

## 雏鸭胰脏组织损伤在新型鸭肝炎病毒感染过程中的变化特点

胡薛英<sup>1,2</sup>, 谷长勤<sup>2</sup>, 王德海<sup>2</sup>, 程国富<sup>2</sup>, 苏敬良<sup>1</sup>, 余锐萍<sup>1\*</sup>, 周诗其<sup>2</sup> (1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 2. 华中农业大学 动物医学院, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 对新型鸭肝炎病毒人工感染 9 日龄樱桃谷雏鸭的胰脏损伤特点进行了研究。对感染雏鸭在接毒后 12、24、48、72、96、168 h 以及 14 d 时胰脏病理组织学变化的观察结果表明: 感染雏鸭的胰脏组织在接毒后 24 h 出现胰腺细胞的局灶性坏死及嗜酸性小体, 且在接毒后 48 h 分布广泛而严重; 接毒后 72~168 h 期间, 胰脏组织中出现炎性细胞浸润并且逐渐增多, 而胰腺的局灶性坏死及嗜酸性小体逐渐减少; 接毒后 14 d, 仅见到组织炎性细胞的浸润。应用透射电镜对接毒后 48 h 胰脏的超微结构观察结果显示, 胰腺细胞发生坏死, 同时出现凋亡细胞的形态特征。本试验结果表明, 在新型鸭肝炎病毒感染雏鸭时, 胰脏的局灶性坏死是典型病理变化之一, 胰腺细胞在发生坏死的同时, 可能也发生凋亡, 二者同时出现在同一胰脏组织内。

**关键词:** 新型鸭肝炎病毒; 胰脏; 组织病理变化; 超微结构; 雏鸭

**中图分类号:** S852.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-4545(2006)02-0186-03

鸭病毒性肝炎(Duck viral hepatitis)简称鸭肝炎(DH), 是由 1 型、2 型和 3 型 3 个血清型鸭肝炎病毒(DHV)引起的, 6 周龄内雏鸭发生的一种急性高度致死性传染病, 以肝炎为其主要病变特征<sup>[1-2]</sup>。国内外学者对鸭病毒性肝炎的病理学研究表明, 胰脏局灶性坏死是鸭病毒性肝炎的另一典型病理变化<sup>[3-6]</sup>。

新型鸭肝炎病毒是近年新分离鉴定的一型病毒<sup>[7]</sup>, 其对雏鸭感染的主要病理变化为出血性坏死性肝炎, 胰脏有局灶性坏死<sup>[8]</sup>。为深入研究感染雏鸭胰脏的组织损伤特点, 以及胰脏的病理变化与发病机制的关系, 本试验对感染雏鸭胰脏的组织病理变化进行了动态观察, 并对胰脏的超微结构进行了观察。

## 1 材料与方法

**1.1 毒株** 将新型鸭肝炎病毒用生理盐水 1:10 稀释, 接种于 10 日龄鸭胚, 每枚经尿囊腔注射 0.2 mL。收集 48~96 h 死亡鸭胚的尿囊液, 经测定尿囊液的鸭胚 ELD<sub>50</sub> 为  $10^{-4.32}/0.1\text{ mL}$ , -20℃ 冻存备用。接种前, 将收集的尿囊液用灭菌生理盐水作 1:100 稀释, 加双抗, 4℃ 过夜, 次日作接毒用。

**1.2 试验动物** 1 日龄健康樱桃谷雏鸭 180 只, 购自武汉市某养鸭场。自由饮水采食, 隔离饲养。饲料为希望 901 肉用雏鸭料。

**1.3 病理模型复制** 雏鸭饲养 8 d 后, 随机分成 2 组, 其中试验组 120 只, 经右腿部肌肉注射按 1.1 处理的病毒接种材料 0.2 mL/只; 对照组 60 只, 于相同部位接种生理盐水 0.2 mL/只。

**1.4 采取样品及样品制备** 接毒后, 观察雏鸭的临床症状, 于接毒后 12、24、48、72、96、168 h 和 14 d 分批随机选取试验组 8 只、对照组 8 只, 颈静脉放血致死, 经采血后剖检, 观察各器官组织的病理变化; 取胰脏, 10% 中性福尔马林固定, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜观察。另取感染后 48 h 雏鸭的胰脏组织, 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液固定, 1% 锇酸后固定, 环

氧树脂包埋, 超薄切片, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 透射电镜(日立 H-7000FA 型)观察。

## 2 结果

**2.1 临床症状及剖检病变** 雏鸭接种前 1 周, 精神状况良好, 采食、饮水正常。接种后 12~24 h, 大部分雏鸭开始出现精神沉郁, 缩颈弓背, 不愿走动, 采食量、饮水量明显减少, 部分鸭开始出现神经症状, 表现头往后仰, 两腿呈划水样姿势。死亡雏鸭呈现出典型的角弓反张姿势。雏鸭从接种后 24 h 开始死亡, 死亡高峰为接种后 24~48 h, 接种后 7 d 停止死亡。整个试验期间, 试验组死亡 26 只, 死亡率为 21.7%; 对照组雏鸭未见死亡。

接种后 12 h, 试验组雏鸭胰脏组织无明显眼观病变; 接种后 24 h, 眼观病变明显, 表现为胰脏苍白, 缺乏透明感及光泽, 表面散在针尖大小白色病灶; 接种后 48 h, 胰脏肿大, 缺乏透明感及光泽, 质地较硬, 表面有淤血及细小的白色病灶(图 1A)。接种后 72、96、168 h, 在胰脏表面仍可见有针尖大小白点; 接种 14 d, 胰脏无明显可见变化。

**2.2 胰脏组织病理学观察** 接毒后 12 h, 可见胰腺细胞间隙增大, 有轻度水肿; 组织细胞间散在少量空泡, 空泡边缘清楚, 空泡内含有红色的细胞质残留碎片, 有的空泡内有细胞或是红色嗜酸性团块。接毒后 24 h, 胰脏组织水肿, 胰腺细胞间分布有较多空泡, 内有细胞或是红色嗜酸性团块(图 1B)。接毒后 48 h, 胰腺细胞间分布的空泡数量明显增多, 有的呈局灶性分布, 有的散在分布; 多数空泡内含有细胞或者是红色嗜酸性玻璃样圆形团块, 有些细胞的细胞膜破裂, 细胞核溶解消失, 呈局灶性坏死(图 1C); 毛细血管和小血管扩张, 充满红细胞, 小血管周围出现少量的淋巴细胞。接毒后 72~168 h, 胰腺外分泌细胞间的空泡数量逐渐减少, 但可见胰腺血管壁增厚, 血管内皮细胞肿胀, 突出于管腔, 血管周围和胰腺细胞间也出现淋巴细胞浸润, 数量逐渐增多(图 1D)。接毒后 14 d, 胰腺细胞间空泡消失, 但细胞及血管周围有明显炎性细胞浸润。

对照组雏鸭胰脏结构正常, 未见异常变化。

收稿日期: 2004-08-30

基金项目: 2004 年度华中农业大学科技创新基金资助项目

作者简介: 胡薛英(1966-), 女, 副教授, 博士。

\* 通讯作者

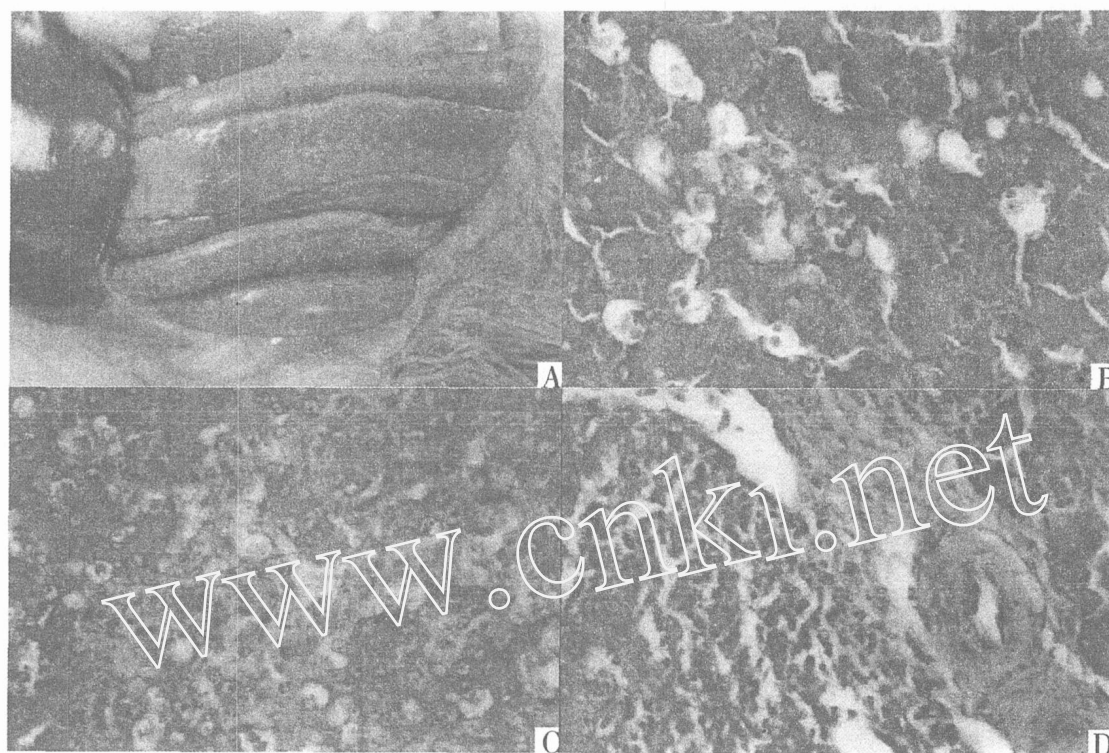


图 1 试验组雏鸭胰脏组织病理学观察结果 A. 胰脏肿大, 淤血, 有针尖大白色病灶; B. 接毒后 24 h, 胰腺细胞间分布有较多空泡, 内有细胞或红色嗜酸性团块(HE, 400 $\times$ ); C. 接毒后 48 h, 鸭胰腺细胞坏死, 空泡内有红色嗜酸性团块(HE, 400 $\times$ ); D. 接毒后 168 h, 胰脏血管周围炎性细胞浸润(HE, 400 $\times$ )

**2.3 胰脏超微病理学观察** 接毒后 48 h, 可见胰脏的大部分胰腺细胞形态规则, 细胞质内质网丰富, 分布有酶原颗粒。在正常的胰腺细胞间, 分布有一些异常细胞。有些细胞发生坏死, 细胞膜不完整或消失, 内质网扩张, 线粒体肿胀, 嵴断裂或溶解消失, 细胞核破裂、溶解, 细胞内容物包括细胞器和酶原颗粒外溢(图 2A)。有些细胞皱缩, 与周围细胞之间出现很大的间隙, 细胞的电子密度增加, 内质网扩张, 电子密度增加, 形成板层状结构(图 2B); 细胞核浓缩, 核染色质固缩聚集于核膜, 呈逗号状(图 2C)或半月形(图 2D); 细胞核与细胞器被细胞膜分隔, 形成凋亡小体(图 2E, F)。有些细胞内出现空泡, 细胞膜破裂不完整, 细胞器溶解(图 2G), 有的细胞核分裂成若干块(图 2H)。

### 3 讨论

本试验应用新型鸭肝炎病毒人工感染雏鸭, 对感染后不同时期雏鸭胰脏的组织病理变化进行了系统的动态观察。结果显示, 胰脏的局灶性坏死是感染雏鸭的典型病理变化之一, 且在接毒后 48 h 病变表现最严重。这与国内外学者对鸭病毒性肝炎的胰脏组织病理学研究一致<sup>[1, 3, 6]</sup>。

本研究还发现胰脏的病理变化有一些新特点。在光镜下, 在胰腺细胞间观察到多量均质红染的嗜酸性团块, 呈半透明玻璃状的嗜酸性小体。在透射电镜下观察这些细胞, 可见细胞皱缩, 细胞器和细胞核浓缩, 核染色质聚集于核膜下, 凝集成逗号状或半月状; 有的细胞膜凹陷, 将细胞器和细胞核分隔成若干小块。这些细胞变化特点均为凋亡细胞的形态特征<sup>[9]</sup>。由此认为, 光镜下观察到的嗜酸性小体是凋亡细胞及其形成的

凋亡小体<sup>[10]</sup>, 说明新型鸭肝炎病毒感染可诱导胰腺细胞发生凋亡。

受损的胰腺细胞以坏死方式死亡, 能够引起多种酶及炎症介质的释放, 诱发严重的炎症反应; 而以凋亡方式死亡时, 不伴有炎症反应<sup>[11]</sup>。Kaiser<sup>[12]</sup>和 Hahn 等<sup>[13]</sup>认为, 诱导胰腺腺泡细胞凋亡可减轻急性胰腺炎的严重程度, 并且认为凋亡可能是一种保护现象, 可减轻急性胰腺炎病变的发展。

本试验结果提示, 胰脏胰腺细胞的坏死与凋亡可能是新型鸭肝炎病毒感染发生发展过程中的一个重要环节。那么, 胰腺细胞的坏死与凋亡是如何发生的, 胰脏的组织损伤与肝脏的组织损伤之间有何联系, 在新型鸭肝炎病毒感染发生发展过程中的作用又如何, 诸多问题还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Saif Y M. Diseases of Poultry[M]. 11<sup>TH</sup> Edition. America: Iowa State Press, 2003. 339-351.
- [2] 王 平. 北京小鸭病毒性肝炎的研究(一) 诊断和防治[J]. 北京大学学报(自然版), 1980, 1: 55.
- [3] 徐福南, 周 芳. 鸭病毒性肝炎的组织病理学研究[J]. 中国兽医科技, 1990, 2: 6-7.
- [4] 禹旺盛, 赵振华, 佟程浩. 鸭病毒性肝炎的发生和病理形态学观察[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1991, 12(11): 12-13.
- [5] Farmer H, Chalmers W S K, Woolcock P R. The duck fatty kidney syndrome—An aspect of DVH[J]. Avian Pathol, 1987, 16: 227-236.
- [6] 胡薛英, 程国富, 周诗其, 等. 试验感染鸭病毒性肝炎雏鸭的组织病理学研究[J]. 华中农业大学学报, 2000, 19(1): 48-50.

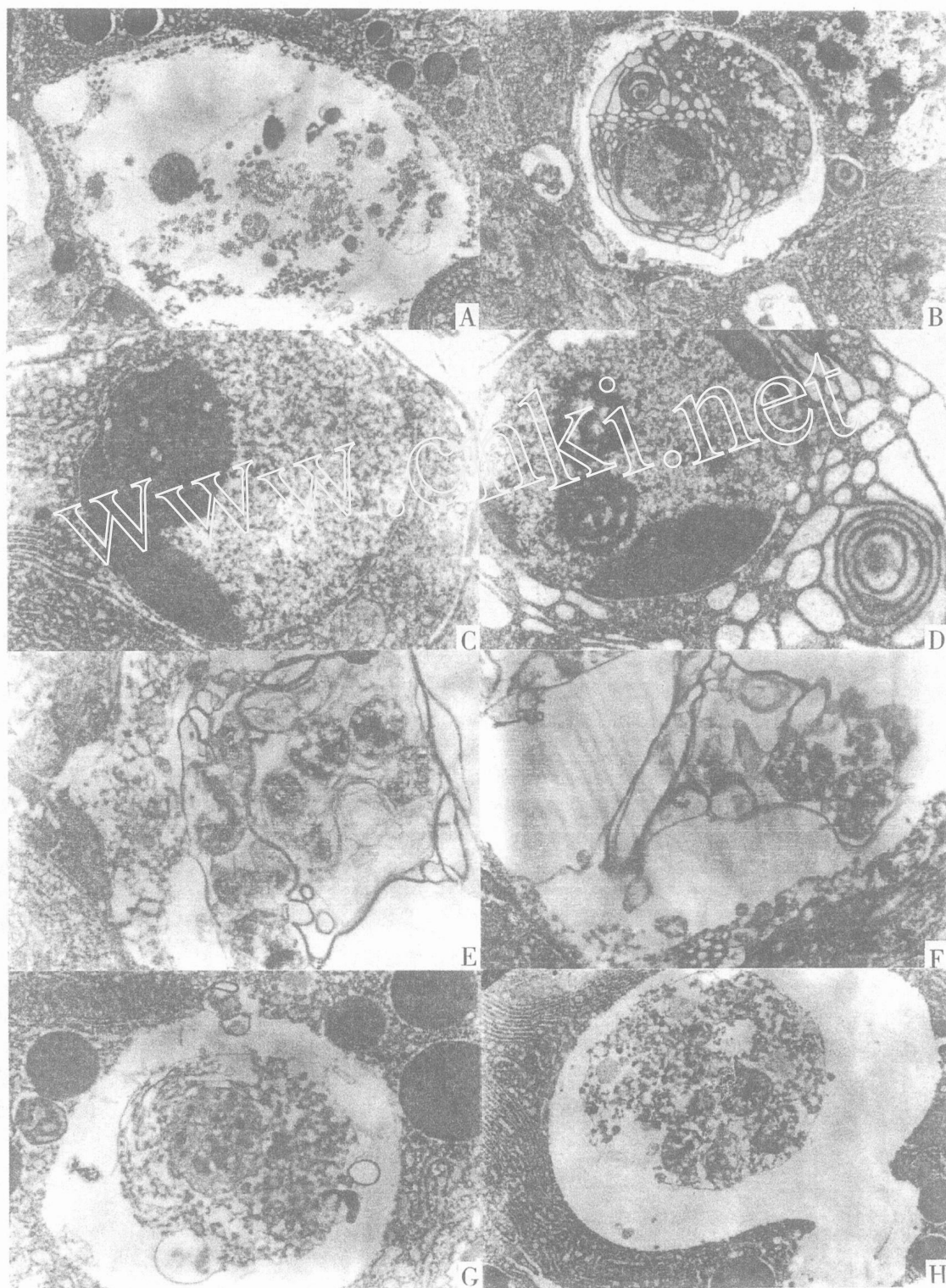


图2 试验组雏鸭胰脏超微病理学观察结果 A. 接毒后 48 h, 胰腺细胞坏死, 细胞核破碎、溶解, 细胞内容物包括细胞器和酶原颗粒外溢 (6 000 $\times$ ); B. 接毒后 48 h, 胰腺细胞皱缩, 内质网扩张, 电子密度增加, 形成板层状结构 (4 000 $\times$ ); C. 接毒后 48 h, 胰腺细胞核浓缩, 核染色质固缩聚集于核膜下, 呈逗号状 (12 000 $\times$ ); D. 接毒后 48 h, 胰腺细胞核浓缩, 核染色质固缩成团块, 呈半月形 (12 000 $\times$ ); E. 接毒后 48 h, 胰腺细胞膜凹陷, 将细胞核与细胞器分隔成若干团块 (12 000 $\times$ ); F. 接毒后 48 h, 胰腺细胞核与细胞器被细胞膜分隔, 形成凋亡小体 (10 000 $\times$ ); G. 接毒后 48 h, 胰腺细胞内出现空泡, 细胞膜破裂不完整, 溶解 (15 000 $\times$ ); H. 接毒后 48 h, 胰腺细胞膜破裂, 细胞核分裂成若干块 (8 000 $\times$ )

- [7] 苏敬良, 黄 瑜, 贺荣连, 等. 新型鸭肝炎病毒的分离及初步鉴定 [J]. 中国兽医科技, 2002, 32(1): 15-16  
[8] 胡薛英, 苏敬良, 程国富, 等. 新型鸭肝炎病毒试验感染雏鸭的组

织病理学[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(6): 549-551.

- [9] Lawrence M S, Jonathan D A. Methods in cell Biology——Volume 66 Apoptosis[M]. USA: Academic Press, 1995. 394-396

(下转 191 页)

## Fluorescence labelling of *Candida albicans* and *Salmonella typhimurium* and its effect on adherence to cells

ZHOU Dong-rui<sup>1</sup>, YANG Li-guo<sup>3</sup>, TANG Zu-ming<sup>2</sup>, GUO Xiao-ying<sup>2</sup>, ZHANG Chun-xiu<sup>2</sup>, LU Zu-hong<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Animal Reproduction, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Department of Biomedical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, China;

3. College of Animal Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract** Fluorescence labelling methods of *C. albicans* and *S. typhimurium* and its effect on adherence to HeLa cells were investigated in the present study. The fungi and bacteria were cultured in different LB media at 37 °C for 1 day, which contained fluorochrome Rhodamine B, fluorescein sodium, or acridine orange, respectively. The results showed that *S. typhimurium* was labelled by Rhodamine B or fluorescein sodium, and *C. albicans* was only labelled by fluorescein sodium. However, the growth of the two kinds of bacteria was inhibited by acridine orange. The fluorescent intensities were detected by luminescence spectrometer. The results showed that the fluorescence intensity of Rhodamine B labelled bacteria was enhanced with the increasing dosage of the fluorochromes used, but fluorescence intensity of bacteria labelled by Fluorescein sodium had an maximum value at the dosage of 0.5 g/L. We also found that the adherence of the bacteria to the HeLa cells was not affected by fluorescence labelling.

**Key words:** *Candida albicans*; *Salmonella typhimurium*; fluorescence labelling; cell adherence

\* Corresponding author, E-mail: zhlu@seu.edu.cn

(上接 188 页)

[10] 彭黎明, 王增礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 394-411.

[11] 尚东, 关凤林, 杨佩满, 等. 胰腺腺泡细胞凋亡在大鼠急性胰腺炎病程中的作用及凋亡调控基因的表达[J]. 肝胆胰外科杂志, 2001, 13(3): 152-155.

[12] Kaiser A M. Apoptosis versus necrotic cell death in acute pan-

creatitis[J]. Gastroenterology, 1996, 110: 1781-1783.

[13] Hahn K B, Kim J H, You B M, et al. Induction of apoptosis with an extract of *Artemisia asiatica* attenuates the severity of caerulein-induced pancreatitis in rats[J]. Pancreas, 1998, 17: 153-157.

## Characteristics of the Pancreas Organ Damage in Ducklings Infected with New Type Duck Hepatitis Virus

HU Xue-ying<sup>1,2</sup>, GU Chang-qin<sup>2</sup>, WANG De-hai<sup>2</sup>, CHENG Gu-fu<sup>2</sup>, SU Jing-liang<sup>1</sup>, SHE Riping<sup>1\*</sup>,

ZHOU Shi-qi<sup>2</sup> (1. College of Veterinary Medicine, China Agriculture University, Beijing

100094, China; 2. College of Animal Medicine, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

**Abstract** 9-day old ducklings were inoculated with new type duck hepatitis virus. The histopathological changes of pancreas of inoculated duckling were examined at 12, 24, 48, 72, 96, 168 h and 14 d post inoculation. Histopathological examination revealed there was local coagulative necrosis and Councilman's bodies in pancreas at 24 h post inoculation and it became the most extensive and serious at 48 h post inoculation, between 72 h to 168 h post inoculation, there was heterophil infiltration in pancreas and became more serious. The local coagulative necrosis and Councilman's bodies decreased, only heterophil infiltration was observed at 14 d post inoculation. Ultrastructural study revealed the necrosis and apoptosis in pancreas cells. The study implied that the duckling infected with new type duck hepatitis virus resulted in both the necrosis and apoptosis in the pancreas, and the local coagulative necrosis in pancreas was one of the typical histopathological changes.

**Key words:** new type duck hepatitis virus; pancreas; histopathological changes; ultrastructure; ducklings

\* Corresponding author