

## 斑点叉尾鲷呼肠孤病毒诱导斑点叉尾鲷 肾脏组织细胞凋亡的研究

王 瑶<sup>1</sup>, 曾令兵<sup>2\*</sup>, 徐 进<sup>2</sup>, 周 勇<sup>2</sup>, 肖 艺<sup>2</sup>

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223)

**摘要:** 为研究斑点叉尾鲷呼肠孤病毒(CCRV)诱导斑点叉尾鲷肾脏细胞(CCK)发生凋亡的机理,以 CCRV 感染的 CCK 细胞为实验材料,采用 Hoechst 33258 染色、DNA 片段化检测、TUNEL 反应、亚 G1 期细胞检测以及线粒体膜电位变化检测等方法进行实验。感染试验结果显示,病毒感染斑点叉尾鲷肾脏组织细胞后,细胞变圆、皱缩,随后细胞脱落,细胞单层呈网状,感染 72 h 后出现典型细胞病变效应(CPE);病毒感染 48 h 后 Hoechst 33258 染色结果显示,细胞的染色质固缩、核边缘化或破裂,可观察到凋亡小体,细胞凋亡率随时间增加;DNA 片段化检测结果显示,病毒感染细胞 12 h 后细胞基因组 DNA 出现片段化,随后逐渐增强,72 h 达到最高;TUNEL 反应结果表明,病毒感染细胞 72 h 后细胞基因组 DNA 断裂,有大量游离 3'末端自由羟基(-OH)存在。亚 G1 期细胞检测结果显示,病毒感染 48 h 后,约 53.44% 细胞处于亚 G1 期;利用 JC-1 检测试剂盒检测病毒感染细胞的线粒体膜电位变化,病毒感染细胞 24 h 后线粒体膜通透性发生改变,膜电位变化显著。紫外线灭活与热灭活的斑点叉尾鲷呼肠孤病毒不能诱导斑点叉尾鲷肾脏细胞发生凋亡,表明细胞凋亡依赖于病毒复制。

**关键词:** 斑点叉尾鲷;呼肠孤病毒;肾脏组织细胞系;细胞凋亡

**中图分类号:** S 917.1

**文献标志码:** A

细胞凋亡是指在一定生理病理或病原生物感染的条件下,机体或细胞为维护内环境稳定,通过基因调控,使细胞高度有序地自动死亡过程。细胞发生凋亡时,具有自身的形态学与生物化学特征,可借助细胞生物学与荧光染色技术、分子生物学技术以及流式细胞仪等进行检测<sup>[1-2]</sup>。

诱导宿主细胞凋亡是病毒与宿主细胞间相互作用的一种常见方式。Pham 等<sup>[3]</sup>研究发现石斑鱼(*Epinephelus* sp.)虹彩病毒可诱导 3 种非宿主细胞发生凋亡。Huang 等<sup>[4]</sup>研究发现蛙虹彩病毒可通过线粒体途径诱导黑头软口鲷(*Pimephales promelas*)FHM 细胞凋亡。水生双 RNA 病毒的 VP3 蛋白可以通过线粒体途径诱导鱼类以及鼠细胞凋亡<sup>[5]</sup>。传染性胰腺坏死病毒 IPNV 可通过活

化的 caspase-8/3 诱导斑马鱼(*Danio rerio*)细胞凋亡<sup>[6]</sup>,并且通过 VP5 蛋白调节 MCL-1 的表达<sup>[7]</sup>。大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)弹状病毒 SMRV 可以诱导鲤(*Cyprinus carpio*)白细胞发生凋亡<sup>[8]</sup>。大鳞大马哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)呼肠孤病毒可感染鲑(*Salmo salar*)上皮细胞、纤维组织母细胞以及巨噬细胞产生细胞病变效应,并且诱导细胞凋亡<sup>[9]</sup>。草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)呼肠孤病毒可诱导草鱼肾脏组织细胞发生凋亡<sup>[10]</sup>。

斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)是我国重要的淡水引进品种,在我国大部分地区已经形成养殖产业。斑点叉尾鲷出血病是斑点叉尾鲷鱼种阶段的重要病毒性疾病,死亡率高达 60% 以上,其病原为斑点叉尾鲷呼肠孤病毒(CCRV)<sup>[11]</sup>。斑

收稿日期:2012-08-14 修回日期:2012-10-04

资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200803013)

通信作者:曾令兵,E-mail:zenglingbing@gmail.com

点叉尾鲷呼肠孤病毒(CCRV)是水生呼肠孤病毒属成员,是一种双链RNA病毒,病毒基因组由11个分节段RNA组成。CCRV可在斑点叉尾鲷肾脏组织细胞系(CCK)上增殖<sup>[11]</sup>,但目前尚未有CCRV诱导CCK细胞凋亡的研究报道。本实验采用多种细胞凋亡检测方法,研究了CCRV诱导CCK细胞凋亡的过程,为阐明CCRV感染机理提供了重要实验数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

M199培养基、DPBS、Hoechst33258、PI、JC-1、胰酶购自Sigma公司(Sigma,美国);DAPI购自Beckon公司(Beckon,美国);胎牛血清FBS购自于杭州四季青公司;细胞基因组DNA提取试剂盒TB302、DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System试剂盒TB235购自于Promega公司(Promega,美国);T-25cm<sup>2</sup>细胞培养瓶、24孔培养板购自Corning公司(Corning,美国)。

### 1.2 细胞系与病毒感染

斑点叉尾鲷肾脏细胞系CCK(channel catfish kidney)为本实验室建立和保藏<sup>[12]</sup>;斑点叉尾鲷呼肠孤病毒CCRV(channel catfish reovirus)由本实验室分离鉴定<sup>[11]</sup>。于T-25cm<sup>2</sup>细胞培养瓶中培养CCK细胞,温度28℃,培养液为M199。细胞长成汇合单层后,用0.25%胰酶消化,按1:2~1:3分瓶传代培养。传代培养的汇合单层细胞用于病毒感染试验,感染复数(multiplicity of infection, MOI)为1.0,28℃吸附1h,吸弃病毒残液,添加5mL含2%FBS的M199培养基,28℃培养,倒置显微镜下逐日观察细胞病变效应(CPE)。

### 1.3 Hoechst 33258 荧光染色

将CCK细胞接种于24孔细胞培养板,细胞浓度 $1 \times 10^6$ 个/mL,每孔接种1mL,培养24h后进行CCRV感染实验,并设置未感染对照组。感染不同天数后吸弃培养液,DPBS洗涤细胞,甲醇:冰乙酸(3:1)固定30min后染色。加入1mL浓度为5μg/mL的Hoechst 33258染色液,4℃避光染色15min,荧光倒置显微镜(Leica,德国)观察,照像记录结果。于荧光染色图片中选取4个视野,每个视野计数100个细胞,计算出不同时间下实验组以及对照组中的荧光细胞百分数

(细胞凋亡率)。

### 1.4 DNA Ladder 试验

于T-25cm<sup>2</sup>培养瓶中传代培养CCK,细胞浓度 $1 \times 10^6$ 个/mL,接种量为5mL,培养24h后接种CCRV细胞毒,设置未感染对照组。采用胰酶消化法分别在感染后0,12,24,48,72h收集培养瓶内全部细胞,离心收集细胞沉淀。参照Promega细胞基因组DNA试剂盒说明书提取细胞基因组DNA。2%琼脂糖凝胶电泳,电压65V,电泳时间2h,凝胶成像系统(Bio-Rad,美国)照像记录结果。

### 1.5 TUNEL 检测

将CCK细胞接种于24孔细胞培养板,细胞浓度 $1 \times 10^6$ 个/mL,每孔接种1mL,培养24h后进行CCRV感染实验,并设置未感染对照组。72h后按DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System试剂盒操作说明书进行染色试验:于4℃条件下以4%多聚甲醛固定细胞1h,再用DPBS洗涤细胞3次,每次洗涤5min;然后加入渗透液(含0.2% TritonX-100的DPBS缓冲液)渗透5min,DPBS洗涤3次;再加入100μL平衡液,室温下孵育5~10min,DPBS洗涤2次;再加入孵育液混合物(平衡液45μL、核苷酸混合物5μL、rTdT酶1μL),加盖覆盖膜,37℃下湿盒中避光温育1h后,浸入 $2 \times$ SSC的缓冲液反应15min,DPBS洗涤3次,每次5min,去除未结合的荧光素-12-dUTP,最后用Propidium Iodide(PI)避光染色10min,DPBS洗涤3次;荧光显微镜观察(Leica,德国)。

### 1.6 亚G<sub>1</sub>期(sub-G<sub>1</sub>)细胞检测

于T-25cm<sup>2</sup>培养瓶中传代培养CCK,细胞浓度 $1 \times 10^6$ 个/mL,接种量为5mL,培养24h后接种CCRV,48h后胰酶消化收集培养瓶内所有细胞,离心沉淀细胞DPBS洗涤2次。使用DPBS调整细胞浓度至 $1 \times 10^6$ /mL,加入终浓度为0.5μg/mL DAPI染液,室温下避光染色15min,1000r/min离心5min,弃上清,DPBS重悬细胞沉淀,1000r/min离心5min,弃上清,用400μL DPBS重悬细胞沉淀,流式细胞仪(Beckman-coulter,美国)检测。

### 1.7 JC-1 检测线粒体膜电位变化

于T-25cm<sup>2</sup>培养瓶中传代培养CCK,细胞浓度 $1 \times 10^6$ 个/mL,接种量为5mL,培养24h后,参照方法1.2接种CCRV,24h后胰酶消化收集

细胞,1 000 r/min 离心 5 min,DPBS 悬浮细胞沉淀,加入 JC-1,终浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。室温下避光染色 10 min,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 400  $\mu\text{L}$  DPBS 重悬浮细胞沉淀,流式细胞仪(Beckman-coulter,美国)检测。

### 1.8 灭活 CCRV 诱导 CCK 凋亡试验

CCRV 病毒分别经紫外线照射处理,45、55、65  $^{\circ}\text{C}$  热处理 30 min 灭活,然后感染 CCK 细胞,设置未灭活病毒感染对照,72 h 后收集细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,收集细胞沉淀。参照 Promega 细胞基因组 DNA 提取试剂盒说明书提

取细胞基因组 DNA,2% 琼脂糖凝胶电泳,电压 65 V,时间 2 h,凝胶成像系统照相记录结果。

## 2 结果

### 2.1 CCK 细胞病变效应

CCRV 病毒感染 CCK 细胞 24 h 后,细胞变圆,细胞间隙增大,细胞单层收缩(图 1-a);48 h 后细胞病变明显,部分细胞脱落;72 h 后,细胞病变明显加剧,细胞脱落,单层呈网状,出现典型细胞病变效应(CPE)(图 1-b)。正常对照组细胞则生长良好,单层致密(图 1-c)。

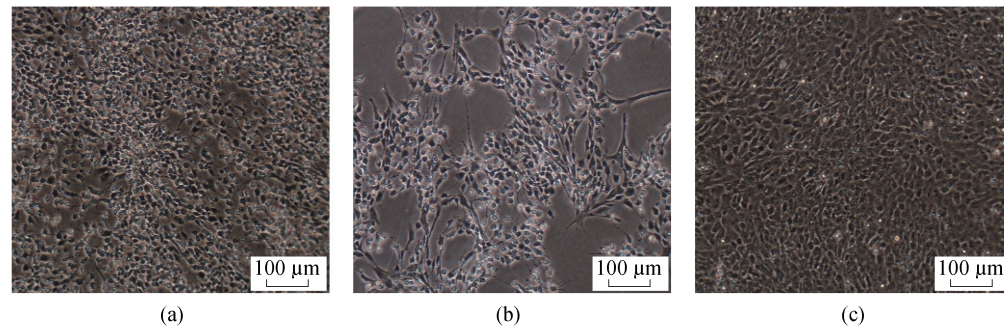


图 1 CCRV 感染 CCK 后细胞病变效应

(a) CCRV 接种 24 h 后的病变细胞; (b) CCRV 接种 72 h 后的病变细胞; (c) 正常 CCK 细胞。

Fig. 1 The cytopathic effect of CCRV infected CCK

(a) 24 h post-infected CCK cells; (b) 72 h post-infected CCK cells; (c) normal CCK cells.

### 2.2 Hoechst 33258 荧光染色

Hoechst33258 荧光染色观察结果显示,CCRV 感染 CCK 48 h 后,细胞核染色质皱缩,细胞核边缘化或破裂,可观察到细胞凋亡小体(箭

头所示),发生凋亡的细胞散状分布(图 2-a)。而对照组细胞中个别细胞核深染,多数细胞核浅染,核大小、形态均未发生变化(图 2-b)。

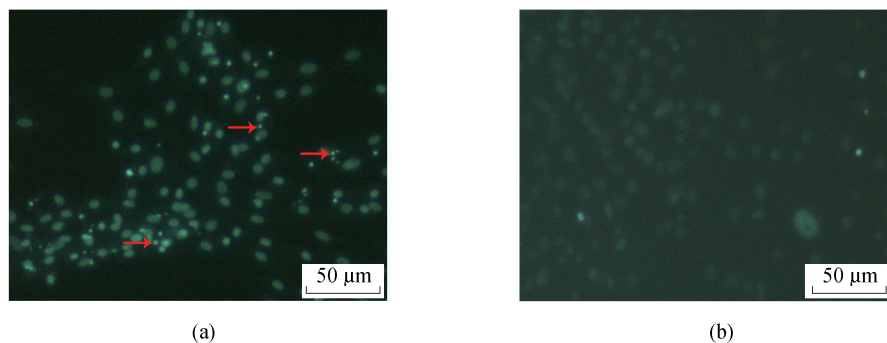


图 2 CCRV 感染 CCK 细胞 48 h 后 Hoechst33258 荧光染色检测

(a) CCRV 感染 48 h 后的 CCK 细胞; (b) 正常 CCK 细胞。

Fig. 2 Hoechst33258 staining of CCRV infected CCK cells at 48 h post infection

(a) CCK cells at 48 h post infection; (b) normal CCK cells.

CCRV 感染 CCK 后 24、48、72、96、120 h,从 Hoechst33258 荧光染色图片中选取 4 个视野,每

个视野计数 100 个细胞,计算出不同时间下实验组以及对照组中的荧光细胞百分数即细胞凋亡

率。从图3可见,病毒感染24、48、72、96、120 h,凋亡率分别为 $18.67\% \pm 3.05\%$ 、 $48.33\% \pm 4.04\%$ 、 $77.67\% \pm 5.50\%$ 、 $89.67\% \pm 4.04\%$ 、 $95.67\% \pm 2.89\%$ 。该结果表明,随着感染时间的延长,实验组细胞凋亡率增高,呈现时间依赖性效应。

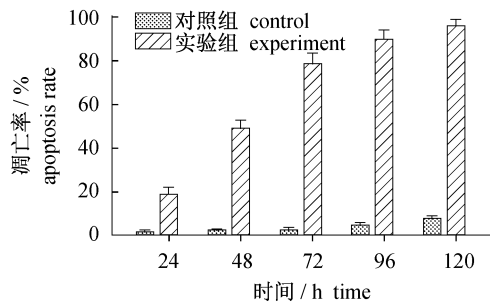


图3 细胞凋亡率与 CCRV 感染时间关系  
Fig.3 The relationship of apoptosis rate and CCRV infection time

### 2.3 DNA Ladder 试验

CCRV 感染 CCK 细胞 12、24、48 和 72 h 后通过试剂盒提取细胞总 DNA,琼脂糖凝胶电泳获得细胞 DNA 片段化电泳图(图4),病毒感染 12 h 后(泳道5),CCK 细胞 DNA 隐约出现大小为 180~200 bp 整数倍的 DNA 梯状条带。随着时间的延迟,病毒感染 24、48 和 72 h 后,DNA 梯状条带逐渐明显,小分子片段增多,亮度增强,大片段 DNA 发生降解。对照组无梯状条带显示。由此可说明,CCRV 诱导 CCK 细胞发生了凋亡,细

胞总 DNA 片段化显著,并且在一定时间内随着时间的延长,梯状条带更为明显,细胞凋亡呈现感染时间依赖性特征。

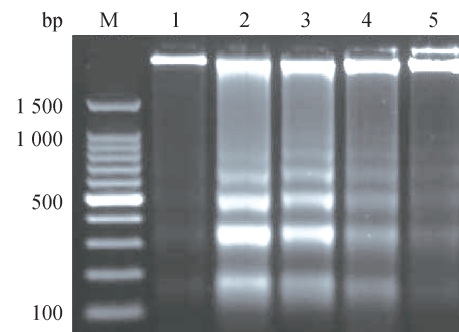


图4 CCRV 感染 CCK 后细胞后 DNA 片段化电泳图  
泳道 M. 100 bp Marker; 泳道 1. 正常细胞 DNA; 泳道 2. 感染 72 h 后的 CCK 细胞 DNA; 泳道 3. 感染 48 h 后的 CCK 细胞 DNA; 泳道 4. 感染 24 h 后的 CCK 细胞 DNA; 泳道 5. 感染 12 h 后的 CCK 细胞 DNA。

Fig.4 DNA fragmentation of CCRV-infected CCK cells

Lane M. 100 bp Marker; Lane 1: the control CCK cells; Lane 2. CCK cells at 72 h post infection of CCRV; Lane 3. CCK cells at 48 h post infection of CCRV; Lane 4. CCK cells at 24 h post infection of CCRV; ;Lane 5. CCK cells at 12 h post infection of CCRV.

### 2.4 TUNEL 检测

CCRV 感染 CCK 细胞 72 h 后经 TUNEL 法检测,结果表明,实验组细胞中黄绿色的凋亡细胞明显增多,细胞 DNA 断裂明显,感染细胞融合形成合胞体,凋亡小体呈散在分布(图5-a,箭头所示),而对照组 CCK 细胞仅有极少数细胞呈黄绿色,绝大多数细胞正常(图5-b)。

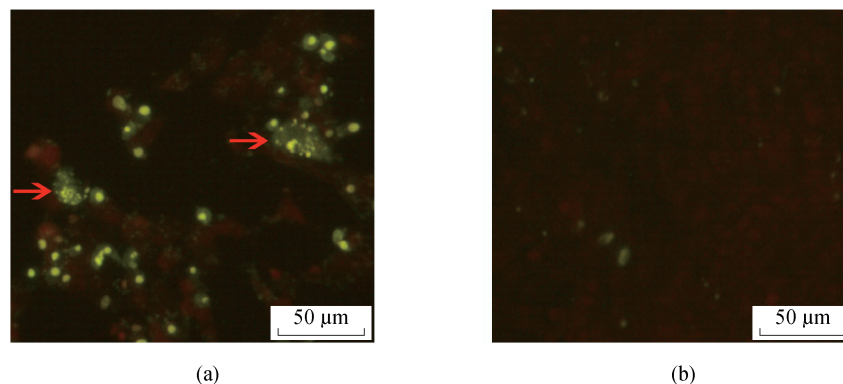


图5 CCRV 诱导 CCK 细胞凋亡的 TUNEL 检测

(a) CCRV 感染 72 h 后的 CCK 细胞; (b) 正常 CCK 细胞。

Fig.5 The TUNEL assay of CCRV induced apoptosis in CCK cells

(a) CCK cells at 72 h post infection of CCRV; (b) normal CCK.

## 2.5 亚 G<sub>1</sub> 期 (sub-G<sub>1</sub>) 细胞检测

CCRV 感染 CCK 细胞 48 h 后, DAPI 流式细胞仪检测 CCK 细胞凋亡, 结果表明, 图 6-a 可

见明显的凋亡细胞峰亚 G<sub>1</sub> 期峰 (sub-G<sub>1</sub>), 凋亡率为 53.64%。图 6-b 为正常对照细胞, 未见亚 G<sub>1</sub> 期凋亡细胞峰。

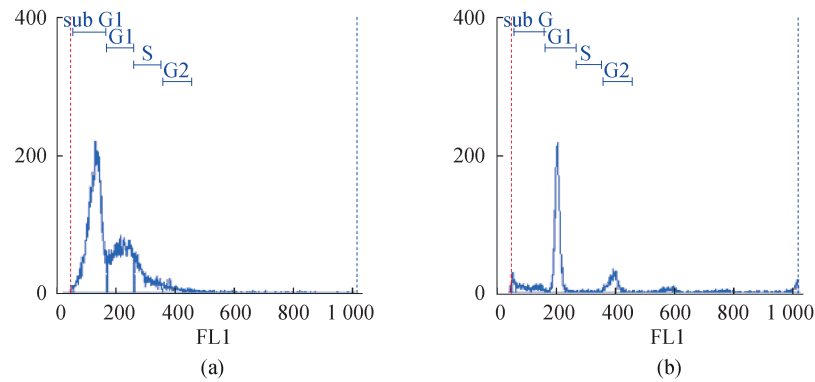


图 6 CCRV 感染后亚 G<sub>1</sub> 期 CCK 细胞检测

(a) CCRV 感染 48 h 后的 CCK 细胞; (b) 正常 CCK 细胞。

Fig. 6 Detection of sub-G<sub>1</sub> CCK cells after CCRV infection

(a) CCK cells at 72 h post infection of CCRV; (b) normal CCK.

## 2.6 流式细胞仪 JC-1 检测

CCRV 感染 CCK 细胞后 24 h, JC-1 荧光探针流式细胞仪检测细胞凋亡。在正常 CCK 细胞中, 线粒体维持较高的膜电位, JC-1 聚集在线粒体内形成聚合物, 产生红色荧光; 细胞发生凋亡时, 线粒体膜电位下降, JC-1 则为单体, 红色荧光强度减弱, 产生绿色荧光。与对照组 (图 7-a) 相比, 实

验组 (图 7-b) 细胞在 R2 及 R1 区域百分率增大 (分别为 55.06%、16.86%), 对照组细胞多集中于 R4 区域 (66.46%), R1 区域仅占 1.79%。经 JC-1 检测, 细胞病变后, JC-1 红色荧光减弱, 绿色荧光增多, 即 JC-1 由聚合物转变为单体状态, 说明 CCK 线粒体膜电位下降, CCK 发生了凋亡。

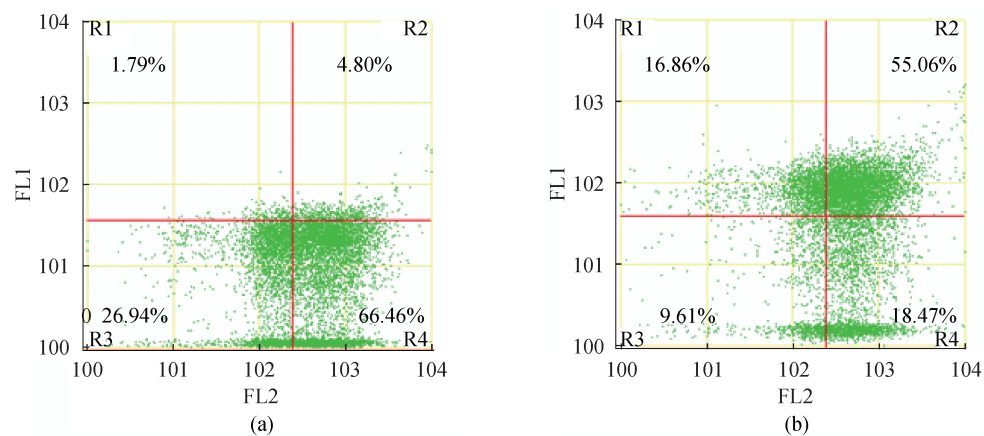


图 7 JC-1 荧光探针检测 CCK 细胞凋亡的流式细胞图

(a) 正常 CCK 细胞; (b) CCRV 感染 24 h 后的 CCK 细胞。

Fig. 7 The detection of apoptosis of infected CCK in flow cytometric analysis using JC-1 fluorescent labeling

(a) Normal CCK cells; (b) CCK cells at 24 h post infection with CCRV.

## 2.7 灭活 CCRV 诱导 CCK 凋亡

CCRV 经紫外线照射处理以及热处理后, 病毒滴度变化如下: 紫外线照射处理组以及 65 °C 热

处理后, 病毒滴度为零, 表明病毒丧失感染活性。与对照组 (病毒滴度为  $8.63 \pm 0.47$ ) 相比, 45 °C (病毒滴度为  $7.51 \pm 0.23$ )、55 °C (病毒滴度为

6.82 ± 0.47) 热处理组病毒滴度均有一定下降,但小于 2 个对数级,对病毒活性影响不显著。CCR<sub>V</sub> 经紫外线照射(泳道 4)以及 65 °C 热处理 30 min(泳道 1)后感染 CCK 细胞,细胞基因组 DNA 未发生片段化,而 55 °C(泳道 2)、45 °C(泳道 3)热灭活 30 min 处理的 CCR<sub>V</sub> 感染 CCK 细胞后,细胞基因组 DNA 琼脂糖电泳呈梯状条带,基因组 DNA 片段化明显,表明 45 °C、55 °C 热灭活处理的 CCR<sub>V</sub> 仍具有感染活性,可以诱导 CCK 细胞凋亡,且 45 °C 灭活组较之 55 °C 灭活组 CCR<sub>V</sub> 诱导 CCK 细胞凋亡更加明显。正常 CCK 细胞 DNA 未发生片段化(泳道 5),未灭活 CCR<sub>V</sub> 感染 CCK 细胞发生明显凋亡(泳道 6)(图 8)。这一结果与灭活 CCR<sub>V</sub> 感染 CCK 细胞后 DNA 片段化结果一致。

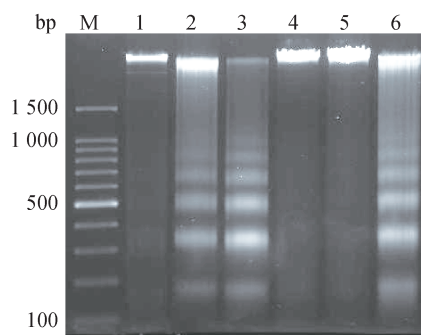


图 8 灭活 CCR<sub>V</sub> 感染 CCK 细胞后 DNA 片段化电泳图

泳道 M. 100 bp Marker; 泳道 1. 65 °C, 30 min 热灭活 CCR<sub>V</sub>; 泳道 2. 55 °C, 30 min 热灭活 CCR<sub>V</sub>; 泳道 3. 45 °C, 30 min 热灭活 CCR<sub>V</sub>; 泳道 4. UV 照射灭活 CCR<sub>V</sub>; 泳道 5. 正常 CCK 细胞; 泳道 6. 未灭活 CCR<sub>V</sub> 感染 CCK 细胞。

Fig. 8 DNA fragmentation of CCK cells infected with different inactivated CCR<sub>V</sub>

Lane M. 100 bp Marker; Lane 1. 65 °C, 30 min inactivated CCR<sub>V</sub>; Lane 2. 55 °C, 30 min inactivated CCR<sub>V</sub>; Lane 3. 45 °C, 30 min inactivated CCR<sub>V</sub>; Lane 4. UV inactivated CCR<sub>V</sub>; Lane 5. normal CCK cells; Lane 6. un-inactivated CCR<sub>V</sub>.

### 3 讨论

细胞凋亡是机体为了维持内环境的稳定,通过自身基因调控,高度有序地使生物体内一些细胞主动死亡的一种方式。凋亡可作为机体自我调节的一种方式,同时也可作为机体的一种防御方式<sup>[13]</sup>。越来越多的资料表明,病毒参与了细胞凋亡的诱导和抑制<sup>[14]</sup>。病毒感染细胞后,或是因为病毒复制与病毒蛋白的表达对细胞有毒性作用,

或是因为细胞自身的核酸与蛋白质代谢被病毒抑制,最终导致细胞病变。许多病毒的致细胞病变效应都是通过诱发细胞凋亡来实现的,细胞凋亡在病毒感染致病上有重要意义<sup>[9]</sup>。

CCR<sub>V</sub> 感染 CCK 后,细胞皱缩,变圆,随后脱落,细胞单层呈网状收缩直至崩解,出现典型细胞病变效应,说明 CCR<sub>V</sub> 病毒可在 CCK 中增殖。Hoechst33258 是可与 DNA 特异结合的活性染料,主要结合在 DNA 的 A-T 碱基区,紫外光激发时发射蓝色荧光。细胞发生凋亡时,染色质固缩,经 Hoechst33258t 染色,细胞核呈碎块状致密浓染<sup>[16]</sup>,显示 CCR<sub>V</sub> 感染细胞后,细胞核浓缩,并且凝聚于核膜周边,可观察到凋亡小体。这与草鱼呼肠孤病毒 GCRV<sup>[10]</sup> 以及大鳞大麻哈鱼呼肠孤病毒(CSV)<sup>[9]</sup> 诱导的细胞凋亡一致。在 Hoechst33258 染色结果中,通过对凋亡细胞统计计数,证实细胞凋亡与病毒感染时间关系密切,细胞凋亡过程呈一定的时间依赖特征。

细胞凋亡的另一显著特征为染色质片段化<sup>[17-18]</sup>。发生凋亡的细胞核小体邻接处双螺旋 DNA 断裂,形成 180 ~ 200 bp 及其整数倍的寡核苷酸碎片,在含 EB 的琼脂糖凝胶电泳中呈典型的梯状条带(DNA ladder)。在 DNA 梯状电泳试验中,CCR<sub>V</sub> 感染 CCK 细胞 12, 24, 48 h 和 72 h 后均呈现典型的凋亡细胞特有的梯状条带,病毒感染 12 h 后隐约可见 DNA Ladder 条带,24 h 凋亡表现明显,72 h 后达到高峰,这表明 CCR<sub>V</sub> 诱导 CCK 细胞发生凋亡,细胞基因组出现片段化具有一定的时间依赖性,这一结果与 Hoechst33258 染色观察结果一致,这亦是细胞凋亡与细胞坏死的重要区别之一。细胞坏死时,细胞基因组 DNA 无规律的断裂,伴随组蛋白降解,在琼脂糖凝胶电泳上呈模糊的弥散状条带<sup>[17]</sup>。

在细胞发生凋亡时,内源性内切酶激活导致 DNA 断裂而暴露出 3'-OH。而 TUNEL 法就是通过标记细胞 DNA 的 3'-OH 来确定是否存在细胞凋亡。在末端脱氧核苷酸转移酶 TdT 作用下,可自行进行 3'端的脱氧核苷酸合成。在反应体系中加入标记的脱氧核苷酸,则在 3'端出现一段带有标记物的寡核苷酸,通过荧光显色反应,可在原位特异性的显示凋亡细胞<sup>[19]</sup>。本研究中采用 TUNEL 技术检测 CCR<sub>V</sub> 感染 CCK 细胞后引起的细胞凋亡,结果表明,CCR<sub>V</sub> 感染 CCK 细胞

72 h后,有大量 TUNEL 阳性凋亡细胞,出现凋亡小体。经过 PI 复染后,排除了是因着色红色的坏死细胞所致。

JC-1 是一种广泛用于检测线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 的荧光探针。在线粒体膜电位较高时,JC-1 聚集在线粒体的基质(matrix)中,形成聚合物(J-aggregates),可以产生红色荧光;在线粒体膜电位较低时,JC-1 不能聚集在线粒体的基质中,此时 JC-1 为单体(J-monomer),可以产生绿色荧光。本研究中采用荧光探针 JC-1 法,对 CCRV 感染的 CCK 细胞进行了分析,发现 CCRV 感染组中 JC-1 红色荧光下降显著,而 JC-1 绿色荧光明显增强,说明线粒体跨膜电位在发生凋亡时下降,线粒体膜通透性增加,与王珊等<sup>[20]</sup>报道一致。

本实验还初步研究了不同灭活方式处理的 CCRV 感染 CCK 细胞后是否可引起 CCK 细胞凋亡的试验。通过细胞基因组 DNA 片段化分析,发现完全灭活的 CCRV 不能引起感染细胞基因组 DNA 片段化,这意味着 CCRV 感染 CCK 引起细胞凋亡可能依赖于病毒的复制。

实验采用 Hoechst33258 染色、DNA 片段化实验、TUNEL 反应以及 JC-1 流式细胞术等几种不同的细胞凋亡检测方法,证实了 CCRV 可诱导 CCK 细胞凋亡,并证实该凋亡过程具有时间依赖性和依赖于病毒的增殖过程,为今后进一步开展 CCRV 病毒致病机理研究奠定了重要基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 梁智辉,朱慧芬,陈九武. 流式细胞术基本原理与实用技术[M]. 武汉:华中科技大学出版社,2000: 4 - 16.
- [ 2 ] 王珊,周春喜,李宁,等. 检测早期细胞凋亡的流式细胞术[J]. 现代科学仪器,2003,3:48 - 50.
- [ 3 ] Pham P H, Lai Y S, Lee F F Y, *et al.* Differential viral propagation and induction of apoptosis by grouper iridovirus(GIV) in cell lines from three non-host species [ J ]. *Virus Research*, 2012, 167 ( 1 ): 16 - 25.
- [ 4 ] Huang Y H, Huang X H, Gui J F, *et al.* Mitochondrion-mediated apoptosis induced by *Rana grylio* virus infection in fish cells [ J ]. *Apoptosis*, 2007,12(9):1569 - 1577.
- [ 5 ] Chiu C L, Wu J L, Her G M, *et al.* Aquatic birnavirus capsid protein, VP3, induces apoptosis via the Bad-mediated mitochondria pathway in fish and mouse cells[ J ]. *Apoptosis*, 2010,15(6):653 - 668.
- [ 6 ] Hong J R, Huang L J, Wu J L. Aquatic birnavirus induces apoptosis through activated caspase-8 and -3 in a zebrafish cell line [ J ]. *Journal of Fish Diseases*, 2005,28(3):133 - 140.
- [ 7 ] Hong J R, Gong H Y, Wu J L. IPNV VP5, a novel anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family, regulates Mcl-1 and viral protein expression [ J ]. *Virology*, 2002,295(2):217 - 229.
- [ 8 ] Du C S, Zhang Q Y, Li CL, *et al.* Induction of apoptosis in a carp leucocyte cell line infected with turbot(*Scophthalmus maximus* L.) rhabdovirus[ J ]. *Virus Research*, 2004,101(2):119 - 126.
- [ 9 ] DeWitte-Orr S J, Bols N C. Cytopathic effects of chum salmon reovirus to salmonid epithelial, fibroblast and macrophage cell lines [ J ]. *Virus Research*, 2007,126(1 - 2):159 - 171.
- [ 10 ] 屈三甫,张小榕,郑从义,等. 草鱼呼肠孤病毒诱导草鱼肾细胞凋亡[J]. 水生生物学报,2000,24(6): 616 - 621.
- [ 11 ] 曾令兵,徐进,李艳秋,等. 斑点叉尾鮰出血病原呼肠孤病毒的分离与鉴定[J]. 病毒学报,2009,25(6):460 - 466.
- [ 12 ] 曾令兵,李晓莉,张林,等. 斑点叉尾鮰肾脏组织细胞系的建立及其生物学特性[J], 中国水产科学, 2009,16(1):75 - 81.
- [ 13 ] Lohmann C, Muschawekh A, Kirschnek S, *et al.* Induction of tumor cell apoptosis or necrosis by conditional expression of cell death proteins; analysis of cell death pathways and *in vitro* immune stimulatory potential [ J ]. *Journal of Immunology*, 2009,182(8):4538 - 4546.
- [ 14 ] Ravindra P V, Tiwari A K, Ratta B, *et al.* Newcastle disease virus-induced cytopathic effect in infected cells is caused by apoptosis [ J ]. *Virus Research*, 2009,141(1):13 - 20.
- [ 15 ] Tyler K L, Squier M K, Rodgers S E, *et al.* Differences in the capacity of reovirus strains to induce apoptosis are determined by the viral attachment protein  $\sigma$ -1 [ J ]. *Journal of Virology*, 1995,69(11):6972 - 6979.
- [ 16 ] Du C S D, Zhang Q Y Z, Li C L, *et al.* Induction of apoptosis in a carp leucocyte cell line infected with turbot(*Scophthalmus maximus* L.) Rhabdovirus[ J ]. *Virus Research*, 2004,101(2):119 - 126.
- [ 17 ] Häcker G. The morphology of apoptosis[ J ]. *Cell and Tissue Research*, 2000,301(1):5 - 17.

- [18] Schwartzman R A, Cidlowski J A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death [J]. *Endocrine Reviews*, 1993, 14 (2): 133 - 151.
- [19] Nishizaki K, Yoshino T, Orita Y, *et al.* TUNEL staining of inner ear structures may reflect autolysis, not apoptosis [J]. *Hearing Research*, 1999, 130 (1 - 2): 131 - 136.
- [20] 王珊, 李宁, 于力方, 等. 流式细胞术检测细胞凋亡比较研究 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2005, 12 (3): 168 - 170.
- [21] 李超, 伏圣博, 刘华玲, 等. 细胞凋亡研究进展 [J]. *世界科技研究与发展*, 2007, 29 (3): 45 - 53.
- [22] 雷静, 章平, 钱旻. 几种细胞凋亡检测方法的比较 [J]. *生物技术通讯*, 2005, 16 (6): 681 - 683.
- [23] 阮红梅, 张奇亚. 流式细胞术在细胞凋亡研究中的应用 [J]. *动物医学进展*, 2005, 26 (3): 12 - 15.
- [24] 洗健安, 王安利, 孙敬锋. 流式细胞术在水产动物研究中的应用 [J]. *水产科学*, 2009, 28 (5): 290 - 293.

## Studies on the apoptosis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) kidney cells induced by channel catfish reovirus

WANG Yao<sup>1</sup>, ZENG Lingbing<sup>2\*</sup>, XU Jin<sup>2</sup>, ZHOU Yong<sup>2</sup>, XIAO Yi<sup>2</sup>

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China)

**Abstract:** Channel catfish reovirus (CCRV) is the pathogen of the hemorrhage of channel catfish (*Ictalurus punctatus* Rafinesque), which propagates in the kidney of channel catfish (CCK) cell line. In this study, the evaluation of whether the CCRV could induce the apoptosis of CCK cells was examined by Hoechst33258 staining, DNA fragmentation assay, TUNEL reaction, and flow cytometry analysis using JC-1, etc. The infection test indicated that CCRV caused typical cytopathic effect (CPE) in CCK cells. Chromatin condensation, nuclei marginalization and the apoptotic bodies were observed in Hoechst 33258 staining, and the apoptotic rate increased with the time going of CCRV infection. The DNA fragmentation assay demonstrated that fragmentation was first noted at 12 h post-infection and reached the peak at 72 h post-infection. In addition, genomic DNA was broken and lots of 3'-terminal free-hydroxyl group (-OH) were generated in infected CCK in TUNEL assay. The hypo-diploid fraction was shown in the sub-G1 cells analysis and the apoptotic rate was 53.44% at 48 h post-infection. Furthermore, the change of the mitochondrial membrane potential (MMP) was investigated by flow cytometric analysis with JC-1 fluorescent labeling and the result showed that the membrane permeability and MMP of CCK cells changed significantly at 24 h post-infection. These results demonstrated that CCRV induced apoptosis in CCK cells. Besides, CCRV-induced apoptosis did require the viral replication as the apoptosis was blocked in CCK cells by both heat-inactivated and UV-inactivated virus.

**Key words:** *Ictalurus punctatus*; reovirus; kidney cell line; apoptosis

**Corresponding author:** ZENG Lingbing. E-mail: zenglingbing@gmail.com