

禽网状内皮组织增生病毒感染 SPF 鸡对脾细胞中产生 IFN- γ 的影响 *

郑玉姝,赵宏坤,崔治中 **

(山东农业大学动物科技学院,泰安 271018)

摘要:用网状内皮组织增生病毒(Reticuloendotheliosis virus, REV)感染 SPF 鸡造成免疫抑制状态,用双抗体夹心 ELISA 对鸡脾淋巴细胞 γ -干扰素(IFN- γ)的分泌量进行了测定。结果显示,SPF 雏鸡接种 REV 后,除呈现生长缓慢症状外,并出现了中枢免疫器官严重萎缩等免疫抑制状态的典型表现。IFN- γ ELISA 显示,REV 感染后 7 d (7 dpi),脾淋巴细胞 IFN- γ 的分泌量显著升高,与对照组相比差异极显著,至 15 dpi,IFN- γ 水平最高,以后逐渐下降,但至 50 dpi 仍显著高于对照鸡。这是 REV 感染鸡后对 IFN- γ 影响的首次直接定量研究。

关键词:禽网状内皮组织增生病毒; γ -干扰素;酶标法

中图分类号: S185 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-1304(2007)01-0112-03

Effects of Reticuloendotheliosis virus Infection on IFN- γ Production in the Splenocytes of SPF Chickens

ZHENG Yu-shu, ZHAO Hong-kun, CUI Zhi-zhong**

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: To study the influence of Reticuloendotheliosis virus (REV) infection on interferon- γ (IFN- γ) production, IFN- γ levels in spleen lymphocyte cultures were measured by ELISA and compared between REV-infected birds and control SPF birds. The results showed that there was no change in IFN- γ levels 3 days after infection when compared to the control. IFN- γ levels in spleen cell culture dramatically increased 7 days after infections and then gradually decreased but still significantly higher than that of the controls at days 15, 28 and 50 respectively. At the same time, body weights and the ratios of bursa or thymus to body weights in REV-infected chickens were significantly lower than the controls, indicating the severe atrophy of central immune organs. This is the first report of influence of REV-infection on IFN- γ production in SPF chickens by quantitative ELISA measurement.

Key words: Reticuloendotheliosis virus; IFN- γ ; ELISA

网状内皮组织增生病毒(REV)是一种禽类反转录病毒,可引起鸡及多种鸟类的生长迟缓、肿瘤或免疫抑制等一系列综合症(Witter et al., 2003)。REV 感染后可导致体液和细胞介导免疫应答的严重抑制,已有很多报道(崔治中等, 2000; Merkle et al., 1992; Walker et al., 1983; Keffe et al., 2005),但迄今尚未对其机理进行全面深入地研究。随着禽类免疫学的发展,特别是禽类细胞因子的克隆及新的试验方法的应用,为免疫抑制性因子的研究提供了可能(刘秀梵, 1998; Yun et al., 2000)。Markowski-Grimsrud 和 Schat(2003)用 RT-PCR 检测发现,感染 REV 的 9~10 或 30 日龄鸡产生的 IFN- γ mRNA 水平增长了 10 倍。但在蛋白水平上对 REV 感染鸡 IFN- γ 的定量检测尚属空白。因此,本实验用 REV 感染

SPF 雏鸡,并采用双抗体夹心 ELISA 对鸡脾淋巴细胞培养上清中的 IFN- γ 进行了定量检测和比较,探讨了 REV 感染对 IFN- γ 分泌量与免疫抑制的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 1 日龄 SPF 鸡,购自济南 SPAFS 公司。饲养于正压隔离罩内。

1.1.2 病毒 SNV 株,为经典鸭源 SNV 株前病毒全基因组 cDNA 的感染性克隆质粒 pPB101 转染而来(吉荣等, 2005)。SNV 在 SPF 成纤维细胞(CEF)上进行病毒含量测定。

1.1.3 ELISA 试剂盒 Biosource 公司产品 (Catalog No. CAC1233),其中包括包被抗体(鼠抗鸡

* 基金项目:国家自然科学基金重点项目(No.30330450)资助。

** 通讯作者。Author for correspondence. 教授,博士,主要从事畜禽传染病及动物分子病毒学研究。E-mail: <zzcui@sdau.edu.cn>.

收稿日期:2006-03-23 接受日期:2006-04-29

IFN- γ mAb)、检测抗体(生物素标记的鼠抗鸡 IFN- γ mAb)、鸡 IFN- γ 标准品和 HRP 标记的链霉亲和素。四甲基联苯胺(TMB)购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验设计 100 只 1 日龄 SPF 鸡, 饲养至 5 日龄, 随机分为 2 组。1 组腹腔内接种 SNV 株 0.2 mL, 相当于 104 TCID₅₀(半数组织培养感染量)/只; 另 1 组不接种作为阴性对照。2 组鸡隔离饲养, 观察接种鸡的发病和死亡情况。于感染后 3、7、15、28 和 50 d(dpi) 每组随机取 6 只鸡称重, 心脏采血处死后, 取胸腺、法氏囊称重。无菌取脾脏进行 IFN- γ 含量的测定。

1.2.2 IFN- γ 的 ELISA 检测 无菌研磨脾脏, 用 Hank's 平衡盐缓冲液(HBSS)重悬细胞置于淋巴细胞分离液上, 离心分离淋巴细胞, 用 HBSS 洗 2 次后, 将细胞重悬于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中。经台盼蓝染色确定细胞存活率达 95% 以上, 将脾淋巴细胞按 3×10^6 /mL 接入 24 孔板, 于 41 °C, 5% CO₂ 的培养箱中孵育 12、24、36、48、60 和 72 h, 收集细胞培养上清按试剂合说明书进行 ELISA, 简述如下: 取 96 孔板每孔加入 100 μ L 包被液(含 2 μ g/mL 包被抗体)于 4 °C 温育过夜, 吸弃液体, 然后用 PBS-1% BSA 室温封闭 2 h。用 PBST 洗板 3 次后, 加入标准液、对照及上述培养上清 100 μ L/孔, 再加入生物素标记的鼠抗鸡 IFN- γ mAb (试剂合提供, 见 1.1.3), 室温 700 r/min 温育。洗 3 次后加入 HRP 标记的链霉亲和素(1:2500)室温温育 30 min, 洗后加 TMB 显色。用 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应。在 450 nm 读取吸光度值, 建立标准曲线, 计算样品浓度。

1.2.3 统计学分析 采用 SPSS 软件进行统计分析。

2 结果和分析

2.1 人工感染 REV 后鸡的死亡情况

SPF 鸡 5 日龄接种 REV 后, 鸡只生长迟缓, 体重降低, 15 dpi 时与对照鸡相比差异极显著 ($P < 0.001$)(表 1)。自接种后 3 d 开始发生零星死亡, 至 50 d 本实验结束止死亡率达 18%。而对照鸡生长良好, 无 1 只死亡。

2.2 人工感染 REV 的 SPF 鸡中枢免疫器官的变化

鸡接种 REV 后 3、7、15、28 和 50 d, 每组分别取 6 只鸡剖检, 15 dpi 可见法氏囊和胸腺这 2 个中枢免疫器官明显萎缩, 与对照组相比差异极显著 ($P < 0.001$)(表 1)。计算法氏囊和胸腺的免疫指数: 法氏囊重量/体重, 胸腺重量/体重, 并对感染组和对照组的

的法氏囊和胸腺的免疫指数进行比较, 结果感染组极显著低于对照组。REV 感染 SPF 鸡后造成了中枢免疫器官的明显抑制。

表 1 REV 感染对增重与免疫器官的影响(感染后 15 d)

Table 1 Influence of REV-infection on body weight, thymus and bursa of Fabricius(n = 6) (15 days after infection)

组别 Group	体重/g Body weight	器官/体重 organ/body weight ($\bar{X} \pm SD$)	
		氏囊/g Bursa of Fabricius	胸腺/g Thymus
Control	186.20 \pm 16.78	0.446 \pm 0.037	0.563 \pm 0.117
REV	131.53 \pm 21.73*	0.215 \pm 0.069*	0.211 \pm 0.107*

* $P < 0.01$

2.3 脾淋巴细胞培养上清中 IFN- γ 产生动态

REV 感染后 4 d, 将鸡心脏采血处死后, 无菌取脾脏制备脾淋巴细胞, 收集培养了 12、24、36、48、60 和 72 h 的 REV 感染鸡脾淋巴细胞培养液上清, 进行 IFN- γ 双抗体夹心 ELISA 检测。如图 1 所示, 脾淋巴细胞培养液上清中 IFN- γ 水平逐渐升高, 至培养 60 h 达到最高, 以后逐渐下降。

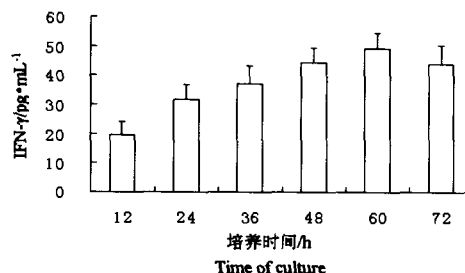


图 1. REV 感染鸡(4 dpi)IFN- γ 检测时间的优化

Fig.1. The optimum time for measurement of IFN- γ in chickens infected with REV

2.4 SPF 鸡感染 REV 后不同时期脾淋巴细胞 IFN- γ 产量的变化动态

收集培养 60 h 的脾淋巴细胞培养液上清进行 IFN- γ 含量测定。如图 2 所示, SPF 鸡脾淋巴细胞培养上清中 IFN- γ 水平在 REV 感染后 3 d 变化不大 ($P > 0.05$), 但在 7 dpi 急剧升高, 增加了 4~5 倍, 形成一个峰值。以后逐渐下降, 至 28 dpi, IFN- γ 的分泌水平仍相当于对照鸡的 3 倍。在 7~28 dpi, REV 感染鸡 IFN- γ 的分泌水平与对照鸡相比差异极显著 ($P < 0.01$)。至 50 dpi 实验结束止, 感染鸡的 IFN- γ 分泌水平仍显著高于对照鸡 ($P < 0.05$)。在整个试验过程中, 对照鸡脾淋巴细胞培养上清中 IFN- γ 的水平变化不明显, 基本维持在一个水平上 ($P > 0.05$)。

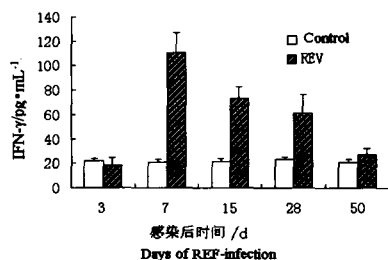


图2 REV 感染对鸡脾淋巴细胞中 IFN- γ 产生的影响

Fig.2. Effects of REV-infection on IFN- γ production in chicken spleen lymphocytes

3 讨论

REV 感染可造成胸腺、法氏囊萎缩;不断地零星死亡;对 ND(新城疫)和禽流感疫苗抗体反应显著降低等一系列免疫抑制的症状。REV 造成的免疫抑制往往增加了其它病原的感染机会,REV 与其它病毒共感染越来越普遍,成为目前养禽业比较棘手的问题。为了更好地控制该病,需要了解该病的发病机理、免疫抑制的机制。目前,对 REV 造成的免疫抑制的机理研究的还不多。本研究以 REV 造成的免疫抑制为模型,对 IFN- γ 在免疫抑制中的作用进行了探讨。用 REV 感染 5 日龄 SPF 鸡,从 7 dpi 到 28 dpi,脾淋巴细胞培养上清中 IFN- γ 的水平增长了 3~5 倍,与对照鸡相比差异极显著。在 15~28 dpi,SPF 鸡体重、法氏囊和胸腺免疫指数均降低,与对照鸡相比差异极显著。但在 REV 感染组的不同个体间,鸡脾

淋巴细胞培养上清中 IFN- γ 的水平与同期的免疫器官指数进行相关性分析,还没有显示出明显的相关性。这可能与二者都有很大的个体差异性有关,或者与 IFN- γ 水平及免疫器官指数的动态不同步有关。在这方面,还有待进一步的研究。

IFN- γ 是一种免疫调节的多效性因子,哺乳动物和禽 IFN- γ 被用作感染机体细胞介导免疫的指示器(Ottenhoff et al.,1995)。病毒感染可直接损害免疫系统的细胞,同时也可影响 IFN- γ 产生细胞,如 T 淋巴细胞,细胞感染后产生 IFN- γ 。但 REV 诱生 IFN- γ 与免疫抑制的关系尚不明确。有研究表明,IFN- γ 对细胞增殖有双相作用,即抑制和刺激细胞增殖的作用,但以抑制细胞生长活性为主(Asao et al.,2000)。这可能是新生动物注射 IFN 后生长缓慢的一个主要原因。本研究中 REV 感染后 IFN- γ 分泌的高峰期时检测到了法氏囊和胸腺的显著萎缩,因此,检测 IFN- γ 的分泌水平可以作为监测 REV 造成免疫抑制的一个重要指标。

Markowski-Grimsrud 和 Schat(2003)用 RT-PCR 方法对 REV-CS 株感染鸡的 IFN- γ mRNA 水平进行了检测,9~10 日龄或 30 日龄的鸡的 IFN- γ mRNA 与对照相比增长了 10 倍。本研究采用 ELISA 方法从蛋白水平上对 SNV 株感染鸡的 IFN- γ 进行了直接的定量,在感染后 7~28 dpi 检测到了相当高的 IFN- γ 。这说明 REV 是一个 IFN- γ 的强诱生剂(Dimier-Poisson et al.,2003)。

参 考 文 献

- Asao H and Tu X Y. Interferon-gamma has dual potentials in inhibitor or promoting cell proliferation(J). *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275:867.
- Cui Z Z(崔治中), Du Y(杜岩), Zhao W M(赵文明), Ji R(吉荣) and Chai J Q(柴家前). Immunosuppression of chicken flocks induced by Reticuloendotheliosis virus (J). *Chinese Journal of Veterinary Medicine* (中国兽药杂志), 2000, 34:1~3(in Chinese)
- Dimier-Poisson I H, Bout D T and Quere P. Chicken primary enterocytes: inhibition of *Eimeria tenella* replication after activation with crude interferon-gamma supernatants (J). *Avian Diseases*, 2004, 48: 617~624
- Ji R(吉荣), Cui Z Z(崔治中), Wang X L(王锡乐) and Sun S H(孙淑红). Infectious clone of avian Reticuloendotheliosis virus and its provirus genomic sequence(J). *Chinese Journal of Virology*(病毒学报), 2005, 21: 448~455 (in Chinese with English abstract)
- Keeffe M, Grumont R J, Hochrein H, Fuchsberger M, Gugasyan R, Vremec D, Shortman K and Gerondakis S. Distinct roles for the NF-kappaB1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and survival of plasmacytoid and conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals (J). *Blood*, 2005, 106:3457~3464
- Liu X F (刘秀梵). Immunosuppressive virus disease and its effect on the control of avian diseases(J). *China Poultry* (中国家禽), 1998, 20:1~3(in Chinese)
- Markowski-Grimsrud C J and Schat K A. Infection with chicken anaemia virus impairs the generation of pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes (J). *Immunology*, 2003, 109 (2): 283~294
- Merkle H, Cihak J and Losch U. The cytotoxic T lymphocyte response in Reticuloendotheliosis virus-infected chickens is mediated by alpha beta and not by gamma delta T cells(J). *Immunobiology*, 1992, 186:292~303
- Ottenhoff T H and Mutis T. Role of cytotoxic cells in the protective immunity against and immunopathology of intracellular infections (J). *European Journal of Clinical Investigation*, 1995, 25:371~377
- Walker M H, Rup B J, Rubin A S and Bose H R Jr. Specificity in the immunosuppression induced by avian Reticuloendotheliosis virus(J). *Infection and Immunity*, 1983, 40:225~235
- Witter R L, Fadly A M and Saif Y M. Disease of Poultry(M). Ames: Iowa State Press, 2003, 517~536
- Yun C H, Lillehoj H S and Choi K D. Chicken IFN- γ monoclonal antibodies and their application in enzyme-linked immunosorbent assay (J). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2000, 73: 297~308