

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

陈明勇 陈德威 高齐瑜 张冰

(中国农业大学动物医学院)

摘要 研究了传染性法氏囊病病毒(BDV)变异 E 株人工感染体外培养法氏囊细胞的凋亡。电镜观察和 DNA 电泳分析表明, BDV 感染后 4~ 24 h, 法氏囊培养细胞呈现典型细胞凋亡的形态学特征和生化特征。经流式细胞计检测、荧光染色观察和统计学分析表明, BDV 感染后 4~ 24 h, 法氏囊培养细胞凋亡数量显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。试验结果说明 BDV 变异 E 株人工感染可以诱导法氏囊培养细胞凋亡。

关键词 传染性法氏囊病病毒变异 E 株; 细胞凋亡; 法氏囊培养细胞

分类号 S855.3; S851.65

Studies on Apoptosis in Target Cell Infected with Variant Serotype -1 Isolate E of Infectious Bursal Disease Virus

Chen Mingyong Chen Dewei Gao Qiyu Zhang Bing

(College of Veterinary Medicine, CAU)

Abstract Apoptosis of the chicken embryo bursal cells (CEB) infected with variant serotype-1 isolate E of infectious bursal disease virus (BDV) was studied. The BDV-infected CEB exhibited the morphological and biochemical features of apoptosis at 4~ 24 h after infection using the methods of transmission electron microscope and agarose gel electrophoresis of cellular DNA. Statistical analyses by flow cytometry and staining with fluorescent DNA-binding dyes indicated that the number of apoptotic cells in the CEB increased significantly by 4~ 24 h post infection ($P < 0.05$ or 0.01). The results revealed that the target cells infected artificially with BDV were induced to display apoptosis.

Key words variant serotype-1 isolate E of infectious bursal disease virus; apoptosis; target cell

传染性法氏囊病病毒是双 RNA 病毒科, 双 RNA 病毒属的一个成员, 主要侵害鸡的法氏囊, 导致其损伤和免疫抑制。传染性法氏囊病的病理组织学变化主要表现为法氏囊淋巴细胞大量减少^[1]。研究证实, 法氏囊淋巴细胞是 BDV 的主要靶细胞^[2,3]。为了探索 BDV 对靶细胞的杀伤机制, 本试验利用电镜技术、DNA 电泳分析、流式细胞术和荧光染色技术对 BDV 变异 E 株人工感染靶细胞凋亡进行了较为详尽的研究, 旨在进一步了解 BDV 变异 E 株对法氏囊培养细胞发生凋亡的机制。

收稿日期: 2000-04-07

陈明勇, 北京海淀区圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区), 100094

1 材料和方法

BDV 变异 E 株: 由中国农业大学生物学院张曼夫教授提供, 毒价为每 0.1 mL $10^{6.5}$ TCID₅₀, -70℃ 保存, 使用前复壮。

SPF 种蛋: 购自中国兽医药品监察所。

小牛血清: 购自美国 Gibco 公司, 65℃ 灭活 30 min, 分装, -20℃ 冻存备用。

细胞培养液: MEM 培养基干粉, 购自美国 Gibco 公司, 按说明加入青、链霉素 ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 用碳酸氢钠调整 pH 7.2~7.4, 过滤除菌, 分装保存, 使用时分别加入 8%、4% 小牛血清配成细胞生长液和细胞维持液。

鸡胚法氏囊细胞 (CEB) 的制备: 取 18 日龄 SPF 鸡胚, 在无菌条件下, 取鸡胚法氏囊组织于无菌烧杯中, 反复剪碎, 加 Hank's 液, 充分洗涤 2 次, 于沉淀组织中加入 3~5 倍量 0.5% 胰酶, 混匀后置 37~39℃ 水浴锅中消化 20~30 min, 沉淀, 吸去胰酶溶液, 用 Hank's 液充分洗涤, 沉淀细胞加入细胞生长液, 用大口径吸管反复吹打数次, 经双层灭菌纱布过滤, 计数分装于 100 mL 细胞培养瓶中, 置 37℃、含 5% CO₂ 培养箱中培养, 至 84~96 h 即长成 90% 以上单层细胞^[4]。

感染与取材: 取生长成单层的 CEB, 弃去细胞生长液, 用 Hank's 液轻轻洗涤 1 次, 接种 BDV 变异 E 株, 接种量为 0.1 mL, 加入 3 mL 细胞维持液, 37℃ 吸附 90~120 min, 弃去接种液, 用 Hank's 液洗涤 1 次, 加入足够的细胞维持液, 置 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中继续培养。接毒后 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h, 取培养的 CEB 进行相应处理和检测。

电镜观察: 取上述培养 CEB 样品, 2.5% 戊二醛固定, 4~24 h 后用缓冲液漂洗, 1% 锇酸后固定, 漂洗, 常规丙酮系列脱水, Epon812 包埋, 常规制作超薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铅双染色, 透射电镜观察、照像。

DNA 电泳分析: 按 Vasconcelos 等 (1995) 方法略加改进进行^[5]。

流式细胞术检测: 按 Lam (1995) 方法略加改进进行^[6]。

取上述病毒感染组和对照组培养 CEB 细胞, 按 Lam (1995) 方法收集病毒感染后不同时间及其相应对照组的 CEB 制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 使用流式细胞仪检测细胞大小和数量, 观察前向光散射和侧散射光谱, 作光散射图谱, 计算机软件分析。

10 凋亡指数的测定: 按 Duke and Cohen (1992) 方法略加改进进行^[7]。

11 数据的统计处理: 所有数据与对照组比较, 进行 2 个样本均数差异的显著性 t 检验。

2 结果

2.1 法氏囊培养细胞的超微结构

BDV 接种法氏囊培养细胞后 2~8 h, 可见培养法氏囊细胞核染色质浓集, 聚集成一个或数个电子密度很高的团块, 凝集在核膜周边, 形成典型的半月形或新月形的凋亡小体 (图 1-1)。病毒接种后 12~24 h, 凋亡细胞数量明显增多, 在镜下可见大量的上述形态的凋亡小体和凋亡细胞, 同时在细胞培养液中可见少量的由单位膜包裹的、发育程度不一致的病毒颗粒 (图 1-2)。病毒感染后 36~48 h, 法氏囊培养细胞内凋亡细胞数量显著下降。而对照组法氏囊培养

细胞细胞结构基本正常,对照组CEB在培养后2~48 h,上述细胞凋亡现象也有增加趋势,但与病毒接种法氏囊培养细胞相比,细胞凋亡现象明显少见(图1-3)。

2.2 法氏囊培养细胞DNA电泳

BDV接种后4, 8, 12, 24 h,法氏囊培养细胞总DNA样品在琼脂糖凝胶板上呈现梯形图谱,其中BDV接种后12, 24 h的培养法氏囊细胞DNA在电泳谱中呈现典型的梯状条带,而对照组法氏囊培养细胞DNA在电泳图谱上仅呈现1条带(图1-4)。

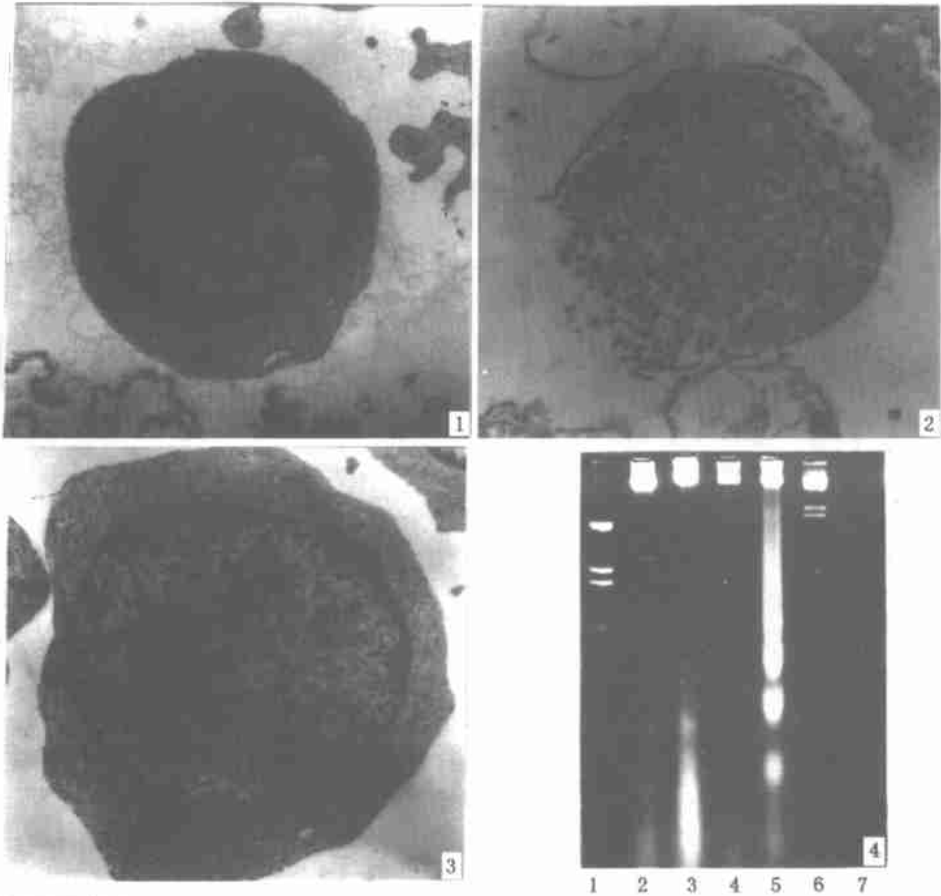


图1 BDV接种法氏囊培养细胞的电镜观察及DNA图谱

- 1 接种后8 h 细胞核染色质浓集,形成凋亡小体,聚集在核膜周边, $\times 6\ 600$;
- 2 接种后24 h 细胞培养液中病毒包涵体, $\times 20\ 000$;
- 3 对照的培养细胞, $\times 8\ 300$;
- 4 DNA图谱: 其中1, 6为DNA markers, 7为对照法氏囊培养细胞DNA, 2~5为BDV接种后4, 8, 12, 24 h培养法氏囊细胞DNA。

2.3 流式细胞计检测

BDV接种后2~48 h,法氏囊培养细胞凋亡数量明显上升,至接种后24 h达到高峰,随后急剧下降。与对照法氏囊培养细胞相比,BDV接种后4, 8, 12, 24 h法氏囊培养细胞凋亡数

量显著或极显著升高($P < 0.05$ 或 0.01), 其余时间组凋亡细胞数量亦高于对照法氏囊培养细胞, 但差异不显著($P > 0.05$) (图 2)。

2.4 法氏囊培养细胞凋亡指数

BDV 接种法氏囊培养细胞和对照法氏囊培养细胞悬液样品经吖啶橙-溴化乙锭双染色, 荧光显微镜观察, 凋亡细胞呈现橙黄色荧光, 而对照法氏囊培养细胞表现绿色荧光。

BDV 接种后 2~48 h, 试验组法氏囊培养细胞凋亡数量明显上升, 和流式细胞计检测结果呈现基本一致的变化规律, 至接种后 4~24 h, 接种组法氏囊培养细胞凋亡细胞数量与对照法氏囊培养细胞比较呈现显著或极显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。其他时间接种组法氏囊培养细胞凋亡细胞数量也高于对照组, 但差异不显著($P > 0.05$) (图 3)。

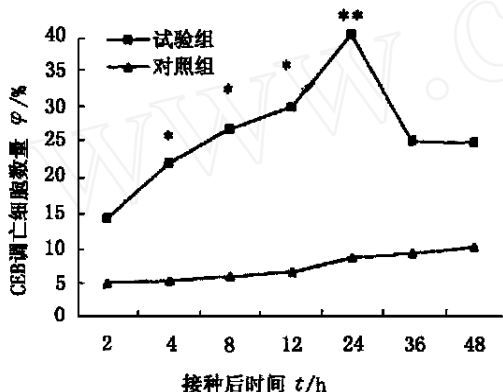


图 2 BDV 接种后 2~48 h 法氏囊培养细胞凋亡细胞数量变化曲线

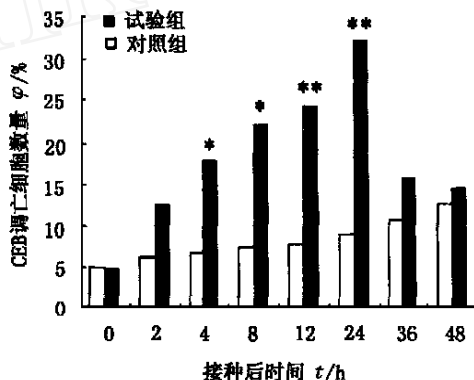


图 3 BDV 人工接种法氏囊培养细胞凋亡细胞指数变化

3 讨论

细胞凋亡与病毒感染之间的关系目前受到生命科学家的普遍关注。在许多病毒性感染疾病的发病机理中凋亡起着重要作用, 如爱滋病、鸡传染性贫血病、鸡新城疫等^[8,9]。Tham (1996) 研究表明, 传染性法氏囊病毒人工感染可诱导鸡胚成纤维细胞和 Vero 细胞凋亡, 并认为 BDV 引起雏鸡免疫抑制的机理是由于 BDV 直接或间接诱导雏鸡法氏囊淋巴细胞程序化死亡, 导致淋巴细胞坏死排空, 引起免疫功能障碍^[10]。本试验利用 BDV 变异 E 株体外试验感染法氏囊培养细胞, 取得了上述一致的试验结果, 表明 BDV 人工感染可以诱导法氏囊培养细胞的细胞凋亡。法氏囊淋巴细胞是 BDV 的主要靶细胞, 因此 BDV 变异 E 株人工感染可以诱导靶细胞凋亡, 靶细胞凋亡是雏鸡发生免疫抑制的重要原因。

细胞凋亡具有特征性的形态学变化和生物化学变化, 凋亡细胞的超微结构观察和细胞 DNA 的琼脂糖凝胶电泳是检测细胞凋亡的特有方法^[11]。在检测法氏囊培养细胞凋亡过程中, 本试验增设了流式细胞计检测和凋亡指数的测定 2 种方法, 取得了理想的结果。2 种方法所检测的法氏囊培养细胞基本一致的变化规律, 从定量角度上更好地说明了细胞凋亡的发展过程。试验结果提示, 流式细胞计和凋亡指数测定是检测细胞凋亡简单而实用的手段。

参 考 文 献

- 1 卡尔尼克B W 主编 禽病学 高福, 刘文军译 北京: 北京农业大学出版社, 1991, 554~ 566
- 2 Hirai K, Calnek B W. *In vitro* replication of infectious bursal disease virus in established lymphoid cell lines and chicken B lymphocytes *Infection and Immunity*, 1979, 25: 964~ 970
- 3 Lam K M. Lysis of chicken lymphocytes by infectious bursal disease virus *Avian Dis*, 1988, 32: 818~ 821
- 4 Houssaint E. Early separation of B and T lymphocyte precursors in chick embryo. *J Exp Med*, 1991, 174: 397~ 406
- 5 Vasconcelos A C, Lam K M. Apoptosis in chicken embryos induced by the infectious bursal disease virus *J Comp Path*, 1995, 112: 327~ 338
- 6 Lam K M. Apoptosis in chicken embryo fibroblasts caused by Newcastle disease virus *Veterinary Microbiology*, 1995, 47: 357~ 363
- 7 Duke R C, Cohen J J. Morphological and biochemical assays of apoptosis In: Coligan J, et al *Current Protocols in Immunology*. New York: John Wiley and Sons, 1992
- 8 Jeurissen S H M. Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after *in vivo* infection and of cell lines after *in vitro* infection *J Virol*, 1992, (6): 7383~ 7388
- 9 Stewart S A. Human immunodeficiency virus type 1 induces apoptosis following cell cycle arrest *J Virol*, 1997, (7): 5579~ 5592
- 10 Tham K M, Moon C D. Apoptosis in cell cultures induced by infectious bursal disease virus following *in vitro* infection *Avian Dis*, 1996, 40: 109~ 113
- 11 Wylie A H. Apoptosis *ISIA tlas Science: Immunology*, 1988, (1): 192~ 196