

## 不同日月龄兔感染 RHDV 后圆小囊的比较病理学观察

余锐萍 杨汉春 马毅新 陈艳红 查振林 高齐瑜

(中国农业大学 动物医学院,北京 100094)

**摘要** 为探讨圆小囊在兔体全身抗感染免疫中的功能作用,采用组织病理学及免疫组织化学方法,对比观察了 2 日龄、1 月龄及 2 月龄实验兔感染 RHDV 后圆小囊的病理变化,同时采用 ELISA 方法对实验兔的血清及肝、肾、脾中的 RHDV 含量进行了测定,重点对实验兔圆小囊黏膜上皮内淋巴细胞(IEL)进行了统计比较。结果显示:2 月龄以内兔人工感染 RHDV 后,临床症状、剖检及组织病理学观察均未见异常。血清及 RHDV 的靶器官肝、脾、肾中均未检测出 RHDV 抗原。2 月龄以上兔感染 RHDV 后,无论从临床症状,还是大体剖检,组织病理学观察,均出现了明显的病理学改变,而且感染后血清 RHDV 抗原检测呈阳性反应。圆小囊、肝、脾、肾等组织器官都呈现 RHDV 免疫组化强阳性反应。2 月龄以内的乳兔及仔兔感染 RHDV 后,圆小囊虽未出现明显的形态结构改变,免疫组化染色也未见 RHDV 抗原阳性反应物,但 IEL 明显增多,2 日龄兔 IEL 由 1.2% 增加到 4.2%;1 月龄兔的 IEL 由 10.1% 增加到 26.1%。1 月龄仔兔还表现出固有层中淋巴细胞明显增多。

**关键词** 不同龄兔;圆小囊;RHDV;肠上皮内淋巴细胞;病理学

**中图分类号** S 852.42

**文章编号** 1007-4333(2004)01-0049-05

**文献标识码** A

## Comparative pathological studies of sacculus rotundus with the different ages of rabbits infected with rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV)

She Ruiping, Yang Hanchun, Ma Yixin, Chen Yanhong, Zha Zhenlin, Gao Qiyu

(College of Animal Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** Pathological changes of sacculus rotundus of rabbits which had different ages and were infected with rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) were studied. RHDV in liver, kidney and spleen of the experimental rabbits was also tested by both the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the quantitative analysis of intraepithelial lymphocyte (IEL) in the villus epithelium of sacculus rotundus. The results indicated that the infected rabbits of two months old did not appeared abnormal changes in clinical symptom, necropsy and histopathology. RHDV antigen was not detected in sera, liver, kidney and spleen. But the infected rabbits older than two months had obvious alterations in clinical symptom, necropsy and histopathology, and contained high level of RHDV antigen in sera. Immunohistochemistry showed a positive immunoreactivity of RHDV antigen in the liver, spleen, kidney and sacculus rotundus in these infected rabbits. The number of IEL in the villus epithelium of sacculus rotundus of the rabbit younger than two months increased significantly following infecting. The number of lymphocyte in proper tunic also increased obviously.

**Key words** rabbits with different ages; sacculus rotundus; RHDV; IEL; pathology

由于神经体液因素不健全,新生动物对病毒的易感性更强<sup>[1]</sup>,但兔病毒性出血症(RHD)却与之相反。以往关于 RHD 的研究表明,兔对此病的易感性随品种、日龄不同而有差异,RHDV 主要感染 2 月龄以上的青壮年兔,且膘情越好,发病与死亡率越

高<sup>[2~5]</sup>。2 月龄以内的白兔具有抵抗力,人工感染 3~5 日龄乳兔即使大剂量感染也不发病。新生兔对 RHDV 有如此强的抵抗力,这其中的原因是很值得探讨的。

圆小囊是兔特有的肠道黏膜免疫器官<sup>[6,7]</sup>,它

收稿日期:2003-11-11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870584;30270995)

作者简介:余锐萍,教授,主要从事动物黏膜免疫细胞及分子病理学研究。E-mail:sherpcau@cau.edu.cn

在兔全身抗感染免疫中作用的报道还很少。本研究对2日龄、1、2月龄兔感染RHDV后,病毒在兔血清中和实质器官中的变化及圆小囊的病理学变化进行了比较观察,并对实验兔圆小囊黏膜上皮内淋巴细胞(intraepithelial lymphocyte, IEL)进行了统计比较,以探讨圆小囊在兔体全身抗感染免疫中的功能作用。

## 1 材料与方法

1) 实验动物。实验用初生2日龄未开眼乳兔9只,1月龄仔兔9只,2月龄以上大兔9只,购自深山区非RHD疫区,均为白兔。

2) RHDV。实验用RHD病兔脏器毒(肝、脾)由中国农业大学动物医学院传染病与微生物教研室提供。将含毒病料剪碎后以生理盐水作1:10稀释,研磨过滤,滤液经双抗处理后备用。

3) 实验设计。3种不同日龄兔各9只,不同日龄随机均分为3组,每组3只。1组作对照,另2个感染组均按每只2 mL腹腔接种上述RHDV病料滤液,未开眼乳兔按每只1 mL接种。接种后于28、48及50 h剖杀采取圆小囊及其他有关组织,用2.5%戊二醛-多聚甲醛混合固定液固定。作石蜡切片、染色、观察,并对实验兔圆小囊黏膜上皮内淋巴细胞(IEI)进行计数统计。为了减少对照兔与感染兔日龄上的差异,各对照组与第一批感染组同时取材。

所有实验兔接种前全部经心脏采血,做血清RHDV母源抗体测定。接种后,分别于28和48 h(发病兔在濒死前)剖杀取材前采血,做RHDV抗原检测,并对剖检兔的肝、脾、肾中RHDV抗原进行检测。

4) 切片制作。按常规方法制作石蜡切片,H·E染色。

5) 圆小囊黏膜IEL计数。在20倍物镜下观察圆小囊的H·E染色切片,记数100个黏膜上皮细胞间的淋巴细胞的数量,每张切片观察记数5个视野,取其平均值,参考Ferguson法<sup>[8]</sup>。

6) RHDV免疫组织化学染色。切片经二甲苯脱蜡后,用PBS(pH7.4)冲洗5 min 3次;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>甲醇溶液室温孵育15 min。蒸馏水冲洗后,PBS冲洗5 min 3次。1%小牛血清白蛋白(BSA)及5%脱脂牛奶封闭20 min,倾去血清,滴加1%抗RHDV IgG(用1% BSA配制)工作液,4℃保湿过夜。PBS冲洗5 min 3次。滴加生物素化羊抗兔IgG工作液,

室温下孵育30 min。PBS冲洗5 min 3次。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液37℃孵育30 min。PBS冲洗5 min 3次,DAB显色液显色,充分冲洗后,用苏木素衬染,按常规石蜡切片制作方法脱水、封片,显微镜观察。

结果判定:镜下RHDV抗原阳性信号呈棕红色或棕黄色颗粒或团块状。

7) 血清中RHDV母源抗体的测定。按常规ELISA(间接法)操作方法进行。

8) 血清及器官组织中RHDV抗原的测定。按常规ELISA操作方法进行。

## 2 结果

### 2.1 病理学观察结果

#### 2.1.1 临症表现及剖检变化

1) 2日龄及1月龄兔感染RHDV后,一直未见任何异常表现,精神状态、采食、饮水均正常,剖检也未见异常病变。

2) 2月龄以上大兔感染后24 h即有2例出现明显的角弓反张等异常表现,待48 h后采血时,感染RHDV的兔已处于濒死期。

2月龄以上感染RHDV兔剖检均具有RHD典型的病变,如肝、脾肿大、淤血、红气管,肺弥散点状出血,肾混浊、肿胀、圆小囊肿大、切面外翻,有的囊腔内积有黏液或血性渗出物。

#### 2.1.2 组织病理学观察

1) 2日龄、1月龄感染RHDV兔的圆小囊,除个别有少量黏液卡他性变化外,还可见圆顶明显伸长,固有层淋巴细胞及黏膜上皮内淋巴细胞数量增多,但全身各组织器官均未见异常变化。

2) 2月龄以上兔感染RHDV后,圆小囊的组织结构出现了明显的变化,表现为黏膜绒毛萎缩,上皮变性脱落,固有层裸露(黏膜溃疡),圆顶上皮与普通黏膜上皮相融合;顶上皮及其复合体(dome epithelium complex)变性、坏死、脱落,同时伴有明显增生。深部淋巴组织的病变包括淋巴细胞成片坏死、排空,巨噬细胞增生、血管扩张,透明血栓形成。

### 2.2 感染RHDV前血清中RHDV母源抗体的测定

所有实验兔包括2日龄乳兔、1月龄仔兔和2月龄兔各9只,感染RHDV前RHDV母源抗体的测定结果均为阴性。

### 2.3 感染RHDV后血清中RHDV抗原的测定

1) 2日龄乳兔感染后28和48 h血清中RHDV

抗原的测定结果均为阴性。

2) 1 月龄仔兔感染 RHDV 后 28 和 48 h 血清中 RHDV 抗原的测定结果也均为阴性。

3) 2 月龄以上大兔感染后血清中 RHDV 抗原的测定结果见表 1。

表 1 2 月龄以上大兔感染 RHDV 后血清中 RHDV 抗原滴度

Table 1 Titer of RHDV antigen in sera of above two-month-old group rabbit infected with RHDV

感染 时间/h	试验兔编号					
	1	2	3	4	5	6
28	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>5</sup>
48				2 <sup>8</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>5</sup>

2 月龄以上大兔感染 RHDV 后 28 h 血清中就出现了很高的 RHDV 抗原滴度, 48 h 后抗原滴度有所增高, 这表明 2 月龄以上大兔感染后 RHDV 在兔体内大量繁殖。

#### 2.4 感染 RHDV 后肝、脾、肾中 RHDV 抗原的测定

2 日龄乳兔感染 RHDV 后肝、脾、肾中 RHDV 抗原测定结果均为阴性, 表明这些组织中不存在 RHDV。1 月龄仔兔感染 RHDV 后肝、脾、肾中也均未测出 RHDV 抗原, 表明仔兔在感染 RHDV 后病毒未在这些组织中增殖。

#### 2.5 圆小囊 RHDV 免疫组织化学染色结果观察

1) 2 月龄以内兔 RHDV 免疫组织化学染色结果。对照组及 2 日龄、1 月龄感染 RHDV 兔的圆小囊及全身各组织器官内 RHDV 免疫组织化学染色均呈阴性反应, 未见任何阳性反应物。

2) 2 月龄以上大兔 RHDV 免疫组织化学染色结果。对照兔圆小囊全呈阴性反应。感染兔的圆小囊均呈现较强的阳性反应, 而且圆小囊的 RHDV 免疫组织化学阳性反应强度与肝、脾、肾的反应强度呈正相关, 即肝、脾、肾中阳性反应愈强, 圆小囊内的阳性反应亦越强。RHDV 抗原阳性反应信号定位于圆小囊的圆顶和滤泡区的巨噬细胞、浆细胞、淋巴细胞及变性坏死的细胞内及细胞碎片中, RHDV 免疫组织化学阳性反应出现在感染细胞的胞浆及细胞核内, 黏膜上皮及 M 细胞有时也可见阳性反应。严重病例的圆小囊黏膜及其淋巴组织中的所有细胞及纤维组织均呈阳性反应。

#### 2.6 感染 RHDV 后圆小囊黏膜上皮内淋巴细胞的定量观察

1) 2 日龄兔感染 RHDV 后圆小囊黏膜 IEL 的数量变化情况 (图 1)。2 日龄兔感染 RHDV 后, 圆小囊黏膜上皮内淋巴细胞数量迅速增多, 感染 48 h 后 IEL 即达到 4.2%, 超过了正常 10 日龄时 IEL 数 (3%), 与对照兔相比差异显著 ( $P < 0.05$ )

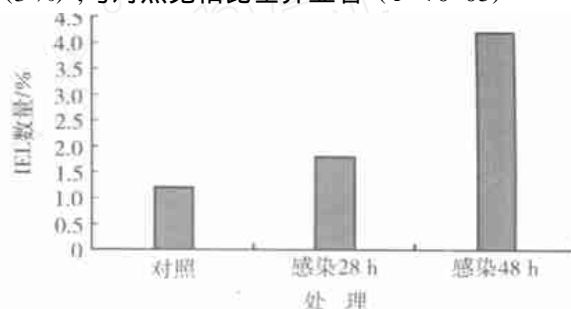


图 1 2 日龄兔感染 RHDV 后圆小囊黏膜 IEL 的数量变化

Fig. 1 The variation of the number of IEL in the mucosa epithelium of sacculus rotundus of the two-day-old group rabbit infected with RHDV

2) 1 月龄兔感染 RHDV 后圆小囊黏膜 IEL 的数量变化情况 (图 2)。1 月龄兔感染 RHDV 后圆小囊黏膜 IEL 的数量急剧增多, 与对照组相比差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 感染 28 和 48 h 后圆小囊 IEL 的数量超过了 2 月龄对照兔的 IEL 数 ( $< 20\%$ ), 分别达到了 25% 和 26%。

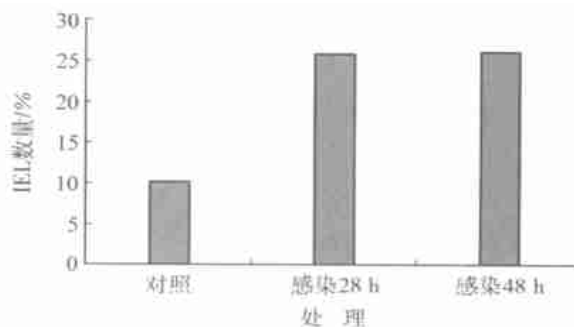


图 2 1 月龄兔感染 RHDV 后圆小囊黏膜 IEL 的数量变化

Fig. 2 The variation of the number of IEL in the mucosa epithelium of sacculus rotundus of the one-month-old group rabbit infected with RHDV

3) 2 月龄以上大兔感染 RHDV 后黏膜 IEL 的数量急剧增多, 上皮细胞间隙内都可见有淋巴细胞, 很多淋巴细胞成串分布, IEL 的数量多达 200% ~ 300%, 固有层内淋巴细胞密集, 圆顶上皮内淋巴细胞成团聚集, 或成堆地向肠腔脱落。由于黏膜上皮

受损严重,变性脱落明显,固而无法对其黏膜上皮内淋巴细胞的数量进行系统详细计数。

### 3 小结与讨论

1) 关于2月龄以内兔感染RHDV的报道,多是从临症发病情况的角度进行研究。吉传义等<sup>[9]</sup>曾对1月龄幼兔及乳兔进行RHDV人工感染试验,发现RHDV对乳兔无致病性,对1月龄幼兔虽有致死作用,但其潜伏期及病程较长,属亚急性型感染。黄吉凤等<sup>[10]</sup>也曾用RHDV分别感染5,15及25日龄家兔,接种后72h扑杀,对其肝、脾、肺、肾、胸腺、骨髓等做组织病理学和超微结构观察,发现RHDV对1月以内幼兔也具有感染性,并对其肝、肾等造成一定程度的病理学损伤,其损伤程度与日龄呈正相关。幼龄兔感染RHDV与成年兔典型的兔出血症在病症、病理学变化和病毒繁殖方面完全不同。

本研究系统观察了2日龄乳兔、1月龄仔兔,及2月龄以上大兔对RHDV的易感性。从感染RHDV后兔的临床发病情况、剖检及组织病理学变化、血清及靶器官组织中RHDV抗原的检测,RHDV免疫组织化学定位等角度进行了比较系统、全面的观察研究。结果表明,2月龄以内兔人工感染RHDV后,临症表现、剖检及组织病理学观察均未见异常。血清及RHDV的靶器官肝、脾、肾中均未检测出RHDV抗原,这说明2月龄以内兔感染后RHDV未能在兔体内复制增殖。2月龄以上兔感染RHDV后,无论从临床症状,还是大体剖检,组织病理学观察,均出现了明显的病理学改变,而且感染后血清RHDV抗原检测呈阳性反应。肝、脾、肾、圆小囊等组织器官都呈现RHDV免疫组化阳性反应,说明2月龄以上兔感染RHDV后,病毒在靶细胞中复制增殖,并造成了病毒血症。

本研究结果与吉、黄二者所报道的不同,是由于本研究所用实验兔与其二人所用的品种不同有关。

研究结果显示,2月龄以内仔兔与2月龄以上大兔对RHDV的易感性如此不同,表明二者体内存在着对RHDV截然不同的反应因素。

本研究中2月龄以内仔兔对RHDV有抵抗力,是由于新生乳兔及仔兔体细胞尚未分化成熟,膜受体发育还不健全,缺乏RHDV受体位点,因而当RHDV进入体内后,不能与细胞发生黏着或吸附,既使有少数病毒通过非特异性布朗运动和扩散方式与细胞发生结合<sup>[11]</sup>,但又由于幼龄兔细胞未分化成

熟,尚缺乏健全胞饮作用,以致RHDV不能侵入细胞内。或者有少数病毒直接穿过细胞膜进入了细胞内,也会由于幼兔体细胞分化程度低,细胞内微环境不适于病毒繁殖,造成病毒在细胞内的非生产性感染,以至不会对已感染的靶细胞造成明显的病理损伤<sup>[11]</sup>。因此,RHDV不可能在仔兔体内大量复制繁殖,也就不可能引起仔兔发病。

2) 2月龄以上大兔感染RHDV后引起了肝、脾、胸腺等组织器官严重的病理学损伤,并且在血清及这些组织中检测出了RHDV抗原的存在。此时,圆小囊也同样发生了严重的病变,而且免疫组化染色也显示出了阳性反应结果。圆小囊在感染RHDV所表现出的这种与其他器官病变的一致性,进一步表明圆小囊是RHDV的靶器官。同时,也表明圆小囊不仅仅是肠道局部黏膜免疫器官,也是全身免疫的一部分,在抗全身性感染的免疫中具有一定的作用。2月龄以内仔兔感染RHDV后,全身各器官组织均无异常变化,RHDV抗原检测均呈阴性反应。圆小囊也未见形态结构异常改变,RHDV免疫组化染色呈阴性反应。

IEL是位于肠绒毛黏膜上皮细胞之间的淋巴细胞,其数量随动物机体生长发育逐渐增多,当肠道接触抗原后IEL明显增多<sup>[12,13]</sup>。IEL通过特异性免疫机制和非特异性免疫机制参与和调节肠道黏膜免疫机制<sup>[14]</sup>。已证实IEL的增加同黏膜局部迟发性变态反应直接相关。因此,IEL数量的增加同机体免疫功能状况直接相关<sup>[15]</sup>。本研究中在2月龄以内的乳兔及仔兔感染RHDV后,圆小囊虽未出现明显的形态结构改变,免疫组化染色也未见RHDV抗原阳性反应物,但却出现了IEL增多现象,在1月龄仔兔还表现出固有层中淋巴细胞增多现象,2日龄兔感染RHDV后48h,IEL的数量(4.2%)超过了10日龄正常兔圆小囊黏膜IEL数(3%)。1月龄兔感染RHDV后28h,IEL数由对照的10.1%增至25.8%,差异极为显著( $P < 0.01$ ),超过了2年龄正常兔圆小囊黏膜上皮内淋巴细胞的数量(18%)。这个变化特点与2月龄以上兔感染RHDV后IEL急剧增多的情况相一致。结果提示,当仔兔受到RHDV感染刺激后,虽未发生圆小囊的结构损伤,但却引起圆小囊黏膜免疫反应加强。同时,也表明圆小囊比其他免疫器官对RHDV这种全身性感染的病原体的刺激具有更高的敏感性。

## 参 考 文 献

- [1] Mohanty S B. Effects of viruses on the host cells. Pathogenesis of viral infections[M]. In: Veterinary Virology. London: Lea Fetiger, 1981. 47 ~ 71
- [2] 杜念兴, 徐为燕. 兔出血症研究[J]. 中国农业科学, 1991, 24(1): 1 ~ 10
- [3] 刘胜江, 浦伯清. 兔的一种新的病毒病[J]. 畜牧与兽医, 1984, 16(6): 253 ~ 255
- [4] 余锐萍. 兔出血症研究概况[J]. 中国兽医杂志, 1992, 18(7): 43 ~ 46
- [5] Smid B, Valicek L, Stepanek J, et al. Experimental transmission and electron microscopic demonstration of the virus of haemorrhagic disease of rabbits in Lovakia [J]. J Vet Med B, 1989, 36: 237 ~ 240
- [6] 余锐萍, 刘环, 宋俊霞, 等. 兔圆小囊组织发育及其与肠道黏膜免疫关系的研究[J]. 中国学术期刊文摘, 2000, 6(10): 1322 ~ 1323
- [7] 余锐萍, 刘海虹, 贾君政, 等. 家兔肠相关淋巴组织圆小囊超微结构观察[J]. 电子显微学报, 2002, 21(4): 359 ~ 363
- [8] Ferguson A. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum[J]. Gut, 1971, 12: 988 ~ 994
- [9] 吉传义, 张英, 孙智峰, 等. 兔出血症病毒接种幼年兔的人工感染实验[J]. 畜牧与兽医, 1994, 26(5): 212 ~ 214
- [10] 黄吉凤, 徐福南. 兔出血症病毒人工感染幼兔的病理学研究[J]. 南京农业大学学报, 1996, 20(2): 77 ~ 81
- [11] 李成, 主编. 畜禽病毒图谱[M]. 北京: 农业出版社, 1987. 4 ~ 9
- [12] 余锐萍, 高齐瑜, 王彩虹. 肠相关性淋巴样组织研究概况[J]. 动物医学进展, 2002, 23(4): 29 ~ 33
- [13] 刘环, 余锐萍. 兔圆小囊免疫功能及其与肠道黏膜局部免疫关系的研究: 实验性感染肠球虫兔的圆小囊上皮间淋巴细胞及杯状细胞定量观察[J]. 畜牧兽医学报, 1997, 28(5): 448 ~ 452
- [14] Lillehoj H. Intestinal intraepithelial and splenic natural killer cell responses to Eimerian infections in inbred chickens [J]. Infection and Immunity, 1989, 57(7): 1844 ~ 1879
- [15] Mowat A M I. Intraepithelial lymphocytes count and crypt hyperplasia measure the mucosal component of the graft-versus-host reaction in mouse small intestine [J]. Gastroenterology, 1982, 83: 417 ~ 423

## 科研简讯

## “农大 3 号”节粮小型蛋鸡配套系通过国家畜禽品种初步审定

国家畜禽品种审定委员会家禽专业委员会近期对我校动物科技学院选育的“农大 3 号”节粮小型蛋鸡配套系进行了审定。委员们在听取工作汇报、审阅有关技术资料并对育种场进行现场考察后,依据“家禽品种审定标准”,认为“农大 3 号”节粮小型蛋鸡配套系已达到了“家禽品种审定标准”,一致同意通过审定,报送农业部批准。

“农大 3 号”节粮小型蛋鸡配套系是在吴常信院士的领导下,将隐性白羽肉鸡的 *dw* 基因导入普通褐壳蛋鸡中,经过十几年的选育,培育出了繁殖性能高、节省饲料的矮小型褐壳蛋鸡,1997 年以来选育形成节粮小型蛋鸡配套系。饲养节粮小型蛋鸡在高产的同时可节省 20% 左右饲料,并且能有更高的饲养密度,从而获得更大的经济效益。“农大 3 号”节粮小型蛋鸡的选育于 1999 年获得国家科技进步二等奖。

(科技处供稿)