

# 人工感染鸭病毒性肠炎急性病例细胞凋亡的电镜研究

袁桂萍, 程安春\*, 汪铭书, 周毅, 刘菲, 郭宇飞, 韩晓英,  
廖永洪, 徐超, 周伟光, 文明, 贾仁勇, 陈孝跃

(四川农业大学动物科技学院禽病防治研究中心动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 雅安 625014)

**摘要:** 应用透射电镜和超薄切片技术观察鸭病毒性肠炎病毒(Duck Enteritis Virus, DEV) CH 强毒株人工感染成年鸭各组织器官的形态学特征。结果表明, 脾脏、胸腺、法氏囊、十二指肠固有层中淋巴细胞除了坏死变化外还有很明显的凋亡变化, 两者往往同时存在。疾病过程中, 淋巴细胞凋亡数量明显增多。凋亡细胞的形态学改变是细胞体积缩小, 细胞器结构正常, 染色质初期浓集成团, 聚集于核膜的周边, 随后出现染色质凝聚, 核碎裂以及凋亡小体形成等现象。淋巴细胞的坏死和凋亡共同造成了淋巴细胞的大量损耗, 淋巴细胞的这种变化可能在鸭病毒性肠炎的发病机制中起着重要的作用。研究结果表明 DEV 急性感染可诱导成年鸭体内淋巴细胞的凋亡。

**关键词:** 鸭病毒性肠炎病毒; 人工感染; 淋巴细胞; 细胞凋亡

中图分类号: S858.325.3; S852.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)11-1174-04

细胞凋亡(Apoptosis)是机体在生理条件下, 经过多种途径的信号传递导致细胞产生一系列形态和生物化学方面的改变而引起的细胞自我消亡的过程<sup>[1-4]</sup>。细胞凋亡是当前生命科学的研究热点, 越来越多的资料表明病毒感染与细胞凋亡之间存在密切的联系。病毒感染可以使细胞凋亡的基因调控失常, 致使细胞凋亡减弱或增强, 从而破坏了机体细胞的自稳态, 最终表现为疾病的发生<sup>[1-9]</sup>。深入研究病毒感染与细胞凋亡的关系对阐明病毒的致病机理并制定防制病毒性疾病的有效策略具有重要的意义。本研究对 DEV 人工感染鸭所复制的急性鸭病毒性肠炎(Duck Viral Enteritis, DVE)病例的病理模型各组织器官的细胞凋亡进行了电镜观察, 以期阐明 DEV 致宿主细胞病变死亡机理提供有用的资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 鸭

健康 2 月龄北京鸭 50 只, 未免疫接种, 源于雅安无鸭病毒性肠炎感染史地区。

收稿日期: 2004-03-16

基金项目: 四川杰出青年学科带头人基金后续资助项目(03ZQ026-028); 四川省重点建设学科项目(SZD0418)

作者简介: 袁桂萍(1977-), 女, 四川新津人, 博士生, 从事动物传染病研究工作

\* 通讯作者: 程安春, Tel: 0835-2882844; Fax: 0835-2882754;

E-mail: chenganchun@vip.163.com

### 1.2 DEV

CH 株强毒, 对 2 月龄鸭最小致死量为  $10^8$  /mL, 由四川农业大学禽病研究中心提供。

### 1.3 人工感染

皮下接种 DEV CH 株强毒, 用量为  $10^4$  最小致死量/只, 接种后每隔 24 h 剖杀取样, 2 只/次, 直至有鸭发生死亡时停止剖杀而采集死亡鸭组织器官, 取其典型病变部位, 观察记录发病及死亡情况。采取的样品包括: 心肌、肝脏、肾脏、脾脏、胸腺、法氏囊、胰腺、大脑、十二指肠。采取正常鸭组织作对照。

### 1.4 超薄切片制备及电镜观察

参照文献[10]制备超薄切片。将采集的样品切成  $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 2\text{ mm}$  大小, 用 3% 戊二醛(pH 7.2)和 1% 锇酸先后固定, 按常规电镜样品制备程序脱水、渗透、包埋、超薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铅染色, H-600 型透射电镜观察并照相。

## 2 结果

在疾病过程中, 心肌、肾脏、胰腺、大脑没有发现明显的细胞凋亡变化, 死亡鸭的肝脏中发现少量的凋亡细胞(图 1), 脾脏、胸腺、法氏囊、十二指肠固有层中淋巴细胞除了明显的坏死性变化外, 还出现明显的细胞凋亡现象。接种后 24 h, 十二指肠固有层淋巴细胞明显增多, 脾脏、胸腺、法氏囊、十二指肠固有层中的部分淋巴细胞开始出现凋亡的早期现象, 接种后 72 h 以及发病死亡鸭较多的淋巴细胞出现明显的凋亡现象。

电镜观察清楚地显示了凋亡细胞的超微结构变化。淋巴细胞凋亡早期表现为: 体积缩小, 与周围细胞脱离, 细胞核核仁消失或边集, 染色质聚集成团, 常分布于细胞核膜的周边, 形成新月形或花环形的结构(图 2-3); 凋亡的淋巴细胞染色质固缩、破碎成团块样, 胞浆浓缩深染, 细胞膜上出现许多空泡, 出现大小不等的圆形凋亡小体, 被单位膜包绕, 内有致密的核样物质(图 3~7), 凋亡小体或整个凋亡细胞被临近网状内皮细胞或巨噬细胞吞噬、消化(图 6)。

凋亡细胞的胞浆逐渐溶解, 细胞膜出现皱褶(图 7)。鸭死亡后淋巴细胞除了凋亡变化外, 许多的淋巴细胞的死亡还表现黑洞核样变化(图 8): 细胞缩小, 染色质凝聚成团成黑洞样, 胞浆均质深染, 无可辨别的细胞器结构, 细胞膜完整或有缺损, 但胞质并没有明显的溢出现象, 有的胞浆结构溶解消失, 只剩下致密的黑洞样团块。坏死的淋巴细胞中常见核衣壳、病毒包涵体和少量成熟病毒, 而凋亡和黑洞核样变化的淋巴细胞中往往少见或没有病毒和核衣壳。

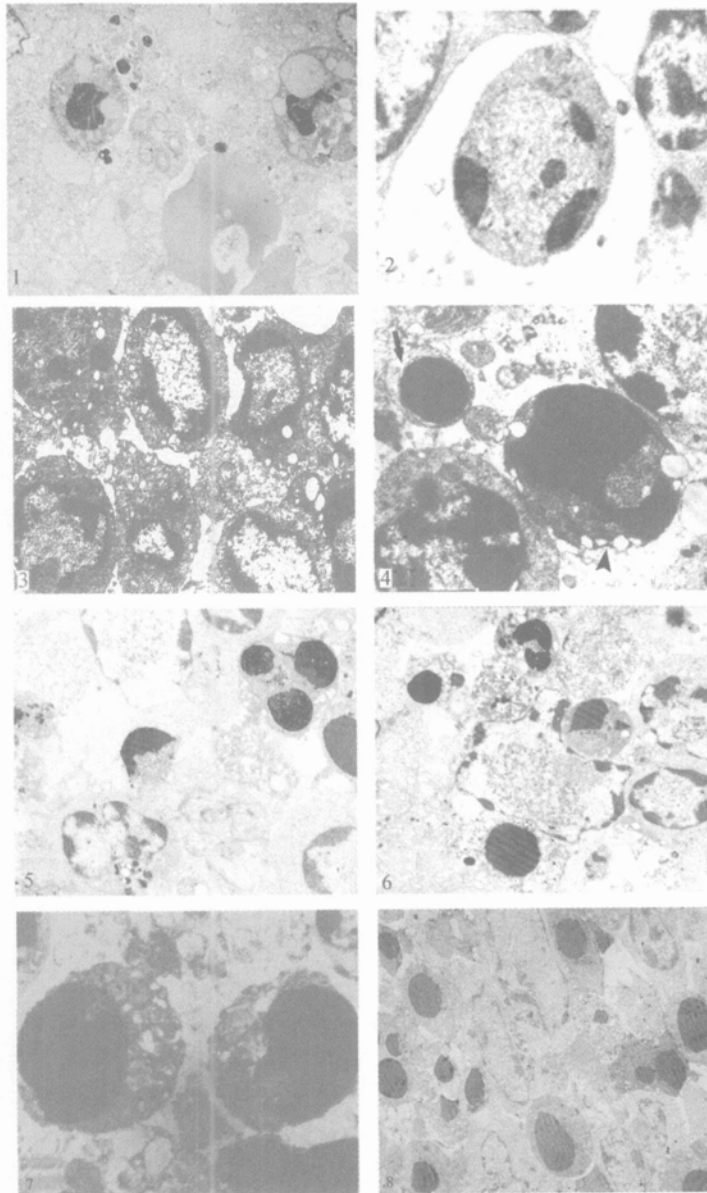


图 1 死亡鸭肝组织中的凋亡细胞 2 394 ×

图 2 胸腺淋巴细胞凋亡早期, 淋巴细胞与周围细胞脱离, 体积缩小, 染色质凝集边聚 7 713 ×

图 3 法氏囊淋巴细胞凋亡早期, 淋巴细胞染色质边集, 细胞浆浓缩 3 826 ×

图 4 凋亡细胞膜出现大量的空泡(短箭头)及凋亡小体(长箭头)形成 4 658 ×

图 5 淋巴细胞坏死以及凋亡细胞正在裂解成凋亡小体 3 399 ×

图 6 吞噬细胞正在吞噬、消化凋亡细胞 3 507 ×

图 7 凋亡细胞晚期的形态,染色质固缩,细胞膜皱褶 6 530 ×

图 8 淋巴细胞的黑洞核样变化,染色质固缩或碎裂,胞质均匀深染 2 320 ×

Fig. 1 Apoptotic cells in liver of dead duck 2 394 ×

Fig. 2 The early stage of apoptosis in thymus lymphocyte, it is separated from contiguous cells, cell body contracted, chromatin clumped and marginated 7 713 ×

Fig. 3 The early stage of apoptosis in lymphocytes in the bursa of Fabricius, chromatin condensed and marginated 3 826 ×

Fig. 4 Vacuoles on the membrane of apoptotic cells (arrowhead) and apoptotic body with a clear membranous material (arrow) 4 658 ×

Fig. 5 The coexistence of apoptosis and necrosis of lymphocytes, an apoptotic cell is splitting into apoptotic bodies 3 399 ×

Fig. 6 Apoptotic cells are phagocytosed and digested by reticular cell 3 507 ×

Fig. 7 The late stage of apoptosis of lymphocytes, chromatin condensed and cytomembrane creased 6 530 ×

Fig. 8 Chromatin of lymphocytes condensed or broke into pieces like black holes, with homogeneous and electron dense cytoplasm 2 320 ×

### 3 讨论

透射电镜是观察细胞形态的较好方法,可以同时反映细胞膜的完整性、细胞浆中细胞器的改变、细胞核和染色质的变化、凋亡小体的形成以及凋亡细胞的去向等变化。细胞凋亡在形态学与细胞坏死有明显区别,凋亡细胞在形态学上表现为胞浆浓缩,核固缩、裂解,质膜内陷将细胞分为有膜包裹但内容物不外泄的凋亡小体<sup>[1,2]</sup>。病毒诱导宿主细胞凋亡的发现,为进一步研究病毒的致病机理提供了新思路。病毒感染常常既诱导细胞凋亡又引起细胞坏死,一方面宿主细胞可利用细胞凋亡来清除病毒感染细胞;另一方面病毒又可以抑制细胞凋亡,以利于自身增殖需要。而病毒诱导细胞凋亡还是抑制凋亡,取决于多方面因素<sup>[1,2,4]</sup>。DEV 属于疱疹病毒  $\alpha$  亚科。许多研究证实,疱疹病毒既可诱导细胞凋亡,又可抑制细胞凋亡,其诱导或抑制取决于靶细胞的类型和感染的条件<sup>[1,2,4]</sup>。人工感染试验中,  $\gamma$  疱疹病毒科的马立克氏病病毒以及  $\alpha$  疱疹病毒科的牛疱疹病毒-1 和伪狂犬病毒等急性感染其宿主动物后,都能引起体内的细胞出现典型的凋亡现象<sup>[5-8]</sup>。

本研究发现 DEV 也可致细胞凋亡,尤其是在接种后 72 h 前后的免疫器官淋巴细胞出现明显的细胞凋亡的形态变化。Protor<sup>[11]</sup> 关于 DVE 研究表明 DEV 感染可引起病鸭的免疫器官淋巴细胞凋亡,但当时把它认为是细胞坏死的一种方式,其中还描述 DVE 病例中淋巴细胞的坏死形态与鸡传染性法氏囊病的淋巴细胞坏死一致,而近年来的研究证明 IBDV 可致鸡的淋巴细胞凋亡<sup>[12]</sup>。本研究中发现十二指肠固有层浸润的淋巴细胞出现明显的凋

亡,死亡鸭肝脏中发现的少量的凋亡细胞根据形态判断也可能是肝组织浸润的淋巴细胞,这些现象与 Aleman<sup>[7]</sup> 等的发现一致,他们研究发现伪狂犬病毒人工感染可引起浸润在神经细胞周围的炎性细胞明显凋亡,并且认为浸润炎性细胞凋亡在病毒的免疫逃避机制中起着重要的作用。本研究表明 DVE 的发病机理与 DEV 诱导的淋巴细胞凋亡密切相关,从抑制淋巴细胞的凋亡出发,或许可以找到防治 DVE 的更加有效的方法。卫兰等<sup>[3]</sup> 在体外培养新生小鼠胸腺的超微结构的研究中对核呈黑洞样结构、胞质肿胀、胞膜不完整的这种细胞变化有详细描述,认为这些细胞的变化既有坏死的特点,又有凋亡的特征,所以本研究中鸭死亡后出现的许多黑洞核样变化的淋巴细胞的死亡性质还有待进一步探讨。

本研究中还发现肠道上皮细胞和胰腺外分泌细胞出现一种细胞形态及其亚细胞结构无明显变化而整个细胞深染的现象,尚不知道这些细胞变化的性质是属于凋亡还是坏死。由于本研究只限于形态学上的观察,对于鸭死亡后许多的淋巴细胞出现的晚期变化是属于细胞凋亡晚期变化还是坏死不能作出准确的判断,而且对于出现凋亡的淋巴细胞的亚类以及凋亡细胞的数量无法给出定论,所以还需结合其它方法对淋巴细胞以及其它组织细胞的凋亡进行定性和定量的进一步研究,并且还需要对凋亡和坏死的淋巴细胞类型作出进一步的明确。坏死的淋巴细胞中有大量的病毒粒子以及包涵体,而凋亡的细胞中则少见或没有病毒颗粒存在,说明了 DEV 感染可以直接或间接地诱导细胞凋亡,更深入地研究这种现象对于了解 DEV 感染和致病机制有十分重要的意义。

## 参考文献:

- [1] 李祥敏, 金梅林, 陈焕春. 疱疹病毒潜伏感染与细胞凋亡关系的研究进展[J]. 动物医学进展, 2000, 22(4): 32~35.
- [2] 王 健. 疱疹病毒诱导的凋亡及其机制[J]. 国外医学: 微生物学分册, 2001, 24(2): 20~22.
- [3] 卫 兰, 吴江声, 郭 琦, 等. 体外培养新生小鼠胸腺的超微结构[J]. 解剖学杂志, 2002, 25(2): 114~118.
- [4] 黄文林, 姜 勇, 董小平, 等. 分子病毒学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [5] Morimura T, Ohashi K, Kon Y, et al. Apoptosis and CD8<sup>+</sup> down regulation in the thymus of chickens infected with Marek's disease virus[J]. Archives of Virology, 1996, 141(11): 2 243~ 2 249.
- [6] Delhon G A, Gonzalez M J, Murcia P R. Susceptibility of sensory neurons to apoptosis following infection by bovine herpesvirus type 1[J]. Journal of General Virology, 2002, 83(9): 2 257~ 2 267.
- [7] Aleman N, Quiroga M I, Lopez-Pena M, et al. Induction and inhibition of apoptosis by pseudorabies virus in the trigeminal ganglion during acute infection of swine[J]. Journal of Virology, 2001, 75(1): 469~ 479.
- [8] Morimura T, Ohashi K, Hattori M, et al. Apoptosis of CD4<sup>+</sup> T cell *in vivo* and non-responsiveness of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells *in vitro* observed in chickens infected with Marek's disease virus[A]. Proceedings of the 5th International Symposium[C]. East Lansing, Michigan, 1996, 335~ 340.
- [9] 袁桂萍, 程安春, 汪铭书, 等. 鸭病毒性肠炎病毒强毒在人工感染鸭体内形态结构和发生学的电镜观察[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(5): 486~ 491.
- [10] 洪 涛. 生物医学超微结构与电子显微镜技术[M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [11] Protor S J. Pathogenesis of duck plague in the bursa of Fabricius, thymus and spleen[J]. AM J Vet Res, 1976, 37(4): 427~ 431.
- [12] Lam K M. Morphological evidence of apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease virus [J]. Journal of Comparative Pathology, 1997, 116(4): 367~ 377.

Electron Microscopic Study on Apoptosis Induced by Duck Enteritis Virus *in vivo*

YUAN Gui-ping, CHENG An-chun\*, WANG Ming-shu,  
ZHOU Yi, LIU Fei, GUO Yu-fei, HAN Xiao-ying, LIAO Yong-hong,  
XU Chao, ZHOU Wei-guang, WEN Ming, JIA Ren-yong, CHEN Xiao-yue  
(Key Laboratory of Sichuan Provincial Animal Disease and Human Health,  
Avian Disease Research Center, College of Animal Science and Veterinary  
Medicine, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China)

**Abstract:** Fifty Peking ducks aged two months were inoculated subcutaneously with a virulent field strain of duck enteritis virus. The morphology of cells of those infected ducks was observed using electron microscopy and ultrathin section techniques. The result make it clear that the lymphocytes in spleen, thymus, bursa of Fabricius and in the lamina propria of small intestine undergo apoptosis and necrosis at the same time. At the process of the disease, the number of apoptotic cells increased steadily. The morphological changes of apoptosis including chromatin condensation and margination, appearance of vacuoles on the cytomembrane, and the formation of apoptotic bodies. The apoptosis and necrosis of lymphocytes resulted in the depletion of lymphocytes, and the apoptosis of lymphocytes may play an important role in the pathogenesis of duck viral enteritis.

**Key words:** duck enteritis virus; artificial infection; lymphocytes; apoptosis

\* Corresponding author