

仇汝龙,范志宇,王芳,等.兔出血症病毒感染机体后炎症因子的检测分析[J].江苏农业科学,2016,44(2):238-241.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.068

兔出血症病毒感染机体后炎症因子的检测分析

仇汝龙,范志宇,王芳,胡波,宋艳华,魏后军,刘星,徐为中,薛家宾

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏南京 210014)

摘要:兔出血症病毒(RHDV)感染成年兔可以诱导兔体内产生强烈的炎症反应,是病毒感染后急性死亡的重要原因之一。为揭示病毒感染机体后体内重要炎症因子的表达情况,采用荧光定量 PCR 方法检测 RHDV 感染后 6、12、24、30、36 h 兔外周血、肝脏和脾脏内病毒增殖情况以及 IL-6、IL-10、TNF- α 和 IFN- γ 炎症因子的表达情况。结果表明,兔出血症病毒拷贝数在外周血、肝脏和脾脏内随着感染时间的变化呈快速上升的趋势。外周血、肝脏和脾脏在病毒感染中,促炎症因子 IL-6 和 TNF- α 表达水平都明显上调。肝脏促炎症因子 IL-6 在 30 h 左右达到最大值,而在外周血和脾脏中则持续上调。抑炎因子 IL-10 随着炎症因子的上调也随之上升,但其表达水平只有较低程度的上调。IFN- γ 相对表达水平在肝脏和脾脏有短暂的上调,在外周血中则持续下调。

关键词:兔出血症病毒;炎症因子;荧光定量 PCR;外周血;脾脏;肝脏

中图分类号: S852.65;S858.291 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0238-03

兔出血症(RHD)是对野兔和家兔具有高度传染性的疾病,其病原是兔出血症病毒(RHDV),属于杯状病毒家族的兔病毒属^[1]。感染兔出血症病毒的成年兔在 48~72 h 内死亡^[2],死亡原因主要为肝脏快速衰竭并伴随强烈的炎症反应。在免疫反应中,调节炎症反应的正是信号通路及细胞因子。

细胞因子是调节性蛋白,在调节免疫反应中的细胞反应阶段有着重要的作用,包括淋巴细胞的激活、增殖、分化、存活和凋亡^[3]。它们是低分子量蛋白,主要是由淋巴细胞、抗原呈递细胞、单核细胞、内皮细胞和纤维细胞等分泌。细胞因子可分为不同的类别,比如白介素、干扰素、肿瘤坏死因子和趋化因子等。细胞因子相互作用,施展极化效应于 T 细胞并且调整免疫反应^[4]。CD4+ 亚群(Th 细胞)根据自身所分泌的细胞因子,分为 Th1 和 Th2 亚群。Th1 细胞分泌 IFN- γ 、淋毒素和 IL-2,可以刺激炎症反应,比如迟发型超敏反应,促进补体的产生和细胞毒性 T 细胞分化。Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5 和 IL-10 等,调节体液免疫反应^[5-6]。多数研究证明宿主感染的程度以 Th1 和 Th2 细胞为基础^[7]。IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IFN- γ 和 TNF- α 等^[8-11]兔细胞因子序列的发表,促使检测兔细胞因子的分子生物学试验的产生。荧光定量 PCR 具有敏感性和结果快速性,可以作为检测细胞因子的方法。本研究通过荧光定量的方法,检测感染 RHDV 兔体内病毒拷贝数和炎症因子的变化,为研究兔

出血症病毒的感染及致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒和试验兔

兔出血症病毒(由江苏省农业科学院兽医研究所保存);新西兰成年白兔 40 只,购自南京金陵种兔场。

1.2 主要试剂和仪器

Trizol RNAiso plus,反转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)和荧光定量试剂 SYBR Premix EX Taq,均购自 Takara 公司。pMD18-T Vector 和大肠杆菌 DH5 α 均购自南京基天生物公司,荧光定量机器 Stepone 7300,人外周血淋巴细胞分离液,购自天津市灏洋生物制品有限责任公司。

1.3 引物

炎症因子 IL-6、IL-10、IFN- γ 和 TNF- α 的检测引物^[12]见表 1,VP60 模板引物及 VP60 检测引物建立标准曲线和检测样品^[13]。引物由 Invitrogen 公司合成。

1.4 试验动物分组和取样

将 40 只新西兰兔分为 5 组,每组 5 只攻毒兔和 3 只对照兔,兔攻毒采用颈部皮下注射 0.5 mL HA 为 2⁸ RHDV 的肝悬液。5 组兔分别在攻毒后 6、12、24、30、36 h 取样后杀死。血液通过心脏采血,采集后立即分离淋巴细胞和血清,肝脏和脾脏则保存于 -70℃ 备用。

1.5 RNA 的提取及反转录

1.5.1 炎症因子 RNA 提取 外周血淋巴细胞、肝脏和脾脏的 RNA 提取采用 Trizol 法。按照 6、12、24、30、36 h 取样,取外周血 3 mL 采用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞后提取 RNA。肝脏和脾脏则称取 0.5 g 匀浆提取 RNA。提取的 RNA 进行反转录。

1.5.2 病毒 RNA 提取 病毒拷贝数的定量,采用外周血清提取 RNA,组织则采用 0.5 g 肝脏和脾脏的匀浆上清液来提取 RNA^[14]。提取的 RNA 进行反转录。

收稿日期:2016-01-20

基金项目:现代农业产业技术体系建设兔体系病毒病预防与控制岗位专项(编号:CARS-44-C-1);公益性行业(农业)科研专项(编号:201303046);江苏省自然科学基金(编号:BK20140740)。

作者简介:仇汝龙(1988—),男,山东济宁人,硕士研究生,助理研究员,主要从事家兔疾病防治与兽医生物技术研究。E-mail:qr8891@163.com。

通信作者:王芳,博士,研究员,主要从事家兔重要疫病致病机制及防控技术的研究。E-mail:rwangfang@126.com。

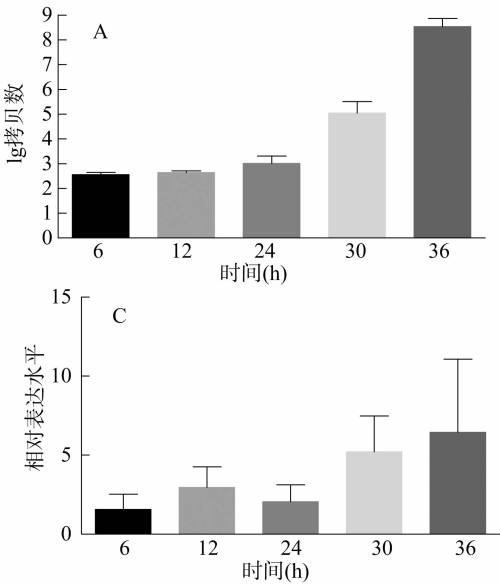
表 1 引物序列

引物名称	正义引物(5'→3')	反义引物(3'→5')
GAPDH	GAATCCACTGGCGTCTTCAC	CGTTGCTGACAATCTTGAGAGA
IL-6	GAAAACACCAGGTCAGCAT	GGCTTTGTAGACGCCTTCCT
IL-10	GAACTCCTGGGGGAAAAC	GGCTTTGTAGACGCCTTCCT
IFN-γ	TTCCCAAGGATAGCAGTGGT	TGAAGCCAGAAGTCCTCAAAA
TNF-α	CTCCTACCCGAACAAGGTCA	CGGTCAACCCTTCTCCAAC
VP60 模板引物	GCAGTTCGCTTCATA	TGGTCAATGTCGGCAAAC
VP60 检测引物	GTTCACACACTGGTCCTTAG	GTGAGGACTGGGGTCGTGAG

1.6 荧光定量 PCR 检测和计算

1.6.1 炎症因子的检测 炎症因子检测的荧光定量体系：SYBR Mix 10 μL, PCR 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL, ROX 0.4 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 6.8 μL。程序：95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 循环 40 次; 熔解曲线默认设置。分析数据：细胞因子数据分析采用 2^{-ΔΔC_T} 方法, 计算相对表达水平。

1.6.2 病毒拷贝数的检测 病毒拷贝数的检测需要进行绝对定量, 定量体系和程序见“1.6.1”节。结果根据标准曲线计算。



2 结果与分析

2.1 外周血淋巴细胞的炎症因子和外周血病毒拷贝数

感染 RHDV 的兔外周血中的病毒拷贝数迅速上升, 导致病毒随血液在兔体内传播 (图 1-A)。炎症因子 IL-6 和 TNF-α 表达水平则持续上升直到 36 h (图 1-B 和图 1-C), 说明炎症反应加剧, 而抗炎因子 IL-10 作为最重要的保护性因子, 在外周血淋巴细胞中并没有检测出其 mRNA 的表达。IFN-γ 在感染病毒的外周血中持续下调 (图 1-D)。

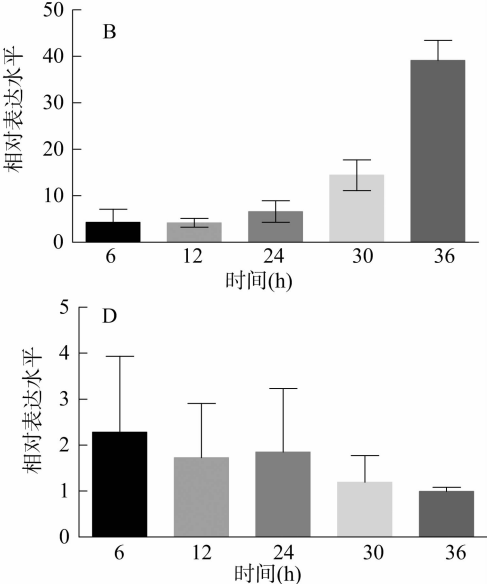


图1 血液病毒拷贝数 (A) 和外周血淋巴细胞炎症因子IL-6 (B)、TNF-α (C)、IFN-γ (D)

2.2 肝脏炎症因子和病毒拷贝数

肝脏作为 RHDV 感染中急性衰竭的部位, 病毒拷贝数快速上升直到 36 h (图 2-A), 炎症因子 IL-6 和 TNF-α 也快速上升, 表明炎症反应加剧, IL-6 相对表达水平在 30 h 达到最大值, 之后则相对表达水平大大降低 (图 2-B 和图 2-C)。不同于外周血, 抗炎因子 IL-10 在肝脏中相对表达水平持续处于上调的趋势 (图 2-D)。IFN-γ 在肝脏 30 h 则有短暂的上调 (图 2-E)。

2.3 脾脏细胞因子和病毒拷贝数

兔体感染 RHDV 后, 脾脏内病毒的拷贝数也持续上升并在 30 h 达到较高水平 (图 3-A)。炎症因子 IL-6 和 TNF-α 同肝脏一样, 处于较高水平的表达 (图 3-B 和图 3-C), 不同的是脾脏 IL-6 持续升高直到 36 h。抗炎因子 IL-10 表达水平也有上调, 在 30 h 达到最大值 (图 3-D)。脾脏的 IFN-γ 相对表达水平与肝脏相似在 30 h 都有短暂的上调,

然后迅速下调 (图 3-E)。

3 讨论

近年来的研究表明, 炎症因子 (IL-1β、IL-6、TNF-α 等) 的急性升高在“暴发性肝脏衰竭”中有着重要作用, 是 RHDV 感染引起重症炎症反应的关键因素。对炎症因子的研究, 可以阐述细胞免疫在 RHDV 感染病毒清除和肝损伤中的作用, 深化免疫损伤理论认识, 为发展特异性免疫治疗手段提供了科学依据。炎症因子作为调节性因子存在于整个免疫反应阶段, 通过荧光定量 PCR 对炎症因子的跟踪检测可以对 RHDV 感染引发的炎症反应进行深入的研究和了解。

本研究发现, 通过实时荧光定量 PCR 的方法, 对感染 RHDV 的兔体内病毒拷贝数和炎症因子进行检测, 结合感染后不同时间点的相关结果分析, 可以对 RHDV 感染兔体后的体内传播和引发的炎症反应有较为深刻的了解。

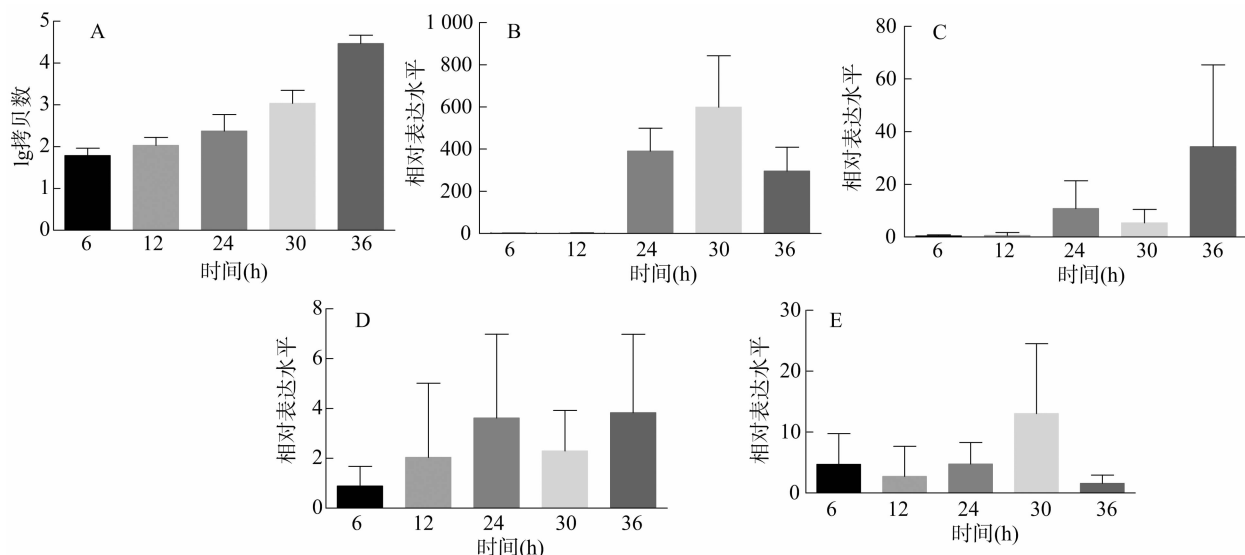


图2 肝脏病毒拷贝数 (A) 和肝脏内炎症因子IL-6 (B)、TNF- α (C)、IL-10 (D)、IFN- γ (E)

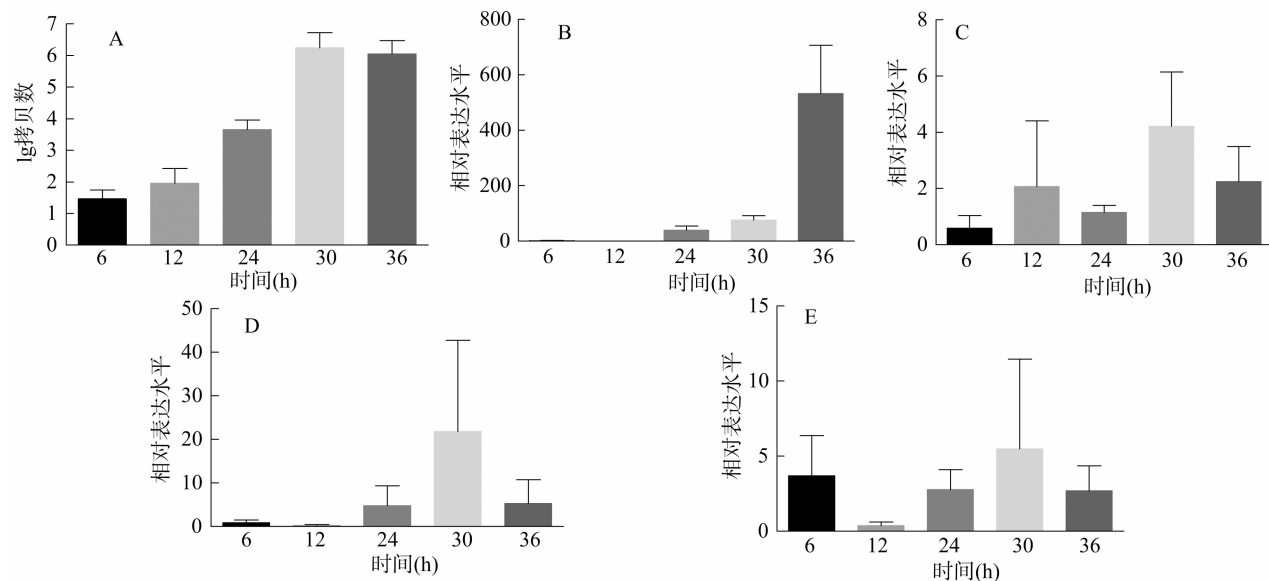


图3 脾脏病毒拷贝数 (A) 和脾脏炎症因子IL-6 (B)、TNF- α (C)、IL-10 (D)、IFN- γ (E)

兔出血症病毒在感染成年兔后,体内病毒随血液到达全身,并且快速增殖直到 36 h,作为靶器官的肝脏和脾脏内病毒积累量快速上升。病毒量在靶器官增多的同时,炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的相对表达水平在外周血、肝脏和脾脏中都大幅度上调,暗示炎症反应的加剧。随着炎症反应的加剧,保护性抗炎因子 IL-10 相对表达水平也有一定程度的上调,以调节炎症反应。但是炎症反应一直处于加剧的趋势,说明炎症反应没有得到有效的控制。肝脏和脾脏中具有抗病毒能力的 IFN- γ 虽然有一定程度的上调,并不能阻止病毒在两者中的增殖。感染兔出血症病毒的兔体内暴发炎症反应,导致免疫反应的失衡,抗炎因子无法起到保护作用,从而导致肝脏等组织器官衰竭和死亡^[15]。总之,感染 RHDV 的兔体内炎症反应的不断加剧,病毒的快速增殖和在靶器官的不断积累可能最终是导致兔快速死亡的重要原因。本研究为兔出血症病毒感染和致病机制的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Granzow H, Weiland F, Strebelow H G, et al. Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV): ultrastructure and biochemical studies of typical and core-like particles present in liver homogenates [J]. *Virus Research*, 1996, 41 (2): 163-172.
- [2] Ohlinger V F, Haas B, Meyers G, et al. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease [J]. *Journal of Virology*, 1990, 64 (7): 3331-3336.
- [3] Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 386-401.
- [4] Boeuf P, Vigan-Womas I, Jublot D, et al. CyProQuant-PCR: a real time RT-PCR technique for profiling human cytokines, based on external RNA standards, readily automatable for clinical use [J]. *Bmc Immunology*, 2005, 6 (1): 1-14.

黄银云, 胡新岗, 郭广富, 等. 樱桃谷肉鸭大肠杆菌病 PCR 鉴定及治疗药物筛选与应用[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 241–243.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.069

樱桃谷肉鸭大肠杆菌病 PCR 鉴定 及治疗药物筛选与应用

黄银云, 胡新岗, 郭广富, 徐婷婷

(江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300)

摘要:为给如皋地区养鸭合作社肉鸭养殖诊治大肠杆菌病提供依据, 采用 PCR 技术鉴定长期困扰养鸭业疑似大肠杆菌病的病原, 通过 27 种药敏制片试验筛选出适合当地的先锋霉素 V、先锋霉素 VI、头孢呋辛、丁胺卡那霉素、新霉素、多黏菌素 B 等 6 种高敏药物及头孢哌酮、头孢曲松、羧苄西林、氨苄西林等 4 种中敏药物, 确定链霉素、卡那霉素、新霉素、强力霉素、氧氟沙星等 17 种抗菌药物不适于在该地区应用。并采用 6 种高敏药物分组, 治疗病鸭均取得了良好的临床疗效。

关键词:樱桃谷鸭; 大肠杆菌病; PCR; 药敏试验; 疗效

中图分类号: S858.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0241-03

随着集约化养鸭业的发展, 大肠杆菌病已严重威胁到养鸭业的健康发展。大肠杆菌属于条件性致病菌, 当由于各种应激刺激造成鸭体的免疫功能降低时, 鸭群就会发生感染^[1]。该病既可通过消化道感染, 也可通过呼吸道感染, 甚至可以通过种蛋垂直传播。肉鸭发病多见于 10~30 日龄, 发病率和死亡率较高, 临床常见肝周炎、气囊炎、心包炎和脑炎病变^[1-2]。常见的发病原因包括鸭舍环境卫生差、空气污浊灰尘多、不重视消毒预防、引进带有大肠杆菌的鸭苗等。此外, 由于养殖户缺乏科学给药知识, 临床上频繁使用某些抗菌药物, 导致地方性大肠杆菌耐药严重, 治疗效果不佳, 而抗菌

药物虽然可以暂时控制疫情发展, 但停药后常会复发, 给鸭场造成了极大的损失^[3]。江苏省如皋市某樱桃谷肉鸭养殖专业合作社长期受疑似大肠杆菌病困扰, 笔者应用 PCR 技术鉴定该病病原, 并通过药敏试验筛选了该合作社可用的敏感药物, 并取得了很好的临床效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器设备 Mikro200R 冷冻高速离心机、JS-380A 自动凝胶图像分析仪、PCR 仪 (PTC-200rev)、DYY-7C 型电泳仪、DYCP-31DN 琼脂糖水平电泳槽、恒温箱、微量移液器等。
1.1.2 试剂 麦康凯平板、伊红美兰平板、鲜血平板培养基, 由江苏省动物流行病学研究中心制备提供; TSB 培养基、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP Mix、25 mmol/L MgCl₂、10 × PCR buffer、100 bp DNA Ladder 和 6 × DNA 凝胶载入染料 (Loading

收稿日期: 2015-03-22

基金项目: 江苏省高校“青蓝工程”资助。

作者简介: 黄银云 (1977—), 女, 江苏泰州人, 硕士, 副教授, 主要从事动物疫病防控研究及动物医学专业教学工作。E-mail: gxh008@qq.com。

[5] Abbas A K, Murphy K M, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes[J]. Nature, 1996, 383(6603): 787–793.

[6] Mena A, Ioannou X P, Kessel A V, et al. Th1/Th2 biasing effects of vaccination in cattle as determined by real-time PCR[J]. Journal of Immunological Methods, 2002, 263(1/2): 11–21.

[7] Dinarello C A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock[J]. Chest, 1997, 112(6): 321–329.

[8] Cannon J G, Clark B D, Wingfield P, et al. Rabbit IL-1 Cloning, expression, biologic properties, and transcription during endotoxemia[J]. Journal of Immunology, 1989, 142(7): 2299–2306.

[9] Shakhov A N, Kuprash D V, Azizov M M, et al. Structural analysis of the rabbit TNF locus, containing the genes encoding TNF- β (lymphotoxin) and TNF- α (tumor necrosis factor)[J]. Gene, 1990, 95(2): 215–221.

[10] Isono T, Nagano Y, Seto A. Expression of the interferon- γ and interleukin-10 genes in rabbit HTLV-I-transformed T-

cell lines[J]. Immunogenetics, 1996, 44(4): 306–308.

[11] Perkins H, Van L B C, Kerr P. The complete cDNA sequences of IL-2, IL-4, IL-6 AND IL-10 from the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)[J]. Cytokine, 2000, 12(6): 555–565.

[12] Liu W K, Dang R Y, Wang X L. Development of a SYBR-based real-time PCR to detect rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and analyze its tissue distribution in experimentally infected rabbits[J]. Virol Sin, 2015, 30(3): 228–30.

[13] Espino A M, Rivera F. Quantitation of cytokine mRNA by real-time RT-PCR during a vaccination trial in a rabbit model of fascioliasis[J]. Vet Parasitol, 2010, 169(1/2): 82–92.

[14] Duarte M D, Carvalho C L, Barros S C, et al. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2)[J]. J Virol Methods, 2015, 219: 90–5.

[15] Abrantes J, Loo W V D, Pendu J L, et al. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review[J]. Veterinary Research, 2012, 43(6): 162–172.