

禽白血病病毒 J 亚群 (ALV-J) 免疫抑制特性研究

张利¹, 刘青², 王晓伟², 王峰², 陈洪博², 成子强^{2*}

(1. 山东农业大学科学技术处, 泰安 271018; 2. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘要: 本研究人工接种 1 日龄及 7 日龄 SPF 雏鸡禽白血病病毒 J 亚群 (ALV-J), 模拟先天感染及早期感染, 检测 ALV-J 不同感染时间对机体的影响。对感染鸡体质量、免疫器官质量、组织病理学、血细胞、CD4⁺ 及 CD8⁺ T 淋巴细胞进行了检测。结果发现, ALV-J 对免疫器官抑制显著, 尤其是中枢免疫器官, 1 日龄感染组的抑制程度显著高于 7 日龄感染组。免疫器官的抑制是产生体质量抑制的根源。病理学观察发现, 1 日龄感染组中枢免疫器官淋巴细胞流失严重, 间质结缔组织明显增生; 而 7 日龄感染组在 3 周前表现为免疫细胞增殖, 在 3 周以后淋巴细胞逐渐坏死流失, 其他器官主要表现为炎性浸润及出血, 未见肿瘤增生灶。血细胞检测发现, ALV-J 感染组粒细胞、淋巴细胞和红细胞均有下降, 但对粒细胞的影响更加明显, 1 日龄感染鸡更为严重。对胸腺和脾脏 CD4⁺ 及 CD8⁺ T 淋巴细胞检测发现, CD4⁺ 细胞数量明显下降, 而 CD8⁺ 细胞数量明显升高, 说明机体的免疫抑制和这两种细胞的变化高度相关。无论是 1 日龄还 7 日龄感染, 均在 4 周龄时达到免疫抑制最低值, 因此可以确定 ALV-J 感染在体内潜伏期约为 3~4 周的时间。ALV-J 造成机体免疫力极其低下, 为肿瘤的形成及混合感染创造了条件。

关键词: 禽白血病病毒 J 亚群; 免疫抑制; 免疫细胞

中图分类号: S852.659.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)09-1198-05

Immunosuppressive Characters of Avian Leukosis Virus Subgroup J

ZHANG Li¹, LIU Qing², WANG Xiao-wei², WANG Feng², CHEN Hong-bo², CHENG Zi-qiang^{2*}

(1. Department of Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: SPF birds were inoculated with avian leukosis virus subgroup J- NX0101 strain at 1 day age and 7 day age, respectively - analog congenital infection and early infections. Detect the effect of immune system caused by ALV-J. Body weight, immune organs weight, histopathology, blood cells, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in spleen and thymus were tested. Results showed that ALV-J suppressed significantly not only body weight but also immune organs, especially in thymus and the bursa of Fabricius from 2 weeks age. The most serious immunosuppression occurred post inoculation 3 to 4 weeks. Histopathology observation found that most immune cells were destroyed and interstitial connective tissue proliferation in thymus and the bursa of Fabricius. The other organs showed inflammatory infiltrate and hemorrhage. Tumor was not seen in any organs. Blood detection showed that ALV-J caused granular leukocytes, lymphocytes and erythrocytes decreasing, especially group 1. CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes detection in spleen and thymus showed that CD4⁺ cell number decreased, while CD8⁺ cell number increased at 5 weeks age. It is confirmed that the immunosuppression caused by ALV-J was high related with the two kinds of cells. The study demonstrated that the latent period of ALV-J *in vivo* was at 3 to 4 weeks after infection.

Key words: avian leukosis virus subgroup J (ALV-J); immunosuppression; immune cells

收稿日期: 2010-01-24

基金项目: 国家自然科学基金 (30871856)

作者简介: 张利 (1976-), 女, 黑龙江齐齐哈尔人, 硕士生, 主要从事兽医管理理学研究, E-mail: honey@sda.u.edu.cn

* 通讯作者: 成子强, E-mail: czqsd@126.com

J 亚群白血病目前已成为家禽中的常见病,其以免疫抑制及髓细胞瘤为特征。此病于 1991 年,由英国的 Payne 等^[1]首次在肉种鸡中发现,并分离到 J 亚群禽白血病毒(ALV-J),其属于禽白血病毒家族中的第 10 个成员。该病 1998 年在世界范围内暴发,给世界养禽业造成了沉重打击。1999 年,杜岩等^[2]在国内首次从商品代肉鸡中分离并检测到 ALV-J 病毒。2000 年以后,J 亚群白血病在我国鸡群中全面暴发,并呈现出宿主范围扩展^[3-5]、多重混合感染^[6-7]及肿瘤多样化^[8]的新趋势,使我国 ALV-J 的感染形势更为复杂。

ALV-J 除了诱导肿瘤的生长以外,其对鸡群的主要影响是免疫抑制,造成体质量下降及产蛋量降低,并成为其他疾病的诱因^[9-10],因此,ALV-J 已经成为家禽业中的一个极重要的病原。

禽白血病的消除计划主要是根据淋巴细胞白血病的垂直传播特性制定的。在垂直传播方面,ALV-J 与其他外源性 ALV 极其相似,因此有人认为对于 ALV 的消除计划^[11]也适合于 ALV-J^[12]。然而,ALV-J 的水平传播要比其他亚群强的多,因此 ALV-J 需要一个不同于 ALV 的消除计划。而要建立一个完整的 ALV-J 消除计划,必须是在对 ALV-J 感染后机体状态的全面了解的基础之上,才能科学的、逐步的消除 ALV-J 在我国的感染。

本研究通过人工感染 SPF 雏鸡 ALV-J,定期检测相应指标,以确定 ALV-J 感染后机体的免疫状态及免疫抑制产生的关键时间。

1 材料和方法

1.1 材料

病毒,ALV-J NX0101 毒株,由山东农业大学动物科技学院崔治中教授惠赠;SPF 雏鸡,购自济南赛斯公司;CD4-FITC、CD8-PE 单克隆抗体,购自北京博奥森生物技术有限公司(代理)。

1.2 方法

1.2.1 SPF 雏鸡感染及饲养 健康 1 日龄 SPF 蛋雏鸡 39 只随机分为 3 组,每组 11 只。第 1 组为 1 日龄攻毒组,第 2 组为 7 日龄攻毒组,第 3 组为空白对照组。腹腔接种相同剂量病毒(约 10^3 TCID₅₀)。接种后,严格隔离饲养,观察记录临床表现。分别在 2、3、4、5 周龄每组剖检 3 只检测各项指标,以 3 只鸡数值平均数制图。

1.2.2 临床及病理学检测 采血前称量体质量,

仔细观察大体病变,称量脾、胸腺和法氏囊的质量,并取其他各器官于 10% 福尔马林固定,制备组织切片进行组织病理学观察。

1.2.3 血液学指标检测 颈静脉采血,肝素抗凝,通过血细胞分析仪对白细胞总数、淋巴细胞数、粒细胞数及红细胞数进行检测。

1.2.4 流式细胞仪检测 将约 5 mg 的胸腺和脾脏,用注射器芯在细胞滤器上轻轻充分研磨,以冷 PBS 冲洗,冷冻离心机 $4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清,用红细胞裂解液裂解 5~8 min, $4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清,用 FACS Buffer(含 2% 血清的 PBS)调整细胞浓度为 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$,加入 CD4-FITC 或 CD8-PE 特异性单克隆抗体(1:100 倍稀释),4℃ 避光孵育 30 min,用 FACS Buffer 洗涤, $4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 弃上清,加 200 μL 多聚甲醛固定液后在流式细胞仪 Guava Easycyte Mini(Guava Inc, American)上检测。

2 结果

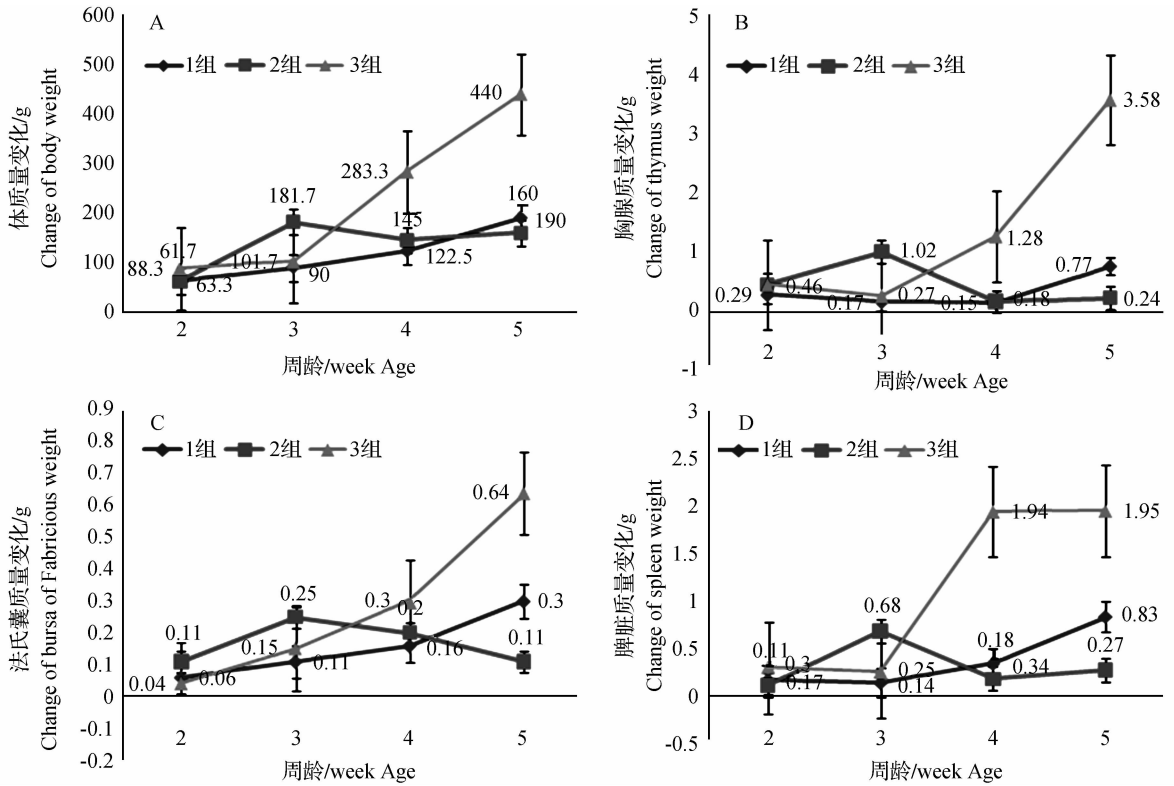
2.1 雏鸡感染 ALV-J 后临床指标检测结果

2.1.1 体质量变化 如图 1A 所示,在 2 周龄时,感染组与对照组差异不显著;在 3 周龄时,第 1 组与第 3 组平均体质量没有差异,但第 2 组平均体质量显著高于第 1 组及第 3 组;4 周龄时,第 3 组体质量显著增加,第 1 组略微增加,而第 2 组体质量下降,略微高于第 1 组,显著低于第 3 组;5 周龄时,第 1 组和第 2 组都略有上升,但都显著低于第 3 组。从感染组体质量的变化趋势来看,1 日龄感染组在 3 周龄以前与对照组体质量无显著差异,说明在感染 3 周时,病毒在 1 日龄感染组鸡体内仍处于潜伏状态,出现持续而且明显的体质量抑制发生在 4 周龄;而 7 日龄感染组在 3 周龄时(感染后 2 周)体质量明显上升,甚至高于对照组,3 周龄后才出现体质量下降,为何病毒后天感染的早期对机体具有增体质量作用? 这一现象值得进一步研究。

2.1.2 胸腺、法氏囊及脾脏质量变化 如图 1B、C 和 D 所示,胸腺法氏囊及脾脏质量变化趋势与体质量变化趋势相似。胸腺:1 日龄感染组受影响最大,从第 2~4 周持续走低,在第 5 周才略有上升;7 日龄感染组在 3 周龄时和体质量一样有一个突然升高的高峰,然后下降,到第 5 周时甚至低于第 1 组。法氏囊和脾脏 1 日龄感染组受影响比胸腺轻微,其出现持续的上升,虽然上升比较缓慢;7 日龄感染组

变化趋势与胸腺相似。从免疫器官的总体变化趋势可以看出,受影响最大的是胸腺,其次是法氏囊和脾脏。7日龄感染组在感染后2周时,均出现免疫增

强的现象,然后持续降低,体现了免疫器官与病原的斗争过程。



A. 体质量随日龄变化图。第1组和第2组 ALV-J 均产生明显的体质量抑制; B、C 和 D 分别为:胸腺质量、法氏囊质量和脾脏质量随日龄变化图

A. Dynamic change of body weight, significant suppression by ALV-J of both group 1 and group 2; B, C and D: changes of thymus, bursa of Fabricius and spleen weight

图1 临床指标检测结果

Fig. 1 The results of clinical indexes

2.2 雏鸡感染 ALV-J 后血液学指标检测结果

2.2.1 白细胞总数及淋巴细胞数 如图 2A 和 B, 白细胞总数及淋巴细胞数变化趋势基本一致, 感染组从第 2 周开始, 明显低于对照组。其中 1 组在经历 4 周龄时的一个低谷后, 产生一个明显的跃升, 原因不明; 而第 2 组在 3 周龄后开始持续下降。说明病毒对淋巴细胞具有明显的杀伤作用。

2.2.2 粒细胞总数 如图 2C, 粒细胞的变化趋势明显不同于淋巴细胞。在 2 周龄时, 感染组都明显低于对照组, 但在 3 周龄时, 第 2 组粒细胞数却显著高于第 1 组及第 3 组, 在第 4 周略微上升后, 却突然下降, 在第 5 周时, 明显低于第 1 组及第 3 组。分析: 在粒细胞中, 髓细胞是 ALV-J 的靶细胞, 在其与 ALV-J 接触过程中, 在 ALV-J 的刺激下, 迅速增

殖, 以抵抗病毒的杀伤, 但病毒持续的复制可能对细胞的损伤进一步加强, 因此在持续 2 周的升高后, 突然下降, 并且降至比 2 周龄时还低。髓细胞数量的急剧下降, 降低了机体的炎症反应能力, 为进一步肿瘤的形成创造了条件。

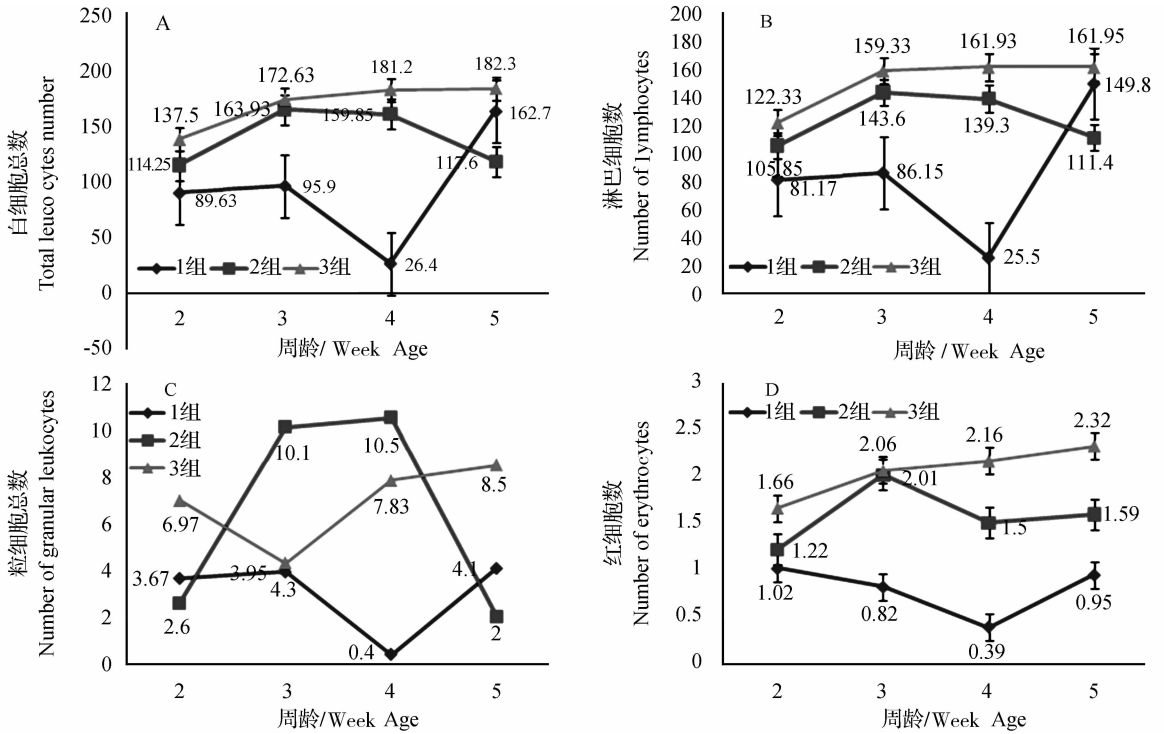
2.2.3 红细胞数量 如图 2D, 第 1 组红细胞数量明显降低于第 2 组及第 3 组, 说明 1 日龄感染 ALV-J 出现了明显的病毒血症, 贫血现象更为明显, 更易产生肿瘤; 第 2 组红细胞数量介于第 1 组与对照组之间, 说明早期感染, 机体产生一定的抵抗作用。

2.3 雏鸡感染 ALV-J 后 T 淋巴细胞检测结果

应用流式细胞仪检测 5 周龄时胸腺及脾脏中 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的比例变化。从图 3 可以看

出,胸腺受病毒的影响非常严重,尤其是 CD4⁺ 明显降低;脾脏内感染组 CD8⁺ T 细胞高于对照组,第 1 组最高;而 CD4⁺ T 细胞却明显降低,这可能是

ALV-J 造成机体免疫抑制的根本原因;CD4⁺ CD8⁺ T 细胞比例明显升高,说明 1 日龄感染 ALV-J 后,抑制了 CD4⁺ CD8⁺ 细胞分化为 CD4⁺ 细胞。

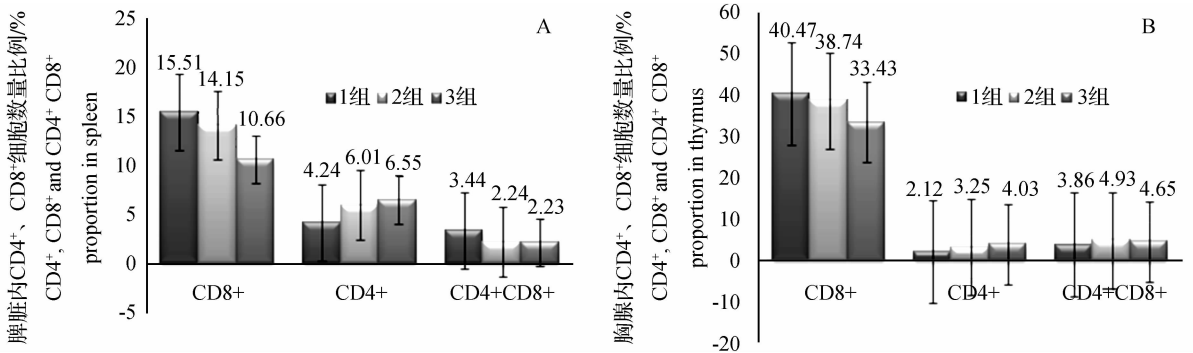


A. 白细胞总量;B. 淋巴细胞数量;C. 粒细胞数量;D. 红细胞数量

A. Total leucocytes number; B. Number of lymphocytes; C. Number of granular leukocytes; D. Number of erythrocytes

图 2 血细胞数量随日龄变化图

Fig. 2 Dynamic change of blood cells number



A. 脾脏内 CD4⁺、CD8⁺ 细胞数量比例;B. 胸腺内 CD4⁺、CD8⁺ 细胞数量比例

A. CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺ CD8⁺ proportion in spleen; B. CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺ CD8⁺ proportion in thymus

图 3 第 5 周龄,脾脏及胸腺内 CD8⁺、CD4⁺ 及 CD4⁺ CD8⁺ 细胞数量比例

Fig. 3 CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺ CD8⁺ proportion in spleen and thymus at 5 weeks age

2.4 病理组织学检测结果

2.4.1 免疫器官 第 1 组胸腺、法氏囊和脾脏从第 2 周开始出现持续的抑制,主要表现为淋巴细胞的变性和坏死,其中胸腺中的淋巴细胞流失最为严重,在第 5 周时,3 种免疫器官的间质结缔组织明显

增生,无免疫抵抗现象出现;而第 2 组在 3 周龄以前主要表现免疫器官的炎症反应——淋巴细胞增殖,在 3 周龄以后淋巴细胞开始大量流失,5 周龄时淋巴细胞流失约 70% 以上,间质结缔组织明显增生,这与免疫器官的质量变化一致,说明免疫器官在与

病原斗争时,病原逐渐抑制了免疫细胞的功能,最终导致免疫系统的崩溃。

2.4.2 其他器官 发生明显变化的是肝脏、肾脏和骨髓,主要表现为实质细胞的变性和间质炎性细胞浸润。

3 讨论

本研究发现,越早感染 ALV-J,对机体的体质量抑制越明显, Kim 等^[10]研究显示,在 2 周龄以后感染时,ALV-J 对机体的体质量抑制不明显。在 2 周龄时,鸡免疫器官已经基本发育成熟^[13],因此对 ALV-J 的感染具有一定抵抗作用。在图 1 中我们可以看出,第 2 组的指标总是在上升后再下降,说明后期 ALV-J 感染后,机体产生了一定的抵抗作用,免疫器官的变化基本与体质量变化一致,因此,从临床的角度来看,体质量的变化反应了机体的免疫状态。ALV-J 对中枢免疫器官的抑制更明显,从胸腺和法氏囊的动态变化来看,ALV-J 不仅对 T 淋巴细胞产生抑制作用,而且还对 B 淋巴细胞也产生了明显的抑制作用,这种持续抑制的发生,是导致肿瘤产生的先决条件。

血液学指标检测发现,ALV-J 对所有的白细胞及红细胞均产生明显的影响,说明 ALV-J 对机体的抑制首先是全面的抑制,在感染 3~4 周时,选择性抑制髓细胞明显增强,从图 2C 可以看出,第 2 组的粒细胞变化明显不同于其他细胞。从变化曲线来看,无论 1 日龄感染还是 7 日龄感染,免疫抑制最严重的时期均发生在第 4 周龄,也就是感染后的 3~4 周时间,因此这个时间也是免疫抑制的关键时间,为制定 ALV-J 消除计划提供了重要参考。

脾脏 T 淋巴细胞的检测进一步说明,CD4⁺T 细胞是 ALV-J 攻击的重要细胞,CD4⁺细胞数量的下降将造成细胞免疫体系的崩溃。病理组织学观察发现,1 日龄感染组与 7 日龄感染组在免疫器官所表现的变化稍有不同,1 日龄感染组表现为持续的免疫细胞流失,而 7 日龄感染组在经历 2 周的炎性增生后,免疫细胞才迅速流失。免疫细胞主要以坏死、凋亡的形式流失。说明先天感染造成的免疫抑制是相当严重的,而在免疫器官成熟后感染 ALV-J,机体对其具有一定的抵抗性。

本研究从不同角度检测了 ALV-J 感染后机体的变化,为将来 ALV-J 消除计划的制定提供了重要

的参考。

参考文献:

- [1] PAYNE L N, BROWN S R, BUMSTE A D, et al. A novel subgroup of anain leucosis virus in chickens [J]. *J Gen Virol*, 1991, 72: 801-807.
- [2] 杜 岩,崔治中,秦爱建,等. 鸡的 J 亚群白血病病毒的分离及部分序列比较[J]. *病毒学报*, 2000, 16(4): 341-346.
- [3] 徐滨蕊,董卫星,何召庆,等. 间接荧光抗体法快速诊断海兰褐蛋鸡 J 亚群禽白血病的研究[J]. *中国兽医杂志*, 2002, 38(9): 7-9.
- [4] XU B, DONG W, YU C, et al. Occurrence of avian leucosis virus subgroup J in commercial layer flocks in China [J]. *Avian Pathol*, 2004, 33(1): 13-17.
- [5] 成子强,张 利,刘思当,等. 中国麻鸡中发现禽 J 亚群白血病[J]. *微生物学报*, 2005, 45(4): 584-587.
- [6] 张 志,崔治中,姜世金. 从 J 亚群禽白血肿瘤中检测出禽网状内皮组织增生症病毒[J]. *中国兽医学报*, 2004, 24(1): 10-13.
- [7] 成子强,张玲娟,刘 杰,等. 蛋鸡中发现 J 亚群白血病与网状内皮增生症自然混合感染[J]. *中国兽医学报*, 2006, 26(6): 586-590.
- [8] 成子强. J 亚群白血病相关肿瘤[C]//成子强. 中英肿瘤性疾病研讨会论文集. 泰安: [出版者不详] 2009: 7.
- [9] KIM Y, BROWN T P, PANTIN-JACKWOOD M J. Effects of cyclosporin A treatment on the pathogenesis of avian leukosis virus subgroup J infection in broiler chickens with Marek's disease virus exposure [J]. *J Vet Sci*, 2003, 4(3): 245-255.
- [10] KIM Y, BROWN T P, PANTIN-JACKWOOD M J. The effects of cyclophosphamide treatment on the pathogenesis of subgroup J avian leukosis virus (ALV-J) infection in broiler chickens with Marek's disease virus exposure [J]. *J Vet Sci*, 2004, 5(1): 49-58.
- [11] SPENCER J L. Progress towards eradication of lymphoid leukosis viruses-A review [J]. *Avian Pathol*, 1984, 13: 599-607.
- [12] WITTER R L, BACON L D, HUNT H D, et al. Avian leukosis virus subgroup J infection profiles in broiler breeder chickens: association with virus transmission to progeny [J]. *Avian Dis*, 2000, 44: 913-931.
- [13] 栾维民,杨树宝,杨丽华,等. 鸡脾脏中 T 淋巴细胞及其亚群的发育[J]. *中国兽医学报*, 2008, 28(6): 684-687.