

# 类猪圆环病毒 2 型因子 P1 和 P2 诱导 PK-15 细胞凋亡的研究

温立斌<sup>1</sup>, 何孔旺<sup>1</sup>, 杨汉春<sup>2</sup>, 王玉然<sup>3</sup>, 李广东<sup>4</sup>, 惠孝鑫<sup>5</sup>

(1. 江苏省农业科学院 兽医研究所, 江苏 南京 210014; 2. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094;  
3. 河北省动物卫生监督所, 河北 石家庄 050081; 4. 河北省畜牧站, 河北 石家庄 050000; 5. 河北工程大学, 河北 邯郸 056038)

**摘要:** 为了研究类猪圆环病毒 2 型因子 P1 和 P2 体外诱导的细胞凋亡作用, 将 P1 和 P2 分子克隆分别转染 PK-15 细胞。结果表明, 用透射电镜可以观察到 P1 和 P2 诱导 PK-15 细胞出现凋亡的典型形态学变化。

**关键词:** 猪圆环病毒 2 型; 类猪圆环病毒 2 型因子; 细胞凋亡

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)06-0084-03

## Apoptosis in PK-15 Cells and Immune Organs of Pigs Induced by Porcine Circovirus Type 2-like Agents P1 and P2

WEN Li-bin<sup>1</sup>, HE Kong-wang<sup>1</sup>, YANG Han-chun<sup>2</sup>, WANG Yu-ran<sup>3</sup>,  
LI Guang-dong<sup>4</sup>, HUI Xiao-xin<sup>5</sup>

(1. Veterinary Research Institute, Jiangsu Academy of Agriculture Science, Nanjing 210014, China;  
2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;  
3. Animal Health Supervision Institute of Hebei Province, Shijiazhuang 050081, China;  
4. Animal Husbandry Station of Hebei Province, Shijiazhuang 050000, China;  
5. Hebei University of Engineering, Handan 056038, China)

**Abstract:** In this study, the apoptosis of PK-15 cells and immune organs of pigs induced by molecular clones of porcine circovirus type 2-like agents P1 and P2 was reported. The results showed that PK-15 cells transfected with the molecular clones of P1 and P2 presented the morphological features of apoptosis cells under electron microscope.

**Key words:** Porcine circovirus type 2; Porcine circovirus type 2 like virus; Apoptosis

猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus type 2, PCV2)是引起猪圆环病毒病的主要病原, 包括猪断奶后多系统衰竭综合征(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)和其他相关疾病, 如猪皮炎与肾病综合征、后期流产等。其中, PMWS 是 PCV2 引起的最常见的疾病, 主要发生在 5~12 周龄的仔猪, 临床表现为渐进性消瘦或生长迟缓、腹股沟淋巴结肿大、贫血、呼吸困难和腹泻等<sup>[1-4]</sup>。此外, PCV2 感染可造成机体免疫功能抑制, 从而导致继发感染和免疫失败发生<sup>[5]</sup>。目前, 猪圆环病毒病已成为危害我国养猪生产的重要免疫抑制性疫病之一<sup>[6]</sup>。PCV2 导致机体免疫系统受到抑制的机理仍不十分清楚,

PMWS 特征性的病理变化是淋巴组织中淋巴细胞缺失和组织细胞浸润<sup>[7, 8]</sup>, 关于是否为细胞凋亡引起的上述现象, 研究者的结论也各异, 但研究都表明 PCV2 可导致淋巴细胞凋亡<sup>[9-12]</sup>。P1 和 P2 是我们首次在诊断 PCV2 过程中得到的 2 个类 PCV2 因子, 它们与 PCV2 相似, 也具有环状 DNA 基因组, 且具有与 PCV2 高度同源的序列, 基因组全长分别为 648, 993 个核苷酸, 是目前已知的拥有较小基因组的 DNA 因子。为了进一步研究 P1 和 P2 的生物学特性, 我们构建了它们的分子克隆, 并证实了它们在体外具有感染性<sup>[13-15]</sup>, 那么, P1 和 P2 能否与 PCV2 相似, 引起细胞凋亡并造成免疫抑制? 因此, 研究 P1

和 P2 感染与细胞凋亡的关系, 将有助于认识 P1 和 P2 感染的方式、发展及转归, 为进一步阐明 P1 和 P2 的致病机理和防治提供理论依据。本研究首先从体外着手, 探讨 P1 与 P2 是否会导致体外细胞的凋亡, 为进一步研究它们在体内的诱导活性提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 分子克隆和细胞 P1 和 P2 的双拷贝串联分子克隆, 由本实验室构建、保存; 无 PCV 污染的 PK-15 细胞由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养基、小牛血清为 GIBCO 公司产品; 转染试剂盒 Lipofectamine™ 2000 为 Invitrogen 公司产品; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

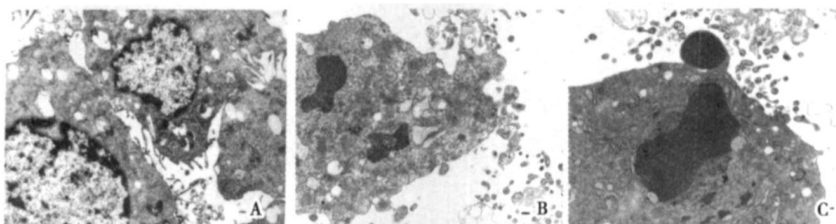
1.2.1 PK-15 细胞的转染 参照试剂盒说明进行: 将 PK-15 细胞用 RPMI 1640 生长液培养到旺盛生长状态, 并传代入 24 孔细胞培养板, 使细胞密度在 1 d 后能达到 90%~95% 的细胞融合; 更换无抗生素的生长培养液; 用 50  $\mu$ L 无血清的 OPTI-MEM I Reduced Serum Medium 稀释 0.8  $\mu$ g 待转染质粒 DNA (包括构建的分子克隆和对照 pSK 空载体) 轻轻混匀, 此外设不转染质粒的细胞作为对照; 使用前轻轻混匀

Lipofectamine™ 2000 脂质体, 取 2  $\mu$ L Lipofectamine™ 2000 脂质体用 OPTI-MEM I Reduced Serum Medium 稀释至 50  $\mu$ L, 轻轻吹打混匀, 室温孵育 5 min; 将稀释的 Lipofectamine™ 2000 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 DNA-脂质体复合物加到 24 孔细胞板中, 每孔加 100  $\mu$ L; 将细胞板轻轻晃动混匀, 置 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 培养 5 h, 再更换 RPMI 1640 生长液继续培养至一定时间。

1.2.2 透射电镜的观察 用橡皮刮子刮下转染质粒 48 h 和 72 h 后的贴壁细胞和对照细胞, 1 000~2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。按常规方法进行双固定、梯度乙醇脱水、浸透和环氧树脂包埋, 制备超薄切片, 进行醋酸铀-枸橼酸铅双染色, JEM-1200EX 透射电子显微镜观察并拍照。

## 2 结果与分析

电镜检测类 PCV2 因子 P1 和 P2 在转染 PK-15 细胞后 48 h 和 72 h 都能观察到不同凋亡时期典型的凋亡细胞。具体表现为凋亡细胞的细胞器明显减少, 染色质浓缩, 向核膜边缘集中 (边集), 固缩, 细胞浆中有大量空泡存在, 细胞膜包裹破裂的细胞核形成凋亡小体 (图 1)。而对照细胞及转染空载体的细胞则形态完整, 细胞器数目正常, 核物质分布均匀。



A. 显示染色质边集; B. 显示染色质浓缩和胞浆大量空泡; C. 显示凋亡小体 (标尺为 200 nm)。

A. Showing chromatin margination; B. Showing chromatin condensation and many cytoplasmic vacuoles; C. Showing a apoptotic body. (bar= 200 nm).

图 1 PK-15 细胞转染 P1 和 P2 分子克隆后形态学变化

Fig. 1 Electron microscopy showing morphological changes of PK-15 cells transfected with molecular clones of P1 and P2

## 3 讨论

细胞死亡的方式有细胞坏死与细胞凋亡 2 种, Kerr 等<sup>[16]</sup> 根据细胞发生了与坏死完全不一样的死亡过程而提出了细胞凋亡 (Apoptosis) 的概念。细胞凋亡是细胞主动死亡的过程, 具有特征的形态和生化改变, 是由基因控制的个别细胞发生的自主有序的细胞生理性死亡。自 Eze 等<sup>[17]</sup> 首次报道病毒能够诱导细胞凋亡以来, 陆续发现很多病毒都能够诱导细胞凋亡, 从而认识到病毒及基因产物诱导细胞凋亡是病毒感染过程中的普遍现象。近年来, 病毒感染与宿主细胞凋亡相互关系的研究形成了新的医学研究热点, 这一方面是因为其有助于阐明细胞凋

亡的分子机制, 另一方面将有助于了解病毒与宿主细胞的相互作用, 以及病毒逃避免疫监视并形成持续性感染或对机体造成损坏的分子机制。

由于检测技术的限制, 20 世纪 80 年代前, 有关细胞凋亡的研究一直未能很好的开展起来。随着细胞生物学、分子生物学等科学理论的发展, 细胞凋亡的检测技术也有了很大的发展。目前, 检测细胞凋亡的方法主要有透射电镜技术、TUNEL 法和流式细胞术等。几种检测技术各有优缺点, TUNEL 法具有早期、敏感、快速、可比较特异地原位显示凋亡细胞等优点, 缺点是结果判断受主观因素的影响较大。流式细胞术优点在于检测细胞凋亡敏感性较高, 定量不受主观因素的影响, 但需要特殊的设备, 而且不

能用于组织切片,样品处理不当也会影响结果的准确性。因此,在研究细胞凋亡时,需考虑实验室条件、样本来源和研究目的来选择检测方法。由于细胞超微结构的变化是凋亡细胞的重要形态学特征,因此透射电镜是细胞凋亡定性检测最可靠的方法。本研究我们采用透射电镜技术对 P1 和 P2 分子克隆在体外诱导 PK-15 细胞凋亡的能力进行了检测。

结果表明, P1 和 P2 在体外能够诱导 PK-15 细胞发生凋亡, PK-15 细胞来源于猪肾细胞,因此,推测 P1 与 P2 可能导致猪体内细胞凋亡,并可能是病毒致病机制之一。当然,由于细胞凋亡的机制十分复杂,既有宿主方面的原因,又有病毒方面的原因。因此, P1 和 P2 能否诱导猪体内细胞发生凋亡,并进而是否会导致猪发病,以及细胞凋亡的分子机制,还有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Allan G, Meehan B, Todd D, *et al.* Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndrome[J]. *Vet Rec*, 1998, 142(17): 467–468.
- [2] Ellis J, Hassard L, Clark E, *et al.* Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome[J]. *Can Vet J*, 1998, 39(1): 44–51.
- [3] West K H, Bystrom J M, Wojnarowicz C, *et al.* Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2[J]. *J Vet Diagn Invest*, 1999, 11: 530–532.
- [4] Rosell C, Segalé s, Ramos-Vara J A, *et al.* Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome[J]. *Vet Rec*, 2000, 146(2): 40–43.
- [5] Opriessnig T, McKeown N E, Harmon K L, *et al.* Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine[J]. *Chin Vaccine Immunol*, 2006, 13(8): 923–929.
- [6] 杨汉春. 猪免疫抑制性疾病的流行特点与控制对策[J]. *中国畜牧兽医*, 2004, 31(5): 41–43.
- [7] Rosell C, Segalé s J, Planá-Durá n J, *et al.* Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs[J]. *J Comp Pathol*, 1999, 120(1): 59–78.
- [8] Bolin S R, Stoffregen W C, Nayar G P, *et al.* Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2001, 13(3): 185–194.
- [9] Shibahara T, Satok, Ishikawa Y, *et al.* Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome[J]. *J Vet Med Sci*, 2000, 62(11): 1125–1131.
- [10] Kiupel M, Stevenson G W, Choi J, *et al.* Viral replication and lesions in BALB/c mice experimentally inoculated with porcine circovirus isolated from a pig with postweaning multisystemic wasting disease[J]. *Vet Pathol*, 2001, 38(1): 74–82.
- [11] Resendes A R, Majo N, Segalé s J, *et al.* Apoptosis in lymphoid organs of pigs naturally infected by porcine circovirus type 2[J]. *J Gen Virol*, 2004, 85: 2837–2844.
- [12] Mandrioli L, Sarli G, Panarese S, *et al.* Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 97: 25–37.
- [13] 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.
- [14] Wen L B, He K W, Yang H C, *et al.* Complete nucleotide sequence of a novel porcine circovirus-like agent and its infectivity in vitro[J]. *SCI CHINA SER C*, 2008, 51: 1–6.
- [15] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春. P1 因子分子克隆的体外感染性分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39: 941–944.
- [16] Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics[J]. *Br J Cancer*, 1972, 26(4): 239–257.
- [17] Ezoe H, Fatt R B, Mak S. Degradation of intracellular DNA in KB cells infected with cyt mutants of human adenovirus type 12[J]. *J Virol*, 1981, 40(1): 20–27.