

H5N1 亚型禽流感病毒 HA 基因重组 新城疫病毒活载体疫苗株组织嗜性的研究

董俊斌¹, 步志高^{2*}

(1. 内蒙古农业大学, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 中国农业科学院 哈尔滨兽医研究所/兽医生物技术国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要: 为了研究 H5N1 亚型禽流感病毒 HA 基因重组新城疫病毒活载体疫苗株 [La Sota - HAmut(GD)] 的组织嗜性, 用重组疫苗 [La Sota - HAmut(GD)] 人工感染 2 日龄 SPF 鸡, 接种后定期采集病鸡的各组织器官制备成石蜡切片, 用建立的检测石蜡切片中 [rLa Sota - HAmut(GD)] 病毒的免疫酶组化染色技术, 对人工感染 [rLa Sota - HAmut(GD)] 鸡发病后病毒的组织器官亲嗜性和动态分布规律进行研究。[rLa Sota - HAmut(GD)] 在胞浆内复制, 主要亲嗜气管黏膜的上皮细胞和固有层腺体细胞、肝小叶间胆管上皮细胞。病毒出现的先后顺序为气管、肝脏、肺脏。结果表明: 外源基因 *HAmut* 的插入对 LaSota 疫苗株的组织嗜性的影响很大。

关键词: rLa Sota - HAmut(GD); 组织嗜性; 研究

中图分类号: S852.65; S858.32 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)04-0668-05

Studies on the Histotropism of Recombinant Newcastle Disease Virus LaSota Vaccine Strain Expressing HAmut HA Gene of H5 Highly Pathogenicity Avian Influenza Virus

DONG Jun-bin¹, BU Zhi-gao^{2*}

(1. Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: Vaccination was given by eyedrop and intranasally instillation with LaSota - HAmut(GD) (2×10^6 EID₅₀/chicken) to two-day-old SPF chicken, after 1, 3, 5, 10, 15, 18 days the trachea, lungs, livers, kidneys, brains, spleen, proventriculus, duodenum were collected. The distribution of viral antigen in tissues was detected by using immunohistochemical(IHC) staining. As a result, in the chickens of LaSota - HAmut(GD) vaccination, specific staining was localized in the trachea submucosa cells, hepatocytes, bronchus epithelial cells, alveolar macrophages; the appearing sequence of viral antigens in the organs was tracheal, lungs, livers. These results showed that foreign gene *HAmut* inserted rLaSota had a little influence on histotropism of viral antigen.

Key words: Recombinant Newcastle disease virus LaSota vaccine strain; immunohistochemical(IHC) staining; histotropism of viral antigen

收稿日期: 2010-04-19 修回日期: 2010-05-18

基金项目: 国家“973”计划资助项目(2005CB523200)

作者简介: 董俊斌(1975-), 女, 博士生, 主要从事分子病理学研究, E-mail: nydxdbj@163.com; * 通讯作者: 步志高, 研究员, 博士, E-mail: zgb@hvri.ac.cn。

新城疫病毒在分类上属副黏病毒科、腮腺炎病毒属,是一种有囊膜的负链 RNA 病毒^[1]。新城疫是由新城疫病毒(NDV)引起的以主要侵害鸡和火鸡的急性、高度接触性传染病,常以败血症经过,危害极其严重。很多学者正对其病原 NDV 进行研究,NDV 弱毒疫苗可同时诱导全身性体液免疫、局部黏膜免疫及细胞免疫的形成,产生更加全面、确实的免疫保护;可通过饮水、喷雾、滴鼻、点眼或注射多种方式给药,使用极为方便;NDV 弱毒具有高滴度的鸡胚生长特性,生产成本极为低廉。NDV 弱毒疫苗免疫在我国养禽业几乎是所有新生雏鸡必不可少的免疫程序,所有这些使得 NDV 弱毒疫苗成为最具吸引力的重组活病毒疫苗载体。NDV 为高度传染性和高度致死性的家禽疫病原,我国每年用于新城疫防制的弱毒疫苗至少在百亿羽份以上,所以 NDV 弱毒作为活病毒疫苗载体应用的经济意义巨大。包括 LaSota 株在内的 NDV 弱毒疫苗长期以来一直用于家禽防疫,其安全有效性已被充分证明;NDV 遗传相对稳定,仅有一个血清型,毒株间发生重组及毒力返强可能性极小;复制过程在细胞浆内完成,从 RNA 到 RNA,不存在 DNA 阶段及细胞基因组整合的可能^[2-3];NDV 弱毒疫苗可同时诱导全身性体液免疫、局部黏膜免疫及细胞免疫的形成,形成更加全面、确实的免疫保护^[4]。

A 型流感病毒血凝素(HA)是诱导保护性抗体免疫反应的最主要免疫原。GD/96 为中国大陆分离的第一个 H5 亚型禽流感病毒分离株,其 HA 基因被认为与目前流行危害于亚、欧、非洲、危害禽类并导致人类感染发病死亡 H5N1 亚型高致病力禽流感病毒在分子进化上具有共同的祖先,在我国所有 H5 禽流感分离株之间抗原性最具代表性,GD/96 作为早期分离株的代表,HA 基因分别被选择用于重组新城疫病毒的目的外源抗原基因。

重组 NDV 保持野生型 LaSota 疫苗株的高滴度鸡胚生长和低致病性特性,高代次连续传代仍然保持生物学特性和外源重组 HA 基因的稳定表达不变。

1999 年欧洲学者^[5]率先建立了第一个高致病性 NDV 的反向遗传操作系统(reverse genetic system, RGS 系统)。研究表明,NDV 基因组在不同位点插入外源报告基因或免疫原基因,经细胞或鸡胚连续高代次传代仍保持高度的遗传和表达稳定性^[6-7]。我们选择生产实践广泛应用、免疫效果良好的 NDV LaSota 弱毒疫苗株,建立了相应的反向遗传操作系统,成功救获了野生型病毒株,在此基础上,前期实验中重组病毒[rLa Sota - HAmut(GD)]按 10^6 EID_{50%} 常规剂量 1 次免疫 7 日龄 SPF 雏鸡,诱导显著而持久的 NDV 和 H5 亚型 AIV 特异保护性 HI 抗体反应;1 次免疫 3 周后,免疫雏鸡对新城疫强毒致死攻击均为 100% 完全保护;对重组 HA 基因同源和异源 H5 亚型高致病力 AIV 的致死攻击分别形成 100% 完全保护,攻毒后不发病、不死亡且喉头及泄殖腔排毒检测阴性。实验结果表明,重组病毒[rLa Sota - HAmut(GD)]可以作为安全有效、成本低廉的重组二联活疫苗,用于家禽 H5 亚型高致病力禽流感及新城疫的疫苗防制。本实验利用重组[La Sota - HAmut(GD)]接种 2 日龄 SPF 鸡,进行病毒定位研究,对组织嗜性作了初步研究,这对揭示外源基因 HAmut 的插入对 LaSota 亲本疫苗株的病毒定位和组织嗜性的影响及对揭示 LaSota 的免疫机理和对 LaSota 作为疫苗的载体的可行性作了初步探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 本试验选用 2 日龄 SPF 鸡,在哈尔滨兽医研究所的隔离器中饲养。

1.1.2 病毒及抗体 La Sota - vp2 毒株由哈尔滨兽医研究所构建,利用反向遗传操作系统,成功救获了病毒株;抗 NDV NP 蛋白单克隆抗体由哈尔滨兽医研究所研制。

1.1.3 负压隔离器 哈尔滨兽医研究所动物研究中心提供。

1.2 主要试剂

DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;美国 ZYMED 公司 Sp - 9000 免疫组化试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

2 结果分析

2.1 动物免疫与取材

实验分 2 组:第 1 组空白对照组用灭菌 PBS 滴鼻、点眼 100 μ L/只接种 2 日龄雏鸡;第 2 组用[La Sota

-HAMut(GD) 疫苗株滴鼻、点眼 100 μL/只免疫 2 日龄雏鸡; 每组 20 只分别隔离饲养 在免疫后 1, 3, 5, 10, 15, 18 d 取材心脏、肝脏、肺脏、肾脏、大脑, 1 次扑杀 2 只或 3 只。

2.2 NDV 抗原检测

分别将各组鸡心脏、肝脏、肺脏、肾脏、大脑 16 mm × 30 mm 经 $w(\text{多聚甲醛}) = 4\%$ 固定 24 h, 按常规制作石蜡切片, 实验中所用一抗为抗 NDV NP 蛋白单克隆抗体, 工作效价 1:600。

依次将载玻片放入二甲苯(I) - 二甲苯(II) - 100% 乙醇(体积分数计, 下同) (I) - 100% 乙醇(II) - 95% 乙醇 - 85% 乙醇 - 75% 乙醇 - 50% 乙醇, 一般在每个试剂中放 10 min; 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min; 脱蜡后用 PBS(磷酸盐缓冲液) 溶液冲洗 3 遍, 加入 3% H₂O₂ 溶液中孵育 10 min, 然后倒掉 H₂O₂, 在蒸馏水中洗 3 次。再加入柠檬酸缓冲液, 放入烧杯在微波炉中蒸煮, 一般刚到沸腾断电, 冷却至室温 (10 min) 反复蒸煮 2 次; 冷却至室温后 将柠檬酸缓冲液倒掉, 并将载玻片置于 PBS 中 5 min, 洗 2 次, 加上 5% BSA 封闭液, 然后放置室温 20 min; 将载玻片上的多余液体用去不洗; 加一抗(NDV 抗 NP 蛋白单克隆抗体); 做空白对照实验, 就在组织切片上用 PBS 代替一抗。加完一抗在 4 °C 冰箱中保存过夜; 将载玻片从冰箱中取出, 放入 PBS 中洗 3 次, 每次 5 min, 加二抗(生物素标记抗鼠 IgG) 然后置于 37 °C 温箱中 20 min; 加过氧化物酶标记链酶卵白素工作液; 将切片从温箱中取出, 放入 PBS 中洗 3 次, 每次 5 min, 加上辣根酶标记链酶卵白素工作液, 置于 37 °C 温箱中 20 min; 将切片从温箱中取出, 放入 PBS 中洗 3 次, 每次 5 min, 擦干组织周围的 PBS 后加上显色剂。显色剂的配置: 在 1 mL 水中加 1 滴显色剂 A 摇匀; 然后加 1 滴显色剂 B 摇匀; 再加 1 滴显色剂 C 摇匀, 20 ~ 37 °C 镜下控制显色时间; 将显色后的切片用清水冲洗一段时间后, 浸泡于苏木精中染色; 将复染后的片子置于水中冲洗后, 依次将载玻片放入 50% 乙醇 - 75% 乙醇 - 85% 乙醇 - 95% 乙醇 - 100% 乙醇(I) - 100% 乙醇(II) - 二甲苯(I) - 二甲苯(II), 每个试剂中放置 5 min, 封片。镜下观察其结果。

2.3 免疫组化检测

2 日龄雏鸡用 [La Sota - HAMut(GD)] 疫苗株接种后的第 3 d 就发现气管黏膜和肺脏出现阳性反应, 褐色颗粒出现在细胞浆中。接种后第 5 d 肝脏的肝细胞有阳性反应, 褐色颗粒出现在胞浆内。病毒出现规律(表 1)。

表 1 在 rLa Sota - HAMut(GD) 接种后不同组织器官中不同时间的检出情况

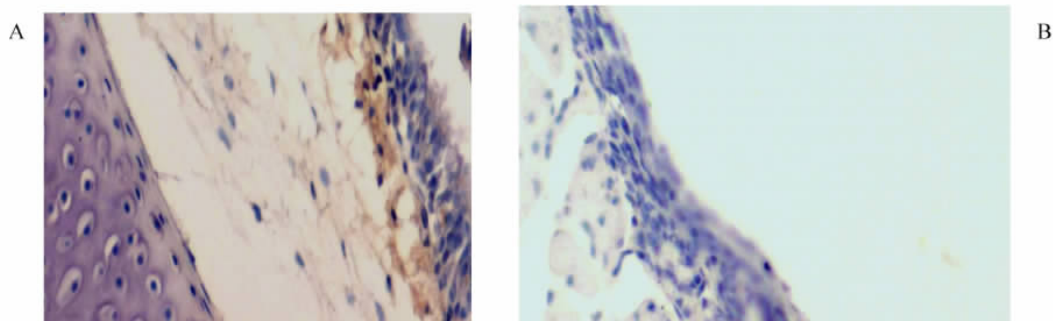
Tab. 1 Virus distribution in organs of chickens with rLa Sota - HAMut(GD) on different days

接种后时间/d Inoculated time	材料 Material							
	气管 Trachea	肝脏 Liver	肺脏 Lung	肾脏 Kidney	大脑 Brain	脾脏 Spleen	腺胃 Proventriculus	十二指肠 Duodenum
1	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	-	+	-	-	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-	-	-
10	+	+	+	-	-	-	-	-
15	+	-	+	-	-	-	-	-
18	+	-	-	-	-	-	-	-

* + 免疫组化阳性; - 免疫组化阴性。

Immunohistochemical staining showed positive; immunohistochemical staining showed negative.

呼吸系统: 2 日龄 SPF 鸡接种 [La Sota - HAMut(GD)] 毒株在接种后第 3 d 气管黏膜的固有层有阳性反应, 褐色颗粒出现在固有层的腺体细胞、淋巴细胞、巨噬细胞中(图 1)。接种后第 15 d 没有发现阳性反应。气管攻毒后第 3 d 气管均有病毒存在和分布, 位于气管黏膜上皮细胞胞浆和固有层黏液腺细胞胞浆内, 阳性染色强度逐渐加深并维持一段时间后逐渐减弱、最后消失。在肺脏的小支气管固有层增生的淋巴细胞和粒细胞, 单核细胞阳性, 黏膜下层腺体细胞阳性, 小动脉周围结缔组织细胞阳性, 肺泡间巨噬细胞阳性, 褐色颗粒出现在细胞中(图 2)。

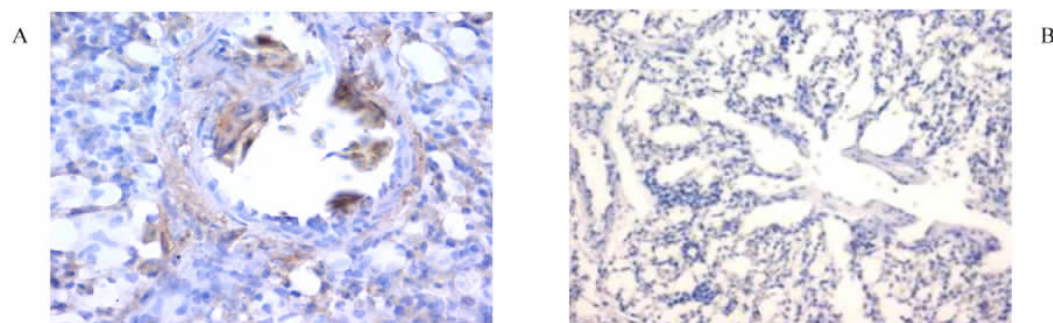


A. 气管粘膜阳性(IHC ×400) ; B. 气管空白对照组(用 PBS 代替一抗) (IHC ×400) 。

A. Immunohistochemical staining showed positive in chicken tracheal cells; B. There is not specific staining in chicken tracheal cells(PBS replaced Monoclonalantibody) .

图1 用 [La Sota - HAMut(GD)]接种 2 日龄 SPF 鸡接种后第 3 d 气管黏膜

Fig.1 Chicken trachea epithelium at the third day inoculated with [La Sota - HAMut(GD)]



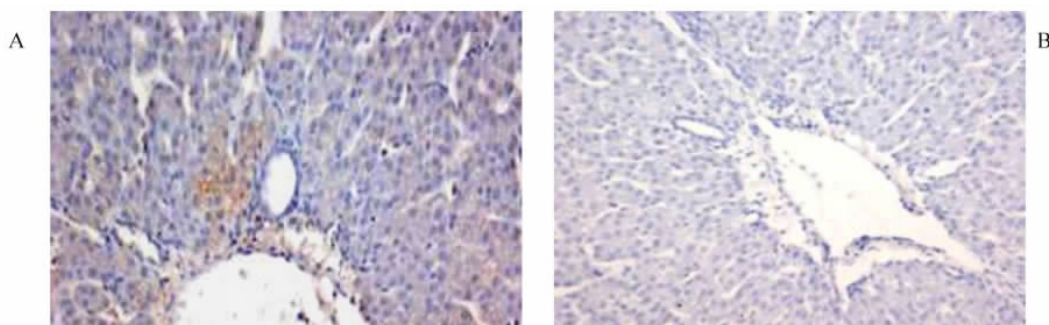
A. 气管粘膜阳性(IHC ×400) ; B. 气管空白对照组(用 PBS 代替一抗) (IHC ×400) 。

A. Immunohistochemical staining showed positive(IHC ×400) ; B. Immunohistochemical staining showed negative(PBS replaced Monoclonalantibody) (IHC ×400) .

图2 用 [rLa Sota - HAMut(GD)]接种 2 日龄 SPF 鸡接种后第 3 d 肺脏

Fig.2 Chick lung at the third day inoculated with [rLa Sota - HAMut(GD)] strain

消化系统: 接种后第 5 d 在肝脏肝细胞中有阳性反应, 褐色颗粒出现在中央静脉、汇管区周围肝细胞的细胞浆中(图 3)。接种到第 15 d 没有发现肝脏细胞的阳性反应。阴性对照组, 空白对照组背景清晰, 肝脏有病毒存在和分布, 阳性染色强度逐渐加深并维持一段时间后逐渐减弱, 最后消失。



A. 阳性肝细胞(IHC ×200) ; B 肝脏空白对照组(用 PBS 代替一抗) (IHC ×200) 。

A. Immunohistochemical staining showed positive in chicken liver cells; B. Immunohistochemical staining showed negative in chicken liver cells(PBS replaced Monoclonalantibody) .

图3 用 La Sota - vp2 接种 2 日龄 SPF 鸡接种后第 5d 肝脏

Fig.3 Chicken liver at the fifth day inoculated with (La Sota - vp2) strain

3 讨论

外源基因 *Hamut* 的插入增加病毒在雏鸡体内的组织嗜性。免疫组化结果说明病毒能在气管固有

膜淋巴细胞、腺体细胞内复制, 肺脏小支气管固有层细胞、黏膜下层腺体细胞、小动脉周围结缔组织细胞、肺泡间巨噬细胞, 也能在肝细胞内复制, 这增加了亲本毒株 La Sota 的复制部位, 在早期研究中发现, 以气雾方式接种新城疫病毒 B1 和 GB 菌株时, 在接种第 1 d 就能在气管黏膜上发现病毒^[8]。为什么病毒在感染初期停止在靶器官内复制, 目前还不清楚, 可能是病毒进入机体后, 在黏膜部位由于外界干扰素如氧过少、酸性多的情况下抑制病毒在靶器官的复制。细胞表面病毒受体位点的损伤和缺失也许是病毒感染引起气管黏膜的损伤的重要因素。荧光抗体检测已经证明新城疫病毒抗原出现在纤毛上皮细胞和腺体细胞中^[8]。LaSota 毒株能在气管黏膜固有层细胞和肝细胞中复制。刘培欣, 曹殿军等^[9]报道用 LaSota 弱毒滴鼻、点眼接种雏鸡后在免疫后的 1, 3, 5, 8, 12, 16, 21, 30 d 取雏鸡的肝脏、十二指肠、肺脏、食管、法氏囊、气管, 检测病毒在组织中的分布, 结果发现接种后第 5 d, 肝脏组织中有病毒的存在; 现接种后第 3 d, 气管组织中有病毒的存在。

[La Sota - HAmut(GD)]在机体的气管和肝脏检出的时间与亲本株相同, 但在肺脏持续时间很长。刘培欣, 曹殿军等^[9]报道用 LaSota 弱毒滴鼻、点眼接种雏鸡后在接种后第 5 d 能发现肝脏的肝细胞呈阳性反应; 虽然在肝脏复制但未引起肝脏的明显病变, 这可能是由于病毒与宿主细胞之间保持着一种稳定状态; 2 日龄接种的雏鸡在气管黏膜的检测发现接种后第 3 d 就有阳性反应, 褐色颗粒出现在固有层的细胞浆中, 其他器官未发现阳性反应。

本研究从 [La Sota - HAmut(GD)]疫苗株对各个组织器官嗜性及其动态分布规律方面进一步揭示 [La Sota - HAmut(GD)]从呼吸道入侵后, 很快扩散肺脏、肝脏。在组织器官中大量复制, 但不引起鸡的临床症状。[La Sota - HAmut(GD)]是一种泛嗜性胞浆内复制病毒, 经气管人工接种 [La Sota - HAmut(GD)]病毒首先在固有层腺体细胞内和肺脏小支气管固有层细胞、黏膜下层腺体细胞、小动脉周围结缔组织细胞、肺泡间巨噬细胞, 大量复制。

[La Sota - HAmut(GD)]疫苗株采用滴鼻点眼接种, 因为诱导粘膜免疫的最佳途径是直接 将抗原接种到粘膜表面。由于共同粘膜免疫系统的存在, 在某一点粘膜位点的接种便可诱导全身的粘膜免疫反应。[La Sota - HAmut(GD)]疫苗株能够引起呼吸道的免疫反应, 并且我们发现在呼吸道有病毒抗原的存在, 它可以显著降低免疫原量。这说明滴鼻点眼接种可能是一种有效、安全的免疫途径。

作为预防新城疫和家禽 H5 亚型高致病力禽流感疫苗 [La Sota - HAmut(GD)]接种后第 3 d 免疫组化染色 [La Sota - HAmut(GD)]出现在气管固有膜腺体细胞浆中和肺脏细胞中, 这是导致机体发生免疫反应的前提条件, 是机体防御机制和免疫机制的表现。外源基因 *HAmut* 的插入亲本毒株增加病毒在雏鸡体内的组织嗜性。

参考文献:

- [1] Cheville N F, Riley J, Ritchie A E. Pathogenesis of virulent Newcastle disease in chickens [J]. *Am Vet Med Assoc*, 1972; 161 - 179.
- [2] Huang Z, Elankumaran S, Panda A, et al. Recombinant newcastle disease virus as a vaccine vector [J]. *Poultry Science*, 2003, 82: 899 - 906.
- [3] Neumann G, Whitt A M, Kawaoka Y. A decade after the generation of a negative - sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned [J]. *Journal of General Virology*, 2002, 83: 2635 - 2662.
- [4] Huang Z, Panda A, Elankumaran S, et al. The hemagglutinin - neuraminidase protein of newcastle disease virus determines tropism and virulence [J]. *Journal of Virology*, 2003, 78: 263 - 266.
- [5] Peeters B P H, Deleeuw O S, Koch G, et al. Rescue of newcastle disease virus from cloned cDNA: Evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence [J]. *Journal of Virology*, 1999, 73: 5001 - 5009.
- [6] Engel - Herberta I, Ortrud Werner B, Jens P, et al. Characterization of a recombinant Newcastle disease virus expressing the green fluorescent protein [J]. *Journal of Virological Methods*, 2002, 108: 19 - 28.
- [7] Krishnamurthy S, Huang Z, Samal S K. Recovery of a virulent strain of newcastle disease virus from cloned cDNA: Expression of a foreign gene results in growth retardation and attenuation [J]. *Virology*, 2000, 278: 168 - 182.
- [8] Wang X, Fu C, Gao H. Molecular and antigenic characterization of very virulent infectious bursal disease virus strain Gx isolated in China [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2003, 45: 91 - 97.
- [9] 刘培欣, 曹殿军, 闫丽辉, 等. NDV 活疫苗免疫及免疫攻毒后组织中病毒动态分布 [J]. *中国预防兽医学报*, 2000, 22 (5): 566 - 572.