

文章编号: 1001-411X(2002)02-0070-04

传染性囊病病毒 VP2 蛋白诱导细胞凋亡的研究

吕英姿, 曹永长, 陈峰, 毕英佐

(华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 在体外分别构建了 3 种重组表达质粒: 含传染性囊病病毒 GZ911 株 VP2 基因的 pGVP2、含 HK46 株 VP2 基因的 pHVP2 以及含 HK46 株 5' 一端序列(包括非编码区、VP5 和 VP2 基因)的 pHVP2+5。用不同的重组质粒转染原代鸡胚成纤维细胞(CEF), 在转染后 0、14、38 h, 收集对照组和转染组细胞, 用酶联免疫吸附试验检测 CEF 中降解 DNA 量。结果, 在 14 和 38 h, 各组细胞中测得的 D_{260} 值均为转染 pHVP2+5 组最大, 其次为转染 pHVP2、pGVP2 的组, 并都大于其他对照组, 表明 2 个 IBDV 毒株的 VP2 蛋白在 CEF 中表达后都能诱导 CEF 发生凋亡, 但不同毒株的 VP2 蛋白诱导 CEF 凋亡的能力不同; VP5 蛋白可增强 VP2 蛋白诱导 CEF 凋亡的作用。

关键词: 传染性囊病病毒; VP2; VP5; 细胞凋亡

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

传染性囊病(IBD)是由传染性囊病病毒(IBDV)引起的影响养鸡业的主要疫病之一, 主要侵害 3~12 周龄的雏鸡和青年鸡, 导致严重的免疫抑制。IBDV 属双 RNA 病毒科, 其基因组由 A、B 两段双链 RNA 组成。B 片段编码 VP1 蛋白, A 片段含有 1 个大的开放阅读框(ORF)和 2 个潜在的小 ORF, 大 ORF 编码 VP2、VP3 和 VP4 蛋白^[1], 第二个小 ORF 编码 VP5 蛋白^[2]。大 ORF 起始于序列的 131 bp 处, 第二个小 ORF 起始于 98 bp 处, 2 个 ORF 间有一段序列重复。本文扩增的 5' 一端序列同时含 2 个 ORF, 可同时表达 VP5、VP2 蛋白。VP2 和 VP3 是病毒的主要结构蛋白, 其中 VP2 是主要的宿主保护性抗原^[1]。

近年来, 研究人员对 IBDV 诱导的雏鸡、鸡胚、培养细胞发生的细胞凋亡进行了大量的研究^[3-9], 对 IBDV 中的凋亡因子以及 VP5 蛋白在病毒致病机理中的作用也进行了研究^[10-11], 证明 VP2 蛋白是 IBDV 的凋亡因子, 而 VP5 蛋白不能表达的病毒子对 CEF 的凋亡效应减弱。本文在前人研究的基础上, 比较了强弱毒株的 VP2 蛋白诱导细胞凋亡能力的差异, 以及 VP5 蛋白在细胞凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 PCR 扩增 VP2 基因和 5' 一端序列

本试验中采用的 2 个病毒株为弱毒株 GZ911 和强毒株 HK46, 所用的模板为含这 2 个毒株 A 片段 cDNA 的质粒^[12-13]。PCR 引物的序列为:

A5: AT GAATTCAGGATACGATCGGTCTGACCCCG-
GGGGAGTCA;

PI: TTGAATTCTAGACAAACCTGCAAGATCA;

PII: TTTTCTAGATCACTTAT(G)GGCCCG(A)AT-
TATGTC。

A5 和 PII 为 5' 一端序列的引物, PI 和 PII 为 VP2 的引物, A5 位于 A 片段的起始位点, PI 位于 VP2 基因的起始位点, PI 和 A5 相距 131 bp。在 A5 和 PI 的 5' 一端均加 *EcoR*I 酶切位点; PII 和 PI 相距 1364 bp, 在 5' 一端加 *Xba*I 酶切位点和 1 个终止密码子。

PCR 反应体积为 100 μ L, 其中含引物 A5 或 PI 和 PII 各 100 μ mol, 10 \times buffer 10 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(购自华美生物工程公司)2 U, dNTP 150 μ mol, 模板 2 μ L。PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 温度循环为 94 $^{\circ}$ C、40 s, 52 $^{\circ}$ C、45 s, 72 $^{\circ}$ C、210 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。

1.2 PCR 产物的克隆及鉴定

PCR 产物用 *EcoR*I 和 *Xba*I 双酶切; 质粒 pALTER 用 *EcoR*I 和 *Xba*I 双酶切, 同时用 CIAP(小牛小肠碱性磷酸酶)去磷酸化。用 T4 DNA 连接酶分别将双酶切后的 PCR 产物与质粒 pALTER 连接, $CaCl_2$ 法转化大肠杆菌 JM109 受体菌, 氯霉素筛选。将阳性克隆培养于 3 mL 含氯霉素的 LB 培养基中, 提取重组质粒, 分别用 PCR 和双酶切进行鉴定, 最终得到 3 种重组质粒: 含 IBDV GZ911 株 VP2 cDNA 的 pGVP2、含 IBDV HK46 株 VP2 cDNA 的 pHVP2 和含 HK46 株 5' 一

收稿日期: 2001-11-08 作者简介: 吕英姿(1974-), 女, 预防兽医学博士研究生。

通讯作者: 毕英佐(1944-), 男, 研究员, 硕士。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870550); 广东省自然科学基金资助项目(960449)

1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

端序列的 cDNA 的 pHVP2+5.

1.3 重组质粒转染鸡胚成纤维细胞 (CEF)

质粒的转染在 Lipofectamin (Gibco/BRL 公司产品) 的介导下进行. 在 6 孔培养板上培养原代 CEF 至长成单层, 吸出培养液, 细胞用 Hank's BSS 洗 1 次. 取 15 μ L Lipofectamin, 加不含血清的 199 培养基至 100 μ L; 另分别取 3 种重组质粒 154.08 μ g, 加不含血清的 199 培养基至 100 μ L, 混匀 2 种溶液, 室温下反应 30 min 后, 加入到细胞中, 同时加 0.8 mL 不含血清的 199 培养基. 在 37 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱中转染 5 h, 弃去转染混合液, 加 2 mL 新鲜的 199 培养基 (含 $\varphi=10\%$ 的新生牛血清) 培养, 分别在转染后 0、14、38 h 收集各组细胞用 ELISA 检测细胞凋亡. 另设不加 Lipofectamin 和质粒的完全空白对照 (CK₁) 以及只加 15 μ L Lipofectamin 不加质粒的对照 (CK₂).

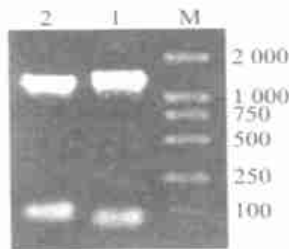
1.4 ELISA 定量检测 CEF 中降解 DNA 的含量

参照薛春宜等^[4]的方法进行, 每个样品均做 2 个重复, 取其平均值.

2 结果

2.1 PCR 产物的检测

PCR 产物在 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶上电泳, 检测到约 1 360 bp 和 1 500 bp 的 DNA 带, 与预期的大小一致 (图 1).



M. DNA Marker; 1. 5'-端序列的 PCR 产物; 2. VP2 基因的 PCR 产物
M. DNA Marker; 1. PCR product of 5' terminal sequence; 2. PCR product of VP2 gene

图 1 IBDV VP2 基因和 5'-端序列的 PCR 产物

Fig. 1 PCR products of IBDV VP2 gene and 5' terminal sequence

2.2 PCR 产物的克隆及鉴定

PCR 产物插入质粒 pALTER 的 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切位点之间, 经转化、筛选, 获得多个阳性菌落. 对阳性菌落用 PCR 进行检测, 扩增到约 1 360 bp 和 1 500 bp 的 DNA 片段; 从小规模培养的阳性菌落中提取质粒 DNA, 用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切, 获得几条 DNA 片段, 长度分别约为 5.6 kb、1.36 kb 和 1.5 kb, 与质粒及 VP2、5'-端序列的大小一致.

2.3 各组 CEF 中降解 DNA 的含量

ELISA 测得各组细胞中的降解 DNA 含量见表 1.

表 1 各组细胞不同时间测得的降解 DNA 含量 (D_{λ} 值)

Tab. 1 The amount of DNA fragments measured from different group of cells at various time post-transfection

组别 groups	所加试剂 reagents	D_{λ} 值		
		0 h	14 h	38 h
1	空白 (CK ₁)	0.123	0.202 ^a	0.108 ^a
2	Lipofectamin (CK ₂)	0.113	0.262 ^b	0.193 ^a
3	Lipofectamin 和 pGVP2	0.111	0.399 ^c	0.322 ^b
4	Lipofectamin 和 pHVP2	0.121	0.451 ^d	0.453 ^c
5	Lipofectamin 和 pHVP2+5	0.113	0.530 ^e	0.508 ^c

1) 同列数值后字母不同者表示差异显著 ($P < 0.05$, Duncan's 法)

从表 1 可以看出, 各组细胞在不同时间测得的 D_{λ} 值均有不同程度的差异. 第 3、4、5 组在 14、38 h 测得的 D_{λ} 值大于 0 h 的 D_{λ} 值. 14、38 h 测得的 D_{λ} 值均为第 5 组最大, 其次是第 4 和第 3 组.

3 讨论

在质粒 pALTER 中含有 CMV 立即一早期启动子, 可启动插入的 DNA 序列在真核细胞中表达. Lim 等用 pALTER 构建了含 IBDV 完整的 A 片段和 B 片段的重组质粒, 以此重组质粒转染 CEF, 获得完整的病毒粒子, 证明 pALTER 能启动插入的 DNA 序列在 CEF 中表达^[12]. 在本试验中将 VP2、VP5 基因插入 pALTER, 使之在 CEF 中表达, 从而对 VP2、VP5 蛋白与细胞凋亡的关系进行研究.

ELISA 结果显示, 转染 pGVP2 和 pHVP2 的 2 组细胞在转染后 14 h, 细胞中降解 DNA 的含量即明显高于对照组, 表明这时的细胞已开始出现凋亡. 第 2 组的 D_{λ} 值与第 1 组相比在 14 h 时有较明显的升高, 说明 Lipofectamin 对细胞有一定程度的损伤, 但其 D_{λ} 值仍显著低于第 3、4、5 组, 证明 VP2 蛋白是诱导细胞凋亡的主要因素. 第 3、4 组细胞在 14 和 38 h 测得的 D_{λ} 值均为第 4 组大于第 3 组, 且差异显著, 说明 HK46 VP2 蛋白引起的 CEF 中降解 DNA 的含量大于 GZ911 VP2 蛋白引起的 DNA 降解量. 这一结果表明, 2 个 IBDV 毒株的 VP2 蛋白诱导 CEF 凋亡的能力是有差异的, 强毒株 HK46 的 VP2 蛋白诱导 CEF 产生细胞凋亡的能力强于弱毒株 GZ911.

不同毒力的 IBDV VP2 蛋白诱导细胞凋亡能力的不同, 可能与不同毒力的 IBDV 感染后, 雏鸡法氏囊病理学变化的差异有关. 由于 VP2 蛋白是 IBDV 的凋亡因子^[10], 且 VP2 蛋白中某几个关键部位的氨基酸残基发生突变时, 就会使病毒的毒力发生改变^[13, 14]; 而在野外情况下, 不同毒力的 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;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^[1]。不同IBDV毒株诱导CEF凋亡的情况也不同^[4]。推测这些差异主要是由VP2蛋白诱导细胞凋亡能力的差异引起。

pHVP2+5在CEF中可同时表达VP5和VP2两个蛋白,从结果中可见,在转染后14和38h,第5组CEF测得的 D_{λ} 值均大于第4组,虽然在38h时两组的 D_{λ} 值间差异不显著,但这一结果仍可表明,在有VP5蛋白存在时,VP2蛋白诱导的细胞凋亡作用增强。在这里VP5蛋白可能起2种作用,一是VP5蛋白本身可诱导CEF凋亡,二是VP5和VP2间起协同作用,VP5蛋白的表达增强了VP2蛋白诱导细胞凋亡的作用,而VP5蛋白本身不是凋亡因子。Yao等^[11]在实验中观察到,VP5蛋白与IBDV致病机理有关,缺少VP5蛋白的病毒子不引起法氏囊萎缩,其对CEF产生的凋亡效应也减弱,但单独的VP5蛋白能否诱导细胞凋亡则有待进一步的探索。另外,5'-端非编码区也可能对这一结果产生影响。Nagarajan等认为A片段5'-端最初的32个碱基是主要的启动子,在病毒的复制中起重要作用^[16],虽然这一非编码区序列高度保守^[17],但仍不能排除这些非编码区对CEF凋亡产生的可能影响。

另外,笔者在试验中观察到,38h时细胞病变比14h时明显,而38h测得的 D_{λ} 值低于14h(只有转染pHVP2的组不明显),Tham等观察到类似的现象^[18],表明VP2蛋白可能在早期诱导CEF发生凋亡,在转染后期则细胞逐渐坏死。

参考文献:

- LUKERT P D, SAIF Y M. Infectious bursal disease [A] . CALNEK B W, BARNES H J, BEARD C W, et al. Diseases of Poultry [C] . 10th. Iowa: Iowa State University Press, 1997. 721—738.
- MUNDT E, BEYER J, MULLER H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells [J] . J Gen Virol, 1995, 76: 437—443.
- 曹永长, 毕英佐, 罗晚秋, 等. 传染性囊病病毒诱导细胞凋亡的初步观察 [J] . 中国兽医杂志, 1997, 23(3): 5—7.
- 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.
- INOUE M, FUKUDA M, MIYANO K. Thymic lesions in chicken infected with infectious bursal disease virus [J] . Avian Dis, 1994, 38: 839—846.
- THAM K M, MOON C D. Apoptosis in cell cultures induced by infectious bursal disease virus following *in vitro* infection [J] . Avian Dis, 1996, 40: 109—113.
- TANIMURA N, SHARMA J M. In-situ apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease virus [J] . J Comp Path, 1998, 118: 15—27.
- VASCONCELOS A C, LAM K M. Apoptosis induced by infectious bursal disease virus [J] . J Gen Virol, 1994, 75: 1 803—1 806.
- VASCONCELOS A C, LAM K M. Apoptosis in chicken embryos induced by infectious bursal disease virus [J] . J Comp Path, 1995, 112: 327—338.
- FERNANDEZ-ARIAS A, MARTINEZ S, RODRIGUEZ J F. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2 is an apoptotic inducer [J] . J Virol, 1997, 71(10): 8 014—8 018.
- YAO K, GOODWIN M A, VAKHARIA V N. Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions [J] . J Virol, 1998, 72: 2 647—2 654.
- LIM B L, CAO Y, YU T, et al. Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2 [J] . J Virol, 1999, 73(4): 2 854—2 862.
- CAO Y C, YEUNG W S, LAW M, et al. Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains [J] . Avian Diseases, 1998, 42: 340—351.
- YAMAGUCHI T, OGAWA M, INOSHIMA Y, et al. Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus [J] . Virology, 1996, 223: 219—223.
- MULLER H. Replication of infectious bursal disease virus in lymphoid cells [J] . Arch Virol, 1986, 87: 191—203.
- NAGARAJAN M M, KIBENGE F S B. The 5'-terminal 32 basepairs conserved between genome segments A and B contain a major promoter element of infectious bursal disease virus [J] . Arch Virol, 1997, 142: 2 499—2 514.
- 马保华, 曹永长, 吕英姿, 等. 传染性囊病病毒VP5及非编码区基因的序列分析 [J] . 华南农业大学学报, 2001, 22(3): 64—66.
- THAM K M, MOON C D. Apoptosis in cell cultures induced by infectious bursal disease virus following *in vitro* infection [J] . Avian Dis, 1996, 40: 109—113.

Studies on Apoptosis Induced by VP2 of Infectious Bursal Disease Virus

LÜ Ying-zi, CAO Yong-chang, CHEN Feng, BI Ying-zuo

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

Abstract: Three recombinant plasmids, pGVP2 and pHVP2 containing VP2 gene of IBDV strain GZ911 and HK 46 respectively, and pHVP2+5 containing 5' terminal sequence including 5' non-coding region, VP5 gene and VP2 gene, were cloned. These three plasmids were used to transfect chicken embryo fibroblasts (CEF). At 0, 14, 38 h post-transfection, cells in different groups were collected and the amount of DNA fragments was measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). At 14 and 38 h posttransfection, cells transfected with pHVP2+5 produced the highest D_{λ} , cells transfected with pHVP2 produced intermediate D_{λ} , and pGVP2 produced the lowest D_{λ} . All of which were higher than control groups. These results showed that VP2 of two IBDV strains was able to induce apoptosis when expressed in CEF, but the VP2 of different strains varied in the capacity to induce apoptosis. The apoptosis in CEF induced by VP2 was enhanced by VP5.

Key words: infectious bursal disease virus; VP2; VP5; apoptosis

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 64 页)

Properties of Landscape Pattern of Chebaling National Nature Reserve

ZHOU Qing¹, XIAO Hong-sheng¹, CHEN Bei-guang¹, WANG Yan-fang²

(1 College of Forestry, South China Agric. Univ. Guangzhou 510642, China;

2 Landscape Garden Management Department, Zhengzhou, Henan Province, Zhengzhou 450006, China)

Abstract: The landscape pattern of National Chebaling Nature Reserve was analyzed based on GIS by utilizing vegetation map. Results showed that forest type are the main component of vegetation in this region. The degrees of fragmentation of mid-subtropical mountain evergreen broadleaf forest and mid-subtropical hill and low-mountain evergreen broadleaf forest were smaller. *Pinus massoniana* stand had the main impact on the formation of landscape pattern. The Shannon index of landscape diversity of type number was the biggest and of type area was the smallest.

Key words: landscape pattern; GIS; National Chebaling Nature Reserve

【责任编辑 李晓卉】