

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：豬繁殖與呼吸道症候群病毒感染對豬肺臟細胞素表現之影響

Cytokine response in lung during different stages of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-077

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：鄭謙仁 國立臺灣大學獸醫學系

摘要

本實驗的目的為建立反轉錄競爭性定量聚合連鎖反應於豬細胞素及豬繁殖與呼吸綜合症病毒 (PRRSV) 基因表現的測量，同時運用此方法觀察 PRRSV 感染對豬肺臟細胞素表現的影響。為了克服聚合連鎖反應在定量方面的困難，我們架構了一段包含了 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-8、IFN- γ 、PRRSV、 β -actin 及 TNF- α 八對引子序列之 DNA 片段，此 DNA 片段包含之引子序列與測試樣本用之引子序列完全相同，唯其 PCR 產物大小不一；以此 DNA 片段當模板，利用其與樣本模板共同競爭 PCR 反應物質之原理，將此 DNA 片段連續稀釋，經 PCR 反應後，由比對電泳圖上兩種產物之密度，可推算出樣本之濃度，解決 PCR 在定量方面之不足。我們以此 DNA 片段，分別定量測量 PRRSV 攻毒組 (n=4) 與對照組 (n=4) 保育豬肺臟 IFN- γ 、IL-1 β 及 PRRSV mRNA 的表現。結果發現，在三個不同時間點 (攻毒後 7、14 和 21 日)，攻毒組 IFN- γ 之表現量皆顯著高於對照組；而攻毒組 IL-1 β 之表現量於攻毒後 21 日顯著高於對照組，但攻毒後第 7 和 14 日，攻毒組與對照組 IL-1 β 之表現量無顯著差異；另外，隨病毒量的增加，IFN- γ 與 IL-1 β mRNA 的表現亦跟著上升。此結果顯示 PRRSV 感染會影響 IFN- γ 與 IL-1 β mRNA 之表現，唯其對免疫系統干擾與否，則仍需進一步的研究。

關鍵詞：豬繁殖與呼吸綜合症 反轉錄競爭性定量聚合連鎖反應 細胞素

Abstract

In this study, we used reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qcPCR) to assay porcine cytokines and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) mRNA expression, and investigated the effect of PRRSV infection on cytokine gene expression in the lung tissue of

nursing pigs. We modified a previously described RT-qcPCR method to construct a DNA fragment to measure interleukin-1 β (IL-1 β), IL-2, IL-4, IL-8, interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α , β -actin, and PRRSV mRNA expression in pig. This constructed DNA fragment had identical primer sequences to target cDNA except differences in the size of products. After co-amplifying of RNA-derived cDNA with serial dilution of the DNA fragment and calculating the ratios between them, a precise quantification data of sample was obtained. By using this DNA fragment, it was possible to analyze IL-1 β , IFN- γ and PRRSV mRNA expression in the lung between PRRSV-infected (n=4) and sham-inoculated (n=4) piglets. The results revealed that piglets infected by PRRSV had a higher level of IFN- γ mRNA expression in their lung than those of sham-inoculation ($P < 0.05$) at 7, 14, and 21 days post-inoculation (PI). PRRSV-infected piglets also showed higher IL-1 β mRNA expression than sham-inoculated ones at 21 days PI ($P < 0.05$) although there were no differences between the groups of 7 and 21 days PI. Besides, as virus load increased IFN- γ and IL-1 β mRNA expression would also elevated. From these results, it is concluded that PRRSV infection would alter IFN- γ and IL-1 β mRNA levels in the lung tissue of infected piglets; however the disturbance of immune system in piglet by PRRSV infection required further study.

Keywords: Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qcPCR), cytokines

計畫緣由與目的

豬繁殖與呼吸綜合症 (Porcine Reproductive Respiratory Syndrome, PRRS) 是近年來非常重要的豬病毒性疾病，本病過去曾被稱之為藍耳病或神祕豬病，造成歐美及世界各地嚴重的經

濟損失。在本省亦造成母豬晚期流死產，哺乳仔豬虛弱、育成率降低，保育豬和肉豬類似感冒症狀及容易感染二次性細菌性併發症。此病在1980年代末期被發現後，在美、加、西歐均有病例報告，在國內無論是台灣省家畜衛生試驗所，台灣養豬科學研究所，屏東科技大學及台大豬病研究室，皆曾以豬肺臟巨噬細胞及免疫螢光抗體染色証實本病的發生，並推斷自1991年起，該病毒即已侵犯本省。本病在本省豬場感染，以持續盤桓及造成嚴重之二次性細菌性併發症於保育豬及肉豬為特徵；此點和國外報告，在嚴重性及致害程度上有很大不同。因此對本省造成極大的危害，造成豬場的重大經濟損失。另外，本省豬場常有出生仔豬於分娩舍即因呼吸道症狀死亡的狀況，且懷疑是豬生殖與呼吸綜合症病毒 (Porcine Reproductive Respiratory Syndrome Virus, PRRSV) 感染所致。本病在台灣的病害較國外疫情嚴重，是否因病毒株的差異而造成，抑或是本國飼養管理方法的特殊性而造成，亟待探討，也因此突顯本病在本土研究的重要性。國外這兩年對PRRSV的研究，因免疫染色及原位雜交技術的進步，對於PRRSV的細胞趨性已有重大發現，國科會亦支持本實驗室進行本土病毒株在此方面的研究。如同國外的報告，PRRSV的主要感染細胞為巨噬細胞 (Macrophage) 且肺臟為PRRSV主要侵犯的臟器。但是，在本實驗室的初步結果發現病毒於感染後一天即在肺臟繁殖，且隨著感染時間增加，病毒的數量亦增加，而病毒所造成的間質性肺炎須待一週或十天以上才發生。究竟PRRSV對免疫系統的影響為何？而肺臟的局部免疫反應在PRRSV的存在又是如何？實在值得研究。而此部分仍是PRRS研究的最大瓶頸之一。臨床所見的嚴重PRRSV感染病例，在實驗感染常為不顯性或極輕微的病變；複合感染的研究僅少數的報告有加重病情或有免疫干擾的結果，大多數為無影響。因此，此病的致病機制相信是非常複雜且不易進行。雖然國外已有PRRSV疫苗販售，但有報告在某些疫苗計畫完整的豬場，仍有PRRS爆發，顯示疫苗株和野外株病毒可能缺乏交叉保護，或許因有ADE (antibody-dependent enhancement) 的存在，使得疫苗產生的某些抗體無保護效果且反而加重病情；但此現象說明要達到控制PRRS的目的仍需許多的研究及努力，而對PRRS致病機制的瞭解，可能是最重要的工作之一。由於細胞素 (cytokines) 是調控免疫系統的重要媒介因子，目前已有許多疾病的致病機制是由此角度進行研究。由於細胞素的調控有 autocrine 及 paracrine 的特性，因此就 PRRSV 複製或產生病灶的器官-肺臟，來探討細胞素在

此的變化，應有機會瞭解病毒對肺臟局部免疫系統的影響為何，而且這方面在 PRRS 的研究亦屬新的方向。針對以上問題提出以下試驗，希望能對 PRRSV 之致病機制有更深入之了解，並以此作為未來防疫及疫苗發展的參考依據。

結果與討論

豬生殖與呼吸綜合症 (Porcine Reproductive Respiratory Syndrome, PRRS) 是近年來非常重要的豬病毒性疾病，其臨床表徵包括母豬晚期流死產，哺乳仔豬虛弱、育成率降低，保育豬和肉豬的間質性肺炎及容易感染二次性細菌性併發症等。本病在本省豬場感染，以持續盤桓及造成嚴重之二次性細菌性併發症於保育豬及肉豬為特徵；此點和國外報告，在疾病的嚴重性及致害程度，以及流行病學等有很大不同；因此對於本土台灣株豬生殖與呼吸綜合症病毒 (Porcine Reproductive Respiratory Syndrome Virus, PRRSV) 感染致病機制的研究就顯得十分重要。肺臟巨噬細胞是 PRRSV 感染繁殖的主要細胞，而間質性肺炎是 PRRSV 感染的主要病灶，因此就 PRRSV 感染在肺臟引起的免疫病理變化及對肺臟局部免疫系統的影響等問題就變得十分重要。本研究嘗試由已初步建立之反轉錄競爭性聚合-連鎖反應之定量方法，針對 5-6 週齡 PRRSV-free SPF 小豬感染後一、二、三週，其肺臟巨噬細胞相關的細胞素包含 IL-1 β 、IL-8、IFN- γ 及 TNF- α 以及重要的 T 細胞相關的細胞素包含 IL-2 及 IL-4 等之表現，在 PRRSV 感染後之影響。望由此了解病毒對肺臟局部免疫系統的影響，及 PRRS 病灶的形成和何種細胞素的調控有關；另外隨感染時間改變，肺臟病毒量的消長對其細胞素輪廓 (profile) 的影響；嘗試由此瞭解可能的有效免疫系統為何？本實驗的目的為建立反轉錄競爭性定量聚合-連鎖反應於豬細胞素及豬生殖與呼吸綜合症病毒 (PRRSV) 基因表現的測量，同時運用此方法觀察 PRRSV 感染對豬肺臟細胞素表現的影響。為了克服聚合-連鎖反應在定量方面的困難，我們架構了一段包含了 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-8、IFN- γ 、PRRSV、 β -actin 及 TNF- α 八對引子序列之 DNA 片段，此 DNA 片段包含之引子序列與測試樣本用之引子序列完全相同，唯其 PCR 產物大小不一；以此 DNA 片段當模板，利用其與樣本模板共同競爭 PCR 反應物質之原理，將此 DNA 片段連續稀釋，經 PCR 反應後，由比對電泳圖上兩種產物之密度，可推算出樣本之濃度，解決 PCR 在定量方面之不足。我們以此 DNA 片段，分別定量測量 PRRSV 攻毒組 (n=4) 與對照組 (n=4) 保育豬肺臟 IFN- γ 、IL-1 β 及 PRRSV mRNA 的

表現。結果發現，在三個不同時間點（攻毒後 7、14 和 21 日），攻毒組 IFN- γ 之表現量皆顯著高於對照組；而攻毒組 IL-1 β 之表現量於攻毒後 21 日顯著高於對照組，但攻毒後第 7 和 14 日，攻毒組與對照組 IL-1 β 之表現量無顯著差異；另外，隨病毒量的增加，IFN- γ 與 IL-1 β mRNA 的表現亦跟著上升。此結果顯示 PRRSV 感染會影響 IFN- γ 與 IL-1 β mRNA 之表現，唯其對免疫系統干擾與否，則仍需進一步的研究。

計畫成果自評

本研究主要是想了解本土台灣株 PRRSV 的致病機制，特別是 PRRSV 感染豬隻肺臟之細胞素表現的影響，主要回答下列問題包括肺臟病灶形成的免疫病理機轉，病毒對肺臟局部免疫系統的影響，以及隨感染時間改變，肺臟病毒量的消長對其細胞素輪廓(profile)的影響等問題。先前，我們已架構一段包含 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-8、IFN- γ 、PRRSV、 β -actin 及 TNF- α 八對引子序列之 DNA 片段（稱為 competitor DNA），此 DNA 片段包含之引子序列與測試樣本用之引子序列完全相同，唯其 PCR 產物大小不一；以此 DNA 片段當模板，利用其與樣本模板共同競爭 PCR 反應物質之原理，將此 DNA 片段連續稀釋，經 PCR 反應後，由比對電泳圖上兩種產物之密度，可推算出樣本之濃度，克服 PCR 在定量方面之不足。之後我們將以反轉錄競爭性定量聚合連鎖反應 (RT-qPCR)，分別觀察 PRRSV 攻毒組與對照組保育豬在攻毒後第 7、14、21 天及 28 天肺臟中細胞素表現，同時隨感染時間改變，細胞素表現的種類及濃度和肺臟病毒量以及肺臟病灶間的關係做一探討。本研究在探討保育豬的致病機制，其結果對於瞭解此病毒在肺臟病灶形成的免疫病理機轉，以及病毒對肺臟局部免疫系統的影響應極有幫助。此外，在本計畫和其他國科會支持的相關計畫下，已完成兩位逆碩士生的訓練，為國家造就高級研究人員。

參考文獻

- } 張志成、鍾文彬、林敏雯、翁仲男、楊平政、邱雲棕、張文發、朱瑞民。1993a。臺灣地區豬繁殖與呼吸道症候群 I. 病毒分離。中華獸醫誌 19:268-276。
- } 張志成、鍾文彬、林敏雯、楊平政、翁仲男、張文發、邱雲棕、劉振軒、朱瑞民。1993b。臺灣地區豬繁殖與呼吸道症候群 II。以無特定病原豬人工接種豬繁殖與呼吸道症候群病毒。中華獸醫誌 19:277-284。

- } 黃子鳴、鄭謙仁、林柏翠、林心郁、吳怡先、龐飛。以反轉錄聚合酶連鎖反應偵測豬細胞素的表現。中獸學會暨臺省畜獸學會聯合學術發表會，p A26，1996
- } 鍾文彬、吳大中、林敏雯、黃瓊儀、張志成、鍾文彬、林敏雯、楊平政、翁仲男、張文發、楊平政。1997。臺灣地區豬繁殖與呼吸道症候群 III. 流行病學調查。中華獸醫誌。23: 43-50。
- } 邱明堂、鍾文彬、鄭謙仁、關玲玲、龐飛。1997。本省病死保育和生長肥育豬隻肺炎及肺臟內豬繁殖與呼吸道症候群病毒感染狀況。中華獸醫誌 23:430-440。
- } 顏宏勳、關玲玲、龐飛、鄭謙仁。1998。以反轉錄競爭性定量聚合酶連鎖反應偵測豬細胞的表現。臺灣省畜牧獸醫學會暨中華民國獸醫學會 86 年度聯合學術論文發表會。
- } Albina, E., Carrat, C and Charley B. 1998. Interferon- α response to swine Arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Interferon Cytokine Res. 18: 485-490
- } Babu, J. S., Kanangat, S, and Rouse, B. T. 1993. Limitations and modifications of quantitative polymerase chain reaction. Application to measurement of multiple mRNAs present in small amounts of sample RNA. J. Immunol. Methods 165:207-216.
- } Balkwill F.R. et al. 1993. The cytokine network. Immunol.Today 10: 299.
- } Benavides, G. R., Hubby, B., Grosse, W. M., McGraw, R. A., and Tarleton, R. L. 1995. Construction and use of a multi-competitor gene for quantitative RT-PCR using exosting primer sets. J. Immunol. Methods 181: 145-156.
- } Chiou, M-T., Jeng, C-R., Chueh, L-L., Cheng, C-H., and Pang, VF. 2000. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (isolate tw91) on porcine alveolar macrophages *in vitro*. Microbiol. 71 : 9-25.
- } Christianson W. T. and Joo H. S. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome: a review. Swine Health and Production 2:10-28.
- } Chung W. B., Lin, M. W., Chang, W. F., Hsu, M. Yang P. C. 1997. Persistent of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in intensive farrow-to-finish pig herds. Can J Vet Res. 61:292.
- } Scott p, Kauman SHE. 1991. The role of T

- } Clerici M, and Shear M. 1993. A Th1-Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today*. 14:107-110.
- } Del Prete G, Maggi E, et. al. 1994. Human Th1 and Th2 cells: functional properties, mechanisms of regulation, and role in disease. *Lab. Invest*. 70:299-306.
- } Fan J, et al. 1993. Elevated IFN- γ and decreased IL-2 gene expression are associated with HIV infection. *J. Immunol*. 151:5031-5040.
- } Kanangat, S., Solomon, A. and Rouse B.T. 1992. Use of quantitative polymerase chain reaction to quantitate cytokine messenger RNA molecules. *Mol. Immunol*. 29: 1229-1236.
- } Lee, K-H., Jeng, C-R , Pang, V. F., Chang, C.C., Cheng, I. C., Chung, W-B., and Chueh. L-L. 1998. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by in situ hybridization. *J Chin Soc Vet Sci*. 24:16-23.
- } Piatak Jr., M., Luk, K.C., Williams, B. and Lifson. J. D. 1993. Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *Biotechniques* 14:70-80.
- } Reddy, N. R., Wilkie, B.N. and Mallard. B. A. 1996. Construction of an internal control to quantitate multiple porcine cytokine mRNAs by RT-PCR. *Biotechniques* 21: 868-870.
- } Rossow, K. D., Collins, J. E., Goyal, S. M., Nelson, E. A., Christopher-Hennings, J., and Benfield, D. A. 1995. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol*. 32: 361-373.
- } Rottman, J.B., Tompkins, W. A. F. and Tompkins. M. B. 1996. A Reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction (RT-qcPCR) technique to measure cytokine gene expression in domestic mammals. *Vet. Pathol*. 33 : 242-248.
- } cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunol Today*. 12:346-348.
- } Shimizu M, Yamada S, Kawashima K, Ohashi S, Shimizu S, and Ogawa T. 1996. Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 50: 19-27.
- } Sieling, P.A. and Modlin. R. L. 1994. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology* 191:378-387.
- } Vèzina SA, Loemba H, Fournier M, Dea S, and Archambault D. 1996. Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res*. 60: 94-99.
- } Vahlenkamp T.W., Egberink, H. F., van Eijk, M. J.T., Slotboom-Kamphorst, A.M.E., Verschoor, E.J., Horzinek, M.C. and de Ronde. A. 1995. Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction for quantitation of feline immunodeficiency virus. *J. Virol. Methods* 52:335-346.
- } Wensvoort G, Dekluyver E. P., Pol J. M. A. et al. 1992. Lelystad virus, the cause of