ 0.008),病毒组为(0.075 $\pm$ 0.002)。结果显示:与阴性对照组相比,病毒组的平均光密度值下降,差异显著( $P < 0.01$ )。



A: 阴性对照组; B: 病毒组

图4 TGF- $\beta$ 在JEC细胞中的表达情况(S-P $\times$ 200)

### 3 讨论

#### 3.1 甲型流感病毒H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>对JEC的凋亡诱导作用

病毒是一种严格的细胞内寄生性微生物,在体外实验中,选择1株对该病毒敏感的细胞对于研究工作的顺利实施非常重要。过去在研究甲型流感病毒时采用的细胞有:MDCK、猴肾细胞、人胚肾细胞以及原代人胎膜或羊膜细胞等<sup>[6,7]</sup>。JEC是1株人子宫内膜腺癌细胞<sup>[5]</sup>,我们研究发现受甲型流感病毒感染后JEC在形态及生化特征上都呈现出了凋亡特有的变化,流式细胞术定量检测也显示:在同一时间点上,凋亡率随着病毒浓度的增加而升高;而同一病毒浓度条件下,细胞凋亡率随着感染时间的延长而降低。说明JEC是1株对甲型流感病毒H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>敏感的人源性细胞,H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>能够诱导其发生凋亡,且具有浓度及时间的依赖性。提示JEC可以作为甲型流感病毒研究的1个重要工具。

#### 3.2 甲型流感病毒诱导JEC细胞凋亡机制的初步探讨

较多学者对流感病毒能够诱导细胞发生凋亡这一现象进行了大量研究,发现不同型或亚型的流感病毒能诱导不同类型的细胞在体内外发生凋亡<sup>[1-3]</sup>。但其机制多数学者认为与Fas、FasL、TGF- $\beta$ 、PKR、NS1、NA、PB1-F2等有关<sup>[4]</sup>,其中Fas、FasL与TGF- $\beta$ 这两条途径受到较多重视。Fas-FasL结合后通过裂解和活化caspase而引起细胞骨架降解和DNA片段化,凋亡发生。多种哺乳动物细胞可以表达Fas,而FasL仅表达于活化的T细胞。以往研究证实:用甲型流感病毒感染体外培养的人淋巴细胞,可发现细胞表面的Fas以及FasL数量增加。我们的结果表明:正常生长的JEC细胞就有Fas的表达,病毒感染后表达增强,提

示其凋亡机制可能与Fas有关。传统认为Fas是应该与其配体FasL相结合而发挥其凋亡诱导作用的,可在我们的研究中,FasL始终都没有表达,究其原因尚需进一步研究。流感病毒通过其表面的NA激活TGF- $\beta$ ,从而诱导感染细胞发生凋亡。实验证实:用流感病毒感染小鼠,1d后具有活性的TGF- $\beta$ 水平增高,进一步研究表明流感病毒的NA糖蛋白可以激活潜在的TGF- $\beta$ ,从而引起细胞凋亡。现已有较多关于TGF- $\beta$ 诱导细胞凋亡的报道<sup>[8-10]</sup>。

有研究显示,乳腺癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌、膀胱癌、子宫内膜癌及宫颈癌等均有TGF- $\beta$ 的高表达,许多肿瘤细胞系也可分泌具有生物活性的TGF- $\beta$ 。本实验结果显示:正常培养的JEC细胞也有TGF- $\beta$ 的表达,主要位于细胞质中,在受到病毒感染之后,其表达明显降低。这就说明了甲型流感病毒诱导JEC凋亡的机制可能与TGF- $\beta$ 的表达有关。但这种病毒感染细胞后TGF- $\beta$ 不增反降的现象是与文献报道有别的,其机制还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Stasakova J, Ferko B, Kittel C, et al. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18[J]. J Gen Virol, 2005, 86(Pt 1): 185 - 195.
- [2] Hayase Y, Tobita K. Characterization of HeLa cells persistently infected with influenza virus B/Lee/40 with respect to telomerase activity and apoptosis[J]. Intervirology, 2003, 46(5): 319 - 322.
- [3] Lowy R J. Influenza virus induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms[J]. Int Rev Immunol, 2003, 22(5-6): 425 - 449.
- [4] Takizawa T. Influenza virus infection and apoptosis[J]. Nippon Rinsho, 2003, 61(11): 2001 - 2005.
- [5] 吴中明,张逸群,刘祖林,等.子宫内膜腺癌细胞系的建立及其生物学特性[J].中国肿瘤临床,1999,26(10):779-781.
- [6] Mersich S E, Baumeister E G, Riva D, et al. Influenza circulating strains in Argentina exhibit differential induction of cytotoxicity and caspase-3 in vitro[J]. J Clin Virol, 2004, 31(2): 134 - 139.
- [7] Ohyama K, Nishina M, Yuan B, et al. Apoptosis induced by influenza virus-hemagglutinin stimulation may be related to fluctuation of cellular oxidative condition[J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26(2): 141 - 147.
- [8] Cao Y, Wei H, Pfaffl M, et al. Apoptosis of human trabecular meshwork cells induced by transforming growth factor-beta2 in vitro[J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2004, 24(1): 87 - 89, 94.
- [9] Yoo J, Ghiassi M, Jimanova L, et al. Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation[J]. J Biol Chem, 2003, 278(44): 43001 - 43007.
- [10] Jang C W, Chen C H, Chen C C, et al. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase[J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(1): 51 - 58.

(编辑 王小寒)