

水泡性口炎病毒与 Monocyte 及 MoDC 的互作研究

邹胜利¹, 聂作明¹, 吴祥甫¹, 方心葵², 孙 涛²

(1. 浙江理工大学生物化学研究所, 杭州 310018; 2. 上海交通大学上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240)

摘 要: 为了探究水泡性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus, VSV)与天然宿主免疫细胞的互作关系, 实验用 M 蛋白第 51 位甲硫氨酸残基缺失后的重组病毒(VSV Δ M51-GFP)和第 51 位甲硫氨酸敲除、第 221 位缬氨酸突变为苯丙氨酸、第 226 位丝氨酸突变为精氨酸的重组病毒(VSV-M_T-GFP)以及野生型重组病毒(VSV-GFP)感染猪单核细胞(Monocyte)和单核细胞诱导的树突状细胞(Monocyte-derived dendritic cell, MoDC), 通过空斑实验制作病毒生长曲线, 用激光共聚焦显微镜和流式细胞仪检测细胞的感染状况, ELISA 检测细胞培养上清中的细胞因子表达变化。结果表明, VSV、VSV Δ M51、VSV-M_T 均可感染 Monocyte 和 MoDC, 且 Monocyte 的感染率仅为 8.38%。3 种病毒在 MoDC 中可以大量复制, 但无法在 Monocyte 中扩增。且与野生型 VSV 相比, VSV Δ M51、VSV-M_T 细胞致病性依次减弱。VSV 能有效激活 TNF- α 、IL-8、IFN- α 相关免疫细胞因子在 MoDC 中的表达, 且 M 蛋白突变程度越大, 病毒激活能力越强。

关键词: 水泡性口炎病毒; 单核细胞; MoDC; 互作; 基质蛋白 M

中图分类号: Q255 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3851 (2016) 05-0749-05 **引用页码:** 090701

0 引 言

水泡性口炎(vesicular stomatitis, VS)是由水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)引起的一种人畜共患急性传染病, 可通过多种媒介广泛传播。VSV 属于弹状病毒科水泡病毒属成员, 按其血清型可分为新泽西型和印第安纳型^[1], 基因组为一条单链 RNA 分子, 分别编码 N、NS、M、G、L 5 种主要结构蛋白, 其中 M 和 G 蛋白定位于病毒粒子包膜蛋白。M 蛋白由 229 个氨基酸组成, 能使核衣壳同含有 G 蛋白的包膜或细胞膜发生相互联系, 故 M 蛋白被认为是一种桥连分子和重要的致病因子^[2]。树突状细胞^[3](Dendritic Cell)是目前已知功能最强大的抗原递呈细胞, 作为机体适应性 T 细胞免疫应答的始动者, DC 细胞能够显著刺激初始 T 细胞的增殖。病毒感染 DC 后, 能够不同程度引起 MHC II、TNF- α 、IL-12、和 CD80/86 等细胞因子及表面蛋白的变化。病毒感染致使细胞因子分泌的改

变可以反映出细胞免疫的倾向性。IFN- α 的分泌可以促进动物体内未成熟 DC 的成熟^[4], TNF- α 的分泌可诱导 DC 主要组织相容性复合物的表达, 可以提高 DC 细胞的抗原递呈能力。IL-8 是一种强有力的细胞趋化因子和活化因子, 是激活中性粒细胞的吞噬功能和溶酶体活性, 此外对 T 淋巴细胞也有一定的趋化作用^[5]。

近年来, VSV 相继被人们应用于 HIV、乳腺癌^[6]等疾病的疫苗研究^[7]。2014 年, 起源于非洲的埃博拉病毒引起全球恐慌, 近日, 加拿大公共卫生署的科研人员成功研发出基于口炎病毒载体的 VSV-EBOV 埃博拉疫苗^[8], 已投入临床实验, 并表现出强大的临床效果。

而此前对 VSV 与 M 蛋白的研究数据主要来源于小鼠, 在 BALB/c 小鼠实验中已经证明基质蛋白 M 与细胞感染有关, 但其在天然宿主致病机制中的作用并不清楚。与小鼠相比, VSV 在天然宿主中与免疫细胞的互作模型回归本体动物, 使研究结果更

收稿日期: 2015-01-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272562)

作者简介: 邹胜利(1990-), 男, 河南驻马店人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学方面的研究。

具有参考意义。观察 DC 感染病毒后的功能和表型变化,可帮助人们探究 VSV 传播机制,通过比较 M 蛋白突变后病毒的致病性和免疫原性变化,也可为 VSV 病毒弱化和载体疫苗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 病毒株与细胞

表达绿色荧光蛋白的野生型重组 VSV(VSV-GFP)、M 蛋白第 51 位甲硫氨酸缺失的重组病毒 VSV Δ M51-GFP、以及在 VSV Δ M51-GFP 基础上将第 221 位缬氨酸突变为苯丙氨酸、第 226 位丝氨酸突变为精氨酸的重组病毒(VSV-M_T-GFP)、猪肾细胞系(IBRS2)和非洲绿猴肾细胞(VERO)、Monocyte 及 MoDC 均由上海交通大学兽医生物技术重点实验室分离制备和诱导。采血用猪为上海交通大学实验动物中心的中型西双版纳猪。

1.1.2 主要试剂及仪器

细胞培养用 RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基和胎牛血清以及 MHC II、CD80 荧光抗体购自赛默飞。低吸附 24 孔细胞培养板购自美国康宁公司,细胞磁珠分选设备及 CD14 抗体购自德国 Miltenyi 公司,流式细胞仪分别用到 BD 公司 FACSCalibur 和 Beckman Coulter 公司的 CytoFLEX 型号,激光共聚焦显微镜为德国徕卡 TCS SP5 II 型号,TNF- α 、IL-8、IFN- α 检测试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司。其他常用试剂为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 猪 Monocyte 及 MoDC 的分离及诱导

从猪心脏静脉丛取血 120 mL,加适量 1%肝素抗凝,缓慢移入装有 17 mL 淋巴细胞分离液的 50 mL 离心管中,2000 r/min 离心 20 min,使离心机自然减速。将上层与中层之间的乳白色单个核细胞层用吸管吸出,加入红细胞裂解液裂解 5 min 后再加 DPBS 缓冲液 2000 r/min 离心 5 min,进行细胞计数后按照每 10^7 个细胞加入 10 μ L CD14 磁珠抗体,室温孵育 10 min,加 DPBS 缓冲液离心后加入 3 mL 的无血清 RPMI-1640 培养基过柱,将磁性分选柱从磁场中移走,用含 10% FBS 得到 Monocyte 细胞。将得到的 Monocyte 细胞计数,用 RPMI-1640 培养基调整细胞密度至 2×10^6 /mL,加入猪 IL-4 和 GM-CSF,使二者工作浓度为 10 ng/mL,将细胞移至表面低吸附 24 孔细胞培养板,诱导 5 d。

1.2.2 MoDC 的鉴定

把经过诱导培养的 MoDC 细胞从低吸附 24 孔板中轻轻吹打洗出,用 DPBS 洗 1 遍,用 MHC II 及 CD80 荧光抗体避光染色 20 min,1000 r/min 离心 2 min,加入 500 μ L DPBS 重悬,上流式细胞仪检测 MHC II 和 CD80 含量。

1.2.3 病毒在 IBRS2、Monocyte 及 MoDC 细胞的多步生长曲线

按 MOI (multiplicity of infection)=1,用 VSV-GFP、VSV Δ M51-GFP 和 VSV-M_T-GFP 分别感染 IBRS2、Monocyte 及 MoDC 细胞,孵育 1 h 后,用 DPBS 洗 3 遍,在接种病毒后的 2、8、12、24、48 h 收集细胞上清,并依次按 $1:10^3$; $1:10^4$; $1:10^5$; $1:10^6$; $1:10^7$; $1:10^8$ 稀释后,感染 12 孔细胞培养板中的 VERO 细胞,37℃孵育 1h 后用 PBS 洗涤,按 1:1 加入含有 10% FBS 的 DMEM 培养基和 1%低熔点琼脂糖凝胶,等凝胶冷却凝固后,放置在 5%的二氧化碳培养箱中培养 16~24 h,待空斑形成后用微波炉加热,弃去培养基和琼脂糖凝胶,加入 1%的结晶紫染色液染色 2 min 后洗去染色液,晾干后选取合适的孔对空斑进行计数,根据病毒稀释倍数计算病毒滴度,制作病毒多步生长曲线。

1.2.4 Monocyte 和 MoDC 细胞病毒感染检测

分别按 $MOI=1$ 将 3 种病毒接种 MoDC 细胞,按 $MOI=1$ 和 $MOI=10$ 接种 Monocyte 细胞。病毒孵育 1 h 后,用 DPBS 洗 3 遍,培养 12 h。用流式细胞仪检测细胞病毒感染率,随后用激光共聚焦显微镜对感染病毒后 MoDC 及 Monocyte 观察 GFP 荧光。

1.2.5 细胞因子的检测

按 $MOI=1$ 将 3 种病毒接种 MoDC 细胞,孵育 1 h 后,用 DPBS 洗 3 遍,12 h 后收集细胞培养上清,用 ELISA 试剂盒检测 TNF- α 、IL-8 和 IFN- α 。实验用 RPMI-1640 培养基作为空白对照,用未感染病毒的 MoDC 上清作为阴性对照。具体操作方法参照检测试剂盒说明书。

2 结果

2.1 MoDC 诱导后的鉴定

Monocyte 诱导过程中,在显微镜下可以看到细胞逐渐聚集成团,从第三天开始逐渐呈现出典型的毛刺状突起,呈现出 MoDC 细胞表型。将诱导得到的 MoDC 细胞用 MHC II 及 CD80 荧光抗体避光染色 20 min,上流式细胞仪检测。用未经荧光抗体染色的阴性细胞设门,如图 1 所示,MHC II 及 CD80/

86 表面标志的双阳性比例可达到 86%左右,成熟的 DC 细胞高表达 MHC II 类分子和 CD80/86 共刺激分子^[9],表明诱导得到的细胞成熟度和一致性较高。

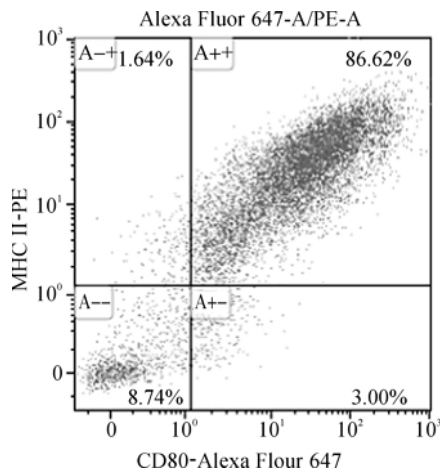


图 1 MoDC 的纯度鉴定

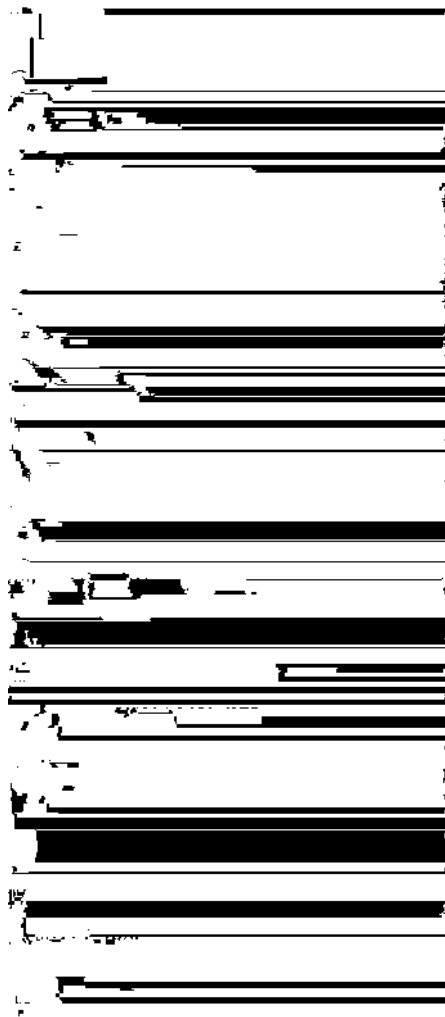


图 2 病毒在细胞中的生长曲线

2.2 3 种病毒在 IBRS2、Monocyte 及 MoDC 中生长动力学特征

IBRS2 作为一种猪肾细胞系,常用于很多猪瘟病毒的增殖,本实验以 IBRS2 细胞作为病毒在普通细胞中繁殖状况。通过空斑试验对接毒后的细胞培养上清中的病毒含量进行定量,得到其各自的生长曲线。观察病毒在 IBRS2、Monocyte 及 MoDC 中的生长曲线,如图 2(a)和(b)所示,3 种病毒在 IBRS2 和 MoDC 均可进行复制,IBRS2 细胞在 12 h 时上清病毒浓度达到最大值,且随着时间增加细胞逐渐凋亡,病毒滴度快速降低。MoDC 细胞在感染病毒 12 h 后病毒滴度达到最大值,随后病毒滴度维持在一定水平,下降趋势缓慢。如图 2(c),多次重复空斑实验表明病毒在 Monocyte 培养上清中的浓度并未增加。

2.3 病毒在 Monocyte 和 MoDC 中的感染状况

为了验证 Monocyte 这一 DC 前体细胞能否被 VSV 有效感染,用 VSV-GFP 分别在 $MOI = 1$ 和 $MOI = 10$ 的条件下感染 Monocyte 12h 后,进行激光共聚焦显微镜和流式细胞仪检测感染状况。如图 3 所示,重组病毒 VSV-GFP 感染 Monocyte 后,可以看到少量细胞发出 GFP 荧光,表明 VSV 可以感染 Monocyte。用未感染 VSV 病毒的 Monocyte 细胞做为阴性对照,如图 4 所示,在 $MOI = 1$ 时,Monocyte 感染率为 8.38%,当感染细胞的病毒浓度提高十倍 ($MOI = 10$),其感染率仅提高至 16.56%。相比之下,VSV 对 MoDC 的感染率明显高于 Monocyte,接种 VSV-GFP 8 h 后 MoDC 感染率可达到 54%。

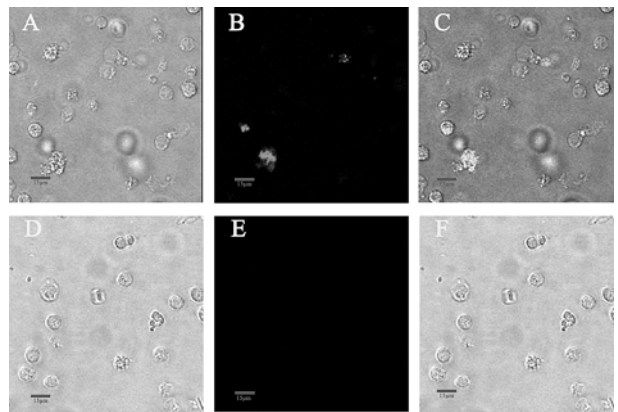


图 3 Monocyte 的共聚焦荧光图像

注:A、D 为白光模式,B、E 为 488nm 蓝色激发光,C、F 为白光模式和 488nm 蓝色激发光的合并。

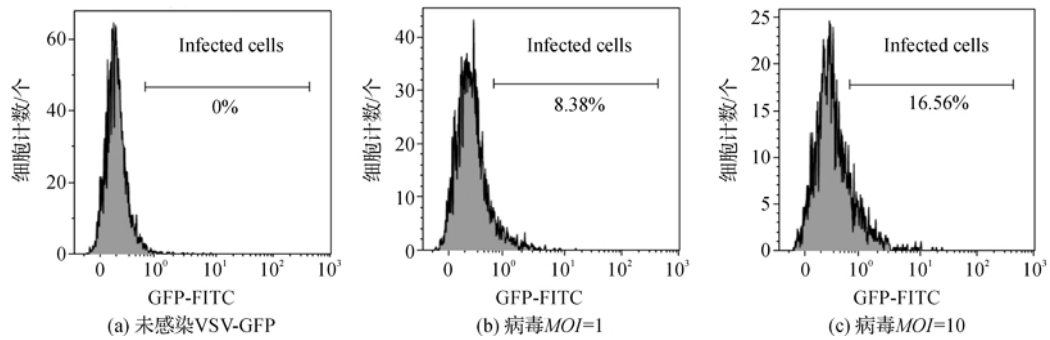


图4 Monocyte 病毒感染率

2.4 VSV 感染 MoDC 细胞对细胞因子分泌的改变

用 ELISA 检测试剂盒对细胞培养上清中的 TNF- α 、IL-8 及 IFN- α 进行检测,结果发现 TNF- α 、IL-8 和 IFN- α 在感染前后发生了较大的变化。TNF- α 和 IFN- α 在 3 种接毒 MoDC 上清中的浓度依次为 VSV < VSV Δ M51 < VSV-M_T, IL-8 在上清

中浓度为 VSV-M_T > VSV > VSV Δ M51。从图 5 可知, TNF- α 、IL-8 和 IFN- α 在上清中的浓度高低与 M 基质蛋白突变的程度有关,即 M 蛋白突变的程度越大, VSV 引起细胞因子变化的能力越强。值得注意的是, 3 种病毒在 MoDC 细胞中的生长动力学特征表现出同样的趋势。

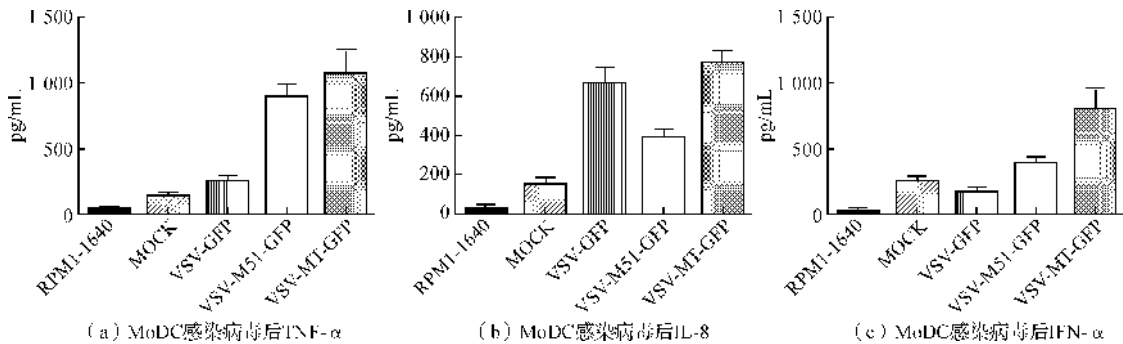


图5 MoDC 感染病毒后细胞因子的表达变化

3 讨论

通过病毒的生长曲线可以证实, VSV 在体外可以感染 DC 细胞。通过比较 3 种病毒的上清滴度, 可知 3 种病毒在 DC 细胞中复制能力依次为 VSV、VSV Δ M51 和 VSV-M_T, M 蛋白作为 VSV 中重要的毒力因子, 未突变的 M 蛋白可阻遏宿主细胞的 mRNA 从细胞核向细胞外的转运, 一定程度上抑制感染的细胞产生干扰素^[10], 可使病毒躲过宿主的免疫系统得以复制的同时, 降低对宿主细胞杀伤性。在空斑实验中, 野生型的重组病毒 VSV 形成的空斑较大且清晰, 而 VSV-M_T 形成的空斑斑痕相对模糊, 毒力明显弱于野生型 VSV。

与病毒在 MoDC 中的表现不同, 多次空斑实验均表明 VSV 无法在 Monocyte 中复制, 激光共聚焦实验和流式细胞仪检测说明 Monocyte 的感染率明显低于 MoDC。在研究登革热病毒的实验中发现登革热病毒在 Monocyte 细胞中同样无法扩增^[11], 表明部分病毒难以进入 Monocyte, 而 Singleton 在研

究猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 中发现 PRRSV 在 Monocyte 中的可以大量复制。以 VSV 为载体的疫苗虽然在动物实验中都产生了很好的保护效果, 但由于减毒重组活载体疫苗有在体内复制的特点, 其安全性受到质疑, 因此, 对 Monocyte 能被 VSV 感染却无法复制的机制研究可为人们在 VSV 疫苗研制中提供思路。

VSV 感染 DC 后能够通过相关细胞因子的表达和分泌激活 DC 细胞, 发挥其抗原递呈作用。病毒的免疫源性与致病性一般表现为对应关系, 当 VSV M 蛋白突变后, 其致病性下降, 免疫原性往往随之下降。而本研究与野生型 VSV 和 VSV Δ M51 相比, VSV-M_T 在表现出低复制和低毒性的特点的同时, 却能够更大程度地激活 DC 细胞发挥作用, M 蛋白作为参与宿主细胞凋亡的重要病毒因子, 在 MoDC 细胞中因其突变产生稳定差异将为研究与 M 蛋白相关的 VSV 载体疫苗提供参考和依据。

参考文献:

- [1] MARTINEZ I, BARRERA J C, RODRIGUEZ L L, et al. Recombinant vesicular stomatitis (Indiana) virus expressing New Jersey and Indiana glycoproteins induces neutralizing antibodies to each serotype in swine, a natural host[J]. *Vaccine*, 2004, 22(29/30):4035-4043.
- [2] FANG X, ZHANG S, SUN X, et al. Evaluation of attenuated VSVs with mutated M or/and G proteins as vaccine vectors[J]. *Vaccine*, 2012, 30(7):1313-1321.
- [3] LANG P A, MERYK A, PANDYRA A A, et al. Toso regulates differentiation and activation of inflammatory dendritic cells during persistence-prone virus infection [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2015, 22(1):164-173.
- [4] PLEVIN R E, KNOLL M, MCKAY M, et al. The role of lipopolysaccharide structure in monocyte activation and cytokine secretion[J]. *Shock*, 2016, 45(1):22-27.
- [5] GILLE C, STEFFEN F, LAUBER K, et al. Clearance of apoptotic neutrophils is diminished in cord blood monocytes and does not lead to reduced IL-8 production [J]. *Pediatric Research*, 2009, 66(5):507-512.
- [6] EBERT O, HARBARAN S, SHINOZAKI K, et al. Systemic therapy of experimental breast cancer metastases by mutant vesicular stomatitis virus in immune-competent mice [J]. *Cancer Gene Therapy*, 2005, 12(4):350-358.
- [7] FLANAGAN E B, ZAMPARO J M, BALL L A, et al. Rearrangement of the genes of vesicular stomatitis virus eliminates clinical disease in the natural host: new strategy for vaccine development [J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(13):6107-6114.
- [8] GARBUTT M, LIEBSCHER R, WAHL-JENSEN V, et al. Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(10):5458-5465.
- [9] CHAKRABORTY K, CHATTERJEE S, BHATTACHARYYA A. Modulation of phenotypic and functional maturation of murine bone-marrow-derived dendritic cells (BMDCs) induced by cadmium chloride [J]. *International Immunopharmacology*, 2014, 20(1):131-140.
- [10] SIMON I D, VAN ROOIJEN N, ROSE J K. Vesicular stomatitis virus genomic RNA persists in vivo in the absence of viral replication[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(7):3280-3286.
- [11] SCHMID M A, DIAMOND M S, HARRIS E. Dendritic cells in dengue virus infection: targets of virus replication and mediators of immunity [J]. *Frontiers in Immunology*, 2014, 5(657):647-647.

Study on Interactions of Vesicular Stomatitis Virus with Monocyte and MoDC

ZOU Shengli¹, NIE Zuoming¹, WU Xiangfu¹, Fang Xinkui², SUN Tao²

(1. School of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. Shanghai Municipal Veterinary Key Laboratory, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: In order to explore the interactions between VSV (Vesicular stomatitis virus) and immune cells of natural host, three recombinant VSVs, including the wild-type VSV-GFP, the VSV with M51 deletion (VSV $_{\Delta}$ M51-GFP) and the VSV with triple mutations of M51 deletion, V221F and S226R (VSV-M_T-GFP), were used to infect the pig monocyte and monocyte-derived dendritic cell. The plaque experiment was done to make virus growth curve. Then confocal laser scanning microscope and Flow cytometry were used to assess the cell infection status. The change in cytokines expression in MoDC was detected by ELISA assay kit. The results show that three viruses can infect monocyte and MoDC, and virus infection rate of Monocyte is only 8.38%. The three viruses are unable to replicate in quantity in monocyte, but cannot proliferate in monocyte. Compared with wild-type VSV, the pathogenicity of VSV $_{\Delta}$ M51 and VSV-M_T decreases successively. They can effectively activate the expression of TNF- α , IL-8, IFN- α in MoDC, and the virus activation capacity is positively correlated with the degree of M protein mutation.

Key words: vesicular stomatitis virus; dendritic cell; MoDC; interaction; matrix protein M

(责任编辑: 许惠儿)