

# 鸡传染性法氏囊病病毒在 DT40 细胞中的增殖规律

罗俊<sup>1</sup>, 滕蔓<sup>1</sup>, 樊剑鸣<sup>1,2</sup>, 邢广旭<sup>1</sup>, 李乔木<sup>1</sup>, 杨艳艳<sup>1</sup>, 张改平<sup>1\*</sup>

(1. 河南省农业科学院河南省动物免疫学重点实验室, 郑州 450002; 2. 郑州大学公共卫生学院毒理学教研室, 郑州 450001)

**摘要:** 为了系统地研究 IBDV 弱毒在 DT40 细胞系中的增殖规律, 作者探讨了 IBDV 弱毒株对 DT40 细胞的侵染性以及不同培养条件对 IBDV 在该细胞中增殖的影响。结果表明, 在基础维持液培养条件下, IBDV TAD 和 HN3 2 个弱毒株均不需要传代适应过程即可直接感染 DT40 细胞, 并在其中增殖; 而在细胞最佳生长液条件下, IBDV 可伴随宿主细胞的快速分裂而增殖, 并可在较长培养时间内进行连续、大量的病毒收获。本研究表明 DT40 细胞可以作为深入探讨 IBDV 分子致病机制的良好靶细胞模型, 其同时也可能为生产 IBDV 商品化疫苗提供一种潜在便捷的工具细胞。

**关键词:** IBDV; DT40 细胞; 病毒增殖; 疫苗制备

中图分类号: S852.659.4

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)08-1276-05

## Proliferation of Infectious Bursal Disease Virus in the Chicken B-lymphocyte Cell Line DT40

LUO Jun<sup>1</sup>, TENG Man<sup>1</sup>, FAN Jian-ming<sup>1,2</sup>, XING Guang-xu<sup>1</sup>, LI Qiao-mu<sup>1</sup>,  
YANG Yan-yan<sup>1</sup>, ZHANG Gai-ping<sup>1\*</sup>

(1. Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. The Laboratory of Toxicology, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** In the present study, the infectivity and propagation of infectious bursal disease virus (IBDV) in DT40 cells were investigated based on a systematic selection of the optimal maintenance medium for virus infection. The results showed that both of the two tested attenuated IBDV strains, TAD and HN3, could directly infect and proliferate in DT40 cells without adaptive passage. The IBDV particles could be rapidly propagated and continuously harvested at high titers for a long time, accompanying with the rapid growth of DT40 cells. Our data suggest that DT40 could be used as an ideal model for the research of the pathogenetic mechanisms of IBDV. Additionally, it could also serve as a potential system for the preparation of the commercial vaccines against IBDV.

**Key words:** IBDV; DT40; virus proliferation; vaccine preparation

在全球范围内, 传染性法氏囊病 (Infectious bursal disease, IBD) 已给养禽业带来了巨大损失, 深入研究该病的致病机制对于该病的防控具有重要

意义。研究表明, 法氏囊是鸡传染性法氏囊病病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 最重要的靶器官, 并且其对早期囊 B 细胞致病性最高<sup>[1-2]</sup>, 表

收稿日期: 2008-11-20

基金项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD06A04-6); 河南省基础与前沿研究计划项目 (082300433201)

作者简介: 罗俊 (1978-), 男, 河南罗山人, 博士, 副研究员, 主要从事动物病毒分子生物学与分子免疫学研究, Tel: 0371-65738179, E-mail: luojun593@yahoo.com.cn

通讯作者: 张改平 (1960-), Tel: 0371-65711364; Fax: 0371-65729031; E-mail: zhanggaiping2003@yahoo.com.cn

面携带 IgM 的 B 淋巴细胞是 IBDV 最主要的靶细胞<sup>[3-6]</sup>,然而,这些研究还主要停留在细胞水平,在分子水平研究 IBDV 致病机制的报道还很少。最近,利用鸡胚成纤维细胞(chicken embryo fibroblast cells, CEF)、Vero 细胞等易感细胞,已取得了一些研究进展<sup>[7-10]</sup>。显然,这些易感细胞系与 IBDV 在体内感染的靶细胞仍存在很多差异,如能寻找一种更能贴近体内真实感染状态的靶细胞模型对于研究 IBDV 的分子致病机制,将具有重要的意义。

DT40 细胞是来源于鸡法氏囊前 B 淋巴细胞的一个细胞系,其细胞膜表面表达有 sIgM,在生长过程中还向胞外分泌 IgM<sup>[11-12]</sup>。多项研究表明,DT40 细胞中仍存在高频率的免疫球蛋白基因转换,并且该细胞系应该定性为一种鸡法氏囊前 B 淋巴细胞系<sup>[12-13]</sup>。最近有研究表明,IBDV 全病毒粒子及表达的病毒蛋白均可诱导 DT40 细胞的凋亡<sup>[14-15]</sup>,然而,IBDV 弱毒株对 DT40 细胞的感染性及其增殖规律目前尚不清楚。作者在测定 DT40 细胞在不同维持培养液中生长情况的基础上,利用免疫组化技术检测 2 株 IBDV 弱毒株对该细胞系的感染力,并对不同培养条件对 IBDV 在 DT40 中的增殖规律的影响进行了系统研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病毒及细胞

IBDV 标准疫苗毒株 TAD、CEF 传代致弱毒株 HN3 均为笔者实验室保存。2 株病毒均用单层 CEF 细胞培养,收集病毒用常规方法测定病毒的 TCID<sub>50</sub>。DT40 细胞系(ATCC CRL-2111)为笔者实验室保存,DT40 细胞全培养基为含 10% 胎牛血清(fetal calf serum, FBS)、5% 鸡血清(chicken serum, CHS)、50 μmol·L<sup>-1</sup>的 β-巯基乙醇、100 U·L<sup>-1</sup> 氨苄青霉素以及 50 μg·mL<sup>-1</sup>链霉素的 RPMI-1640,培养基及血清均为 Gibco 公司产品。

### 1.2 病毒感染 DT40 最佳维持液的选择

为选择 IBDV 感染 DT40 细胞的最佳维持液,对 DT40 在不同血清添加浓度的培养基条件下的生长曲线进行了测定。将 DT40 用 RPMI-1640 全培养基连续传代 2~3 次、细胞浓度达到 0.4×10<sup>6</sup>~0.6×10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> 时收集细胞,用不含血清的 RPMI-1640 洗涤 1 次,按每瓶 1×10<sup>6</sup>、2×10<sup>6</sup> 或 3×10<sup>6</sup> 个细胞接种到细胞瓶中,分别添加 10 mL 含以下不同浓度及配比血清的细胞维持液:(1)2% FBS;(2)

2% CHS;(3)1% FBS 和 1% CHS;(4)1% FBS 和 1.25% CHS;(5)1.25% FBS 和 1% CHS;(6)1.25% FBS 和 1.25% CHS。37 °C 条件下 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24、48 及 72 h 后,分别取样进行细胞计数。以上试验均重复 3 次并进行统计分析。

### 1.3 病毒感染试验

收集对数生长期 DT40 细胞,灭菌 PBS 缓冲液洗涤 2 次,计数后按每组 2×10<sup>6</sup> 个细胞分为 3 组,分别用 200 μL PBS 稀释的 IBDV TAD、HN3 病毒液(病毒滴度为 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>)于 37 °C 孵育 30 min,对照组用 PBS 替代病毒液。孵育结束后,PBS 洗涤 2 次以去除未结合的病毒粒子。每组分别用 10 mL 含 1% FBS 和 1% CHS 的 RPMI-1640 培养基悬浮接种于细胞瓶,37 °C 培养。于接毒后 24、48、72 h 分别取样进行细胞计数、病毒滴定,绘制细胞及病毒增殖曲线。

### 1.4 细胞免疫组化试验

病毒接种 72 h 后,收集全部细胞分别用 RPMI-1640 基础培养基洗涤 2 次,然后用适量 RPMI-1640 基础培养基悬浮细胞铺板至 96 孔细胞板(每孔 100 μL 含 1×10<sup>4</sup> 个细胞),于 37 °C 培养 30 min 后小心弃去培养基;每孔添加 50 μL 含 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的甲醇固定液室温固定 10 min,弃去固定液;PBST-20 洗涤 6 次,每孔添加 200 μL 含 5% 猪血清的 PBST-20 封闭液于 37 °C 封闭 1 h 后弃去;同上洗涤后,每孔添加 50 μL 1:5 000 稀释的 IBDV F22 单抗腹水,37 °C 孵育 30 min 后弃去;同上洗涤后,每孔添加 50 μL 1:500 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP(华美公司产品),37 °C 孵育 30 min 后弃去;同上洗涤后,AEC(中杉金桥公司产品)显色,显微镜下观察结果。阳性对照组,IBDV 未感染的 DT40 细胞同上固定、封闭,分别用 50 μL 含 10 μg·mL<sup>-1</sup> 的 sIgM 特异性单抗 L1(SBA 公司产品)、50 μL 1:500 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 同上反应,最后用 AEC 显色。阴性对照组,除一抗用含 5% FBS 的 PBST-20 代替外,其余反应均相同。

### 1.5 IBDV 在 DT40 细胞中的大量增殖及连续收获

收集对数生长期 DT40 细胞,灭菌 PBS 液洗涤 2 次,计数后按每组 2×10<sup>6</sup> 个细胞分为 2 组,分别用 200 μL PBS 稀释的 IBDV TAD、HN3 病毒液(病毒滴度为 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>)于 37 °C 孵育 30 min。孵育结束后,PBS 洗涤 2 次以去除未结合的病毒粒子。每组分别用 10 mL DT40 细胞全培养基悬浮接种于细

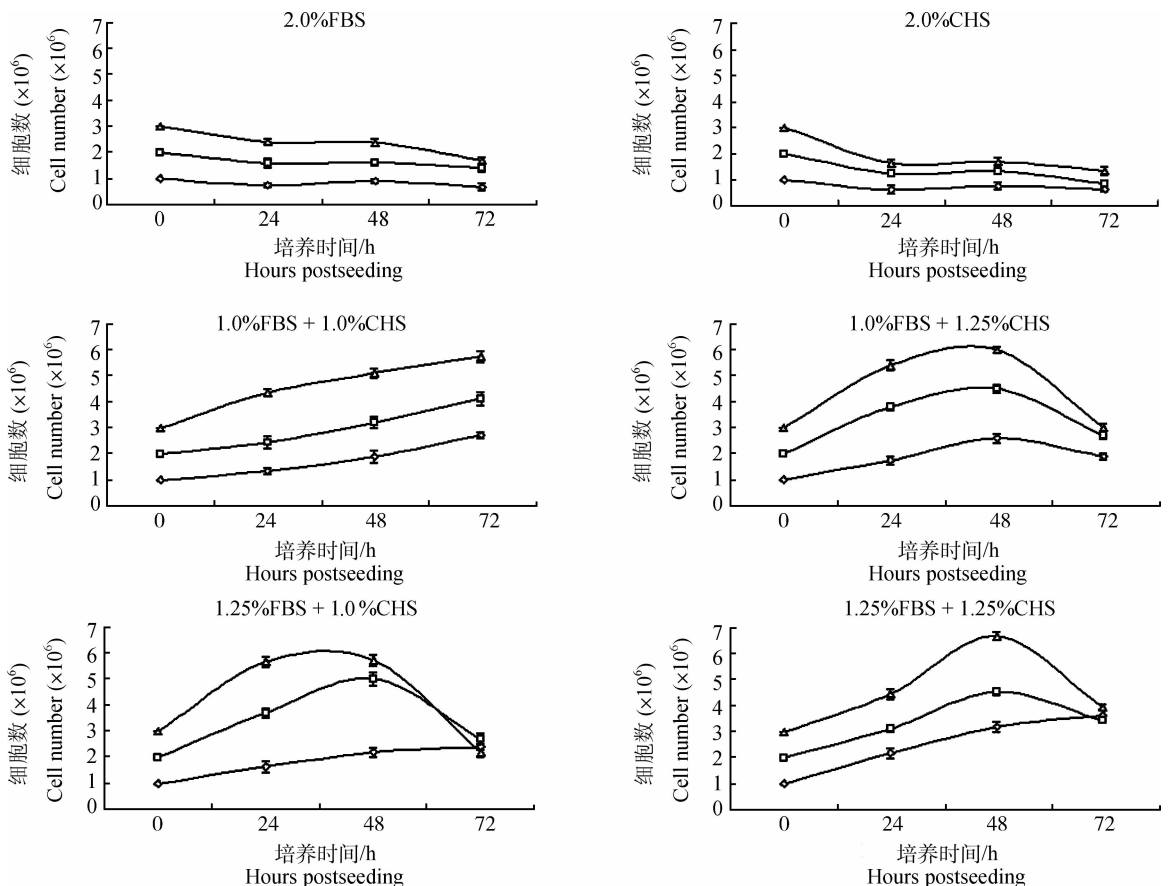
胞瓶, 37 °C 培养。接毒后 24、48、72 h 分别取样进行细胞计数。至 DT40 细胞浓度达到  $(1.5 \sim 1.8) \times 10^7$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  时开始, 每 24 h 进行一次半量收毒(即收集 5 mL 细胞培养物后再添加 5 mL 新鲜全培养基继续培养)并进行细胞计数。连续收毒 7 d, 对每批样品进行病毒滴定, 绘制细胞及病毒增殖曲线。

## 2 结果

### 2.1 DT40 病毒感染最佳细胞维持液

对 DT40 细胞在添加不同血清种类及浓度的 RPMI-1640 培养基中培养 72 h 内的生长曲线进行测定的结果表明(图 1), 在单独添加 2% FBS 或 2% CHS 的培养基中, 无论初始接种量为  $1 \times 10^6$ 、 $2 \times$

$10^6$  或  $3 \times 10^6$  个 DT40 细胞, 细胞数量均呈现不断下降的趋势, 而在添加 1% FBS 和 1% CHS 混合血清培养基中, 3 组不同初始量的 DT40 细胞在接种后 72 h 内均呈现较缓慢增加的趋势。当混合血清中 1% FBS 或 1% CHS 分别增加为 1.25% 或两种血清同时增加至 1.25% 时, DT40 细胞在 48 h 内均呈现较快增长, 但此后随着营养消耗的增加, 细胞数量开始急剧下降。在病毒感染试验中, 维持相对稳定的宿主细胞数量对于分析病毒感染过程具有重要的意义, 因此, 添加 1% FBS 和 1% CHS 的 RPMI-1640 培养基可以作为 DT40 病毒感染的最佳细胞维持液。



FBS. 胎牛血清; CHS. 鸡血清

FBS. Fetal bovine serum; CHS. Chicken serum

图 1 DT40 细胞在添加不同种类及浓度血清的 RPMI-1640 培养基中的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of DT40 maintained in RPMI-1640 medium supplemented with different concentrations of FBS and/or CHS

### 2.2 DT40 对 IBDV 弱毒株的易感性

病毒滴定结果表明(图 2A), TAD 病毒最早可

于感染后 24 h 检测到, 在随后的 48 h 内病毒滴度逐渐升高, 至 72 h 可达  $10^{2.2}$  TCID<sub>50</sub>  $\cdot 50 \mu\text{L}^{-1}$ 。与

TAD 相比,HN3 的病毒增殖速度稍快,在感染 72 h 后可达到  $10^{2.9}$  TCID<sub>50</sub> · 50  $\mu$ L<sup>-1</sup>。病毒感染后细胞生长曲线分析表明(图 2B),在病毒感染初期,细胞增殖较快,而随着病毒数量的增加,DT40 细胞的数量开始下降,这与病毒滴定结果一致。在病毒感染 72 h 时取样进行的细胞组化试验结果表明,TAD 和 HN3 均可特异性的感染部分 DT40 细胞(图 3)。这些数据表明,与 CEF 细胞类似,IBDV 弱毒株可以直接感染 DT40 细胞,不需要盲传适应过程。

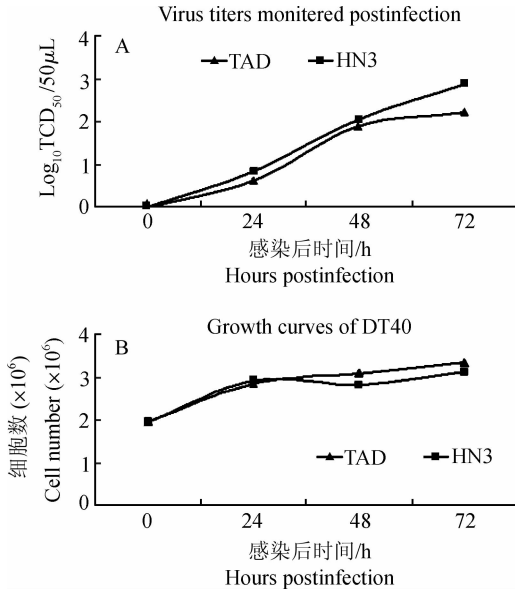
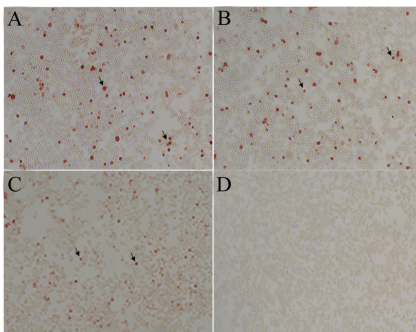


图 2 IBDV 弱毒株感染 DT40 后的病毒及细胞增殖曲线

Fig. 2 Demonstration of the infectivity of two attenuated IBDV strains to DT40



A. TAD; B. HN3; C. 阳性对照; D. 阴性对照。黑色箭头示阳性细胞

A. TAD; B. HN3; C. Positive control; D. Negative control. DT40 cells positively infected by IBDV are shown by the arrows

图 3 细胞免疫组化检测 DT40 中 IBDV 的感染情况 100 $\times$

Fig. 3 Immunohistochemical detection of IBDV infection in DT40 cells 100 $\times$

## 2.3 IBDV 在 DT40 细胞中的快速增殖及连续收获

IBDV 感染 DT40 细胞后,将感染细胞培养于 DT40 最佳生长培养液中,待细胞增加至最大细胞量后,每 24 h 收获一半细胞培养物,并重新添加等量新鲜生长培养基。与最佳细胞维持液相比,在 DT 细胞全培养基条件下 TAD 和 HN3 的病毒粒子增殖速度大幅提高,病毒感染 72 h 后 TAD 病毒滴度达到峰值,为  $10^{6.8}$  TCID<sub>50</sub> · 50  $\mu$ L<sup>-1</sup>,而 HN3 则可高达  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub> · 50  $\mu$ L<sup>-1</sup>。在培养基进行每天半量换液后,2 株 IBDV 的病毒滴度在 7 d 内仍维持在  $10^5$  至  $10^6$  TCID<sub>50</sub> · 50  $\mu$ L<sup>-1</sup> 的高水平(图 4A)。细胞计数结果表明,病毒感染后 DT40 的生长曲线变化趋势与病毒滴度变化趋势基本一致(图 4B),病毒感染 3 d 后,2 组细胞数量均达到峰值,此后均有所下降。感染后 4~7 d,HN3 组的 DT40 细胞数量稍低于 TAD 组,可能是 HN3 病毒的适应性稍强所致。这些数据表明 IBDV 病毒增殖数量主要取决于 DT40 细胞数量,在全培养基条件下,IBDV 可在 DT40 细胞中获得大量增殖,并且可伴随着 DT40 细胞的传代培养获得长时间的连续收毒。

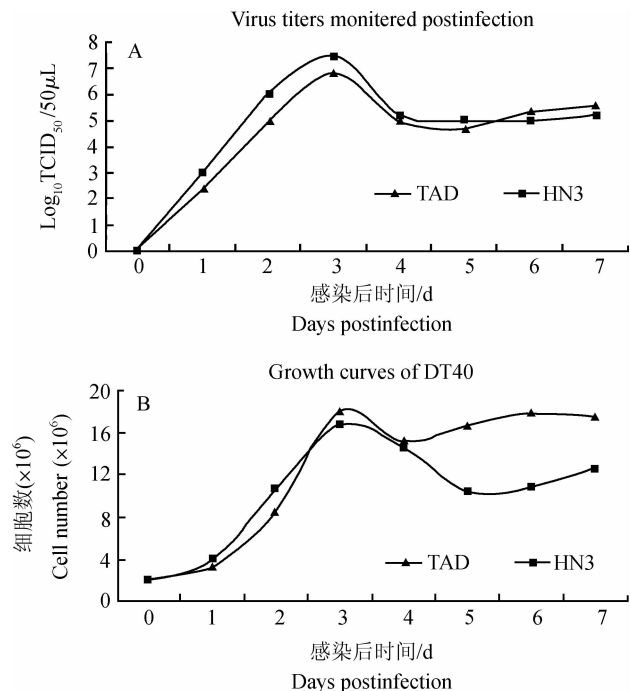


图 4 全培养基条件下 IBDV 感染 DT40 后的病毒及细胞增殖曲线

Fig. 4 Abundant proliferation of TAD and HN3 strains of IBDV in DT40 maintained in RPMI 1640 complete medium

### 3 讨论

作者对 DT40 细胞对 IBDV 弱毒株的易感性以及 IBDV 在其中的增殖规律进行了探讨, 结果发现, IBDV 弱毒株不需要传代适应即可直接感染该细胞系并在其中大量增殖。已有研究表明, DT40 是一种鸡法氏囊干细胞系, 并且由于其 DNA 同源重组率非常高而被广泛用于 B 细胞抗原受体信号传导、细胞循环调控、基因转换、细胞凋亡、DNA 修复等多个领域的研究<sup>[16]</sup>。因此, DT40 对 IBDV 弱毒的易感性表明, 其可以作为一种更加接近宿主体内真实状态的 B 淋巴靶细胞模型用于 IBDV 的致病机制研究。

对于病毒感染试验而言, 能够使靶细胞在未感染状态下的数量保持相对稳定的培养基一般被认为是最佳的细胞维持液。通常情况下, 人们一般使用含 2% 牛血清的培养基作为病毒接种时的维持液。然而在本试验中, 添加较低浓度的混合血清(1% 胎牛血清和 1% 鸡血清)于 RPMI-1640 培养基中的维持效果明显优于添加单一血清(2% 胎牛血清或 2% 鸡血清)及较高浓度的混合血清。这为今后利用 DT40 细胞进一步研究 IBDV 的致病机制提供了重要的基础。

令人意外的是, 当用最佳生长培养液培养 IBDV 感染的 DT40 细胞时, IBDV 的复制速度显著增加, 并且可以通过培养液半量更换的方式在较长的时间内进行连续收获病毒, 这意味着 IBDV 病毒的增殖速度与 DT40 细胞的生长速度相当, 病毒滴度的高低主要取决于宿主细胞的数量。因此, 这为大量生产 IBDV 病毒粒子提供了一种新的策略。众所周知, 在 IBDV 商品化疫苗生产过程中, 大量获得 IBDV 病毒粒子主要依赖于 CEF 细胞培养, 而 CEF 属于原代培养细胞, 大量制备该细胞的工作劳动强度很大。因此, 一旦确认 DT40 细胞本身不存在其它病毒污染后, 其可能为 IBDV 弱毒疫苗的生产提供一种便捷的工具细胞和新方法。

#### 参考文献:

- [ 1 ] KAUFER I, WEISS E. Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens [J]. *Infect Immun*, 1980, 27:364-367.
- [ 2 ] HUDSON L, PATTSO M, THANTREY N. Specific B lymphocyte suppression by infectious bursal agent (Gumboro disease virus) in chickens [J]. *Eur J Immunol*, 1975, 5:675-679.
- [ 3 ] HIRAI K, CALNEK B W. In vitro replication of infectious bursal disease virus in established lymphoid cell lines and chicken B lymphocytes [J]. *Infect Immun*, 1979, 25:964-970.
- [ 4 ] HIRAI K, FUNAKOSHI T, NAKAI T, et al. Sequential changes in the number of surface immunoglobulin-bearing B lymphocytes in infectious bursal disease virus-infected chickens [J]. *Avian Dis*, 1981, 25:484-496.
- [ 5 ] BURKHARDT E, MULLER H. Susceptibility of chicken blood lymphoblasts and monocytes to infectious bursal disease virus (IBDV) [J]. *Arch Virol*, 1987, 94:297-303.
- [ 6 ] OGAWA M, YAMAGUCHI T, SETIYONO A, et al. Some characteristics of a cellular receptor for virulent infectious bursal disease virus by using flow cytometry [J]. *Arch Virol*, 1998, 143:2327-2341.
- [ 7 ] LIN T W, LO C W, LAI S Y, et al. Chicken heat shock protein 90 is a component of the putative cellular receptor complex of infectious bursal disease virus [J]. *J Virol*, 2007, 81:8730-8741.
- [ 8 ] ZHENG X J, HONG L L, SHI L X, et al. Proteomics analysis of host cells infected with infectious bursal disease virus [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7:612-625.
- [ 9 ] 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.
- [10] KIBENGE F S, MCKENNA P K. Isolation and propagation of infectious bursal disease virus using the ovine kidney continuous cell line [J]. *Avian Dis*, 1992, 36:256-261.
- [11] BABA T W, HUMPHRIES E H. Differential response to avian leukosis virus infection exhibited by two chicken lines [J]. *Virology*, 1984, 135:181-188.
- [12] BABA T W, GIROIR B P, HUMPHRIES E H. Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes [J]. *Virology*, 1985, 144:139-151.
- [13] MCCORMACK W T, TJOELKER L W, THOMPSON C B. Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion [J]. *Annu Rev Immunol*, 1991, 9:219-241.
- [14] RODRIGUEZ-LECOMPTE J C, NION-FONG R, LOPEZ A, et al. Infectious bursal disease virus (IBDV) induces apoptosis in chicken B cells [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2005, 28:321-337.
- [15] PETERS M A, LIN T L, WU C C. Infectious bursal disease virus polyprotein expression arrests growth and mitogenic stimulation of B lymphocytes [J]. *Arch Virol*, 2004, 149:2413-2426.
- [16] WINDING P, BERCHTOLD M W. The chicken B cell line DT40; a novel tool for gene disruption experiments [J]. *J Immunol Methods*, 2001, 249:1-16.