

H1N1 亚型流感病毒诱导外周血 单个核细胞凋亡研究 *

张 衡 王革非 高媛丽 陈小璇 林桂梅 李康生 **

(汕头大学医学院微生物学及免疫学教研室, 广东省高校免疫病理学重点实验室, 汕头 515031)

摘要 A 型流感病毒能诱导淋巴细胞、单核巨噬细胞的凋亡, 为进一步探讨淋巴细胞和单核巨噬细胞在凋亡中可能存在的相互作用, 用 H1N1 亚型流感病毒诱导人外周血淋巴细胞和单核巨噬细胞的凋亡. 结果显示, 前 48 h, H1N1 流感病毒能诱导淋巴细胞和单核巨噬细胞的凋亡, 但在培养 48 h 后, 流感病毒对单核巨噬细胞表现为凋亡抑制作用, 同时流感病毒对淋巴细胞吸附不同时间后, 荧光染色和流式细胞术检测凋亡未见明显差异, 说明细胞凋亡与病毒吸附时间长短并无相关性. 检测 p53 抑制剂 Pifithrin- α (PFT- α)加入前后淋巴细胞和单核巨噬细胞的凋亡情况, 结果显示, 淋巴细胞和单核巨噬细胞的凋亡均被抑制, 提示通过 p53 诱导的凋亡可能是流感病毒诱导细胞凋亡的一条重要途径.

关键词 外周血单个核细胞, A 型流感病毒, 凋亡, p53

学科分类号 Q1, Q93, R392

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00486

流行性感冒是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病, 其起病急、蔓延快, 对人群尤其是儿童、老年人及免疫缺陷者危害尤为严重. 流感病毒不仅能导致上呼吸道和肺部的感染, 同时还能导致脑部、心脏、胰腺等全身性多器官的感染. 流感病毒点突变造成的抗原漂移可导致流感每年季节性流行, 而基因重配造成的抗原转换则可能产生新的亚型, 因人类对新亚型普遍缺乏免疫力而可能导致流感世界大流行^[1~4].

流感病毒能诱导多种组织细胞的凋亡, 包括外周血单个核细胞, 但其相关的免疫病理学机制至今未得到进一步的阐述^[5~7]. 研究表明, 在病毒感染细胞时, 病毒自身蛋白以及细胞分泌的信号分子都参与到这一过程中, 如 Fas-FasL、肿瘤坏死因子(TNF)、RNA 依赖的蛋白激酶 R(PKR)、一氧化氮(NO)、转化生长因子(TGF)、有丝分裂原激活蛋白(MAP)激酶等. 尽管许多蛋白质被证明与流感病毒的凋亡有关, 但尚缺乏进一步的机制探讨^[8~11].

本实验从健康自愿者的外周血中分离培养淋巴细胞和单核巨噬细胞, 用 A 型流感病毒(H1N1 亚型)感染后, 通过流式碘化丙啶(PI)单染色以及 Annexin V-PI 双染色检测并比较外周血淋巴细胞和

单核巨噬细胞在不同情况下的凋亡情况. RT-PCR 分别检测 p53 的 RNA 表达水平. 根据检测的结果, 加入 Pifithrin- α (PFT- α)抑制 p53 转录, 检测 p53 被抑制时外周血淋巴细胞和单核巨噬细胞的凋亡情况.

1 材料与方法

1.1 病毒与细胞

犬肾上皮细胞系 MDCK(Madin-Darby canine kidney)细胞, 本实验室保存. A 型流感病毒 A/Shantou/169/2006(H1N1)株, 于 2006 年分离于汕头大学医学院第一附属医院, 本室保存. 通过红细胞凝集抑制试验(hemagglutination inhibition assay, HAI)及基因测序对比确认病毒亚型. 病毒感染 MDCK 细胞后, 在含有 1 mg/L TPCK-Trypsin(Sigma 公司)的无血清 1640 培养基中增殖, 空斑形成试验(plaque-forming assay)确定病毒效价^[12].

* 国家自然科学基金(30771988, 30571674), 广东省自然科学基金(05008347, 04020239)和广东高校优秀青年创新人材培育项目(LYM08056)资助.

** 通讯联系人. Tel: 0754-88900456, E-mail: ksli@stu.edu.cn

收稿日期: 2009-01-05, 接受日期: 2009-02-09

1.2 淋巴细胞的分离、培养与感染

采集自愿者的新鲜血液并于 1 h 内用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离并得到单个核细胞, 并进一步通过细胞贴壁, 得到淋巴细胞和单核巨噬细胞, 细胞用含 10% 胎牛血清(Hyclone 公司)的 RPMI 1640 (Gibco 公司)培养. 用病毒液吸附不同处理方式的细胞, 包括: a. 病毒直接吸附单个核细胞; b. 病毒直接吸附淋巴细胞和单核巨噬细胞 1 h 后, 再将淋巴细胞和单核巨噬细胞进行分离; c. 将淋巴细胞、单核巨噬细胞进行分离后再用流感病毒进行吸附; d. 病毒吸附不同时间后, 淋巴细胞和单核巨噬细胞的凋亡情况. 通过细胞计数和调节病毒颗粒数控制病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 2.

1.3 RNA 提取与半定量 RT-PCR

分别提取病毒感染后培养 2、4、8、12 h 的淋巴细胞和单核巨噬细胞的 RNA, 检测淋巴细胞和单核巨噬细胞中 p53 在 RNA 表达水平上的差异, RNA 抽提试剂盒为 Qiagen 公司的 RNeasy mini kit, 逆转录试剂盒为 SuperScript III (Invitrogen 公司), 使用随机引物获得 cDNA. 利用 2×MasterMix(天根生化科技(北京)有限公司)进行 PCR 扩增, p53 引物序列分别为: 5′ ACC CAG GTC CAG ATG AAG C 3′, 5′ ATG TAG TTG TAG TGG ATG GTG GTA 3′, β-actin 引物序列分别为: 5′ ATG CCT GCC GTG TGA ACC ATG T 3′, 5′ AGA GCT ACC TGT GGA GCA ACC T 3′. PCR 产物经凝胶电泳后, 用 BandScan4.3 进行分析.

1.4 凋亡检测

使用流式细胞术, 通过碘化丙锭(propidium, PI, Sigma 公司)单染色和 Annexin V-PI 双染色的方法检测细胞的凋亡, 以确认不同处理间凋亡是否存在差异, 凋亡试剂盒为美国 Bipec Biopharma 公司产品. 使用 Pifithrin-α(PFT-α, Santa Cruz 公司)抑制 p53 转录, 通过流式 PI 单染色检测淋巴细胞和单核巨噬细胞的凋亡情况.

2 结 果

2.1 空斑形成试验确定病毒滴度

根据血凝试验测得 H1N1 病毒的滴度, 分别对流感病毒进行 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释, 并吸附单层 MDCK 细胞, 60~72 h 后, 得到流感病毒增殖的空斑试验结果, 如图 1 所示. 流感病毒滴度为: 1.2×10⁷ PFU/ml.

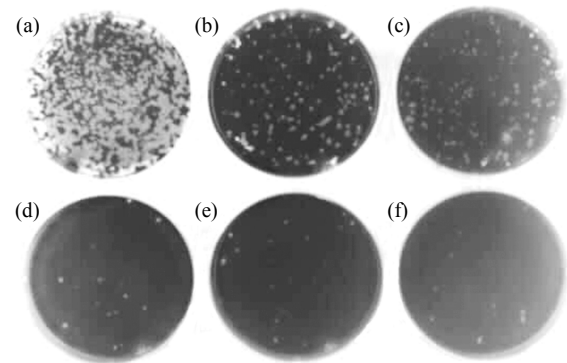


Fig. 1 Plaque of H1N1 virus in MDCK cell
(a) Virus dilution: 10⁻⁴. (b, c) Virus dilution: 10⁻⁵. Plaque was 115 and 119 respectively. (d, e, f) Virus dilution: 10⁻⁶. Plaque was 14, 13 and 9 respectively. Plaque forming unit (PFU)=12×10⁶=1.2×10⁷ PFU/ml.

2.2 流感病毒不同感染条件对单个核细胞凋亡的影响

考虑胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)对流感病毒复制的抑制作用和 TPCK-Trypsin 对单个核细胞的影响, 以不同的方式处理细胞, 培养 48 h 进行 PI 单染色, 流式细胞术检测不同处理方式下单个核细胞的凋亡水平, 以确定 FBS 和 TPCK-Trypsin 对流感病毒所诱导凋亡的影响. 结果如表 1 所示, 在无血清培养基中添加 1 mg/L 的 TPCK-Trypsin, 有利于病毒感染.

Table 1 Apoptosis of mononuclear cell with different treatments		
Manipulation method	%	
	Non-infection group	Virus-infection group
10%FBS(-)TPCK-Trypsin(-)	7.36	9.97
10%FBS(-)TPCK-Trypsin(1 mg/L)	8.30	24.29 ¹⁾
10%FBS(+)TPCK-Trypsin(1 mg/L)	6.13	12.96 ¹⁾

¹⁾P < 0.01, the apoptosis ratio of virus-infection group was significantly higher than non-infection group.

2.3 流感病毒不同感染时间对单个核细胞凋亡的影响

考虑病毒吸附时间的不同可能对凋亡比例造成的影响, 病毒吸附细胞 1、2、4、8 h 后, 细胞培养 48 h 分别进行 Annexin V-PI 荧光检测和流式细胞术检测. 结果如图 2、3 所示.

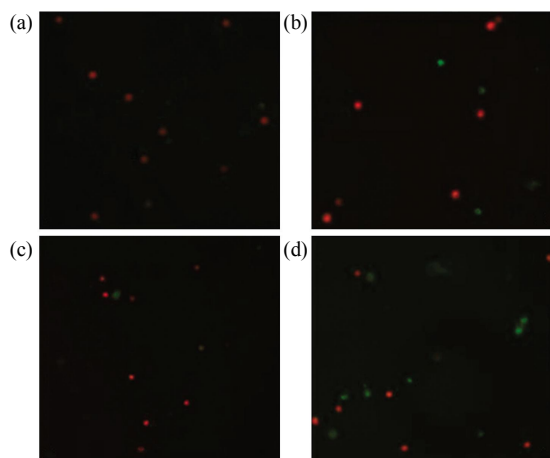


Fig. 2 Fluorescence microscope Annexin V-PI staining result

(a) Virus adsorbs lymphocyte for 1 h. (b) Virus adsorbs lymphocyte for 2 h. (c) Virus adsorbs lymphocyte for 4 h. (d) Virus adsorbs lymphocyte for 8 h. Early apoptosis of lymphocyte show green fluorescent and late apoptosis of lymphocyte show red fluorescent, green fluorescent was Annexin-V staining, red fluorescent was PI staining. There was no difference in proportion of apoptosis when cells were cultured 48 h after 1 h, 2 h, 4 h, 8 h virus adsorption.

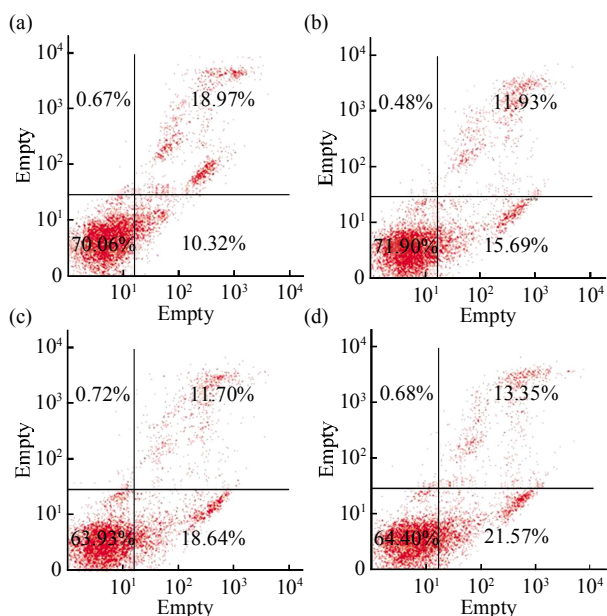


Fig. 3 The Annexin-V PI staining results for lymphocyte adsorbed by virus at different time

(a) Virus adsorbs lymphocyte for 1 h. (b) Virus adsorbs lymphocyte for 2 h. (c) Virus adsorbs lymphocyte for 4 h. (d) Virus adsorbs lymphocyte for 8 h. The Annexin-V PI staining results, lymphocyte cultured for 48 h after adsorbed by virus at 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, the proportion of apoptosis in lymphocyte was 29.28%, 27.62%, 30.34% and 34.92%, repeated test obtained the similar result. The result indicated that there was no difference in proportion of apoptosis when cells were cultured 48 h after 1 h, 2 h, 4 h, 8 h virus adsorption.

病毒吸附淋巴细胞 1、2、4、8 h 后培养 48 h, 流式细胞术检测淋巴细胞凋亡比例分别为 29.28%、27.62%、30.34%、34.92%, 重复试验, 得到相似的结果. 实验结果表明, 凋亡比例整体表现为上升趋势, 但病毒吸附时间与淋巴细胞凋亡之间无明显相关.

2.4 流感病毒感染单个核细胞的凋亡检测

按上述确立的感染条件, 用病毒感染复数 MOI=2 的 H1N1 流感病毒, 对 Ficoll 分离液分离得到的单个核细胞混合液吸附 1 h, 进一步分离得到淋巴细胞和单核巨噬细胞, 分别培养 12、24、48、72 h, 用 PI 单染流式细胞术检测细胞凋亡情况. 淋巴细胞凋亡结果如表 2, 单核巨噬细胞结果如表 3.

表 2 结果表明, 随着时间的推移, 淋巴细胞在流感病毒的作用下凋亡率逐渐增加. 同时, 随着淋巴细胞体外培养时间的延长, 淋巴细胞自身出现的凋亡也逐渐增加. 在 24~48h 这一时间段凋亡比例出现了较大幅度的变化, 未感染组凋亡比例由 6.02% 升至 32.6%, 病毒感染组则由 12% 升至 45.71%. 比较各时段的凋亡比例, $P < 0.01$, 差别有统计学意义.

表 3 结果表明, 培养 24 h 后, 单核巨噬细胞感染组凋亡比例较未感染组高, 说明流感病毒对单核巨噬细胞凋亡起促进作用. 从 48 h 开始, 病毒感染的单核巨噬细胞其凋亡比例则较未感染组低, 8 次重复试验均得到相似的结果. 48 h 后, 流感病毒对单核巨噬细胞的凋亡再无促进作用. 在 24~48 h 之间细胞凋亡情况发生了一次转换.

考虑到淋巴细胞和单核巨噬细胞一起吸附感染存在的相互影响, 我们还进行了以下实验. 实验一: 分离淋巴细胞和单核巨噬细胞, 病毒吸附 1 h 后再培养 48 h; 实验二: 病毒吸附混合的淋巴细胞和单核巨噬细胞 1 h 后, 再进行分离并培养 48 h. PI 单染流式细胞术检测比较实验一、实验二淋巴细胞凋亡区别. 结果如图 4 所示.

PI 单染色流式细胞术检测结果表明, 淋巴细胞和单核巨噬细胞先分离后再病毒吸附 1 h 进行培养, 与混合淋巴细胞和单核巨噬细胞病毒吸附 1 h 后再进行分离, 两者凋亡比例比较, 先细胞分离再病毒吸附组的凋亡比例较先病毒吸附再细胞分离组要高, 分别为 38.33%、23.21%, $P < 0.01$, 差别有统计学意义. 说明淋巴细胞与单核巨噬细胞之间存在相互作用, 并且单核巨噬细胞可能在吸附感染过程中分泌相关蛋白和细胞因子、趋化因子抑制了淋巴细胞的凋亡.

Table 2 Apoptosis of lymphocyte infected by influenza virus then cultured for different time

	%			
<i>t</i> _{cultivation} /h	12	24	48	72
Non-infection group	0.26	6.02 ± 2.11	32.60 ± 2.02	48.63 ± 1.95
Virus-infection group	7.03 ¹⁾	12.00 ± 1.93 ¹⁾	45.71 ± 2.13 ¹⁾	65.99 ± 1.82 ¹⁾

¹⁾*P* < 0.01, the apoptosis ratio of virus-infection group was significantly higher than non-infection group. $\bar{x} \pm s$, *n*=8.

Table 3 Apoptosis of mononuclear macrophage infected by influenza virus then cultured for different time

	%			
<i>t</i> _{cultivation} /h	12	24	48	72
Non-infection group	0.32	6.94 ± 2.13	12.38 ± 3.12	33.06 ± 2.03
Virus-infection group	0.96 ¹⁾	13.34 ± 2.67 ¹⁾	7.89 ± 2.34 ¹⁾	27.78 ± 1.89 ¹⁾

¹⁾*P* < 0.01, the apoptosis ratio of virus-infection group was significantly higher at 12 h and 24 h, but greatly lower at 48 h and 72 h compared with the non-infection group.

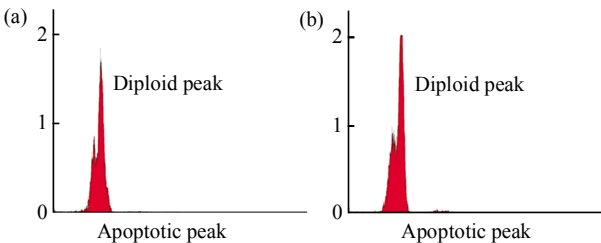


Fig. 4 PI staining of lymphocytes incubated for 48 h

(a) Apoptosis of lymphocyte isolated from mononuclear cell which was treated with influenza virus for 1 h. (b) Apoptosis of lymphocyte treated with influenza virus for 1 h after it was isolated from mononuclear cell.

2.5 单个核细胞感染流感病毒后 p53 基因转录水平的变化

由于 p53 是一种重要的凋亡诱导蛋白，为证实 p53 在流感病毒诱导的凋亡中所起到的作用，实验检测了流感病毒 H1N1 吸附淋巴细胞和单核巨噬细胞后培养 2、4、8、12 h 的 PCR 结果。结果如图 5、6 所示，流感病毒 H1N1 感染淋巴细胞后，

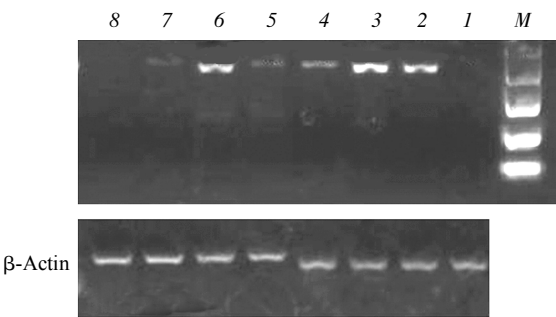


Fig. 6 RT-PCR results for mononuclear macrophage p53

M: Marker (PCR Marker, NEB), 1~4: Virus infected group(2 h, 4 h, 8 h, 12 h), 5~8: Control group(2 h, 4 h, 8 h, 12 h). Slight rise in control could be found after 4 h. p53 expression level in mononuclear macrophage is obviously higher in virus infected group than control at 8 h, 12 h.

p53 的 mRNA 与同期的对照细胞组相比无明显变化。流感病毒 H1N1 感染单核巨噬细胞后，在 8 h 和 12 h mRNA 表达水平明显上调。p53 的 mRNA 转录水平的上调与凋亡水平具有相关性。

2.6 抑制 p53 对流感病毒感染的单个核细胞凋亡的影响

将单个核细胞进行分离后，加入 30 mmol/L 终浓度的 p53 抑制剂 PFT-α 进行预处理，2 h 后用流感病毒 H1N1 吸附，培养 48 h 后对淋巴细胞、单核巨噬细胞进行 PI 染色，流式细胞术检测凋亡情况。结果如图 7 和图 8 所示，加入 PFT-α 后，淋巴细胞对照组与病毒感染组之间的凋亡比例分别为 0.86%、0.68%，*P* > 0.05。单核巨噬细胞对照组与病毒感染组之间的凋亡比例分别为 4.42%、4.74%，*P* > 0.05，均不再有凋亡峰的出现，即 PFT-α 使病毒感染组凋亡比例明显下降，结果提示，p53 抑制剂 PFT-α 可以抑制流感病毒感染所致的单个核细胞的凋亡。

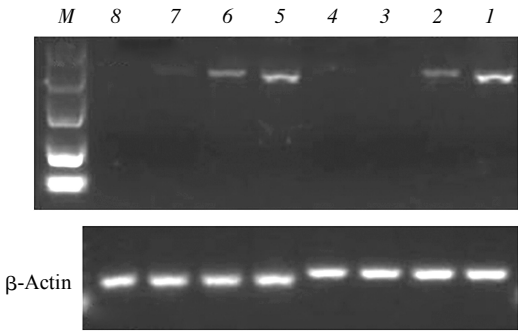


Fig. 5 RT-PCR results for lymphocyte p53

M: Marker (PCR Marker, NEB), 1~4: Virus infected group(2 h, 4 h, 8 h, 12 h), 5~8: Control group(2 h, 4 h, 8 h, 12 h). p53 expression level in lymphocyte rise at 2 h, 4 h both in virus infected group and control.

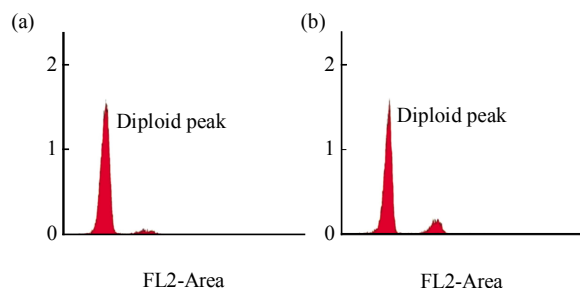


Fig. 7 PI staining results for lymphocytes incubated for 48 h

After adding p53 inhibitor (PFT- α) and cultivating 48 h, the proportion of apoptosis in lymphocyte was 0.86% and 0.68% ($P > 0.05$), no more apoptotic peak was found in virus infected and control group. (a) Control group. (b) Virus infected group.

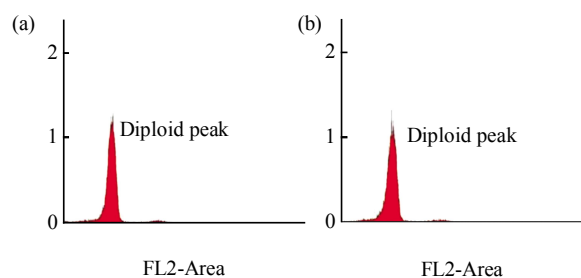


Fig. 8 PI staining results for mononuclear macrophage incubated for 48 h

After adding p53 inhibitor (PFT- α) and cultivating 48 h, the proportion of apoptosis in mononuclear macrophage was 4.42% and 4.47% ($P > 0.05$), no more apoptotic peak was found in virus infected and control group. (a) Control group. (b) Virus infected group.

3 讨 论

本研究选取人类 A 型流感病毒, 体外接种于人外周血单个核细胞. 通过对单个核细胞的不同处理, 探讨其与凋亡的相关性以及单个核细胞中单核巨噬细胞和淋巴细胞间可能的相互作用, 并尝试探寻参与凋亡反应过程的相关蛋白和细胞因子. 考虑到培养条件、处理方式对单个核细胞凋亡的影响, 对单个核细胞做了 3 种处理方式, 包括: a. 单个核细胞中加入 FBS 和 TPCK-Trypsin; b. 只加入 TPCK-Trypsin; c. 既不加入 TPCK-Trypsin, 也不含 FBS. 试验结果表明, 终浓度为 1 mg/L 的 TPCK-Trypsin 的加入并未对单个核细胞的凋亡造成显著影响, 而 10% FBS 的加入则对单个核细胞的凋亡有抑制作用, 这与众多文献中提到的流感病毒能被血清非特异性抑制这一结果相符^[13].

实验结果表明, 淋巴细胞病毒感染组和其未感染组在 48h 均开始出现较明显的凋亡峰, 但病毒感染组凋亡比例明显较未感染组高. 分析未感染组出现凋亡的原因可能包括以下几个方面: a. 在分离外周血时或在处理单个核细胞时受到了机械损伤; b. 培养过程中没有加入 FBS; c. 单个核细胞, 特别是淋巴细胞, 在体外易凋亡. 整个试验采取将单个核细胞置于 6 孔板中进行病毒吸附的方式, 使用流感病毒吸附细胞 1~2 h, 病毒吸附的同时, 根据淋巴细胞悬浮生长、单核巨噬细胞贴壁生长的特性进行分离, 并分别培养 12、24、48、72 h. 人外周血淋巴细胞在 H1N1 流感病毒诱导下的凋亡也进一步证实了流感病毒能促进淋巴细胞凋亡这一事实^[14]. 但单核巨噬细胞的凋亡情况却与一些文献报道有不一致之处, 我们的实验结果表明, 单核巨噬细胞感染并培养 24 h 后流感病毒对其凋亡具有促进作用, 但培养 48 h 和 72 h 后流感病毒对其凋亡无明显作用. 出现这种结果可能与单核巨噬细胞有分泌相关的蛋白质或细胞因子、趋化因子抑制自身的凋亡有关, 或者其中涉及到淋巴细胞的共参与. Tadlock 等^[15]在 2003 年用 H5N1 感染外周血单核巨噬细胞时发现, 病毒能诱导 p38 MAPK 的活化, 并最终能抑制 caspase-3、-8、-9. 2002 年 Cheung 等^[16]和 2005 年 Tyner 等^[17]也发现, 无论是 H5N1 还是 H1N1 均能诱导人外周血单核巨噬细胞产生趋化因子 Ccl5, 而在单核巨噬细胞中 Ccl5 与其受体的结合又能诱导抗凋亡信号的产生.

将 P53 抑制剂 PFT- α 加入到淋巴细胞和单核巨噬细胞中培养 48 h 后, 流式细胞术 PI 单染色的结果显示, 未感染组和病毒感染组的凋亡峰均消失, 表明淋巴细胞和单核巨噬细胞的凋亡可能与 p53 存在一定的联系, p53 可促进淋巴细胞和单核巨噬细胞的凋亡. 结果进一步说明了 p53 在凋亡中所起到的作用, 也提示 p53 参与的凋亡诱导途径可能是流感病毒诱导细胞凋亡的一条公共途径^[18, 19], 进一步的研究正在进行中.

参 考 文 献

- 1 Bourmakina S V, Adolfo G S. Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus. *J Gen Virol*, 2003, **84**(3): 517~527
- 2 Webster R G, Bean W J, Gorman O T, *et al.* Evolution and ecology of influenza A virus. *Microbiol Rev*, 1992, **56**(1): 152~179
- 3 Murphy B R, Webster R G. *Orthomyxoviruse*, Field Virology. 3rd. Lippincott-Raven, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilking American, 1996. 1397~1445

- 4 Fouchier R A, Munster V, Wallensten A, *et al.* Characterization of a novel Influenza A virus Hemagglutinin subtype (H16) obtained from Black-Headed gulls. *J Virol*, 2005, **79**(5): 2814~2822
- 5 Granville D, Carthy D, Yang D, *et al.* Interaction of viral proteins with host cell death machinery. *Cell Death Differ*, 1998, **5**(8): 653~659
- 6 Teodoro J G, Branton P E. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol*, 1997, **71**(3): 1739~1746
- 7 Wang G F, Zhang J, Li W Z, *et al.* Apoptosis and proinflammatory cytokine responses of primary mouse microglia and astrocytes induced by human H1N1 and avian H5N1 influenza viruses. *Cell Mol Immunol*, 2008, **5**(2): 113~120
- 8 Mahmoud R Hussein. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update*, 2005, **11**(2): 162~178
- 9 Brydon E W A, Smith H, Sweet C. Influenza A virus-induced apoptosis in bronchiolar epithelial (NCI-H292) cells limits pro-inflammatory cytokine release. *J Gen Virol*, 2003, **84** (9): 2389~2400
- 10 Uchide N, Ohyama K, Bessho T, *et al.* Induction of pro-inflammatory cytokine gene expression and apoptosis in human chorion cells of fetal membranes by influenza virus infection: possible implications for maintenance and interruption of pregnancy during infection. *Med Sci Monit*, 2005, **11**(1): RA7~16
- 11 Uchide N, Suzuki A, Ohyama K, *et al.* Secretion of bioactive interleukin-6 and tumor necrosis factor- α proteins from primary cultured human fetal membrane chorion cells infected with influenza virus. *Placenta*, 2006, **27**(6~7): 678~690
- 12 Wang G F, Lin S Y, Zhang H, *et al.* Apobec 3F and apobec 3G have no inhibition and hypermutation effect on the human influenza A virus. *Acta Virol*, 2008, **52**(3): 193~194
- 13 Skehel J, Wiley D C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 2000, **69**: 531~569
- 14 Nichols J E, Niles J A, Roberts N J. Human lymphocyte apoptosis after exposure to influenza A virus. *J Virol*, 2001, **75**(13): 5921~5929
- 15 Tadlock L, Yamagiwa Y, Marienfeld C, *et al.* Doublestranded RNA activates a p38 MAPK-dependent cell survival program in biliary epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, **284**(6): 924~932
- 16 Cheung C Y, Poon L L, Lau A S. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease?. *Lancet*, 2002, **360**(9348): 1831~1837
- 17 Tyner J W, Uchida O, Kajiwarra N, *et al.* CCL5-CCR5 interaction provides antiapoptotic signals for macrophage survival during viral infection. *Nat Med*, 2005, **11**(11): 1180~1187
- 18 Elizabeth T, Imberly L, Eremy J, *et al.* Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 in cell death and viral replication. *J Virol*, 2005, **79**(14): 8802~8811
- 19 Zhirnov O P, Klenk H D. Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis*, 2007, **12**(8): 1419~1432

H1N1 Influenza A Virus Induced Apoptosis of Peripheral Blood Mononuclear Cell*

ZHANG Heng, WANG Ge-Fei, GAO Yuan-Li, CHEN Xiao-Xuan, LIN Gui-Mei, LI Kang-Sheng**

(Department of Microbiology and Immunology, The Key Immunopathology Laboratory of Guangdong Province, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, China)

Abstract Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) was induced apoptosis when infected by influenza A virus. To observe the interaction between lymphocyte and macrophage, the lymphocyte and macrophage were induced by H1N1 subtype influenza virus. The result showed that apoptosis of PBMC including lymphocyte and macrophage was promoted by virus infection in the first 48 h, but the apoptosis of macrophage was inhibited after 48 h cultivation. According to fluorescent staining and flow cytometry there was no difference in apoptosis of lymphocyte after virus adsorption at different time. The result showed that there was no relationship between apoptosis and adsorption time. The apoptosis of lymphocyte and macrophage was detected when PFT- α was added, the result show that the apoptosis of lymphocyte and macrophage was inhibited. It hinted that p53 may be impact the apoptosis of lymphocyte and mononuclear macrophage that treated with influenza virus.

Key words peripheral blood mononuclear cell, influenza A virus, apoptosis, p53

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00486

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(30771988, 30571674), The National Natural Science Foundation of Guangdong Province(05008347, 04020239) and Funds for Outstanding Young Scientists in Universities of Guangdong Province(LYM08056).

**Corresponding author. Tel: 86-754-88900456, E-mail: ksli@stu.edu.cn

Received: January 5, 2009 Accepted: February 9, 2009