

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(1):105-114; 4 January 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

猪圆环病毒 2 型与猪细小病毒共感染对猪肺泡巨噬细胞吞噬功能及其干扰素表达水平的影响

刘祥义, 陈立功, 宋勤叶*, 杨芳, 李艳琴, 左玉柱, 焦健达, 王秀平

河北农业大学动物科技学院, 保定 071001

摘要:【目的】分析猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 与猪细小病毒 (PPV) 共感染对猪肺泡巨噬细胞 (PAM) 吞噬功能及其干扰素表达水平的影响, 为进一步阐明猪断奶后多系统衰竭综合征的发病机制提供实验依据。【方法】将 48 头 5 周龄健康仔猪随机分为 PCV2 组、PPV 组、PCV2/PPV 组和对照组, 每组 12 头。PCV2 和 PPV 组经口鼻途径分别接种 PCV2 或 PPV, PCV2/PPV 组同时接种 PCV2 和 PPV, 对照组接种细胞营养液。感染后 3、7、14 和 35 d (dpi) 从每组随机选择 3 头剖杀, 检测 PAM 的存活率、吞噬活性及其 $\alpha 1$ 型干扰素 (IFN- $\alpha 1$)、 γ 干扰素 (IFN- γ) mRNA 的表达水平。【结果】PCV2 组和 PCV2/PPV 组 PAM 的存活率于 3、7、14 dpi 均低于对照组, 35 dpi 均与对照组 PAM 的存活率接近, PCV2 与 PCV2/PPV 两组之间差异不显著 ($P > 0.05$); 3 个病毒感染组 PAM 的吞噬功能均显著下降 ($P < 0.01$), 其中 PCV2/PPV 组的吞噬功能低于 PCV2 组 ($P < 0.05$); PCV2/PPV 组 PAM 中 IFN- $\alpha 1$ 和 IFN- γ mRNA 的水平持续低于 PCV2、PPV 组和对照组的水平 ($P < 0.01$)。【结论】PCV2 与 PPV 共感染没有引起 PAM 的活力进一步下降, 但导致其吞噬功能及 IFN- $\alpha 1$ 和 IFN- γ mRNA 的表达水平持续降低。

关键词: PCV2, PPV, 共感染, 猪肺泡巨噬细胞, 吞噬功能, 干扰素, 猪

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)01-0105-10

猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus type 2, PCV2) 引起的猪圆环病毒病 (porcine circovirus diseases, PCVD) 是危害当今世界养猪生产的重要免疫抑制性传染病之一^[1-3]。PCVD 是与 PCV2 相关的多种疾病的统称, 主要包括猪断奶后多系统衰竭综合征 (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)、猪皮炎肾病综合征、猪呼吸道疾病复合征、增生性坏死性肺炎、母猪繁殖障碍、仔猪先天性震颤等^[2-3], 其中以 PMWS 的危害最为严重, 该病可以导致断奶后和育成期仔猪尤其是 5-12 周龄仔猪的

进行性消瘦、皮肤苍白、黄疸、呼吸困难、腹泻和中枢神经障碍等临床症状, 以及全身淋巴结炎症、肝炎、肠炎、肾炎和肺炎等病理变化, 发病率为 4% - 30%, 病死率 50% - 90%^[2-5]。PMWS 于 1991 年首次在加拿大西部猪场暴发流行, 随后与其他 PCVD 在全球养猪国家蔓延流行^[4-7]。

PCV2 属于圆环病毒科圆环病毒属成员, 由 Ellis 等 (1998)^[8] 从 PMWS 病猪体内分离鉴定。目前猪群中 PCV2 的感染率很高, 但只有部分感染猪出现 PMWS 临床症状, 其他多呈亚临床感染形

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771600)

* 通信作者。Tel: +86-312-7528342; E-mail: songqinye@126.com

作者简介: 刘祥义 (1982-), 男, 河北衡水人, 硕士研究生, 研究方向: 动物分子病毒学与免疫学。E-mail: liuxiangyi@126.com

收稿日期: 2010-06-26; **修回日期:** 2010-09-03

式^[6-7]。研究发现 PMWS 的发生除了必须有 PCV2 存在,并与 PCV2 的毒力大小有关外,还需要其他致病因子包括病原微生物和环境因素等的协同参与^[9-14]。当单独用 PCV2 实验感染仔猪时常不表现 PMWS 的典型症状或仅表现出温和的临床症状,但当 PCV2 与猪细小病毒 (porcine parvovirus, PPV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、伪狂犬病毒 (pseudorabies virus, PRV)、猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV) 或免疫调节剂如弗氏不完全佐剂、猪肺炎支原体菌苗等共同接种仔猪时,可以复制出典型的 PMWS 症状或使病变加重^[12-20]。目前,对 PMWS 临床病例和实验室感染动物的病原学和组织病理学研究均表明 PPV 在 PMWS 的发生中具有重要的协同作用^[12-14,21-22],但是关于它们的协同机制尚不清楚。已知 PCV2 和 PPV 的靶细胞都是巨噬细胞,而猪肺泡巨噬细胞 (porcine alveolar macrophage, PAM) 是机体肺部抵抗各种病毒感染的第一道防线,为机体重要的免疫细胞,具有吞噬外源异物、抗原递呈和分泌多种细胞因子等功能,与防御感染、启动炎症反应和调节免疫应答有密切关系^[23-24]。可见,阐明 PCV2 与 PPV 共感染对 PAM 免疫功能的影响,是进一步阐明 PMWS 的发病机制的基础,但目前关于此方面的研究报道尚未见到。鉴于巨噬细胞的活力和吞噬功能是其进一步加工处理、递呈抗原的前提,以及活化巨噬细胞产生的干扰素在机体早期抗病毒反应和免疫调节中的重要作用,本研究旨在分析 PCV2 与 PPV 分别单独和共同感染仔猪肺泡巨噬细胞的存活率、吞噬功能及其干

扰素表达水平的变化,为进一步阐明 PMWS 的发病机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂: SYBR® *Premix Ex Taq*TM, 为 TaKaRa 产品。PCV2 和 PPV 抗体 ELISA 检测试剂盒,为深圳市绿诗源生物技术有限公司产品。质粒、基因组 DNA 及总 RNA 提取试剂盒,为天根生化科技有限公司产品。

1.1.2 毒株和重组质粒: PCV2 SD2008 株 (GenBank 登录号: GQ174519), 由河北农业大学动物传染病实验室保存。取第 2 代 (F2) SD2008 株在 PK-15 细胞上复苏,通过免疫过氧化物酶单层试验 (immunoperoxidase monolayer assay, IPMA) 测定其滴度为 $10^{5.61}$ TCID₅₀/0.1 mL。PPV 7909 株,购自中国兽药监察所,在 PK-15 细胞上复苏后,测定其滴度为 $10^{6.69}$ TCID₅₀/0.1 mL。

重组猪 $\alpha 1$ 型干扰素 (IFN- $\alpha 1$)、 γ 干扰素 (IFN- γ)、看家基因 β -actin、PCV2、PPV 基因片段的重组质粒 (pGM-T-IFN- $\alpha 1$ 、pGM-T-IFN- γ 、pGM-T-act、pGM-T-PCV2、pGM-T-PPV), 由河北农业大学动物传染病实验室构建与鉴定。

1.1.3 实验动物: 5 周龄健康仔猪 48 头,经 PCR 检测 PCV2、PPV、PRRSV、PRV 及 CSFV,均为阴性。经 ELISA 检测,血清中不含 PCV2 和 PPV 相应抗体。

1.1.4 引物: 参考 GenBank 中的相关序列,应用 Oligo 6.0 软件,设计检测用引物 (表 1)。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 扩增猪干扰素、病毒及看家基因部分基因片段的引物和 PCR 条件

Table 1 Conditions of PCR and primers to amplify partial genes of cytokines, viruses and β -actin

| Target gene | Pimer sequence (5'→3') | GenBank accession No. | Annealing temperature/°C | Product /bp |
|-----------------|--|-----------------------|--------------------------|-------------|
| IFN- $\alpha 1$ | Forward: TCTCTCCCTTCTCCTGCCTG Reverse: CAGGGGCTGTAGCTCTTCTC | EU364896 | 58.4 | 346 |
| IFN- γ | Forward: CAGCTTTGCGCTGACTTTGTG Reverse: CTTGATCACATCCATGCTCC | AY188090 | 51.8 | 261 |
| PCV2 | Forward: AGTGAGCGGGA AAAATGCAGA Reverse: TCCTCCGTGGATTGTTCTGT | AF538325 | 55 | 417 |
| PPV | Forward: GTTTTCACCAAAGCAGGCTC Reverse: AACTTCGCCAGCGGACAAC | AY583318 | 55 | 208 |
| β -actin | Forward: CTGGCATTGTTCATGGACTCT Reverse: GCGATGATCTTGATCTTCAT | U07786 | 59 | 547 |

1.2 动物感染

将48头仔猪随机分为PCV2、PPV、PCV2/PPV和非感染对照4个组,每组12头,分别经口鼻途径接种病毒。PCV2组每头感染 $10^{5.61}$ TCID₅₀/0.1 mL的PCV2 SD2008株细胞毒3 mL,PPV组每头感染 $10^{6.69}$ TCID₅₀/0.1 mL的PPV-7909株细胞毒3 mL,PCV2/PPV组每头感染PCV2 SD2008株和PPV-7909株的混合液6 mL,对照组接种3 mL细胞维持液。感染后每天观察记录各组的临床表现,间隔1周称取各组猪体重,于感染后35 d(days post infection, dpi)检查各组猪的病理变化。4组动物严格隔离饲养,分别由专人饲养,饲养条件完全相同。

1.3 血清PCV2和PPV特异性抗体的检测

于感染前(0 d)与感染后7、14、21、28、35 d采取前腔静脉血,分离血清,作1:40倍稀释后,分别应用PCV2或PPV抗体检测ELISA试剂盒检测每组的血清特异性抗体。当 OD_{630} 值 >0.4 时,判为阳性, OD_{630} 值 ≤ 0.2 时,判为阴性。

1.4 PAM的获取

感染后3、7、14和35 d,从每组中随机取3头猪,经静脉注射5-10 mL 1%的戊巴比妥钠。麻醉后,臂动脉放血致死,摘取肺脏,参照文献^[25],灌洗收集PAM,用10% RPMI 1640营养液将细胞浓度调整为 4×10^6 个/mL,备用。

1.5 PAM中PCV2与PPV核酸的定量检测

用病毒基因组DNA提取试剂盒,提取各组PAM中的病毒DNA,通过实时荧光定量PCR(Real-time PCR)测定各组PAM中的病毒核酸浓度。

1.6 PAM存活率的检测

取收集的PAM置于灭菌的试管中,在37℃ 5% CO₂培养箱内轻轻振荡培养。分别于培养0、8、16、24、36、48、60、72、96 h时,取适量细胞,通过台盼蓝排出试验^[26]检测PAM的存活率。PAM存活率% = 活细胞数/(活细胞数 + 死细胞数) × 100%。

1.7 PAM吞噬功能的检测

取各组的PAM加入放有飞片的6孔细胞培养板内(1 mL/孔),于37℃ 5% CO₂培养箱内培养;分别在培养0、8、16、24、36、48、60、72、96 h时,加入5%的鸡红细胞悬液500 μL,充分混匀,37℃ 孵育30 min,其间轻轻振荡1次;用PBS洗去未被吞噬的鸡红细胞,取出飞片;甲醇固定10 min;姬姆萨染色10 min;显微镜下观察并随机计数200个PAMs,计

算吞噬百分率。吞噬百分率为计算每100个PAMs中吞噬有鸡红细胞的PAM数,即

吞噬百分率 = 200个吞噬鸡红细胞的PAMs/200个PAMs × 100%。

1.8 PAM中IFN-α1和IFN-γ mRNA表达水平的检测

将PAM分装到细胞瓶中,加入含有15 mg/L LPS的细胞培养液于37℃ 5% CO₂培养箱孵育24 h,收集细胞,以PBS悬浮并调整细胞浓度为 2×10^6 个/mL,用总RNA提取试剂盒提取细胞总RNA,通过Real-time RT-PCR测定各组PAM中IFN-α1和IFN-γ mRNA浓度,每个样品重复2孔。Real-time RT-PCR反应体积为10 μL,包括SYBR® Green Realltime PCR Master Mix 5 μL、25 μmol/L上、下游引物各0.2 μL、cDNA模板1.5 μL、灭菌三蒸水3.1 μL。反应程序为:95℃ 5 min;94℃ 20 s,50.0℃ -62℃ 20s,72℃ 30 s,共40个循环;72℃ 5 min。融解曲线分析如下:65℃ -95℃,每0.2℃读板1次,1s/次。

1.9 数据表示与统计分析

细胞因子mRNA含量用相对值表示,即将细胞因子的cDNA拷贝数除以同一样品中看家基因β-actin的cDNA拷贝数,即获得细胞因子与看家基因的一个相对比值,用以表示相应细胞因子的mRNA转录水平。病毒感染组PAM中PCV2和PPV的核酸含量为待检样品的绝对值。应用SPSS软件对实验数据进行方差分析。当 $P < 0.05$ 时,差异显著,以“不同小写字母”表示; $P < 0.01$ 时,差异极显著,以“不同大写字母”表示。

2 结果

2.1 临床表现与病理变化

感染后3 d,PCV2、PPV、PCV2/PPV组与对照组的仔猪轻度拉稀,经投喂电解多维和痢菌净3-5 d后即好转,上述情况可能与仔猪刚断奶更换饲料的应激反应有关。但从感染后14 d至实验结束,PCV2组中有1头、PCV2/PPV组中的2头间断腹泻,而PPV组和对照组未见异常。感染后第4-5周PCV2组与PCV2/PPV组的平均增重均明显下降,其中PCV2/PPV组平均增重1.4 kg,显著低于PCV2组(2.53 kg)($P < 0.05$)、PPV组(3.38 kg)与对照组(5.21 kg)($P < 0.01$),PCV2组与PPV组之

间差异不显著 ($P > 0.05$) (图 1)。实验期间所有猪没有明显的呼吸道和发热症状 (平均直肠温度均在 $39.5^{\circ}\text{C} - 40.0^{\circ}\text{C}$ 范围内波动)。

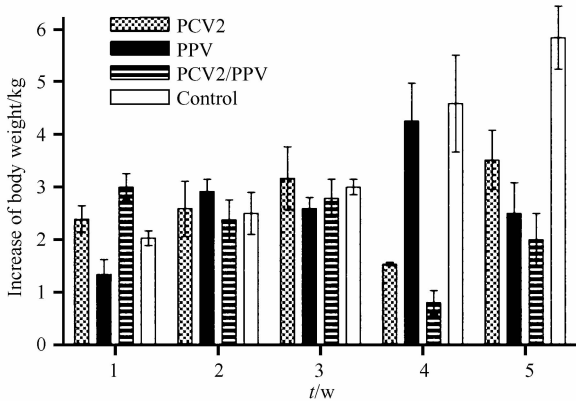


图 1 猪每周的体重增加情况

Fig. 1 Increase of pigs' body weight per week.

感染后 35 d 的病理学检查可见, PCV2 单独感染与 PCV2/PPV 共感染猪的淋巴结肿大, 免疫组织中淋巴细胞减少、组织细胞和多核巨细胞浸润, 间质性肺炎、肾炎和肝炎等 PMWS 的典型病理变化, 但 PCV2/PPV 共感染猪的病理变化较 PCV2 感染猪严重。PPV 感染组中的 2 头猪有轻度的间质性肺炎、肾炎或肝炎变化。对照组的 3 头猪未见异常 (表 2)。

2.2 血清 PCV2 与 PPV 抗体

感染前所有猪的血清 PCV2 与 PPV 抗体均为阴性, 感染后对照组所有猪的血清 PCV2 与 PPV 抗体、PCV2 组的血清 PPV 抗体以及 PPV 组的血清 PCV2 抗体均为阴性。感染后 7 d, PCV2/PPV 组中 8 头猪 (8/9) 的血清中检测到了 PCV2 抗体, 7 头 (7/9) 检测到了 PPV 抗体, 感染后 14-35 d 该组内所有猪的血清转为 PCV2 和 PPV 抗体阳性。PCV2 组中 6 头

表 2 感染后 35 d 猪的病理变化

Table 2 Lesions of pigs in different groups at necropsy on 35 days post infection

| Lesions | Group | | | | |
|------------|------------------------|-------------|------------------|-----------------|---|
| | PCV2 (n = 3) | PPV (n = 3) | PCV2/PPV (n = 3) | Control (n = 3) | |
| Lymph node | Enlargement | 2 + | 1 + | 3 + + | 0 |
| | Depletion | 3 + | 0 | 3 + + + | 0 |
| Lung | Interstitial pneumonia | 2 + | 2 + | 3 + + | 0 |
| Liver | Interstitial hepatitis | 3 + + | 1 + | 3 + + + | 0 |
| Spleen | Enlargement | 2 + | 0 | 1 + | 0 |
| | Depletion | 3 + | 1 + | 3 + + | 0 |
| Kidney | Interstitial nephritis | 2 + + + | 2 + | 3 + + + | 0 |
| Heart | Pericardial effusion | 1 | 0 | 2 | 0 |
| Stomach | catarrhal inflammation | 3 + | 1 + | 3 + + | 0 |

Note: the severity of lesion in affected pigs is expressed with "+" (mild), "+ + +" (moderate) and "+ + + +" (severe).

猪 (6/9) 在感染后 7 d 检测到 PCV2 抗体, 21 d 后全部转为 PCV2 抗体阳性。PPV 组的 4 头猪 (4/9) 在感染后 7 d 检测到了 PPV 抗体, 21 dpi 所有猪的 PPV 抗体为阳性, 28 dpi PPV 抗体平均水平逐渐下降, 至 35 dpi 时该组中 1 头猪的血清转为 PPV 抗体阴性。实验期间, PCV2/PPV 组的 PCV2 和 PPV 抗体平均水平分别高于 PCV2 组和 PPV 组的相应抗体平均水平 (图 2)。

2.3 PAM 中的 PCV2 与 PPV 核酸含量

感染后 3、7、14 和 35 d, 应用 Real-time PCR 测定各组 PAM 中 PCV2 或 PPV 核酸含量的结果显示,

7 dpi, PCV2/PPV 组的 PAM 中 PCV2 核酸含量 (1.767×10^9 copies/ μL) 高于 PCV2 组的含量 (1.307×10^9 copies/ μL), 其他时间检测时 PCV2 核酸含量均低于 PCV2 组的含量, 其中 14 和 35 dpi 时两组之间差异极显著 ($P < 0.01$) (图 3)。相反, PCV2/PPV 组的 PAM 中 PPV 核酸的平均浓度总体上高于 PPV 组的浓度, 其中 14 和 35 dpi, PCV2/PPV 组的 PPV 核酸浓度 (分别为 1.451×10^9 和 7.072×10^9 copies/ μL) 显著高于 PPV 组的含量 (分别为 0.558×10^9 和 1.271×10^9 copies/ μL) ($P < 0.01$)。实验期间, PCV2 组和 PPV 组的 PAM 中分别没有检

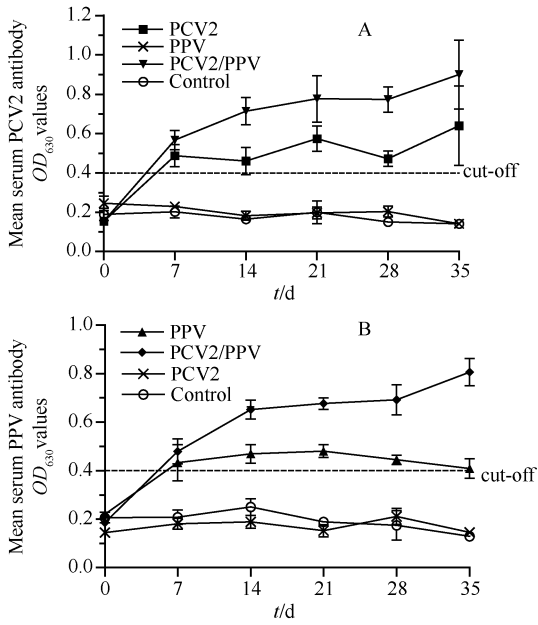


图 2 血清 PCV2 或 PPV 特异性抗体的产生动态

Fig. 2 Development of PCV2 or PPV-specific antibodies in serum. A: to PCV2; B: to PPV.

测到 PPV 或 PCV2 核酸, 对照组的 PAM 中没有检测到 PCV2 和 PPV 核酸(图 3)。

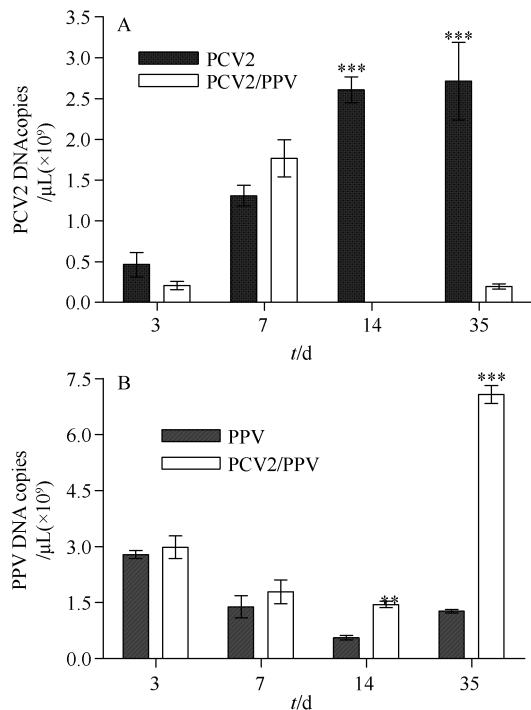


图 3 感染后不同时间 PAM 中 PCV2 或 PPV 核酸的浓度

Fig. 3 Concentrations of PCV2 or PPV nucleotides in PAM after infection. (A), PCV2 nucleic acid; (B), PPV nucleic acid; ** = significant ($P < 0.01$) differences between groups; *** = significant ($P < 0.001$) differences between groups.

2.4 PAM 存活率的变化

感染后 PCV2、PPV、PCV2/PPV 组的 PAM 存活率均降低, 并随着 PAM 在体外培养时间的延长, PAM 存活率的下降趋势逐渐明显。当 PAM 在体外培养 48 h 后, 对照组 PAM 的存活率在 70% - 84% 之间, PCV2、PPV 与 PCV2/PPV 组 PAM 的存活率分别为 40% - 71%、30% - 64% 和 53% - 75% (图 4)。与 PCV2 组和 PPV 组相比, PCV2/PPV 组的 PAM 存活率没有进一步降低。35 dpi, PCV2 组的存活率平均值 (85.05%) 与对照组的存活率 (86.29%) 接近, PCV2/PPV 组的存活率 (78.89%) 较 PCV2 组略低(图 4)。上述实验结果表明, 与 PCV2 组比较, PCV2 和 PPV 共感染没有导致 PAM 的存活力进一步降低。

2.5 PAM 吞噬功能的变化

试验期内 PCV2、PPV、PCV2/PPV 组 PAM 对鸡红细胞的吞噬百分率显著低于对照组 ($P < 0.01$), 其中 PCV2/PPV 组的吞噬率下降更严重(图 5)。PAM 在体外培养的 60 h 内, PCV2/PPV 组 PAM 的吞噬率 (4% - 22.3%) 低于 PCV2 与 PPV 组的吞噬率 (8.3% - 26.3% 和 5% - 24.4%) ($P < 0.05$)。3 dpi 和 7 dpi, PCV2 组与 PPV 组的 PAM 吞噬率总体上没有显著差异; 14 和 35 dpi, 后者低于前者 ($P < 0.05$)。此外, 从 7 dpi 开始, 由于病毒感染组的 PAM 体外培养时贴壁能力差, 故图中有的吞噬数据在培养 60 - 72 h 后没有显示。上述结果提示, PCV2 与 PPV 共感染导致 PAM 的吞噬功能显著下降, PPV 在 PCV2 对 PAM 吞噬能力的影响中起着重要协同作用。

2.6 PAM 中 IFN- α 1 和 IFN- γ mRNA 表达水平的变化

2.6.1 PAM 中 IFN- α 1 mRNA 表达水平的变化: 感染后 PCV2/PPV 组 PAM 中 IFN- α 1 mRNA 水平持续低于 PCV2、PPV 组和对照组的水平, 其中以 7 dpi 时的表达量最低(表 3)。PCV2 组的 IFN- α 1 mRNA 水平在 7 和 14 dpi 时也低于对照组, 但 35 dpi 显著高于对照组 ($P < 0.01$) 与 PPV 组的表达水平接近。PPV 组的 IFN- α 1 mRNA 表达水平则在 3 和 35 dpi 时出现两次显著上调(表 3)。上述结果表明, PCV2 与 PPV 共感染导致 PAM 表达 IFN- α 1 的功能持续严重下调。

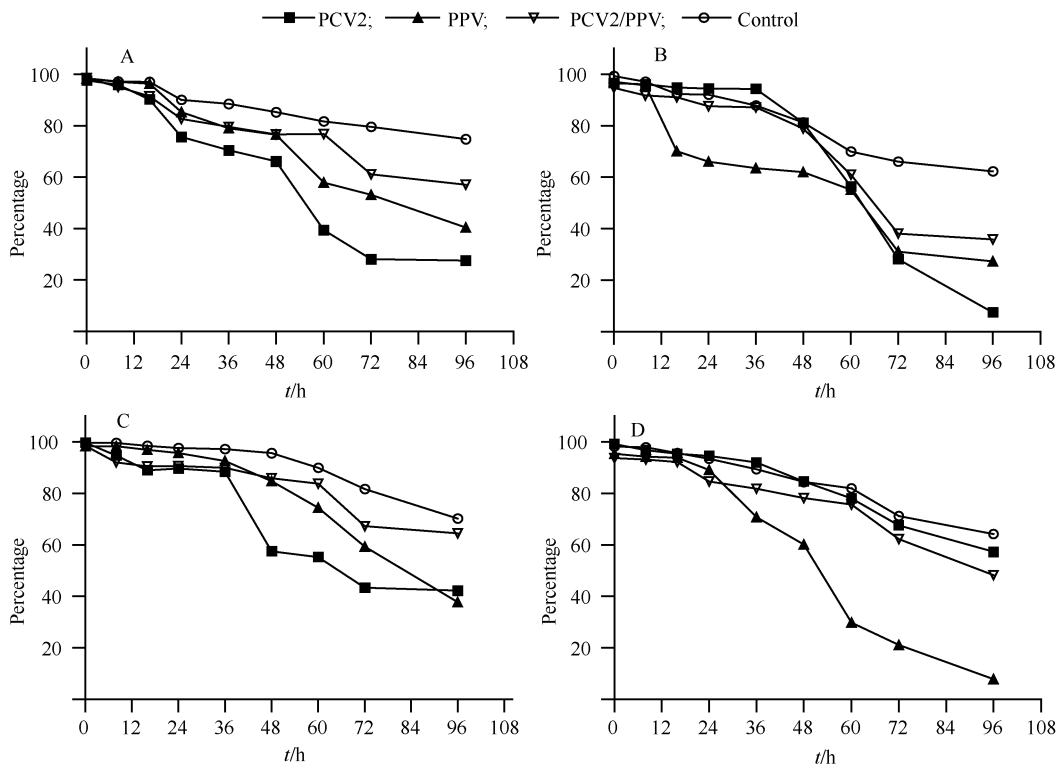


图 4 PAM 的存活率

Fig. 4 Survival rates of PAM after infection. A-D, on 3,7,14 and 35 dpi, respectively.

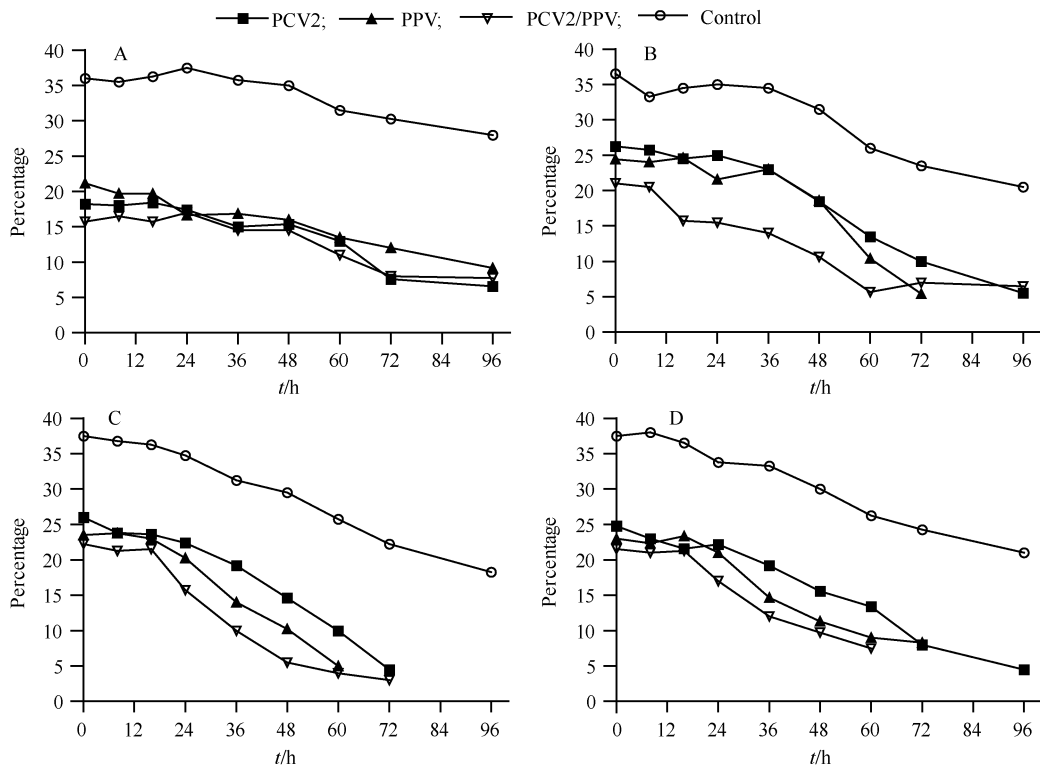


图 5 PAM 吞噬功能的变化

Fig. 5 Changes in phagocytotic capabilities of PAM after infection. A-D, on 3,7,14 and 35 dpi, respectively.

表 3 PAM 中 IFN- α 1 mRNA 水平的相对值
Table 3 Relative values of IFN- α 1 mRNA levels in PAM

| dpi | Group | | | |
|-----|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | PCV2 | PPV | PCV2/PPV | Control |
| 3 | 0.042 \pm 0.013 ^{ba} | 0.111 \pm 0.047 ^{aA} | 0.005 \pm 0.005 ^{ab} | 0.046 \pm 0.037 ^{abc} |
| 7 | 0.023 \pm 0.006 ^{aA} | 0.010 \pm 0.001 ^{bB} | 0.001 \pm 0.001 ^{cC} | 0.045 \pm 0.025 ^a |
| 14 | 0.023 \pm 0.017 ^{baA} | 0.010 \pm 0.003 ^{bB} | 0.004 \pm 0.001 ^{cC} | 0.082 \pm 0.031 ^{aA} |
| 35 | 0.238 \pm 0.061 ^{aA} | 0.252 \pm 0.061 ^{aA} | 0.011 \pm 0.005 ^{cC} | 0.064 \pm 0.029 ^{bB} |

Note: Different superscripts (a, b, c or A, B, C) within each column indicates significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) differences between groups.

2.6.2 PAM 中 IFN- γ mRNA 表达水平的变化: PCV2/PPV 组 PAM 中 IFN- γ mRNA 的表达水平在实验期间持续低于 PCV2 组和对照组的水平 ($P < 0.01$), 其中以感染后 7 和 14 d 的表达水平最低(表 4)。PCV2 和 PPV 组 PAM 中的 IFN- γ mRNA 水平

于 7 和 14 dpi 时显著低于对照组 ($P < 0.05$), 但在 3 和 35 dpi 时出现两次高峰, 显著高于对照组和 PCV2/PPV 组 ($P < 0.05$) (表 4)。上述结果表明, PPV 与 PCV2 共感染导致 PAM 中 IFN- γ mRNA 的表达水平严重降低。

表 4 PAM 中 IFN- γ mRNA 水平的相对值
Table 4 Relative values of IFN- γ mRNA levels in PAM

| dpi | Group | | | |
|-----|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | PCV2 | PPV | PCV2/PPV | Control |
| 3 | 10.680 \pm 4.330 ^{aA} | 8.597 \pm 3.855 ^{ab} | 0.820 \pm 0.142 ^b | 2.620 \pm 0.255 ^b |
| 7 | 0.567 \pm 0.198 ^{bB} | 0.737 \pm 0.220 ^{bAB} | 0.083 \pm 0.118 ^{cC} | 1.155 \pm 0.148 ^{aA} |
| 14 | 0.151 \pm 0.116 ^b | 0.047 \pm 0.013 ^b | 0.061 \pm 0.066 ^b | 4.777 \pm 3.603 ^a |
| 35 | 23.150 \pm 2.051 ^b | 15.700 \pm 7.071 ^b | 0.769 \pm 0.332 ^c | 10.690 \pm 2.418 ^a |

Note: Different superscripts (a, b, c or A, B, C) within each column indicates significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) differences between groups.

3 讨论

自 20 世纪 90 年代末证明 PCV2 是 PMWS 的原发和必要病原以来, 对 PCV2 致病机制的研究一直是众多学者关心的热点, 然而目前对此仍然不十分清楚。研究表明, PMWS 临床典型症状的出现除了必须有 PCV2 外, 还需要其他致病因子的共同参与^[9,14]。已知猪细小病毒 (porcine parvovirus, PPV) 是 PCV2 致病的重要协同因子之一, 两种病毒共同感染可以引起猪体重下降、衰竭、黄疸、贫血以及全身淋巴结炎症、肝炎、肠炎、肾炎或肺炎等 PMWS 的典型特征^[12-14,22]。肺泡巨噬细胞是 PCV2 的主要靶细胞, 其在感染初期机体清除病毒和启动特异性免疫应答过程中承担着重要作用。因此分析 PCV2/PPV 共感染对猪肺泡巨噬细胞活力、吞噬及细胞因子表达等免疫功能的影响, 对于进一步阐明 PMWS 的发病机制具有重要意义。巨噬细胞除可以吞噬和杀灭多种病原微生物、处理凋亡损伤的细胞外, 还可以对细胞内的抗原进行加工、处理和递呈, 进而启动特异性免疫应答。活化的巨噬细胞同时可以分泌多种细胞因子, 其中 IFN- α 和 IFN- γ 在抑制病毒复制、增强 MHC I 类分子或 MHC II 类分子表达和活化免疫细胞等过程中发挥着重要作用, 是感染与免疫研

究中关注的重点。因此本研究主要分析了 PCV2/PPV 共感染对 PAM 吞噬功能及其表达 IFN mRNA 水平的变化。

本研究以 PCV2 SD2008 株和 PPV 7909 株共同感染仔猪, 引起了比 PCV2 SD2008 株单独感染更加明显的腹泻和增重降低的临床特征以及程度严重的典型 PMWS 病理变化。在 PCV2/PPV 共感染初期 (感染后 7 d 左右), PAM 中 PCV2 核酸的含量高于 PCV2 感染猪的含量, 但感染 14 d 后 PCV2 核酸含量低于 PCV2 感染猪的含量。与此相反, PCV2/PPV 共感染猪肺泡巨噬细胞中 PPV 核酸含量持续高于 PPV 感染猪的含量。由此推测, PCV2/PPV 共感染早期, PPV 对 PCV2 侵染 PAM 或在其内增殖具有促进作用, 但随后则干扰 PCV2 的侵染或增殖, 而 PCV2 对 PPV 侵染 PAM 或在其内增殖具有明显的促进作用。同时病理学检查发现, PCV2/PPV 共感染猪的肺脏出现比较严重的肿胀、肺泡间隔增宽、分泌物增多等变化, 相比之下 PCV2 单独感染猪的肺脏病变较轻。可见, PCV2 与 PPV 同时感染引起的肺炎病变程度不完全取决于肺脏局部的 PCV2 含量, 可能与 PCV2 和 PPV 总量及局部产生的炎症细胞、细胞因子、应激反应蛋白及一些酶类有密切关系。

PCV2 体外感染 PAM 实验表明, PCV2 对 PAM

的存活率没有明显影响(仅导致轻微降低),但可以引起 PAM 吞噬和杀伤活性显著下降^[27]。本研究比较了 PCV2 感染、PPV 感染、PCV2/PPV 共感染以及非感染对照仔猪肺泡巨噬细胞的存活率和吞噬功能,发现无论是 PCV2 单独感染,还是 PCV2/PPV 共同感染后 3、7、14 d PAM 的存活率均有所降低,但在感染后 35 d PAM 的存活率与对照猪的基本接近。上述结果表明,PCV2 感染降低了 PAM 的存活率,但 PCV2 与 PPV 共感染没有使 PAM 存活率降低进一步加剧,同时提示,体外感染有时不一定能够完全反应体内感染的结果。对 PAM 吞噬鸡红细胞功能的检测发现,PCV2 体内感染降低了 PAM 的吞噬功能,而 PCV2/PPV 共感染使 PAM 吞噬功能的降低更为严重,同时发现在 7-35 dpi 内,PPV 感染仔猪肺泡巨噬细胞的吞噬功能也明显下降,而且低于 PCV2 感染猪的吞噬功能,可见,PPV 在 PCV2/PPV 感染猪 PAM 吞噬功能的变化过程中承担着重要协同作用。

IFN- α 与 IFN- γ 在机体抗病毒反应和免疫调节中发挥着重要作用,已知 PCV2 感染猪的淋巴结、扁桃体、脾脏和胸腺等局部组织和器官内的细胞因子分泌失衡,导致机体免疫调节功能紊乱和免疫应答能力降低,其中 PMWS 自然病例扁桃体和 PBMC 表达 IFN- γ 的水平升高^[28-29]。Hasslung 等(2005)^[9]报道,在 PCV2 与 PPV 共感染猪血清中出现了 INF- α 反应,认为 PPV 通过诱导机体产生过量的 TNF- α 和 INF- α 加重了 PMWS 的发生。可见,上述研究报告中均没有关于肺脏内干扰素表达水平的数据。本研究发现 PCV2 感染仔猪的肺泡巨噬细胞中 IFN- α 1 mRNA 的表达水平在感染后 3、7 和 14 d 时降低,在感染后 35 d 显著升高(与 PPV 感染猪的表达水平接近),IFN- γ mRNA 表达水平在感染后 7 和 14 d 时下降,3 和 35 d 时出现两次上调。而 PCV2/PPV 共感染猪的肺泡巨噬细胞中 IFN- α 1 与 IFN- γ mRNA 的表达水平持续低于 PCV2 单独感染猪的表达水平。已知干扰素是机体抵御病毒感染的第一线防御因素,能够增强巨噬细胞清除病毒的活性,在特异性免疫应答发挥作用之前起着重要作用。PCV2/PPV 共感染猪肺泡巨噬细胞中 IFN- α 1 与 IFN- γ 的表达水平持续低下,将会导致 PAM 清除病毒的功能降低,因此感染早期(7 dpi) PCV2/PPV 共感染猪肺泡巨噬细胞中 PCV2 和 PPV 的核酸含量分别高于 PCV2 或 PPV 单独感染猪的含量可能与此有一定关系。另外,IFN- γ 可以抑制 IL-4 和 IL-10 的产生,进

而影响体液免疫反应。本实验中 PCV2/PPV 感染猪肺泡巨噬细胞持续低水平表达 IFN- γ 的结果可能会导致 IL-4 和 IL-10 的过量表达,最终造成机体免疫反应类型失衡,体液免疫应答相对提高,细胞免疫应答抑制。所以 PCV2/PPV 共感染猪的血清 PCV2 和 PPV 抗体水平比 PCV2 和 PPV 单独感染猪的相应抗体水平高。

综合上述分析结果推测,PCV2 与 PPV 共感染加剧了 PAM 吞噬及表达 IFN- α 1 和 IFN- γ 功能的降低,导致感染早期机体局部的抗病毒活性和启动特异性免疫应答的能力减弱,继而影响特异性免疫功能的激活与正常发挥,为 PMWS 病程的进一步发展创造了前提条件。

参考文献

- [1] Segalés J, Domingo M, Chianini F, Majó N, Domínguez J, Darwich L, Mateu E. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Veterinary Microbiology*, 2004, 98(2):151-158.
- [2] Segalés J, Rosell C, Domingo M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Veterinary Microbiology*, 2004, 98(2):137-149.
- [3] Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *The Veterinary Journal*, 2005, 169(3):326-336.
- [4] Rosell C, Segalés J, Plana-Durán J, Balasch M, Rodríguez-Arriola GM, Kennedy S, Allan GM, McNeilly F, Latimer KS, Domingo M. Pathological, immunohistochemical, and in situ hybridization studies on natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *Journal of Comparative Pathology*, 1999, 120(1):59-78.
- [5] Harding JC, Clark EG. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health and Production*, 1997, 5(5):201-203.
- [6] Allan GM, Ellis JA. Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2000, 12(1):3-14.
- [7] Segalés J, Domingo M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Veterinary Questions*, 2002, 24(3):109-124.
- [8] Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, Strokappe J, Martin K, McNeilly F, Meehan B, Todd D, Haines D. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Veterinary Journal*, 1998, 39(1):44-51.

- [9] Hasslung F, Wallgren P, Ladekjaer-Hansen AS, Bøtner A, Nielsen J, Watrang E, Allan GM, McNeilly F, Ellis J, Timmusk S, Belák K, Segall T, Melin L, Berg M, Fossum C. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Sweden and Denmark with a Swedish isolate of porcine circovirus type 2. *Veterinary Microbiolog*, 2005, 106 (1-2):49-60.
- [10] Lohse L, Bøtner A, Hansen AS, Frederiksen T, Dupont K, Christensen CS, Baekbo P, Nielsen J. Examination for a viral co-factor in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Microbiolog*, 2008, 129 (1-2):97-107.
- [11] Carman S, Cai HY, DeLay J, Youssef SA, McEwen BJ, Gagnon CA, Tremblay D, Hazlett M, Lulis P, Fairles J, Alexander HS, van Dreumel T. The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease—2004 – 2006. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2008, 72 (3):259-268.
- [12] Ellis J, Clark E, Haines D, West K, Krakowka S, Kennedy S, Allan GM. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Veterinary Microbiolog*, 2004, 98 (2):159-63.
- [13] Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, Foster JC, Ellis JA, Krakowka SJ, Meehan BM, Adair BM. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*, 1999, 121 (1):1-11.
- [14] Krakowka S, Ellis JA, Meehan B, Kennedy S, McNeilly F, Allan G. Viral wasting syndrome of swine; experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Veterinary Pathology*, 2000, 37 (3):254-263.
- [15] Rovira A, Balasch M, Segalés J, García L, Plana-Durán J, Rosell C, Ellerbrok H, Mankertz A, Domingo M. Experimental Inoculation of Conventional Pigs with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus 2. *Journal of Virology*, 2002, 76 (7):3232-3239.
- [16] Kim J, Ha Y, Chae C. Potentiation of Porcine Circovirus 2-induced Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome by Porcine Parvovirus Is Associated with Excessive Production of Tumor Necrosis Factor- α . *Veterinary Pathology*, 2006, 43 (5):718-725.
- [17] Ha Y, Lee EM, Lee YH, Kim CH, Kim D, Chae S, Ahn KK, Kim B, Chae C. Effects of a modified live CSFV vaccine on the development of PMWS in pigs infected experimentally with PCV-2. *Veterinary Record*, 2009, 164 (2):48-51.
- [18] Opriessnig T, Thacker EL, Yu S, Fenaux M, Meng XJ, Halbur PG. Experimental Reproduction of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Pigs by Dual Infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and Porcine Circovirus Type 2. *Veterinary Pathology*, 2004, 41 (6):624-640.
- [19] Krakowka S, Ellis J, McNeilly F, Waldner C, Rings DM, Allan G. *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins and porcine circovirus type 2 (PCV2) infection: Induction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the gnotobiotic swine model of PCV2-associated disease. *Canadian Veterinary Journal*, 2007, 48 (7):716-724.
- [20] Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, Ringler S, Rings DM, Allan G. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Veterinary Pathology*, 2001, 38 (1):31-42.
- [21] Sharma R, Saikumar G. Porcine parvovirus- and porcine circovirus 2-associated reproductive failure and neonatal mortality in crossbred Indian pigs. *Tropical Animal Health and Production*, 2010, 42 (3):515-522.
- [22] Ha Y, Lee YH, Ahn KK, Kim B, Chae C. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by prenatal porcine circovirus 2 infection and postnatal porcine parvovirus infection or immunostimulation. *Veterinary Pathology*, 2008, 45 (6):842-848.
- [23] Gilpin DF, McCullough K, Meehan BM, McNeilly F, McNair I, Stevenson LS, Foster JC, Ellis JA, Krakowka S, Adair BM, Allan GM. In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2003, 94 (3-4):149-161.
- [24] Basta S, Carrasco CP, Knoetig SM, Rigden RC, Gerber H, Summerfield A, McCullough KC. Porcine alveolar macrophages: poor accessory or effective suppressor cells for T-lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2000, 77 (3-4):177-190.
- [25] Thanawongnuwech R, Thacker EL, Halbur PG. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (isolate ATCC VR-2385) infection on bactericidal activity of porcine pulmonary intravascular macrophages (PIMs) in vitro comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMs). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1997, 59 (3-4):323-335.

- [26] Chiou MT, Jeng CR, Chueh LL, Cheng CH, Pang VF. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (isolate tw91) on porcine alveolar macrophages in vitro. *Veterinary Microbiolog*, 2000, 71(1-2):9-25.
- [27] Chang HW, Jeng CR, Lin TL, Liu JJ, Chiou MT, Tsai YC, Chia MY, Jan TR, Pang VF. Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 110(3-4):207-219.
- [28] Darwich L, Pié S, Rovira A, Segalés J, Domingo M, Oswald IP, Mateu E. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of General Virology*, 2003, 84(8):2117-2125.
- [29] Darwich L, Balasch M, Plana-Durán J, Segalés J, Domingo M, Mateu E. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *Journal of General Virology*, 2003, 84(12):3453-3457.

Coinfection effects of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus *in vivo* on phagocytosis and interferon mRNA expression of porcine alveolar macrophages

Xiangyi Liu, Ligong Chen, Qinye Song^{*}, Fang Yang, Yanqin Li, Yuzhu Zuo, Jianda Jiao, Xiupin Wang

College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China

Abstract: [**Objective**] Our study is to analyse the coinfection effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV) *in vivo* on phagocytosis and interferon mRNA expression level of porcine alveolar macrophages (PAM). [**Methods**] Forty-eight 5-week-old healthy piglets were divided randomly into 4 groups of 12 (PCV2, PPV, PCV2/PPV and the control groups). The piglets in PCV2 group were inoculated oronasally with 3 mL of porcine circovirus type 2 (PCV2, $10^{5.61}$ TCID₅₀/0.1 mL), PPV group with 3 mL of porcine parvovirus (PPV, $10^{6.69}$ TCID₅₀/0.1 mL), PCV2/PPV group with 3 mL of PCV2 and 3 mL of PPV and the control group with 3 mL of cell culture medium, respectively. Three piglets from each group were sacrificed randomly on 3, 7, 14 and 35 day post infection (dpi) and porcine alveolar macrophages (PAM) were collected to detect viability, phagocytotic capabilities and α - and γ -interferon (IFN- α 1 and IFN- γ) mRNA levels of PAM. [**Results**] The viabilities of PAM from PCV2 group and PCV2/PPV group became weaker than that of control group during the period of 3 – 14 dpi but they were similar to that of control group on 35 dpi; there was no significant difference between the viability of PCV2/PPV group and that of PCV2 group ($P > 0.05$). The phagocytotic capabilities of PAM from three virus infection groups were lower than that of control group ($P < 0.01$), among which that of PCV2/PPV group descended more drastically. IFN- α 1 and IFN- γ mRNA levels in PAM from PCV2/PPV group were significantly lower than those of PCV2, PPV and control groups ($P < 0.01$). [**Conclusion**] PCV2/PPV co-infection did not cause further decline of PAM viability but strongly weakened phagocytosis and constantly lowered IFN (IFN- α 1 and IFN- γ) mRNA expression levels of PAM.

Keywords: PCV2, PPV, Co-infection, PAM, Phagocytosis, Interferon, Swine

(本文责编: 张晓丽)