

· 药理与临床 ·

大蒜新素对人巨细胞病毒感染的人胚肺成纤维细胞凋亡的影响

聂兴草, 方 峰*, 李 红, 董永绥, 甄 宏, 刘志峰, 李 革

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 儿科临床病毒研究室, 湖北 武汉 430030)

摘要: 目的 研究大蒜新素对人巨细胞病毒 (HCMV) 诱导感染的人胚肺成纤维细胞 (HEL F) 凋亡的动态变化及凋亡调控基因 *bcl-2* 和 *fas* mRNA 表达的影响。方法 用流式细胞术测定 HEL F 在高、低感染复数 (MOI 分别为 2.5、0.25) HCMV 感染后 1、12、24、36、48、72、96 h 凋亡细胞比率; 大、中、小剂量大蒜新素 (9、6 和 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理正常的和感染的 HEL F 细胞 (MOI 为 2.5) 后上述各时间点凋亡细胞比率。用原位杂交法检测大剂量大蒜新素处理感染细胞 (MOI 为 0.25) 72 h 后 *bcl-2* 和 *fas* mRNA 表达强度变化, 并与正常细胞和感染细胞对比分析。结果 正常细胞凋亡比率保持恒定低水平 (凋亡率平均 2.68%); 低、高感染复数感染细胞随时间延长凋亡细胞逐渐增多, 凋亡率峰值分别达 8.85% (96 h) 和 25.63% (72 h); 各剂量大蒜新素处理的正常细胞凋亡率增加, 呈剂量依赖性, 峰值分别为 4.88%、6.47% 和 8.35%; 但各剂量药物处理感染细胞后却使细胞凋亡比率下降, 大剂量药物处理 72 h 时效应最为明显, 凋亡细胞比率由 25.63% 降至 16.24%。正常细胞高表达 *bcl-2*, 低表达 *fas* 基因; 感染 HCMV 后, *bcl-2* 表达显著下调, *fas* 表达明显增强; 大蒜新素处理感染细胞后使 *bcl-2* 表达强度明显高于感染细胞, *fas* 表达水平明显低于感染细胞, 但仍未恢复到正常细胞水平。结论 HCMV 是 HEL F 凋亡的强诱导剂; 病毒可通过下调凋亡抑制基因 *bcl-2* 和上调凋亡促进基因 *fas* 而发挥致凋亡作用。大蒜新素本身可诱导 HEL F 凋亡, 但却能明显抑制 HCMV 诱导的细胞凋亡, 其抑制作用可能与药物干扰 HCMV 影响凋亡调控基因 *bcl-2* 和 *fas* 表达有关。

关键词: 大蒜新素; 细胞凋亡; 凋亡调控基因; 人巨细胞病毒; 人胚肺成纤维细胞

中图分类号: R285.51

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)09-1015-04

Effect of allitridin on apoptosis of human embryonic lung fibroblast infected by human cytomegalovirus

NIE Xing-eao, FANG Feng, LI Hong, DONG Yong-sui, ZHEN Hong, LIU Zhi-feng, LI Ge

(Laboratory of Pediatric Clinical Virology, Tongji Hospital, Tongji Medical College,

Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Object** To study the effect of allitridin on the dynamic changes of apoptosis and the expression of apoptosis-modulating genes, *bcl-2* and *fas* mRNA in human embryonic lung fibroblast (HEL F) infected by human cytomegalovirus (HCMV). **Methods** By using flow cytometry, the apoptotic cell rates in high and low MOI (2.5 and 0.25) infected cells at 1, 12, 24, 36, 48, 72, and 96 h after HCMV infection and in infected cells (MOI= 2.5) treated with different doses of allitridin (9, 6, and 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at above time-course after treatment of drug were measured. The levels of *bcl-2* and *fas* mRNA expression in infected cells (MOI= 0.25) treated with high dose of allitridin for 72 h were determined by *insitu* hybridization method, compared with infected and normal cells. **Results** The apoptotic cell rates were persistently low in normal HEL F cells (mean: 2.68%) and increased as time in low and high MOI infected cells, peak reached 8.85% (96 h) and 25.63% (72 h), respectively. Allitridin also induced apoptosis of normal cells in a dose-dependent manner, the peak was 4.88%, 6.47%, and 8.35%, respectively. Significantly, different doses of allitridin could inhibit apoptosis of high MOI infected cells. High dose of drug had the highest efficacy at 72 h, apoptotic cell rate decreased from 25.63% to 16.24%. High *bcl-2* mRNA expression and low *fas* mRNA expression in normal HEL F cells were observed, and in HCMV infected cells, the expression of *bcl-2* mRNA were down-regulated and that of *fas* mRNA were up-regulated. Allitridin was significantly able to up-regulate the expression of *bcl-2* gene and down-regulate *fas* gene in HCMV infected cells, although they still couldn't return to the levels of normal cells.

* 收稿日期: 2004-02-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070928)

作者简介: 聂兴草 (1974—), 女, 湖北人, 华中科技大学同济医学院博士, 主要从事病毒性疾病的机制和防治研究。

* 通讯作者 Tel: (027) 83663579 E-mail: ffang@tj.h. tjmu. edu. cn

Conclusion HCMV is a strong inducer of apoptosis for HELF cells, which is associated with its role of altering the expression of apoptosis-regulating genes, bcl-2 and fas. Allitridin, although it induces apoptosis of normal cells, can markedly inhibit apoptosis induced by HCMV, and this inhibition may be related to interfering with the action of HCMV on the expression of bcl-2 and fas mRNA.

Key words: allitridin; cell apoptosis; apoptosis-regulating genes; human cytomegalovirus (HCMV); human embryonic lung fibroblast (HELF)

细胞凋亡是在生理或病理因素刺激下机体通过基因控制而使细胞发生自主有序地消亡过程,对于维持机体自身稳定具有重要意义。在受到胞内微生物侵袭时,凋亡是机体防御机制之一。同时,细胞凋亡异常增加已被认为是病毒性疾病的重要发病机制之一^[1,2]。研究表明,人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)可致细胞染色体损伤、不成熟和凝集^[3],可使感染细胞中 p53 表达水平升高^[4],诱导高度磷酸化 Rb 基因表达^[5],进而诱导感染细胞凋亡^[2,6]。另一方面, HCMV 又可编码凋亡抑制物 vICA 和 vMIA^[7,8],抑制细胞凋亡。HCMV 病毒可能在细胞不同感染时相和条件下诱导或抑制感染细胞凋亡,其双重效应可能在 HCMV 致病机制中发挥重要作用。

大蒜新素(allitridin)是大蒜鳞茎中的有效成分,在体外可明显抑制 HCMV 实验毒株和临床毒株增殖和病毒即刻早期抗原(immediate-early antigens, IEAs)表达^[9],并可明显降低巨细胞病毒(CMV)肝炎小鼠肝组织病毒 IE 基因负荷量和改善肝脏组织病变及肝功能^[10]。大蒜新素抗 CMV 的机制并不十分明确,其改善病毒感染组织病变作用除与其抗病毒效应相关外,是否与药物干扰病毒对细胞增殖或凋亡作用有关是本研究的目的。本实验采用流式细胞术和原位杂交法分析不同浓度大蒜新素对 HCMV 感染的人胚肺成纤维细胞(human embryonic lung fibroblast, HELF)凋亡发生的动态变化及凋亡调控基因 bcl-2 和 fas mRNA 表达的影响。

1 材料

1.1 细胞:取妊娠 16 周水囊引产胚胎,按常规方法制备原代 HELF,第 10~15 代细胞用于本实验。

1.2 病毒: HCMV AD169 株由中国预防科学院病毒研究所提供,平均感染性病毒量为 5.26×10^6 PFU/mL。

1.3 药物:大蒜新素即大蒜素注射液(15 mg/mL),上海禾丰制药有限公司生产,批号:010005。

1.4 主要试剂与仪器:含 bcl-2 cDNA (2.0 kb) 及

fas-cDNA 片段(2.3 kb)的质粒由华中科技大学同济医学院免疫教研室惠赠;地高辛标记及检测试剂盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司。FA Csort 流式细胞仪(美国 Becton Diskinson 公司);Model 2300 型 CO₂培养箱(美国);显微镜图像分析仪(HPIAS-1000 医学彩色图像分析系统)。

2 方法

2.1 凋亡细胞发生率检测:用流式细胞仪检测各组细胞凋亡发生率。细胞按常规固定、收集、碘化丙锭染色后上机检测。由于细胞凋亡过程中,核 DNA 降解成寡聚核小体,凋亡细胞在 G₀/G₁峰前形成亚 G₁峰,可利用该峰对凋亡细胞进行定量分析。

2.1.1 HCMV 对 HELF 细胞凋亡的影响:按常规建立高、低感染复数(multiplicity of infection, MOI 分别为 2.5 和 0.25)两种感染细胞模型,正常细胞作为对照,于感染后 1、12、24、36、48、72 和 96 h 收集细胞,每组设 3 个复孔。

2.1.2 大蒜新素对正常细胞凋亡的影响:用 MTT 比色法测得细胞对药物的最大耐受质量浓度为 9.6 μ g/mL,据此设立大、中、小剂量(分别为 9、6 和 3 μ g/mL)药物处理组,于药物作用后 1、12、24、36、48、72 和 96 h 收集细胞,每组设 3 个复孔。

2.1.3 大蒜新素对 HCMV 感染细胞凋亡的影响:先建立高感染复数(MOI=2.5)感染细胞模型,再用大、中、小剂量大蒜新素处理感染细胞,观察凋亡细胞发生率的动态变化,药物作用后采样时间点同上,每组设 3 个复孔。

2.2 凋亡调控基因 bcl-2 和 fas mRNA 表达水平检测:用大剂量大蒜新素处理低感染复数(MOI=0.25)感染细胞(培养板孔内置细胞飞片)72 h 后,取出细胞飞片先用 4% 多聚甲醛固定,再用原位杂交法检测 bcl-2 和 fas mRNA 表达强度,设正常细胞和低感染复数(MOI=0.25)感染细胞作为对照,每组设 3 个复孔。每次实验设立不加探针的阴性对照和 Rnase 处理后的阴性对照。杂交结果用显微镜图像分析仪进行图像分析,计算平均吸光度值。

2.3 统计学处理:数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数

比较采用方差分析和 q 检验, 两组均数比较采用 t 检验。数据用 SPSS for Windows 10.0 统计软件处理。

3 结果

3.1 HCMV 对 HELF 细胞凋亡的影响: 结果见表 1。正常细胞凋亡发生率保持恒定低水平; 低、高感染复数感染细胞在感染 24 和 12 h 后凋亡发生率逐渐增高, 峰值分别在感染后 96 和 72 h, 后者增幅

表 1 大蒜新素及 HCMV 对正常 HELF 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of allitridin and HCMV on cell apoptosis of normal HELF ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量	凋亡率/%						
		1 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h	96 h
正常	-	2.68±0.05	2.66±0.04	2.67±0.04	2.69±0.06	2.69±0.04	2.69±0.06	2.68±0.06
HCMV	MOI= 0.25	2.75±0.04	2.82±0.04	4.92±0.35*	5.00±0.02*	5.62±0.04*	6.63±0.03*	8.85±0.14*
	MOI= 2.5	2.73±0.05	4.56±0.06* #	7.11±0.60* #	8.65±0.11* #	10.83±0.32* #	25.63±0.29* #	20.53±0.32* #
大蒜新素	3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.72±0.05	2.60±0.04	2.68±0.04	2.51±0.04	3.63±0.04*	3.55±0.06*	4.88±0.05*
	6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.68±0.06	2.55±0.03	2.76±0.07	4.69±0.07* ▲	5.25±0.08* ▲	6.47±0.06* ▲	6.43±0.05* ▲
	9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.74±0.06	4.16±0.04* ▲△	4.93±0.05* ▲△	5.76±0.08* ▲△	7.07±0.04* ▲△	8.35±0.06* ▲△	8.28±0.06* ▲△

与正常组比较: * $P < 0.05$; 与 HCMV (MOI= 0.25) 组比较: # $P < 0.05$

与大蒜新素小剂量组比较: ▲ $P < 0.05$; 与大蒜新素中剂量组比较: △ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs normal group # $P < 0.05$ vs HCMV (MOI= 0.25) group

▲ $P < 0.05$ vs small dosage allitridin group; △ $P < 0.05$ vs middle dosage allitridin group

表 2 大蒜新素对 HCMV 感染的 HELF 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effects of allitridin on cell apoptosis of HELF infected by HCMV ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量	凋亡率/%						
		1 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h	96 h
正常	-	2.68±0.05	2.66±0.04	2.67±0.42	2.69±0.06	2.69±0.04	2.69±0.06	2.68±0.06
HCMV	MOI= 2.5	2.73±0.05	4.56±0.06*	7.11±0.06*	8.65±0.11*	10.83±0.32*	25.63±0.29*	20.53±0.32*
大蒜新素	3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.69±0.04	4.45±0.04	6.21±0.05* #	7.84±0.06* #	9.81±0.12* #	23.39±0.39* #	18.24±0.38* #
	6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.77±0.04	3.94±0.04*	5.44±0.05* # ▲	7.11±0.08* # ▲	8.33±0.20* # ▲	20.84±0.24* # ▲	14.72±0.22* # ▲
	9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.77±0.03	3.15±0.06* # ▲△	4.87±0.09* # ▲△	6.82±0.10* # ▲△	7.11±0.10* # ▲△	16.24±0.33* # ▲△	13.18±0.14* # ▲△

与正常组比较: * $P < 0.05$; 与 HCMV (MOI= 2.5) 组比较: # $P < 0.05$

与 HCMV+ 大蒜新素 (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组比较: ▲ $P < 0.05$; 与 HCMV+ 大蒜新素 (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组比较: △ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs normal group; # $P < 0.05$ vs HCMV (MOI= 2.5) group

▲ $P < 0.05$ vs HCMV+ allitridin (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group; △ $P < 0.05$ vs HCMV+ allitridin (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group

3.4 大蒜新素对 HCMV 感染细胞 bcl-2 和 fas mRNA 表达强度的影响: 结果显示, 正常 HELF 高表达 bcl-2, 低表达 fas 基因; 感染 HCMV 后, bcl-2 表达明显下调, fas 表达明显增强; 大蒜新素处理感染细胞后 bcl-2 表达强度明显高于感染细胞, 而 fas 表达水平明显低于感染细胞, 但仍与正常细胞有明显差异, 结果见表 3。

4 讨论

4.1 HCMV 对细胞凋亡的影响和机制初探: 流式细胞术动态定量分析 HCMV 感染细胞的凋亡发生率, 发现高感染复数感染后 12 h 就可见到凋亡细胞比率明显增高, 随着感染时间延长增幅逐渐增加, 72 h 增幅最大, 为正常细胞的 9.5 倍。低感染复数感染时, 也观察到凋亡细胞增多现象, 但与高感染复数感

更大。

3.2 大蒜新素对正常 HELF 细胞凋亡的影响: 结果见表 1。大、中、小剂量药物分别于处理 12、36、48 h 后使凋亡发生率明显增加, 剂量愈大, 增幅愈大。

3.3 大蒜新素对 HCMV 感染细胞凋亡的影响: 各剂量药物处理感染细胞 12、24 h 后凋亡发生率明显降低, 下调效应随药物剂量增加而增强, 见表 2。

表 3 大蒜新素对 HCMV 感染细胞 bcl-2 和 fas mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of allitridin on expression of bcl-2 and fas mRNA in HCMV-infected cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量	平均吸光度值	
		bcl-2	fas
正常	-	9.517±0.203	2.468±0.121
HCMV	MOI= 0.25	1.723±0.193* *	8.416±0.147* *
大蒜新素	9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	6.595±0.133* * #	3.199±0.114* * #

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与 HCMV 组比较: # $P < 0.01$

* * $P < 0.01$ vs normal group; # $P < 0.01$ vs HCMV group

染相比, 凋亡细胞有意义增多的时间较晚 (24 h), 且凋亡发生率也明显低于后者, 最大凋亡细胞比率约为后者的 1/3, 是正常细胞的 3.3 倍。结果证实, 无论是低感染量还是高感染量 HCMV 病毒均可诱

导感染细胞凋亡。有学者在 HCMV 视网膜炎时发现视网膜色素上皮细胞发生凋亡^[6], 与实验结果一致。推测 HCMV 感染细胞发生凋亡机制有两方面: 一方面 HCMV 感染细胞后, 受染细胞通过启动凋亡机制以清除感染细胞内病毒作为对 HCMV 感染的一种防御反应, 这在高感染复数感染时最为明显, 在感染早期 (12 h) 细胞凋亡机制就开始启动, 其发生率在感染后 72 h 时陡然显著增高, 与 HCMV 子代病毒增殖高峰期吻合^[9]。感染 72 h 后, 凋亡发生率有所下降可能与感染后 72 h 高峰表达的病毒 IE 蛋白发挥其抑制感染细胞凋亡的机制有关^[11]。另一方面, 体外研究发现, HCMV 的 UL36 和 UL37 基因可分别编码参与凋亡级联反应的 Caspase-8 抑制子—vICA 和位于线粒体的凋亡抑制子—vMIA^[7,8]。这些事实说明, HCMV 为逃避受染细胞启动凋亡所引发的病毒清除机制而采取相应抑制凋亡措施, 以利于病毒的进一步增殖。此外, HCMV 感染量大, 感染时间较长时, 发生凋亡的细胞增多。这时凋亡在 HCMV 引致感染组织细胞损伤, 即在 HCMV 疾病的发病机制中起到不可忽视的作用。

bcl-2 和 fas 基因是细胞凋亡的重要调控基因, 前者抑制细胞凋亡, 后者促进细胞凋亡。原位杂交结果显示, 体外培养的正常人 HELF bcl-2 基因高表达, fas 基因低表达, 使细胞凋亡发生率维持低水平; HCMV 感染 72 h 后, 诱导 bcl-2 基因表达明显降低, fas 基因表达明显增高, 与感染细胞凋亡发生率明显增高相一致, 表明 bcl-2 和 fas 基因参与 HCMV 病毒诱导凋亡机制。

4.2 大蒜新素对正常细胞和感染细胞凋亡的影响: 大蒜新素已被证明在体内外均具有良好的抗 CMV 病毒效应, 特别是用于治疗小鼠 CMV 病毒性肝炎, 可明显减轻肝组织病变和改善肝细胞功能。大蒜新素的这种治疗作用机制并不十分清楚。本实验结果表明大、中、小剂量大蒜新素处理正常 HELF 后分别在 12、36、48 h 出现凋亡细胞增多, 与药物处理的时间和浓度呈正相关, 但保持在较低水平, 这可能是正常细胞对外来刺激的一种反应, 或认为大蒜新素本身可诱导 HELF 发生凋亡。但将大蒜新素处理感染细胞后并未出现所预想的大蒜新素和 HCMV 致细胞凋亡效应叠加的结局, 却见大蒜新素使感染细胞凋亡发生率明显下降, 药物质量浓度与感染细胞凋亡发生率呈负相关, 即大蒜新素质量浓度愈高, 感染细胞凋亡发生率愈低。大蒜新素的这种

反差效应提示, 大蒜新素可抑制 HCMV 感染细胞凋亡而具明显的保护作用。为进一步研究大蒜新素抑制感染细胞凋亡的机制, 本实验还观察了药物对 HCMV 感染细胞凋亡抑制基因 bcl-2 和凋亡促进基因 fas 表达的影响, 发现大蒜新素可显著上调 bcl-2 mRNA 表达和下调 fas mRNA 表达。提示大蒜新素对 bcl-2 和 fas 基因在转录水平的调控可能是其抑制 HCMV 感染细胞凋亡的机制之一。

本研究结果表明, HCMV 是 HELF 细胞凋亡的强诱导剂; 病毒可通过下调凋亡抑制基因 bcl-2 和上调凋亡促进基因 fas 表达而发挥作用; 病毒诱导细胞凋亡效应可能在其致病机制中起作用。大蒜新素虽然本身可诱导细胞凋亡, 但却能明显抑制 HCMV 感染诱导的细胞凋亡, 其机制与药物干扰病毒影响凋亡调控基因 bcl-2 和 fas 表达这一作用环节有关; 大蒜新素抗 HCMV 致凋亡作用可能是其减轻病毒致组织病变和功能异常的机制之一。

References:

- [1] Roulston A, Marcellus R C, Branton P E. Viruses and apoptosis [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1999, 53: 577-628.
- [2] Chiou S H, Liu J H, Hsu W M, et al. Up-regulation of fas ligand expression by human cytomegalovirus immediate-early gene product 2: a novel mechanism in cytomegalovirus-induced apoptosis in human retina [J]. *J Immunol*, 2001, 167(7): 4098-4103.
- [3] Luleci G, Sakizli M, Gunalp A. Selective chromosomal damage by human cytomegalovirus [J]. *Acta Virol*, 1980, 24 (5): 341-345.
- [4] Muganda P, Mendoza O, Hernandez J, et al. Human cytomegalovirus elevates levels of the cellular protein p53 in infected fibroblast [J]. *J Virol*, 1994, 68(12): 8028-8034.
- [5] Castillo J P, Yurochko A D, Kowalik T F. Role of human cytomegalovirus immediate-early proteins in cell growth control [J]. *J Virol*, 2000, 74(17): 8028-8037.
- [6] Buggage R R, Chan C C, Matteson D M, et al. Apoptosis in cytomegalovirus retinitis associated AIDS [J]. *Curr Eye Res*, 2000, 21(3): 721-729.
- [7] Goldmacher V S, Bartle L M, Skaletskaya A, et al. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(22): 12536-12541.
- [8] Skaletskaya A, Bartle M, Chittenden T, et al. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses Caspase-8 activation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(14): 7829-7834.
- [9] Shu S N, Fang F, Dong Y S, et al. An experimental study on the effect of allitridin on inhibiting the expression of HCMV immediate-early antigens *in vitro* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(10): 967-970.
- [10] Liu Z F, Fang F, Dong Y S, et al. Experimental study on phylactic and therapeutic ability of allitridin to murine cytomegalovirus hepatitis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(6): 529-532.
- [11] Zhu H, Shen Y, Shen K T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis [J]. *J Virol*, 1995, 69(12): 7960-7970.