

人类巨细胞病毒感染树鼩原代真皮成纤维细胞诱导凋亡特性

焦玲帅^① 陈一波^① 杨铭^① 董书维^① 代解杰^{②*} 夏雪山^{①*}

^① 昆明理工大学生命科学与技术学院 昆明 650500;

^② 中国医学科学院昆明医学生物学研究所树鼩种质资源中心 昆明 650118

摘要: 人类巨细胞病毒 (HCMV) 流行广泛, 危害严重, 由于其严格的物种特异性限制, 动物模型缺乏, 严重阻碍了对其致病机制的研究及药物、疫苗的研发。本研究对树鼩 (*Tupaia belangeri*) 来源的原代真皮成纤维细胞感染 HCMV 后的细胞死亡现象进行了初步探索。首先, 观察了感染后细胞病变和死亡情况, 使用细胞增殖检测试剂盒测定了细胞活力; 其次, 对凋亡相关因子 *bax*、*bcl-2* 和未折叠蛋白反应相关因子 *chop*、*atf4*、*xbp1s* 转录水平的差异进行了逆转录荧光定量 PCR 检测与分析; 然后利用免疫蛋白印迹技术检测并分析了主要病毒蛋白 IE1、UL44 和凋亡相关因子 Bax、Caspase-9、Caspase-3、PARP 的表达水平; 最后结合膜联蛋白-V 和碘化丙啶双染色法从生物化学角度对细胞死亡类型进行了鉴定。结果显示, 细胞病变和死亡情况随着感染进程逐渐严重, 细胞活力下降明显 ($P < 0.001$)。感染上调 *bax*、*bcl-2*、*chop*、*atf4*、*xbp1s* 转录水平并且使 *bax* 与 *bcl-2* 转录水平呈明显拮抗趋势; 感染同时上调 Bax、Caspase-9、Caspase-3、PARP 蛋白表达和逐级剪切激活; 病毒蛋白 IE1、UL44 可以上调至一个完整的病毒复制周期结束。综上, 本研究指出 HCMV 跨物种感染树鼩原代真皮成纤维细胞可诱导细胞凋亡, 并且与内质网和线粒体密切相关。

关键词: 人类巨细胞病毒; 树鼩原代真皮成纤维细胞; 细胞凋亡

中图分类号: Q952.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2019) 03-404-10

HCMV Can Induce Apoptosis Through Cross-species Infecting the Tree Shrew Primary Dermal Fibroblast

JIAO Ling-Shuai^① CHEN Yi-Bo^① YANG Ming^① DONG Shu-Wei^①
DAI Jie-Jie^{②*} XIA Xue-Shan^{①*}

^① Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500;

^② Germplasm Resource Center of Chinese Tree Shrew, The Institute of Medical Biology,

Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 650118, China

Abstract: Human cytomegalovirus (HCMV) is popularly prevalent and extremely harmful, which has

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. U1702282);

* 通讯作者, E-mail: xueshanxia@kmust.edu.cn, djj@imbcams.com.cn;

第一作者简介 焦玲帅, 男, 硕士研究生; 研究方向: 人类疾病动物模型; E-mail: jiaolingshuai@163.com。

收稿日期: 2018-12-03, 修回日期: 2019-03-15 DOI: 10.13859/j.cjz.201903010

seriously hindered the researches on its pathogenic mechanism, drugs and vaccines, owing to restriction of species specificity and lacking animal models. In this study, we have explored the death of primary dermal fibroblasts (TSDF) isolated from the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri*) that infected with HCMV-Towne. The cytopathic effect and cellular death after infection were observed, and cell viability was measured using CCK (cell counting kit). The differences in transcriptional levels of apoptosis-related factor genes *bax*, *bcl-2*, and an unfolded protein response (UPR) relevant factor genes *chop*, *atf4*, *xbp1s* were detected using qRT-PCR. Western blot was also used to detect principal viral proteins IE1 and UL44 as well as apoptosis-related factors including Bax, Caspase-9, Caspase-3, and PARP. Additionally, apoptosis was detected by AV-PI double staining. The results showed that the cytopathic effect and cellular death gradually worsen as the infection progressed (Fig.1 a-e), accompanying with significant decrease of cell viability (Fig. 2c, $P < 0.001$). Moreover infection caused up-regulation of the transcription levels of *bax*, *bcl-2*, *chop*, *atf4*, *xbp1s*, and the *bax* and *bcl-2* transcription levels showed a significant antagonistic trend (Fig. 3). Meanwhile, protein expression and progressive activation of Bax, Caspase-9, Caspase-3, and PARP were also up-regulated. Nevertheless viral proteins IE1 and UL44 were up-regulated to the end of a complete virus replication cycle (Fig. 4). In summary, our study indicates that HCMV can induce apoptosis through cross-species infecting the tree shrew primary dermal fibroblasts, which is closely related to endoplasmic reticulum and mitochondria.

Key words: Human cytomegalovirus; Tree shrew primary dermal fibroblast; Apoptosis

人类巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 感染在全球范围内广泛发生, 发达国家成人血清阳性率为 36% ~ 77%, 发展中国家高达 95%, 不发达国家如非洲阳性率高达 100% (Adland et al. 2015)。该病毒以慢性或潜伏感染的方式持续存在于被感染者体内, 通过体液接触而传播。HCMV 是先天性脑发育异常的重要病因, 是免疫功能不全病人重要的机会性感染病原体, 婴幼儿感染后可引起严重的神经性耳聋、失明和反应迟钝等 (Cheeran et al. 2009)。HCMV 具有严格的物种特异性, 可能受到细胞凋亡、细胞嗜性和宿主细胞核防御反应等多种因素影响 (Jurak et al. 2006, Tang et al. 2006, Marsh et al. 2015, Burwitz et al. 2016)。除了不能感染 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞等少数细胞外, HCMV 临床株可感染成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、神经胶质细胞、造血干细胞等。而实验株因 *ul128-131* 基因的突变, 失去了对表皮细胞、内皮细胞、多形核粒细胞、树枝状细胞等的感染能力 (Wang et al. 2005)。成纤维细胞广泛用于 HCMV 的体外扩

增和相关研究。目前, 对 HCMV 致病机制、疫苗和药物研发主要借助于除人类以外物种的巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 感染相应的动物, 如黑猩猩 (*Pan troglodytes*, Perot et al. 1992, Bennett et al. 2016)、恒河猴 (*Mancaca mulatta*, Burwitz et al. 2016)、大鼠 (*Rattus norvegicus*, Powers et al. 2008)、小鼠 (*Mus musculus*, Crawford et al. 2015)、豚鼠 (*Cavia porcellus*, Schleiss. 2002) 等进行比较分析, 至今尚无合适的 HCMV 动物模型。

本研究所用的树鼩原代真皮成纤维细胞来源于我国西南地区小型实验动物树鼩 (*Tupaia belangeri*)。基因组分析显示, 其与灵长类亲缘关系接近 (Fan et al. 2013)。单纯疱疹病毒 (Li et al. 2015)、流感病毒 (Yang et al. 2013) 等多种人类病毒都有利用其进行相关研究。鉴于原代细胞能在一定程度上反映其在体内的状态, 同时考虑到成纤维细胞用于 HCMV 研究的普遍性, 本研究选择树鼩原代真皮成纤维细胞进行 HCMV 的体外感染实验。期间发现随感染时间延长细胞死亡情况愈发严重, 而相关研究中

人的胚肺成纤维细胞 (human embryonic lung fibroblast, HEL) 在感染 HCMV 早期, 仅会出现少数细胞死亡, 而后病毒编码的 vMIA、vICA 等作用于凋亡通路, 使凋亡现象得以缓解, 从而利用宿主进行有效的复制和传播 (Skaletskaya et al. 2001, Karbowski et al. 2006)。已有研究表明, 巨细胞病毒感染引起凋亡的同时, 可以激活未折叠蛋白反应 (unfolded protein reaction, UPR) 通路中肌醇需求酶 1 (inositol-requiring enzyme-1, IRE1) 和哺乳动物 RNA 依赖性蛋白激酶样内质网激酶 (the PKR-like ER kinase, PERK) 分别介导的两条途径 (Lee et al. 2003, Isler et al. 2005)。线粒体内源凋亡途径的主要调节剂, B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白家族成员中的 Bcl-2 和 Bax 也参与其中 (Brune et al. 2017), 并且 Bcl-2 具有与 Bax 结合的能力, 从而拮抗其执行促凋亡功能。因此本研究以细胞死亡为线索, 鉴定死亡类型的同时, 对细胞死亡原因进行了初步探索。

在体外细胞水平进行病毒感染与致病性研究, 是活体动物模型建立和阐明病毒跨物种传播机制的有效途径。为探索 HCMV 感染所致的细胞死亡特性, 以及病毒跨物种传播机制, 本研究使用人类巨细胞病毒 Towne 株 (human cytomegalovirus-Towne, HCMV-Towne) 感染体外培养的树鼯原代真皮成纤维细胞, 通过观察感染后的细胞病变、细胞活力测定、转录水平和蛋白水平功能因子检测与分析、膜联蛋白-V 和碘化丙啶 (annexin-V and propidium iodide, AV-PI) 双染色法鉴定等, 最终确定树鼯原代真皮成纤维细胞的病变死亡类型为细胞凋亡, 并且与内质网和线粒体密切相关。

1 材料与方法

1.1 树鼯原代真皮成纤维细胞的分离培养

树鼯原代真皮成纤维细胞由本实验室分离纯化并鉴定。首先将无菌处理的 2 月龄雄性树鼯大腿内侧皮肤剪碎至 1 mm³ 大小, 采用 0.1%

胶原酶 I 消化法于 37 °C 分批消化两个 20 min。接着将消化液过 100 目滤网后 1 000 r/min 离心 10 min。最后用含 10%FBS、1%青链霉素溶液的 DMEM-F12 完全培养基重悬细胞, 接种于 T25 细胞培养瓶, 置于 37 °C 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 4 d。然后换含 2%低血清生长因子 (Gibco 公司) 的 DMEM-F12 完全培养基继续培养, 由于所获取的树鼯原代真皮成纤维细胞中混有少量皮肤来源的上皮样细胞, 所以待细胞长至 70%时采用胰酶差异消化法进行纯化。同时使用波形蛋白抗体进行成纤维特性及纯度鉴定 (结果未展示)。本研究所有实验方案均经昆明理工大学伦理委员会审核批准。

1.2 细胞感染及活力测定

HCMV-Towne 由中国科学院武汉病毒研究所罗敏华研究员惠赠。感染实验中树鼯原代真皮成纤维细胞按 10⁶/皿铺于直径 90 mm 细胞培养皿, 以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 1 接种 HCMV-Towne, 设置接种后 12、24、48、60、72、96 h, 共 6 个感染组和对应的模拟感染组 (Mock 组), 期间观察细胞病变情况, 收取细胞样本并记录 (本部分实验接种病毒后未更换培养液)。

通过 CCK 法利用 CCK 试剂盒 (北京全式金生物公司) 测定感染后细胞活力。在不同密度树鼯原代真皮成纤维细胞与对应 450 nm 处吸光值 (A_{450}) 间建立线性关系的基础上, 对不同感染时间点感染组培养上清和 Mock 组培养上清 450 nm 处吸光值 A_{450} 结果进行细胞数换算, 从而得到感染组相比于 Mock 组细胞活力百分比结果。

1.3 凋亡相关因子转录水平差异分析

对不同感染时间点细胞样本提取总 RNA 后, 使用 HiScript® II 一步法逆转录荧光定量 PCR SYBR Green 试剂盒 (Vazyme 公司) 进行定量, 然后通过 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 的方法计算各感染组相对模拟感染组间相关细胞因子转录水平上下调情况。所用引物见表 1。

表 1 凋亡相关基因逆转录荧光定量 PCR 引物

目的基因 Target	引物序列 Primer sequence (5'-3')
<i>TS-β-actin</i>	F: CCAGGGCTTACCTGTACACTG
	R: CATTTTTAGGTGTACTTTTATTG
<i>TS-bax</i>	F: CCGCCTCACTCACCAT
	R: CATCCACCCCCCAAT
<i>TS-bcl-2</i>	F: AGAAAGAGCAATAGTGGAATAGG
	R: CAGTGATGAATGTCTCAAGAAAAG
<i>TS-xbp1s</i>	F: CTCAGTGAAGGAGGAACC
	R: CAGCAGGCAGGAAGATGG
<i>TS-chop</i>	F: CAGGGAGGTAGAGGCAA
	R: GGAAAGGCAGGTAGTGG
<i>TS-atf4</i>	F: CTCGGATAATGACAGTGCCA
	R: GGTCTATGGTTTTGGGCGG

反应条件: 第一步逆转录 50 °C 15 min; 第二步预变性 95 °C 5 min; 第三步循环反应, 95 °C 10 s, 60 °C 34 s, 共计 40 个循环。溶解曲线 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。

1.4 免疫蛋白印记检测蛋白表达

使用 RIPA 裂解处理 1.3 中所述的感染组及 Mock 组细胞样本。通过 BCA 法建立标准曲线, 换算得到各待测蛋白样本的浓度值。确定上样量后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 70 V 恒压浓缩 30 min, 110 V 恒压分离 1 h。采用湿转法将电泳结束的 PAGE 胶按 160 mA 恒流转 90 min 至 0.4 μm 的 PVDF 膜上, 其中用于标记 Caspase-3 和 Bax 的 PAGE 胶, 按 160 mA 恒流转 50 min 至 0.2 μm 的 PVDF 膜上。结束后将膜置于含 5% BSA 的封闭液中室温摇动封闭 1 h。根据表 2 对一抗进行稀释, 然后 4 °C 过夜孵育处理。次日使用 TBST 洗膜, 二抗 (表 2) 按 1 : 5 000 稀释后于摇床上室温孵育 1 h。TBST 再次漂洗后, 使用 BIO-RED 凝胶成像系统检测结果。

1.5 膜联蛋白-V 和碘化丙啶双染法鉴定细胞凋亡

使用无 EDTA 的胰酶短暂消化处理接种后 24 h 和 48 h 的细胞样本, 经过 PBS 洗涤后,

表 2 免疫印迹实验所用抗体

名称 Title	来源 Source	货号 Lot No.	稀释比例 Dilution Ratio	供应商 Supplier
IE1 (pp72)	Mouse IgG2a	MA1-7596	1 : 1 000	Thermo Fisher
UL44 (ICP36)	Mouse IgG	ab53482	1 : 1 000	Abcam
Bax	Rabbit	#2772	1 : 1 000	CST
Caspase-9	Mouse IgG1	#9508	1 : 1 000	CST
Caspase-3	Rabbit	#9662	1 : 1 000	CST
PARP	Rabbit IgG	#9532	1 : 1 000	CST
β-actin	Mouse IgG1	ab6276	1 : 5 000	Abcam
Rabbit IgG	HRP-IgG (sheep)	ab6721	1 : 5 000	Abcam
Mouse IgG	HRP-IgG (sheep)	ab97023	1 : 5 000	Abcam

按 Thermo Fisher 公司的膜联蛋白-V (annexin V, AV) 和碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 双染色试剂盒标准流程操作, 将避光处理好的细胞悬液制片后, 置于倒置荧光显微镜下观察染色情况。

1.6 数据统计分析

采用 GraphPad Prism 5 (GraphPad 软件) 进行 one way ANOVA 统计学分析。所有数据以平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示, 当 $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果

2.1 树鼯原代真皮成纤维细胞感染 HCMV 后病变观察及活力测定

通过比较不同感染时间点树鼯原代真皮成纤维细胞的病变死亡情况, 发现相比于 Mock 组, 感染组接种后 24 ~ 96 h 细胞膨大变圆及死亡漂浮程度愈发严重 (图 1)。接种后 96 h 活细胞数明显少于 Mock 组及其他感染组, 且细胞活力从接种后 24 h 的 90.25% 呈持续下调趋势, 至接种后 96 h 降为 40.4% (图 2, $P < 0.001$)。树鼯原代真皮成纤维细胞在感染 HCMV 后很可能随着病毒复制活动的进行, 以一种不可逆的方式触发了细胞自身的程序性死亡。

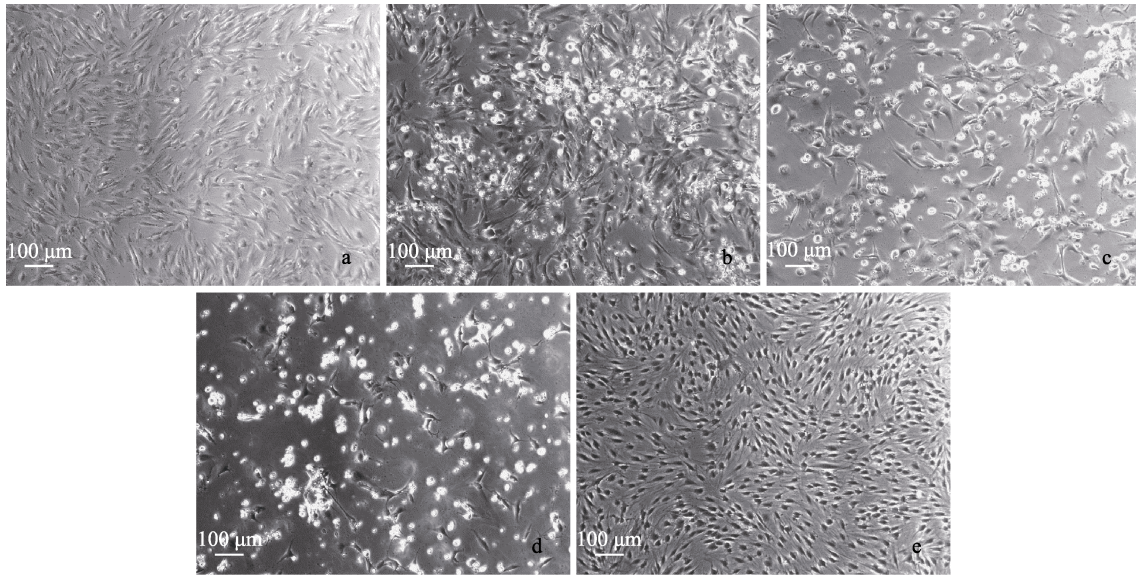


图 1 不同感染时间点树鼯原代真皮成纤维细胞病变死亡情况 (× 100)

Fig. 1 Cytopathic effect and cellular death of tree shrew primary dermal fibroblast at different time points of HCMV infection (× 100)

a. 接种后 24 h; b. 接种后 48 h; c. 接种后 72 h; d. 接种后 96 h; e. 模拟感染 96 h。

a. After inoculation 24 h; b. After inoculation 48 h; c. After inoculation 72 h; d. After inoculation 96 h; e. Mock-96 h.

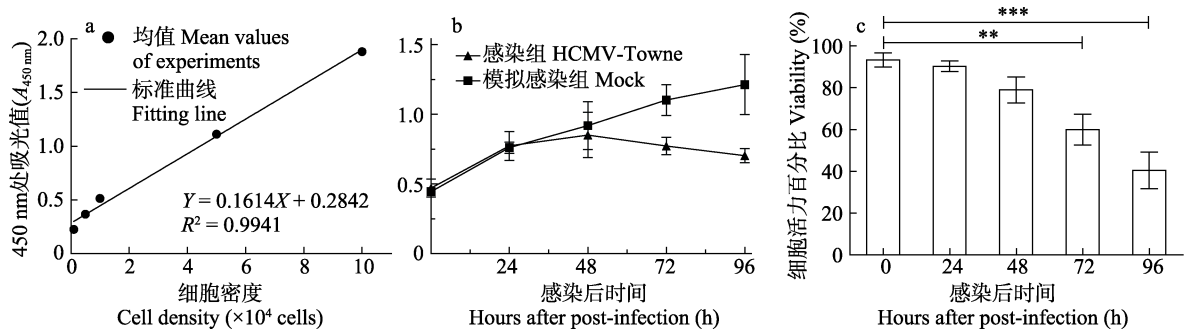


图 2 不同感染时间点树鼯原代真皮成纤维细胞活力测定结果

Fig. 2 Determination of tree shrew primary dermal fibroblast viability at different time points after infection

a. 树鼯原代真皮成纤维细胞活力标准曲线; b. 树鼯原代真皮成纤维细胞各感染时间点 450 nm 吸光值 A_{450} 与感染时间线性关系; c. 树鼯原代真皮成纤维细胞感染时间与细胞活力关系, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$ 。

a. Tree shrew primary dermal fibroblast viability standard curve; b. Linear relationship between A_{450} nm absorbance value and infection time at each infection time point of tree shrew primary dermal fibroblast; c. Relationship between tree shrew primary dermal fibroblast infection time and cell viability, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$.

2.2 树鼯原代真皮成纤维细胞凋亡相关因子转录水平差异分析

通过综合分析逆转录荧光定量 PCR (qRT-PCR) 定量结果, 发现随着感染时间延长, 相

比于 Mock 组, 感染组在接种后 12 ~ 96 h 过程中 *bcl-2* 和 *bax* 的转录水平均呈现明显上调趋势, 且在接种后 24 h 开始 *bax* 转录水平逐渐高于 *bcl-2*。其中感染组 *bax* 在接种后 60 h 相对

Mock 组 mRNA 转录水平上调 39.98 倍, 与同时间点 *bcl-2* 上调的 4.93 倍相比处于明显的抑制优势(图 3a)。感染组未折叠蛋白反应(UPR)相关细胞因子 *xbp1s* 转录水平上调始于接种后 12 h, 但于接种后 48 h 出现减弱, 在接种后 60 h 相对 *bax* 又出现高水平上调随后减弱, 而 *atf4* 与 *chop* 同样上调后处于较低的稳定水平(图 3b)。

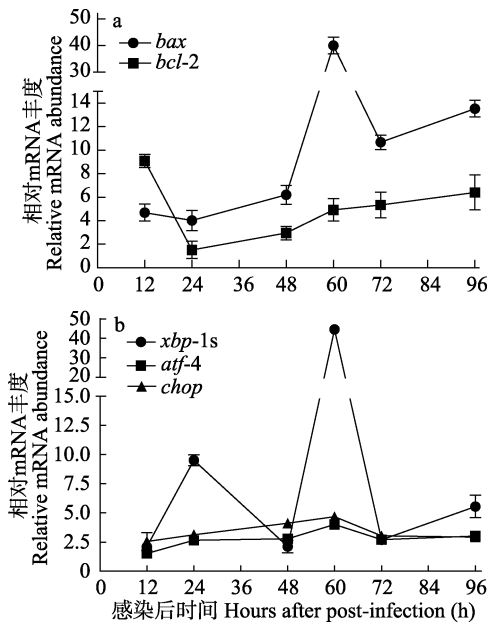


图3 不同感染时间点细胞凋亡相关因子转录水平差异表达

Fig. 3 Differential expression of transcriptional levels of apoptosis related factors at different time points after infection

a. 线粒体凋亡途径相关细胞因子转录水平差异表达情况; b. 未折叠蛋白反应相关因子转录水平差异表达情况。

a. Differential expression of mitochondrial apoptosis pathway-related cytokine transcription levels; b. Differential expression of UPR-associated cytokine transcription levels.

2.3 树鼯原代真皮成纤维细胞感染后凋亡相关典型因子及病毒蛋白的免疫印迹检测

细胞程序性死亡的调控网络复杂而有序。本研究中线粒体凋亡途径相关细胞因子 Bax 在接种后 12~96 h 呈表达上调趋势, 与其转录水平结果相符。Caspase-9 由于上游因子 Bax 作用

从接种后 24 h 开始, 由 47 ku 被剪切激活成 37 或 35 ku 的蛋白片段, 进而剪切激活功能的执行者 Caspase-3, Caspase-3 从接种后 48 h 开始由 35 ku 被剪切激活成 19 ku 和 17 ku 的活化态, 然后执行其阻碍 PARP 修复受损 DNA 的功能。PARP 由 116 ku 被剪切成 89 ku, 从而不能执行其 DNA 修复的功能。病毒立即早期蛋白 IE1 和复制相关蛋白 UL44 在接种后 12~72 h 呈稳定上调趋势, 接种后 96 h 蛋白表达量相比 72 h 略有减弱(图 4)。

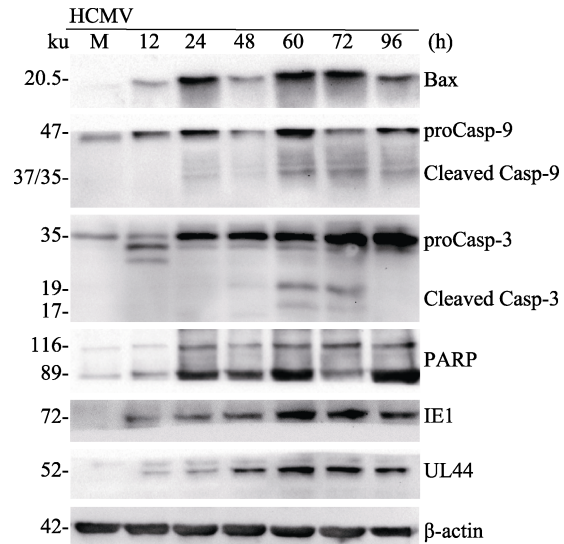


图4 不同感染时间点凋亡相关因子及病毒蛋白表达情况

Fig. 4 Apoptosis-related factors and viral protein expression at different time points after infection

2.4 膜联蛋白-V 和碘化丙啶(AV-PI) 双染法鉴定树鼯原代真皮成纤维细胞凋亡

本研究利用膜联蛋白-V 和碘化丙啶双染法结合倒置荧光显微镜将处于不同凋亡时期的细胞标记并区分。图 5a~c 为接种后 24 h AV⁺、PI⁺的凋亡早期染色结果。图 5d~f 和 g~i 均为接种后 48 h AV⁺、PI⁺的凋亡晚期染色结果, 不同的是图 5g~i 中的染色结果, 同时可以观察到携带有核酸且由细胞膜包裹的泡状结构。接种后 24 h 为树鼯原代真皮成纤维细胞凋亡早期状态转变的关键点。

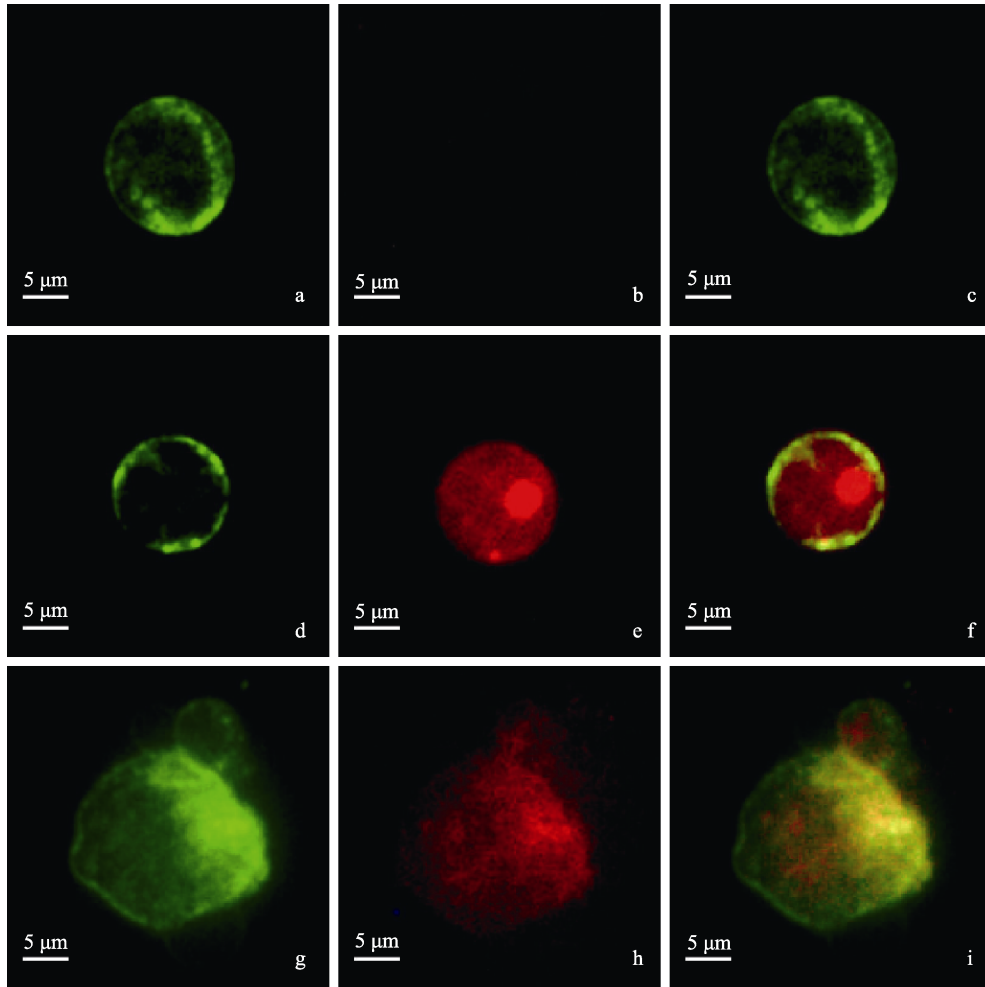


图 5 膜联蛋白-V 和碘化丙啶双染色法鉴定树鼯原代真皮成纤维细胞凋亡 ($\times 400$)

Fig. 5 Tree shrew primary dermal fibroblast apoptosis identification results by annexin-propidium iodide (AV-PI) staining ($\times 400$)

a. 接种后 24 h 的 AV⁺染色结果; b. 接种后 24 h 的 PI⁻染色结果; c. 接种后 24 h 的 AV⁺和 PI⁻染色结果叠加; d. 接种后 48 h 的 AV⁺染色结果; e. 接种后 48 h 的 PI⁺染色结果; f. 接种后 48 h 的 AV⁺和 PI⁺染色结果叠加; g~i 与 d~f 同为接种后 48 h 双染结果, 但是 g~i 具有由细胞膜包裹着核酸的泡状结构。

a. AV⁺ staining results after 24 h inoculation; b. PI⁻ staining results after 24 h inoculation; c. AV⁺ and PI⁻ Merged staining results after 24 h inoculation; d. AV⁺ staining results after 48 h inoculation; e. PI⁺ staining results after 48 h inoculation; f. AV⁺ and PI⁺ Merged staining results after 48 h inoculation, g - i and d - f are the same double staining results after inoculation 48 h.

AV⁺. 膜联蛋白 V 阳性染色结果; PI⁺. 碘化丙啶阳性染色结果; PI⁻. 碘化丙啶阴性染色结果。

AV⁺. Annexin V positive staining results; PI⁺. Propidium iodide positive staining results; PI⁻. Propidium iodide negative staining results.

3 讨论

通过分析现有的巨细胞病毒与相应动物模型研究发现, 黑猩猩巨细胞病毒与 HCMV 最为

接近, 可导致与人类似的症状 (Bennett et al. 2016), 但黑猩猩模型受到动物伦理的严格限制。恒河猴巨细胞病毒 (rhesus CMV, RhCMV) 的恒河猴模型主要使用驯养恒河猴, 其饲养成

本高且普遍携带 RhCMV, 不易获得血清反应阴性的动物 (Powers et al. 2008)。小鼠和大鼠模型也应用广泛, 但小鼠巨细胞病毒 (mouse CMV, MCMV) 不能突破胎盘屏障, 所以不能用于先天感染研究 (Medearis 1964)。先天感染主要依赖于豚鼠巨细胞病毒 (guinea pig CMV, GPCMV) 的研究, 然而豚鼠较长的生育周期和较少的产仔数量使得相关研究进展缓慢 (Schleiss 2002)。近年来有研究使用移植了人类细胞的人源化小鼠 (humanized mice) 进行 HCMV 的体内实验, 但是病毒仅能在人源细胞中复制 (Crawford et al. 2015), 并不能扩散到小鼠的其他组织器官而引发系统性感染。树鼩作为与人类亲缘关系较近的动物 (Fan et al. 2013) 近年来受到广泛的关注。相关研究在发现了树鼩疱疹病毒 (Tupaia herpesvirus, TuHV) 的基础上, 进一步指出 TuHV 的生物学特性与哺乳动物 CMV 相似, 其基因组结构特征及编码蛋白与哺乳动物 CMV 接近, 尤其与灵长类和啮齿类 CMV 最为接近 (Bahr et al. 2001), 而且分离自树鼩恶性淋巴瘤的 TuHV 可感染人类包皮成纤维细胞。人类 I 型单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus I, HSV-1) 感染树鼩眼部的实验中, 急性感染期部分树鼩产生类似人类病毒性脑炎的症状, 在三叉神经发生潜伏感染, 树鼩被认为是研究 HSV-1 感染和中枢神经系统病变的一个重要模型 (Li et al. 2015, 2016)。因此本实验室以树鼩为实验对象, 旨在尝试填补 HCMV 自然动物模型研究领域的空白。

已知巨细胞病毒 (CMV) 跨物种感染失败不是由病毒结合或入胞失败造成的 (Garcia-Ramirez et al. 2001)。物种特异性被认为是病毒与宿主共同进化并彼此适应的结果, 病毒获得了对抗宿主免疫防御的相应机制 (Marsh et al. 2015)。例如, 恒河猴和食蟹猴 (*M. fascicularis*) 同属灵长目猴科猕猴属, 恒河猴巨细胞病毒 (RhCMV) 实验株 68-1 虽然能感染食蟹猴成纤维细胞, 但产毒量有限 (Burwitz et al. 2016)。

为了有效复制和传播, HCMV 感染人的胚肺成纤维细胞后, 可通过多种策略干扰宿主免疫反应, 从而利用宿主高效复制。而 HCMV 感染树鼩原代真皮成纤维细胞后仅有少量子代病毒产生 (结果未展示)。所以树鼩原代真皮成纤维细胞与人的胚肺成纤维细胞感染 HCMV 后产生不同现象, 对研究物种屏障发生机制, 以及动物模型的建立尤为重要。

树鼩原代真皮成纤维细胞支持 HCMV 复制活动进行的同时, 大量细胞死亡的现象不容忽视, 本实验以此为线索, 通过设计由凋亡相关因子 *bax*、*bcl-2*, 未折叠蛋白反应 (UPR) 相关细胞因子 *chop*、*atf4*、*xbp1s* 转录水平差异的 qRT-PCR 检测实验, 首先从核酸水平揭示细胞死亡现象, 其中 *bax* 与 *bcl-2* 在接种 24 h 以前呈拮抗表达上调趋势, 之后 *bax* 处于明显优势地位 (图 3a); *xbp1s* 在接种后 24 和 60 h 出现两次转录上调的高峰 (图 3b); *atf4* 一直处于较弱转录水平。结合最近研究指出的 *atf4* 与病毒的弱水平复制活动相关 (Yu et al. 2013), HCMV 病毒 UL148 蛋白在感染期间可以激活未折叠蛋白反应 (Siddiquey et al. 2018), 我们又设计了蛋白水平实验。HCMV 裂解性复制启动的关键蛋白 IE1 在接种后 12~72 h 表达上调 (图 4), 结合 HCMV 的 DNA 聚合酶辅助因子 (Strang et al. 2012) UL44 的上调, 说明 HCMV 在感染树鼩原代真皮成纤维细胞后开展了持续的复制活动。图 4 中线粒体相关凋亡因子 Bax、Caspase-9、Caspase-3 在接种后 12 h 起始逐级表达上调和剪切激活, 活化的 Caspase-3 进而阻碍 PARP 修复受损 DNA, 结合图 5 中通过 AV-PI 双染法对凋亡的鉴定, 充分说明树鼩原代真皮成纤维细胞可作为 HCMV 的细胞模型, 对 HCMV 严格的物种特异性发生机制展开相关研究。

综上, 本研究充分鉴定了 HCMV 跨物种感染树鼩原代真皮成纤维细胞过程中引发的细胞凋亡现象。树鼩与灵长类动物亲缘关系接近 (Fan et al. 2013), TuHV 的生物学特性、基因

组结构特征及编码蛋白又与灵长类 CMV 具有较高的相似度 (Bahr et al. 2001), 若能充分解读 HCMV 物种特异性发生机制, 成功建立 HCMV 的树鼯模型, 将推动 HCMV 致病机制、抗病毒药物和疫苗等相关领域研究。

参 考 文 献

- Adland E, Klenerman P, Goulder P, et al. 2015. Ongoing burden of disease and mortality from HIV/CMV coinfection in Africa in the antiretroviral therapy era. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1016.
- Bahr U, Darai G. 2001. Analysis and characterization of the complete genome of tupaia (tree shrew) herpesvirus. *Journal of Virology*, 75(10): 4854–4870.
- Bennett A J, Panicker S. 2016. Broader impacts: international implications and integrative ethical consideration of policy decisions about US chimpanzee research. *American Journal of Primatology*, 78(12): 1282–1303.
- Brune W, Andoniou C E. 2017. Die another day Inhibition of cell death pathways by cytomegalovirus. *Viruses*, 9(9): E249.
- Burwitz B J, Malouli D, Bimber B N, et al. 2016. Cross-species rhesus cytomegalovirus infection of cynomolgus macaques. *PLoS Pathogens*, 12(11): e1006014.
- Cheeran M C, Lokensgard J R, Schleiss M R. 2009. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection disease mechanisms and prospects for intervention. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1): 99–126.
- Crawford L B, Streblov D N, Hakki M, et al. 2015. Humanized mouse models of human cytomegalovirus infection. *Current Opinion in Virology*, 13: 86–92.
- Fan Y, Huang Z Y, Cao C C, et al. 2013. Genome of the Chinese tree shrew. *Nature Communications*, 4: 1426.
- Garcia-Ramirez J J, Ruchti F, Huang H, et al. 2001. Dominance of virus over host factors in cross-species activation of human cytomegalovirus early gene expression. *Journal of Virology*, 75(1): 26–35.
- Isler J A, Skalet A H, Alwine J C. 2005. Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *Journal of Virology*, 79(11): 6890–6899.
- Jurak I, Brune W. 2006. Induction of apoptosis limits cytomegalovirus cross-species infection. *The EMBO Journal*, 25(11): 2634–2642.
- Karbowski M, Norris K L, Cleland M M, et al. 2006. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature*, 443(7112): 658–662.
- Lee A H, Iwakoshi N N, Glimcher L H. 2003. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and Cellular Biology*, 23(21): 7448–7459.
- Li L, Li Z, Li X, et al. 2016. Reactivation of HSV-1 following explant of tree shrew brain. *Journal of Neurovirology*, 22(3): 293–306.
- Li L, Li Z, Wang E, et al. 2015. Herpes simplex virus 1 infection of tree shrews differs from that of mice in the severity of acute infection and viral transcription in the peripheral nervous system. *Journal of Virology*, 90(2): 790–804.
- Marsh A K, Ambagala A P, Perciani C T, et al. 2015. Examining the species-specificity of rhesus macaque cytomegalovirus (RhCMV) in cynomolgus macaques. *PLoS One*, 10(3): e0121339.
- Medearis D N Jr. 1964. Mouse cytomegalovirus infection 3 attempts to produce intrauterine infections. *American Journal of Hygiene*, 80: 113–120.
- Perot K, Walker C M, Spaete R R. 1992. Primary chimpanzee skin fibroblast cells are fully permissive for human cytomegalovirus replication. *Journal of General Virology*, 73(12): 3281–3284.
- Powers C, Fruh K. 2008. Rhesus CMV: an emerging animal model for human CMV. *Medical Microbiology and Immunology*, 197(2): 109–115.
- Schleiss M R. 2002. Animal models of congenital cytomegalovirus infection: an overview of progress in the characterization of guinea pig cytomegalovirus (GPCMV). *Journal of Clinical Virology*, 25: S37–S49.
- Siddiquy M N A, Zhang H, Nguyen C C, et al. 2018. The human cytomegalovirus endoplasmic reticulum-resident glycoprotein UL148 activates the unfolded protein response. *Journal of Virology*, 92(20): e00896–18.
- Skaletskaya A, Bartle L M, Chittenden T, et al. 2001. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14): 7829–7834.
- Strang B L, Boulant S, Chang L, et al. 2012. Human cytomegalovirus UL44 concentrates at the periphery of replication compartments, the site of viral DNA synthesis. *Journal of Virology*, 86(4): 2089–2095.
- Tang Q, Maul G G. 2006. Mouse cytomegalovirus crosses the species barrier with help from a few human cytomegalovirus proteins. *Journal of Virology*, 80(15): 7510–7521.
- Wang D, Shenk T. 2005. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50): 18153–18158.

Yang Z F, Zhao J, Zhu Y T, et al. 2013. The tree shrew provides a useful alternative model for the study of influenza H1N1 virus. *Virology Journal*, 10: 111.

Yu Y, Pierciey F J Jr, Maguire T G, et al. 2013. PKR-like endoplasmic reticulum kinase is necessary for lipogenic activation during HCMV infection. *PLoS Pathogens*, 9(4): e1003266.