

禽网状内皮组织增生病病毒分子生物学特性与免疫抑制

马春霞,郑世民*

(东北农业大学动物医学学院,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:禽网状内皮组织增生病病毒为反转录病毒科禽类C型反转录病毒。禽网状内皮组织增生病病毒感染后主要引起感染家禽免疫功能抑制和慢性肿瘤,该病的控制对养禽业的健康发展和生物制品质量的提高具有重大影响。文章对禽网状内皮组织增生病病毒的生物学特性与引起免疫抑制机制的研究新进展进行了简要综述。

关键词:禽网状内皮组织增生病病毒;生物学特性;免疫抑制

中图分类号:S852.659.3

文献标识码:A

文章编号:1007-5038(2007)04-0057-04

禽网状内皮组织增生病是由反转录病毒科禽网状内皮组织增生病病毒(Reticuloendotheliosis virus, REV)引起的鸡、鸭、鹅、火鸡和其他禽类发生的一种病理综合征,是严重危害禽类的传染性肿瘤病之一,包括急性网状细胞肿瘤、矮小综合征、淋巴和其他组织的慢性肿瘤。REV最早是1958年从患内脏型淋巴瘤的火鸡脾脏中分离,经过火鸡和鸡300次连续传代而获得的病毒。由于该病毒所引起的肿瘤以网状内皮组织增生为特征,故称为“网状内皮组织增生病”,并将该病毒命名为REV-T,即T株^[1]。目前,美国、英格兰、以色列、澳大利亚、德国、南非和

日本等国家已先后分离到不同毒株。REVs主要包括REV-T株、鸡合胞体病毒(Chick syncytia virus, CS)、脾坏死病毒(Spleen necrosis virus, SNV)、鸭传染性贫血病毒(Duck infectious anaemia, DIA)及C45株(宇文延清等,2003年),不同毒株的抗原相关性已被确定,而且都能引起禽类免疫抑制。

禽网状内皮组织增生病在我国家禽中的感染率已达20%~30%^[2],REV感染不仅能引起肿瘤,还可以引起感染鸡胸腺、法氏囊等免疫器官萎缩,使鸡的免疫功能下降、甚至丧失,导致免疫抑制,使感染鸡极易继发感染其他病毒病和细菌病。研究表

收稿日期:2006-12-26

作者简介:马春霞(1980—),女,黑龙江富锦人,硕士研究生,主要从事禽病免疫病理学研究。*通讯作者

[8] Jonathan M Q, Yu W Y, Mark A H, et al. *In vitro* culture of embryonic mouse intestinal epithelium: cell differentiation and introduction of reporter genes[J/OL]. BMC Developmental Biology, 2006, (6): 24. <http://www.biomedcentral.com/1471-213X/6/24>.

[9] 周莹,胡学庆,周广东,等.大鼠小肠上皮类器官单位的分离培养鉴定[J].组织工程与重建外科杂志,2005,1(4):214-216.

[10] 周莹,施诚仁,姚晓虹,等.改良法分离大鼠IOUs构建小肠的初步研究[J].上海交通大学学报(医学版),2006,26(4):393-396.

[11] Jessup J M, Frantz M, Sonmez-Alpan E, et al. Microgravity culture reduces apoptosis and increases the differentiation of a human colorectal carcinoma cell line[J]. In Vitro Cell Dev Biol, 2000, 36A: 367-373.

Primary Culture of Mammalian Intestinal Epithelial Cells

LIU Fang-ning, ZHANG Yan-ming

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100, China)

Abstract: Epithelial cells lining the digestive tract represent a highly organized system built up by multipotent stem cells. Long-term primary culture of intestinal cells (up to 10 d) is still difficult despite progress in isolation methodologies and manipulation of the cell microenvironment. In this article, the isolation of viable epithelial cells, the identification, construction of maintenance and growth media, cell culture conditions were discussed. The main aim is to show the difficulty of primary culture of mammalian intestinal epithelial cells, at the same time, to take some signs or experiences for intestinal epithelial cell culture.

Key words: primary culture; mammals; small intestine; colon; epithelium

明^[3], 马立克病病毒(Marek's disease virus, MDV)、鸡贫血病病毒(Chicken infectious anemia, CAV)和 REV 等免疫抑制性病毒在生产鸡群中的混合感染是导致当前养禽业生产性能下降的重要因素之一。

1 REV 分子生物学特性

REV 属鼠白血病病毒相关的反转录病毒科禽类 C 型反转录病毒。目前已分离到 30 多株, 不同毒株之间, 虽然致病力不同, 但都具有相似的抗原性, 故只有一个血清型^[4]。Chen P Y 等(1997 年)根据各毒株间致病性不同, 认为 REV 至少含有 A、B、C 3 个不同的抗原表位, 建立了能与 T 株反应、但不与鸡合胞体株反应的单克隆抗体, 依据中和试验和与单克隆抗体反应的不同, 将分离株划分为 3 个亚型, 其中, I 型含 A、B、C 3 个表位, II 型仅有 B₂ 表位, III 型含有 A、B 2 个表位^[5]。

REV 呈球形, 有壳粒和囊膜。病毒颗粒直径为 80 nm~100 nm, 每个病毒表面约有 100 个长约 6 nm、直径为 10 nm 的突起。在蔗糖中的浮密度为 1.16 g/mL~1.18 g/mL, 在氯化铯中的浮密度为 1.20 g/mL~1.22 g/mL。REV 的基因组为单股 RNA, 由两个 30 S~40 S 的 RNA 亚单位组成的 60 S~70 S 复合体, 含有 gag、pol 和 env 等结构基因。env 基因编码 gp90 和 gp20 两种糖蛋白, 其中 gp90 蛋白含有顺式构象表位, 是病毒的免疫原性蛋白。gag 基因编码 p12、pp18、pp20、p30 和 p10 等 5 种结构蛋白, 其中 p30 是群特异性抗原, 在病毒粒子的装配中发挥重要作用。vel 基因编码 Vel 蛋白, 具有 DNA 结合转录因子功能, 通常与细胞蛋白形成复合物, 能诱导转化细胞, 使 REV 以水平传播和垂直传播的立体感染方式在鸡群和其它禽群中传播, 诱发鸡群的免疫抑制状态, 导致不同程度的继发、二重感染和多重感染^[6]。

REV 病毒群可分为完全复制型和不完全复制型(缺陷型)两种。其中, 完全复制型 REV 基因组约为 9.0 kb, 可于多种禽体内复制, 实验室内主要在鸡胚、火鸡胚、鸭胚及鹌鹑胚的成纤维细胞内增殖, 有的毒株在鸭胚和火鸡胚成纤维细胞形成合胞体细胞病变, 其复制过程与其他反转录病毒相似。不完全复制型 T 株基因组约有 5.7 kb, 主要是由于 gag-pol 区基因的大段缺失和 env 区部分缺失所致, 其 env 区含有 1 个 0.8 kb~0.9 kb 具有转化作用的替代片段——V-rel 基因, 该基因是主要的致病基因, 与 T 株的急性致癌作用有关。不完全 T 株病毒的复制需要一个辅助病毒即完全 T 株(REV-A)。因为不完全 T 株丢失, 只有 REV-A 继续复制, 所以在细胞培养过程中, 3 代以后会丧失致癌作用。REV 含有 RNA 指导的 DNA 聚合酶(Mn²⁺ 激活

酶), 此外, 还有多种多肽成分。从感染鸡组织或细胞培养物的液体中可以获得不含宿主细胞的 REV, 在 -70 ℃ 长期保存其活力不变^[3,7], 4 ℃ 时相对稳定, 37 ℃ 下 20 min 其感染性丧失 50%, 1 h 活力减少 99%。REV 对乙醚敏感, 不耐酸, 5% 氯仿可将其灭活。表面糖蛋白可被蛋白水解酶部分破坏, 在 pH < 5.6 或 pH > 6.5 时快速失活, 但对紫外线有较强的抵抗力。

2 REV 引起免疫抑制的机制

REV 感染后禽生长迟缓, 淘汰率和死亡率升高^[8]; 引起感染鸡的免疫抑制, 干扰其他禽病疫苗的免疫效果, 导致免疫失败。REV 的自然宿主有鸡、火鸡、鸭、鹅、日本鹌鹑等, 其中火鸡最易感染。鸡和火鸡也是最常用的实验动物。REV 一般感染小日龄雏鸡^[9], 特别是胚胎及新孵出的雏鸡, 感染后引起严重的免疫抑制或免疫耐受。而较大日龄鸡, 由于免疫机能发育较完善, 感染后不呈现病毒血症。

免疫抑制是指由于各种因素作用, 使机体对抗原的应答能力低下, 甚至丧失的现象。REV 感染引起法氏囊等免疫器官组织萎缩, T、B 细胞的分化、成熟受阻, 白细胞介素 2(interleukin-2, IL-2) 以及干扰素(interferon, IFN) 等多种细胞因子分泌减少, 从而导致 REV 感染家禽发生免疫抑制^[10]。

REV 引起免疫抑制的机制较为复杂, 淋巴细胞或网状内皮细胞为 REV 的靶细胞, 家禽感染 REV 后, V-rel 致癌基因能引起 B 淋巴细胞转化成肿瘤细胞(B 淋巴细胞瘤), 从而使 B 细胞分化、成熟受阻(陆承平等, 2002 年), 体液免疫功能受抑制; 辅助性 T 细胞亚群数量急剧下降, IL-2 及 IFN 等重要细胞因子分泌减少, 从而导致免疫功能障碍。阿合买提·买买提等(2001 年)研究发现, 1 日龄 SPF 雏鸡感染 REV 后, 体液免疫中枢器官法氏囊和外周免疫器官脾脏的 IgG⁺、IgM⁺ 和 IgA⁺ 生成细胞数量明显减少, 表明 REV 感染可导致感染雏鸡免疫器官功能抑制, 使其特异性抗病能力降低。REV 感染可使 IL-2 生物合成和分泌减少^[11]。Hrdlickova 等研究发现, REV-T 株感染转化的脾细胞, 因致癌基因 V-rel 的作用, 使发生转化的细胞膜上表达过量的 IL-2 受体(interleukin-2 receptor, IL-2R)。完全复制型 REV 通过病毒剪切和变异的基因序列插入到宿主细胞原癌基因 c-myc 中, 激活 c-myc, 在病毒 3' 端长末端重复序列(long terminal repeat, LTR) 的指导下致癌, 并且 c-myc 也能促进细胞膜表面 IL-2R 的表达。因此, 发生转化的瘤变细胞膜上 IL-2R 结合性地降低 IL-2 的水平, 使 IL-2 大大减少, 造成严重的免疫功能障碍。IL-2 含量减少会影响 T 细胞正常生长、分化和增殖及分泌各种具有免疫促进作用的细胞因子, 如 T 细胞分化成 Th 和 CTL 等具有不

同功能的效应细胞,影响主要参与非特异性免疫反应和辅助特异性免疫应答而具有多种功能的单核巨噬细胞、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK 细胞)及淋巴因子活化杀伤细胞(lymphokine-activated killer cells, LAK)等杀伤细胞的激活和增殖^[12]。在细胞免疫中发挥重要作用的 T 细胞包括 CD4 和 CD8 两大亚类。CD8⁺ 细胞通过释放穿孔素和颗粒酶特异性杀伤靶细胞,发挥细胞毒效应。REV 感染造成鸡群的细胞免疫抑制^[13], T 细胞数量减少使机体免疫抑制加重;同时严重抑制 B 淋巴细胞分化成为抗体分泌细胞,即浆细胞,导致雏鸡的抗肿瘤特异性细胞免疫和体液免疫功能以及非特异性免疫功能均明显降低,从而使感染雏鸡对其他疫苗的免疫应答降低,容易发生条件性病原体感染。NK 细胞具有重要的非特异性杀肿瘤细胞的能力。病毒感染可诱导 IFN 的生物合成,使 NK 细胞活性明显增加。但接种 REV-T 转化细胞的鸡,其 NK 细胞活性受到严重抑制,对肿瘤细胞的杀伤能力降低。李广兴等^[12]研究发现,SPF 雏鸡感染 REV 后 49 d,脾脏淋巴细胞分泌 IFN 明显减少。其发生的可能机制是:①与 REV 感染后机体内 T 细胞数量减少和功能降低密切相关。REV 感染 SPF 雏鸡后,各免疫组织器官,如胸腺、脾脏、盲肠扁桃体和哈德氏腺等的淋巴细胞数量明显减少;胸腺和脾脏 T 淋巴细胞增殖反应明显降低,功能受到抑制。②T 细胞缺乏足够量的 IL-2 刺激而导致 IFN 分泌不足。总之,REV 感染 SPF 雏鸡后脾脏 T 细胞分泌 IFN 减少,不仅降低了机体的抗病毒能力,而且还会引起机体细胞免疫和体液免疫应答水平降低,尤其是抗细菌与病毒感染的能力和对肿瘤细胞的杀伤功能减退。

REV 感染雏鸡外周血液、脾脏淋巴细胞对有丝分裂(如植物血凝素、脂多糖)的增殖反应降低。这种抑制作用可由感染鸡脾脏中抑制性 T 细胞,通过病毒表面胰蛋白酶敏感蛋白传递给对照鸡脾细胞,从而使正常鸡脾细胞失去分裂功能,并且对抵抗 REV 肿瘤细胞的细胞毒活性产生明显抑制作用。此抑制作用因毒株和感染剂量的不同而异^[14],如鸡感染完全复制型的 REV-T 株其抑制作用可持续 10 周~19 周,而感染鸡合胞体病毒株后其抑制作用呈现一过性。REV 感染鸡对 MDV、鸡新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)、绵羊红细胞和流布布鲁菌的应答功能下降,初次应答受到的影响较二次严重。在感染 REV 的同一病鸡的不同组织中,病毒含量不同。一般情况下 REV 在体内的含量,胸腺中的检出率明显高于脾脏和肝脏,说明胸腺含毒量最高^[15]。REV 感染雏鸡对同种异体移植的排斥反应产生抑制,使排斥反应延迟 6 d~14 d^[16]。REV 感染鸡产生的免疫抑制,抵抗力降低,从而对

其他病原,如鸡痘病毒、传染性支气管炎病毒、柔嫩艾美耳球虫和鼠伤寒沙门菌等的易感性增高。

3 REV 与其他病毒的相互关系

免疫抑制性病毒的双重及多重感染具有普遍性。单一的免疫抑制性病毒感染,通常临床症状不明显,对免疫抑制也较轻;但当两种或两种以上病毒同时或先后感染某一个体时,则会相应增强各自的致病性,加重免疫抑制状态(金文杰等,2001 年)。

REV 本身对禽的致死力不明显,但由于 REV 能使法氏囊等免疫器官组织萎缩,其致病基因 V-rel 能引起 B 淋巴细胞转化为肿瘤细胞,损害动物的免疫系统,使机体的抵抗力下降,从而易遭受其他病原的侵袭。当多种病毒持续感染同一鸡时,病毒相互发生作用^[17],加重病情。REV 隐性感染比临床感染更为普遍,REV 易与其他病毒,尤其是 J 亚群白血病病毒(Avian leukosis virus-J, ALV-J)发生混合感染。动态病理学研究表明^[18],REV 感染主要引起骨髓网状细胞及淋巴样细胞性弥漫性或局灶状浸润,ALV-J 感染主要引起骨髓髓系细胞灶状或弥漫性显著增生,混合感染时骨髓病变与 REV 感染基本一致,但程度较严重,并可见有 ALV-J 感染的特征性病变。各病毒感染组免疫器官均发生了严重的实质萎缩性变化,病变以混合感染组最重,REV 组次之^[19]。

ALV-J 感染组的某些组织器官中可见酸性粒细胞样瘤细胞浸润,REV 组见网状细胞及淋巴细胞样瘤细胞浸润增生,而混合感染组可见上述两种瘤细胞均增生。从混合感染组的病变来看,在致病性上 ALV-J 与 REV 之间的确存在明显的协同促进作用,导致机体的免疫抑制加重。有研究表明^[20],蛋鸡中发现 ALV-J 与 REV 混合感染提示,病毒在环境选择压力及免疫选择压力的作用下,其生物特性、致病作用以及宿主范围均可发生改变。蛋鸡中不但存在 REV 感染,而且与其他病毒的混合感染可能是将来的流行趋势,并且这种感染引起的发病情况要比单一病毒感染更为严重^[10]。

4 结语

综上所述,禽感染 REV 后,无论细胞免疫,还是体液免疫机能均受到明显抑制,从而降低了机体对其他病原感染的抵抗力,增加了继发感染机会,并且使感染后的病变加重;同时,也是造成多种疫苗免疫失败的主要原因之一。因此,必须建立科学有效的检测手段,加强检疫,防止污染其他疫苗,同时开发和研制新的有效的疫苗来预防 REV 感染,以保证养禽业的健康发展是该项研究的重要任务和奋斗目标之一。

参考文献:

- [1] Payne L N. Retrovirus-induced disease in poultry[J]. Poul

- Sci, 1998, 77(8): 1204-1212.
- [2] 张 志, 王锡乐, 庄国庆, 等. 用单抗介导的免疫荧光试验检测组织切片中的禽网状内皮组织增生病毒[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(3): 122-124.
- [3] 姜世金, 孟珊珊, 崔治中, 等. 我国自然发病鸡群中 MDV、REV 和 CAV 共感染的检测[J]. 中国病毒学, 2005, 20(4): 164-167.
- [4] Witter R L, Fadly A M. Reticuloendotheliosis [A]. Saif Y M. Diseases of Poultry [C]. 11th ed. USA: Iowa State University, 2003: 517-535
- [5] Saif Y M. Diseases of Poultry [M]. 11th edition, Iowa State University, Ames, USA. 2003.
- [6] 葛兆宏, 陆广富. 禽网状内皮组织增生病毒 PCR 及 RT-PCR 检测方法的研究和 p30 主要抗原域的原核表达[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(4): 441-445.
- [7] 宁章勇, 于书敏, 刘文菊, 等. 禽网状内皮组织增生病研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31(2): 31-32.
- [8] 王锡乐, 张 志, 姜世金, 等. 昆虫细胞表达的网状内皮组织增生病毒囊膜糖蛋白及其免疫性[J]. 微生物学报, 2005, 45(4): 593-597.
- [9] Moore K M, Davis J R, Sato T, et al. Reticuloendotheliosis virus (REV) long terminal repeats incorporated in the genomes of commercial fowl poxvirus vaccines and pigeon poxviruses without indication of the presence of infections REV[J]. Avian Dis, 2000, 44: 827-841.
- [10] Kim Y, Brown T P, Pantin-Jackwood M J. The effects of cyclophosphamide treatment on the pathogenesis of subgroup J avian leukosis virus (ALV-J) infection in broiler chickens with Marek's disease virus exposure [J]. J Vet Sci, 2004, 5(1): 49-58.
- [11] 吴永平, 崔治中. 鸡胚中人工感染网状内皮增殖病病毒的检测[J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26(1): 54-56.
- [12] 李广兴, 刘忠贵. SPF 雏鸡感染网状内皮组织增殖病病毒后细胞因子诱生活性的动态变化[J]. 动物医学进展, 1999, 20(3): 50-54.
- [13] 郭慧君, 崔治中, 孙淑红, 等. 不同感染量 REV 对鸡免疫反应和细胞毒性作用的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(9): 893-898.
- [14] 孙淑红, 崔治中, 邱玉玉. 网状内皮增生病毒感染 SPF 鸡对疫苗免疫反应的抑制作用[J]. 中国病毒学, 2006, 21(1): 34-37.
- [15] 赵文明, 丁家波, 崔治中. 不同方法对网状内皮组织增殖病病毒的检测[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(3): 133-135.
- [16] 司振书. 病毒感染引发的鸡群免疫抑制[J]. 动物科学与动物医学, 2004, 21(6): 50-51.
- [17] Singh P, Schnitzlein W M, Tripathy D N. Reticuloendotheliosis virus sequences within the genomes of field strains of fowlpox virus display variability[J]. Journal of Virology, 2003, 77(10): 5855-5862.
- [18] 刘思当, 商营利, 赵德明. 鸡 J 亚群白血病病毒与网状内皮增殖病病毒混合感染发病机理的研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2005, 36(2): 225-231.
- [19] James S, Guy H, Barnes J, et al. Partial characterization of an Adenovirus-like virus isolated from broiler chickens with transmissible viral proventriculitis[J]. Avian Disease, 2005, 49: 344-351.
- [20] 成子强, 张玲娟, 刘 杰, 等. 蛋鸡中发现 J 亚群白血病与网状内皮增生症自然混合感染[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(6): 586-589.

The Immunosuppression and Molecular Biological Characteristics of Avian reticuloendotheliosis virus

MA Chun-xia, ZHENG Shi-min

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

Abstract: Reticuloendotheliosis virus is a kind of bird species C type retrovirus, which belongs to retroviridae. And it is the next category correlated with mouse type C oncovirus. REV is one of the most important infectious pathogens in poultry industry. REV can cause immune suppression and chronic tumour development in chicken. Controlling this virus will bring great effect on healthy development of poultry industry and elevation of avian biologic product. The paper reviewed research progress on the mechanism of immunosuppression and molecular biological characteristics of avian REV.

Key words: reticuloendotheliosis; biological characteristics; immunosuppression