

IBDV 感染雏鸡外周血液淋巴细胞 chMDA5 信号通路因子表达的动态变化

王成成, 葛 铭, 刘超男, 栾亚男, 李广兴, 张瑞莉*

(东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030)

摘 要: 为研究鸡 MDA5(chMDA5)及其信号通路因子在传染性法氏囊病病毒(IBDV)感染雏鸡体内的表达情况, 将 40 只 14 日龄 SPF 雏鸡随机分为感染组和对照组, 感染组雏鸡经点眼、滴鼻方式给予 IBDV 液, 对照组雏鸡于相同日龄、相同途径给予相同剂量 PBS, 于感染后第 1、4、7 及 21 天采取雏鸡外周血液并分离淋巴细胞, 采用实时荧光定量 PCR 方法检测雏鸡外周血液淋巴细胞 chMDA5 信号通路因子 mRNA 转录及 IBDV 载量的动态变化。结果表明, IBDV 感染雏鸡后第 4 天病毒载量较感染后第 1 天明显升高, 之后逐渐下降; 雏鸡淋巴细胞 chMDA5 及其信号通路因子表达量在感染后第 4 天均有明显的上升($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 感染后第 7—21 天又出现下调。IBDV 能够激活雏鸡体内 chMDA5 信号通路, 并且 IBDV 复制与 chMDA5 信号通路因子的表达有着密切关系。

关键词: IBDV; chMDA5; 雏鸡; 外周血液淋巴细胞

中图分类号: S852.659.4

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)05-0830-06

Dynamic Changing in the Expression of chMDA5 Signal Pathway Factors in Peripheral Blood Lymphocytes of Chicken Infected with IBDV

WANG Cheng-cheng, GE Ming, LIU Chao-nan, LUAN Ya-nan, LI Guang-xing, ZHANG Rui-li*

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

Abstract: The present study investigated the expression of chick melanoma differentiation associated gene 5(chMDA5) and its signaling pathway factors in chickens infected with infectious bursal disease virus(IBDV). Fourty 14-day-old specific pathogen free(SPF) chickens were randomly allocated into 2 groups which were infected and control groups. The infected group of chickens was inoculated with IBDV by intraocularly and intranasally. Meanwhile, the control group chickens were administered with PBS by intraocularly and intranasally. Peripheral blood lymphocytes were isolated at the 1st, 4th, 7th and 21st day after infection. Real-time fluorescence quantitative PCR method was used to detect the mRNA expression levels of chMDA5 signal pathway factors and the IBDV loads in peripheral blood lymphocytes of chickens. The results showed that the viral loads of IBDV-infected chickens in peripheral blood lymphocytes on the 4th day were significantly higher than that in the 1st day, and then gradually declined. The expression of chMDA5 and its downstream targets genes were significantly increased($P < 0.01$ or $P < 0.05$) at the 4th day after infection, then reduced at 7-21 day than that in the control group. The results indicated that IBDV could activate the chMDA5 signaling pathways in chickens. In addition, the replication of IBDV had closely relationship with the expression of chMDA5 signaling pathways factors.

Key words: IBDV; chMDA5; chickens; peripheral blood lymphocyte

收稿日期: 2014-09-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31272533)

作者简介: 王成成(1988-), 女, 辽宁辽阳人, 硕士生, 主要从事预防兽医学研究

* 通信作者: 张瑞莉, E-mail: zhangruili@neau.edu.cn

机体的天然免疫系统在抵抗病毒感染方面发挥着重要作用。病毒感染宿主细胞后,宿主细胞可以通过模式识别受体(pattern recognition receptors, PRR)识别病原相关分子模式(pathogen associated molecule patterns, PAMP),从而区别病原生物与机体自身^[1]。RIG-I 样受体(RIG-I like receptors, RLRs)是一类新发现的能够特异性识别细胞质中病毒 dsRNA 的模式识别受体。RLRs 家族成员主要包括三个:视黄酸诱导基因-1(retinoic acid-induced gene 1, RIG-I)、黑色素瘤分化相关基因 5(melanoma differentiation associated gene 5, MDA5)和 LGP2(laboratory of genetics and physiology 2),能够识别细胞质中的病毒 RNA,诱导干扰素和促炎症细胞因子的产生,在抗病毒天然免疫的建立方面起着至关重要的作用。其中,MDA5 在体内的表达十分广泛,主要依赖于线粒体外膜的衔接蛋白分子即 IFN- β 启动子激活因子 1(IFN- β -promoter stimulator 1, IPS-1)启动特异性的信号通路,介导抗病毒效应。MDA5 激活的信号转导途径对机体启动抗病毒天然免疫发挥着重要作用^[2]。鸭拥有完整的 RIG-I 受体,在 A 型流感病毒感染的时候被激活从而上调 IFN- β 表达,相比之下,鸡缺乏这种 RNA 解旋酶。鸡的胚胎成纤维细胞系 DF-1 细胞对 RIG-I 配体无免疫反应,但将鸭 RIG-I 基因转染到 DF-1 细胞后则可以检测这种 RNA 解旋酶,并诱导 IFN- β 启动子表达。也就是说,鸡细胞内可能缺乏 RIG-I 受体^[3]。那么,鸡细胞内是否存在 MDA5 受体呢?研究发现,在 RIG-I 缺乏的鸡细胞内(包括 DF-1 成纤维细胞和 HD-11 巨噬细胞样细胞),MDA5 活化介导 IFN- β 的合成分泌而发挥抗禽流感病毒作用^[4-5]。

鸡传染性法氏囊病(infection bursal disease, IBD)是由双链 RNA 病毒科禽双链 RNA 病毒属法氏囊炎病毒(infection bursal disease virus, IBDV)引起的一种鸡的急性高度接触性免疫抑制传染病^[6]。已证实,相对较长的 dsRNA(>1 kb)可被 MDA5 选择性识别,而短的 dsRNA(<1 kb)则依赖于 RIG-I 的识别^[7]。IBDV 基因序列全长 A 段为 3.2~3.4 kb, B 段为 2.4 kb^[8],那么,MDA5 信号转导通路是否参与 IBDV 感染过程? C. C. Lee 等最新体外研究发现,DF-1 细胞内 MDA5 能够识别 IBDV^[9],但是,在复杂的鸡体内,IBDV 感染是否激活 MDA5 信号转导通路,至今未见有报道。因此,本

项研究拟从能够特异性识别 dsRNA 病毒的模式识别受体 MDA5 及其信号转导入手,以雏鸡为研究对象,研究雏鸡感染 IBDV 后,其外周血液淋巴细胞 chMDA5 信号转导通路中衔接蛋白分子(chIPS-1)、转录因子(chIRF3)及其诱导产物(chIFN- β)表达变化,从雏鸡体内抗病毒模式识别及信号转导的角度在分子水平阐明 IBDV 致雏鸡发病机制,为防制雏鸡 IBD 提供新的科学思路。

1 材料与方法

1.1 病毒及实验动物

IBDV JIC7 株,TCID₅₀ 为 $10^{5.5} \cdot 0.1 \text{ mL}^{-1}$,购自中国兽医药品监察所。

SPF 雏鸡 40 只,购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 SPF 实验动物中心。

1.2 主要试剂和仪器

SYBR Green Realtime PCR Master Mix 购自 TOYOBO 公司;Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司;M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂均购自大连宝生物工程有限公司;鸡淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司;ABI 7500 荧光定量 PCR 仪,Life Technologies 产品。

1.3 实验动物分组及处理

将 40 只 SPF 雏鸡随机分为感染组和对照组,每组 20 只。其中,感染组雏鸡于 14 日龄经点眼、滴鼻方式给予 IBDV 液,每只 0.6 mL,对照组雏鸡于相同日龄、相同途径给予相同剂量 PBS。两组雏鸡分别严格隔离饲养。在感染 IBDV 后第 1、4、7、21 天,每组随机抽取 5 只雏鸡,心脏采血,经抗凝处理后按照淋巴细胞分层液说明书分离淋巴细胞。

1.4 雏鸡外周血淋巴细胞总 RNA 的提取与反转录

参照 Trizol 试剂盒说明书进行雏鸡外周血淋巴细胞总 RNA 的提取。之后参照反转录试剂盒说明书,将提取的总 RNA 反转录成 cDNA,置于 -20 °C 备用。

1.5 引物的设计与合成

根据 GenBank 上公布的 chMDA5 受体及其信号通路因子序列,在基因保守区内设计特异性的引物,用于实时荧光定量 PCR 反应检测 chMDA5 受体及其信号通路因子 mRNA 的转录情况。同时,根据 GenBank 上公布的 *ch β actin* 基因序列设计特异性引物,作为参考基因,引物由博仕生物有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 chMDA5 受体及其信号通路因子和参考基因目的片段扩增用引物

Table 1 The primers used to amplify the gene fragment of chMDA5 and its signaling pathway factors

基因 Name of primers	引物序列(5'-3') Sequences(5'-3')	大小/bp Fragments sizes
chMDA5	GGAAGGCCCTAGACATCAAAGAGTG	135
	CATCTTCACGTTCAACAGCTCCTG	
chIPS-1	TGCAGGGAGGCCATACACCAGTG	124
	TCCACCTCCCAAGGTGACCCGTG	
chIRF3	CTCTCTGACTCTTTCAACCTCTTCG	260
	TGCTGCCTGCTCCTGTGG	
chIFN- β	GCCACACACTCCAAAACACTG	151
	TTGATGCTGAGGTGAGCGTTG	
ch β actin	ATTGCTGCGCTCGTTGTT	173
	CTTTTGCTCTGGGCTTCA	

1.6 雏鸡外周血液淋巴细胞 chMDA5 及其信号通路因子(chIPS-1、chIRF3、chIFN- β) mRNA 的检测

实时荧光定量反应采用 ABI Prism 7500 实时荧光定量 PCR 仪进行检测,PCR 反应程序:95 °C 预变性 1 min,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 40 s,共 40 个循环,退火延伸时检测荧光信号。PCR 反应体系: Mix 10 μ L、PCR Forward Primer(10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.6 μ L、PCR Reverse Primer(10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.6 μ L、cDNA 2 μ L、ROX 0.04 μ L、H₂O 补全 20 μ L。对 PCR 结果采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法进行分析,试验中由 PCR 仪设定统一的荧光阈值,PCR 扩增信号达到阈值后,仪器将计算出此反应所需的循环数为 C_t 值。以 ch β actin 为参考基因,各试验处理组中相对于对照组的 $\Delta\Delta C_t$ 值根据以下公式计算: $\Delta\Delta C_t$ 值=感染组(目的基因 C_t 值-参考基因 C_t 值)-对照组(目的基因 C_t 值-参考基因 C_t 值)。利用公式计算出 mRNA 相对转录量为 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 。

1.7 雏鸡外周血液淋巴细胞 IBDV 载量的检测

1.7.1 IBDV-VP2 实时荧光定量 PCR 标准曲线的绘制 将重组质粒 T-IBDV-VP2(本实验室制备并保存)进行 10 倍倍比稀释:10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷,作为标准品模板,使用前测定原始质粒浓度并换算成质粒的拷贝数。用 IBDV 实时荧光定量 PCR 引物(上游引物为 CAAACCT-GCAAGATCAAACC,下游引物为 AAGCCAGG-GAAAAAGACAA,预期扩增片段长度为 184 bp)进行荧光定量 PCR 扩增,并绘制标准曲线。PCR 程序及体系同 1.6。以不同浓度标准品的对数值为横坐标,以 PCR 反应中荧光信号达到阈值所用的

C_t 值为纵坐标绘制 T-IBDV-VP2 标准曲线。

1.7.2 IBDV 载量动态变化检测 以 1.5 制备的雏鸡外周血液淋巴细胞 cDNA 为模板,以 IBDV 实时荧光定量 PCR 扩增引物进行实时荧光定量 PCR 反应,反应条件与反应体系同 1.6。反应结束后,记录各试验样品的 C_t 值,将其代入 T-IBDV-VP2 标准质粒绘制的标准曲线建立的回归方程,可以得出相应试验组病毒的拷贝数。

1.8 数据统计与分析

采用 Graph PadPrism 软件进行数据处理,经方差分析法分析组间差异性。

2 结果

2.1 雏鸡外周血液淋巴细胞 IBDV 载量的动态变化

以不同浓度标准品的对数值为横坐标,以 PCR 反应中荧光信号达到阈值所用的 C_t 值为纵坐标绘制 T-IBDV-VP2 标准曲线,标准品的对数值与 C_t 值之间成线性关系,反应的相关系数 R² = 0.999 286,T-IBDV-VP2 质粒扩增效率为 90.1%,获得回归方程:Y = -3.585 967X + 30.30。将各感染组测得的 C_t 值代入方程,可以得出相应感染组病毒拷贝数,根据各拷贝数,绘制病毒含量的动态变化图,如图 1 所示,雏鸡感染 IBDV 后第 4 天,其外周血液淋巴细胞 IBDV 载量与感染后第 1 天相比迅速升高并且达到峰值,之后逐渐下降,感染后第 21 天 IBDV 载量与感染后第 1 天基本持平。

2.2 雏鸡外周血液淋巴细胞 chMDA5、chIPS-1、chIRF3、chIFN- β mRNA 表达的动态变化

雏鸡感染 IBDV 后,其外周血液淋巴细胞 chM-

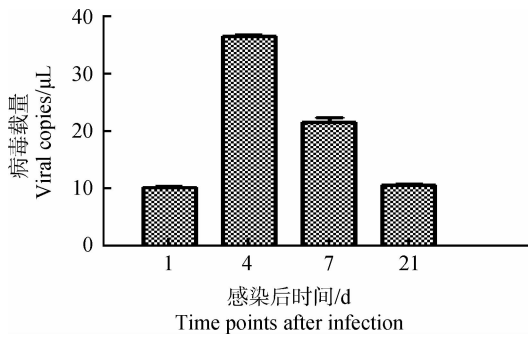
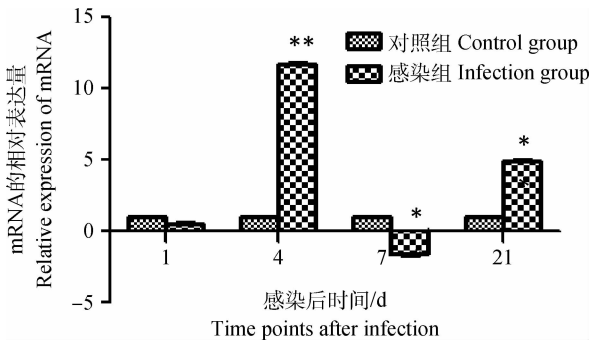


图 1 雏鸡外周血液淋巴细胞 IBDV 载量动态变化

Fig. 1 Dynamics changes of the viral load in chick peripheral blood lymphocytes

MDA5 mRNA 的表达量在感染后第 1 天略低于对照组,但到感染后第 4 天,*chMDA5* mRNA 表达量极显著升高且达到峰值($P < 0.01$),之后显著降低,在感染后第 7 天其表达明显低于对照雏鸡($P < 0.05$),但在感染后第 21 天 *chMDA5* mRNA 表达量又升高($P < 0.05$),如图 2。



** 表示感染组细胞 mRNA 相对表达量与相应时间点对照细胞比较差异极显著($P < 0.01$); * 表示感染组细胞 mRNA 相对表达量与相应时间点对照细胞比较差异显著($P < 0.05$),无标记表示差异不显著($P > 0.05$)。以下各图同
The letter “**” shows the relative expression of mRNA significantly different at 0.01 level compared with control group, the letter “*” shows the relative expression of mRNA significantly different at 0.05 level compared with control group and differ quietly (with unlabeled, $P > 0.05$). The following is same as here

图 2 雏鸡外周血液淋巴细胞 *chMDA5* mRNA 转录表达的动态变化

Fig. 2 Dynamic changes of the *chMDA5* mRNA in chick peripheral blood lymphocytes

雏鸡感染 IBDV 后第 1 天,其外周血液淋巴细胞 *chIPS-1* mRNA 表达量明显低于对照细胞($P < 0.05$),之后表达量呈上升趋势,至感染后第 4 天达到峰值($P < 0.01$),在第 7 天表达量明显下调并且低于对照组($P < 0.05$),但在感染后第 21 天,

chIPS-1 mRNA 表达量又出现小幅上升($P < 0.05$),如图 3。

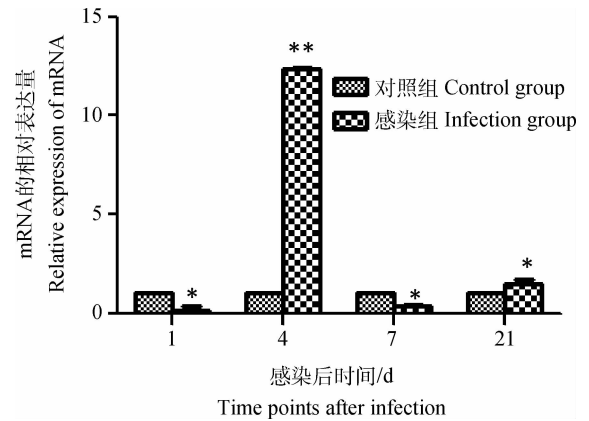


图 3 雏鸡外周血液淋巴细胞 *chIPS-1* mRNA 表达的动态变化

Fig. 3 Dynamic changes of the *chIPS-1* mRNA in chick peripheral blood lymphocytes

雏鸡感染 IBDV 后第 1 天,其外周血液淋巴细胞 *chIRF3* 表达量明显下调($P < 0.01$),但在感染后第 4 天又出现明显的上升趋势并且表达量达到峰值($P < 0.01$),之后下调,但在感染后第 21 天表达量再一次升高,并且与感染后第 4 天 *chIRF3* 表达量持平($P < 0.01$),如图 4。

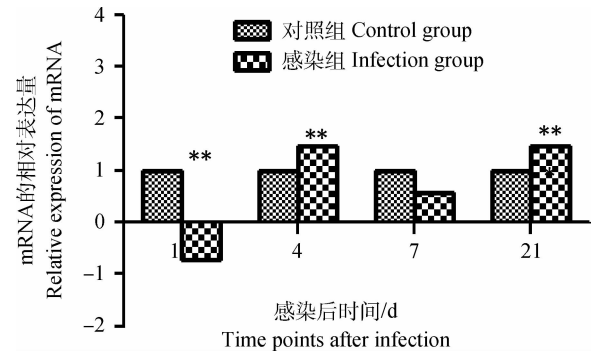


图 4 雏鸡外周血液淋巴细胞 *chIRF3* mRNA 表达的动态变化

Fig. 4 Dynamic changes of the *chIRF3* mRNA in chick peripheral blood lymphocytes

雏鸡感染 IBDV 后第 1 天,其外周血液淋巴细胞 *chIFN-β* mRNA 表达量与对照组相比小幅升高($P < 0.05$),至感染后第 4 天达到峰值($P < 0.01$),在感染后第 7 天又显著下调出现负值($P < 0.05$),在第 21 天其表达量又升高且明显高于对照组($P < 0.01$),如图 5。

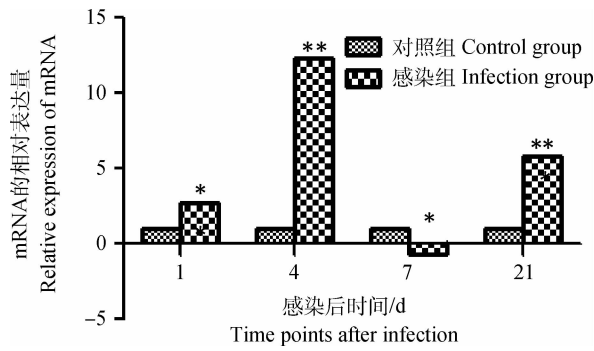


图5 雏鸡外周血液淋巴细胞 *chIFN-β* mRNA 表达的动态变化

Fig. 5 Dynamic changes of the *chIFN-β* mRNA in chick peripheral blood lymphocytes

3 讨论

IBDV 被动物机体固有免疫受体识别后, 激活机体抗病毒免疫, 主要是 I 型干扰素及炎性细胞因子的活化。当 dsRNA 病毒感染机体后, MDA5 识别病毒核酸, 并通过蛋白-蛋白接触的方式与其下游衔接蛋白分子 IPS-1 结合, 进而活化 I κ B 及 I κ B 激酶, 这两类激酶活化转录因子 NF- κ B 及 IFR (IFN regulatory factor) 并形成转录复合体, 结合到 IFN- β 的启动子区域, 促进 IFN- β 基因转录^[10]。

本试验从 mRNA 水平检测雏鸡感染 IBDV 后, 其外周血液淋巴细胞 chMDA5 及其信号转导通路中衔接蛋白分子(chIPS-1)、转录因子(chIRF3)及诱导产物(chIFN- β)转录的动态变化。结果发现, 雏鸡感染 IBDV 后, 其外周血液淋巴细胞 *chMDA5* 和 *chIFN-β* 转录量呈现先小幅下降然后显著上升, 之后两者的表达量在感染后第 7 天又出现迅速下调。同时, 本研究还发现, *chMDA5* mRNA 转录量的变化趋势与 IBDV 载量变化趋势相同, 即 IBDV 病毒粒子拷贝数增加的同时 *chMDA5* 的转录量也相应增加, 待 *chMDA5* 转录量有所下降时, IBDV 的复制也受到抑制, 表明 IBDV 在雏鸡外周血液淋巴细胞内的复制、增殖与 chMDA5 的表达存在着一定的关系。研究发现, MDA5 的过量表达可增强 IFN- β 启动子活性^[11], 而流行性腮腺炎病毒和仙台病毒等副黏病毒的 V 蛋白可通过其高度保守的 C 末端与 MDA5 结合, 抑制 MDA5 介导的 IFN- β 启动子的转录活化, 进而对整个信号通路产生抑制作用^[12]。我们怀疑 IBDV 某部分结构蛋白也有此作用。

chMDA5 信号通路因子 chIPS-1 和 chIRF3 基

因转录量变化趋势与 *chMDA5* 相似, 在感染 IBDV 后第 1 天两者转录量均低于对照组, 其中 *chIRF3* 表达量显著低于对照组, 感染后第 4 天 *chIPS-1* 和 *chIRF3* 转录量均达到峰值, 之后迅速下降, 在第 21 天又出现小幅上调。原因在于 MDA5 通过 CARD-CARD 相互作用募集位于线粒体的配体蛋白 IFN- β 启动子刺激子 (IPS-1) 产生相应干扰素的同时与 Fas 相关的死亡域蛋白 (FADD) 作用^[13], 活化 IRF3, 进而促进各种细胞因子表达。IPS-1 缺陷型小鼠暴露于 RNA 病毒, 不能激活 IRF3^[14]。因此, 我们了解到 IPS-1 是 MDA5 信号途径中心配体蛋白, IPS-1 与 MDA5 下游多个信号分子相互作用对 IRF3 的激活和起始抗病毒反应起着核心作用。

近年来, 对 MDA5 等非依赖型固有免疫受体的关注度日益提高, 本试验通过实时荧光定量 PCR 的方法检测 IBDV 感染雏鸡 MDA5 信号通路因子的动态变化, 发现 chMDA5 及其信号通路因子在雏鸡感染 IBDV 后的不同天数其基因转录量变化惊人的相似, 这与 MDA5 信号通路相符。然而, IBDV 感染鸡体第 1 天, MDA5 信号通路中 IRF3 表达量的下降趋势比 IPS-1 更低, 究其原因需要更深入的研究。了解 IBDV 感染对 MDA5 及其下游细胞因子的影响可为鸡传染性法氏囊病的预防和治疗奠定基础。

4 结论

IBDV 能够激活雏鸡体内 chMDA5 信号通路, 并且 IBDV 复制与 chMDA5 信号通路因子的表达密切相关。

参考文献 (References):

- [1] AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity[J]. *Cell*, 2006, 124 (4): 783-801.
- [2] KATO H, TAKEUCHI O, SATO S, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses[J]. *Nature*, 2006, 441 (7089): 101-105.
- [3] BARBER M R W, ALDRIDGE J R, WEBSTER R G, et al. Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(13): 5913-5918.
- [4] KARPALA A J, STEWART C, MCKAY J, et al. Characterization of chicken MDA5 activity; regulation

- of IFN- β in the absence of RIG-I functionality[J]. *J Immunol*, 2011, 86(9):5397-5405.
- [5] LINIGER M, SUMMERFIELD A, ZIMMER G, et al. Chicken cells sense influenza A virus infection through MDA5 and CARDIF signaling involving LGP2[J]. *J Virol*, 2012, 86(2):705-717.
- [6] CALNEK B W. 禽病学[M]. 高福, 刘文军, 译. 北京:北京农业大学出版社, 1991:554-556.
CALNEK B W. Poultry science[M]. GAO F, LIU W J, translation. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1991:554-556. (in Chinese)
- [7] KATO H, TAKEUCHI O, MIKAMO-SATOH E, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5 [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(7):1601-1610.
- [8] PETKOV D, LINNEMANN E, KAPCZYNSKI D R, et al. Full-length sequence analysis of four IBDV strains with different pathogenicities [J]. *Virus Genes*, 2007, 34(3):315-326.
- [9] LEE C C, WU C C, LIN T L. Chicken melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) recognizes infectious bursal disease virus infection and triggers MDA5-related innate immunity[J]. *Arch Virol*, 2014, 159(7):1671-1686.
- [10] HEMMI H, TAKEUCHI O, SATO S, et al. The roles of two I κ B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection[J]. *J Exp Med*, 2004, 199(12):1641-1650.
- [11] ANDREJEVA J, CHILDS K S, YOUNG D F, et al. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN- β promoter[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(49):17264-17269.
- [12] RAMACHANDRAN A, HORVATH C M. Dissociation of paramyxovirus interferon evasion activities: universal and virus-specific requirements for conserved V protein amino acids in MDA5 interference [J]. *J Virol*, 2010, 84(21):11152-11163.
- [13] 谢广成, 段招军. 抗病毒感染固有免疫应答的信号转导[J]. *病毒学报*, 2012, 28(3):303-310.
XIE G C, DUAN Z J. Signal transduction of innate immunity to virus infection[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2012, 28(3):303-310. (in Chinese)
- [14] SUN Q, SUN L, LIU H H, et al. The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses[J]. *Immunity*, 2006, 24(5):633-642.
(编辑 白永平)