

用 ELISA 检测传染性囊病病毒诱导的细胞凋亡^{*}

薛春宜 毕英佐 曹永长 朱基美

(华南农业大学动物科学系, 广州, 510642)

摘要 用 5 株传染性囊病病毒 (IBDV) 分别感染鸡胚成纤维细胞 (CEF), 于感染后不同时间收集接毒组与对照组的细胞进行检测。试验结果显示, 接毒组与对照组细胞的 DNA 在琼脂糖凝胶电泳谱上均呈现梯状条带。用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测各组细胞中降解 DNA 量, 发现感染 IBDV 7 h 后, 接毒组细胞降解 DNA 量比对照组明显增加, 且各接毒组间降解 DNA 量有一定的差异。试验结果表明: 各株 IBDV 均诱导 CEF 发生细胞凋亡, 但不同 IBDV 毒株诱导细胞凋亡的能力有差异; ELISA 是定量检测细胞凋亡的较好方法。

关键词 传染性囊病病毒; 细胞凋亡; 鸡胚成纤维细胞

中图分类号 S 855.3

传染性囊病 (IBD) 是由传染性囊病病毒 (IBDV) 引起的一种高度接触性传染病, 主要侵害 3~12 周龄的雏鸡和青年鸡, 破坏法氏囊中的 B 淋巴细胞, 导致免疫抑制 (Lukert et al, 1997)。由于传染性囊病的复杂性和重要性, 人们对该病进行了大量的研究, 但对于 IBDV 引起免疫抑制机理的研究则不够深入。近年来, 研究人员通过用 IBDV 感染雏鸡、鸡胚、培养细胞等多种途径进行研究, 发现 IBDV 可诱导细胞凋亡 (曹永长等, 1997; Inoue et al, 1994; Tham et al, 1996; Vasconcelos et al, 1994, 1995), 因而推测细胞凋亡与 IBDV 引起 B 淋巴细胞数量减少, 从而导致免疫抑制有关。

本试验采用了 5 个 IBDV 毒株感染鸡胚成纤维细胞 (CEF), 通过 DNA 电泳和 ELISA 2 种研究手段, 建立了 IBDV 诱导细胞凋亡的实验模型, 同时比较了几株 IBDV 诱导细胞凋亡能力的差异, 以期进一步对 IBDV 引起免疫抑制的机理进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞为 9 日龄鸡胚按常规方法制备和培养的鸡胚成纤维细胞 (CEF)。传染性囊病病毒 (IBDV) 共 5 株, GZ911、GZ912 为华南农业大学家禽研究室分离保存的细胞适应株, JS-1、SD-3 是由北京市农林科学院畜牧兽医学研究所提供的细胞适应株, 囊病 2 号 (B-2) 为苏威动物保健品有限公司的疫苗株。GZ911、GZ912、JS-1、SD-3 细胞适应株经 CEF 传代 2 次后备用, B-2 经 CEF 传代 3 次以适应细胞并引起细胞病变后备用。按常规测定 IBDV 滴度, 用 Reed-Muench 法计算细胞半数感染量 (TCID₅₀)。

1.2 方法

DNA 的提取和电泳分析: 参照 Lam (1996) 的方法进行。CEF 长成单层后, 按 10⁵ TCID₅₀ 的剂量接种 IBDV, 分别收集接毒后 0、7、24、31、52、72 h 的 CEF, 未接毒 0、24、52、72 h 的 CEF,

1999-04-12 收稿 薛春宜, 女, 24 岁, 硕士

^{*} 广东省自然科学基金 (960449) 资助项目

由鸡胚刚制备好的细胞,用 SPF 鸡胚制备培养的未接毒 CEF 及接毒后 0 h 的 CEF;然后用 199 维持液清洗上述细胞。TTE 重悬细胞后,用等体积的酚:氯仿(1:1)、氯仿:异戊醇(24:1)各抽提 1 次,均 5 000 r/min 离心 10 min。于抽提好的水相中加 1/10 体积的 3 mol/L (pH 5.2) 醋酸钠、2 倍体积的冷无水乙醇, -20℃ 过夜。10 000 r/min 离心 15 min, 去上清液, 用 $\varphi = 70\%$ 的乙醇洗沉淀, 离心, 干燥。沉淀溶于 100 μL TE 中, -20℃ 保存。将样品 5 μL 与 1 μL 含 0.25 g/L 溴酚蓝和 $\varphi = 30\%$ 甘油的上样缓冲液混合均匀后, 在含 0.5 mg/L 溴化乙锭的 15 g/L 琼脂糖凝胶板上电泳。电泳结束后置于紫外透射仪下观察、摄影。

ELISA:按 Boehringer Mannheim 公司的 cell death detection ELISA kit 使用说明书测定 CEF 中降解 DNA-组蛋白的含量。CEF 长成单层后,按 10^5TCID_{50} 的剂量接种 IBDV, 分别收集对照组及接毒组接毒后 0、7、24、31、52、72 h 的 CEF, 用 199 维持液悬浮分散 CEF, 用血细胞计数板计数。取含 1×10^4 个 CEF 的悬浮液, 1 500 r/min 离心 5 min, 去上清液。细胞沉淀加 200 μL 裂解缓冲液, 室温放置 30 min。1 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 4℃ 保存待测。于 ELISA 反应板上每孔加 20 μL 待测的细胞裂解液、80 μL 新鲜配制的免疫混合试剂(4 μL 生物素标记的抗组蛋白抗体、4 μL 过氧化物酶标记的抗 DNA 抗体、72 μL 培养缓冲液), 每个样品做 2 个重复。每批测样时均做一次阴性对照, 即用培养缓冲液代替细胞裂解液。室温下, 置微量振荡器上 500 r/min 振荡 2 h。用培养缓冲液洗涤 3 次, 彻底移走清洗液。加 100 μL 底物, 室温下, 置微量振荡器上 250 r/min 振荡 15 min。用 Emax 酶标仪在 405 nm 波长下对样品进行读数 ($D_{405\text{ nm}}$), 阴性对照则在 492 nm 下读数 ($D_{492\text{ nm}}$)。

$$\text{样品 } D_{\lambda} = D_{405\text{ nm}} - D_{492\text{ nm}}.$$

2 结果

2.1 几株 IBDV 滴度的测定结果

每 0.2 mL 的 GZ911、GZ912、JS-1、SD-3、B-2 病毒原液的 TCID_{50} 分别为 $10^{-6.2}$ 、 $10^{-6.33}$ 、 $10^{-7.81}$ 、 $10^{-6.5}$ 、 $10^{-5.83}$ 。

2.2 CEF 的 DNA 电泳结果

由琼脂糖凝胶电泳的结果可以看到(图 1), 从对照组及感染 IBDV 后的细胞中提取的 DNA 在电泳谱上均呈有规律的梯状条带。

2.3 CEF 中降解 DNA 含量的变化情况

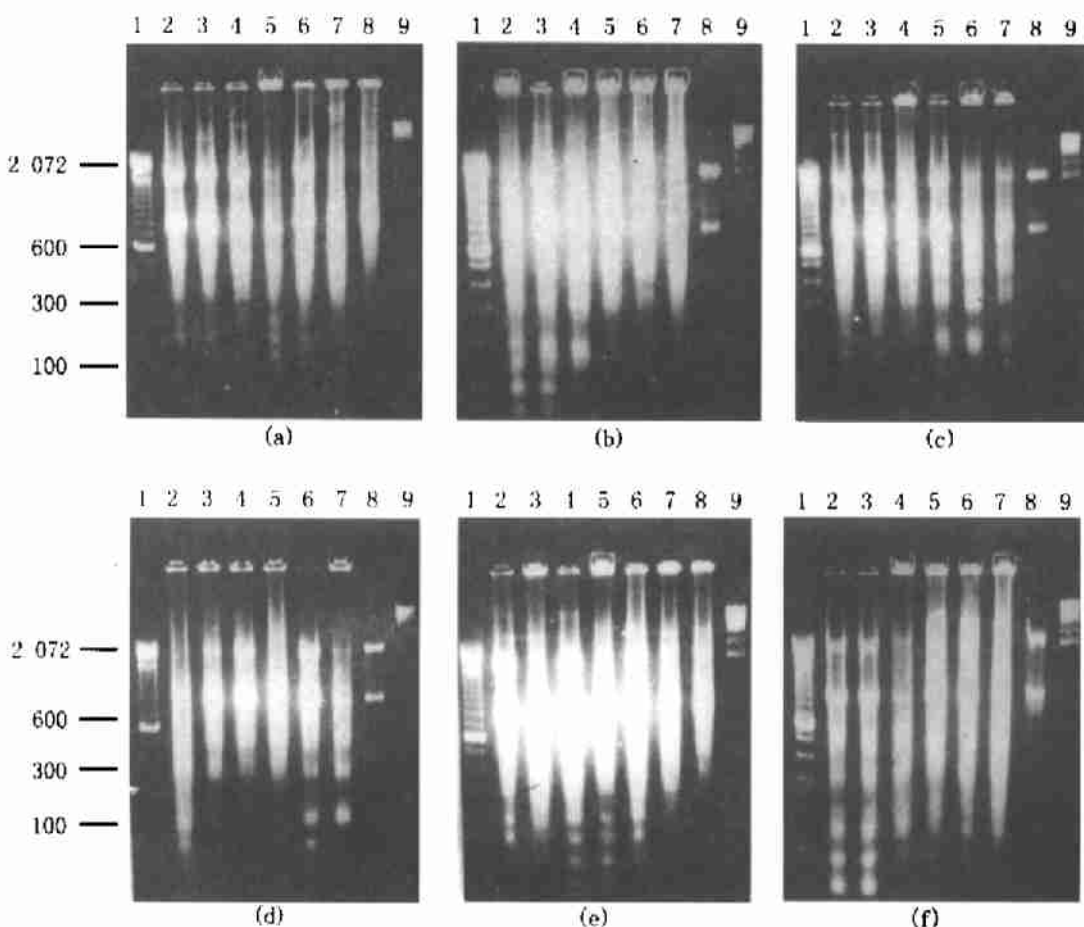
由表 1 可知: 经 ELISA 反应后, 对照组的 D_{λ} (表示降解 DNA 含量) 在整个测试时间内变化

表 1 各组细胞不同时间的降解 DNA 水平 (D_{λ})¹⁾

组别	时间/h					
	0	7	24	31	52	72
对照组	0.122±0.004	0.085±0.003	0.161±0.020 ^a	0.156±0.068 ^a	0.357±0.087 ^a	0.186±0.005 ^a
GZ911	0.108±0.025	0.073±0.004	1.184±0.020 ^b	0.495±0.059 ^b	0.695±0.164 ^b	0.909±0.017 ^b
GZ912	0.140±0.010	0.101±0.011	1.298±0.084 ^b	0.738±0.073 ^c	0.891±0.004 ^b	1.119±0.034 ^c
JS-1	0.119±0.003	0.083±0.006	0.317±0.045 ^{cd}	0.692±0.066 ^c	0.609±0.071 ^{ab}	1.527±0.035 ^d
SD-3	0.105±0.008	0.087±0.004	0.554±0.016 ^c	0.698±0.021 ^c	2.041±0.124 ^c	1.338±0.081 ^c
B-2	0.115±0.025	0.095±0.021	0.396±0.180 ^{cd}	0.326±0.117 ^{ab}	0.701±0.053 ^b	1.072±0.057 ^c

1) 经多重比较统计, 组间数据标有相同字母者表示差异不显著, 不同字母为差异显著 ($P < 0.05$)

不大,而接毒组则变化较大.0、7 h时,各组 CEF 的 D_A 间差异不显著($P > 0.05$). 各组在 7 h 内,其 D_A 变化不大.7 h 后各测试时间接毒组 D_A 均大于对照组,除 JS-1 组于 24、52 h 及 B-2 于 31 h 时 D_A 与对照组差异不显著($P > 0.05$)外,其它各组 D_A 值均显著高于对照组($P < 0.05$). 另外,5 个毒株对 D_A 值的影响情况不同.



(a) 空白对照, (b) GZ911, (c) GZ912, (d) JS-1, (e) SD-3, (f) OB-2

1、9 泳道分别为 100 bp、1 kb DNA Ladder. (a) 组中 2~8 泳道的 DNA 分别来源于未感染 IBV 的 SPF CEF、感染 IBV 后 0 h 的 SPF CEF、鸡胚细胞及 0、24、52、72 h 的未感染 IBV 的 CEF. 其余各组中 2~8 泳道的 DNA 分别来源于空白对照 CEF 0 h 及感染 IBV 后 0、7、24、31、52、72 h 的 CEF

图 1 各组细胞的 DNA 凝胶电泳图谱

3 讨论

细胞凋亡的概念首先是由 Kerr 等(1972)提出的,用以描述一种不同于细胞坏死的细胞死亡方式.细胞坏死是由于机械损伤、局部贫血、细菌及病毒感染等,造成胞膜破裂、细胞器及细胞肿胀破裂直至溶解的细胞急速死亡现象,这种死亡过程常常引起炎症反应,而细胞凋亡是受基因调控的主动连续的程序化反应,它具有特征性形态改变和生化变化,形态学方面表现

为细胞体积缩小,核染色质浓缩,细胞核裂解,进而胞膜内陷将细胞自行分割成单位膜包围的凋亡小体,凋亡细胞周围没有炎症反应。生化变化主要表现为 DNA 的有控降解,DNA 发生有规律的断裂,在凝胶电泳谱上呈梯状条带。

本研究的首要目的是要建立一个 IBDV 诱导细胞凋亡的实验模型。笔者采用了 5 个 IBDV 毒株感染单层 CEF,通过 DNA 电泳和 ELISA 这 2 种研究手段,证明这 5 个毒株均能诱导 CEF 发生细胞凋亡。这与 Tham 等(1996)和 Vasconcelos 等(1994)的研究结果一致。

同时,笔者观察到,未感染 IBDV 的对照组细胞的 DNA 电泳谱也呈梯状条带。Tham 等(1996)也观察到类似的现象,他们认为这是体外培养细胞的正常生理性死亡引起的。ELISA 同样检测到对照组 DNA 发生断裂,但对照组降解 DNA 量(用 D_A 值表示)自始至终低于感染 IBDV 的实验组,且基本维持恒定。这些结果说明,CEF 在培养过程中会发生细胞正常的生理性死亡,这是 CEF 维持细胞数量恒定的一种机制。

比较这 2 种检测细胞凋亡的方法,可以得出下列结论:(1)虽然 DNA 电泳是检测细胞凋亡的常用方法,但在 IBDV 诱导 CEF 细胞凋亡的实验模型中,由于 CEF 的正常生理性死亡也会导致 DNA 断裂,在电泳谱表现为梯状条带。因此 DNA 电泳不是检测 IBDV 诱导 CEF 凋亡的理想方法。(2)ELISA 检测降解 DNA 的变化量,可以定量表示细胞凋亡的程度。虽然对照组也检测到 DNA 断裂的发生,但在整个试验过程中,对照组 D_A 基本恒定,且维持在较低水平,不会影响对 IBDV 诱导的细胞凋亡的定量测定。因此,笔者认为 ELISA 是检测 IBDV 诱导 CEF 发生细胞凋亡的比较好的方法。

本研究用 5 个 IBDV 毒株分别感染单层 CEF。其中,B-2 株是国内外广泛使用的一个疫苗株,GZ911、GZ912、JS-1 和 SD-3 是国内分离的 IBDV 野毒株经多次鸡胚和细胞传代培养而致弱的毒株。ELISA 试验结果表明,在感染 IBDV 的最初 7 h 内,所有感染了 IBDV 的 CEF 和对照组一样,降解 DNA 的量没有增加,而从 24 h 开始,所有 IBDV 都导致了降解 DNA 量的增加。这表明,IBDV 细胞适应株诱导细胞凋亡是发生在感染 IBDV 的至少 7 h 之后。从感染 IBDV 后 7 h 开始,5 个毒株对 CEF 细胞凋亡的影响程度是不同的。这种差异很可能是由毒株本身的性质所决定的。GZ911 和 GZ912 是本实验室于 1991 年从广东分离的野毒株经多次传代致弱的毒株,两者的传代致弱方式和传代次数基本相同,在本试验中,它们诱导 CEF 细胞凋亡的情况比较相似。当然,由于分析的毒株不够多,要说明毒株的哪些特性决定它们与细胞凋亡之间的关系,还需进一步研究。

不同 IBDV 毒株影响 CEF 细胞凋亡的情况不同,这一点有助于阐明不同毒株感染雏鸡后导致雏鸡病变的差异。不同毒力 IBDV 感染后,鸡法氏囊的病理学变化不一样,强毒株会造成法氏囊充血、出血、水肿,继而淋巴滤泡受侵,炎症减弱,法氏囊萎缩(Muller, 1986);而变异株感染后,法氏囊有广泛病变,并快速萎缩,却很少或不出现炎症反应(Lukert et al, 1997;Sharma et al, 1989;Snyder, 1990)。这些差异的出现可能与不同毒株诱导细胞凋亡的能力有关。另一方面,标准强毒株、超强毒株及变异株感染雏鸡后,最终都会引起雏鸡法氏囊的萎缩,从而导致免疫抑制。而本研究中所有毒株都能诱导 CEF 的细胞凋亡。据此推测,细胞凋亡可能与 IBDV 引起雏鸡法氏囊的萎缩,从而导致免疫抑制有关。

参 考 文 献

曹永长,毕英佐,罗晚秋,等.1997.传染性囊病病毒诱导细胞凋亡的初步观察.中国兽医杂志,23(3):5~7

- Inoue M, Fukuda M, Miyano K. 1994. Thymic lesions in chicken infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, 38: 839 ~ 846
- Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239 ~ 257
- Lam K M. 1996. Newcastle disease virus-induced apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of chickens. *J Comp Path*, 114: 63 ~ 71
- Lukert P D, Saif Y M. 1997. Infectious bursal disease. In: Calnek B W, Barnes H J, Beard C W, eds. *Disease of Poultry*. 10th ed. Iowa: Iowa State University Press, 721 ~ 738
- Muller H. 1986. Replication of infectious bursal disease virus in lymphoid cells. *Arch Virol*, 87: 191 ~ 203
- Sharma J M, Dohms J E, Metz A L. 1989. Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and the effect of those virus on humoral and cellular immune response in specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis*, 33: 112 ~ 124
- Snyder D B. 1990. Changes in field status of infectious bursal disease virus. *Avian Path*, 19: 419 ~ 423
- Tham K M, Moon C D. 1996. Apoptosis in cell cultures induced by infectious bursal disease virus following in vitro infection. *Avian Dis*, 40: 109 ~ 113
- Vasconcelos A C, Lam K M. 1994. Apoptosis induced by infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, 75: 1 803 ~ 1 806
- Vasconcelos A C, Lam K M. 1995. Apoptosis in chicken embryos induced by infectious bursal disease virus. *J Comp Path*, 112: 327 ~ 338

Detection of Apoptosis of Chicken Embryo Fibroblasts Induced by Infectious Bursal Disease Virus Using ELISA

Xue Chunyi Bi Yingzuo Cao Yongchang Zhu Jimei

(Dept. of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract Chicken embryo fibroblasts (CEF) infected with each of five strains of infectious bursal disease virus (IBDV) and control CEF were harvested and tested at various stages post-infection. Upon Agarose gel electrophoresis, DNA extracted from IBDV-infected and control CEFs exhibited a laddering pattern. The amount of the DNA fragments was measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). There was a significant increase in the amount of DNA fragments in each IBDV-infected group, as compared with the control group, and the amount of DNA fragments showed some differences among the infected groups. These results demonstrated that the five IBDV strains all could induce apoptosis, but different IBDV strains exhibited variation in the capacity to induce apoptosis; quantitative change in apoptosis was better detected with ELISA.

Key words infectious bursal disease virus; apoptosis; chicken embryo fibroblasts

【责任编辑 柴 焰】