

DOI:CNKI:61-1390/S.20111025.1731.012

网络出版时间:2011-10-25 17:31

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20111025.1731.012.html>

牛疱疹病毒 I 型诱导 MDBK 细胞凋亡的初步研究

张 宽,许信刚,童德文,丁 丽,李兆才,李 伟

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**研究牛疱疹病毒 I 型(BHV- I)对牛肾细胞(MDBK 细胞)的作用,为探讨 BHV- I 诱导细胞凋亡的分子机制奠定基础。**【方法】**常规方法培养 MDBK 细胞,于对数生长期感染 BHV- I,同时设立对照组,于感染后不同时间取样,采用细胞形态观察、细胞活性检测、细胞核形态观察、DNA ladder 检测、细胞凋亡率检测和细胞内 Caspase-3 活性检测等方法,对 BHV- I 感染的 MDBK 细胞进行凋亡指标检测。**【结果】**接毒后 24 h,MDBK 细胞即出现明显的细胞病变。活性检测表明,感染 BHV- I 的细胞活性降低,并且呈病毒感染量和感染时间的依赖性。感染细胞出现核固缩,并呈新月形变化。DNA 电泳结果和流式细胞术检测结果均表明,感染 BHV- I 的细胞 DNA 出现规律的片段化,细胞凋亡比例随感染时间延长而增加,细胞内 Caspase-3 活性逐渐升高。**【结论】**BHV- I 能够诱导 MDBK 细胞凋亡,并且在诱导细胞凋亡过程中有 Caspase-3 参与。

[关键词] 牛疱疹病毒 I 型;MDBK 细胞;细胞凋亡

[中图分类号] S858.215.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)12-0021-05

Preliminary study of apoptosis of MDBK cells induced by BHV- I

ZHANG Kuan,XU Xin-gang,TONG De-wen,DING Li,LI Zhao-cai,LI Wei

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The aim of this study was to investigate whether BHV- I could cause MDBK cells apoptosis, which would lay theoretical foundation for the further observation of BHV- I induced apoptosis. **【Method】** MDBK cells were cultured and infected with BHV- I. Subsequently, cells were collected at various time post infection, including cells of control group. Then AO-EB staining, flow cytometry and DNA ladder tests were used to detect the apoptotic MDBK cells. Besides, spectrophotometry was used to examine the activity of caspase-3. **【Result】** 24 h post infection, cytopathic effect appeared and vitality of cells began to decrease. Apoptosis appeared in MDBK cells infected with BHV- I which was judged by DNA laddering, Flow cytometry and chromatin condensation. With the increase of apoptotic cells, the level of caspase-3 rose. **【Conclusion】** BHV- I can induce MDBK cells to undergo apoptosis which involves caspases-3 activation.

Key words: bovine herpes virus- I; MDBK cell; apoptosis

细胞凋亡是生物体内的细胞在特定的内源和外源信号诱导下,其死亡途径被激活,并在有关基因的

调控下发生的程序性死亡过程^[1],且这一过程受基因严格调控^[2]。动物机体通过启动细胞凋亡机制来

* [收稿日期] 2011-07-26

[基金项目] 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-07-0701);西北农林科技大学青年学术骨干项目(E111020901)

[作者简介] 张 宽(1987—),女,内蒙古巴彦淖尔人,在读硕士,主要从事分子病原学研究。E-mail: zhangkuan.100@163.com

[通信作者] 许信刚(1974—),男,陕西武功人,副教授,博士,主要从事分子病原学与免疫学研究。

E-mail: xuxingangzhangqi@yahoo.com.cn

童德文(1967—),男,安徽太湖人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物病理学研究。

E-mail: dwtong@nwsuaf.edu.cn

清除体内受损、衰老、突变和感染病原体的非正常细胞,以保证机体维持动态平衡^[3]。目前,许多外在因素和不良刺激诱发的细胞凋亡逐渐引起人们的关注,如物理刺激、化学药物作用以及病原微生物感染等诱导的细胞凋亡^[4-5],对细胞凋亡的相关研究将有助于揭示某些疾病的病理机制。

牛疱疹病毒 I 型(Bovine Herpesvirus-1, BHV-1)属于疱疹病毒科、 α -疱疹病毒亚科、水痘病毒属^[6]。该病毒感染牛引起的牛传染性鼻气管炎是一种急性热性接触性传染病。BHV-1 感染可引起多种临床症状,除呼吸道症状和生殖道症状外,还会引起被感染牛免疫力下降,易发继发感染,这给该病的治疗和控制带来了极大困难^[7],所以研究 BHV-1 的致病机理有非常重要的实际意义。本试验以牛肾细胞(MDBK 细胞)为模式细胞,采用 MTT 法、细胞核染色以及 DNA 电泳等技术,对 BHV-1 诱导的 MDBK 细胞凋亡进行研究,以期探讨 BHV-1 诱发 MDBK 细胞凋亡的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株和细胞系 本试验所用牛疱疹病毒 I 型(BHV-1)由西北农林科技大学动物医学院兽医微生物实验室保存^[2],MDBK 细胞由西北农林科技大学动物医学院动物病理学实验室保存。

1.1.2 试剂 DMEM 培养基,购自 Gibco 公司;新生牛血清,购自 Hyclone 公司;碘化丙锭(Propidium iodide, PI)和四甲基偶氮唑蓝(MTT)染料,购自 Sigma 公司;DMSO、吖啶橙(Acridine orange, AO)和溴乙锭(Ethidium bromide, EB),购自 Amresco 公司;BCA 试剂盒,购自威格拉斯公司;Caspase-3 分光光度法活性检测试剂盒,购自南京凯基生物发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 BHV-1 的增殖 用含有体积分数 10% 小牛血清的 DMEM 培养液对 MDBK 细胞进行传代,在 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 MDBK 细胞。待细胞长成单层,按照 0.2 MOI(感染复数)接种病毒,37℃ 吸附 1 h,加入体积分数 2% 小牛血清的 DMEM 培养基,在 37℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养。待细胞病变达到 80% 时,反复冻融细胞 3 次,使之完全破碎释放病毒,收取病毒液, -80℃ 保存。

1.2.2 BHV-1 感染对 MDBK 细胞活性的影响

取 MDBK 细胞接种于 96 孔培养板中,将 BHV-1 进行 5ⁿ 倍比稀释后,按 50.00, 10.00, 2.00, 0.40, 0.08, 0.016 和 0.003 MOI 接种处于对数生长期的 MDBK 细胞,每个 MOI 设置 3 个重复。同时设正常对照组,以无血清培养基替代病毒液处理正常对照组。分别在接毒后 0, 12, 24, 36, 48 h 加入 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μ L, 37℃ 继续孵育 4 h, 吸弃孔内培养液。每孔加入 150 μ L DMSO, 振荡溶解甲臞结晶,置于酶标仪上,用空白孔调零,在 570 nm 波长测定各孔光吸收度,记录结果并进行统计分析。用 MDBK 细胞存活率表示感染 BHV-1 的 MDBK 细胞的活性,其计算公式为:

MDBK 细胞存活率(%) = (感染 BHV-1 细胞的 OD/正常对照细胞的 OD) $\times$ 100%。

1.2.3 BHV-1 感染对 MDBK 细胞形态的影响

将 MDBK 细胞接种于 12 孔细胞培养板,按照 0.2 MOI 感染 BHV-1 病毒,分别于接毒后 12, 24, 36, 48 和 60 h, 采用倒置显微镜观察细胞整体的形态学变化。

1.2.4 BHV-1 感染对 MDBK 细胞核形态的影响

将 MDBK 细胞接种于 96 孔细胞培养板,按照 0.2 MOI 感染 BHV-1 病毒,分别于接毒后 12, 24, 36, 48 和 60 h 终止培养,小心弃去培养基,加入 5 μ L AO-EB(100 μ g/mL)染液进行细胞核染色,同时设置正常对照,置于倒置荧光显微镜下,使用紫外激发光,观察细胞核的形态学变化。

1.2.5 BHV-1 感染对 MDBK 细胞基因组 DNA 的影响

将 MDBK 细胞接种于 6 孔细胞培养板,按照 0.2 MOI 感染 BHV-1 病毒,分别于接毒后 12, 24, 36, 48 和 60 h 收集细胞,同时设置正常对照,将收集的细胞用 PBS 清洗 2 次,加入细胞裂解液和 RNase A(终质量浓度为 0.1 mg/mL), 37℃ 水浴 1 h; 加入蛋白酶 K(终质量浓度为 0.5 mg/mL), 55℃ 水浴 3 h; 用等体积酚/氯仿/异戊醇抽提 DNA 2 次, 加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠和 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 过夜沉淀 DNA, 12 000 r/min 离心 30 min, 弃上清。用 20 μ L TE 缓冲液溶解 DNA, 于 20 g/L 的琼脂糖凝胶上,在 40 V/cm 电压下电泳,于凝胶成像系统中观察并拍照。

1.2.6 BHV-1 感染对 MDBK 细胞凋亡率的影响

将 MDBK 细胞接种于 6 孔细胞培养板,按照 0.2 MOI 感染 BHV-1 病毒,分别于接毒后 12, 24, 36, 48 和 60 h 收集细胞,同时设置同期正常对照,将收集的细胞用 PBS 清洗 2 次,用体积分数 75% 乙醇重悬细

胞,4℃固定48 h以上。PBS清洗2次后,用含RNA酶的碘化丙啶(50 μg/mL)染液轻轻重悬细胞,4℃避光染色30 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.7 BHV-Ⅰ感染对MDBK细胞内Caspase活化度的影响 将MDBK细胞接种于6孔细胞培养板,按照0.2 MOI感染BHV-Ⅰ病毒,分别于接毒后12,24,36,48和60 h收集细胞,同时设置正常对照,将收集的细胞用PBS清洗2次。采用BCA法测定MDBK细胞中的可溶性蛋白总浓度,Caspase活化度的测定按照试剂盒说明书进行。

2 结果与分析

2.1 BHV-Ⅰ感染对MDBK细胞活性的影响

细胞活性检测结果见表1。由表1可以看出,未感染病毒组MDBK细胞的存活率在每个培养时

段均接近100%,接毒组MDBK细胞的存活率随病毒感染量的增大而降低,同时呈时间依赖性。在感染量为50.00 MOI,感染12 h时的细胞存活率明显低于0 h组,且差异达极显著水平。感染量为0.016 MOI,感染48 h时的细胞存活率低于0 h组,且差异显著,低于此剂量未检测到细胞存活率的明显变化。

2.2 BHV-Ⅰ感染对MDBK细胞形态的影响

倒置显微镜下观察发现,贴壁伸展生长的正常对照组MDBK细胞在感染BHV-Ⅰ12 h后,MDBK细胞出现轻微病变,少数细胞边缘收缩;感染24 h时出现病变斑,病变细胞变圆收缩、聚集成簇;随感染时间延长,病变斑逐渐扩大,圆缩的细胞不断增多,并呈串状脱壁漂起;至感染60 h时,大部分细胞病变脱壁(图1)。

表 1 BHV-Ⅰ不同感染量对MDBK细胞存活率的影响
Table 1 The vitality of MDBK cells infected with BHV-Ⅰ

BHV-Ⅰ感染量/ MOI Concentration	MDBK细胞存活率/% Cell viability				
	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h
50.00	103.2±0.013	86.0±0.004**	63.8±0.012**	32.3±0.012**	25.3±0.012**
10.00	102.7±0.011	98.6±0.017	66.4±0.019**	53.9±0.055*	33.1±0.017**
2.00	101.9±0.014	98.5±0.016	74.2±0.019*	60.5±0.039**	46.9±0.036**
0.40	99.7±0.002	103.7±0.021	83.5±0.053	72.3±0.045**	54.7±0.031**
0.08	98.0±0.005	102.7±0.029	97.2±0.043	85.0±0.035*	61.8±0.024**
0.016	99.5±0.007	97.2±0.015	94.5±0.031	92.3±0.060	81.0±0.032*
0.003	102.1±0.018	99.8±0.015	97.3±0.056	97.7±0.013	98.2±0.026

注:数据后标“*”表示与感染0 h相比差异显著($P<0.05$);“**”表示与感染0 h相比差异极显著($P<0.01$)。
Note:Compared with 0 h(hours post infection),“*”indicates significant difference($P<0.05$);“**”indicates extremely significant difference($P<0.01$).

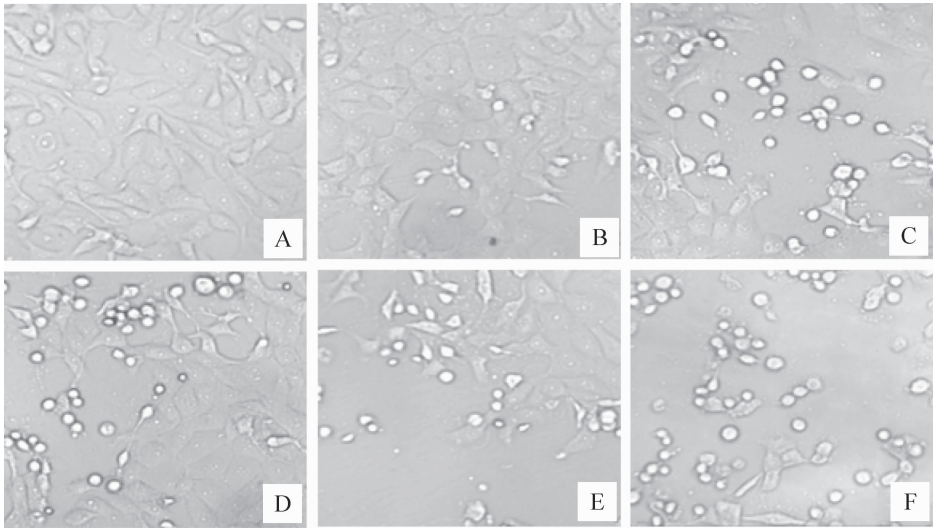


图 1 BHV-Ⅰ感染后不同时间MDBK细胞的形态学变化(200×)

A. 正常对照组细胞;B~F.感染12,24,36,48和60 h的细胞

Fig. 1 Morphological change of BHV-Ⅰ-infected MDBK cells at different hours post infection (200×)
A. Control;B~F. Infected 12,24,36,48,60 h

2.3 BHV- I 感染对 MDBK 细胞核形态的影响

由图 2 可以看出,经 AO-EB 染色后,正常 MD-BK 细胞的细胞核呈绿色圆形,均质饱满,未见红染。接毒组 MDBK 细胞在接毒 48 h 之前细胞核均为绿色,未见红染;接毒后 12 至 24 h,个别细胞出现染色质浓缩,呈新月形聚集于一侧;接毒后 36 h,部

分细胞染色质高度浓缩,呈绿色深染点状;接毒后 48 h,染色质高度浓缩的细胞增多,部分细胞出现核碎裂分叶;接毒后 60 h,多数细胞染色质高度浓缩,呈点状或分叶状,部分细胞核 EB 着色,细胞核呈红色,染色质高度浓缩。

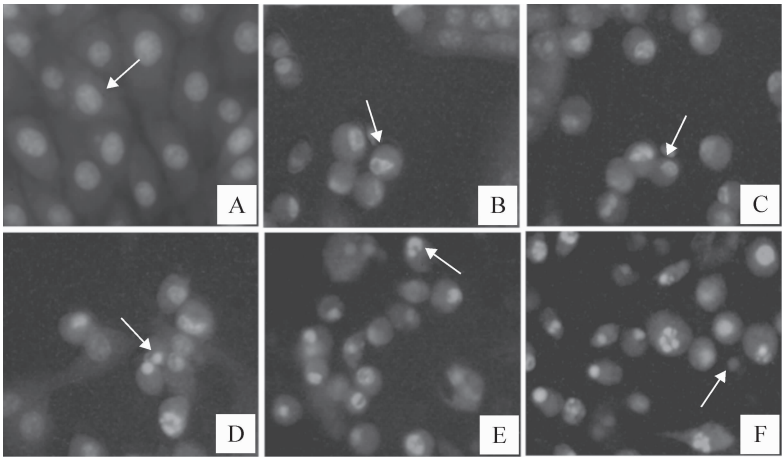


图 2 BHV- I 感染后不同时间 MDBK 细胞核的形态学变化 (400×)

A. 正常对照组细胞; B~F. 感染 12,24,36,48 和 60 h 后的细胞

Fig. 2 Morphological change of BHV- I -infected MDBK cells at different hours post infection(400×)

A. Control; B—F. Infection 12,24,36,48,60 h

2.4 BHV- I 感染对 MDBK 细胞基因组 DNA 的影响

DNA 电泳结果(图 3)显示,在接毒 24 h 以后, MDBK 细胞 DNA 出现梯状电泳条带,正常细胞 DNA 电泳未见 DNA 降解。说明接毒 24 h 以后,细胞基因组发生了有规律的降解。

2.5 细胞凋亡率的流式细胞术测定

细胞凋亡率的检测结果见表 2。由表 2 可知,正常组细胞凋亡率较低;接毒组细胞凋亡率均高于同期正常对照细胞,且凋亡率随感染时间的增加而增大。在 48 h 时,约有 48.8% 的细胞发生凋亡。

2.6 细胞 Caspase-3 活性的检测

从图 4 可以看出, MDBK 细胞在接毒后 0~12 h,细胞 Caspase-3 未见活化,24 h 起 Caspase-3 活性开始升高,至 60 h 时达到最高。说明 BHV- I 感染 MDBK 细胞可以引起细胞内活化的 Caspase-3 含量

显著增加,Caspase-3 参与了 BHV- I 诱导的 MDBK 细胞的凋亡过程。

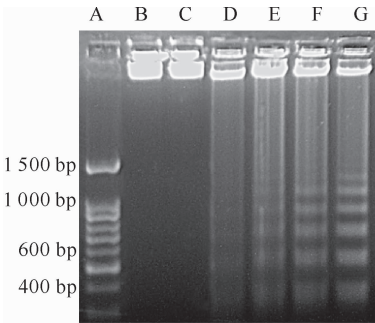


图 3 BHV- I 感染后不同时间 MDBK 细胞 DNA 的电泳分析

A. Marker; B. 正常对照组; C~G. 感染 12,24,36, 48 和 60 h 后细胞的 DNA

Fig. 3 Electrophoresis analysis of BHV- I -infected MDBK cells DNA ladder at different hours post infection

A. Marker; B. Control; C—G. Infection 12,24,36,48,60 h

表 2 BHV- I 感染后不同时间 MDBK 细胞的凋亡率

Table 2 Percentage of apoptotic cells induced by BHV- I infection

处理 Treatment	MDBK 细胞凋亡率/% Percentage of apoptotic cells				
	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
BHV- I 感染组 BHV- I infection	1.9	2.9	10.1	48.8	48.4
正常对照组 Control	0.0	1.0	0.9	1.7	2.3

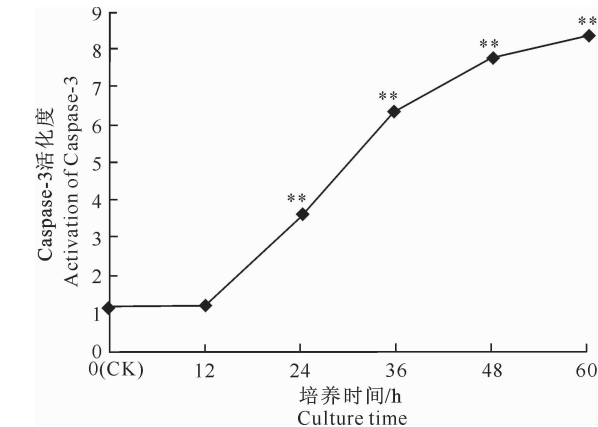


图 4 BHV- I 接种后不同时间 MDBK 细胞的 Caspase-3 活性

与正常对照组相比, ** 表示差异极显著($P<0.01$)

Fig. 4 Activation of Cspase-3 in BHV- I -infected

MDBK cells at different hours post infection

Comparing with negative control group,

** indicates extremely difference ($P<0.01$)

3 讨 论

BHV- I 感染家牛和野生牛可以引起传染性鼻气管炎,且常伴有继发感染,而继发感染是该病的主要危害之一,给养牛业造成了巨大损失。研究证明,BHV- I 感染引起继发感染的主要原因之一是该病毒侵害宿主免疫系统,减少免疫细胞的数量,从而降低宿主免疫力,引发其他病原微生物继发感染,造成更严重且复杂的临床症状^[8]。本试验表明,BHV- I 有致细胞病变作用,通过 MTT 法检测细胞活性,结果表明,BHV- I 感染可以降低细胞的活性,并且呈浓度和时间依赖性,即随着病毒感染量的增加或感染时间的延长,细胞存活率均会逐渐下降。由此推测,BHV- I 可能通过感染并致死宿主的免疫细胞而降低宿主的免疫力。

在细胞凋亡晚期,DNA 会在核小体之间断裂成不连续的以 180~200 bp 为最小单位的规则片段,从而在琼脂糖凝胶电泳中呈现梯状条带^[9]。MDBK 细胞 DNA 电泳结果和流式细胞术检测结果均证明,BHV-I 感染后 MDBK 细胞 DNA 出现规律的片段化,细胞凋亡比例随感染时间的延长而增加。细胞皱缩变圆、染色质浓缩、核固缩呈新月形等变化也是细胞凋亡的典型特征。染色观察表明,感染 BHV-I 后 48 h 之前,AO-EB 染色细胞核呈绿色,说明 BHV-I 感染早期细胞膜完好;在感染 60 h 左右,部分细胞膜通透性增加,EB 着色红染,说明随着凋亡的发展,细胞膜通透性逐渐变化,但没有坏死现象出现。通过以上试验

结果可以初步确定:BHV-I 通过诱导被感染细胞凋亡而导致细胞出现病变效应。

细胞凋亡过程涉及一系列复杂的蛋白激酶激活的级联反应^[10],最终将凋亡信号传入细胞核,调节相关基因的表达,诱导细胞凋亡^[11]。Caspase 家族蛋白在凋亡信号转导中发挥着至关重要的作用,哺乳动物细胞凋亡的途径主要有死亡受体介导的外源途径^[10]、线粒体途径^[12]和内质网途径 3 种^[13],Caspase-3 是这 3 种途径下游共同的信号转导分子,活化的 Cspase-3 可以进一步作用于相应底物,最终诱导细胞凋亡,所以被称为“凋亡执行者”。本试验结果显示,Caspase-3 参与 BHV- I 诱导的 MDBK 细胞的凋亡过程,这为进一步探讨 BHV- I 诱导细胞凋亡的分子机制奠定了基础。

[参考文献]

[1] Fink S L, Cooks B T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells [J]. Infection and Immunity, 2005, 73(4): 1907-1916.

[2] Nika N D, Stanley J K. Cell death: Critical control points [J]. Cell, 2004, 116(2): 205-219.

[3] 余 敏,邱卓琳,李 红,等. 小鼠早期胚胎质量与细胞凋亡的相关性 [J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(3): 409-413.

Yu M, Qiu Z L, Li H, et al. Association between cell apoptosis and the quality of early mouse embryo [J]. J South Med Univ, 2011, 31(3): 409-413. (in Chinese)

[4] 李玉谷,叶远兰,崔聪颖,等. 1 株 H5N1 亚型高致病力禽流感病毒人工感染鸭的细胞凋亡观察 [J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(7): 1069-1073.

Li Y G, Ye Y L, Cui C Y, et al. Induction of apoptosis by a highly pathogenic influenza virus, A/duck/Guangding/220/2003 (H5N1) in experimentally infected ducks [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2009, 40(7): 1069-1073. (in Chinese)

[5] Inman M, Zhang Y, Geiser V, et al. The zinc ring finger in the bICP0 protein encoded by bovine herpesvirus-1 mediates toxicity and activates productive infection [J]. J Gen Virol, 2001, 82(3): 483-492.

[6] 李河林,王晶钰,刘红彦,等. 牛传染性鼻气管炎病毒 XA 株的分离与鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 38(6): 19-22.

Li H L, Wang J Y, Liu H Y, et al. Isolation and identification of infectious Bovine Rhinotracheitis Virus [J]. Journal of Northwest A&F University: National Science Edition, 2006, 38(6): 19-22. (in Chinese)

[7] Zang S C, Wood C, Xue W Z, et al. Immune suppression in calves with bovine immunodeficiency virus [J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 1997, 4(2): 232-235.