

流感病毒与细胞凋亡

张衡 综述;李康生 审校

(汕头大学医学院微生物学及免疫学教研室,汕头 515031)

摘要:流感病毒与细胞凋亡的相关研究近年来一直是流感研究的热点,流感病毒可使 MDCK细胞,呼吸道细支气管细胞,淋巴细胞以及绒毛膜细胞和胎膜细胞发生凋亡,弄清楚流感病毒与细胞凋亡相互间的关系无疑对流感病毒的致病机制及抗感染免疫的研究有着积极的促进作用,本文仅对近几年来,流感病毒与 MDCK细胞以及其它相关细胞的凋亡情况或关系的研究作一综述。

关键词:流感病毒;凋亡;MDCK细胞

中图分类号: R373.1; Q26

文献标识码: A

文章编号: 1005-5673(2007)02-0076-03

1 介绍

流感病毒 (*Influenza virus*) 是有包膜的正粘病毒,具有多种形态,可以呈丝状或杆状,但一般为球形,病毒的直径为 80 ~ 120nm,内有一直径约为 70nm 的电子致密核心,为病毒的核衣壳^[1]。流感病毒的结构主要包括内部的核心(即核衣壳)和外部的包膜(即病毒囊膜)两部分。根据核蛋白抗原性的不同,可把感染人的流感病毒分为甲、乙、丙三型。

细胞凋亡的概念是 1972年由 Kerr等三位科学家首次提出的^[2]。细胞凋亡指的是细胞为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主有序的死亡。细胞凋亡与细胞坏死不同,细胞凋亡不是一个被动的过程,而是一个主动的过程,它涉及一系列基因的激活,表达及调控等作用;凋亡不是病理条件下自体损伤的一种现象,而是细胞为更好的适应生存环境而争取的一种主动死亡过程^[2]。同时,细胞凋亡在生物进化,内环境的稳定以及多个系统发育中起着重要的作用。

细胞凋亡的变化是多阶段的,非同步发生的。首先出现的是细胞体积变小,细胞连接消失,与周围细胞脱离,然后是细胞质密度增加,线粒体膜电位消失,通透性改变,释放细胞色素 C到胞浆,核质浓缩,核膜核仁破碎,DNA降解为约 180bp ~ 200bp的片段;胞膜有小泡状形成,膜内侧磷脂酰丝氨酸外翻到膜表面,膜结构依然完整,最后,凋亡细胞被分割包裹为几个凋亡小体,不引起周围的炎症反应^[2]。

收稿日期:2006-10-11;修回日期:2006-12-05

作者简介:张衡(1981-),男,硕士研究生,主要从事微生物学及免疫学相关工作。

凋亡小体能够迅速的被周围相邻的活性细胞或吞噬细胞吞噬和降解^[4]。

细胞凋亡的过程大致可分为以下几个阶段:接受凋亡信号 凋亡调控因子的相互作用 蛋白水解酶的活化 进入连续反应过程。目前比较清楚的通路主要有细胞凋亡的膜受体通路与细胞色素 C释放和 Caspases激活的生物化学途径两种。细胞凋亡过程受多基因严格控制,这些基因在种属之间非常保守。目前,发现的凋亡抑制分子主要包括抑癌基因 p53,癌基因 C-myc, APs, FLIPs以及 Bcl-2家族的凋亡抑制分子^[5,6]。在正常细胞中 Caspases处于非活化的酶原状态,凋亡程序一旦开始,Caspases被活化,随后发生凋亡蛋白酶的层叠级联反应,起始 Caspases发生二聚体化,而效应 Caspases则介导异四聚体化,进而诱导不可逆的凋亡^[2,3]。但是到目前为此凋亡过程的确切机制还不完全清楚,而凋亡过程的异常可能与许多疾病的发生有直接或间接的关系,如肿瘤,自身免疫性疾病等,能诱发细胞凋亡的因素也有很多,如射线,药物等。

2 流感病毒与 MDCK细胞的凋亡

MDCK(Madin-Darby canine kidney)细胞是目前实验室进行流感病毒分离最常用的传代细胞株,MDCK细胞对甲型流感病毒的各亚型以及乙型流感病毒均高度敏感。早在 1993年,美国威斯康辛州的 Hinshaw等就甲型流感病毒和乙型流感病毒对 MDCK细胞凋亡的影响和机制作了较深入的研究。他们所使用的病毒包括有 5种不同来源的 H1N1,2种不同来源的 H5N2,另外还包括 H7N3、H3N8、H5N3、H2N2、H3N2这 5种不同亚型的流感病毒^[7]。1997年,德国科学家 Hechtischer等就丙型流感病毒对

MDCK细胞凋亡的影响也做了相关的研究。他们所使用的流感病毒是丙型流感病毒的一种变异株 C/AA-cyt^[8]。另外,在 1997年,伯明翰大学的 Smith等人也就流感病毒对 MDCK细胞凋亡的影响作了进一步的研究^[9]。

他们的研究发现,无论是甲型流感病毒、乙型流感病毒,还是丙型流感病毒都能诱导 MDCK细胞的凋亡,但丙型流感病毒诱导细胞凋亡的过程较甲型和乙型流感病毒的诱导过程更为缓慢,而且过程也不尽相同^[8]。认为可能与病毒毒力的大小不同有关,有研究发现,对人毒力大小不同的两种流感病毒 C/bne7a和 A/Fiji感染 MDCK细胞和 U-937细胞后,对人致病性较强的 C/bne7a更能引起细胞的凋亡和细胞毒性的产生,虽然 C/bne7a产生的病毒颗粒较 A/Fiji少^[9]。另据捷克科学家 Homickova对 1994年到 1995年在捷克分离得到的一株甲型流感病毒(H3N2)和乙型流感病毒分别感染 MDCK细胞发现,乙型流感病毒较甲型流感病毒有着更强的细胞毒性效应^[10]。另外,其研究也发现,在缺乏血清培养的条件下,流感病毒诱导凋亡的过程将增强,提示血清的存在可能对流感病毒诱导的凋亡有一定的抑制作用^[10]。

就实验方法而言,多数科学家似乎都采用了相似的研究方法,如都采用 9~11日龄的鸡胚来接种病毒,2~3日后收尿囊液,然后再对 MDCK细胞进行感染。对凋亡细胞的观察也都是先用光学显微镜观察细胞形态,如变圆,皱缩等。用锥虫蓝染细胞膜,并在荧光显微镜下观察,以确定膜的完整性,并区别于坏死细胞。根据凋亡细胞 DNA断裂的规律性,即断裂成 180~200bp左右的片段,用琼脂糖凝胶电泳来最终确定凋亡。一些科学家也根据其实验的需要采用了流式细胞术或电泳技术来对凋亡细胞进行定量观察和检测。还有一些科学家采用了特定的转染和免疫印迹等方法。与上述不同的是,现在病毒接种采用的是 7~11日龄的鸡胚,7日龄的鸡胚用于接种丙型流感病毒,9~11日龄的鸡胚用于接种甲型和乙型流感病毒。另外,上述研究者在用流感病毒感染 MDCK细胞后,均以含 2%~5%的小牛血清的培养基培养,这与现在一般不加小牛血清进行培养而有所不同。

3 流感病毒与其它细胞相关的凋亡

近年来,研究者的目光主要集中在流感病毒对其他细胞的凋亡上,如细支气管上皮细胞、胎膜细胞、绒毛膜细胞、淋巴细胞等等。英国伯明翰大学的

Brydon在用甲型流感病毒感染细支气管上皮细胞时发现细胞中 L-1、L-6和 CXCL8都开始表达,同时 CCL2和 CCL5表达也上升,但表达的这些细胞因子中只有 L-6、CXCL8和 CCL5释放出细胞,而 L-1、CCL2却不释放出细支气管上皮细胞,这表明其细胞的凋亡能够抑制细支气管上皮细胞的炎症反应^[11]。在绒毛膜细胞和胎膜细胞的研究中,日本东京大学的 Uchida等发现流感病毒在体外感染绒毛膜细胞和胎膜细胞后,能诱导这些细胞发生凋亡,并能通过诱导产生一系列的细胞因子,如 L-1、L-6、IFN- α 、TNF、GM-CSF等等,研究还提示流感病毒的感染可能对怀孕期间胎儿的早产、流产、死胎有一定的影响^[12]。他们进一步研究还发现,流感病毒能诱导绒毛膜细胞和胎膜产生单核分化诱导因子(MDIFactors),这种因子能促进单核细胞向巨噬细胞分化,并产生相关的超氧负离子,并进一步诱导细胞凋亡,而 L-6对单核分化因子的这个功能似乎有一定的促进作用^[13]。美国德克萨斯州的 Nichols等用甲型流感病毒感染外周血单核白细胞,发现淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺和 CD19⁺细胞都会出现凋亡,只是在这些被甲型流感病毒感染的细胞中,并不是全部都发生了凋亡。研究者还发现,在淋巴细胞感染甲型流感病毒后,去除其中的单核巨噬细胞,能够减少淋巴细胞的凋亡,原因就在于单核巨噬细胞能通过调节细胞表面 FasL的表达和可溶性 FasL的释放来触发细胞凋亡^[14],并且实验的结果也显示细胞凋亡的机制可能和单核巨噬细胞与 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺淋巴细胞间的相互作用有关。在甲型流感病毒感染淋巴细胞的过程中,加入抗 FasL的抗体或 Caspase-3抑制剂也都能减少淋巴细胞的凋亡。研究还进一步表明,Fas-FasL信号在甲型流感病毒诱导淋巴细胞凋亡中起着主要的作用^[14]。

4 细胞凋亡的相关机制

以前的研究结果表明,细胞的凋亡能够抑制流感病毒的复制^[15]。被感染的细胞通过过度表达 Bcl-2来降低流感病毒的滴度^[16,17],同时 Bcl-2的过度表达可引起细胞核谷胱甘肽(GSH)的积聚,导致核内氧化还原平衡的改变,从而达到降低 Caspases活性的目的,并最后通过 Caspases的抑制作用来降低病毒的复制^[16,17]。众多的研究都表明,流感病毒诱导的细胞凋亡几乎都是最终通过 Caspases途径来介导的。在外周血的淋巴细胞中,诱导产生的 Fas-FasL三聚化并与 Fas相关的死亡结构域(FADD)结合,而后通过激活 Caspase-8而引起 Caspases的级联

反应,最终导致凋亡的发生,其中级联反应中的 Caspase-3能对 Fas介导凋亡的相关物质起调控作用^[14]。在流感病毒感染其它组织或细胞时,也是通过产生相关的细胞因子直接或间接的激活 Caspases而达到凋亡的目的。美国威斯康辛州大学的 Tupin等通过流感病毒感染人肺支气管上皮细胞、人肺腺癌细胞系、小鼠成纤维细胞、MDCK细胞、Vero细胞的研究,发现 p53是流感病毒诱导细胞凋亡的一个共同途径,在病毒感染细胞中,p53的活性和表达水平都升高^[18]。干扰素能增强 p53的转录表达^[19,20]。抑制 p53在细胞内的活性能提高病毒的复制,这可能与干扰素的降低有关,因为 p53与干扰素的表达相关,是干扰素激活反应元件活化所必须的。而此时低浓度的 Caspases对病毒蛋白的加工具有促进作用,高浓度的 Caspases才导致细胞的凋亡^[18]。这也是与以前的研究结果有所不同之处,需要我们的进一步研究探讨。

5 小结

通过从 20世纪 90年代到现在的研究,我们发现,流感病毒诱导的细胞凋亡是一个多因素的过程,即流感病毒通过诱导产生多种细胞因子来进一步诱导细胞的凋亡,而不是仅仅依靠病毒自身蛋白或单一的细胞因子。目前已经发现的细胞信号分子主要包括 Fas-FaL, TNF-, 双链 RNA 依赖的 PKR, TGF-, 以及促有丝分裂的蛋白激酶等。另外,流感病毒对 MDCK细胞的凋亡作用似乎比其它细胞如绒毛膜细胞或胎膜细胞更快,而对同种细胞而言,发生凋亡的快慢与病毒的毒性强弱有关,似乎还没有证据说明与病毒毒粒的多少有关。流感病毒感染的细胞最后都通过 Caspases途径走向凋亡,在不同浓度的 Caspases作用下,其对病毒的影响和与细胞凋亡的关系也是值得我们注意的问题。

参考文献:

- [1] Boumakina SV, Adolb GS. Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus [J]. J Gen Virol 2003, 84: 517-527.
- [2] Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells [J]. Infection and Immunity 2005, 73: 1907-1916.
- [3] Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation [J]. Curr Opin Cell Biol 2003, 15: 725-731.
- [4] Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, et al. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis [J]. Toxicol Pathol 1997, 25: 82-88.
- [5] Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms [J]. Hum Reprod Update 2005, 11: 162-178.
- [6] Zhimov OP, Konakova TE, Wolff T. NS1 Protein of Influenza A virus down-regulates apoptosis [J]. J Virol 2002, 76: 1617-1625.
- [7] Hinshaw VS, Olsen CW, Evans D, et al. Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses [J]. J Virol 1994, 68: 3667-3673.
- [8] Hechtfisher A, Marschall M, Heltel A, et al. A highly cytopathogenic influenza C virus variant induces apoptosis in cell culture [J]. J Gen Virol 1997, 78: 1327-1330.
- [9] Price GE, Smith H, Sweet C. Differential induction of cytotoxicity and apoptosis by influenza virus strains of differing virulence [J]. J General Virol 1997, 78: 2821-2829.
- [10] Homickova Z. Different progress of MDCK cell death after infection by two different influenza virus isolates [J]. Cell Biochem Funct 1997, 15: 87-93.
- [11] Brydon EWA, Smith H, Sweet C. Influenza A virus-induced apoptosis in bronchiolar epithelial (NCH292) cells limits pro-inflammatory cytokine release [J]. J Gen Virol 2003, 84: 2389-2400.
- [12] Uchide N, Ohyama K, Bessho T, et al. Induction of pro-inflammatory cytokine gene expression and apoptosis in human chorion cells of fetal membranes by influenza virus infection: possible implications for maintenance and interruption of pregnancy during infection [J]. Med Sci Monit 2005, 11: RA7-16.
- [13] Uchide N, Suzuki A, Ohyama K, et al. Secretion of bioactive interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha proteins from primary cultured human fetal membrane chorion cells infected with influenza virus [J]. Placenta 2006, 27: 678-690.
- [14] Nichols JE, Niles JA, Jr Roberts NJ. Human Lymphocyte Apoptosis after Exposure to Influenza A Virus [J]. J Virol 2001, 75: 5921-5929.
- [15] Kurokawa M, Koyama AH, Yasuoka S, et al. Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication [J]. Int J Mol Med 1999, 3: 527-530.
- [16] Lin C, Zimmer SG, Lu Z, et al. The involvement of a stress-activated pathway in equine influenza virus-mediated apoptosis [J]. Virology 2001, 287: 202-213.
- [17] Wurzer WJ, Planz O, Ehrhardt C, et al. Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation [J]. EMBO J 2003, 22: 2717-2728.
- [18] Tupin E, Luke K, Jones J, et al. Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 in cell death and viral replication [J]. J Virol 2005, 79: 8802-8811.
- [19] Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, et al. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence [J]. Nature 2003, 424: 516-523.
- [20] Vilcek J. Boosting p53 with interferon and viruses [J]. Nat Immunol 2003, 4: 825-826.