

文章编号:1000-0614(2001)05-0464-05

## 传染性脾肾坏死病毒、ConA 和 LPS 对 体外鳊的头肾淋巴细胞转化的影响

曾 慷<sup>1,2</sup>, 何建国<sup>2</sup>, 王晓红<sup>2</sup>, 翁少萍<sup>2</sup>, 左 涛<sup>2</sup>

(1.暨南大学生物工程系,广东 广州 510630; 2.中山大学生命科学学院,广东 广州 510275)

**摘要:**采用 MTT 颜色反应法研究传染性脾肾坏死病毒 (ISKNV)、伴刀豆球蛋白 A (concanavallin A, ConA) 和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 在离体状态下对健康和 ISKNV 感染后存活 30d 或 60d 的鳊的头肾淋巴细胞转化的影响。结果表明, ConA 和 LPS 能促进健康鳊头肾淋巴细胞的转化, 而对感染后存活 30d 或 60d 的鳊头肾淋巴细胞没有作用; 纯化的 ISKNV 对健康鳊头肾淋巴细胞没有促进淋巴细胞转化的作用, 但对 ConA 的作用有抑制, 对感染后存活的 30d 或 60d 的鳊头肾淋巴细胞, 纯化的 ISKNV 有一定的促进转化的作用。感染存活的鳊头肾中有对 ISKNV 的免疫记忆性 T 细胞。另外, 用建立的 ISKNV PCR 检测方法对健康和 ISKNV 感染后存活的鳊组织进行了检测, 结果显示, 健康鳊为阴性, 而 ISKNV 感染后存活的鱼, 头肾、后肾、脾脏和部分鱼的心脏为阳性。ISKNV 在鳊体内形成潜伏感染。

**关键词:**感染后存活鳊; 传染性脾肾坏死病毒; 淋巴细胞转化; PCR 检测

**中图分类号:** S941.41 **文献标识码:** A

### *In vitro* influences of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), ConA and LPS on the pronephric lymphocytes from *Siniperca chuatsi*

ZENG Kang<sup>1,2</sup>, HE Jian-guo<sup>2</sup>, WANG Xiao-hong<sup>2</sup>, WENG Shao-ping<sup>2</sup>, ZUO Tao<sup>2</sup>

(1. Department of Bio-Engineering, Jinan University, Guangzhou 510630, China;

2. School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** *In vitro*, the influences of ISKNV, concanavallin A (ConA) and lipopolysaccharide (LPS) on the pronephric lymphocytes from healthy mandarin fish *Siniperca chuatsi* and survivors for 30d or 60d infected from ISKNV were determined by the MTT colorimetric assay method. The results showed that the pronephric lymphocytes from healthy mandarin fish proliferated in response to ConA and LPS, not to ISKNV. However, ISKNV were effective to suppress the function of ConA. The pronephric lymphocytes from mandarin fish surviving for 30d or 60d from ISKNV did not proliferate in response to ConA and LPS, and were susceptible to ISKNV. The T cell may exist in pronephron. In addition, the healthy mandarin fish were negative and the fish surviving from ISKNV 30d or 60d were positive in the tissues of spleen, kidney and heart in part by PCR assays for ISKNV DNA. ISKNV was latent in survivors.

**Key words:** *Siniperca chuatsi* surviving from ISKNV; infectious spleen and kidney necrosis virus; lymphocyte

收稿日期:2000-09-18

基金项目:广东省自然科学基金资助项目

第一作者:曾 慷(1968-),男,湖南长沙人,博士,主要从事低等动物免疫学方面的研究。Tel:020-85223259

proliferation; PCR assays for ISKNV

目前虹彩病毒科(Iridoviridae)中有淋巴囊肿病毒属和类金鱼病毒 1 型属中的病毒感染鱼类<sup>[1]</sup>。在八十年代前,能引起鱼类疾病的虹彩病毒只有淋巴囊肿病毒,而且感染是良性和自我恢复的。近十几年来,鱼类的虹彩病毒病在世界范围内的养殖鱼类和野生鱼类中大量流行,据统计,目前已在 100 多种鱼类中报道有虹彩病毒病的发生<sup>[2]</sup>。在这些病毒病中那些能够引起系统性感染的虹彩病毒病危害尤为严重<sup>[3]</sup>。在我国的养殖鱼类中,何建国等<sup>[4]</sup>报道在发生暴发性传染病的鳊(*Siniperca chuatsi*)体内观察到一种病毒,通过回归感染证实其病原性,并认为是鳊暴发性疾病的主要病原。随后,邓敏等<sup>[5]</sup>和翁少萍等<sup>[6]</sup>对病毒感染组织的特异性、特征性病理变化以及分子生物学特性进行了研究,认为此病毒是一种能引起系统性感染的虹彩病毒,命名为传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)。同时曾慷等<sup>[7]</sup>对病毒的宿主范围、传播途径以及温度对感染的影响作了研究。

本文利用 ISKNV、ConA 和 LPS 对健康的和感染后存活鳊的头肾淋巴细胞的功能进行了初步研究,以及用已建立的 ISKNV PCR 检测方法对感染后存活鳊的内脏组织进行了检测。这对于了解 ISKNV 对鳊免疫功能的影响和潜伏性有一定的意义。

## 1 料与方法

### 1.1 实验鳊

健康鳊:从无 ISKNV 发病史的东莞市鳊养殖池购入,体重平均为 100g,暂养于本研究室的水泥池中,充气与循环过滤水,温度为 26℃,每日投喂 1% 鳊体重的健康草鱼苗。三周后,鱼无异常,同时用 PCR 检测方法<sup>[5]</sup>,随机抽验鳊无 ISKNV 阳性后,用于本实验。

感染后存活鳊:用人工浸泡的感染方式感染健康鳊,方法参考文献<sup>[7]</sup>。在感染后 5d,感染鱼表现 ISKNV 症状前 48h 内降低至 15℃养殖温度,2 周后将未发病死亡的鱼 48h 内升温至 28℃养殖,此后感染鳊不再发病。在 28℃分别养殖 30d 和 60d 后,用于本实验。另外,健康鳊经过同样的温度处理作为对照组。

### 1.2 纯化病毒离子的制备

取濒临死亡的人工感染 ISKNV 的鳊的脾脏和头肾,组织学确定在这些组织中病毒感染的细胞在 50% 以上。将脾脏和头肾剪碎,4℃匀浆后,用灭菌 PBS(pH 7.2,含 500 IU·mL<sup>-1</sup>青霉素和 500μg·mL<sup>-1</sup>链霉素)按 1:10(w/v)稀释后放入 4℃冰箱中过夜。次日稀释匀浆液于 4℃,3 000g 离心 10min;取上清液,于 4℃,6 000g 离心 20min;上清液通过 0.45μm 的滤膜后,于 4℃,20 000g 离心 1h,沉淀悬于少量的无菌 PBS(pH 7.2)中。将病毒悬液铺于不连续蔗糖梯度(30%、40%、50%、55%和 60%)上,于 4℃,60 000g 离心 1.5h,取在梯度为 55%和 60%之间的病毒带;于 4℃,20 000g 离心 45min,沉淀即为纯化的病毒离子。沉淀的病毒悬于少量的无菌 PBS(pH 7.2)中。

### 1.3 头肾淋巴细胞的分离

方法参考文献<sup>[8]</sup>。分别取健康鳊和感染后存活的鳊,用 0.05% 的 MS-222 麻醉后,切去尾柄从尾静脉放血,减少头肾的血液。体表用 70% 的酒精浸泡消毒后,无菌操作手术刀从鱼的头部和躯干部之间切开,取出头肾放入 RPMI1640 培养基(每毫升含 100 IU 青霉素和 100μg 链霉素,10 IU 肝素钠)中。用眼科剪将头肾剪碎后挤压过 200 目的不锈钢筛网后,于 4℃,800 r·min<sup>-1</sup>离心 10min,沉淀细胞悬于 RPMI1640 培养基中,头肾淋巴细胞在 Ficoll-paque PLUS(比重为 1.077g·mL<sup>-1</sup>)细胞分离液上分离。分离的淋巴细胞用 RPMI1640 培养液洗 2 次后,悬浮于完全培养基(RPMI1640,含 50IU·mL<sup>-1</sup>青霉素、50 μg·mL<sup>-1</sup>链霉素和 50μg·mL<sup>-1</sup>卡那霉素,10% 的胎牛血清,0.5% 健康鳊血清,20μmol HEPES,50μmol·mL<sup>-1</sup>巯基乙醇)中,0.4% 的台盼蓝活体染色观察活细胞在 95% 以上,调整细胞浓度为 1×10<sup>6</sup>

个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ ,将调整好的头肾淋巴细胞悬液加入到96孔细胞培养板中,每孔100 $\mu\text{L}$ 。

#### 1.4 淋巴细胞体外转化的方法

每尾实验鱼的头肾淋巴细胞用纯化病毒、ConA、LPS、(ConA + 纯化病毒)等4种刺激物。纯化病毒为每孔加入稀释100倍的纯化病毒悬液100 $\mu\text{L}$ ;ConA(Sigma)浓度为64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (用RPMI1640配制),每孔加入100 $\mu\text{L}$ ;LPS的浓度为160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (用PMI1640配制),每孔加入100 $\mu\text{L}$ ;(ConA + 纯化病毒)为先加入ConA(浓度为64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )100 $\mu\text{L}$ 培养12h后,再加入1 $\mu\text{L}$ 纯化病毒悬液刺激。每种刺激物作8个平行孔。另设对照组加入100 $\mu\text{L}$ 的RPMI1640培养基。

#### 1.5 MTT法检测淋巴细胞转化能力

采用MTT颜色反应法测定头肾淋巴细胞转化的活性<sup>[9]</sup>。在淋巴细胞加入各种转化刺激物后,培养板放入CO<sub>2</sub>培养箱(2.5% CO<sub>2</sub>,温度为25 $^{\circ}\text{C}$ ,饱和湿度)中培养,62h后,每孔加入MTT溶液(Sigma,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 用无菌PBS配制)50 $\mu\text{L}$ ,继续培养4h,将培养板于4 $^{\circ}\text{C}$ ,1500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10min,去上清液,每孔加入10% SDS溶液100 $\mu\text{L}$ ,培养板在酶标仪(Bio-RAD 50型)上测量OD值(570nm)。

#### 1.6 PCR检测健康鳊和感染后存活的鳊

在每次取健康鱼和感染后存活鱼的头肾时,分别收集鱼的肝脏、脾脏、头肾、后肾、鳃、肠、心脏、性腺和脑等组织,检测这些鱼体组织中是否有ISKNV。针对ISKNV的PCR检测方法的建立由邓敏等<sup>[5]</sup>建立。本实验采用其报道方法。各组织的总DNA用于PCR反应的模板,采用酚氯仿法抽提,乙醇沉淀后无菌水重溶,存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。设计的引物能从ISKNV的DNA中特异性扩增187bp的片段,反应体系为25 $\mu\text{L}$ ,除模板DNA外,尚含有10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl(pH 8.9),50 $\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$  KCl,0.1% Triton-100,1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  MgCl<sub>2</sub>,0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP,10 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物,1 $\mu\text{L}$  Taq DNA聚合酶,上层盖少许矿物油防止蒸发。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预处理2min,进行30个循环,每个循环反应包括94 $^{\circ}\text{C}$  30s,55 $^{\circ}\text{C}$  30s,72 $^{\circ}\text{C}$  1min,循环完成后,72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸10min,取5 $\mu\text{L}$ 反应液在0.8%琼脂糖凝胶上电泳观察。

#### 1.7 数据的处理

结果采用平均值 $\pm$ 标准差, $P < 0.05$ 和 $P < 0.001$ 认为存在显著差异和极显著差异。

## 2 结果

### 2.1 健康鳊头肾淋巴细胞的转化

在离体状态下,与对照组相比,25 $^{\circ}\text{C}$ 时ConA和LPS都是有效的刺激物,能够显著的刺激鳊头肾淋巴细胞的转化,其中ConA的作用比LPS更加有效。而用纯化的病毒离子单独刺激,淋巴细胞的转化没有的变化,但当纯化病毒加入到已被ConA刺激了的淋巴细胞后,降低了ConA的作用,说明纯化病毒能够抑制ConA的淋巴细胞的转化(图1)。

### 2.2 ISKNV感染后存活的鳊的淋巴细胞的转化

与健康鳊相比,其结果截然不同,ConA和LPS对于ISKNV感染后存活30d或60d的鳊,不是一种有效的刺激物,其刺激结果与对照组相比,没有变化;而纯化病毒离子却有一定的刺激转化作用(图2)。

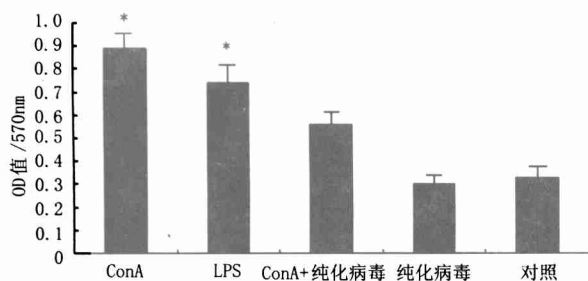


图 1 在离体状态下不同刺激物对健康鳃头肾淋巴细胞转化的影响

Fig.1 *In vitro* the influences of different mitogens on pronephric lymphocytes from healthy *S. chuatsi*

注:数据处理用平均数±标准差,n=7,\*示  $P < 0.05$

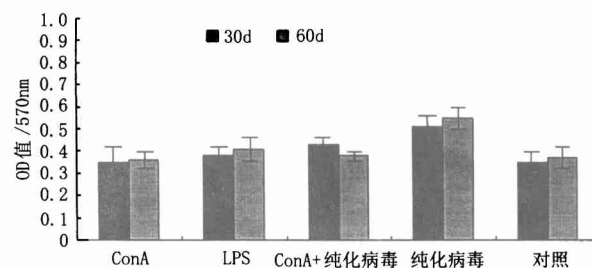


图 2 在离体状态下不同刺激物对感染后 30d 和 60d 的鳃的头肾淋巴细胞转化的影响

Fig.2 *In vitro* the influences of mitogens on pronephric lymphocytes from *S. chuatsi* surviving from ISKNV for 30d and 60d

注:数据处理用平均数±标准差,n=7

### 2.3 PCR 检测

对于健康的鳃,所有的检测结果为阴性。而对于感染后存活 30d 或 60d 的鳃,脾脏、头肾和后部肾的检测结果显示 100% 为阳性;部分心脏的检测结果显示为阳性(表 1)。

表 1 健康和 ISKNV 感染后存活的鳃的组织 PCR 检测结果

Tab.1 The results of PCR assays for ISKNV in the tissues from healthy and surviving from ISKNV for 30d or 60d *S. chuatsi*

检测种类	检测尾数	组织名称								
		脾脏	肝脏	后部肾	头肾	心脏	腮	性腺	肠	脑
健康鳃	7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
感染后存活 30d 的鳃	5	5/5	0/5	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5
感染后存活 60d 的鳃	5	5/5	0/5	5/5	5/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5

### 3 讨论

具有适应性(adaptive)免疫系统的动物一个主要特征是其免疫系统中存在淋巴细胞和免疫球蛋白,鱼类是具有这种免疫系统最原始的动物<sup>[10]</sup>。过去的一些研究表明鱼类的淋巴细胞中能对 ConA 和 LPS 的刺激反应的细胞在功能上相当于哺乳动物的 T 细胞和 B 细胞<sup>[11]</sup>。现在学者一般认为鱼类的头肾相当于哺乳动物的骨髓<sup>[12]</sup>。实验结果表明,健康鳃的头肾淋巴细胞在 ConA 和 LPS 的刺激下能够增生,与以上的观点相一致。对于 ISKNV 感染后的存活鳃,其头肾淋巴细胞却对 ConA 和 LPS 的刺激不反应,而 ISKNV 有一定的作用,这一结果与其他一些报道相似。Estepa 和 Coll<sup>[13]</sup>报道在离体状态下,从病毒性造血组织败血症病毒(VHSV)感染后存活 1 年的虹鳟头肾淋巴细胞,对于 ConA 和 LPS 的刺激,不能引起反应。但是对 VHSV 的刺激却能引起转化。研究表明,VHSV 是一种能够感染鱼类淋巴细胞的病毒<sup>[14]</sup>。ISKNV 主要感染鳃脾脏和肾脏的造血组织,但 ISKNV 感染的宿主细胞目前还不能确定<sup>[6]</sup>。本实验的结果显示纯化的病毒在离体状态下,能够抑制 ConA 的转化作用。这一结果与 Siwicki 等<sup>[15]</sup>在另一种虹彩病毒的实验结果一致。但病毒抑制作用的具体方式还不清楚。

PCR 的检测结果表明,健康鳃都为阴性,进一步肯定了我们实验结果的可靠性。对于 ISKNV 感染后存活 30d 和 60d 的鳃,却能在脾脏和肾脏以及部分心脏中检测到 ISKNV 的存在。这些组织是鳃

ISKNV 主要感染的组织<sup>[6]</sup>。这些结果初步证实了 ISKNV 在鳟体内存在潜伏感染。但无法确定在这些组织中是否有感染性的病毒粒子的存在。关于引起系统性感染虹彩病后其病毒潜伏感染有些不一致的结果。Whittington 等<sup>[16]</sup>通过对虹鳟的研究表明,自然感染 EHNV 后 2~4 月存活的鱼临床表现正常并不能从这种鱼的体内分离出 EHNV,同时在这种鱼体内也检测到特异性抗体的存在。而 Langdon 和 Humphrey<sup>[17]</sup>认为这种从自然感染 EHNV 后存活的河鲈获得了一定的保护性免疫,能成为病毒的携带者,并在此病毒病不流行的季节成为病毒的感染源。Kurita 等<sup>[18]</sup>应用 PCR 检测方法,不能从腹腔注射 RSIV 3 个月后的真鲷的脾脏组织中检测到病毒 DNA 的存在。进一步证实 ISKNV 在鳟中潜伏感染性对于鳟养殖业非常有意义。

#### 参考文献:

- [1] Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. Virus Taxonomy[A]. Sixth report of the international committee on Taxonomy of Viruses [C]. New York and Vienna: Springer-Verlag, Archives of virology, 1995,10(suppl):95-99.
- [2] Tidona C A, Schnitzler P, Kehm R, et al. Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution? [J]. Virus Genes, 1998,16(1): 59-66.
- [3] Ahné W, Bremont M, Hedrick R P, et al. Special topic review: iridoviruses associated with epizootic haematopoietic necrosis (EHN) in aquaculture[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1998,13:367-373.
- [4] 何建国,翁少萍,黄志坚,等. 鳟暴发流行病病毒性病原研究[J]. 中山大学学报(自然科学版),1998,37(5):74-77.
- [5] 邓敏,何建国,左涛,等. 鳟鱼传染性脾肾坏死病毒(ISKNV):PCR检测方法的建立及虹彩病毒新证据[J]. 病毒学报,2000,16(4):85-91.
- [6] 翁少萍,何建国,曾慷,等. 鳟鱼传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)病组织病理与血液生理[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 1998,(增刊):70-76.
- [7] 曾慷,何建国,翁少萍,等. 鳟鱼传染性脾肾坏死病毒(ISKNV)感染途径、宿主范围及对温度敏感性的研究[J]. 中国病毒学, 1999,(12): 354-357.
- [8] Siwicki A K, Klein P, Kiczka W, et al. *In vitro* modulating effects of monomer and dimerized lysozyme on polymorphonuclear (PMN) and mononuclear (MN) cell activity[A]. Stolen J S, et al, eds: Modulators of Immune Responses - The Evolutionary Trail[M]. SOS publications, NY, USA, 1996. 221-232.
- [9] 薛彬. 免疫毒理学实验技术[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版,1995. 19-22.
- [10] Estepa A, Coll M. *In vitro* immunostimulants for optimal responses of kidney cells from healthy trout and from trout surviving viral haemorrhagic septicaemia virus disease[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1992, 2(1): 53-68.
- [11] De Luca D, Wilson M, War G W. Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM[J]. European Journal of Immunology, 1983, 13(5): 546-551.
- [12] Dalmo R A, Ingebrigtsen K, Bogwald J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES)[J]. J Fish Dis, 1997,20(3): 241-273.
- [13] Estepa A, Coll M. Infection of mitogen-stimulated trout leucocytes with salmonid viruses[J]. J Fish Dis, 1991,14(1): 100-108.
- [14] Tafalla C, Figueras A, Novoa B. *In vitro* interaction of viral haemorrhagic septicaemia virus and leukocytes from trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1998, 62(4): 359-366.
- [15] Siwicki A K, Pozet F, Morand M, et al. Effects of iridovirus-like agent on the cell-mediated immunity in sheaffish (*Silurus glanis*) - an *in vitro* study[J]. Virus Res, 1999, 63(1-2): 115-119.
- [16] Whittington R J, Philbey A, Reddacliff G L, et al. Epidemiology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): findings based on virus isolation, antigen capture ELISA and serology[J]. J Fish Dis, 1994, 17(2): 205-218.
- [17] Langdon J S, Humphrey J D. Epizootic haematopoietic necrosis, a new viral disease in redfin perch, *Perca fluviatilis* L, in Australia[J]. J Fish Dis, 1987, 10(2): 289-297.
- [18] Kurita J, Nakajima K, Hirono I, et al. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus(RSIV)[J]. Fish Pathology, 1998,33 (1): 17-23.