

登革病毒 2 型诱导人血管内皮细胞株 EAhy926 自噬的研究

李 颖, 郑毅涛, 齐一鸣, 黄俊琪*

(中山大学中山医学院免疫教研室//教育部热带病防治研究重点实验室, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】探讨登革病毒 2 型(DV2)感染人静脉血管内皮细胞株 EAhy926 对细胞自噬的影响。【方法】同一批 EAhy926 细胞分成对照组和感染组,感染组在 DV2 感染 EAhy926 细胞后 12、24、36、48 h 分别收集细胞,用流式细胞仪检测发生自噬的细胞百分率与酸性自噬泡的平均荧光密度,对照组相应时间点收集细胞做同样处理作为对照。实验重复 5 次,用方差分析和配对 *t* 检验进行统计分析。【结果】感染组 4 个时间点自噬的细胞百分率和酸性自噬泡的平均荧光密度较对照组相应时间点均有升高($P < 0.05$)。48 h 对照组和感染组自噬细胞的百分率和酸性自噬泡平均荧光密度差异最明显。对照组 4 个时间点自噬细胞百分率(%)分别为: 70 ± 7 , 72 ± 6 , 71 ± 8 和 69 ± 10 ;感染组则为 75 ± 3 , 78 ± 3 , 77 ± 5 , 80 ± 7 。对照组 4 个时间点酸性自噬泡平均荧光密度分别为: 36.4 ± 3.4 , 37.0 ± 3.3 , 35.8 ± 2.3 , 34.4 ± 3.2 ,感染组则为 41.1 ± 2.3 , 45.0 ± 4.8 , 41.3 ± 3.3 , 44.5 ± 7.5 。【结论】DV2 能诱导 EAhy926 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: 登革病毒; 自噬; EAhy926; 酸性自噬泡

中图分类号: R373.33

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2011)04-0433-04

DV2-induced Autophagy in Human Endothelial Cell Line EAhy926

LI Ying, ZHENG Yi-tao, QI Yi-ming, HUANG Jun-qi*

(Department of Immunology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University//Key Laboratory of Tropical Diseases Control, Ministry of Education, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To investigate the DV2 (Dengue virus type 2)-induced autophagy in the human endothelial cell line EAhy926.【Methods】Flow cytometric analysis was used to detect the percentage of autophagic cells of EAhy926 and the mean fluorescent intensity (MFI) of autophagic vacuoles after DV2 infection for various time periods (12 h, 24 h, 36 h, and 48 h), at the same time, the EAhy926 cells in control groups were collected for detection. All experiments were repeated for 5 times. The variance analysis and the *t* test were used for analysis. Values were considered statistically significant at $P < 0.05$.【Results】Compared with the control groups, the percentage of autophagic cells of EAhy926 and the MFI of the autophagic vacuoles increased in DV2 infection groups ($P < 0.05$). The differential value between control groups and DV2 infection groups was most significant in 48 h. In different times (12 h, 24 h, 36 h, and 48 h), there were $(70 \pm 7)\%$, $(72 \pm 6)\%$, $(71 \pm 8)\%$, and $(69 \pm 10)\%$ of autophagic cells in control groups respectively, while in DV2 infection groups, there were $(75 \pm 3)\%$, $(78 \pm 3)\%$, $(77 \pm 5)\%$, and $(80 \pm 7)\%$ of autophagic cells, respectively. Accordingly, the MFI of autophagic vacuoles in control groups was 36.4 ± 3.4 , 37.0 ± 3.3 , 35.8 ± 2.3 , and 34.4 ± 3.2 in the four timepoints respectively, while in DV2 infection groups, the MFI of autophagic vacuoles was 41.1 ± 2.3 , 45.0 ± 4.8 , 41.3 ± 3.3 , and 44.5 ± 7.5 , respectively.【Conclusions】DV2 can induce the autophagy of EAhy926.

Key words: dengue virus; autophagy; EAhy926; autophagic vacuoles

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(4): 433-436]

登革病毒(Dengue virus, DV)是一种由雌性伊蚊传播的重要的虫媒性病毒,每年在世界范围内

约有 100 万人感染该病毒,其严重威胁着热带和亚热带国家的公共卫生安全^[1],其中登革病毒 2 型

收稿日期: 2010-10-11

基金项目: 国家自然科学基金(30872350); 广东省自然科学基金(8151008901000017); 广东省科技计划项目(2007B031516008; 2010B050700008); 广东省软科学研究计划(2008B060600051); 广州市科技计划项目(2008Z1-E221); 高校基本科研业务费中山大学青年教师培育项目(10YKPY31)

作者简介: 李颖, 硕士研究生, 研究方向: 抗感染免疫, E-mail: oh_safin@163.com; * 通信作者: 黄俊琪, 博士, 副教授, E-mail: junqi_huang@yahoo.com.cn

(Dengue virus type 2, DV2) 流行最广。登革病毒可引起人类登革热(dengue fever, DF), 严重者可出现登革出血热(dengue hemorrhagic fever, DHF) 和登革休克综合征(dengue shock syndrome, DSS)。DHF/DSS 最主要的特征为出血及血管渗漏, 表明登革病毒在一定程度上会对血管内皮细胞造成损伤。因此 DV 诱导血管内皮损伤机制的研究一直是我们的焦点。自噬, 是广泛存在于真核细胞中的生命现象, 是生物在其发育、老化过程中均存在的一种净化自身多余或受损细胞器的共同机制, 但过度的自噬可以导致细胞的程序性死亡, 因此自噬又被称为 II 型程序性细胞死亡^[2]。作为 I 型程序性细胞死亡的凋亡与自噬之间复杂的动态关系尚未完全清楚, 一般认为自噬作为细胞的保护机制, 先于凋亡发生。我们前期研究表明, DV 感染人脐静脉内皮细胞(human umbilical veins endothelium cell, HUVEC)会诱导凋亡, 在 48 h 细胞凋亡达到高峰^[4]; DV 也能诱导人脐静脉内皮细胞株 EAhy926 发生凋亡, 出现细胞凋亡高峰时间在 60 h。DV 诱导的 EAhy926 细胞凋亡在达到高峰之前, 细胞已发生了显著的自噬, 但发生自噬的机制及与凋亡之间的相互关系不明。为了解登革病毒诱导血管内皮细胞的自噬情况, 本实验利用流式细胞仪技术在 DV2 感染 EAhy926 细胞后不同时间点检测发生自噬的细胞百分率与酸性自噬泡平均荧光密度, 以此探讨登革病毒感染对 EAhy926 自噬的影响, 为进一步研究血管内皮细胞引起血管渗漏综合症及利用自噬抑制血管内皮细胞凋亡的可能性提供一定的理论参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞系 EAhy926 是由人肺腺癌细胞株 A549 与原代培养的人脐静脉内皮细胞 HUVEC 融合构建而成的永生化细胞株, 具有血管内皮细胞的特性^[5], 为中山医学院干细胞教研室惠赠。

1.1.2 病 毒 DV2 病毒株来自中山医学院微生物学教研室, 本实验室已进行病毒扩增和定量保存。

1.1.3 主要试剂 DMEM/F12 培养基、胎牛血清、青链霉素双抗等为 Gibco 产品。吖啶橙(acridine orange, AO)为 Sigma 产品。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 EAhy926 用 100 mL/L 胎牛血清及青链霉素双抗为 1.0×10^5 U/L 的 DMEM/F12 培养液, 37 ℃, 体积分数为 5% CO₂ 孵育箱中培养。

1.2.2 登革病毒感染 对数生长期的 EAhy926 按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板, 待细胞培养 24 h 后, PBS 洗涤 2 次。感染组的 EAhy926 取已定量好的 2 型登革病毒液(10^6 pfu/mL) 加入 EAhy926 细胞培养板中吸附 2 h, 弃去上清, 加入含 20 mL/L 胎牛血清的培养液, 同时设立对照组(未吸附病毒, 用含 20 mL/L 胎牛血清的培养液维持培养), 37 ℃、体积分数为 5% CO₂ 培养, 于 12、24、36、48 h 各时间点弃去培养液, 收集细胞^[6]。

1.2.3 自噬的检测 同一批 EAhy926 细胞分成对照组和感染组, 感染组在 DV2 感染 EAhy926 细胞后 12、24、36、48 h 分别收集细胞, 500×g 5 min 离心, 用 PBS 洗涤 2 遍。用 buffer 重悬并调整细胞数为 1×10^6 cells/mL 吸取 100 μL 转移至 5 mL 的流式离心管中, 加入终浓度为 0.5 μg/mL 的吖啶橙溶液混匀, 室温避光孵育 10 min, PBS 洗涤 2 遍后用 buffer 200 μL 重悬, 流式细胞仪检测。对照组相应时间点收集细胞做同样处理做以对照。实验重复 5 次。

1.3 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 SPSS 16.0 统计软件进行方差分析和配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 对照组和感染组发生自噬的细胞百分率的变化

对照组 EAhy926 细胞 4 个时间点(12、24、36、48 h)发生自噬的细胞百分率分别为: $(70 \pm 7)\%$, $(72 \pm 6)\%$, $(71 \pm 8)\%$ 和 $(69 \pm 10)\%$ 。感染组 EAhy926 细胞 4 个时间点自噬的细胞百分率分别为 $(75 \pm 3)\%$, $(78 \pm 3)\%$, $(77 \pm 5)\%$, $(80 \pm 7)\%$ (图 1), 感染组自噬细胞百分率增加。实验重复 5 次, 对照组和感染组各时间点发生自噬的细胞百分率经方差分析和配对 *t* 检验, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 其中 48 h 对照组和感染组发生自噬的细胞百分率差异最明显(图 2)。

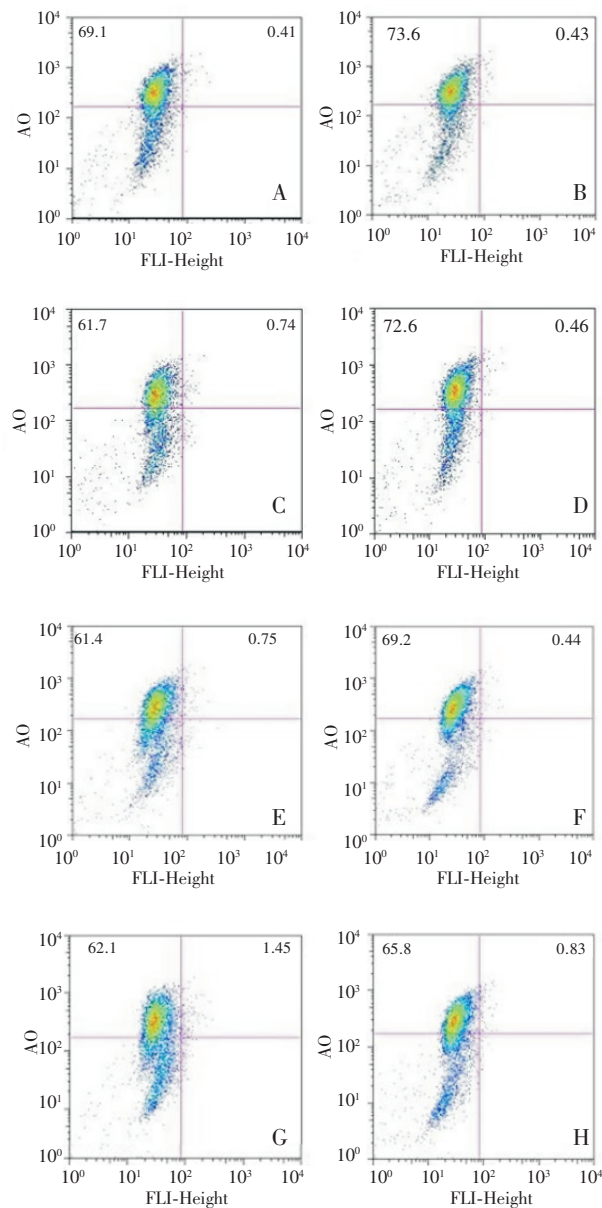


图 1 对照组和感染组 4 个时间点发生自噬的细胞百分率

Fig.1 The percentage of autophagic cells of EAhy926 in control/DV2 infection groups in different times

A, C, E, G: 12, 24, 36, 48 h of cultured EAhy926 cells in control group; B, D, F, H: 12, 24, 36, 48 h of cultured EAhy926 cells in DV2-infection group

2.2 对照组和感染组酸性自噬泡平均荧光密度的分析

对照组 4 个时间点 (12 h, 24 h, 36 h, 48 h) 酸性自噬泡平均荧光密度分别为: 36.4 ± 3.4 , 37.0 ± 3.3 , 35.8 ± 2.3 , 34.4 ± 3.2 。感染组酸性自噬泡平均荧光密度分别为 41.1 ± 2.3 , 45.0 ± 4.8 , 41.3 ± 3.3 , 44.5 ± 7.5 。感染组自噬泡平均荧光密度增加。实验重复 5 次, 对照组和感染组各时间点 EAhy926 酸

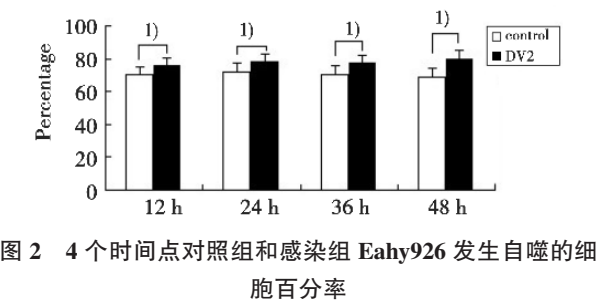


Fig.2 The percentage of autophagic cells of EAhy926 in control/ DV2 infection groups in different time points

Each data is representative of the results of 5 independent experiments. $\bar{x} \pm s$, 1) $P < 0.05$.

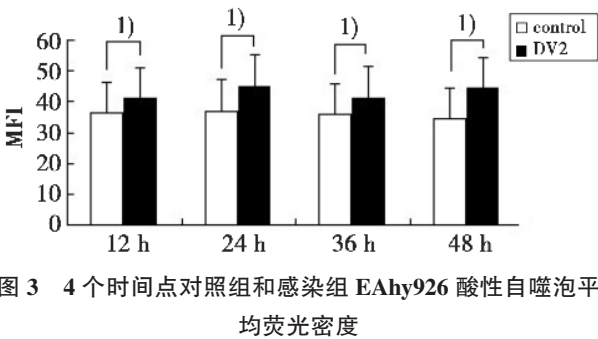


Fig.3 The mean fluorescent intensity (MFI) of autophagic vacuoles in control/DV2 infection groups in different times

Each data is representative of the results of five independent experiments. $\bar{x} \pm s$, 1) $P < 0.05$

性自噬泡平均荧光密度经方差分析和配对 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中在 48 h 对照组和感染组酸性自噬泡平均荧光密度差异最明显(图 3)。

3 讨 论

自噬是广泛存在于真核细胞内的一种细胞分解细胞质和/或细胞器等自身构成成分的生理现象, 其发生是内因(损伤的细胞器、变异的蛋白的大量积蓄以及微生物感染等)与外因(细胞饥饿、低氧、激素刺激等)共同作用的结果。在细胞饥饿、生长因子缺乏和缺氧以及一些病理状态下, 自噬对维持细胞的存活有积极的作用, 由于过度自噬可以导致细胞的程序性死亡, 因此又被称为 II 型程序性细胞死亡。自噬的过程主要包括 4 个环节: ①底物诱导的自噬前体的形成; ②自噬体形成; ③自噬体与溶酶体融合; ④自噬体内容物被降解。酸

性自噬泡的产生是自噬的特异性过程。

吖啶橙是一种荧光染料,其荧光波长会随着细胞内 pH 值的变化而变化。在吖啶橙染色的细胞中,胞仁和胞浆分别发亮绿和暗红色的荧光,而酸性细胞器发亮红色的荧光。红色荧光的强度与酸性细胞器的酸度和/或容积成正相关。因此,可以通过流式细胞仪利用 FL1 通道检测绿色荧光,FL3 通道检测红色荧光以观察红色荧光强度而判断酸性自噬泡的形成情况,吖啶橙可以作为自噬的特征性标记物^[7]。

鉴于自噬与凋亡的复杂关系,本文在前期研究的基础上,继续探讨登革病毒对血管内皮细胞自噬的影响,以人静脉血管内皮细胞株 EAhy926 细胞为细胞模型进行研究。实验证明,登革病毒感染 EAhy926 后,在 12 h 已出现显著自噬,且长时间高水平维持,这可能是由于 EAhy926 是由人肺腺癌细胞株 A549 与原代培养的人脐静脉内皮细胞 HUVEC 融合构建而成的永生化细胞株,EAhy926 与 A549 有相似的细胞增殖能力^[8],其细胞自噬水平与 A549 细胞相似。有报道 1-3-芳基-1 氢-吡唑-5-碳水化合物衍生物能够诱导 A549 发生自噬性死亡,而细胞凋亡及坏死均不明显^[9],内皮抑素可诱导 EAhy926 发生高水平的自噬,而只有 15%~30% 的细胞出现了凋亡^[10],与我们的研究结果基本吻合。感染组各时间点 EAhy926 的发生自噬的细胞百分率较对照组有所升高,其中以 48 h 最明显,对照组发生自噬的细胞百分率为 $(69 \pm 10)\%$,感染组自噬细胞百分率为 $(80 \pm 7)\%$, $P < 0.05$ 。相应地,感染组的 EAhy926 细胞酸性自噬泡的平均荧光密度较对照组有所升高,其中 48 h 最明显,对照组 34.4 ± 3.2 ,感染组为 44.5 ± 7.5 , $P < 0.05$ 。这可能是由于登革病毒作用于 EAhy926 细胞时,细胞发生的自噬可以将胞内物质降解和循环利用而使细胞得以继续存活,高水平的自噬在恶劣环境中对其起到了一定的保护作用。

我们的研究结果表明 DV2 可以诱导内皮细胞 EAhy926 产生自噬,但 DV2 诱导原代静脉内皮细胞自噬情况如何,细胞自噬的具体信号转导通路以及与 DV 诱导的细胞凋亡之间的关系还有待研究。DHF/DSS 诱发的血管渗漏综合征所涉及的

内皮细胞功能丧失机制尚不清楚,而 DV 诱导的细胞自噬以何种方式参与内皮细胞功能变化的过程,还有待进一步的阐明。

参考文献:

- [1] Guzmán MG, Kourí G. Dengue: An update [J]. Lancet Infect Dis, 2002, 2(1): 33-42.
- [2] Mathew R, Karantza WV, White E. Role of autophagy in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(12): 961-967.
- [3] Matsuda T, Almasan A, Tomita M, et al. Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2 ligand/tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand [J]. Gen Virol, 2005, 86 (Pt 4): 1055-1065.
- [4] Liao H, Xu J, Huang J. FasL/Fas pathway is involved in dengue virus induced apoptosis of the vascular endothelial cells [J]. J Med Virol, 2010, 82 (8): 1392-1399.
- [5] Lidington EA, Moves DL, McCormack AM, et al. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions [J]. Transpl Immunol, 1999, 7(4): 239-246.
- [6] 曾祥凤,江丽芳,方丹云,等. DEN2 重组 E 蛋白单克隆抗体的制备及其生物学活性 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(1): 56-60.
- [7] Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, et al. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide [J]. Cancer Res, 2003, 63(9): 2103-2108.
- [8] Lu ZJ, Ren YQ, Wang GP, et al. Biological behaviors and proteomics analysis of hybrid cell line EAhy926 and its parent cell line A549 [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28: 16.
- [9] Fan CD, Zhao BX, Fang W, et al. Synthesis and discovery of autophagy inducers for A549 and H460 lung cancer cells, novel 1-(2-hydroxy-3-oxopropyl)-3-aryl-1H-pyrazole-5-carbohydrazide derivatives [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2008, 18(14): 3860-3864.
- [10] Chau Y P, Lin S Y, Chen J H, et al. Endostatin induces autophagic cell death in EAhy926 human endothelial cells [J]. Histol Histopathol, 2003, 18(3): 715-726.

(编辑 徐杰)