

# 传染性法氏囊病病毒变异 E 株感染鸡 细胞凋亡的研究

陈明勇, 高齐瑜, 杨汉春, 乔 健

(中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

**摘要:**研究了传染性法氏囊病病毒(IBDV)变异 E 株人工感染 28 日龄 SPF 雏鸡后鸡法氏囊淋巴细胞的凋亡情况。电镜观察和 DNA 电泳分析结果表明, IBDV 感染后 12~48 h, 雏鸡法氏囊淋巴细胞出现典型细胞凋亡的形态学特征和生化特征; 经流式细胞计检测和荧光染色观察, 统计学分析表明, IBDV 感染后 24~48 h, 雏鸡法氏囊淋巴细胞凋亡数量显著增加( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。试验结果揭示 IBDV 变异 E 株人工感染可以诱导雏鸡法氏囊淋巴细胞凋亡。

**关键词:**传染性法氏囊病病毒变异 E 株; 细胞凋亡; 法氏囊; SPF 鸡

**中图分类号:** S858.31      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0366-6964(2002)02-0180-05

鸡传染性法氏囊病是由传染性法氏囊病病毒(Infectious bursal disease virus, IBDV)所引起的一种急性传染病。传染性法氏囊病病毒主要侵害鸡的体液免疫中枢器官法氏囊, 导致雏鸡免疫抑制<sup>[1]</sup>, 严重影响禽病疫苗的免疫保护作用, 从而造成极大经济损失, 其免疫抑制机理尚不十分清楚。Vasconcelos, A. C. 等(1994, 1995)和 Tham, K. M. 等(1996)研究发现 IBDV 人工感染可诱导鸡胚法氏囊细胞、鸡胚成纤维细胞、Vero 细胞、鸡胸腺细胞以及外周血液淋巴细胞的细胞凋亡, 并推测细胞凋亡在 IBDV 感染鸡免疫抑制方面起着重要作用<sup>[2,3,4]</sup>。本试验试图应用细胞凋亡的基本研究方法, 对 IBDV 变异 E 株人工感染诱导 SPF 雏鸡法氏囊细胞凋亡进行了初步观察, 目的在于进一步阐明传染性法氏囊病病毒导致免疫抑制的机理, 为 IBD 的防治提供新的方法和手段。

## 1 材料和方法

**1.1 IBDV 变异 E 株** 由中国农业大学生物学院张曼夫教授惠赠<sup>[5]</sup>。

**1.2 SPF 雏鸡** 由中国农业大学实验动物研究所提供, 无菌隔离器隔离饲养。

**1.3 感染与取材** 取培育至 28 日龄 SPF 雏鸡, 随机分成试验组和正常对照组, 试验鸡通过泄殖腔接

种 IBDV 悬液 0.2 ml/只, 对照组接种生理盐水, 接种后 12, 24, 36, 48, 72 h, 剖杀取法氏囊组织进行相应处理的检测。

**1.4 电镜观察** 取上述法氏囊小块组织, 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。

**1.5 DNA 电泳分析** 按 Vasconcelos, A. C. 等人(1995)介绍的方法略加改进进行<sup>[4]</sup>。

**1.6 流式细胞术检测** 按 Nicoletti, I. C. 等人(1991)介绍的方法略加改进进行<sup>[6]</sup>。

**1.7 凋亡指数的测定** 按 Duke, R. C. 等人(1992)介绍的方法略加改进进行<sup>[7]</sup>。

**1.8 数据的统计学处理** 所有数据与对照组比较, 进行两个样本均数差异的显著性 t 检验。

## 2 结果与分析

**2.1 法氏囊细胞的超微结构观察** IBDV-V<sub>E</sub> 感染雏鸡后 12~24 h, 可见法氏囊淋巴细胞核染色质聚集成一个或数个团块, 凝聚在核膜周边(图 1), 胞质浓缩, 细胞体积缩小, 病毒感染后 36 h, 凋亡细胞数量明显增多, 可在视野中观察到为数不等、形态各异的半月形或新月形凋亡小体, 并可见大量凋亡淋巴细胞被巨噬细胞和网状细胞吞噬的现象(图 2), 同时在感染淋巴细胞和巨噬细胞的胞浆内可见大量由单层膜包裹或者未包裹的病毒粒子团块存在(图 3)。IBDV 感染后 48~72 h, 凋亡细胞数量逐渐减

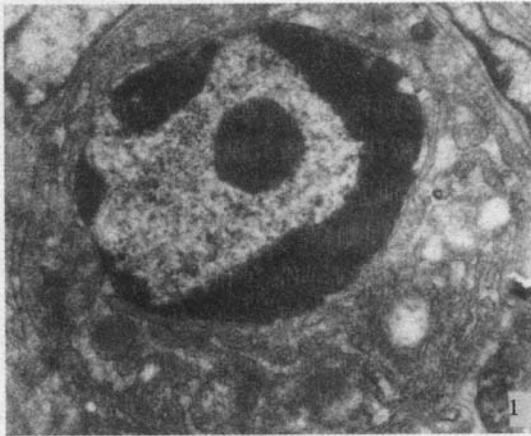


图 1 IBDV 感染后 24h 雏鸡法氏囊淋巴细胞核染色质浓缩、周边化

Fig.1 Condensed chromatin in the perinuclear region of lymphocyte in the BF of IBDV-infected chickens (24h,PI). (× 8.3K)

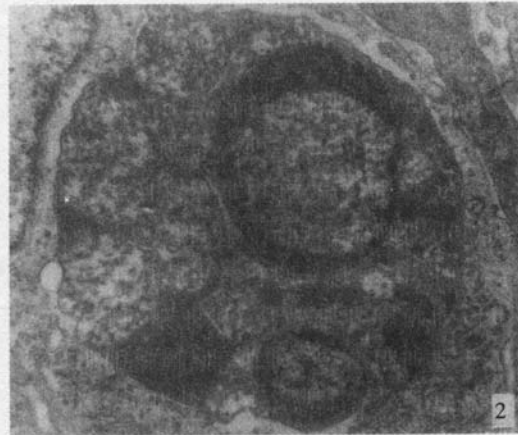


图 2 IBDV 感染后 36h 雏鸡法氏囊巨噬细胞胞浆内被吞噬的凋亡淋巴细胞

Fig.2 Apoptotic lymphocyte phagocytised by the macrophagocyte in the BF of IBDV-infected chickens(36h,PI). (× 8.3K)

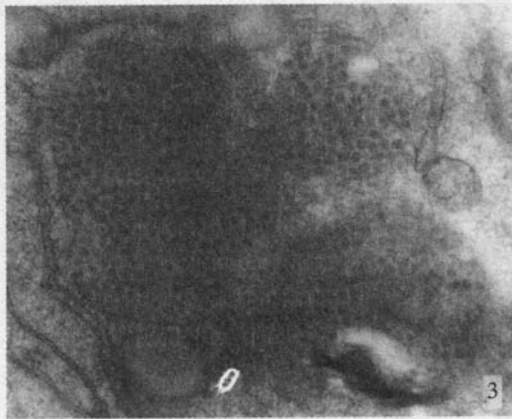


图 3 IBDV 感染后 36h 雏鸡法氏囊淋巴细胞胞浆内病毒结晶

Fig.3 Virus crystal in the cytoplasm of lymphocyte in the BF of IBDV-infected chickens(36h, PI). (× 26K)

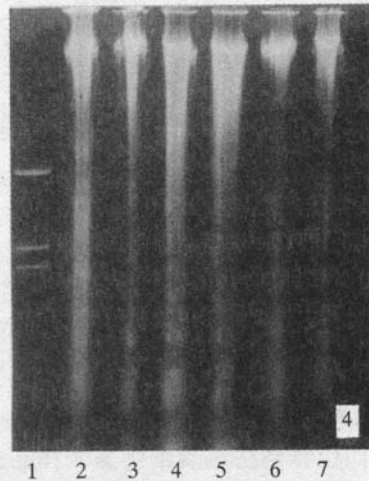


图 4 IBDV 感染后 12~72h 以及对照组雏鸡法氏囊细胞 DNA 电泳图谱。1 为 DNA markers;2 为对照组法氏囊细胞 DNA; 3~7 为 IBDV 感染后 12,24,36,48,72h 法氏囊细胞 DNA

Fig.4 Agarose gel electrophoresis pattern of cellular DNA extracted from the BF of chickens. DNA markers are shown in Lane 1, bursa control is shown in Lane 2, A ladder pattern is seen on the BF of IBDV-infected chickens at 12,24,36,48 and 72 h, PI(Lane 3,4,5,6, and 7).

少,但仍可见淋巴细胞和巨噬细胞内存在大量病毒粒子。而对照组雏鸡法氏囊淋巴细胞具有正常的细胞结构,上述细胞凋亡现象少见。

**2.2 法氏囊淋巴细胞 DNA 电泳结果** IBDV 感染后 12~72 h 的雏鸡法氏囊细胞总 DNA 样品在琼脂糖凝胶板呈现梯状图谱,其中 IBDV 感染后 24 h、36 h 的法氏囊细胞 DNA 在电泳谱上表现极为典型的梯状条带,而对照组法氏囊细胞提取的总 DNA 在电泳谱上只有连续的一条带,梯形条带不明显(图 4)。

**2.3 流式细胞计检测结果** 运用碘化丙啶染色,流

式细胞计检测,IBDV 感染后 24 h 雏鸡法氏囊细胞和对照组法氏囊细胞样品,所作直方图见图 5。从图中可以看出,横轴代表 DNA 含量,纵轴代表细胞数量。感染后 24 h 法氏囊细胞在直方图上出现典型的亚二倍体核峰,即在二倍体峰( $G_1$  峰)左侧出现亚二倍体细胞群的峰型,呈现典型凋亡细胞的特征,

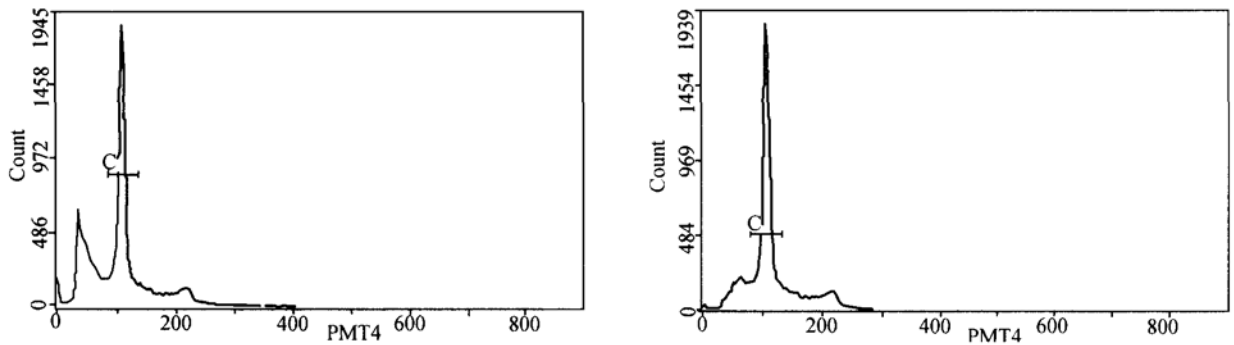


图5 IBDV 感染后 24h 和正常对照组雏鸡法氏囊细胞直方图。左图为试验组,右图为对照组,在 G1 期前出现的峰即为凋亡峰。

Fig. 5 Histogram of bursal cells from the control and IBDV-infected chickens(24h, PI). The right is for control. The left is for test group. The peak emerged in front of G1 period is for apoptotic peak.

凋亡细胞数量越多,亚二倍体核峰越明显,而正常对照组法氏囊细胞在直方图上的亚二倍体核峰不明显。

统计学分析表明,IBDV 感染后 12~72 h,雏鸡法氏囊凋亡细胞数量明显上升,至感染后 24 h 达到

高峰,随后慢慢下降。与对照组比较,IBDV 感染后 24 h,36 h 和 48 h 雏鸡法氏囊凋亡细胞数量显著或极显著上升( $P < 0.05$  或  $0.01$ ),其余时间法氏囊凋亡细胞数量亦高于对照组,但差异不显著( $P > 0.05$ )(图 6)。

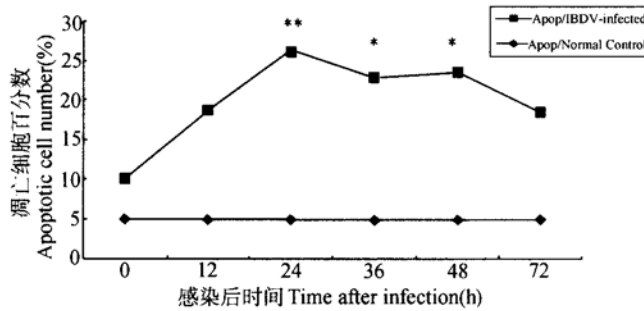


图6 IBDV 感染后 12~72h 雏鸡法氏囊凋亡细胞数量变化曲线

Fig. 6 Changes of apoptotic cell number in the BFs of IBDV infected chickens(12~72h, PI)

**2.4 凋亡指数的测定结果** IBDV 感染雏鸡法氏囊细胞和对照组雏鸡法氏囊细胞悬液样品经吖啶橙-溴化乙锭双染色,荧光显微镜观察,凋亡细胞表现为橙黄色荧光,而正常法氏囊细胞呈现绿色荧光。

IBDV 感染后 12~72 h,试验组雏鸡法氏囊凋亡细胞数量明显上升,和流式细胞计检测结果呈现相同的变化规律,至感染后 24~48 h,试验组雏鸡法氏囊凋亡细胞数量与对照组比较呈现显著或极显著差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),其他时间组法氏囊凋亡细胞数量均高于对照组,但差异并不显著(图 7)。

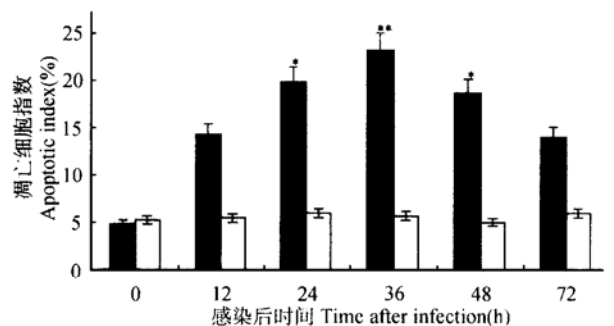


图7 IBDV 人工感染后雏鸡法氏囊凋亡细胞指数变化  
Fig. 7 Changes of apoptotic index in the Bfs of IBDV-infected chickens

### 3 讨论

**3.1 细胞凋亡**,是一种不同于细胞坏死的细胞死亡方式,是由 Kerr 等人于 1972 首先提出<sup>[8]</sup>。细胞凋亡具有特征性的形态学变化和生物化学变化,其形态学特征表现为细胞变圆,胞浆浓缩,核染色质密度

增高,凝集成一个或数个团块,凝聚在核膜周边,呈现半月形或新月形的凋亡小体<sup>[9]</sup>,生物化学特征表现为细胞 DNA 裂解的梯形图谱<sup>[10]</sup>。研究资料表明,鸡传染性贫血病毒、鸡新城疫病毒均可引起雏鸡淋巴细胞凋亡<sup>[11,12]</sup>。本试验利用传染性法氏囊

病病毒变异 E 株,人工感染 28 日龄雏鸡,通过透射电镜观察、琼脂糖凝胶电泳、流式细胞计分析和荧光显微镜观察统计,发现 IBDV 人工感染雏鸡后 12~48 h,法氏囊淋巴细胞出现典型的细胞凋亡的形态学特征和生化特征,表明 IBDV 人工感染可以诱导法氏囊淋巴细胞的细胞凋亡。

**3.2 流式细胞术**是 80 年代发展起来的一种细胞检测技术,它主要根据细胞表面和细胞内部的特殊标志物、特殊成份或者某些物理性质来达到分析或检测某种细胞和细胞系的目的。这种分析或检测主要依据细胞所产生的散射光信号和荧光信号<sup>[13]</sup>。我们运用流式细胞计检测了 IBDV 变异 E 株人工感染诱导雏鸡法氏囊淋巴细胞的细胞凋亡,取得了理想的效果。其试验结果与 Vasconcelos, A. C. (1995)、Ojeda, F (1997) 等人的试验结果基本一致<sup>[4,14]</sup>,但在细胞凋亡的出现时间和持续时间上略有差异,这可能是由于使用的毒株类型、毒株毒力和接种途径不一致所造成的。

**3.3 吖啶橙和溴化乙锭**是检测细胞 DNA 合适的荧光染料。正常细胞核染色质通过吖啶橙染色表现绿色荧光,而凋亡细胞由于其细胞膜通透性发生改变,导致溴化乙锭进入凋亡细胞内与裂解的寡聚 DNA 片段结合,在荧光显微镜下激发出强烈的橙黄色荧光<sup>[7]</sup>。IBDV 感染雏鸡法氏囊淋巴细胞经吖啶橙—溴化乙锭双染色,荧光显微镜观察,统计学分析,法氏囊淋巴细胞凋亡细胞数量变化与流式细胞计检测结果呈现基本一致的变化规律,同上述形态学结构观察和生化特征鉴定也表现良好的相关性。试验结果提示吖啶橙—溴化乙锭双染色、荧光显微镜观察是一项检测细胞凋亡简单而实用的手段。

#### 参考文献:

- [1] B. W. 卡尔尼克主编. 禽病学[M]. 高福, 刘文军译. 北京: 北京农业大学出版社, 1991, 554~566.
- [2] 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.
- [3] Vasconcelos A C, Lam K M. Apoptosis induced by infectious bursal disease virus[J]. Journal of General Virology, 1994, 75: 1803~1806.
- [4] Vasconcelos A C, Lam K M. Apoptosis in chicken embryos induced by the infectious bursal disease virus[J]. J. Comp. Path, 1995, 112: 327~338.
- [5] Rosenberger J K, Cloud S S. Isolation and characterization of variant infectious disease viruses [C]. Abstract 181, 123rd Annual Meet. Am. Vet. Med. Assoc., Atlanta, Ga, 1986, July 20~24.
- [6] Nicoletti I G. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry[J]. J Immunol Method, 1991, 139: 271~279.
- [7] Duke R C, Cohen J J. Morphological and biochemical assays of apoptosis[M]. In Current Protocols in Immunology, edited by Coligan, J. et al. New York: John Wiley and Sons, 1992.
- [8] Kerr J F R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br. J. Cancer, 1972, 26: 239~257.
- [9] Wyllie A H. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis[M]. In Cell Death in Biology and Pathology. Edited by Bowen, I. D. and Lockshin, R. A. London: Chapman and Hall, 1981.
- [10] Wyllie A H. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis[J]. J Pathol, 1984, 142: 67~77.
- [11] Jeurissen S H M. Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after *in vivo* infection and of cell lines after *in vitro* infection [J]. J Virol, 1992, 66: 7383~7388.
- [12] Lam K M, Vasconcelos A C. Apoptosis in peripheral blood lymphocytes induced by the Newcastle disease virus[J]. Vet Immunol and Immunopathol, 1994, 44: 45~56.
- [13] 宋平根, 李素文. 流式细胞术的原理和应用[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1992.
- [14] Ojeda F. Proliferation and apoptosis in infection with infectious bursal disease virus: A flow cytometric study[J]. Avian Dis, 1997, 41: 312~316.

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

CHEN Ming-yong, GAO Qi-yu, YANG Han-chun, QIAO Jian

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** Apoptosis of the bursal lymphocytes of chickens infected with variant serotype-1 isolate E of infectious bursal disease virus (IBDV) at 28-day-old was studied. The IBDV-infected bursal lymphocytes exhibited the morphological and biochemical features of apoptosis at 12~48 h after infection using 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 bursal lymphocytes increased significantly by 24~48 h post infection ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ). The results revealed that the bursal lymphocytes of chickens infected artificially with IBDV was induced to display apoptosis.

**Key words:** Variant serotype-1 isolate E of infectious bursal disease virus; Apoptosis Bursa of Fabricius; SPF chicken

## 中国畜牧兽医学会第十一次全国会员代表大会闭幕

(2001年12月21日)

中国畜牧兽医学会第十一次全国会员代表大会于2001年12月20—21日在北京胜利召开,160名代表参加会议,在中国科协、农业部畜牧兽医局、全国畜牧兽医总站和中国农业大学、中牧集团、中国农业科学院、中国农学会、农业部人事劳动司等单位关怀和支持下,经过全体代表的共同努力,二天来顺利完成了各项议程。这次会议是新世纪之初我国畜牧兽医界科技工作者的首次盛会,会议期间,全体代表认真审议通过了第十届理事会的工作报告和章程修改报告。履行代表职责,选举产生了第十一届理事会、常务理事、副理事长、秘书长。同时举办了高层次的专题报告会,听取了农业部的有关领导、中国农大领导及院士、专家所作的高水平报告,使我们从不同的角度上了解政府对21世纪发展畜牧业的战略方针和当前畜产品的安全问题以及加入WTO后中国畜牧业、饲料业的发展趋势的分析和疾病防治的对策等。

大会对十届理事会的工作报告予以了肯定。过去五年中,十届理事会在上级单位的领导和支持下,在各省学会、各学科分会的共同努力下做了大量的工作并取得了新的成绩,这次表彰了一批长期为学会工作做出贡献的名誉理事长4名、荣誉理事86人、荣誉会员36人以及先进学会19个和先进工作者35名,为今后的工作提出了新的希望。

今后的五年是处在新世纪的开始,广大畜牧兽医科技工作者和学会都肩负着重大的历史使命。中国科协“六大”要求,学会要坚持以邓小平理论为指导,认真学习,深刻理解,努力实践江泽民“三个代表”的重要思想,进一步团结和动员广大科技工作者,全面贯彻党的基本路线,紧紧围绕全党全国工作大局,以经济建设为中心,以发展为主题,围绕经济结构战略性调整,大力推动科技进步和创新,把履行党和政府联系科技工作者桥梁和纽带职责,建设“科技工作者之家”放在突出位置。在学术交流、科学普及和国际民间科技交流与合作等工作领域,努力开拓进取,不断提高水平和质量,加强自身建设,增强发展能力,为实施科教兴国战略和可持续发展战略,实现“十五”计划和中华民族的伟大复兴作出新的贡献。