

PCV-2 感染对 PK-15 细胞抗病毒相关因子 转录时相的影响

韩志涛¹, 李金磊¹, 陈红英², 王淑娟¹, 耿静微¹, 翟阿官², 魏战勇², 崔保安¹

(1 河南省动物性食品安全重点实验室, 河南 郑州 450002; 2 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

【摘要】 **【目的】**了解猪圆环病毒 2 型(PCV-2)感染对 PK-15 细胞抗病毒相关因子转录时相的影响, 探讨宿主-病毒之间的作用关系。**【方法】**运用荧光定量 PCR 技术, 测定和分析 PCV-2 感染 PK-15 细胞后 0(未接种病毒), 1, 6, 12, 24, 48, 72 h 时病毒 DNA 含量及细胞因子 IFN- β 、IFN- γ 、IFNAR-1、IFNAR-2、MHC-I、MHC-II、MX1、NOS、RNaseL 和 IRF-3 mRNA 转录水平的变化。**【结果】**PCV-2 感染 PK-15 后 1 h 就可以检测到病毒 DNA, 在感染后 24 h 病毒开始大量迅速增殖, 于感染 72 h 时达到最高峰。与 0 h 相比, PCV-2 感染后 IFN- β 、IRF-3 的表达量在感染 12 h 时显著增加, 其他时间表达量下降; IFN- γ 、MHC-II 的表达量在感染 12 h 时增加不明显, 其他时间表达量下降; 感染 PCV-2 后 IFNAR-2、MHC-I、MX1 的表达量下降; RNaseL 的表达量在感染 12 h 时显著减少, 其他时间表达量增加, 48 h 时表达量增加显著; IFNAR-1 的表达量在感染 72 h 时显著增加, 其他时间表达量下降; 未检测出 NOS 的表达。**【结论】**随着 PCV-2 病毒含量的增加, 以上几种主要抗病毒因子的表达量不明显或有所下降, 表明 PCV-2 感染 PK-15 细胞后可逃避机体的抗病毒作用机制。

【关键词】 细胞因子; PK-15 细胞; 猪圆环病毒 2 型; 转录时相

【中图分类号】 S852.65+9.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)06-0015-05

Transcriptional profiles of inflammatory related cytokines in PK-15 cell cultures following infection with Porcine circovirus type 2

HAN Zhi-tao¹, LI Jin-lei¹, CHEN Hong-ying², WANG Shu-juan¹,
GENG Jing-wei¹, ZHAI A-guan², WEI Zhan-yong², CUI Bao-an¹

(1 Key Laboratory for Animal-derived Food Safety of Henan Province, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to investigate the host inflammatory responses and the host-PCV-2 interaction in particular antiviral cytokines responses when the Porcine Kidney-15 cells (PK-15) were infected with Porcine Parvovirus (PCV-2). **【Method】** After the Porcine Kidney-15 cells (PK-15) were infected with PCV-2, the viral DNA was measured and analyzed by real-time PCR, so were the transcript level of cytokines (IFN- β , IFN- γ , IFNAR-1, IFNAR-2, MHC-I, MHC-II, MX1, NOS, RNaseL and IRF-3). **【Result】** We found that the transcript levels of IFN- β , IRF-3 were significantly increased at 12 h postinoculation(p. i.), but decreased at other time. The transcript levels of IFN- γ , MHC-II were slightly increased at 12 h p. i. and decreased at other time. The transcript levels of IFNAR-2, MHC-I, MX1 were decreased. The transcript levels of RNaseL were significantly decreased at 12 h p. i. but increased at other time. The transcript levels of IFNAR-1 were significantly increased at 72 h p. i. but decreased at other time.

* [收稿日期] 2010-11-20

[基金项目] 河南省杰出人才创新基金项目(0621002100)

[作者简介] 韩志涛(1985—), 男, 河南许昌人, 在读硕士, 主要从事动物分子免疫学研究。E-mail: henauhanyu@126.com

[通信作者] 魏战勇(1975—), 男, 河南安阳人, 副教授, 主要从事动物分子免疫学研究。E-mail: weizhanyong@henau.edu.cn

【Conclusion】 With the increase of the content of the PCV-2, the expression quantities of the above several main antiviral factors were not obvious or declined which showed PCV-2 infection can evade the antiviral mechanism of PK-15 cells.

Key words: cytokines; PK-15 cell; Porcine circovirus type 2; transcriptional profiles

猪圆环病毒是 1974 年首次在猪肾传代细胞系 PK-15 中发现的一种小病毒^[1]。PCV 可分为 PCV-1 和 PCV-2 2 个基因型,其中 PCV-1 对猪不具有致病性^[2],PCV-2 是造成断奶仔猪多系统衰竭综合征(Postweaning multisystemic wasting syndrom, PMWS)的主要病原^[3],其还可以引起皮炎肾病综合征、增生性坏死性肺炎、猪繁殖与呼吸综合征、仔猪传染性先天性震颤等多种疾病,但临床上以 PMWS 最为常见^[4-6]。目前,该病在世界范围内广泛流行,给各国养猪业造成了巨大的损失^[7]。

固有免疫应答是机体抗病毒入侵的第一道防线,其主要通过干扰素及其相关因子抑制病毒基因的表达。干扰素本身虽然对病毒无灭活作用,但可以作用于正常的细胞,使未受感染的细胞产生抗病毒蛋白,从而抑制病毒的高分子生物合成,使细胞获得抗病毒能力。入侵部位细胞产生的干扰素,可渗透到临近细胞,从而限制病毒向四周扩散而使机体处于抗病毒状态。PCV-2 感染后对 IFN- γ 的影响国内外已有研究^[8-11],但尚未见关于体外 PCV-2 单独感染 PK-15 细胞后抗病毒细胞因子转录时相的报道。本试验利用 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法,在感染后不同时间点,定量检测 PCV-2 感染对 PK-15 细胞 IFN- β 、IFN- γ 、IFNAR-1、IFNAR-2、MHC-I、MHC-II、MX1、NOS、RNaseL 和 IRF-3 等抗病毒细胞因子 mRNA 表达水平的影响,以期对抗病毒细胞因子的抗病毒机制研究提供理论参考和试验依据,并为预防控制 PCV2 提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 PCV-2 是河南省动物性食品安全重点实验室,从南阳一猪场体质下降、消瘦、生长发育不良、腹泻、呼吸困难、肾、脾脏及全身淋巴结高度肿大、出血和坏死的仔猪脾脏中分离所得,经 PCR 及 ELISA 鉴定为 PCV-2,在 PK-15 细胞传代到 10 代,病毒滴度为 $10^{5.4}$ TCID₅₀/mL。

1.1.2 细胞 猪肾细胞 PK-15(Porcine Kidney-15 cells)由中国兽药监察所提供,用含体积分数 7%

新生犊牛血清的 RPMI-1640 培养基,于体积分数 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养。

1.1.3 主要试剂 Protein K, Promega 公司; RPMI-1640 培养基, GIBCOBR 公司; Trypsin, Invitrogen; 胎牛血清, Hyclone 公司; E. Z. N. A Total RNA Kit I, O-MEGA; SYBR® Premix Ex Taq™ II, TaKaRa; RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, MBI Fermentas。其他常规试剂均为分析纯。

1.1.4 主要仪器 Mastercycle ep realplex Real-Time PCR 仪, Eppendorf 公司; 台式高速低温离心机, 德国 Sigma 公司; PTC-200 型 PCR 仪, MJ Research 公司; 紫外凝胶成像系统, 美国 SIM 公司; 小型台式离心机, 德国 Sigma 公司。

1.2 PCV-2 感染 PK-15 细胞

将 PK-15 细胞用胰酶分散后, 培养于 6 孔培养板 (2×10^5 孔⁻¹), 待细胞融合度达 80% 时, 用 PBS 洗 2 次, 接种 PCV-2 (剂量为 $10^{5.4}$ TCID₅₀/mL), 吸附 60 min, 期间每隔 15 min 翻转 1 次。吸附完毕后用 PBS 液洗除未吸附的病毒, 加入含有 D-氨基葡萄糖 (2 mmol/L) 和体积分数 2% 胎牛血清的 1640 维持液。

1.3 PK-15 细胞的收集

分别取 PCV-2 感染后 0 (未接种病毒), 1, 6, 12, 24, 48, 72 h 的 PK-15 细胞, 用 PBS 洗 2 次, 添加 2.5 g/L 胰酶消化, $1\,000 \times g$ 离心 10 min, 收集 PK-15 细胞, -80°C 保存备用。

1.4 PK-15 细胞 DNA 和 RNA 的提取及 cDNA 的合成

按蛋白酶 K 法提取病毒 DNA; 参照 E. Z. N. A Total RNA Kit I 说明书提取细胞总 RNA, 具体方法和步骤参照文献[12]进行, 以提取的总 RNA 为模板进行 cDNA 的反转录合成, 以反转录合成的 cDNA 及提取的 DNA 作为模板进行荧光定量 PCR。

1.5 感染 PCV-2 的 PK-15 细胞抗病毒相关因子转录时相的相对定量 PCR

1.5.1 引物的设计与合成 参照 GenBank 公布的基因序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 引物序列、扩增的基因名称、参考序列 GenBank 登录号、退火温度及扩增产物大小见表 1。引物由大连宝生物公司合成。

表 1 Real-time PCR 引物及其反应条件
Table 1 Primers and conditions used for Real-time PCR assays

基 因 Gene	参考序列 GenBank 登录号 Accession number in GenBank	上游引物(5'→3') Forward primer	下游引物(5'→3') Reverse primer	退火温度/℃ Annealing temperature	扩增产物 长度/bp Size of amplicon
PCV-2 DNA	AF027217	GGGCCAGAATTCAACCTTAACC	CGCACCTTCGGATATACTGTCA	56	171
<i>βactin</i>	AF508792	GGACTTCGAGCAGGAGATGG	GCACCGTGTGGCGTAGAGG	55	254
<i>IFN-β</i>	AY687281	CCAACAAAGGAGCAGCAAT	CATCCATCTGCCCATCAAG	59	266
<i>IFN-γ</i>	AY188090	GGCCAAATTGTCTCTCTCT	CAGTTTCCCAGAGCTACCA	55	129
<i>IFNAR-1</i>	AB116561	GAAGCCGAAGATAAAGCA	GGTGAAGGCAGGTGATG	58	293
<i>IFNAR-2</i>	AM229679	CATCTTAGACGCCTTGGAC	TGTATTGGCTGAGGGTGTC	58	169
<i>MHC- I</i>	EU440343	GCAGAGCCTCCAAAGACA	CGACCAGGACGAGAACC	55	343
<i>MHC- II</i>	EU432079	GCGGGTGAGGTTATTGG	AGGAGGTTGTGGTGCTG	60	279
<i>MX1</i>	NM214061	GCCATACGACATCGAATACC	TTCTCGCCACGTCCACTA	60	227
<i>iNOS</i>	EU714327	ATGGATGAGTATGACGTGGTG	ACGCTATTGAAGCGGATTT	60	191
<i>RNaseL</i>	DQ497160	GATTGCTGGTCTCTATGTG	AGGGTCCTGTAACGGCTC	59	214
<i>IRF-3</i>	AB116563	GTGGTGCCTACACTCTGG	TGTGGTCTCTGCTAAACG	58	103

1.5.2 荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL,其中 SYBR Premix Ex *Taq* 10 μL,上、下游引物各 0.4 μL,600 ng/μL cDNA 1 μL。反应条件为:95 ℃ 1 min;95 ℃ 10 s,退火 15 s(退火温度依引物而定,详见表 1),72 ℃ 15 s,共进行 40 个循环;循环结束后升温至 95 ℃ 15 s,再降至 60 ℃ 15 s,开始从 60 ℃ 递增至 95 ℃ 20 min,采集荧光信号得出扩增产物的溶解曲线,于 95 ℃ 15 s 结束反应。

1.6 数据分析

在实时定量 PCR 中,循环阈值(*Ct*)是反映模板中目标基因含量的一个重要指标。通过样品和标准曲线 *Ct* 值的比较,可以准确计算 RNA 含量。另外,将目标基因与持家基因 *βactin* 进行比较,消除细胞收集、反转录和加样中的操作误差。将 0 h 未接种病毒的细胞因子的表达量设为 1×,使用 CFX96 Real-Time PCR 软件分析各基因相对于 0 h 时表达量的变化水平。

2 结果与分析

2.1 PCV-2 DNA 水平测定

由图 1 可知,病毒感染后 1 h 就可以检测到病毒 DNA,但病毒量相对较低;随后开始逐步上升,在感染后 24 h 时病毒开始大量迅速增殖,于 72 h 时达到最高峰,此时 DNA 的相对含量从感染后 24 h 时的 48 增加至 1 090 左右。

2.2 PCV-2 感染对 PK-15 细胞抗病毒相关因子转录时相的影响

由图 2 可知,与 0 h 相比,PCV-2 感染后 *IFN-β*、*IRF-3* 的表达量在 12 h 显著增加,其他时间表达量下降;*IFN-γ*、*MHC- II* 的表达量在感染 12 h 时增加不明显,其他时间其表达量下降;*IFNAR-1* 的表达量在感染 72 h 时显著增加,其他时间表达量下

降;*IFNAR-2*、*MHC- I*、*MX1* 的表达量在感染后下降;*RNaseL* 的表达量在感染 12 h 时显著减少,其他时间其表达量增加,48 h 时表达量增加显著;本试验未检测出 *NOS* 的表达,推测 PCV-2 感染 PK-15 不能诱导细胞产生 *NOS*。

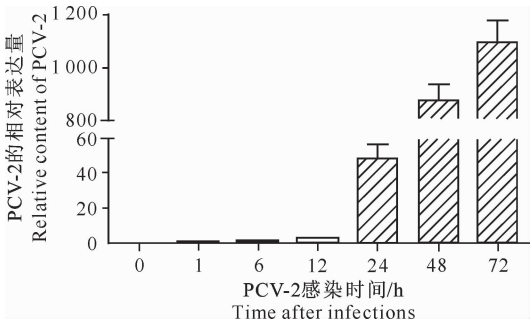


图 1 PCV-2 在 PK-15 细胞中的增殖规律
Fig. 1 Replication of PCV2 in PK-15 cell

3 讨论

PCV-2 可以在 PK-15 细胞中增殖但并不引起细胞病变。本研究发现,在 PCV-2 感染后 1 h 能检测到病毒,24 h 后病毒开始大量增殖,于感染后 72 h 达最高值,增殖倍数可达 1 090 倍左右,这可能是由于病毒大量增殖、释放所致。

本研究发现,PK-15 感染 PCV-2 后,在感染 12 h 时 *IFN-β* 表达量明显升高,*IFN-γ* 表达量稍微增加。这说明细胞因子通常处于沉默状态,只有受到诱导或刺激后才被激活而进行转录,但是转录也受多种因素的调节和控制,需要一定的时间来完成,故在感染后 12 h 时 *IFN-β* 和 *IFN-γ* 表达量才开始升高,随后 *IFN-β* 和 *IFN-γ* 的表达量又显著低于对照组。为此笔者推测,PCV-2 感染初期能诱导干扰素的产生,并发挥抗病毒作用。何冉娅等^[9]研究表明,PCV-2 感染小鼠后脾脏 *IFN-γ* 基因表达水平在第

14~28 天呈下降趋势;Darwich 等^[10]报道,PCV-2 感染可导致腹股沟淋巴结 IFN- γ 表达水平下降。本研究结果与上述研究相一致,说明病毒大量增殖

后能抑制干扰素的表达,进而抑制 T 细胞、NK 细胞等免疫细胞的表达,以逃避宿主的抗病毒免疫反应。

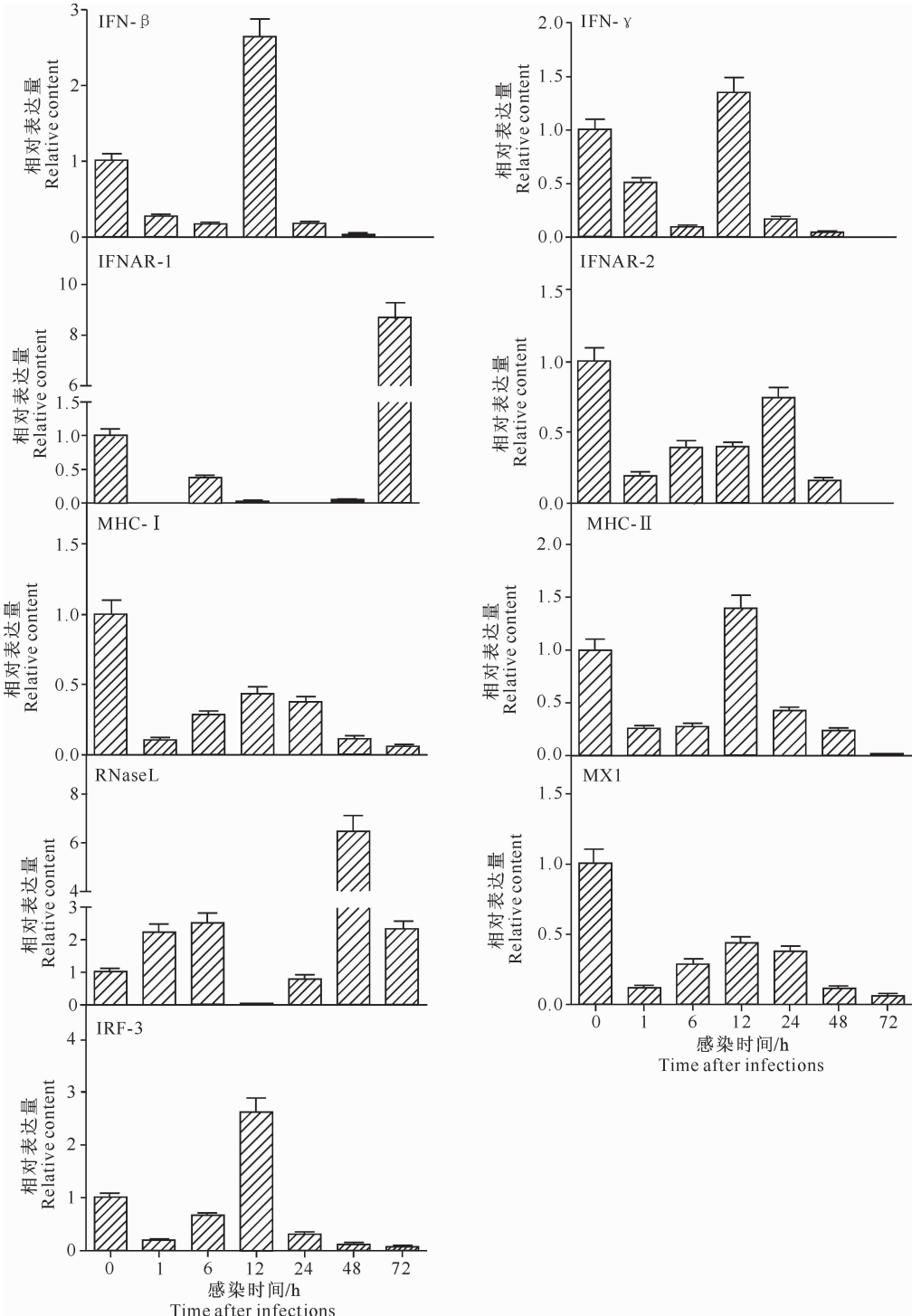


图 2 PCV-2 感染对 PK-15 细胞抗病毒相关因子转录时相的影响

Fig. 2 Transcriptional profiles of inflammatory related cytokines in PK-15 cell

干扰素产生以后,作为激素样细胞因子与其受体结合,可以诱生和激活 400 种以上的胞内蛋白,从而发挥其抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等生物学效

应^[13]。本研究发现,PK-15 感染 PCV-2 后,IFNAR-1 的表达量在感染 72 h 时显著增加,而在其他时间显著降低,IFNAR-2 表达量显著降低。据此

笔者推测,PCV-2 感染后能抑制 I 型干扰素受体的产生,阻碍 IFN 与其受体结合,进而逃避宿主的抗病毒反应,而 IFNAR-1 的表达量在 72 h 显著增加,可能是由于病毒大量增值后导致免疫调节的紊乱,其他一些因子刺激了 IFNAR-1 的产生。

主要组织相容性复合体(MHC)不仅与移植排斥有关,而且广泛参与免疫应答的诱导和调节,所以具有很重要的免疫学意义。本研究发现,PK-15 感染 PCV-2 后,MHC-I 的表达量显著下降,MHC-II 的表达量在 PCV-2 感染 12 h 时略有增加,其他时间表达量下降。据此笔者推测,PCV-2 感染后通过某些干扰素的负性调节因子抑制 MHC 的表达,进而避开 MHC 的加工和转运实现免疫逃避。

RNaseL 是高等脊椎动物自身免疫对抗病毒感染的的基本调节因子,是 IFN 抗病毒反应中抵抗病毒感染的的重要组成部分。RNaseL 发挥作用的基础是其受 IFN 刺激后可调节底物 mRNA 的稳定性^[14]。本研究发现,RNaseL 的表达量在病毒感染 12 h 时显著减少,其他时间表达量增加,感染 48 h 时增加显著。为此笔者推测,PCV-2 感染后,受 IFN 的刺激,RNaseL 表达量显著升高,可诱导病毒感染的细胞产生凋亡,进而可以控制病毒的复制。

MX 蛋白是 I 型干扰素诱导宿主细胞所产生的抗病毒蛋白中的一种,其具有广泛的抗病毒作用。位于核内的 MX1 蛋白可以抑制流感病毒的复制,小鼠 MX2 蛋白对水疱性口炎病毒(VSV)具有抗性^[14-15]。本研究发现,PCV-2 感染 PK-15 细胞后,MX1 的表达量显著下降,说明 PCV-2 感染后抑制了干扰素的产生,导致 MX1 的表达量下降,进而可以逃避宿主的抗病毒免疫反应,此结果与 Kekarainen 等^[7]指出的 PCV2 阻碍免疫反应能促成 Th1 反应抑制及免疫抑制的结论相一致。

IRF-3 除了可以显著增高病毒介导的 I 型干扰素的表达,导致抗病毒效应外,还与 DNA 的损伤修复和病毒诱导的细胞凋亡有关^[16]。IRF-3 的活化依赖于病毒诱导的磷酸化,磷酸化的 IRF-3 能从细胞浆转移至细胞核内,作用于一类干扰素进而促进机体清除感染的病毒^[14]。本研究发现,PCV-2 感染 PK-15 细胞后,IRF-3 的表达量在感染 12 h 时显著增加,其他时间其表达量下降,与 IFN- β 、IFN- γ 的表达规律一致。据此笔者推测,PCV-2 感染初期能诱导 IRF-3 介导干扰素的表达,进而参与抗病毒反应,而后由于病毒的大量增殖,免疫逃逸及某些活化抑制剂的作用导致 IRF-3 的表达量下降。

4 结 论

PCV-2 感染后可引起 PK-15 细胞 IFN- β 、IRF-3 的表达量在感染 12 h 时显著增加,其他时间表达量下降;IFN- γ 、MHC-II 的表达量在感染 12 h 时增加不明显,其他时间其表达量下降;IFNAR-2、MHC-I、MX1 的表达量在感染病毒后下降;RNaseL 的表达量在感染 12 h 时显著减少,其他时间表达量增加,48 h 时表达量增加显著;IFNAR-1 的表达量在 72 h 显著增加,其他时间表达量下降。试验中未检测出 NOS 的表达。

[参考文献]

- [1] Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA [J]. *Nature*, 1982, 295: 64-66.
- [2] Allan G M, McNeilly F, Cassidy J P, et al. Pathogenesis of porcine circovirus: Experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material [J]. *Vet Microbiol*, 1995, 44(1): 49-64.
- [3] Allan G M, McNeilly F, Kennedy S, et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1998, 10(1): 3-10.
- [4] Neumann E J, Dobbinson S S, Welch E B, et al. Descriptive summary of an outbreak of porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in New Zealand [J]. *N Z Vet J*, 2007, 55(6): 346-352.
- [5] Fan H, Xiao S, Tong T, et al. Immunogenicity of porcine circovirus type 2 capsid protein targeting to different subcellular compartments [J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(3): 653-660.
- [6] Fort M, Olvera A, Sibila M, et al. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs [J]. *Vet Microbiol*, 2007, 125(3/4): 244-255.
- [7] Kekarainen T, Montoya M, Dominguez J, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2) viral components immunomodulate recall antigen responses [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 124(1/2): 41-49.
- [8] 司兴奎,郭鑫,杨汉春.猪圆环病毒 2 型感染后猪外周血淋巴细胞 IL-2、IL-4、IL-10、IL-12 p40、IFN- γ 和 TNF- α mRNA 转录的变化 [J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(1): 78-82.
- Si X K, Guo X, Yang H C. The effects of PCV2 experimental infection on transcriptional levels of IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 p40, IFN- γ and TNF- α mRNA of peripheral blood lymphocytes [J]. *Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica*, 2009, 40(1): 78-82. (in Chinese)