

doi: 10.7668/hbncx.2014.S1.018

类猪圆环病毒 P1 诱导 PK15 细胞自噬的研究

温立斌¹, 王凤芝¹, 何孔旺¹, 解建平¹, 贾化生²

(1. 江苏省农业科学院 兽医研究所, 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室, 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014; 2. 张家口市动物卫生监督所, 河北 张家口 075000)

摘要: 旨在探讨类猪圆环病毒 P1 感染对 PK15 细胞自噬的影响。将同一批 PK15 细胞分成对照组和感染组, 感染组在类猪圆环病毒 P1 感染 PK15 细胞后 14、24、48 h 分别收集细胞, 对照组也在同样时间收获, 用透射电镜观察自噬现象的发生。结果表明, 与对照组相比, 感染组 PK15 细胞内出现典型自噬形态学变化。揭示类猪圆环病毒 P1 能诱导 PK15 细胞发生自噬, 但细胞发生自噬的相关信号传导通路还有待进一步研究。

关键词: 类猪圆环病毒 P1; PK15 细胞; 自噬

中图分类号: Q78; S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2014)增刊-0085-04

Porcine Circovirus-like Virus P1-induced Autophagy in PK15 Cells

WEN Li-bin¹, WANG Feng-zhi¹, HE Kong-wang¹, XIE Jian-ping¹, JIA Hua-sheng²

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture, National Research Center of Veterinary Biologicals Engineering and Technology, Nanjing 210014, China; 2. Zhangjiakou Municipal Animal Health Supervision Institute, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: The research is to study the autophagy induced by porcine circovirus-like virus P1. PK15 cells (Both P1 infection and control group) were collected at various time periods (14, 24, 48 h) and used to detect autophagy by transmission electron microscopy. Compared with the control groups, the typical morphological features of autophagy was detected in PK-15 cells infected with P1. The result suggests that porcine circovirus-like virus P1 can induce the autophagy of PK-15 cells.

Key words: Porcine circovirus-like virus P1; PK15 cells; Autophagy

类猪圆环病毒 P1 是目前已知拥有最小基因组的病毒, 基因组为单股、环状 DNA, 全长 648 个核苷酸, 除少部分为外源序列外, 大部分核苷酸序列与猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 高度同源, 推测其与另一株已发现的类猪圆环病毒 P2 一样, 为 PCV2 与其他生物重组而来^[1-4]。通过构建的 P1 感染性克隆, 接种猪可引起类似猪断奶后多系统衰竭综合征 (Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 的临床症状, 表现为消瘦、贫血等。解剖可见感染猪出现脑充血、肺出血及萎缩、腹股沟淋巴结出血、膀胱黏膜出血等, 病毒主要分布在心脏、肝脏、肺脏、胰脏、脑、性腺和膀胱等脏器^[5], P1 在自然感染的仔猪体内分布

基本与此相同^[6]。分子流行病学调查表明, P1 已在我国流行^[7], 且处在不断进化过程中^[8]。由于该病的病理组织学变化主要特征为出血, 表明 P1 在一定程度上会对血管造成损伤。因此, P1 诱导血管损伤机制有待进一步研究。自噬也称为 II 型程序性细胞死亡, 是普遍存在于真核细胞中的生命现象, 是溶酶体对自身多余或受损细胞器的吞噬降解, 在生长发育、细胞分化和疾病发生发展中起着关键作用。为了解 P1 能否诱导 PK15 细胞发生自噬, 本试验通过透射电镜观察不同时间点感染 P1 的 PK15 细胞形态学变化, 检测自噬现象, 为进一步研究 P1 引起血管细胞的出血等提供一定的理论基础。

收稿日期: 2014-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272574; 30972184); 江苏省农业科技自主创新基金 (CX(14)2045)

作者简介: 温立斌 (1967-), 男, 河北宣化人, 研究员, 博士, 主要从事动物分子病毒学与免疫学研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 质粒和细胞 P1 双拷贝串联分子克隆及定量用 P1 标准质粒由江苏省农科院兽医所人兽共患病防控研究室构建、保存^[9-10];无 PCV、P1 和支原体污染的 PK15 细胞由本研究室保存。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640 培养基、胎牛血清和青、链霉素为 GIBCO 公司产品; LipofectamineTM2000 转染试剂为 Invitrogen 产品;病毒基因组提取试剂盒为北京天恩泽基因科技有限公司产品(柱式病毒 DNAout);SYBR[®] Premix Ex TaqTM(Tli RnaseH Plus)为 TaKaRa 产品;Applied Biosystems 7500 定量 PCR 仪;JEM-1200EX 透射电子显微镜为日本电子公司生产;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 PK15 细胞的转染 转染步骤按照试剂盒说明进行:将 PK15 细胞用 RPMI 1640 生长液(含 10% 胎牛血清)培养到旺盛生长状态,并传代入 24 孔细胞培养板,使细胞密度在 1 d 后能达到 90%~95% 的细胞融合;用最终体积 50 μ L 无血清的 OPTI-MEM I Reduced Serum Medium 稀释 0.8 μ g 待转染质粒 DNA(包括构建的病毒 P1 分子克隆和对照 pSK 空载体)轻轻混匀;取 2 μ L 轻轻混匀的 LipofectamineTM2000 脂质体用 OPTI-MEM I Reduced Serum Medium 稀释至 50 μ L,轻轻吹打混匀,室温孵育 5 min;将稀释的 LipofectamineTM2000 与稀释的 DNA 在 30 min 内进行混合,孵育 20 min,以形成 DNA-脂质体复合物;将 PK15 细胞用无抗生素、无血清的培养液清洗 3 次和更换;将 DNA-脂质体复合物加到 24 孔细胞板中,每孔加 100 μ L;将细胞板轻轻晃动混匀,置 CO₂ 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 5 h,再更换 RPMI 1640 维持液(含 2% 胎牛血清)继续培养至 96 h。

1.2.2 拯救病毒 P1 的细胞培养 将 PK15 细胞用 RPMI 1640 生长液培养到对数生长期,胰酶消化,按 1×10^6 个细胞/孔传代入 6 孔细胞培养板,每孔同步接种 100 μ L 拯救病毒 P1,待细胞长成单层后,更换为 RPMI 1640 维持液。同时设立接种转染 pSK 空载体培养物的细胞作为对照组。置 CO₂ 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养至一定时间。其中用于拯救病毒 P1 的一步生长曲线分析的选取接种后 14、24、48、72、96、120 h 的细胞,用于自噬观察的为接种后 14、24、48 h 的细胞。

1.2.3 病毒 P1 的一步生长曲线分析 将不同时间培养的细胞反复冻融 3 次后,用病毒基因组提取试剂盒提取 DNA,最终用 50 μ L 洗脱液洗脱,按参考文献[10]已建立的 P1 定量 PCR 检测方法进行检测。

1.2.4 自噬的观察 用细胞刮刀刮下接种不同时间的病毒 P1 细胞和对照细胞,1 000~2 000 r/min 离心 10 min,弃上清。按常规方法进行双固定、乙醇梯度脱水、浸透和环氧树脂包埋、固化,制备超薄切片,镍网收集,进行醋酸铀-枸橼酸铅双染色,TEM-1200EX 透射电子显微镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 拯救病毒 P1 的生长曲线

通过定量 PCR 检测结果来看,虽然增殖滴度不高,但拯救病毒 P1 在 PK15 细胞中确也进行了复制,表现为在接种细胞 96 h 后,病毒基因组拷贝数达到高峰(图 1)。而对照细胞并未检测到 P1 基因组的拷贝数。

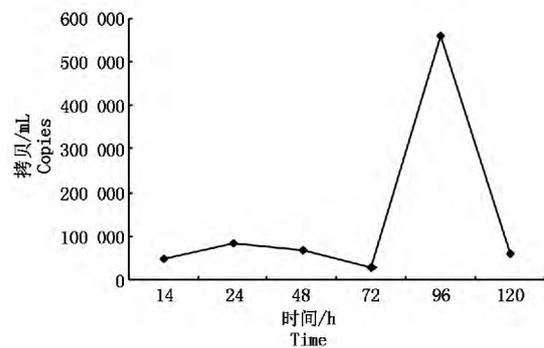
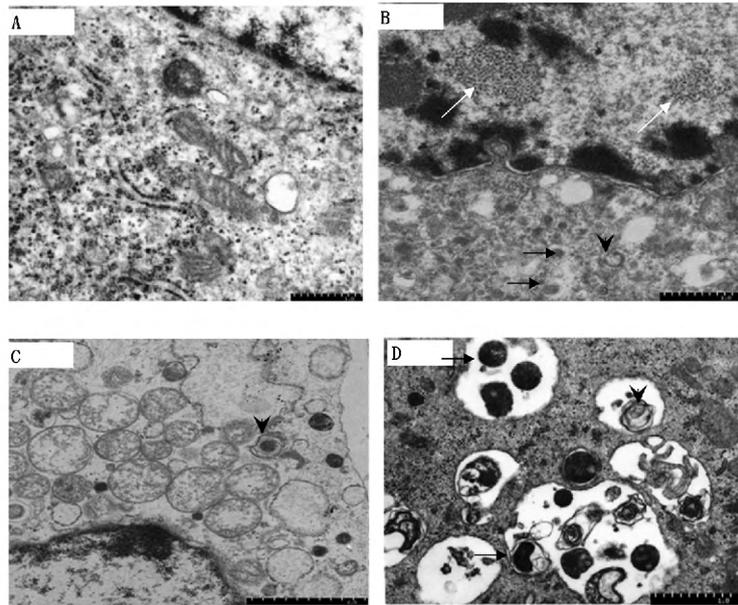


图 1 拯救病毒 P1 的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of P1 virus in PK-15 cells

2.2 拯救病毒 P1 诱导 PK15 细胞自噬的电镜检测

与对照组细胞相比,感染病毒 P1 组细胞的超微结构显示其自噬作用显著增强(图 2)。透射电子显微镜观察,对照细胞处于正常状态,细胞器均匀分布在细胞中,线粒体嵴结构清晰,胞质内罕见自噬小体(图 2-A);而接种 P1 细胞则出现大量空泡,有的空泡中没有内容物(图 2-C),有的则含有自噬溶酶体等(图 2-D),细胞器大量消失(图 2-B, C, D)。在电镜下可见到不同阶段的自噬变化,首先可见到不断扩张、扁平状双层膜、“C”型弯曲的自噬前体(图 2-B),同时,胞质内溶酶体数量增多;然后可见到自噬体和自噬溶酶体(图 2-B, D),也可见到具有包膜、呈漩涡状或板层样的自噬泡(图 2-C, D)。此外,也可在胞核中发现病毒蛋白聚集(图 2-B)。



A. 对照细胞; B ~ D. P1 感染细胞: 自噬体(B. 黑箭▼所示), 自噬前体(B. 黑箭头→所示), 自噬溶酶体(D. 黑箭▼所示), 自噬泡(C, D. 黑箭头→所示) 病毒蛋白(B. 白箭所示)。
A. Mock cells; B - D. P1 infected cells: autophagosomes(B. black arrows) , phagophore(B. black arrowhead) , autolysosome(D. black arrows) , autophagic vacuole(C , D. black arrowheads) , P1 protein aggregates(B. white arrows) .

图2 拯救病毒 P1 诱导 PK15 细胞自噬的透射电镜观察

Fig. 2 The autophagy of PK15 cells infection with a rescue of virus P1 under a transmission electron microscope

3 讨论

细胞自噬可依据细胞内底物运输到溶酶体方式的不同而分为 3 种主要方式, 即巨自噬(Macroautophagy)、微自噬(Microautophagy) 及伴侣分子介导的自噬(Caperone-mediated autophagy) , 巨自噬为最主要的自噬形式, 它是由细胞内双层膜结构不断延伸, 非选择性地包裹胞内物质形成自噬体, 然后与溶酶体融合; 微自噬的自噬体膜由溶酶体膜直接内陷形成, 胞内成分在膜内陷时被卷入; 伴侣分子介导的自噬则没有膜性结构的形成, 是由细胞质内具有特殊氨基酸序列的可溶性蛋白与分子伴侣结合后, 转运到溶酶体中被降解。一般来说, 细胞自噬的检测方法包括电镜检测、蛋白印迹检测和荧光显微镜及流式细胞仪检测等, 其中检测的金标准是通过电镜看到膜状结构的自噬体以及其他相关亚细胞结构。

鉴于目前临床猪病多呈混合感染状态, 从临床病料中分离单纯的类猪圆环病毒 P1 存在一定困难。本研究利用前期构建好的 P1 感染性克隆转染细胞, 通过获得的拯救毒对细胞自噬的影响进行研究, 避免了其他可能潜在病原的干扰。同时利用转染的空载体培养物也进行接种细胞作为对照, 从而避免残存质粒对细胞自噬的影响。结果表明, 拯救毒 P1 不仅能够自我复制, 表现为接种 96 h 后, 其基因组拷贝数大幅提高; 同时电镜也可在感染细胞的胞核中观察到合成的 P1 蛋白, 这与观察到 PCV2 在

感染细胞中的变化一致^[11]。因此, 本研究电镜观察到的细胞自噬可归结到 P1 的诱导所致。

细胞自噬具有降解蛋白质和细胞器维持细胞内平衡的作用, 细胞通过自噬可降解细胞质和细胞器, 其降解产物氨基酸、核苷酸、游离脂肪酸等可供物质能量循环。其对于病毒感染与复制, 与 I 型程序性细胞死亡的凋亡一样具有“双刃剑”作用, 我们前期研究表明 P1 可诱导 PK15 细胞发生凋亡^[12], 虽然凋亡和自噬无论在生化代谢途径, 还是在形态学方面都有显著区别, 但在诱导细胞死亡过程中, 二者保持着动态平衡, 一般自噬通常先于凋亡, 进而抑制或启动凋亡。研究表明, 抑制自噬作用可诱发凋亡, 同时抑制凋亡也可导致自噬发生^[13-14]。

本研究结果表明, 类猪圆环病毒 P1 可以诱导 PK15 细胞产生自噬, 但细胞自噬的具体信号转导通路以及与 P1 诱导的细胞凋亡之间的关系还有待研究。

参考文献:

- [1] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春. 一株类猪圆环病毒 2 型因子 P1 的全基因组序列测定与分析 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(2): 411-416.
- [2] Wen L B, He K W, Yu Z Y, et al. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus-like agent [J]. Journal of Virology 2012, 86(1): 639.
- [3] 温立斌, 何孔旺, 倪艳秀, 等. 类猪圆环病毒因子 P1 核

- 酸链型和极性的研究[J]. 华北农学报, 2012, 27(3): 120-122.
- [4] Wen L, He K, Yang H *et al.* Complete nucleotide sequence of a novel porcine circovirus-like agent and its infectivity *in vitro* [J]. Science in China. Series C Life Sciences/Chinese Academy of Sciences 2008, 51(5): 453-458.
- [5] Wen L, He K, Xiao Q *et al.* A novel porcine circovirus-like agent P1 is associated with wasting syndromes in pigs [J]. PLOS One 2012, 7(8): e41565.
- [6] 温立斌, 王小敏, 周俊明, 等. 类猪圆环病毒因子 P1 在自然感染仔猪体内的组织分布 [J]. 中国兽医学报, 2013, 33(1): 1-3.
- [7] Wen L B, He K W, Yang H C, *et al.* Prevalence of porcine circovirus-like agent P1 in Jiangsu, China [J]. Virology Journal 2011, 8: 543-547.
- [8] 温立斌, 何孔旺, 王凤芝, 等. 类猪圆环病毒 P1 的感染及其分子特征 [J]. 华北农学报, 2013, 28(5): 34-37.
- [9] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春. 类猪圆环病毒 2 型因子 P1 与 P2 株全长基因组 DNA 分子克隆的构建 [J]. 江苏农业学报, 2007, 23(6): 579-582.
- [10] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测类猪圆环病毒因子 P1 [J]. 华北农学报, 2009, 24(4): 31-35.
- [11] Rodríguez-Cariño C, Duffy C, Sánchez-Chardi A *et al.* Porcine circovirus type 2 morphogenesis in a clone derived from the I35 lymphoblastoid cell line [J]. Journal of Comparative Pathology 2011, 144(2/3): 91-102.
- [12] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春, 等. 类猪圆环病毒 2 型因子 P1 和 P2 诱导 PK-15 细胞凋亡的研究 [J]. 华北农学报, 2008, 23(6): 84-86.
- [13] Maiuri M C, Zalckvar E, Kimchi A *et al.* Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8(9): 741-752.
- [14] Platini F, Perez-Tomas R, Ambrosio S A. Understanding autophagy in cell death control [J]. Current Pharmaceutical Design 2010, 16(1): 101-113.