

## IBDV 强毒株感染 SPF 鸡后法氏囊淋巴细胞的凋亡及调控机制

刘玉锋<sup>1</sup> 余锐萍<sup>1</sup> 李慧姣<sup>2</sup> 梁明珍<sup>3</sup> 彭芳珍<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学 动物医学院,北京 100094; 2. 中国兽药监察所,北京 100081;  
3. 北京兽医实验诊断所,北京 100101)

**摘要** 为探究 IBDV 强毒 BC6/85 株感染 SPF 鸡后 1~9 d 内法氏囊淋巴细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的动态表达与淋巴细胞凋亡的关系,通过透射电镜观察及 TUNEL 法检测凋亡的淋巴细胞,用免疫组织化学方法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白。研究表明:感染后 3~5 d 可见到大量凋亡的淋巴细胞,Bcl-2 和 Bax 蛋白表达量显著高于同时点的对照组 ( $P < 0.01$ ); Bcl-2/Bax (Bcl-2 与 Bax 比率)显著低于同时点的对照组 ( $P < 0.01$ )。BC6/85 株感染 SPF 雏鸡 3~5 d 后法氏囊淋巴细胞会发生大量凋亡,Bcl-2/Bax 能准确反映淋巴细胞的凋亡程度。

**关键词** 无特定病原的鸡; IBDV 强毒株; 法氏囊; 细胞凋亡; Bax 蛋白; Bcl-2 蛋白

**中图分类号** S 851.331

**文章编号** 1007-4333(2004)03-0045-04

**文献标识码** A

### Apoptosis and dynamic expression of Bax and Bcl-2 in lymphocytes of bursa of SPF chickens infected with BC6/85

Liu Yufeng<sup>1</sup>, She Ruiping<sup>1</sup>, Li Huijiao<sup>2</sup>, Liang Mingzhen<sup>3</sup>, Peng Fangzhen<sup>1</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

3. Beijing Diagnostic Institute of Veterinary Experiment, Beijing 100101, China)

**Abstract** The objective of the present study was to investigate the apoptosis and dynamic expression of Bcl-2 or Bax in lymphocytes of bursa of 21-day-old SPF chickens infected with BC6/85 from the first to ninth day post infection (PI). The apoptosis was observed by electron microscope, the apoptotic rate was assessed by TUNEL method, and the expressions of Bcl-2, Bax were investigated by immunohistochemical ABC method. The results showed that the apoptosis of lymphocytes in bursa of chickens infected with BC6/85 from the third to fifth day PI significantly increased than that of normal SPF chickens ( $P < 0.01$ ). The expression of Bcl-2 or Bax was significantly increased in lymphocytes of bursa of SPF chickens infected with BC6/85 from the third to fifth day PI than in those of normal chickens ( $P < 0.01$ ). The ratio of Bcl-2 to Bax was significantly decreased compared with that of normal chickens from the third to fifth day PI ( $P < 0.01$ ). The results demonstrate that a great deal of lymphocyte disappearance in the bursa of SPF chickens infected with BC6/85 from the third to fifth day is related to apoptosis. The ratio Bcl-2 to Bax could precisely reflect the degree of lymphocyte apoptosis of bursa.

**Key words** special-pathogen-free chicken; virulent IBDV; bursa; apoptosis; Bax; Bcl-2

鸡传染性法氏囊病 (infectious bursal disease, IBD) 是由传染性法氏囊炎病毒 (IBDV) 引起的鸡的急性、高度接触性传染病。体外试验表明,IBDV 可以引起多种动物细胞系发生凋亡<sup>[1~5]</sup>,关于 IBDV 感染鸡体后法氏囊淋巴细胞的凋亡及其机制尚未见

报道。本实验采用免疫组织化学方法、脱氧核糖核酸末端转移酶介导的缺口末端标记 (TUNEL) 技术及透射电镜观察的方法,对法氏囊强毒 BC6/85 株感染 SPF 鸡后法氏囊淋巴细胞凋亡及其调控蛋白进行了动态观察,从细胞凋亡的角度进一步揭示

收稿日期: 2004-02-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270995)

作者简介: 刘玉锋,博士研究生;余锐萍,教授,通讯作者,主要从事黏膜免疫细胞与分子病理学研究。

IBDV 感染鸡的免疫抑制机理。

## 1 材料与方法

1) 实验动物及分组。75 只 21 日龄 SPF 蛋雏鸡分成 2 组, 对照组 25 只、BC6/85 株攻毒组 50 只, 试验鸡隔离饲养场地由中国兽药监察所提供。

2) 实验毒株。IBDV 强毒 BC6/85 株 ( $CI_{50} = 10^{5.5}/0.1 \text{ mL}$ ), 由中国兽药监察所提供。以  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7.2) PBS 缓冲液将保存种毒作 1:100 稀释, 实验组每只鸡分别经滴鼻、点眼接种 0.2 mL。对照组只用 0.2 mL PBS 缓冲液滴鼻、点眼。

3) 实验时间。对照组和实验组于感染后 1, 3, 5, 7 和 9 d 各剖杀 5 只, 取法氏囊组织并用 2.5% (体积分数, 下同) 戊二醛-多聚甲醛混合固定液固定。

4) 主要试剂。凋亡检测试剂盒购自武汉博士德公司, Rabbit anti-Bax (H277) 和 Rabbit anti-Bcl-2 购自美国 Santa cruz Biotechnology 公司。

5) 法氏囊的病理组织学观察。采用常规 H. E. 染色方法, 光学显微镜观察。

6) 法氏囊组织的电镜观察。将法氏囊组织修切成  $1 \text{ mm}^3$  的小块, 经 2.5% 戊二醛-多聚甲醛液固定 24 h 以上, PBS 冲洗后, 经 1% (体积分数) 的锇酸后固定 1 h, PBS 充分冲洗后, 按常规超薄切片样品制作法脱水, 包埋, 切片, 醋酸双氧铀、柠檬酸铅双重染色日立 100 透射电镜观察。

7) 法氏囊淋巴细胞凋亡的检测。采用原位缺口末端标记法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL), 染色步骤按产品说明书进行。

8) Bcl-2 和 Bax 免疫组化染色。采用一抗-生物

素标记的二抗-链霉卵蛋白标记的辣根过氧化物酶复合物 (ABC) 法, 按北京中山试剂公司试剂盒操作, 用 PBS 替代一抗作为阴性对照。

9) 图像分析和统计方法。用 Motic 病理图文分析系统, 每张切片均选紧邻的 3 个视野, 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 Oxstat 数理统计程序完成组间配对资料显著性检验 ( $t$  检验)。

## 2 实验结果

### 2.1 法氏囊的病理组织学观察结果

BC6/85 株攻毒后第 1 天, 法氏囊组织结构形态基本正常, 攻毒后 3~9 d, 滤泡髓质部淋巴细胞变性, 坏死, 有些形成大的囊状空腔; 嗜嗜性白细胞浸润, 网状细胞增多。间质水肿, 嗜嗜性白细胞浸润。后期淋巴滤泡严重萎缩甚至消失, 上皮细胞增生形成腺体样结构。间质中有大量结缔组织增生。

### 2.2 法氏囊淋巴细胞的电镜观察

对照组法氏囊淋巴细胞中染色质分布均匀, 核膜规则, 细胞形态基本正常。BC6/85 株攻毒后第 1 天, 与对照组无明显区别。3~5 d 淋巴细胞变小, 染色质浓缩成“月牙形”, 凝集在核一侧; 也可见染色质凝集成块, 占据整个细胞核, 表现为黑洞样。同时可见到吞噬有凋亡淋巴细胞的巨噬细胞 (图 1(a), (b))。7~9 d 与对照组无明显的差别。

### 2.3 TUNEL 法原位检测法氏囊淋巴细胞的凋亡

对照组法氏囊淋巴细胞凋亡数 1~9 d 差异不大; 攻毒组法氏囊淋巴细胞在攻毒后 3~5 d 凋亡数量显著增多 (图 1(c), (d)), 各时点明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )。攻毒后 7~9 d 法氏囊淋巴细胞的凋亡数量与对照组差别不显著 (表 1)。

表 1 法氏囊组织中淋巴细胞凋亡数量的变化

Table 1 The variation of the number of apoptotic lymphocytes in bursa  $\uparrow \text{mm}^{-2}$

组别	试验鸡数/只	攻毒后的时间/d				
		1	3	5	7	9
对照组	5	322 ±17	311 ±33	295 ±22	318 ±39	296 ±26
BC6/85 株攻毒组	5	317 ±31	2 613 ±58	2 604 ±75	349 ±28	351 ±31

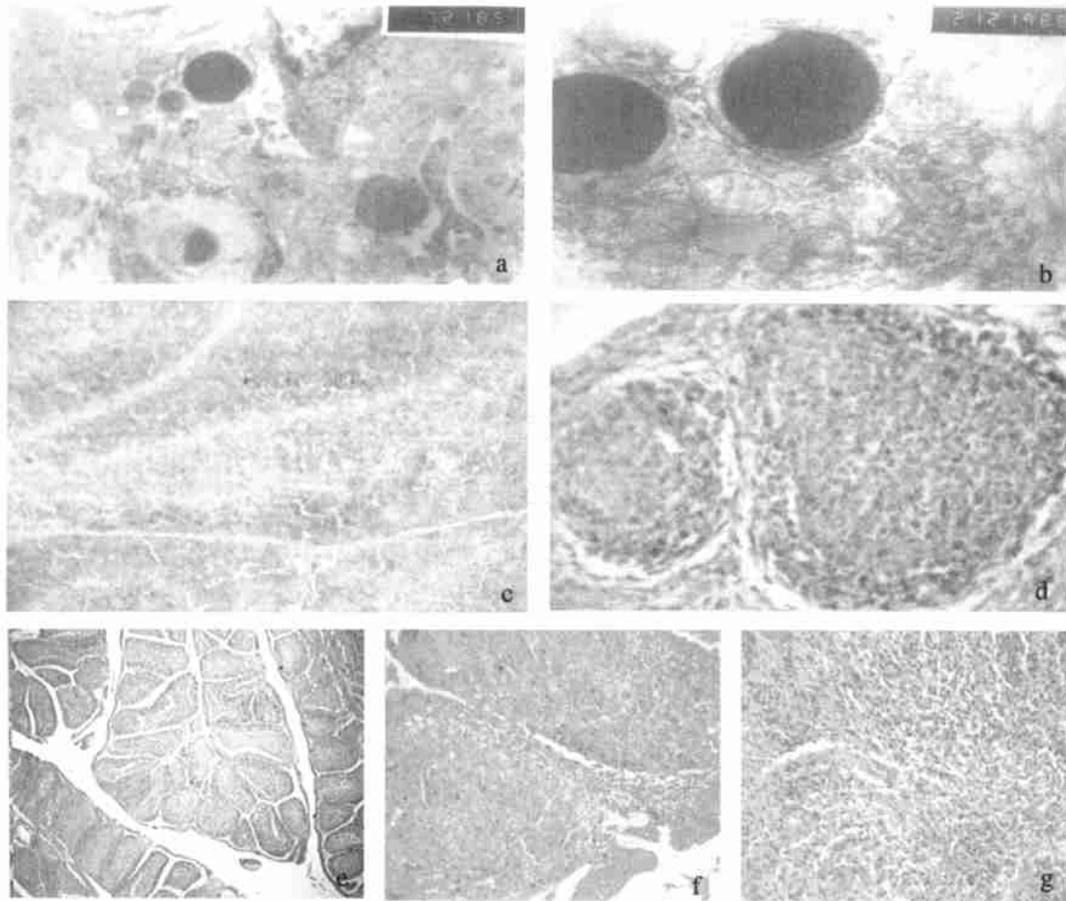
### 2.4 法氏囊淋巴细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

Bcl-2 和 Bax 蛋白表达部位在淋巴细胞的胞质。对照组 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达量, 以及 Bcl-2/Bax 在实验各时点差异均无显著性; 攻毒组在攻毒后 3~5 d Bcl-2 和 Bax 蛋白表达量均显著高于同时点的对照组 ( $P < 0.01$ ), Bcl-2/Bax, 明显低于同时点的对照

组 ( $P < 0.01$ ) (图 1(e) —(g)) (表 2)。

## 3 讨论

细胞凋亡是多细胞生物更新正常细胞和清除异常细胞的重要手段, 在生殖、胚胎发育、免疫、肿瘤、病毒感染等过程中都起着重要的作用。研究细胞凋



- (a) BC6/85 株感染 SPF 鸡后第 3 天法氏囊中凋亡的淋巴细胞 (×7 000) ;  
 (b) BC6/85 株感染 SPF 鸡后第 3 天法氏囊巨噬细胞中吞噬有凋亡小体 (×21 000) ;  
 (c) 对照组第 3 天法氏囊淋巴细胞 TUNEL 实验结果 (×40) ;  
 (d) BC6/85 株感染鸡后第 3 天法氏囊淋巴细胞 TUNEL 实验结果 (×40) ;  
 (e) 未加一抗的免疫组化阴性对照片 (×10) ;  
 (f) BC6/85 株感染 SPF 鸡后第 3 天法氏囊淋巴细胞中 Bax 的免疫组化结果 (×40) ;  
 (g) BC6/85 株感染 SPF 鸡后第 5 天法氏囊淋巴细胞中 Bcl-2 的免疫组化结果 (×40) 。

图 1 BC6/85 株感染 SPF 鸡后法氏囊淋巴细胞凋亡及 Bax 和 Bcl-2 蛋白动态表达

Fig. 1 The apoptosis and expression of Bax and Bcl-2 in lymphocytes of bursa of SPF chickens infected with BC6/85

亡的方法很多,如用光镜和电镜进行形态学观察,琼脂糖凝胶电泳, TUNEL 法,流式细胞仪检测等<sup>[6~8]</sup>,其中超微结构观察被认为是定性检测细胞凋亡的经典方法。TUNEL 法是利用组织学、免疫学、分子生物学的实验技术,在组织原位直接观察凋亡细胞的方法,具有敏感性高、特异性强、可量化凋亡细胞数量的特点。

本实验应用组织病理学观察、透射电镜观察和 TUNEL 方法,分别从定性和定量的角度对 BC6/85 株感染 SPF 雏鸡后法氏囊淋巴细胞的凋亡情况进行动态观察。组织病理学观察发现法氏囊组织在攻

毒后 3~5 d 出现“星空样变”甚至囊状空腔,提示淋巴细胞出现排空现象,这与细胞凋亡有关。透射电镜观察和 TUNEL 方法也表明这一时期是攻毒组淋巴细胞凋亡的高峰。这一试验结果与陈明勇<sup>[9]</sup>报道的 IBDV 变异 E 株感染法氏囊培养细胞 2~48 h 后可观察到凋亡,薛春宜<sup>[10]</sup>报道的用 5 株 IBDV 毒株感染鸡胚成纤维细胞 7 h 后即可见到细胞凋亡有差异。造成这种差异的原因首先与实验材料不同有关。IBDV 通过滴鼻点眼方法感染鸡体后,通过血液循环到达并感染法氏囊组织需要一定的时间,同时鸡体作为一个有机整体在感染病原后会动员全身

表 2 法氏囊淋巴细胞中 Bcl-2, Bax 蛋白表达面密度和 Bcl-2/ Bax 比率

Table 2 The percentage of area of apoptotic lymphocytes and the ratio of Bcl-2 to Bax

试验时间	免疫组化指标	对照组	BC6/85 株攻毒组
第 1 天	Bax	(1.32 ± 0.22) %	(1.47 ± 0.14) %
	Bcl-2	(3.85 ± 0.42) %	(3.40 ± 0.22) %
	Bcl-2/ Bax	3.01 ± 0.84	2.32 ± 0.15
第 3 天	Bax	(1.23 ± 0.23) %	(5.17 ± 0.40) %
	Bcl-2	(3.59 ± 0.14) %	(5.04 ± 0.17) %
	Bcl-2/ Bax	3.04 ± 0.79	0.92 ± 0.08
第 5 天	Bax	(1.27 ± 0.20) %	(5.85 ± 0.25) %
	Bcl-2	(3.78 ± 0.31) %	(5.38 ± 0.29) %
	Bcl-2/ Bax	3.06 ± 0.75	0.98 ± 0.07
第 7 天	Bax	(1.34 ± 0.28) %	(1.57 ± 0.18) %
	Bcl-2	(3.79 ± 0.23) %	(3.69 ± 0.19) %
	Bcl-2/ Bax	2.91 ± 0.59	2.39 ± 0.40
第 9 天	Bax	(1.25 ± 0.29) %	(1.43 ± 0.17) %
	Bcl-2	(3.67 ± 0.31) %	(3.24 ± 0.23) %
	Bcl-2/ Bax	3.07 ± 0.84	2.30 ± 0.34

防御机能来对抗这种损伤过程;而法氏囊培养细胞和鸡胚成纤维细胞缺少整体防御机制,只存在细胞水平上的抗损伤机制。其次,这种差异可能与实验使用的 IBDV 毒株的毒力不同有关。

Bcl-2 蛋白和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax) 分别是 Bcl-2 蛋白家族中最有代表性的抑制和促进凋亡蛋白。Bcl-2 主要生物学功能为与 Bax 形成无功能的异二聚体,竞争性抑制 Bax 所介导的线粒体膜蛋白通道的形成,发挥抑制凋亡的作用。当 Bcl-2 过量时,形成 Bcl-2 同源二聚体,细胞受到保护;当 Bax 过量时,形成 Bax 同源二聚体,细胞则趋向死亡<sup>[11,12]</sup>。

为进一步阐明 IBDV 引起鸡群发病及免疫抑制的机理,本实验采用免疫组织化学方法首次对法氏囊淋巴细胞中凋亡调控蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达进行了动态观察,结果发现 Bcl-2 和 Bax 蛋白在 BC6/85 株攻毒后 3~5 d 都高效表达,明显高于对照组法氏囊淋巴细胞中的表达量。由此推测 Bcl-2 和 Bax 在 BC6/85 感染 SPF 雏鸡后法氏囊淋巴细胞凋亡过程中均发挥了作用。实验结果还表明法氏囊淋巴细胞中的 Bcl-2/ Bax 在 BC6/85 感染后 3~5 d 明显低于

对照组,因此推测 Bcl-2 和 Bax 二者表达水平之间的平衡结果决定了法氏囊组织中淋巴细胞生存还是凋亡。

总之,本实验结果提示,BC6/85 感染 SPF 雏鸡后 3~5 d 会引起法氏囊组织中淋巴细胞大量凋亡,Bcl-2/ Bax 能更准确的反映淋巴细胞凋亡的发生程度。淋巴细胞的大量凋亡是 BC6/85 株感染 SPF 鸡后法氏囊发生萎缩的重要原因。

## 参 考 文 献

- [1] Tham K M, Moon C D. Apoptosis in cultures induced by infectious bursal disease virus following in vitro infection [J]. Avian Disease, 1996, 40:109~113
- [2] Vasconcelos A C, Lam K M. Apoptosis induced by infectious bursal disease virus [J]. J Virol, 1994, 75:1803~1806
- [3] Vasconcelos A C, Lam K M. Apoptosis in chicken embryos induced by infectious bursal disease virus [J]. Journal of Comparative Pathology, 1995, 112:327~338
- [4] Fernandez-arias A S, Rodriguez J F. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer [J]. J Virol, 1997, 71(10):8014~8018
- [5] 吕英姿,曹永长,陈峰,等. 传染性囊病病毒 VP2 蛋白诱导细胞凋亡的研究 [J]. 华南农业大学学报(自然科学版), 2002, 2(23):70~73
- [6] 彭黎明. 细胞凋亡检测方法的研究进展 [J]. 中华病理学杂志, 2001, 30(2):135~136
- [7] Rien I E W, Reutelingsperger C P M, Holdaway K M. The use of annexin-V and TUNEL to monitor the progression of apoptosis in plants [J]. Cytometry, 1997, 29:28
- [8] Ormerod M G. The study of apoptotic cells by flow cytometry [J]. Leukemia, 1998, 12:1013~1025
- [9] 陈明勇,陈德威,高齐瑜,等. 传染性法氏囊病病毒变异 E 株感染法氏囊培养细胞凋亡的研究 [J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(5):108~112
- [10] 薛春宜,毕英佐,曹永长,等. 用 ELISA 检测传染性法氏囊病病毒诱导的细胞凋亡 [J]. 华南农业大学学报, 1999, 20(4):28~32
- [11] 刘卫军. 线粒体、Bcl-2S 与凋亡 [J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 1999, 19(2):113~115
- [12] 赵宇彤,赵晶,崔秀云,等. 细胞凋亡的分子机制 [J]. 生物工程进展, 1999, 3(19):83~85