

金明兰,侯继波,郑其升,等.兔出血症病毒在豚鼠体内分布及细胞免疫试验[J].江苏农业科学,2013,41(5):180-182.

兔出血症病毒在豚鼠体内分布及细胞免疫试验

金明兰^{1,2,3},侯继波²,郑其升²,鲁会军³,任静强³,刘春霞³,南文龙³,胡乐鹏³,金宁一³

(1. 吉林建筑工程学院水污染控制与资源化利用重点实验室,吉林长春 130118; 2. 国家兽医生物制品工程研究中心,江苏南京 210014; 3. 军事医学科学院军事兽医研究所,吉林长春 130062)

摘要:应用纯化兔出血症病毒(RHDV)接种豚鼠,4 d 后剖杀,分离组织,通过电镜观察、血凝试验(HA)、RT-PCR 等方法检测病毒在体内分布情况;应用纯化 RHDV 间隔 2 周接种豚鼠,3 次免疫后 10 d,分离外周血淋巴细胞进行 IFN- γ 、IL-2、IL-4、WST 检测。结果表明:电镜观察未见病毒粒子;HA 检测结果为肝脏 HA 效价最高,肺脏效价最低;RT-PCR 方法未检测到 RHDV 目的基因;WST 检测发现免疫组刺激指数高于对照;免疫组 IFN- γ 、IL-2 检测结果高于对照,IL-4 检测结果低于对照。RHDV 在豚鼠部分组织具有血凝性,电镜未见病毒粒子,能使豚鼠产生细胞免疫反应,本研究为筛选鉴定“通用型”T 细胞表位奠定基础。

关键词: RHDV; VP60; 豚鼠; 细胞; 免疫; IFN- γ ; IL-2; IL-4

中图分类号: S852.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)05-0180-03

兔病毒性出血症(rabbit hemorrhagic disease, RHD)是由兔出血症病毒(rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV)引起的一种高度接触传染性、急性、致死性传染病^[1]。由于尚未建立 RHDV 在体外组织细胞的培养方法,所以目前广泛使用组织灭活疫苗采取皮下或肌肉注射接种,具有良好的免疫效果,在接种后 6~8 d 产生 HI 抗体,接种后 16~18 d HI 抗体滴度可达 2¹¹ 以上,免疫期可达 1 年以上^[2]。基于 RHDV 较强的免疫力,推测 RHDV 可能产生较强的细胞免疫反应。因此,将 RHDV 接种多种属动物,通过检测体内分布和细胞免疫反应,可探索 RHDV 的免疫多种属动物“通用型”T 细胞表位。RHD 的传染性极强,发病率、病死率高。自发现该病以来,国内外学者对其进行了广泛深入的研究。金明兰等利用多种方法检测了 RHDV 在兔体内各组织器官的病毒分布^[3]; Oem 等报道,提纯的 RHDV 可导致体外 50% 肝细胞病变^[4]。国内学者应用 RHDV 制备了抗体,王治方等研制了抗兔瘟精制卵黄抗体,保护率达 80% 以上^[5];王孝友等研制了抗兔瘟精制卵黄抗体,保护率达 90% 以上^[6];蒋长苗等开展了猪源抗兔瘟高免血清的研制与应用^[7]。但国内外还未见关于检测 RHDV 细胞免疫水平的研究,目前尚不明确 RHDV 在多种属试验动物体内是否进行复制以及产生细胞免疫反应。RHDV 的核酸为单链正义 RNA,全长 7 437 个核苷酸,5'末端没有帽状结构,有 2 个开放读码框(ORF),除基因组 RNA 外,在感染组织和病毒颗粒中还有 1 个约 2.4 kb 的亚基因组 RNA,该 RNA 包含了 VP60 蛋白的编码区及 ORF2^[8]。VP60 是 RHDV 的唯一结构蛋白,以 VP60 设计引物,利用 RT-PCR 方法可检测 RHDV。RT-PCR 方法具有较好的稳定性、敏感

性、特异性,检测效率较高,已成为检测 RHDV 的首选方法。本研究以豚鼠为对象,接种 RHDV,应用电镜观察、HA、RT-PCR、WST、IL-2、IL-4 等方法进行体内分布和细胞免疫试验,旨在为了解 RHDV 在豚鼠体内细胞免疫水平及其扩增提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株、试剂、试验动物 RHDV、RHDV 阳性血清和阴性血清来源于江苏省农业科学院兽医研究所。LA Taq DNA 聚合酶、逆转录酶、RNA 酶及各种限制性内切酶、RNA 提取试剂盒 TRIzol Reagent、Con A、完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂购自 Sigma 公司;IL-2、IL-4、IFN- γ 检测试剂盒购自美国 BD 公司;豚鼠淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品有限责任公司;WST 淋巴细胞转染试剂盒购自碧云天生物科技公司;人“O”型红细胞由吉林省长春市血站提供。供试豚鼠由吉林生物制品研究所实验动物中心提供,在隔离器内饲养。

1.2 方法

1.2.1 试验动物免疫 供试豚鼠 40 只,随机平均分为 2 组,接种 RHDV HA 28 和生理盐水 1 mL,每日临床观察,于接种后 4 d 剖杀,无菌条件采集心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏等组织,研磨后反复冻融 3 次,经 3 000 r/min 离心 20 min,收取上清液,进行电镜观察、HA、RT-PCR 检测。

供试豚鼠 40 只,随机平均分为 2 组,依次接种 1 mL RHDV HA 28。将弗氏完全佐剂与纯化病毒等量混合后进行第 1 次免疫;间隔 2 周后,将弗氏不完全佐剂与纯化病毒等量混合后进行第 2 次免疫;间隔 2 周后应用病毒进行第 3 次免疫。对照组应用佐剂与生理盐水等量混合后进行接种。试验均采用肌肉注射。在第 3 次免疫后 10 d 采集抗凝血,分离外周血淋巴细胞进行细胞免疫试验。

1.2.2 血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验 取病毒粗提液,按常规方法^[4]进行 HA 和 HI 试验。

1.2.3 病毒 RNA 的提取及 RT-PCR 检测 取各组织放入

收稿日期:2012-09-06

基金项目:江苏省博士后启动基金(编号:0645)。

作者简介:金明兰(1968—),女,吉林通化人,研究员,研究方向为分子病毒学和环境生物工程。E-mail:jinminglan68@126.com。

通信作者:侯继波,研究员,主要从事生物制品研究。E-mail:houjibo@jaas.ac.cn。

研磨器内迅速研磨,形成匀浆后,依照 Invitrogen 公司产品 TRIZOL LS Reagent 的使用说明书进行。

依照反转录酶 M-MLV 使用说明书进行反转录过程。根据已发表的 RHDV VP60 基因的核苷酸序列设计合成引物。P1:5'-GATAGAGGATCGTACATCCA-3';P2:5'-GCGCTAGTATCTATCACAGA-3'。反应条件:94℃预变性 5 min;94℃ 1 min,52℃ 1 min,72℃ 90 s,15 个循环;94℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 90 s,20 个循环→72℃ 延伸 10 min。取 10 μL PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上检测。

1.2.4 电镜检测 取冻存的粗提病毒液,参照文献[9]方法纯化病毒,用铜网制膜吸附上清液,2% 磷酸钨(PTA)负染 10 min,电镜观察。

1.2.5 分离外周血淋巴细胞 在无抗凝血中加入等体积 Hank'S 液,充分混匀;用吸管将稀释过的抗凝血沿试管壁缓慢、温和地加在等体积细胞分离液液面上;用水平转子离心机以 2 000 r/min 离心 20 min,淋巴细胞将会出现在 2 种液体交界处;尽可能多地收集界面上的细胞,将其加入含有 4 mL Hank'S 液的 10 mL 新离心管中,充分混匀;用水平转子离心机以 1 800 r/min 离心 10 min;弃去上清液,倒置离心管 1 min 使上清流尽,加入 5 mL 无菌 NH₄Cl·Tris 溶液,充分混匀,静置约 10 min;用水平转子离心机以 1 800 r/min 离心 10 min,弃去上清,加入 4 mL Hank'S 液,充分混匀;用水平转子离心机以 1 800 r/min 离心 10 min,弃去上清液,倒置离心管使上清流尽;向沉淀中加入 1 mL 10% RPMI 1640,充分混匀;吸出 5 μL 加入至 45 μL PBS 液中,取 10 μL 加入 10 μL 苔盼兰混匀后进行细胞计数。

1.2.6 T 淋巴细胞增殖试验 应用 WST 法^[10]检测淋巴细胞增殖。分别用纯化的 RHDV 病毒和 ConA 刺激,按照有关说明书操作,在 450 nm 处检测各孔的吸光度(D),取 3 个孔的平均值,计算刺激指数(SI)。

1.2.7 IFN-γ、IL-2、IL-4 检测 SPF 豚鼠经 3 次免疫后 10 d,分离外周血淋巴细胞分别用纯化的 RHDV 病毒和 ConA 刺激,按照有关说明书操作,在 450 nm 处检测各孔的吸光度(D),根据标准品浓度及对应的 D 值计算出标准曲线的回归方程,进而计算出样品浓度。

1.2.8 数据分析 采用 SPSS 11.0 软件分析数据。

2 结果与分析

2.1 HA、电镜、RT-PCR 检测结果

试验动物接种 RHDV 4 d 后,无菌分离心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏等组织,研磨、冻融后进行病毒血凝效价检测。由表 1 可见,所有试验动物的肝脏血凝效价都高于其他组织,以肺脏效价最低。电镜观察结果表明,未见到病毒粒子。RT-PCR 检测结果表明,所有组织中均未见目的基因。

表 1 试验动物 HA 检测结果

| 组别 | HA | | | | |
|----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 心脏 | 肝脏 | 脾脏 | 肺脏 | 肾脏 |
| 免疫 | 2 ⁴ | 2 ⁷ | 2 ⁵ | 2 ¹ | 2 ³ |
| 对照 | 2 ⁰ | 2 ¹ | 2 ⁰ | 2 ⁰ | 2 ¹ |

2.2 外周血 T 淋巴细胞转化检测结果

经 3 次免疫后 10 d,无菌收集外周血,分离淋巴细胞,以不同抗原进行非特异性和特异性刺激,进行脾脏 T 淋巴细胞转化检测。由表 2 可见,当以 ConA、RHDV 刺激时,各免疫组刺激指数显著高于对照($P<0.05$),证明试验动物接种 RHDV 后可以有效提高机体的整体细胞免疫水平。

表 2 T 淋巴细胞增殖动态变化

| 组别 | 不同刺激物的 SI | | |
|----|-----------------|-----------------|---------------|
| | ConA | RHDV | 空白 |
| 免疫 | 1.674 ± 0.027 * | 1.652 ± 0.028 * | 1.331 ± 0.022 |
| 对照 | 1.341 ± 0.021 | 1.412 ± 0.023 | 1.208 ± 0.015 |

注: * 表示与对照差异显著($P<0.05$)。下表同。

2.3 细胞因子检测结果

经 3 次免疫后 10 d,分离淋巴细胞检测细胞因子。由表 3 可见,免疫组的细胞因子显著高于对照,证明接种 RHDV 的试验动物产生了良好的细胞免疫反应。

表 3 细胞因子检测结果(SI)

| 细胞因子 | 组别 | ConA | RHDV | 空白 |
|-------|----|-----------------|-----------------|---------------|
| IL-2 | 免疫 | 1.348 ± 0.018 * | 1.536 ± 0.021 * | 1.134 ± 0.013 |
| | 对照 | 1.114 ± 0.008 | 1.134 ± 0.011 | 1.102 ± 0.009 |
| IL-4 | 免疫 | 1.378 ± 0.022 * | 1.457 ± 0.025 * | 1.141 ± 0.013 |
| | 对照 | 1.213 ± 0.012 | 1.306 ± 0.013 | 1.121 ± 0.009 |
| IFN-γ | 免疫 | 1.516 ± 0.027 * | 1.563 ± 0.028 * | 1.256 ± 0.012 |
| | 对照 | 1.236 ± 0.014 | 1.246 ± 0.012 | 1.228 ± 0.014 |

3 结论与讨论

RHD 是 20 世纪 80 年代发现的一种危害极大的传染病,在世界范围内引起了极大关注。由于 RHDV 难以在各种原代或传代细胞中稳定增殖,也不能在鸡胚上增殖,所以目前使用的组织灭活疫苗均取自人工感染病死兔肝脏,用 0.4% 甲醛灭活,加入适量防腐剂和缓冲试剂制得。但随着组织疫苗成本不断增加,以及潜在散毒、动物福利等问题,使研究人员致力于病毒复制、基因工程疫苗的研制和开发。

RHDV 病毒粒子呈球型,直径为 32~36 nm,为二十面体对称,无囊膜。负染后电镜观察表面具有嵌杯样病毒典型的杯状形态结构。目前,检测 RHDV 的常用方法有电镜观察法、HA、反向间接血凝(IHA)、免疫扩散法、荧光抗体法、酶联免疫吸附法(ELISA)、RT-PCR 法^[11-12],应用电镜观察病毒粒子是简单、快速鉴定病毒的一种方法。本研究应用电镜观察病毒,但结果未见到病毒粒子,原因可能是病毒在多种属动物体内不能复制完整病毒粒子,或者是病毒复制量较少而未能被检测到。HA 具有方便快捷的优点,在临床试验中被广泛应用,根据 HA 试验检测人工接种 RHDV 的多种属试验动物组织,抗原含量从高到低依次为肝脏、脾脏、心脏、肾脏、肺脏,证明 RHDV 是侵害多种组织细胞的泛嗜性病毒,但主要侵害的器官是肝脏,主要靶细胞是肝脏细胞,本研究结果为今后研究提供了宝贵参考资料,但分离的组织是否具有毒性需要更多试验证明。RT-PCR 方法稳定性好、敏感性高、特异性强、时间短、检测效率高,在 RHDV 流行病学调查、产品检疫等方面得到广泛应用。近年来该方法逐渐被应用到

RHDV 检测方面。王芳等研究证实,用血液样本可以检测 RHDV,在攻毒后 24、48、72 h 全血中均可检测出 RHDV,但条带强弱不同,72 h 检出条带较弱与感染病毒后产生的抗体有关^[13]。本研究应用 RT-PCR 方法未能检测到目的基因,表明在分离的组织没有完全复制或复制量较少。迄今兔出血症的动物细胞培养一直是困扰国内外相关领域学者的难题。RHDV 迅速致死成年家兔,幼龄兔反而不易感,其原因尚不明确。RHDV 在幼兔体内不能很好生长,可能是由于幼兔体细胞产生 Di 颗粒,或是幼兔体细胞不能提供 RHDV 生长所需的某种因子^[14]。

T 淋巴细胞是参与细胞免疫反应的主要免疫活性细胞,T 淋巴细胞受到抗原刺激后能够分化、增殖,转化为效应性淋巴细胞。T 淋巴细胞刺激指数的高低、亚群数量、IFN- γ 分泌能力,直接反映了动物机体细胞免疫应答的能力。研究表明,疫苗免疫组均能有效刺激动物产生细胞免疫应答。采用 ConA 刺激时,免疫组刺激指数显著高于对照,说明该组动物整体细胞免疫水平高,引起了机体全面的免疫应答,有效提高了机体细胞免疫功能。本研究应用 WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(WST-1 cell proliferation and cytotoxicity assay kit),进行细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测。WST-1 是一种类似于 MTT 的化合物,在电子耦合试剂存在的情况下,可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的甲臞染料。细胞增殖越多、越快,颜色越深;细胞毒性越大,颜色越浅。研究表明,RHDV 同时与法氏囊疫苗接种豚鼠后可以提高法氏囊疫苗效果,应用鸡作 RHDV 卵黄抗体^[6]。国内学者用 RHDV 油乳剂抗原免疫鸡,可从蛋黄中提取高效价抗体,IgY HI 效价最高为 $15 \log_2$ ^[5];蒋长苗等研制了猪抗 RHD 高免血清,血清 HI 效价达 1:320 以上,对临床发病兔的治愈率达 80%^[7]。以上研究结果证明,RHDV 能够引起很强的豚鼠细胞免疫反应。IFN- γ 也称免疫干扰素,属于 Th1 型细胞因子,是由初始的 TH0、TH1 的 CD4⁺ 辅助性 T 细胞和几乎所有 CD8⁺ 细胞产生,可以特异性地诱导抗病毒状态,直接促进 T、B 淋巴细胞增殖分化、CTL 成熟、B 淋巴细胞分泌抗体。细胞免疫试验表明,RHDV 接种后可以引起接种动物免疫反应,因此可以在动物体内筛选“通用型”细胞表位。

本研究通过离体试验、免疫试验,从细胞免疫、细胞因子表达、组织分布等方面评价了试验动物的细胞免疫效果。结果表明,RHDV 具有较强的细胞免疫作用,可望被开发成新型免疫佐剂。RHDV 接种豚鼠后,分离的肝脏混悬液具有较强

的 HA 性,并能引起较强的细胞免疫反应,因此可以在动物体内进行筛选“通用型”T 细胞表位研究。

参考文献:

- [1]殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1996:525-529.
- [2]刘付敏,彭远义. 兔疫苗的研究应用现状[J]. 兽医导刊,2009(4):36-38.
- [3]金明兰,侯继波,郑其升,等. 兔出血症病毒体内分布和抗体消长规律研究[J]. 江苏农业科学,2010,32(6):31-34.
- [4]Oem J K, Lee K N, Roh I S, et al. Identification and characterization of rabbit hemorrhagic disease virus genetic variants isolated in Korea[J]. J Vet Med Sci,2009,71(11):1519-1523.
- [5]王治方,郭成留,丁爱萍,等. 抗兔瘟精制卵黄抗体的研制[J]. 中国养兔,2007(4):21-23.
- [6]王孝友,徐刚,何洪章,等. 兔病毒性出血症鸡源高免蛋黄抗体的研究与应用[J]. 中国养兔,2004(4):20-22.
- [7]蒋长苗,刘旭光. 猪源抗兔瘟高免血清的研制与应用[J]. 中国养兔杂志,1995(2):25-26.
- [8]Muller A, Freitas J, Silva E, et al. Evolution of rabbit haemorrhagic disease virus(RHDV) in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) from the Iberian Peninsula[J]. Vet Microbiol,2009,135(3/4):368-373.
- [9]Esteves P J, Abrantes J, Carneiro M, et al. Detection of positive selection in the major capsid protein VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus(RHDV)[J]. Virus Res,2008,137(2):253-256.
- [10]王开艳,李太元,鲁会军. H1N1 亚型流感病毒血凝素 Th 和 B 细胞表位预测及抗原性分析[J]. 中国免疫学杂志,2010,26(1):8-12.
- [11]Fouchet D, Le Pendu J, Guitton J S, et al. Evolution of microparasites in spatially and genetically structured host populations:the example of RHDV infecting rabbits[J]. J Theor Biol,2009,257(2):212-227.
- [12]Moss S R, Turner S L, Trout R C, et al. Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus[J]. Journal of General Virology, 2002,83(10):2461-2467.
- [13]王芳,李超美,杨龙圣,等. 兔出血症病毒 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 农业生物技术学报,2007,15(3):409-413.
- [14]金明兰,侯继波,郑其升,等. 兔出血症病毒 JL 株分离鉴定及 VP60 基因主要抗原表位分析[J]. 中国兽医学报,2012,154(6):833-838.