

传染性法氏囊病病毒变异 E 株对法氏囊 淋巴细胞形态及功能的影响

陈明勇 余瑞萍 高齐瑜 贾君镇

(中国农业大学动物医学院)

摘要 利用透射电镜连续观察了传染性法氏囊病病毒变异 E 株人工感染雏鸡后不同时期法氏囊淋巴细胞的超微结构变化, 并对法氏囊内 S IgM, S IgG, S IgA 3 种抗体生成阳性细胞数量和血液中 IgM, IgA, IgG 抗体水平进行检测。观察结果表明, BDV 感染后法氏囊淋巴细胞出现了严重变性、坏死, 表现为核染色质浓缩、碎裂、溶解, 线粒体溶解呈空泡样结构, 其他细胞器破坏溶解, 在法氏囊淋巴细胞、巨噬细胞、网状上皮细胞等细胞的胞浆中可见不同类型和排列方式的病毒粒子。BDV 感染后法氏囊内抗体阳性细胞数量和血清中抗体水平均呈现不同程度的下降, 揭示雏鸡机体体液免疫功能严重抑制。

关键词 鸡; 传染性法氏囊病病毒变异 E 株; 法氏囊; 淋巴细胞; 形态和功能

分类号 S852.35; S855.3

Effect of Infectious Bursal Disease Virus on Morphology and Function of Lymphocytes of Bursa of Fabricius

Chen Mingyong She Ruiping Gao Qiyu Jia Junzhen

(College of Veterinary Medicine, CAU)

Abstract The sequential morphological events of the bursa of Fabricius were examined by transmission electron microscope in chickens infected artificially with BDV via the cloacal, nasal route. The number of surface immunoglobulin-bearing B lymphocytes in the bursa and the level of antibody in the serum of chicken inoculated with BDV were detected. The bursal lymphocytes had showed prominent ultrastructural changes including indensation, destruction and lysis of chromatin in the nucleus, degeneration of the mitochondria and lysis of other organelle. There were a great number of virus particles of different kinds and different arrayed patterns in the cytoplasm of lymphocytes, macrophages and reticulothelion endothelial cells. The numbers of surface immunoglobulin-bearing B lymphocytes in the bursa and the level of IgM, IgG, IgA in the serum of chicken infected with BDV decreased variously. These data indicated that BDV had their ability to cause the suppression of chicken humoral immune function.

Key words chicken; variant serotype 1 isolate E of infectious bursal disease virus; bursa of Fabricius; lymphocytes; morphology and function

传染性法氏囊病是由传染性法氏囊病病毒(BDV)引起的一种雏鸡的急性传染病^[1,2], 病

收稿日期: 2000-03-01

陈明勇, 北京海淀区圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区), 100094



毒主要侵害雏鸡体液免疫中枢器官法氏囊,使雏鸡对多种疫苗接种的反应性降低,对多种疫病的易感性增高,形成免疫抑制现象^[3-5]。为了进一步探讨传染性法氏囊病的免疫抑制机制,本研究利用传染性法氏囊病毒变异 E 株(V E)通过泄殖腔感染,比较观察了 BDV-V E 对法氏囊淋巴细胞形态和功能的影响,现将试验结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

BDV-V E 毒株由中国农业大学生物学院张曼夫教授提供,毒价为每 0.1 mL $10^{6.5}$ TCD₅₀, -70℃ 保存,使用前复壮。

试验雏鸡购自北京市某种鸡场,孵化后未注射任何疫苗,试验前检测 BD 抗体反应为阴性。

试验雏鸡常规隔离饲养分别至 8, 15 和 30 日龄时随机分成 3 组,即 BDV 泄殖腔感染组、BDV 鼻腔感染组及正常对照组,每组 15 只。感染组雏鸡通过泄殖腔或鼻腔分别接种 BDV-V E 法氏囊毒每只 0.2 mL,正常对照组雏鸡接种 PBS。于攻毒后 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 h 剖杀,取法氏囊组织立即固定于 2.5% 戊二醛溶液中,常规制做超薄切片,醋酸铀-柠檬酸铅双染色, JEM-100CX 电子显微镜观察。

1.2 感染雏鸡法氏囊抗体生成细胞数量检测

1.2.1 抗血清 羊抗鸡 IgM (1:100)、羊抗鸡 IgA (1:100)均购自美国 ICN 公司;兔抗鸡 IgG (1:8)由动物医学院传微教研室提供;荧光标记兔抗羊 IgG (1:8)购自 Vector Laboratories 公司,荧光标记羊抗兔 IgG (1:50)购自 Jackson Laboratories 公司。

1.2.2 试验设计 使用 BDV-V E 法氏囊毒,通过鼻腔或泄殖腔分别接种 30 日龄雏鸡,每只 0.2 mL,同时设正常对照组,以 PBS 接种雏鸡,每只 0.2 mL,于攻毒后 7, 14, 21, 28, 35, 42 d, 每组分别取 5 只雏鸡法氏囊进行检测。

1.2.3 单细胞悬液制备 分别取上述试验法氏囊样品,用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.2 PBS 漂洗干净后,浸泡在含有 MEM 的洁净烧杯中,用眼科剪尽可能将组织剪成乳糜状,静置吸去上清液,后转移到组织研磨器中研磨,上述均浆细胞悬液通过 300 目铜筛过滤 2 次,收集滤液, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,用 Hank's 液定容计数,台盼蓝染色计算活细胞数量,调整细胞数量为 5×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,即成为待检的单细胞悬液样品。

1.2.4 抗体生成细胞的检测 采用间接免疫荧光抗体法,操作程序按杨景山方法^[6]略加改进进行。

取上述单细胞悬液样品 50 μL ,滴加在载片上,空气干燥,4℃ 冷丙酮固定, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.2 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,滴加 5% 小牛血清,37℃ 湿盒中封闭 20 min,同上洗涤,再分别滴加羊抗鸡 IgM、羊抗鸡 IgA,兔抗鸡 IgG,37℃ 湿盒中反应 30~40 min,同上洗涤,分别滴加荧光标记兔抗羊 IgG 或荧光标记羊抗兔 IgG,37℃ 湿盒中反应 30~40 min,同上洗涤,风干,甘油封片,荧光显微镜观察荧光阳性细胞,在视野中进行抗体阳性细胞计数,再在普通光镜下计算淋巴细胞总数,检测 3 种抗体生成细胞比例,进行统计学分析。检测时均设置阴性处理、阳性对照、一抗对照、二抗对照以及载片自发荧光对照。

1.3 感染雏鸡血清中 IgG, IgA, IgM 抗体水平检测

酶标抗体 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG 和 HRP 标记兔抗羊 IgG, 均购自北方同正生物技术发展公司, 使用浓度 1·1 000。

同上 1.2.4 剖杀雏鸡, 心脏采血, 分离血清, -20 保存。

血清中 IgG, IgA, IgM 抗体水平检测 使用间接法 ELISA, 按曹树泽^[7]方法略加改进。

2 结果与讨论

2.1 IBDV-VE 对法氏囊淋巴细胞形态的影响

超薄切片, 透射电镜观察, 正常对照组雏鸡法氏囊淋巴细胞超微结构一切正常, 胞核、胞质、胞膜及细胞器结构清晰完整。

BDV 感染组雏鸡接种后 2~4 h, 法氏囊超微结构未见明显变化, 仅见淋巴细胞胞浆中物质电子密度增大, 网状细胞和巨噬细胞胞浆中空泡增多, 这一点在泄殖腔接种雏鸡法氏囊中表现突出, 但仍未发现病毒粒子的存在。泄殖腔感染后 8 h, 在雏鸡法氏囊淋巴滤泡髓质部的少数淋巴细胞的胞质中可发现散在的病毒粒子, 病毒粒子多靠近细胞核, 周围没有膜包围, 电子致密程度不一, 显示不同的成熟程度。

BDV 感染后 12~36 h, 雏鸡法氏囊淋巴滤泡中含有 BDV 病毒粒子的淋巴细胞增加, 可以同时看到处于不同感染程度的细胞, 在部分淋巴细胞的胞质中可见不同大小的病毒包涵体, 包涵体内部病毒颗粒排列比较整齐, 呈串珠样(图 1-1), 部分病毒粒子直径较小, 多粒病毒颗粒连接呈线状, 还有少数病毒粒子呈中空状态。整个病毒包涵体外围围绕着一层膜样结构, 包涵体处缺乏核糖体颗粒, 而周围充积大量核糖体。有的淋巴细胞的胞质中几乎完全被病毒发生基质所占据, 许多正在装配的病毒粒子包埋其中。淋巴滤泡皮质部淋巴细胞形态基本正常, 出现典型的浆细胞, 细胞质中内质网高度发达, 线粒体扩张, 显示皮质部淋巴细胞积极的防御状态。同时, 在少量网状细胞中也可发现大量散在的病毒粒子, 病毒粒子没有膜包围, 在扩张、被破坏的内质网中可见到正在装配的病毒颗粒。这些情况与感染早期的淋巴细胞基本类似, 显示病毒复制的特征。

泄殖腔接种后 48~72 h, 雏鸡法氏囊淋巴滤泡病毒感染细胞数量急剧增加, 整个滤泡, 包括皮质部和髓质部随处可见大量的细胞碎片和完全坏死的淋巴细胞。感染后 48 h, 多数淋巴细胞细胞器变性, 线粒体溶解, 呈空泡状结构, 粗面内质网溶解, 仅残存少量线状结构, 细胞周围可见病毒结晶体、溶酶体、脂滴和吞噬泡(图 1-2)。感染后期, 淋巴细胞核浓集、或空泡化, 呈扭曲样结构, 各种细胞器溶解, 呈现大小不一的空泡样结构, 坏死细胞周边同样集聚有病毒粒子, 溶酶体和吞噬泡等。同时网状细胞可见类似的结构变化(图 1-3), 表现为细胞核染色质边集, 核膜溶解或破裂, 染色质外溢, 线粒体肿胀, 内嵴溶解断裂, 呈空泡状结构, 内质网扩张, 结构模糊, 但巨噬细胞明显增生。

在感染后 72~120 h, 可在各种细胞内见到大量的不同形态的病毒粒子。在淋巴细胞中, 主要存在 2 种类型病毒晶格, 即典型的晶格状排列或串珠样排列病毒结晶块, 其中一类是由单层膜包绕, 另一类没有膜包围(图 1-4)。在网状细胞中, 可见有大量块状基质充填于细胞质中, 基质中包埋有大量的散在的病毒粒子, 整个块状基质没有膜包围, 而在巨噬细胞中也可见到病毒结晶块和晶格状排列的病毒粒子, 主要出现在巨噬细胞的吞噬泡内, 巨噬细胞胞浆中充满了

形态各异的吞噬体或吞噬泡, 脂滴含量明显增多。然而在粘膜上皮细胞中一直未能发现病毒颗粒的存在。感染后 120~ 144 h, 在少量淋巴细胞, 网状细胞和巨噬细胞胞质或吞噬泡内开始发现降解的病毒颗粒或病毒残壳。

鼻腔接种雏鸡在感染后 24 h, 在法氏囊淋巴滤泡极少量的淋巴细胞的胞浆中开始发现散在的病毒颗粒, 感染后 48~ 144 h, 可陆续在越来越多的淋巴细胞、网状细胞、巨噬细胞胞质或吞噬泡内见到形态各异的大量的病毒粒子, 病毒粒子的存在形式以及病毒感染细胞所发生的超微结构变化与泄殖腔接种雏鸡情况基本一致。8, 15, 30 日龄雏鸡感染 BDV 后法氏囊的超微形态学变化情况亦基本相似。

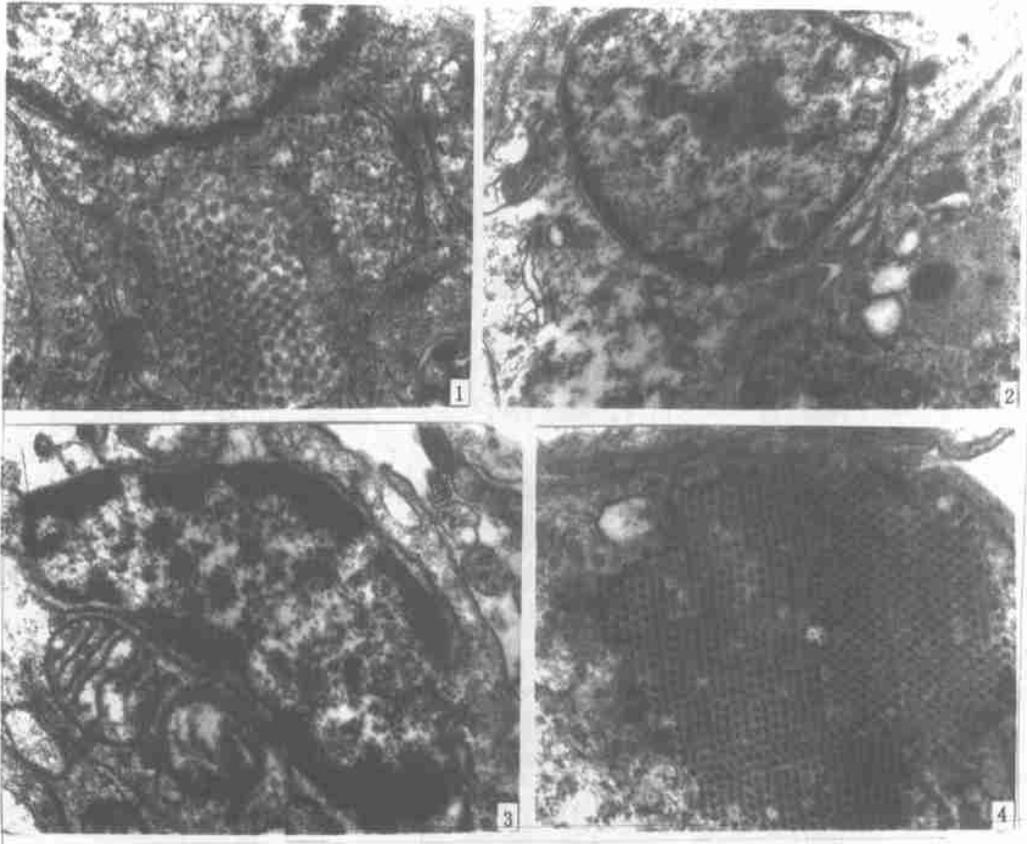


图 1 BDV 泄殖腔接种后雏鸡法氏囊透射电镜观察结果

- 1 30 日龄雏鸡感染 24 h 示感染淋巴细胞胞浆内病毒包涵体, $\times 33\ 000$;
- 2 15 日龄雏鸡感染 48 h, 示变性淋巴细胞及其病毒包涵体、溶酶体、吞噬泡等, $\times 13\ 000$;
- 3 15 日龄雏鸡感染 48 h, 示变性网状细胞, $\times 26\ 000$;
- 4 15 日龄雏鸡感染 72 h, 示淋巴细胞胞浆中典型的呈晶格状排列的病毒粒子, $\times 26\ 000$ 。

试验中我们还观察到, 泄殖腔接种和鼻腔接种雏鸡法氏囊淋巴细胞的超微结构变化, 病毒粒子的存在形式基本相似, 只是泄殖腔接种雏鸡法氏囊病毒粒子的检出时间要早于鼻腔接种 16 h, 表明 BDV 泄殖腔感染可以通过法氏囊表面粘膜上皮细胞而侵入法氏囊淋巴细胞, 但是

我们观察发现,在BDV攻毒后2~144 h,感染雏鸡法氏囊表面粘膜上皮细胞内均未见到病毒粒子的存在,其病毒入侵机制有待于进一步研究。

2.2 感染雏鸡法氏囊抗体生成细胞数量变化检测结果

30日龄雏鸡感染BDV-V E后7~42 d,法氏囊内S IgG生成细胞和S IgM生成细胞数量均显著低于正常对照组雏鸡($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),S IgA生成细胞数量在感染后1~6周亦显著低于对照组($P < 0.05$)。泄殖腔接种、鼻腔接种BDV雏鸡之间,抗体生成细胞数量差异不明显,泄殖腔接种雏鸡法氏囊内抗体生成细胞数量略高于鼻腔接种雏鸡。

2.3 感染雏鸡血清中IgM, IgG, IgA抗体水平检测结果

30日龄雏鸡人工感染BDV后,血清中IgM含量在攻毒后7~42 d,与对照组相比呈现显著或极显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),血清中IgG含量在攻毒后7~42 d与对照组雏鸡比较,出现明显降低($P < 0.05$),而血清中IgA含量在攻毒后7~42 d内下降,与对照组比较没有显著差异($P > 0.05$)。泄殖腔接种和鼻腔接种雏鸡血清中3种免疫球蛋白含量水平变化基本一致。

3 结论

本试验利用BDV变异E株,采用泄殖腔和鼻腔2种途径接种雏鸡,观察了雏鸡法氏囊淋巴细胞攻毒后的形态学变化。结果表明,感染早期,法氏囊淋巴细胞出现较为严重的超微结构变化,同时病毒粒子首先出现于淋巴滤泡髓质部淋巴细胞中,感染后期,可在淋巴滤泡髓质部和皮质部淋巴细胞、网状细胞以及巨噬细胞内均发现多种形式的病毒粒子,同时,病毒感染细胞随着感染时间的延长出现极为严重的坏死、破碎变化。这些结果与过去的文献报道基本一致^[8]。从整个观察过程来看,BDV-V E株主要侵害法氏囊淋巴滤泡髓质部淋巴细胞,随后蔓延至皮质部淋巴细胞,导致淋巴细胞超微结构出现严重变化,表明法氏囊淋巴细胞是BDV-V E株的主要靶细胞,其作用机制为BDV-V E对淋巴细胞的直接杀伤作用,国内外许多学者的研究结果也证实了这一观点^[9,10]。

法氏囊是鸡体液免疫的中枢淋巴器官,随着机体的生长,法氏囊内淋巴细胞逐渐发育成为成熟的囊依赖性淋巴细胞,随后分化形成不同类型的抗体生成细胞^[11],这些抗体生成细胞是机体体液免疫的细胞学基础,是血液中抗体的来源,而血清中免疫球蛋白含量的高低是反映机体体液免疫水平的一个重要指标^[12,13]。本试验利用抗体生成细胞的数量变化和血清中免疫球蛋白的水平2个指标,直接而有效地反映了传染性法氏囊病病毒感染后机体的体液免疫状况,从而合理地评价BDV-V E对法氏囊淋巴细胞免疫功能的影响,试验结果表明,30日龄雏鸡遭受BDV-V E攻毒后,法氏囊内3种抗体生成细胞(S IgM⁺, S IgA⁺, S IgG⁺生成细胞)数量均显著或极显著低于正常对照组雏鸡,同时血清中IgG, IgM含量均明显低于对照组雏鸡,而IgA亦呈现一定程度的降低,证明血清中IgM, IgG, IgA含量的减少与法氏囊组织中相应抗体生成细胞数量的减少密切相关,从而导致BDV-V E感染后雏鸡体液免疫功能下降,呈现体液免疫功能抑制。

参 考 文 献

1 卡尔尼克BW 主编 禽病学.高福,刘文军译.北京:北京农业大学出版社,1991,554~566

- 2 Okoye J O A. Infectious bursal disease of chicken. *Veterinary Bulletin*, 1984, 54: 425~ 436
- 3 Hirai K. Characterization of immunosuppression in chickens by infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, 1979, 24: 950~ 965
- 4 Saif Y M. Immunosuppression induced by infectious bursal disease virus. *Vet Immunol and Immunopathol*, 1991, 30: 45~ 50
- 5 Shama J M. Virus induced immunosuppression in chickens. *Poultry Sci*, 1994, 73: 1082~ 1086
- 6 杨景山主编 医学细胞化学与细胞生物技术 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1992, 32~ 145
- 7 曹树泽主编 兽医微生物学及免疫学技术 北京: 北京农业大学出版社, 1991, 189~ 234, 285~ 386
- 8 Kaufer I, Weiss E. Electron-microscope studies on the pathogenesis of infectious bursal disease after intrabursal application of the causal virus. *Avian Dis*, 1976, 20: 483~ 495
- 9 Hirai K, Calnek B W. *In vitro* replication of infectious bursal disease virus in established lymphoid cell lines and chicken B lymphocytes. *Infection and Immunity*, 1979, 25: 964~ 970
- 10 Muller H. Replication of infectious bursal disease virus in lymphoid cells. *Archives of Virology*, 1986, 87: 191~ 203
- 11 Waltenbaugh C R, Van A lten P J. The production of antibody by bursal lymphocytes. *J Immunol*, 1974, 113: 1079~ 1084
- 12 Ratcliffe M J H. Generation of immunoglobulin heavy chain diversity subsequent to cell surface immunoglobulin expression in the avian bursa of Fabricius. *J Exp Med*, 1989, 170: 1165~ 1178
- 13 Glick B. The bursa of Fabricius and immunoglobulin synthesis. *Inter Rev Cyto*, 1977, 48: 345~ 402