

传染性法氏囊病毒对 SPF 雏鸡免疫器官细胞凋亡及 *bcl-2* mRNA 表达的影响

佟美姣, 高雪丽, 李博韬, 郑世民*

(东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 为证实传染性法氏囊病毒(IBDV)感染 SPF 雏鸡后, 其免疫器官细胞凋亡与 *bcl-2* mRNA 动态表达的关系, 应用 TUNEL 和实时荧光定量 PCR 方法分别对雏鸡免疫器官细胞凋亡数量和 *bcl-2* mRNA 表达的动态变化进行了检测, 结果发现, IBDV 感染雏鸡后 3~7 d, 法氏囊、胸腺和脾脏中凋亡细胞数量显著或极显著高于相应对照雏鸡 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 同时在上述 3 种免疫器官中 *bcl-2* mRNA 的表达均不同程度增加, 并于病毒感染后 3~7 d 差异显著或极显著 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。表明 IBDV 可增加感染雏鸡免疫器官的细胞凋亡数量和 *bcl-2* mRNA 的表达。

关键词: 雏鸡; 免疫器官; 细胞凋亡; *bcl-2* mRNA 表达

中图分类号: S858.315.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)04-0617-05

The Apoptosis and Expression of *bcl-2* mRNA in the Immune Organs of SPF Chicks Infected with Infectious Bursal Disease Virus

TONG Mei-jiao, GAO Xue-li, LI Bo-tao, ZHENG Shi-min*

(College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Apoptosis and expression of *bcl-2* mRNA in the immune organs of chicks infected with infectious bursal disease virus (IBDV) were investigated. The number of apoptosis cells was assessed by TUNEL method. The expression of *bcl-2* mRNA was investigated by Real-time PCR. The results showed that the apoptosis cells in bursa of Fabricius, thymus and spleen of chicks infected with IBDV from the third to seventh day post infection are significant or extremely significant higher than that of normal SPF chicks ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). At the same time, the expression of *bcl-2* mRNA significantly increased in the immune organs of SPF chicks infected with IBDV from the third to seventh day post infection compared with those of normal chicks ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). These study indicates that IBDV can improve the number of apoptosis and the expression of *bcl-2* mRNA in immune organs of chicks infected with IBDV.

Key words: chick; immune organ; apoptosis; expression of *bcl-2* mRNA

传染性法氏囊病 (Infectious bursal disease, IBD) 是由传染性法氏囊病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 感染产生的一种高度接触性传染性疾病, 破坏鸡体免疫器官, 引起免疫抑制。IBDV 感染鸡体后能够引起 B 淋巴细胞及携带有 IgM 早

期分化 B 淋巴细胞发生凋亡, 甚至坏死^[1]。研究发现^[2-3], IBDV 还能引起体外培养的鸡法氏囊细胞、Vero 细胞、鸡胚成纤维细胞发生凋亡。综合目前对该项的已有研究资料, 大多数研究都是在体外培养细胞中进行, 关于病毒感染鸡体后免疫器官中细胞

收稿日期: 2012-12-24

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(30901062)

作者简介: 佟美姣(1984-), 女, 黑龙江五常人, 硕士, 主要从事动物免疫病理研究, E-mail: A06050112@163.com

* 通信作者: 郑世民, E-mail: zhengshiminbl@sohu.com

凋亡及其调控机制研究较少。Bcl-2 家族是细胞凋亡调控关键蛋白,能够调节线粒体的结构与功能。Bcl-2 蛋白的作用包括抑制细胞凋亡,延长细胞寿命^[4]。鸡 *bcl-2* 基因测序是由日本学者在 1992 年完成,测定结果显示与人、鼠基因高度相似,相对分子质量为 25.687 ku,开放阅读框编码 233 个氨基酸残基,在鸡胸腺、脾脏、肾、大脑、心脏和卵巢等器官中均有表达。张书霞等^[5]研究表明,鸡胚胎时期 *bcl-2* 基因表达更为广泛,在成年鸡与胚胎鸡中 *bcl-2* 表达率与细胞凋亡率之间均呈现负调节关系。本试验旨在研究 IBDV 感染雏鸡后,其免疫器官中细胞凋亡以及 *bcl-2* mRNA 表达变化,为探讨 IBDV 致病机理提供实验依据和新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和病毒 21 日龄 CSIRO-MVS 品种 SPF 雏鸡 100 只,购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 SPF 雏鸡实验动物中心并提供饲养;IBDV 强毒(J1C7)株,购自中国兽医药品监察所。

1.1.2 主要试剂 凯基 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒,购自南京凯基生物有限公司;AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒,购自爱思进生物技术(杭州)有限公司;TrizolLS Reagent,购自美国 Invitrogen 公司;SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II,购自大连宝生物工程有限公司;Oligo(dT)15,购自北京天根生物有限公司;M-MLV Reverse Transcriptase,购自美国 Promega 公司。

1.1.3 主要仪器 LightCycler2.0 荧光定量 PCR 仪(美国罗氏公司);PTC-200 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司);DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂);GDS-800 凝胶成像系统(美国 UVP 公司);-80 °C 冰箱(英国 New Brunswick Scientific 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理 100 只 21 日龄

SPF 雏鸡随机均分为病毒感染组(I 组)和对照组(C 组)。其中 I 组雏鸡经滴鼻、点眼感染 IBDV 稀释液 0.1 mL·只⁻¹;C 组雏鸡经上述相同途径应用等量高压灭菌的 PBS。2 组雏鸡分别于感染后 1、3、5、7、14 和 28 d,每组随机抽取 5 只雏鸡心脏采血处死或发病死亡前剖杀,取胸腺、脾脏和法氏囊,做相应处理,供各项检测指标使用。

1.2.2 检测指标及方法

1.2.2.1 免疫器官中凋亡细胞数目测定:采用 TUNEL 法,参照凯基生物公司 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒说明书提供的方法进行操作。每张切片显微镜下随机取 5 个高倍视野,结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。

1.2.2.2 免疫器官中 *bcl-2* mRNA 表达量测定:采用实时荧光定量 PCR 法,①引物设计与合成,通过 Oligo 6.0 及 Primer 5.0 软件设计 *bcl-2*、 β actin 基因引物,由北京英俊生物工程有限公司合成。各引物序列及扩增片段长度见表 1。②免疫器官 *bcl-2* mRNA 表达检测,提取免疫器官中(法氏囊、胸腺和脾脏)RNA,反转录为 cDNA。应用各自引物进行 PCR(反应程序:*bcl-2* 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环,72 °C 终延伸 10 min。 β actin 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环,72 °C 终延伸 10 min)。

PCR 产物进行常规纯化、连接以及转化之后提取质粒,送英俊生物技术公司测序,结果正确后进行后续试验。自-80 °C 冰箱中取出免疫器官 cDNA,以各自引物对 *bcl-2*、 β actin 基因于 32 孔 LightCycler2.0 荧光定量 PCR 仪中加样进行扩增检测,每个样品做 3 个重复,并设阴性对照(反应程序同上)。根据 *bcl-2*、 β actin 基因扩增效率,对 Real-time PCR 结果以 β -actin 为内参照运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

表 1 引物序列及扩增片段长度

Table 1 The primers sequences and amplification fragments sizes

引物名称 Names of primers	序列(5'-3') Sequences	片段长度/bp Fragments sizes	基因序列号 No. of genes
bcl-2(P1)	CGCCGCTACCAGAGGGACTT	123	Z11961.1
bcl-2(P2)	CCGACCCAGTTGACCCCAT		
β -actin(P1)	TGAAGCCCAGAGCAAAAAGAGGTAT	135	AW61617
β -actin(P2)	TGCTCCTCAGGGCTACTCTC		

1.3 数据处理

应用 SPSS 17.0 统计分析软件对数据进行处理。

2 结果

2.1 IBDV 感染雏鸡免疫器官凋亡细胞数量动态变化

IBDV 感染雏鸡,其胸腺、脾脏和法氏囊凋亡细

胞数量均于病毒感染后 3~7 d 显著或极显著高于相应对照雏鸡($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。其他检测点未见统计学差异($P>0.05$)(表 2)。

2.2 IBDV 感染雏鸡免疫器官 *bcl-2* mRNA 表达的动态变化

bcl-2 和 β actin 目的片段 RT-PCR 扩增电泳结果见图 1。

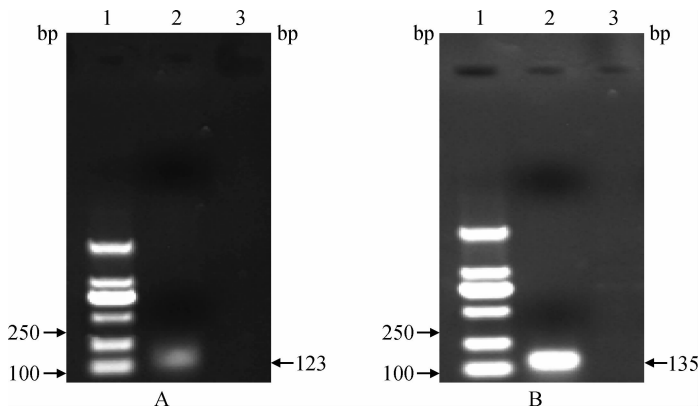
表 2 IBDV 感染 SPF 雏鸡免疫器官凋亡细胞数量变化($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Changes of the number of apoptosis cell in the immune organs of SPF chicks infected with IBDV ($\bar{x}\pm s, n=5$)

个·视野⁻¹

日龄/d Age	组别 Group	法氏囊 Bursa of Fabricius	胸腺 Thymus	脾脏 Spleen
1	C	4.0±1.6	8.6±2.4	5.6±1.816
	I	3.4±2.1	6.8±1.3	8.2±1.643
3	C	4.0±1.6	4.4±1.1	5.6±2.7
	I	32.6±1.0**	17.6±2.4**	20.8±2.9*
5	C	8.4±1.1	2.4±1.8	3.0±2.4
	I	22.8±1.0**	22.8±5.9**	18.8±3.8**
7	C	4.8±1.5	3.0±2.1	5.0±1.6
	I	10.6±2.1**	10.4±2.3*	8.6±2.4*
14	C	5.2±0.8	2.4±1.7	6.2±3.1
	I	7.2±1.5	5.0±3.0	8.4±2.1
28	C	4.0±1.9	5.2±1.6	10.2±2.1
	I	6.7±1.3	5.0±1.6	9.6±1.0

C. 对照组;I. IBDV 感染组;* 表示差异显著 $P<0.05$, ** 表示差异极显著 $P<0.01$, 无标号者差异不显著 $P>0.05$ 。下同
C. Control group;I. Group infected with IBDV; The values designated by an asterisk are significantly different from non-IBDV control ($* P<0.05$), double asterisks are very significantly different from non-IBDV control ($** P<0.01$) and unlabeled is no significant difference ($P>0.05$). The following is same as here.



A. *bcl-2* 基因;B. β actin 基因;1. DL2000 相对分子质量标准;2. PCR 产物;3. 阴性对照

A. *bcl-2* gene;B. β actin gene;1. DL2000 marker; 2. The product of PCR amplification; 3. Negative control

图 1 *bcl-2*、 β actin 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 The result of PCR amplification of *bcl-2* and β actin gene

IBDV 感染雏鸡后,其法氏囊、胸腺和脾脏的 *bcl-2* mRNA 表达较相应对照雏鸡均有不同程度的增加(表 3)。其中法氏囊 *bcl-2* mRNA 表达在感染后 3~7 d 较对照雏鸡增多($P<0.05$);胸腺 *bcl-2*

mRNA 表达于病毒感染后 3~5 d 极显著高于对照雏鸡($P<0.01$);脾脏在感染后 3d 明显高于对照雏鸡($P<0.05$)。

表 3 IBDV 感染 SPF 雏鸡免疫器官中 *bcl-2* mRNA 表达的动态变化

Table 3 Dynamic changes of the expression of *bcl-2* mRNA in the immune organs of SPF chicks infected with IBDV

日龄/d Age	组别 Group	法氏囊 Bursa of Fabricius	胸腺 Thymus	脾脏 Spleen
1	C	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
	I	1.707±0.955	0.079±0.004	0.379±0.008
3	C	1.378±0.001	0.061±0.000	0.382±0.000
	I	2.877±0.003 *	0.905±0.001 * *	0.848±0.011 *
5	C	1.042±0.082	0.308±0.235	0.478±0.009
	I	2.650±0.434 *	0.836±0.033 * *	0.584±0.025
7	C	1.203±0.007	0.384±0.005	0.345±0.002
	I	2.621±0.030 *	0.440±0.009	0.397±0.002
14	C	1.045±0.006	0.064±0.003	0.600±0.002
	I	1.244±0.050	0.126±0.016	0.658±0.003
28	C	0.763±0.006	0.173±0.009	0.331±0.002
	I	0.648±0.028	0.132±0.007	0.315±0.003

3 讨论

细胞凋亡是有核细胞在一定条件下通过启动其自身内部机制,通过激活内源性 DNA 内切酶而引发细胞自然死亡过程。细胞凋亡受多种基因控制,是机体为了更好地适应环境而主动死亡过程,普遍存在于动植物体内,在胚胎发育、肿瘤、生殖、免疫和病毒感染等过程中起到重要作用。细胞凋亡测定方法较多,例如流式细胞仪、原位末端标记、ELISA、定量琼脂凝胶电泳等。本研究采用 TUNEL 方法,虽然该方法本身并不能区分细胞凋亡与坏死,但可与其他方法(如 HE 染色)结合应用,该法的优点是简单方便,易于观察,敏感性较高,可以量化凋亡细胞数量。

本研究发现,IBDV 感染 21 日龄 SPF 雏鸡后,其免疫器官中凋亡细胞数量增高。其胸腺与脾脏中凋亡细胞数量在感染后 3~7 d 显著或极显著高于相应对照雏鸡($P<0.05$ 或 $P<0.01$);法氏囊凋亡细胞数量在感染后 3~7 d 显著增多($P<0.01$),且变化尤为明显,增加量多于其他 2 种免疫器官。IB-

DV 感染雏鸡后,其法氏囊内未成熟 B 淋巴细胞发生大量死亡引起雏鸡体液免疫失衡,同时也能引起鸡体内成熟 B、T 淋巴细胞凋亡,使鸡体免疫力下降,导致机体严重的长期免疫抑制^[6-7]。陈明勇等^[8]用 IBDV 变异 E 毒株人工感染 28 日龄 SPF 雏鸡,结果显示,IBDV 感染后 12~48 h 雏鸡法氏囊淋巴细胞呈现典型细胞凋亡形态和生化特征。刘玉锋等^[9]利用 TUNEL 方法证实,IBDV 超强毒株感染 SPF 鸡后 1~7 d,其法氏囊有大量淋巴细胞凋亡,其中感染后 3~6 d 尤为显著,本研究结果与其基本一致。上述研究均表明,IBDV 感染与细胞凋亡之间存在密切关系,也可能是 IBDV 感染导致雏鸡免疫功能下降的主要因素之一。

Bcl-2 家族与细胞凋亡密不可分,主要参与细胞凋亡线粒体途径,影响 Caspase 家族和细胞色素 C 等释放。张书霞等^[5]利用多种方法研究 *bcl-2* 基因在成年鸡与胚胎鸡免疫器官中的表达变化,结果发现,Bcl-2 是鸡免疫器官发育的重要调节物。刘畅^[10]研究发现,益生菌应用雏鸡 IBDV 感染后,其免疫器官 *bcl-2* mRNA 表达增加,同时 Caspase-3 与

Caspase-9 表达上升。本研究对 IBDV 感染雏鸡后免疫器官中 *bcl-2* mRNA 表达的动态变化进行检测。结果发现,IBDV 感染雏鸡后 3~7 d,其免疫器官 *bcl-2* mRNA 表达极显著高于对照雏鸡 ($P < 0.01$),其中法氏囊表达量最高,胸腺表达量最小。刘玉锋^[11]利用不同 IBDV 毒株感染雏鸡,试验结果显示,其胸腺中并未见 Bcl-2 蛋白表达,本研究结果与其存在一定差异。分析产生差异的主要原因可概括如下:首先是该差异可能是由于研究使用的 IBDV 毒株的毒力不同;其次可能是由于研究方法不同,本试验应用的实时荧光定量 PCR 方法,此方法较为敏感,较少的量就可检测出,结果也显示出胸腺的 *bcl-2* mRNA 的表达量较少。*bcl-2* 基因是抗凋亡基因,但是在研究过程中凋亡细胞数量显著增加的同时 *bcl-2* mRNA 基因表达量也增加,这可能有两方面原因,一种可能是在病毒感染早期,通过增加 *bcl-2* mRNA 表达量抑制细胞凋亡,以有利于病毒在细胞中复制;另一种可能是 IBDV 感染雏鸡后,由于病毒可促进细胞凋亡,从而反作用引起 *bcl-2* mRNA 表达量增加抑制病毒诱导的细胞凋亡作用。

4 结 论

IBDV 感染 SPF 雏鸡后能够引起免疫器官法氏囊、胸腺和脾脏中凋亡细胞数量及 *bcl-2* mRNA 表达量增加;表明 IBDV 感染雏鸡后,其免疫器官中凋亡细胞数量变化与 *bcl-2* mRNA 表达密切相关。

参考文献:

[1] QI X, GAO H, GAO Y, et al. Naturally occurring mutations at residues 253 and 284 in VP2 contribute to the cell tropism and virulence of very virulent in-

- fectious bursal disease virus[J]. *Antiviral Res*, 2009, 84:225-233.
- [2] VASCONCELOS A C, LAM K M. Apoptosis induced by infectious bursal disease virus [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75(7):1083-1086.
- [3] 赵绪永. 传染性法氏囊病毒感染鸡胚成纤维细胞机理研究[D]. 郑州:河南农业大学, 2008.
- [4] VAUX D L, CORY S, ADEMS J M, et al. Bcl-2 genes promotes hematopoietic cells survival and cooperates with c-myc to immortalize pro-B-cell[J]. *Nature*, 1998, 335 (6189):440-442.
- [5] 张书霞,陈万芳,于 用,等. *bcl-2* 基因在成年和胚胎鸡免疫器官中的表达及其与细胞凋亡的关系[J]. 南京农业大学学报, 1999, 22(4):65-68.
- [6] SLAM M N, RASHIDS M H, HOQUE M F, et al. Pathogenicity of IBDV related to outbreaks in the vaccinated flocks and the causes of vaccination failure [J]. *J Innov Dev Strategy*, 2008, 2(3):22-30.
- [7] LIU M, VAKHARIA V N. Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection[J]. *J Virol*, 2006, 7(80):3369-3377.
- [8] 陈明勇,高齐瑜,杨汉青,等. 传染性法氏囊病毒变 E 株感染鸡细胞凋亡的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(2):180-184.
- [9] 刘玉锋,余锐萍,李慧姣,等. IBDV 强毒株感染 SPF 鸡后法氏囊淋巴细胞的凋亡及调控机制[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(3):45-48.
- [10] 刘 畅. 益生菌对 IBD 疫苗免疫雏鸡免疫器官细胞凋亡的影响[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2012.
- [11] 刘玉锋. 不同毒力的 IBDV 毒株致病特性和免疫特性的比较研究[D]. 北京:中国农业大学, 2004.

(编辑 白永平)