

# 1 株 H5N1 亚型高致病力禽流感病毒 人工感染鸭的细胞凋亡观察

李玉谷, 叶远兰, 崔聪颖, 周泉鹤, 张媛, 马勇江, 李楚宣

(华南农业大学兽医学院, 广州 510642)

**摘要:** TUNEL 染色法和透射电镜观察表明, 鸭静脉接种或眼-鼻-口腔-泄殖腔混合接种高致病力禽流感病毒 A/duck/Guangdong/220/2004(H5N1) 后, 心、肝、脾、肺、肾、胰、肠、脑、胸腺和法氏囊均可发生细胞凋亡。其中, 凋亡主要发生在胰腺腺上皮细胞、肾小管上皮细胞、肝细胞和肠黏膜上皮细胞; 也有少量神经元、神经胶质细胞、心肌细胞、呼吸毛细管上皮细胞, 胸腺、脾脏和法氏囊淋巴细胞发生凋亡。

**关键词:** H5N1 亚型禽流感病毒; 细胞凋亡; 鸭

中图分类号: S852.659.5; S858.325.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)07-1069-05

## Induction of Apoptosis by a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus, A/duck/Guangdong/220/2004(H5N1) in Experimentally Infected Ducks

LI Yu-gu, YE Yuan-lan, CUI Cong-ying, ZHOU Quan-he, ZHANG Yuan, MA Yong-jiang, LI Chu-xuan  
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Using terminal deoxyuridine transferase nick-end labeling (TUNEL) and electron microscopy technique, the apoptosis were investigated in ducks inoculated with a highly pathogenic avian influenza virus, A/duck/Guangdong/220/2004(H5N1) by intravenous and ocular-nasal-oral-cloacal routes. The results demonstrated that the virus-induced apoptosis occurred in the pancreas, kidney, liver, heart, lung, intestine, cerebrum, cerebellum, thymus, bursa of Fabricius and spleen, etc. The predominant apoptotic cell types were pancreatic acinar epithelial cells, renal tubular epithelial cells, hepatocytes and intestinal epithelial cells. The minority of neurons, glial cells, cardiac muscle cells, epithelial cells of lung air capillary, lymphocytes in the thymus, bursa of Fabricius and spleen also experienced apoptotic changes.

**Key words:** H5N1 subtype avian influenza virus; apoptosis; duck

细胞凋亡 (Apoptosis) 是受基因调控的一种生理性细胞死亡过程, 又称程序性细胞死亡 (Programmed cell death, PCD)。细胞凋亡在胚胎发育和正常组织代谢中具有重要作用, 如淘汰胚胎发育过程中多余的细胞、清除胚胎发育过程中迁移错位的细胞、淘汰能引起自身免疫反应的淋巴细胞、以及清除衰老和突变的细胞等, 以保证胚胎的正常发育和维持组织器官的自身稳定。但近来研究表明, 许

多外在因素和病理信号, 如某些激素、细胞因子、药物、自由基、放射线、病毒、细菌、细菌内毒素、真菌毒素等, 也可以诱导细胞凋亡, 因此细胞凋亡也可见于某些疾病的病理过程中。关于禽流感病毒诱导细胞凋亡, 在鸡、人以及体外培养的细胞等有较多的研究<sup>[1-9]</sup>, 但在鸭尚未见报道。因此, 本试验通过人工接种 1 株高致病力禽流感病毒 A/duck/Guangdong/220/2004(H5N1), 对鸭体内细胞凋亡的情况

收稿日期: 2008-03-18

基金项目: 广东省科技攻关项目 (2004A2090102); 广东省教育厅科学基金项目 (Z02003)

作者简介: 李玉谷 (1963-), 男, 江西萍乡人, 教授, 博士, 博士生导师, Tel: 020-85283226, E-mail: liyugu@scau.edu.cn

进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物分组与接种病毒

4 周龄眼观健康并经禽流感病毒抽检呈阴性的普通非免疫本地麻鸭 118 只,分为下列 3 组进行试验。其中,接种病毒试验在华南农业大学兽医学院“农业部养禽与禽病防治重点开放实验室”生物安全三级动物实验室(BSL3 实验室)进行,所用禽流感病毒由该实验室提供,并由该实验室分离、鉴定和保存。禽舍严格消毒,排泄物进行无害化处理,试验后的动物尸体消毒后深埋。限制人员流动,进出实验室消毒。

静脉接种组:54 只鸭,每只经蹠静脉注射 1:10 稀释的含禽流感病毒 A/duck/Guangdong/220/2004 (H5N1)的鸡胚尿囊液 0.2 mL(血凝效价 1:64)。

仿自然感染眼一鼻一口腔一泄殖腔混合接种组:54 只鸭,每只眼一鼻一口腔一泄殖腔混合接种上述病毒液 1 mL(两眼各 0.1 mL,两鼻各 0.1 mL,口腔 0.3 mL,泄殖腔 0.3 mL)。上述 2 组各分 3 笼饲养,平时观察其临床症状。

对照组:10 只鸭,不接种病毒,与接种病毒的鸭分室饲养,平时观察其有无异常。在其他鸭接种病毒后 1~10 d 每天各放血处死 1 只,并取材。

### 1.2 TUNEL 染色法

1.2.1 石蜡切片的制备 取对照组、眼一鼻一口腔一泄殖腔混合接种病毒后 1、3、5、10 d,静脉接种病毒后 1、3、5 d(5 d 后仅存活鸭 1 只,故未再取材)鸭的心、肝、脾、肺、肾、胰、大脑、小脑、胸腺、法氏囊、十二指肠等器官,10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,5  $\mu\text{m}$  厚切片。切片分为 3 套:1 套进行 TdT 缺口末端标记(TUNEL)染色,观察细胞凋亡情况;1 套进行 HE 染色,观察一般病理组织学变化<sup>[10]</sup>;1 套进行免疫组织化学染色,观察病毒核蛋白抗原的定位分布(另文报道)。

1.2.2 TUNEL 染色 切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇复水;入 0.1% Triton-X-100(0.1% 柠檬酸钠配制),20  $^{\circ}\text{C}$  作用 8 min;PBS (0.01 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, pH7.4)洗 2 次;入 Tris-HCl(0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>,含 3% BSA 和 20%NCS,pH7.5),20  $^{\circ}\text{C}$  作用 30 min;PBS 洗 2 次;室温下风干切片;滴加 50  $\mu\text{L}$  的 TUNEL 反应液(Roche 产品,阴性对照时省去该反应液),置于湿盒,在暗环境中 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min;PBS 洗 3 次;

拭干切片周边,滴加 50  $\mu\text{L}$  POD 液,盖上盖玻片,在湿盒暗环境中 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 30 min;PBS 洗 3 次;加 50  $\mu\text{L}$  DAB 显色液,20  $^{\circ}\text{C}$  作用 10 min;PBS 洗 3 次;干燥后用甘油明胶封固。

1.2.3 凋亡细胞的计数 在 400 倍数视野的光镜下观察,凋亡细胞数在 30 以上记为“++++”;在 20~30 记为“+++”;在 10~20 记为“++”;在 1~10 记为“+”;未见凋亡细胞记为“-”。

### 1.3 电镜观察

取对照组健康鸭、死亡高峰期的静脉接种病毒后 3 d 和混合接种病毒后 5 d 濒死鸭的心、肝、脾、肺、肾、胰、大脑、小脑、胸腺、法氏囊等的新鲜病料,常规制样,Fei-Tecna G2 分析型透射电镜观察,根据其超微结构尤其是细胞核的特征性变化,检查细胞凋亡的情况。

## 2 结果

### 2.1 TUNEL 染色结果

经 TUNEL 染色,对照组的鸭除在胸腺、法氏囊和小肠偶见个别凋亡细胞外,其他器官均未检测到凋亡细胞。接种上述禽流感病毒的鸭,其心、肝、脾、肺、肾、胰、大脑、小脑、胸腺、法氏囊、十二指肠均发现有凋亡细胞存在。其中,肾和胰细胞凋亡非常明显,可见大量肾小管上皮细胞、胰腺泡上皮细胞发生凋亡。肝和十二指肠也有较多的凋亡细胞,可见于肝细胞、血管内皮细胞、肠黏膜上皮细胞、肠腺上皮细胞、肠固有层淋巴细胞等(图 1~3)。但在胸腺、法氏囊、脾、心、肺、大脑、小脑中凋亡细胞较少,只有少量的淋巴细胞、心肌细胞、呼吸毛细管上皮细胞、神经元、神经胶质细胞等发生凋亡。一般来说,凋亡细胞的数量在静脉接种组略多于混合接种组,接种后 1、3、5 d 多于接种后 10 d(表 1)。而在省去 TUNEL 反应液的阴性对照中,各种组织均未见凋亡反应阳性细胞。

### 2.2 电镜观察结果

电镜下观察,对照组健康鸭的各种组织器官的结构正常,未见细胞变性坏死等明显的病理变化,细胞凋亡也极少见,只有个别器官偶见个别凋亡细胞。接种禽流感病毒的鸭,在心、肝、脾、肺、肾、胰、大脑、小脑、胸腺、法氏囊等器官中,除了可见变性坏死的细胞外,也可观察到凋亡的细胞,其中肾、胰和肝的凋亡细胞较多,胸腺、法氏囊、脾、心、大脑和小脑只有少量凋亡细胞(图 4~6)。凋亡细胞的主要超微

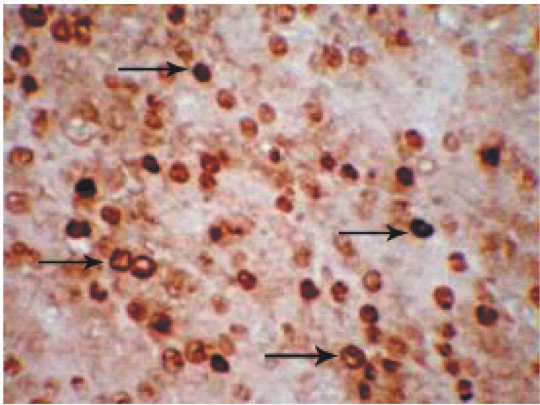


图 1 静脉接种后 5 d, 凋亡的胰腺泡上皮细胞。TUNEL 染色 600×

Fig. 1 Apoptotic pancreatic acinar epithelial cells at 5 days post-inoculation intravenously. TUNEL 600×

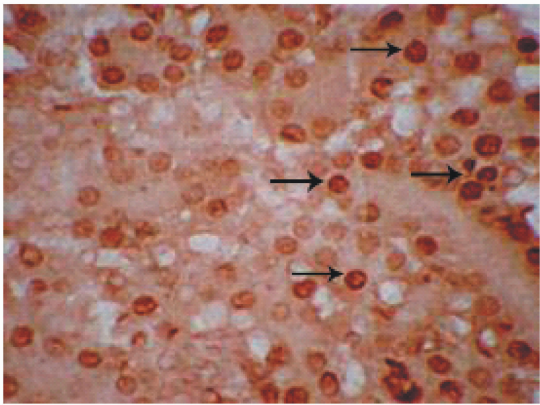


图 2 静脉接种后 5 d, 凋亡的肾小管上皮细胞。TUNEL 染色 600×

Fig. 2 Apoptotic renal tubular epithelial cells at 5 days post-inoculation intravenously. TUNEL 600×

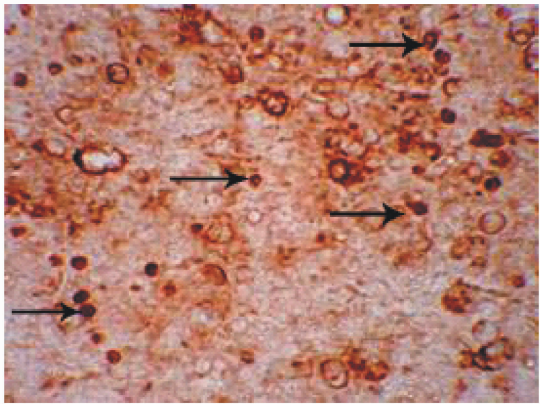


图 3 静脉接种后 5 d, 凋亡的肝细胞。TUNEL 染色 600×

Fig. 3 Apoptotic hepatocytes at 5 days post-inoculation intravenously. TUNEL 600×

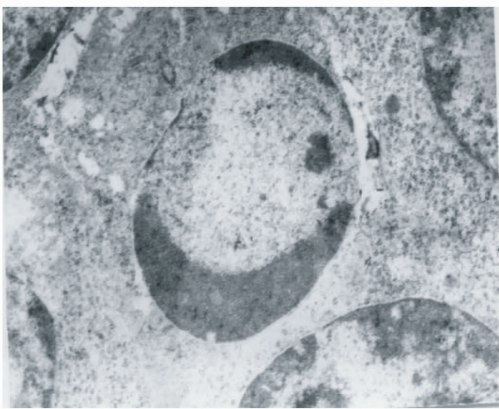


图 4 静脉接种后 3 d, 凋亡的胰腺泡上皮细胞 9 900×

Fig. 4 Apoptotic pancreatic acinar epithelial cell at 3 days post-inoculation intravenously 9 900×

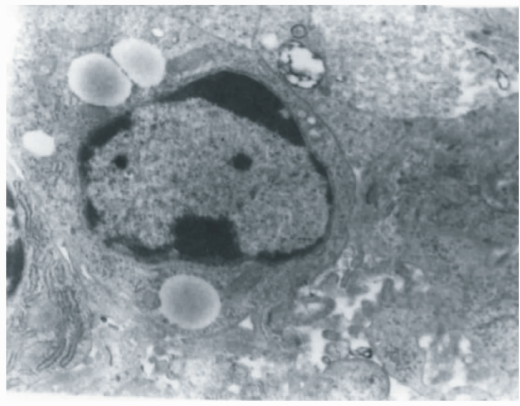


图 5 静脉接种后 3 d, 凋亡的肾小管上皮细胞 6 800×

Fig. 5 Apoptotic renal tubular epithelial cell at 3 days post-inoculation intravenously 6 800×

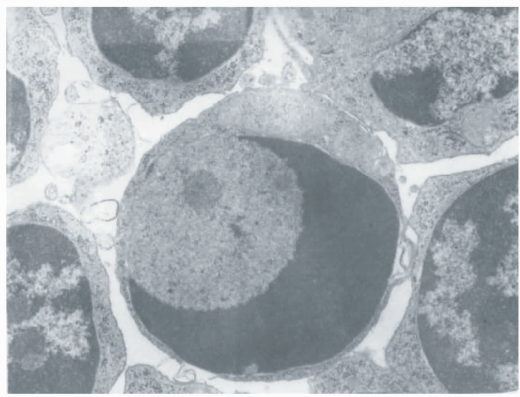


图 6 静脉接种后 3 d, 凋亡的胸腺淋巴细胞 11 000×

Fig. 6 Apoptotic thymocyte at 3 days post-inoculation intravenously 11 000×

表 1 鸭眼-鼻-口腔-泄殖腔混合接种禽流感病毒后各组织器官的细胞凋亡情况  
Table 1 The apoptosis in various organs in ducks inoculated with avian influenza virus by ocular-nasal-oral-cloacal routes

	心 Heart	肝 Liver	脾 Spleen	肺 Lung	肾 Kidney	胰 Pancreas	大脑 Cerebrum	小脑 Cerebellum	胸腺 Thymus	法氏囊 Bursa	十二指肠 Duodenum
对照组 Control	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+	+
1 DPI	+	++	+	+	+++	+++	+	+	+	+	++
3 DPI	+	++	+	+	++++	++++	+	+	+	+	+++
5 DPI	+	++	+	+	++++	++++	+	+	+	+	++
10 DPI	—	+	+	—	++	++	—	—	+	+	+

DPI. Days post-inoculation

结构变化:核内染色质凝集于核膜下形成半月形或花瓣状,线粒体、内质网扩张与细胞膜融合,后期细胞膜内陷或“出芽”包裹细胞内各种成分形成凋亡小体,然后被吞噬细胞吞噬清除。

### 3 讨 论

本试验的结果表明,鸭接种禽流感病毒 A/duck/Guangdong/220/2004 (H5N1) 后,在心、肝、脾、肺、肾、胰、脑、十二指肠、胸腺、法氏囊等器官中,除了可见变性坏死的细胞外,也可观察到凋亡的细胞。其中,肾和胰的凋亡细胞最多,肝和十二指肠中也可见较多的凋亡细胞。在病理组织学观察中发现这些器官具有明显的细胞变性、坏死等损伤<sup>[10]</sup>,在病毒抗原免疫组化染色中观察到这些器官具有较强的免疫阳性反应(另文报道)。这说明该病毒不仅可以引起鸭体内多种组织器官的细胞变性和坏死,而且还可以诱导细胞凋亡。据报道,致病性禽流感病毒 A/chicken/Victoria/1/1985 (H7N7) 可以诱导鸡肝、肾、脑的血管上皮细胞凋亡,也可在这些器官中检查到病毒抗原,提示病毒复制导致被感染鸡的细胞凋亡,认为细胞凋亡可能是致病性禽流感病毒的致病原因<sup>[1]</sup>。鸡接种禽流感病毒 A/duck/Nanjing/21/1995 (H9N2) 后 3 d,其肾、肺、心、肝、脾、胸腺、法氏囊等器官发生了明显的细胞凋亡,其中以肾的细胞凋亡率最高<sup>[2]</sup>。H5N1 亚型禽流感病毒感染人时,可以诱导肺泡上皮细胞凋亡,并可在肺中观察到大量的凋亡白细胞,认为细胞凋亡在人发生禽流感的过程中起重要作用:肺泡上皮细胞的破坏导致肺炎,而白细胞的破坏导致白细胞减少症,这是人患禽流感的主要临床特征<sup>[3]</sup>。一些研究表明,凋亡的发生与流感病毒的毒力无关,不管是低致病力还是

高致病力病毒,都可以诱导细胞凋亡,但凋亡只局限于病毒能造成损伤的器官<sup>[4-6]</sup>。

本试验在心、肺、脑中仅检查到少量的凋亡细胞,但在病理组织学观察中发现这些器官均有明显的损伤<sup>[10]</sup>。其原因可能是,它们的损伤主要是通过细胞变性和坏死,而不是细胞凋亡。另外,在脾、胸腺和法氏囊等免疫器官中也仅见少量的凋亡细胞,但剖检可见胸腺和法氏囊严重萎缩,并且发生时间很早,在静脉接种后 1 d 或者混合接种后 1~2 d 即可出现,而在病理组织学观察中可见这些器官的淋巴细胞大量减少<sup>[10]</sup>。其原因可能是,这些减少的淋巴细胞,一部分迁移到了其他器官,因为在许多非淋巴器官实质和血管中见有大量的淋巴细胞;另一部分可能发生坏死,或者发生了凋亡,但在本试验检查前已经被吞噬细胞吞噬清除了,因而无法检查到凋亡细胞,因为在病理组织学观察中可见组织细胞或巨噬细胞增生的现象<sup>[10]</sup>。另外,在病毒抗原免疫组化染色中,这些器官中也只检查到少量的免疫阳性反应,而且免疫反应物主要存在于细胞碎片中。因此,禽流感病毒 A/duck/Guangdong/220/2004 (H5N1) 对免疫器官的侵害,可能发生在病毒感染的早期。据报道,鸡接种禽流感病毒 A/duck/Nanjing/21/1995 (H9N2) 后 3 d,其脾、胸腺、法氏囊的细胞凋亡率仅为 2.6%、2.2% 和 2.3%,而肾的细胞凋亡率可达 8%~9%<sup>[2]</sup>。

以往研究表明,流感病毒除了可以诱导体内细胞的凋亡,也可以诱导体外培养的细胞(如 HeLa 细胞、MDCK 细胞、单核细胞、淋巴细胞、巨噬细胞等)发生凋亡<sup>[4-9]</sup>。许多 A 型流感病毒(包括禽、马、猪和人的流感病毒),以及人的 B 型流感病毒,都能导致 Madin-Darby 犬肾细胞(MDCK 细胞)的 DNA 断裂,并与病毒感染过程中细胞病理变化的发展相一致;根

据原癌基因 *bcl-2* 是已知的细胞凋亡抑制者,用人的 *bcl-2* 基因转染 MDCK 细胞,这些稳定的转染细胞(MDCK *bcl-2*)在病毒感染后不经历 DNA 的断裂,而且病毒感染后 48~72 h,细胞毒性分析试验表明,与 MDCK 细胞明显低水平的生存能力相比,MDCK *bcl-2* 细胞的生存能力是高水平的,表明 A、B 型流感病毒都能诱导培养的细胞凋亡,认为细胞凋亡可能是宿主感染流感病毒后细胞死亡的普遍机制<sup>[5]</sup>。

关于流感病毒诱导细胞凋亡的确切机制,目前尚未清楚。其中研究最多且叙述较清楚的是 Fas 介导的凋亡信号传导途径<sup>[11]</sup>。据报道,经流感病毒诱导后,Hela 细胞表面的 Fas 表达增加,细胞内的 Fas-mRNA 增多,从而认为流感病毒诱导细胞凋亡的过程可能涉及 Fas 凋亡信号途径的参与<sup>[4]</sup>。Fas 属于肿瘤坏死因子受体/神经生长因子受体家族成员,Fas 与其配体 FasL 结合后可以启动细胞凋亡过程。另外,流感病毒的非结构蛋白 NS1 等在诱导细胞凋亡中也起着重要作用。有人认为,NS1 与 Fas 在结构上有同源性,可以通过 Fas 途径诱导细胞凋亡<sup>[12]</sup>。据报道,禽流感病毒 A/HK/483/1997 (H5N1)编码的 NS1 蛋白可以通过激活 Caspase-3、7、8 而诱导人的肺上皮细胞凋亡<sup>[13]</sup>。马流感病毒也可通过激活 Caspase 而诱导细胞凋亡<sup>[14]</sup>。还有,A 型和 B 型流感病毒的神经氨酸酶(NA)糖蛋白可以通过增强 TGF- $\beta$  的活性而诱导细胞凋亡<sup>[15-16]</sup>。在禽流感病毒感染机体产生抗体的过程中,细胞毒性淋巴细胞因子,如肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )也可诱导细胞凋亡<sup>[9]</sup>。流感病毒还可通过上调肿瘤抑制蛋白 p53 的表达,而诱导受感染的细胞凋亡<sup>[17]</sup>。

**致谢:**本研究得到辛朝安教授、毕英佐教授和罗开健副教授的大力支持和热情帮助,特致谢忱。

## 参考文献:

- [1] ITOH T, KOBAYASHI Y, MORITA T, et al. Virulent influenza A viruses induce apoptosis in chickens[J]. *Virus Res*, 2002, 84(1-2):27-35.
- [2] 林祥梅. 鸭源流感病毒人工感染鸡的发病机理研究[D]. 南京:南京农业大学,1998:1-97.
- [3] UIPRASERTKUL M, KITPHATI R, PUTHAVATHANA P, et al. Apoptosis and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) virus in humans[J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(5):708-712.
- [4] TAKIZAWA T, MATSUKAWA S. Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells[J]. *J Gen Virol*, 1993, 74:2347-2355.
- [5] HINSHAW VS, OLSEN CW, DYBDAHL-SISSOKO N, et al. Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses[J]. *J Virol*, 1994, 68(6):3667-3673.
- [6] FESQ H, BACHER R. Programmed cell death (apoptosis) in human monocytes infected by influenza A virus[J]. *Immunobiology*, 1994, 190:175-182.
- [7] LOWY R J, BIMITROV D S. Induction of apoptosis in macrophages by influenza virus[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 6:2063-2069.
- [8] HECHTFISCHER A, MARSCHALL M, HELTEN A, et al. A highly cytopathogenic influenza C virus variant induces apoptosis in cell culture[J]. *J Gen Virol*, 1997, 78(Pt 6):1327-1330.
- [9] HORNICKOVA Z. Different progress of MDCK cell death after infection by two different influenza virus isolates[J]. *Cell Biochem Funct*, 1997, 15(2):87-93.
- [10] 李玉谷, 周泉鹤, 崔聪颖, 等. 一株 H5N1 亚型高致病力禽流感病毒人工感染鸭的组织病理学观察[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(10):1373-1381.
- [11] 王幼明, 黄克和. 禽流感的病理学进展[J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(2):83-86.
- [12] ITOH N, YONEHARA S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis[J]. *Cell*, 1991, 66:233-243.
- [13] LAM W Y, TANG J W, YEUNG A C, et al. Avian influenza virus A/HK/483/97 (H5N1) NS1 protein induces apoptosis in human airway epithelial cells[J]. *J Virol*, 2008, 82(6):2741-2751.
- [14] LIN C, HOLLAND R E J, DONOFRIO J C, et al. Caspase activation in equine influenza virus induced apoptotic cell death[J]. *Vet Microbiol*, 2000, 84(4):357-365.
- [15] SCHULTZ-CHERRY S, HINSHAW V S. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta[J]. *J Virol*, 1996, 70(12):8624-8629.
- [16] SCHULTZ-CHERRY S, KOCI M, THOMPSON E, et al. Examining the cellular pathways involved in influenza virus induced apoptosis[J]. *Avian Dis*, 2003, 47(3 Suppl):968-971.
- [17] TURPIN E, LUKE K, JONES J, et al. Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 in cell death and viral replication[J]. *J Virol*, 2005, 79(14):8802-8811.