

呼肠孤病毒感染的树鼩中三类 CD 分子及 IFN- γ 表达变化及特征

袁圆, 王璇, 张志成, 李娜, 王文广, 匡德宣, 代解杰*

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所, 中国医学科学院医学生物学研究所实验树鼩标准化与应用研究省创新团队, 云南省眼科疾病防治研究重点实验室, 昆明 650118)

【摘要】 **目的** 探讨树鼩呼肠孤病毒激起机体免疫变化的特征, 为树鼩的病毒防范提供理论基础。 **方法** 选取 40~50 日龄的树鼩分为三组 (MRV1/TS/2011 病毒株、MRV3/TS/2013 病毒株和空白对照), 通过灌胃后, 采集第 1、8、14、21、28 天尾静脉血样, RT-PCR 检测病毒载量、流式细胞术检测 CD4/CD8/CD19、ELISA 检测 IFN- γ 。 **结果** 感染第 14 天, MRV1/TS/2011 和 MRV3/TS/2013 组的树鼩病毒载量、CD4⁺ 及 CD19⁺ 细胞数量达峰值, 其中经 MRV1/TS/2011 感染后第 1 天 CD4⁺ 就有较高表达且数值与对照组相比差异有显著性, CD8⁺ 细胞数量及 IFN- γ 表达量在感染后第 21 天达到峰值。 CD4⁺ 经 MRV1/TS/2011 感染后表达量更高, CD8⁺ 经 MRV3/TS/2013 感染后表达量更高。 **结论** 初步得出 MRV1/TS/2011 及 MRV3/TS/2013 感染机体后, 随病毒载量变化, CD4/CD8/CD19 及 IFN- γ 产生的变化规律: MRV1/TS/2011 感染前期主要激起机体体液免疫, CD4⁺ 细胞发挥主要作用; MRV3/TS/2013 可能主要影响机体细胞免疫, 体液免疫只在病毒表达量显著升高及感染后期发挥作用, CD8⁺ 细胞和 IFN- γ 通过细胞免疫参与抗病毒反应。 CD4⁺ 细胞可能对 1 型呼肠孤病毒更敏感, 而 CD19⁺ 细胞可能对 3 型呼肠孤病毒更敏感。对树鼩呼肠孤病毒的感染特征研究和树鼩本身的病毒防范有一定指导意义。

【关键词】 树鼩呼肠孤病毒; 免疫应答; 流式细胞术; CD 分子; 细胞因子

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 03-0323-08

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.03.009

Characteristics and changes of the CD molecules and IFN- γ expressions in tree shrews infected with mammalian orthoreovirus

YUAN Yuan, WANG Xuan, ZHANG Zhicheng, LI Na, WANG Wenguang, KUANG Dexuan, DAI Jiejie*

(Center of Tree Shrew Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medicine Sciences (CAMS) & Peking Union Medical College (PUMC). Yunnan Innovation Team of Standardization and Application Research in Tree Shrew. The Key Laboratory of Yunnan Province for Ophthalmic Research and Disease Control. Kunming 650118, China)

Corresponding author: Dai Jiejie. Email: djj@imbcams.com.cn

【Abstract】 **Objective** To explore the characteristics of immunological changes in tree shrews infected with orthoreovirus, and provide a theoretical basis for the prevention of virus in tree shrews. **Methods** 40-50-day-old tree shrews were divided into three groups: MRV1/TS/2011 virus-infected and MRV3/TS/2013 virus-infected groups, and saline-treated control group. On the 1, 8, 14, 21, and 28 days after infection, blood samples were taken from the tail vein and used for RT-PCR, flow cytometry and ELISA detection, to assess the viral load, number of CD4/CD8/CD19 cells, and

【基金项目】 国家科技支撑计划 (No. 2014BAI01B00); 云南省联合支持国家计划项目 (No. 2015GA009); 云南省重大科技专项 (No. 2017ZF007)。

Funded by National Key Technology Support Program (No. 2014BAI01B00); Yunnan Province Jointly Supports the National Program (No. 2015GA009); Major Science and Technology Project in Yunnan Province (No. 2017ZF007).

【作者简介】 袁圆 (1994—), 女, 硕士, 研究方向: 动物学。E-mail: 1211092538@qq.com

【通信作者】 代解杰 (1961—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 实验动物资源开发与应用。Email: djj@imbcams.com.cn

IFN-gamma expression. **Results** The MRV1/TS/2011 and MRV3/TS/2013 viral load in the plasma and the number of CD4⁺ and CD19⁺ cells reached a peak at the 14th day after infection. At the first day after MRV1/TS/2011 infection, the CD4⁺ cells had a significantly higher expression compared with the normal group. CD8⁺ cells and the IFN-gamma expression reached a peak at the 21st day after infection. The expression of CD4⁺ was even higher after MRV1/TS/2011 infection, and the expression of CD8⁺ cells was higher after MRV3/TS/2013 infection. **Conclusions** We would conclude that after MRV1/TS/2011 and MRV3/TS/2011 virus infection, accompanying the changes of viral load, it shows some regularity of the expression of CD4/CD8/CD19 and IFN-gamma in the tree shrews; at the early stage of MRV1/TS/2011 virus infection, humoral immunity is stimulated, and CD4⁺ cells play a major role. MRV3/TS/2013 virus may mainly affect the cellular immunity, while humoral immunity only plays a role at a high viral expression or the late stage of infection. CD4⁺ cells may be more sensitive to type 1 reovirus, and CD19⁺ cells may be more sensitive to type 3 reovirus.

【Key words】 orthoreovirus of tree shrew; immune response; flow cytometry; cluster of differentiation (CD); cytokine

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

哺乳动物呼肠孤病毒(mammalian orthoreovirus, MRV)是基因组含 10 个节段的呼肠孤病毒科(Reoviridae)正呼肠孤病毒属(Orthoreovirus)RNA 病毒^[1],标准株可根据红细胞凝集活性分为:T1L(Long 株)、T2J(Jone 株)和 T3D/T3A(Dearing 株/Abney 株)^[2]。MRV 具有广泛的宿主谱,但一般仅在幼体或免疫功能不全的动物体内引起严重感染^[3]。由于 MRV 特殊的基因组^[4]特性和广泛的宿主谱特征可能对人造成潜在威胁^[5],且其作为溶瘤病毒在肝癌治疗中的重要价值^[6],故对呼肠孤病毒引起宿主免疫的特征的研究十分必要。目前呼肠孤病毒免疫学方面相关研究多集中于番鸭^[7]、草鱼呼肠孤病毒^[8],哺乳动物呼肠孤病毒免疫相关的研究十分有限;树鼩(tree shrew)作为灵长类近亲,近期也从其粪便中分离出的两株分属于 T1 型和 T3 型的呼肠孤病毒 MRV1/TS/2011 和 MRV3/TS/2013^[9],关于两株病毒的特征和引发宿主免疫的变化规律亟待补充。前期研究表明,呼肠孤病毒感染正常树鼩后,仅在感染前期有较高的复制表达,后期病毒表达水平有所下降,甚至逐渐被机体清除^[10];在此过程中与适应性免疫相关的 II 型干扰素基因有所上调^[11],但机体清除呼肠孤病毒的具体免疫机制以及机体适应性免疫在此过程中发挥的作用尚未明晰。临床检测中 CD4⁺/CD8⁺ 和 IL-4/IFN- γ 常作为适应性免疫功能评价的指标^[12],综合常用的评价指标^[13],以及适应性免疫中发挥主要功能的细胞类群,本文选用:CD4(一般表达于辅助性 T 细胞)、CD8(一般表达于杀伤性 T 细胞, cytotoxic lymphocyte, CTL 表面)、CD19(表达于所有 B 细胞)、IFN- γ (由 CD4⁺ Th1 类细胞分泌,可协同 CTL 细胞共同发挥细胞免疫作用)^[14]作为实时监测机体

适应性免疫反应变化情况的指标,用 MRV1/TS/2011 和 MRV3/TS/2013 感染自身未携带呼肠孤病毒的树鼩,通过对感染后树鼩体内病毒载量及四个指标的变化情况初步推断呼肠孤病毒引起宿主免疫反应的过程,为树鼩源呼肠孤病毒自身感染特性的研究提供科学依据,对人兽共患疾病的防治也有重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

普通级远交繁殖的 F4 代中缅树鼩滇西亚种(tree shrew, *Tupaia belangeri chinensis*)由中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心提供【SCXK(滇)K2013-0001】,饲养于中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心普通环境【SYXK(滇)K2013-0001】,于中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心进行实验。所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审批号:DWSP201803034)。

1.1.2 试剂及设备

实时荧光定量 PCR 仪:美国 Bio-Rad,型号为 CFX-96;高压灭菌锅:日本 Tomy 公司,型号为 TOMY-SS-325;恒温培养箱:美国 Forma 公司,型号为 CO2 T/C;生物安全柜:美国 Forma 公司,型号为 A/B3 型(6Fi);低温离心机:日本 Hitachi 公司,型号为 CT15RE;QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit(德国 Qiagen);生理盐水;胃管;采血注射器;Perfect Real Time One step primescript RT-PCR kit(TaKaRa);树鼩 CD4 单克隆抗体(PerCP,小鼠源);树鼩 CD8 单克隆抗体(PerCP,小鼠源);人 CD19 单克隆抗体

(PerCP,小鼠源);溶血素(Beckman)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

选取离乳 40 ~ 50 d 左右的树鼯 16 只,体重 60 ~ 70 g,尾静脉采血 160 μ L, QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit 提取试剂盒提取总 RNA,将产物进行 PCR,随机选取病毒检测为阴性的动物 12 只(雌雄各半)分为三组,4 只一组灌胃病毒液。A 组:MRV1/TS/2011 106.1TCID 50/mL 0.8 mL/只;B 组:MRV1/TS/2011 105.6TCID 50/mL 0.8 mL/只;对照组即 C 组:等量灌入生理盐水。

1.2.2 病毒样本扩增培养及毒力检测

Vero 细胞接种于 12 孔板进行病毒培养后,免疫荧光初步确定收毒条件:感染后 36 ~ 75 h 之间收毒,外源加入阿尔法糜蛋白酶。小方瓶内进行扩毒,收毒,反复冻融三次破碎细胞,4 $^{\circ}$ C, 4000 r/min 离心 30 min,去沉淀。

收取病毒,TCID50 检测病毒毒力:将 Vero 细胞按接种于 96 孔板,于 37 $^{\circ}$ C 孵箱中培养至长成致密单层。PBS 清洗后,加入终浓度为 10 μ g/mL 的糜蛋白酶白酶的维持液,倍等比稀释病毒,10¹ ~ 10⁸ 共 8 个稀释度,每个稀释度设 10 个实验孔,2 个对照孔。甩干孔板中的 PBS,实验孔接种稀释后的病毒液,对照孔加入相应不含病毒的维持液。37 $^{\circ}$ C 孵箱中培养,观察并记录出现 CPE 的孔数,计算 TCID50。按前期实验确定的最适攻毒条件调整本次实验的攻毒剂量。

1.2.3 样本采集处理

病毒感染第 1、8、14、21、28 天,尾静脉采集采抗凝血 400 μ L。

分为三部分,其中 150 μ L 提取核酸后检测病毒载量, QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit 提取试剂盒提取总 RNA,将产物进行 RT-PCR,检测的引物见表 1。

表 1 用于实时定量 RT-qPCR 的 MRV/TS 探针及引物序列

Tab.1 Primers and probes of RT-qPCR of the MRV/TS

引物 Primers	序列 Sequences	基因名称 Genes
引物 Primer	F 5' - TCTGCTCGTGAAGTGCGCAA -3'	MRV1/TS/2011
	R 5' - GCACACAGTGGTAAGCGCAA -3'	
探针 Probe	5' FAM,3' Tamra 5' - CGACCGACGCTCAGCAGCCTCACA -3'	
引物 Primer	F 5' - CGAAGCAGGAGGGTCATTAT -3'	MRV3/TS/2012
	R 5' - AGCAGTGGAGGGATAGCAGA -3'	
探针 Probe	5' FAM,3' Tamra 5' -TACCTATCTGCAGGGTTTCTCGGCTG-3'	

取 100 μ L 血样利用 ELISA 检测 IFN- γ 表达量:将标准品及样品加完后,放于湿盒内室温孵育 2 h;弃去酶标包被板中液体,加满洗液清洗 3 次,拍干;用稀释液按 1:1500 的比例稀释酶标抗体,在标准品梯度稀释孔、对照孔及待测样品孔中,每孔加入稀释好的酶标抗体 100 μ L,空白孔 A1 除外;湿盒内室温孵育 1 h;加满洗液清洗 3 次,拍干;加入显色液显色 10 min,加终止液 1 终止反应。在 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(A 值)。

剩余部分样品利用红细胞裂解液裂解红细胞后流式上机检测。每份取 100 μ L 单细胞悬液,约 1 \times 10⁶ 个细胞;样品取一份细胞加入 10 μ L 树鼯 CD4/CD8/CD19 单克隆抗体 PerCP;空白取一份细胞不加抗体;室温下避光反应 1 ~ 2 h;每份加入 1 mL PBS,轻柔洗涤细胞一次,2000 r/min 离心 10 min,弃上清;每份加入 300 μ L PBS 重悬细胞,上机检测。

1.3 数据处理

数据得出后以平均值 \pm 标准误记录,作图。组间差异性用 t-test 软件分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性, $P < 0.01$ 表示差异极显著。IFN- γ 测定后,以标准品浓度为横坐标,A 值为纵坐标,计算出标准品的 Logistic 曲线拟合(四参数)回归方程式,根据样品的 A 值代入方程式计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度。

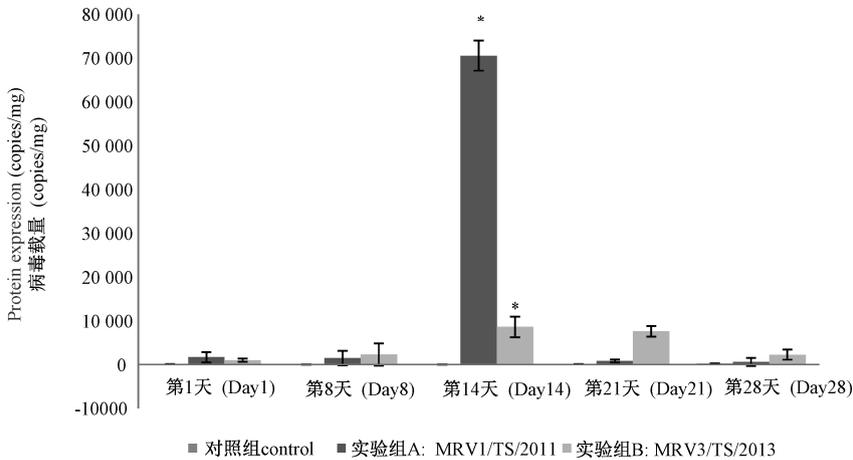
2 结果

2.1 病毒载量随感染时间变化

血浆中两组病毒载量均在感染后第 14 天有高表达,其中 A 组(感染 MRV1/TS/2011 的动物)相较于 B 组(感染 MRV3/TS/2013 的动物)表达量较高,最高可达 7.05 \times 10⁴ copies/mg,其余时间均检测到微量表达;B 组在第 14 天呈 8.59 \times 10³ copies/mg 高表达后,第 21 天仍有较高表达,第 28 天表达量急剧

减少。对照组无病毒 RNA 表达,与对照组比较,两个病毒感染组在第 14 天差异有显著性 ($P < 0.05$),

详见图 1。



注:与对照组比较 * $P < 0.05$, 差异有显著性。

图 1 MRV1/TS/2011 和 MRV3/TS/2013 感染树鼩后血浆中的病毒载量

Note. * $P < 0.05$ means there was a significant difference.

Fig. 1 Expression of virus in the tree shrews infected with MRV1/TS/2011 and MRV3/TS/2013

2.2 免疫细胞数量及 IFN- γ 表达量随感染时间变化

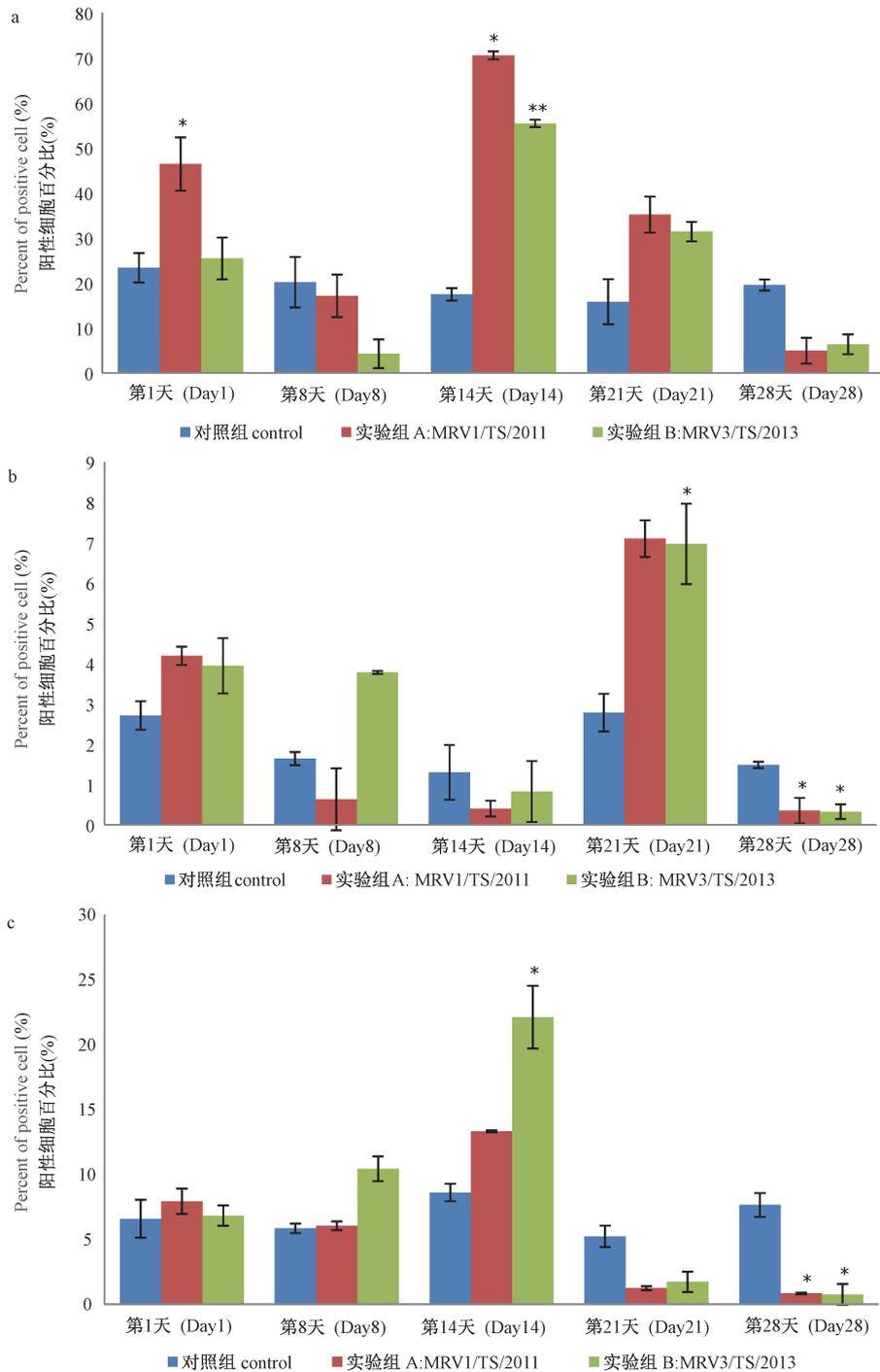
经两株病毒感染后, $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 及 $CD19^+$ 细胞阳性率表达呈现波动变化, $CD4^+$ 及 $CD19^+$ 细胞量均在第 14 天达峰值; 对照组 $CD4^+$ 细胞阳性率基本表达在 20%~30% 之间, 对照组 $CD19^+$ 细胞阳性率基本在 4%~8% 之间; 其中, $CD4^+$ 细胞在感染后第 1、14、21 天均有较高的表达, A 组 $CD4^+$ 细胞在感染第 1 天显著高于对照组; 其余时间细胞量低于对照组; $CD19^+$ 在第 21、28 天表达量低于对照组, 第 28 天感染后细胞阳性率与对照组相比差异有显著性。与对照组相比, 经 MRV3/TS/2013 感染的 $CD19^+$ 细胞在第 8 天和第 14 天细胞阳性率显著升高; 而经 MRV1/TS/2011 感染后 $CD19^+$ 细胞变化不如 MRV3/TS/2013 明显。两株病毒感染后 $CD8^+$ 细胞量在 21 天达峰值; 在感染第 14 天、第 28 天时, 与对照组相比, 经两株病毒感染后 $CD8^+$ 细胞量显著减少。对照组 $CD8^+$ 细胞表达基本维持在 1%~3% 之间。如图 2。

对照组 $CD4^+$ / $CD8^+$ 在感染后也呈波动变化, 变化范围在 5~14 之间, 在第 21 天时有最小值; MRV1/TS/2011 感染后, 在第 1、8、14 天, $CD4^+$ / $CD8^+$ 显著高于对照组; 而在 MRV3/TS/2013 感染后, 第 14、28 天, $CD4^+$ / $CD8^+$ 显著高于对照组。详见表 2。对照组 IFN- γ 表达量在 7~12 之间, 经

MRV1/TS/2011 及 MRV3/TS/2013 感染后, IFN- γ 表达量均在第 21 天与对照组相比差异有显著性, 达最大值, 详见图 3。

3 讨论

适应性免疫是机体抵御外界病原侵染的一条重要途径, 由淋巴细胞增殖分化为表达不同 CD 分子的效应细胞^[15], 完成细胞免疫及体液免疫两种应对。生物研究和临床上常通过对 CD 分子的监测来反映机体免疫功能或判断病程。 $CD4^+$ 细胞增加被认为是细胞免疫增强的表现^[16]; IFN- γ 诱导并参与细胞免疫, $CD8^+$ 表达于 CTL 表面, 两者表达量增加常意味着机体细胞免疫功能增强, B 表面的 $CD19^+$ 增加则相反, 表明机体体液免疫功能增强。而适应性免疫的研究不仅在疾病的机理研究中有重要作用^[17-18], 也能为后续治疗提供思路; 如, 溶瘤病毒治疗的一条重要思路就是发宿主的免疫应答^[19], 目前, 在缺乏适应性免疫应答的两种小鼠模型中研究表明, 借助引发免疫反应来实现呼肠孤病毒的抗肿瘤效应具有可行性和有效性^[20]。故呼肠孤病毒引起机体适应性免疫反应的研究十分必要, 且因树鼩与其他哺乳类实验动物, 如小鼠, 在免疫系统和神经系统中相比亲缘关系更接近于人^[21], 故本研究在未来临床治疗中存在重要的潜在价值。



注:a 图为 CD4⁺ 细胞阳性率随天数变化情况;b 图为 CD8⁺ 细胞阳性率随天数变化情况;c 图为 CD19⁺ 细胞阳性率随天数变化情况;与对照组比较 * $P < 0.05$, 差异有显著性, ** $P < 0.01$, 差异有极显著性。

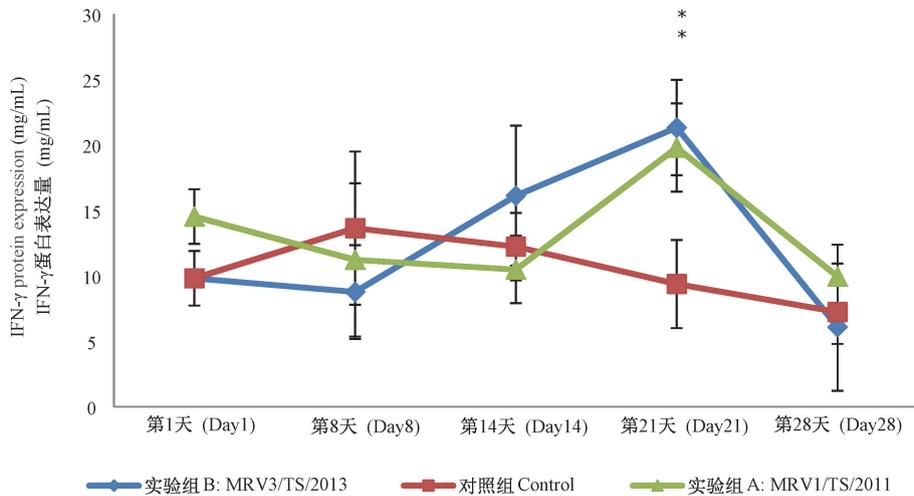
图 2 MRV1/TS/2011 和 MRV3/TS/2013 感染树鼩后血浆中 CD4⁺/CD8⁺/CD19⁺ 表达情况

Note. Figure a shows CD4⁺ cells changed with the time after infection. Figure b shows CD8⁺ cells changed with the time after infection; Figure c shows CD19⁺ cells changed with the times after infection. * $P < 0.05$ means there was a significant difference, and ** $P < 0.01$ means there was a extremely significant difference.

Fig. 2 Expression of CD4⁺/CD8⁺/CD19⁺ cells in the tree shrews infected with MRV1/TS/2011 and MRV3/TS/2013

表 2 MRV1/TS/2011 和 MRV3/TS/2013 感染树鼯后血浆中 CD4⁺/CD8⁺Tab. 2 CD4⁺/CD8⁺ cells in the tree shrew infected with MRV1/TS/2011 and MRV3/TS/2013

组别 Groups	第 1 天 Day 1	第 8 天 Day 8	第 14 天 Day 14	第 21 天 Day 21	第 28 天 Day 28
实验组 A: MRV1/TS/2011	11. 073	27. 042	174. 876	4. 955	14. 0761
实验组 B: MRV3/TS/2013	6. 448	1. 129	66. 972	4. 508	19. 546
对照组 Control	8. 616	12. 286	13. 423	5. 683	13. 154



注:与对照组比较 * $P < 0.05$, 差异有显著性; 第 21 天时, MRV1/TS/2011 和 MRV3/TS/2013 感染组与对照组相比差异均有显著性。

图 3 MRV1/TS/2011 和 MRV3/TS/2013 感染树鼯后血浆中 IFN- γ 表达量情况

Note. * $P < 0.05$ means there is a significant difference; animals infected by MRV1/TS/2011 and MRV3/TS/2013 both have significant difference on the 21st day, compared with the normal group.

Fig. 3 IFN- γ expression in the tree shrew infected with MRV1/TS/2011 and MRV3/TS/2013

目前关于呼肠孤病毒引起机体免疫反应的研究十分有限,主要以和产业养殖相关的草鱼和番鸭作为研究对象。草鱼呼肠孤病毒感染是草鱼出血症的主要病因,草鱼可以通过鱼鳃上调 12 种抗病毒免疫相关基因表达来应对病毒感染^[8]。与哺乳动物不同,草鱼虽有脾、肾、胸腺等免疫器官,但主要的免疫细胞为 IgM 阳性细胞、IgZ 阳性细胞和 PAS 阳性细胞^[22],经病毒感染后三类主要免疫细胞的变化情况暂未见报道。姚金水等^[23]先后证实番鸭呼肠孤病毒可诱导感染细胞凋亡,特别是免疫细胞凋亡从而引起免疫抑制,同时还能引起严重的法氏囊损伤。而本文结果显示,CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺ 三类细胞仅在感染后期明显低于正常组,未观察到明显的免疫抑制现象。李爽等^[24]研究表明鸭源呼肠孤病毒感染雏鸭后 CD8⁺ 细胞阳性率也呈波动变化,在第 5 天达到峰值;而第 14 天,实验组 CD8⁺ 细胞阳性率明显低于对照组;同样,王全溪等^[25]在雏番鸭上的研究也表明试验组脾脏在攻毒后第 5 天,

浆细胞数量比对照组少,差异有显著性 ($P < 0.01$),之后细胞数量有所回升,提示鸭源呼肠孤病毒可能直接对免疫器官进行损伤,使外周血 CD3⁺、CD8⁺T 细胞阳性率降低,导致机体细胞免疫和体液免疫水平下降,诱导机体产生免疫抑制;而本文研究表明 MRV1/TS/2011 及 MRV3/TS/2013 载量在感染第 14 天达峰值,这一结果与前期实验所得相符^[10];而 CD4⁺ 及 CD19⁺ 细胞数量也在感染后第 14 天达峰值,其中经 MRV1/TS/2011 感染后第 1 天 CD4⁺ 就有较高表达且数值与正常组相比有显著性差异,且相较于其他两种被检测细胞,感染过程中,CD4⁺ 细胞阳性率一直较高;可推测在病毒感染前期,机体主要产生 CD4⁺ 细胞,在整个应对感染的过程中,CD4⁺ 细胞一直发挥主要作用;在第 14 天病毒高表达时,CD19⁺ 细胞数量显著增加,共同参与机体免疫反应。关于哺乳动物源呼肠孤病毒的研究目前主要集中与其分子和感染特性,关于其引起机体的免疫反应尚未见报道。为了解树鼯源呼肠孤病

毒感染正常个体后到被机体自然清除的过程,本文主要选用动物离乳 40~50 d 的树鼩,此发育阶段的树鼩个体免疫功能已近完善,且树鼩免疫系统发育在进化上要优于番鸭、草鱼,故不同于这两者的研究结果,在树鼩上未发现明显的免疫抑制现象,动物免疫器官及动物个体也未表现明显的感染病症。结合已有报道,以及本文 CD4⁺ 细胞和 CD19⁺ 经两株病毒感染后表现出的敏感性不同,一方面验证了前期实验中呼肠孤病毒能被正常机体清除的结论,另一方面提示我们不同来源的呼肠孤病毒对宿主感染的机制各不相同,不同型别的呼肠孤病毒也会针对性引起的机体不同的免疫反应。初步推测 MRV1/TS/2011 感染前期主要激起机体体液免疫;MRV3/TS/2013 可能主要影响机体细胞免疫,体液免疫只在病毒表达量显著升高及感染后期发挥作用。与呼肠孤病毒现有的研究对象相比,本文选用近人灵长类动物树鼩作为对象,实验结果为哺乳动物呼肠孤病毒感染及刺激机体免疫应对的机制研究提供了补充资料。

实验中采用的 CD19⁺ 抗体为小鼠源抗人抗体,可通过交叉反应识别树鼩 CD19⁺ 细胞^[26],可能存在非特异性识别的情况,对 B 细胞数量的确立可能存在一定误差;且实验使用单染流式计数,所得结果仅能初步反应感染后个体免疫细胞的变化趋势,为确定 T 辅助细胞、B 淋巴细胞等在感染过程中发挥的具体作用,则后续实验中还需加入 CD3⁺ 细胞染色,由双染特异的圈定具体细胞亚群,反应其准确的变化情况。现有的 IL-4 试剂盒对树鼩检测的灵敏性不高,故实验中未加入该指标,仅用 IFN- γ 辅助判断细胞与体液免疫;本次各类 CD 分子及 IFN- γ 检测中,对照组结果都有较大的个体的差异,故 CD4⁺/CD8⁺ 比值仅作为参考体液免疫和细胞免疫主导作用的一个辅助指标,需要进一步扩大样本才能得出一个正常比值范围,作为判断指标。本研究实验组仅选用 4 只动物,是从小样本得出的相应免疫细胞基本变化趋势,实验过程中发现,树鼩个体间免疫功能差异较大,后期实验还应扩大实验样本,同时在实验设计中加入阴性对照组(培养病毒使用的维持液灌胃)、阳性对照组,增加实验严谨性,避免偶然误差,得出普适变化规律。

本文通过检测两株最近从树鼩粪便分离得到的病毒 MRV1/TS/2011 及 MRV3/TS/2013,感染正常树鼩后几类淋巴细胞表面 CD 分子及干扰素随感

染时间的变化情况,初步揭示了树鼩呼肠孤病毒引起宿主免疫变化的规律,即:呼肠孤病毒感染树鼩后,主要刺激机体产生 CD4⁺ 细胞,在病毒表达量达高峰期时,CD19⁺ 细胞显著增加,可能体液免疫发挥作用;而在病毒感染后期,CD8⁺ 细胞可能通过细胞免疫参与抗病毒反应,IFN- γ 可由 Th1 类细胞和 CD8⁺ 细胞分泌,在病毒感染后期参与细胞免疫;CD4⁺ 可能对 1 型呼肠孤病毒更敏感,而 CD19⁺ 可能对 3 型呼肠孤病毒更敏感。对两株病毒的感染规律研究有一定补充,同时可为呼肠孤病毒在机体内避开机体免疫发挥溶瘤作用提供一定的思路,可拓展呼肠孤病毒发挥溶瘤效应的分子机制,也为树鼩的病毒防范提供了理论基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL. Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. San Diego: Academic Press, 2003, 14(10): 84-96.
- [2] 曾智勇,郭万柱,徐志文,等. 仔猪腹泻粪样中猪呼肠孤病毒的分离鉴定 [J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(6): 574-580.
Zeng ZY, Guo WZ, Xu ZW, et al. Isolation and identification of porcine Reovirus from diarrhea faces of pigs [J]. Acta Vet Zootech Sin, 2007, 38(6): 574-580.
- [3] 左庭婷,端青. 呼肠病毒感染实验动物致病性的研究进展 [J]. 军事医学科学院院刊, 2008, 32(4): 389-391.
Zuo TT, Duan Q. Advances in research on pathogenicity of reovirus infection in lab animals [J]. Bull Acad Milit Med Sci, 2008, 32(4): 389-391.
- [4] Allocat Ni, Petrucci AG, Di Giovanni P, et al. Bat-man disease transmission; zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations [J]. Cell Death Discov, 2016, 2: 16048
- [5] Egawa K, Shimajima M, Taniguchi S, et al. Virulence, pathology, and pathogenesis of Pteropine orthoreovirus (PRV) in BALB/c mice; Development of an animal infection model for PRV [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2017, 11(12): 60-76.
- [6] Adel S, Matthew JB, Karen S. Oncolytic reovirus as a combined antiviral and anti-tumour agent for the treatment of liver cancer [J]. Gut Hepatol, 2016, 10,(11): 1-12.
- [7] 王全溪,吴宝成,李国平. 番鸭呼肠孤病毒诱导免疫抑制机制的初步研究 [J]. 中国兽医科学, 2009, 29(9): 769-773.
Wang QX, Wu BC, Li GP. Mechanism of immunosuppression induced by Muscovy duck reovirus [J]. Vet Sci China, 2009, 29(9): 769-773.
- [8] Li MQ, Chen LJ, Rao YL, et al. Gill mediates immune response after grass capp reovirus challenge in grass capp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Acta Hydrobiol Sin, 2014, 38(5): 834-838.

- [9] 李晓飞, 殷安国, 张媛. 树鼩呼肠孤病毒 RT- nPCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(6): 63-68.
Li XF, Ying AG, Zhang Y, et al. Establishment and application of a Rt-nRCR assay for detection of orthoreovirus in tree shrews [J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(6): 63-68.
- [10] 李晓飞. 树鼩呼肠孤病毒分离与核酸检测方法建立及其致病性研究 [D]. 北京: 北京协和医院, 2014.
Li XF. Isolation and nucleic acid detection and pathogenicity of tree shrew [D]. Beijing: Peking Union Medical College (PUMC), 2014.
- [11] 徐娟. 树鼩呼肠孤病毒分离鉴定及基因重组质粒构建和分子遗传特征分析 [D]. 北京: 北京协和医院, 2014.
Xu J. Isolation and identification of *Tupaia belangeri* orthoreovirus and the S1 gene recombinant plasmid construction and the S1 genomic characteristics analysis [D]. Beijing, Peking Union Medical College, 2014.
- [12] Holling TM, Schooten E, van Den Elsen PJ. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men [J]. Hum Immunol, 2004, 65(4): 282-290.
- [13] 侯江厚, 程小星, 张灵霞, 等. 结核病局部免疫的研究进展 [J]. 中华结核和呼吸杂志 2014, 37(2): 119-121.
Hou JH, Cheng XX, Zhang LX, et al. Research progress of local immune in tuberculosis [J]. Chin J Tuberc Resp Dis, 2014, 37(2): 119-121.
- [14] Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, et al. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection [J]. Ann Intern Medicine, 1996, 124(7): 654-663.
- [15] Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system [J]. Nat Immunol, 2015, 16(8): 343-53.
- [16] 杨雪, 焦艳梅, 吴昊. CD4+ T 淋巴细胞亚群研究进展 [J]. 北京医学, 2011, 33(12): 1001-1003.
Yang X, Jiao YM, Wu H. Research progress of CD4+ T cell subpopulation [J]. Beijing Med J, 2011, 33(12): 1001-1003.
- [17] 胡娟, 杨扬, 米本中, 等. 高脂饲料联合链脲佐菌素诱导的 Beagle 犬糖尿病模型特征 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 54-59.
Hu J, Yang Y, Mi BZ, et al. A beagle model of type 2 diabetes mellitus induced by high fat chow and low dose streptozotocin injection [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(2): 54-59.
- [18] 毛达勇, 周有利, 朱名安, 等. 2 型糖尿病伴感染患者细胞免疫和体液免疫的研究 [J]. 南阳医学院学报, 2003, 22(5): 275-277.
Mao DY, Zhou YL, Zhu MA, et al. The Study of cell immunity and humoral immunity in Type 2 diabetic mellitus patients complicating with infections [J]. J Yunyang Med Coll, 2003, 22(5): 275-277.
- [19] Garber K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment [J]. J Natl Cancer Inst, 2006, 98(5): 298-300.
- [20] Melcher A, Parato K, Rooney CM, et al. Thunder and lightning: immunotherapy and oncolytic viruses collide [J]. Mol Ther, 2011, 19(6): 1008-1016.
- [21] 徐娟, 黄晓燕, 李晓飞. 树鼩呼肠孤病毒的分离鉴定 [J]. 动物学研究. 2013, 34(2): 116-120.
Xu J, Huang X, Li XF. Isolation and identification of solitary virus in tree shrew [J]. Zool Res, 2013, 34(2): 116-120.
- [22] 雷雪彬. 草鱼免疫器官个体发育的组织结构和免疫细胞变化 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
Lei XB. Microstructure and immune cells' distribution of early development immune organs in *Ctenopharyngodon idellus* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013.
- [23] 姚金水, 吴宝成, 陈文列, 等. 禽(番鸭)呼肠孤病毒诱导脾脏单核-巨噬细胞和淋巴细胞凋亡的超微观察 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2004, 33(4): 501-504.
Yao JS, Wu BC, Chen WL, et al. Ultrastructural observation on spleen cell, mononuclear macrophage and lymphocytes incurring apoptosis induced by avian (Muscovy duck) reovirus [J]. J Fujian Agric Forest Univ (Nat Sci Ed), 2004, 33(4): 501-504.
- [24] 李爽, 谷长勤, 白家媛, 等. 鸭源呼肠孤病毒感染引起雏鸭免疫损伤的观察 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(21): 4514-4520.
Li S, Gu CQ, Bai JY, et al. Observation of duckling immune injury caused by duck-originated reovirus infection [J]. Scientia Agric Sin, 2010, 43(21): 4514-4520.
- [24] 王全溪, 吴异健, 陈枝华, 等. 番鸭呼肠病毒感染对体液免疫的影响 [J]. 动物医学进展, 2005, 26(8): 8-12.
Wang QX, Wu YJ, Chen ZH, et al. The effect of the virus infection of duck on humoral immunity [J]. Progr Vet Med, 2005, 26(8): 8-12.
- [26] 李昕潼, 陶玉芬, 刘建生. 树鼩细胞免疫表型分析研究的展望 [J]. 实验动物科学, 2017, 34(4): 74-76.
Li XT, Tao YF, Liu JS. The prospect of the study on the immunophenotype analysis of tree shrew [J]. Lab Anim sci, 2017, 34(4): 74-76.

[收稿日期] 2018-01-16