

淋巴囊肿病毒 27.8 ku 受体蛋白在牙鲆组织中的分布

杜程鹏, 汪沐, 绳秀珍*, 战文斌

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 应用抗牙鲆淋巴囊肿病毒(lymphocystis disease virus, LCDV)受体蛋白(27.8 ku)的单克隆抗体(2G11和3D9)定位LCDV受体蛋白在牙鲆组织中的分布。通过对牙鲆外周血、白细胞、鳃、胃、肠、表皮、肝脏、头肾、体肾、脾、性腺、脑、心脏等进行LCDV受体蛋白的间接免疫荧光与免疫组织化学定位观察,发现在牙鲆外周血白细胞的细胞膜、鳃上皮细胞、表皮、胃黏膜上皮细胞顶端、肠上皮细胞、肝细胞、脾表层结缔组织细胞及头肾后端的肾小管上皮细胞内均有较强的阳性信号,表明这些部位分布有LCDV的27.8 ku受体蛋白,但在体肾、性腺、脑、心脏及外周血红细胞中未观察到阳性信号。推测LCDV通过与鳃、表皮及消化道上皮的受体结合进入牙鲆体内,通过与外周血白细胞上的受体结合侵染白细胞而进入血液循环,进而感染肝脏、脾脏、头肾等器官。

关键词: 牙鲆; 淋巴囊肿病毒受体; 单克隆抗体; 间接免疫荧光; 免疫组织化学

中图分类号: S 917; Q 939.91

文献标志码: A

淋巴囊肿病(lymphocystis disease)是由淋巴囊肿病毒(lymphocystis disease virus, LCDV)引起的鱼类病毒病,世界范围内已有超过140种的海、淡水鱼类发生过该病^[1-2]。我国广东、山东等地养殖的云纹石斑鱼(*Epinethelus moara*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、鲈(*Lateolabrax japonicus*)等近10种重要经济鱼类也受到感染,造成了巨大经济损失^[3-5]。研究宿主细胞上与病毒感染相关的受体蛋白的分布,对阐明LCDV感染的机制以及该病的防控具有重要意义。

病毒受体作为细胞膜上的正常成分,是决定病毒入侵途径、扩散方式及宿主发病特点的主要因素,其决定着病毒感染的宿主范围和组织嗜性^[6]。病毒通过与特异性受体结合进入细胞被普遍认为是病毒侵染宿主的主要方式^[7]。本实验室从牙鲆鳃细胞系(FG)分离鉴定出的27.8 ku蛋白能够与LCDV特异性结合^[8]。本文利用2株抗LCDV受体蛋白的单克隆抗体2G11和3D9,通过间接免疫荧光技术(IFAT)和免疫组织化学技术(IHCT)对牙鲆外周血、白细胞、鳃、胃、

肠、表皮、肝脏、头肾、体肾、脾脏、性腺、脑、心脏中LCDV的受体蛋白进行了定位观察,以期研究LCDV对宿主的吸附机制及在鱼体内的扩散方式提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用健康牙鲆购自青岛某鱼类养殖场,体长31.5~39.4 cm,体质量550~880 g,共20尾。

抗牙鲆淋巴囊肿病毒受体蛋白(27.8 ku)的单克隆抗体(2G11, 3D9)为本实验室研制。异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗小鼠IgG、氨基丙基三乙氧基硅烷(APES)、牛血清白蛋白、NaN₃、Heparin、RPMI-1640,购自Sigma公司;生物素化的马抗小鼠IgG、碱性磷酸酶(AP)标记的链霉卵白素及AP-Red发色试剂盒,购自北京中杉公司。

1.2 牙鲆外周血白细胞滴片及血涂片的制备

白细胞滴片 用10 mL无菌注射器吸取5 mL单细胞悬浮介质[65% RPMI-1640, 35% 双蒸

收稿日期:2011-08-04 修回日期:2011-10-20

资助项目:国家自然科学基金项目(31072232, 30771648)

通讯作者:绳秀珍, E-mail: xzsheng@ouc.edu.cn

水,含 20 IU/mL Heparin, 0.1% (W/V) NaN_3 和 1% (W/V) 牛血清白蛋白(BSA)], 鱼尾静脉抽血约 5 mL, 4 °C 下静置 1 h, 然后 4 °C 离心 10 min (100 × g), 收集上清, 用于分离外周血白细胞。

取已灭菌的 10 mL 离心管, 依次加入 1.070 g/cm³ 和 1.020 g/cm³ 的 Percoll 溶液各 3 mL, 制成 Percoll 不连续梯度; 然后缓慢加入 3 mL 的外周血细胞悬浮液上清, 4 °C 下 840 g 离心 30 min, 收集位于 Percoll 梯度界面的细胞, 用无菌 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, 含 5% 的新生牛血清, pH 7.4) 作为细胞洗涤液, 于 4 °C 下 640 g 离心洗涤 3 次, 每次 5 min, 沉淀即为白细胞。PBS 重悬沉淀, 用血球计数板计数, 调整细胞浓度约为 5×10^5 /mL, 将细胞悬液滴于 APES 处理过的载玻片上(每滴 30 μL), 室温沉降 1 h, 除去多余液体, 丙酮固定 10 min。

血涂片 用无菌注射器从鱼的尾静脉取血后滴于载玻片上制作血涂片, 血膜晾干后入甲醇中固定 5 min。

1.3 间接免疫荧光染色(IFAT)

用无菌的剪刀解剖牙鲆, 取鳃、表皮、胃、肠、肝脏、头肾、体肾、脾脏、性腺、脑、心脏等组织, 切成大小为 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 的小块, 灭菌 PBS 冲洗干净后, OCT 冷冻包埋剂包埋并置于 -80 °C 速冻, 冰冻切片连续切片, 厚度 5 ~ 7 μm , 丙酮固定 10 min。

取牙鲆组织冰冻切片、白细胞滴片及血涂片进行间接免疫荧光染色, 以单抗 2G11 与 3D9 的混合液为第一抗体, 37 °C 孵育 45 min; PBST(含 0.5% Tween-20 的 PBS) 洗涤 3 次, 每次 5 min; 第二抗体为 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG, 37 °C 孵育 45 min; PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 甘油封片, Olympus 荧光显微镜观察拍照。阴性对照片用骨髓瘤细胞上清代替混合单抗。

1.4 免疫组织化学染色(IHCT)

牙鲆各组织取样方法同 1.3。Bouin 氏液固定, 常规石蜡连续切片, 厚度 5 ~ 7 μm , 用 APES 处理的载玻片捞片, 37 °C 烘片, 常规脱蜡复水。于切片样品上滴加适量 3% 乙酸溶液, 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 对切片样品进行高压抗原复性(pH 6.0 的柠檬酸缓冲液中, 121 °C, 7 min), 自然冷却至室温, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。于组织切片上滴加 3% 的胎牛血清

白蛋白封闭液, 37 °C 孵育 30 min; 甩去封闭液, 滴加适量的抗淋巴囊肿病毒 27.8 ku 受体的单抗混合液, 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加生物素标记的马抗小鼠 IgG, 37 °C 孵育 1 h, 同法洗涤; 再用碱性磷酸酶(AP) 标记的链霉卵白素 37 °C 孵育 1 h, AP-Red 显色液显色 5 ~ 30 min, 洗涤后用苏木精复染 5 ~ 10 min, 洗去多余染液, 甘油封片, Olympus 显微镜观察并拍照。实验设置两组阴性对照, 第一组以骨髓瘤上清代替混合单抗, 第二组以 PBS 代替马抗小鼠 IgG。

2 结果

间接免疫荧光染色结果显示, 在牙鲆的外周血白细胞、鳃、表皮、胃、肠、肝脏、脾脏及头肾中分别观察到明显的绿色荧光; 免疫组织化学染色在这些部位观察到红色阳性信号; 而在脑、心脏、性腺、体肾(图版 I) 及外周血红细胞中均未观察到阳性信号。对照片均为阴性(图版 II-2, 4, 6, 8, 10, 12; 图版 III-2, 4, 6, 8, 10, 12)。

2.1 外周血白细胞

间接免疫荧光染色结果显示, 在牙鲆外周血红细胞的细胞膜上有明显的绿色荧光(图版 II-1), 经免疫组化染色后其显示阳性红色(图版 III-1), 表明牙鲆外周血白细胞表面有 LCDV 的受体蛋白存在。而红细胞无阳性信号。

2.2 鳃

牙鲆鳃小片主要由扁平上皮细胞和柱细胞构成, 也分布有粘液细胞及腺细胞。间接免疫荧光与免疫组织化学染色结果显示在鳃上皮细胞中有绿色荧光(图版 II-3) 及红色阳性信号(图版 III-3), 表明分布有 LCDV 受体蛋白。

2.3 表皮

牙鲆的体表皮肤由外层的表皮和内层的真皮组成, 表皮为多层上皮细胞, 其中分布有粘液细胞。经间接免疫荧光与免疫组织化学染色后, 在牙鲆表皮层的上皮细胞中观察到阳性信号, 而粘液细胞中及皮下肌肉层未见阳性信号(图版 II-5, 图版 III-5)。

2.4 胃

牙鲆胃由黏膜层、黏膜下层、肌肉层及浆膜层组成, 胃黏膜上皮为单层柱状上皮细胞。间接免疫荧光与免疫组织化学染色结果显示, 阳性信号主要集中于胃黏膜柱状上皮细胞顶端, 偶尔在黏

膜下层观察到散在的点状阳性信号(图版 II-7,图版 III-7)。

2.5 肠

牙鲆肠由黏膜层、黏膜下层、肌肉层及浆膜层组成,黏膜层为单层柱状上皮,分布有杯状细胞。间接免疫荧光与免疫组化染色的阳性信号位于肠黏膜上皮细胞内,在黏膜下层有少量散在的点状阳性信号。杯状细胞为阴性(图版 II-9,图版 III-9)。

2.6 肝脏

牙鲆的肝脏内有胰腺分布,形成肝胰脏,肝细胞排列紧密,肝板之间有窦状隙。间接免疫荧光染色的阳性绿色荧光与免疫组化染色的阳性红色位于肝细胞内(图版 II-11、图版 III-11)。

2.7 脾脏

牙鲆的脾脏由骨髓和红髓组成,其外包一层结缔组织膜,主要为成纤维细胞和胶原纤维及单层间质上皮。间接免疫荧光染色与免疫组化染色结果显示,绿色荧光或红色阳性信号主要位于脾脏表面的结缔组织层,其内部细胞内无阳性信号,表明 LCDV 的受体蛋白主要分布于脾的表层结缔组织细胞(图版 II-13、图版 III-13)。

2.8 头肾

牙鲆的肾脏由前端分叉部分无肾小球的头肾及后部具肾小球的体肾两部分组成。头肾实质是由血窦、网状细胞及多种血细胞交织在一起构成的,分叉部分后面的造血组织间开始有零星的肾小管出现。间接免疫荧光与免疫组织化学染色结果显示,LCDV 受体阳性信号存在于头肾后端开始出现的肾小管上皮细胞内(图版 II-15、图版 III-15)。而牙鲆体肾内的肾小管上皮为阴性。

3 讨论

本研究应用间接免疫荧光与免疫组织化学技术对牙鲆组织中淋巴囊肿病毒的受体蛋白的分布进行了定位观察,冰冻切片可以使组织中的受体蛋白不被破坏,较好地保持其抗原性;石蜡切片在保持组织形态结构的同时,能够清楚地显示出阳性信号的具体位置。两种技术相互验证,相互补充,提高了结果的准确性。免疫组织化学中应用高压高温抗原复性法,石蜡切片的组织经过 Bouin 氏液处理后,蛋白的抗原性会被部分破坏,经过高温高压处理使得组织的部分抗原性得到恢

复,从而提高了阳性信号的强度;应用生物素三步放大发色,使阳性信号较两步法更为明显,易于观察。

有报道认为 LCDV 可能通过细胞吞噬和受体介导作用进入宿主细胞^[9],因此,LCDV 受体的定位研究将会促进对 LCDV 侵染机制及其在宿主体内传播途径的认识。我们通过免疫共沉淀技术发现牙鲆鳃细胞上分子量为 27.8 ku 蛋白能与 LCDV 特异性结合,该蛋白及其多克隆抗体都对 LCDV 感染具有阻断效果,确定该 27.8 ku 蛋白为 LCDV 的受体蛋白^[8]。本实验利用以该 27.8 ku 蛋白为抗原制备的单克隆抗体对牙鲆组织进行检测,发现在牙鲆的外周血白细胞、鳃、表皮、胃、肠、肝脏、脾脏及头肾有阳性信号,表明这些部位有 LCDV 受体的存在,具有 LCDV 吸附宿主组织细胞的分子基础,可在 LCDV 感染宿主或在宿主体内的传播过程中起作用。

迄今为止已运用多种技术对 LCDV 的靶器官进行了研究。用 LCDV 人工感染健康牙鲆,PCR 法检测发现在鱼血液、胃、性腺、肌肉、肝脏、脾脏中有 LCDV 存在,且血液与脾脏中病毒浓度最大^[10]。应用抗 LCDV 单克隆抗体的免疫荧光和免疫组化技术在患淋巴囊肿病牙鲆的胃、肠、鳃及表皮组织中发现有 LCDV^[11]。有研究者用原位杂交技术在牙鲆的胃、肝、性腺和肌肉中检测到病毒,并推断病毒由口进入消化道,再进入血液进行传播,还提出了病毒垂直传播的可能性^[12]。我们也曾在牙鲆鳃、肠上皮结缔组织和黏膜下层中、脾、头肾边缘组织和表面系膜、肝表面系膜等部位观察到淋巴囊肿细胞^[13]。本研究结果与以上资料具有一致性,在牙鲆靶器官外周血白细胞、鳃、表皮、胃、肠、肝脏、脾脏及头肾中皆检测到 LCDV 的受体蛋白,但在肌肉及性腺中未检测到 LCDV 受体,这种差异还有待于借助其他手段进一步研究。

有关 LCDV 对牙鲆的感染及传播途径问题,资料显示通过皮肤划伤感染实验,LCDV 可通过表皮感染鱼体^[4]。透射电镜下,在牙鲆淋巴囊肿细胞外的囊壁中观察到 LCDV 粒子,说明病毒可以从囊肿细胞释放出来而进入周围组织或环境中^[14]。也有资料发现淋巴囊肿细胞破裂后释放的病毒粒子进入组织及血液循环^[15],可以侵染鱼类白细胞并在其中增殖^[16]。本研究在外周血白

细胞、鳃、表皮、胃、肠、肝脏、脾脏及头肾中检测到 LCDV 的受体蛋白,结合已有研究资料推测 LCDV 可能通过与鳃、表皮及消化道上皮的受体蛋白结合进入牙鲆体内,通过与外周血白细胞上的受体结合侵染白细胞,进而通过血液循环扩散到各组织器官,造成肝脏、脾脏、头肾等器官的感染。因此,利用 LCDV 受体抗体阻断 LCDV 与鳃、表皮及消化道上皮的受体蛋白结合防止其进入鱼体内,阻断 LCDV 与血液中白细胞的结合防止其在鱼体内扩散,可以成为将来防治鱼类淋巴囊肿病的一条途径。

参考文献:

- [1] Walker R. Fine structure of lymphocystis virus of fish [J]. *Virology*, 1962, 18: 503 - 550.
- [2] 战文斌. 水产动物病害学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [3] 张永嘉. 云纹石斑鱼淋巴囊肿病的光镜和电镜研究 [J]. *海洋学报*, 1992, 14(6): 97 - 102.
- [4] 曲径, 沈海平, 李笑刚, 等. 威海地区养殖牙鲆鱼淋巴囊肿病流行病学调查 [J]. *检验检疫科学*, 2001, 11(6): 37 - 35.
- [5] Zhang Q Y, Xiao F, Xie J, *et al.* Complete genome sequence of lymphocystis disease virus isolated from China [J]. *Journal of Virology*, 2004, 78 (3): 6982 - 6994.
- [6] Boycott R, Klenk H D, Hucf M O, *et al.* Cell tropism of influenza virus mediated by hemagglutinin inactivation at the stage of virus entry [J]. *Virology*, 1994, 203: 313 - 319.
- [7] Alicia E, Smith, Helenius A. How viruses enter animal cells [J]. *Science*, 2004, 304 (5668): 237 - 242.
- [8] Wang M, Sheng X Z, Xing J, *et al.* Identification of a 27.8 ku protein from flounder gill cells involved in lymphocystis disease virus binding and infection [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2011, 94: 9 - 16.
- [9] 吕宏旭, 汪岷, 李红岩, 等. 利用牙鲆鳃细胞系分离和培养淋巴囊肿病毒 [J]. *青岛海洋大学学报*, 2003, 33(2): 233 - 239.
- [10] 刘允坤, 孙修勤, 黄捷, 等. 牙鲆淋巴囊肿病的 PCR 诊断方法研究 [J]. *高技术通讯*, 2002, 11: 87 - 89.
- [11] 徐宋娟, 邢婧, 程顺峰, 等. 应用免疫技术检测牙鲆组织内的淋巴囊肿病毒 [J]. *水产学报*, 2004, 28 (12): 101 - 105.
- [12] 孙修勤, 黄捷, 刘允坤, 等. 牙鲆淋巴囊肿病的诊断技术研究 [J]. *高技术通讯*, 2003, 1: 89 - 94.
- [13] 绳秀珍, 战文斌. 鱼类淋巴囊肿病毒靶器官的组织病理研究 [J]. *中国海洋大学学报*, 2006, 36 (5): 749 - 753.
- [14] Sheng X Z, Zhan W B. Occurrence, development and histochemical characteristics of lymphocystis in culture Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *High Technology Letters*, 2004, 10(2): 92 - 96.
- [15] Colorni A, Diamant A. Splenic and cardiac lymphocystis in the red drum, *Sciaenops ocellatus* (L) [J]. *Journal of Fish Disease*, 1995, 18: 467 - 471.
- [16] Garcíá-Rosado E, Castro D, Cano I, *et al.* Serological techniques for detection of lymphocystis virus in fish [J]. *Aquatic Living Resources*, 2002, 15: 179 - 185.

Distribution of lymphocystis disease virus receptor-27.8 ku in flounder (*Paralichthys olivaceus*)

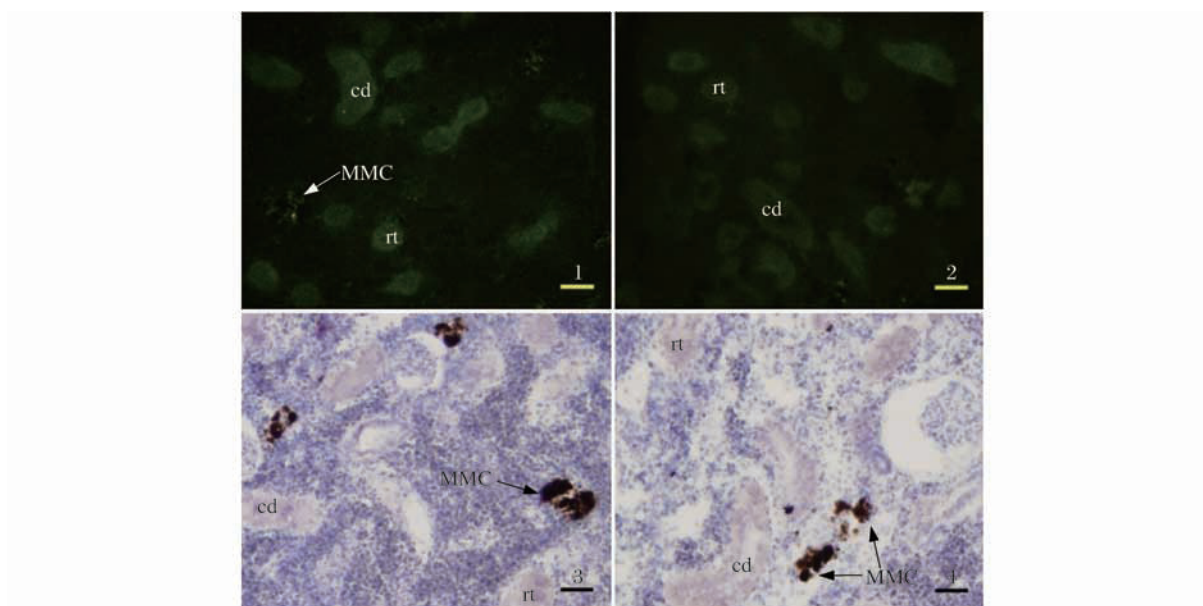
DU Cheng-peng, WANG Mu, SHENG Xiu-zhen*, ZHAN Wen-bin

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Lymphocystis disease virus (LCDV) is the causative agent of lymphocystis disease, which has infected more than 140 species of marine and freshwater fish belonging to 42 families worldwide and caused great economic losses. Determination of the receptor molecules on the surface of susceptible cells will contribute to the understanding of viral infection, pathogenesis and tissue tropism in hosts, which will also benefit the development of anti-viral therapeutic agents. In this paper, monoclonal antibodies (Mabs) 2G11 and 3D9 against 27.8 ku receptor protein of LCDV were applied to detect LCDV receptor in the peripheral blood, leukocyte, gill, stomach, intestine, skin, liver, head-kidney, body kidney, spleen, gonad, brain and heart tissues in flounder (*Paralichthys olivaceus*) by indirect immunofluorescence assay and immunohistochemical experiment. Results showed that receptor-positive signals were found in cell membranes of leukocytes, gill, gastric mucosal cells, intestinal epidermal cells, epidermis, liver, connective tissue cells in the spleen surface and tubular epithelium behind the head-kidney, which indicated that LCDV 27.8 ku receptor protein existed in these tissues. No receptor-positive signals were observed in the body kidney, gonad, brain, heart tissues and red blood cells of *P. olivaceus*. We deduced that LCDV entered the fish's body through binding to the receptor molecules in gill, epidermis and gastrointestinal epithelium, or entered the peripheral blood and infected the leucocyte and then transmitted to other tissues (liver, spleen, head-kidney, etc.) through blood circulation.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; lymphocystis disease virus receptor; monoclonal antibody; indirect immunofluorescence technique; immunohistochemistry

Corresponding author: SHENG Xiu-zhen. E-mail: xzsheng@ouc.edu.cn

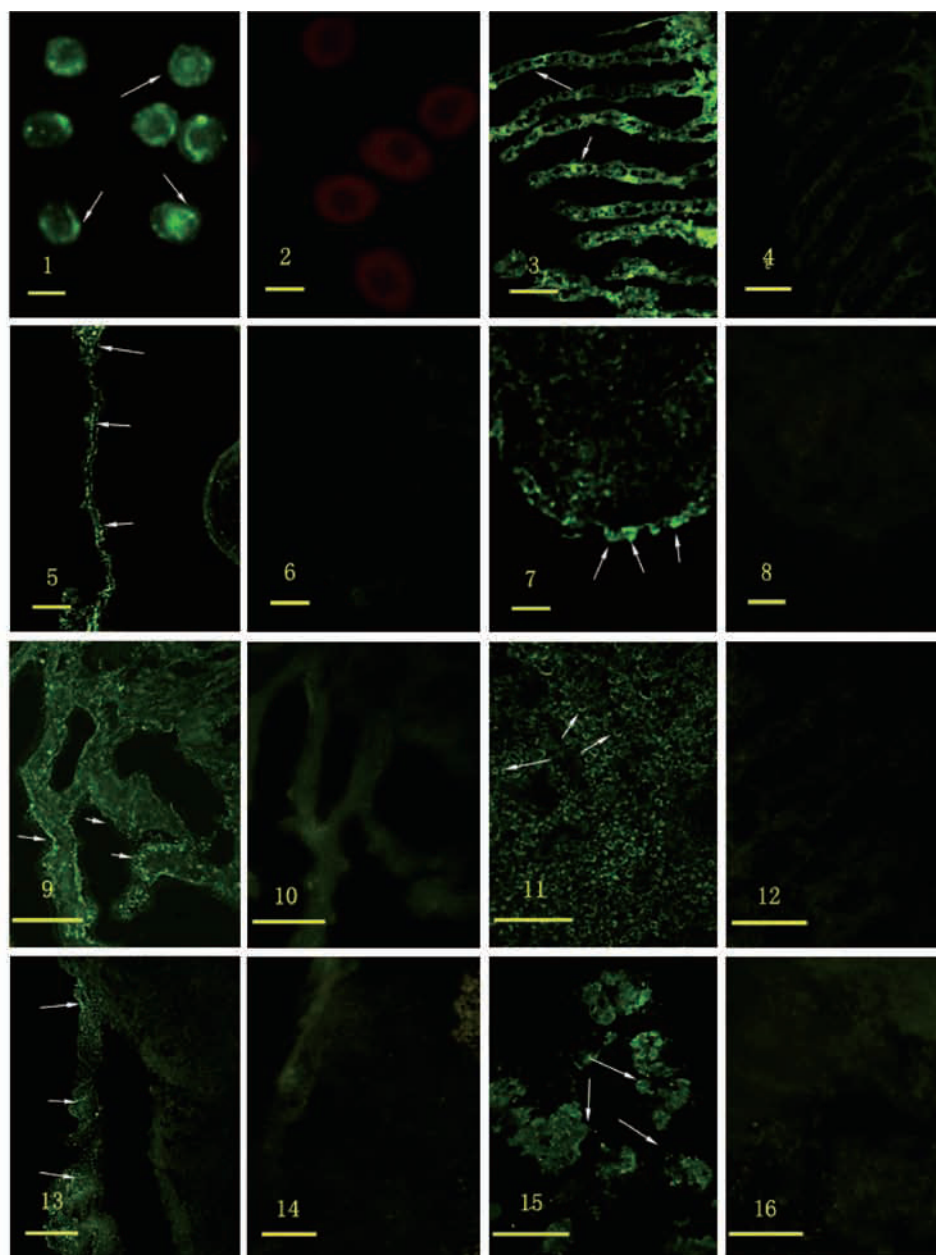


图版 I

1,2 为体肾间接免疫荧光实验组与阴性对照组的染色结果,显示均无明显绿色荧光信号;3,4 分别为体肾免疫组织化学的实验组与阴性对照,未见红色阳性信号,表明在体肾中没有 LCDV 受体的存在。MMC:黑色素巨噬细胞中心;rt:肾小管;cd:集合小管。标尺:50 μm 。

Plate I

1,2 showed the immunofluorescence staining results of body kidney and the negative control. no positive green fluorescent in the body kidney were observed; 3,4 indicated the immunohistochemical staining results of body kidney and the negative control. no positive red signals were found in the body kidney, suggesting no LCDV receptor existed in the body kidney of flounder. MMC; melanin macrophage center; rt; renal tubules; cd; collecting tubule. Bar; 50 μm .

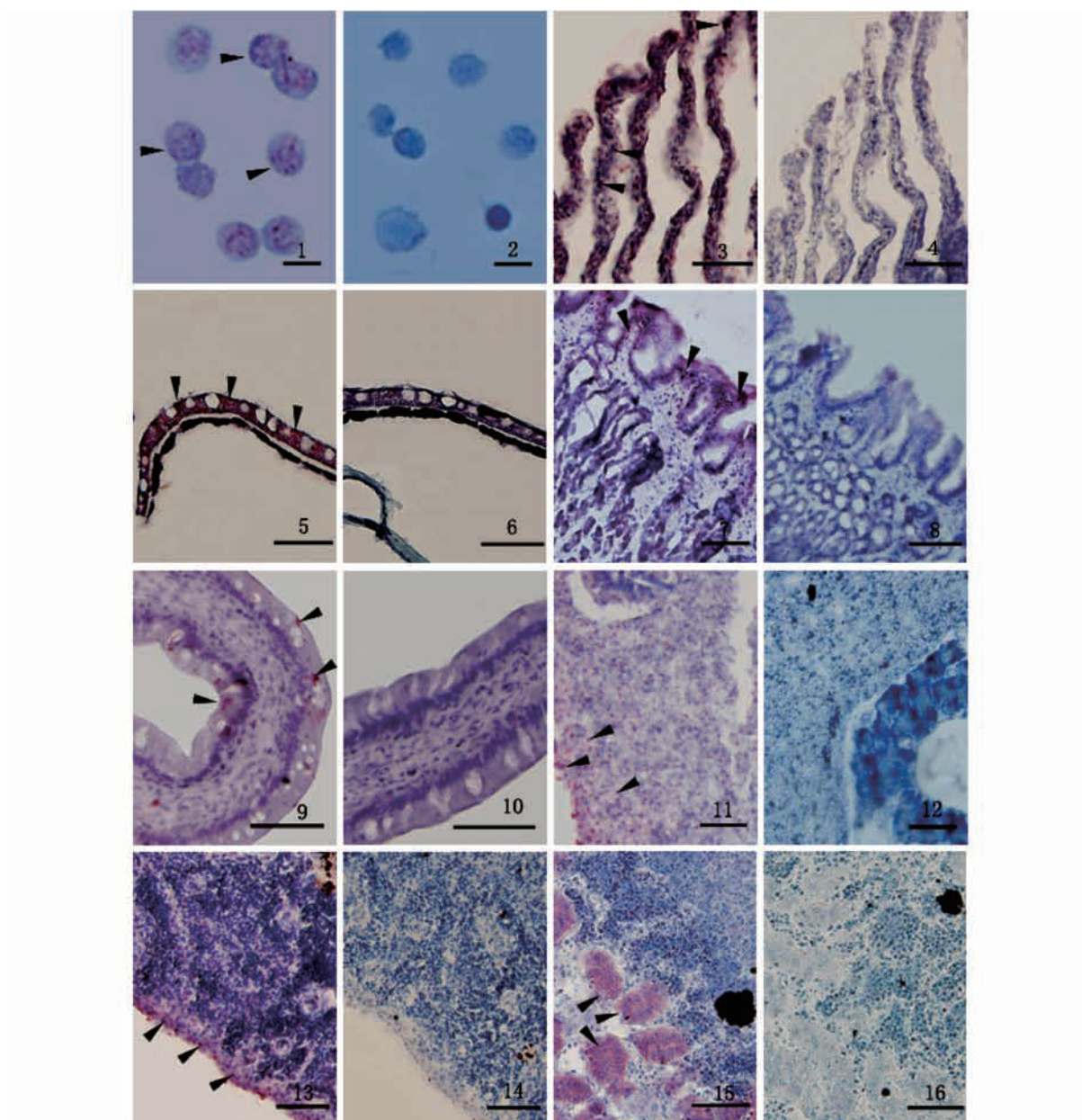


图版 II

采用抗淋巴囊肿病毒受体蛋白的单克隆抗体对牙鲆组织进行间接免疫荧光染色,1,3,5,7,9,11,13,15 分别为牙鲆外周血白细胞、鳃、表皮、胃、肠、肝脏、脾脏、头肾的阳性染色结果,在白细胞细胞膜、鳃上皮、表皮、胃黏膜上皮、肠上皮、肝、脾表层结缔组织及头肾后端与体肾连接处的肾小管上皮等的细胞内观察到 LCDV 受体的绿色荧光(箭头),表明这些部位具有 LCDV 受体存在;2,4,6,8,10,12,14 分别为上述组织的阴性对照结果。标尺:1,2 为 5 μm ;其他为 50 μm 。

Plate II

1,3,5,7,9,11,13,15 are the results of indirect immunofluorescence staining of tissues of *P. olivaceus*, showing the positive green fluorescent in cell membrane of peripheral leukocytes, gill, skin, gastric mucosal cell, intestinal epidermal cells, liver, connective tissue cells in the spleen surface and tubular epithelium behind the head-kidney. The arrow indicated receptor-positive signals. 2,4,6,8,10,12,14 are the negative control results of 1,3,5,7,9,11,13,15, respectively. Bars are 5 μm in 1,2 and 50 μm in other figures.



图版 III

采用抗淋巴囊肿病毒受体蛋白的单克隆抗体对牙鲆组织进行免疫组织化学染色,1,3,5,7,9,11,13,15 分别为牙鲆外周白细胞、鳃、表皮、胃、肠、肝脏、脾脏、头肾免疫组化染色结果,在白细胞细胞膜、鳃上皮、表皮、胃黏膜上皮、肠上皮、肝、脾表层结缔组织及头肾后端与体肾连接处的肾小管上皮等的细胞内观察到 LCDV 受体的红色阳性信号(箭头),表明这些部位具有 LCDV 受体存在;2,4,6,8,10,12,14 分别为其阴性对照结果。标尺:1,2 为 5 μm ;其他为 50 μm 。

Plate III

1,3,5,7,9,11,13,15 are the immunohistochemical results of tissues of *P. olivaceus*, showing the positive red signals of LCDV receptor in cell membrane of peripheral leukocytes, gill, skin, gastric mucosal cell, intestinal epidermal cells, liver, connective tissue cells on the spleen surface and tubular epithelium behind the head-kidney. The arrow head indicated receptor-positive signals. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 are the negative control results of 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, respectively. Bars are 5 μm in 1, 2 and 50 μm in other figures.