

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

豬第二型環狀病毒單獨感染及混合豬生殖與呼吸綜合症病毒感染對豬隻免疫細胞之影響及其可能之作用機制(2/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-002-043-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學獸醫學系暨研究所

計畫主持人：龐飛

計畫參與人員：張惠雯 蔡依潔

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 5 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：豬第二型環狀病毒單獨感染及混合豬生殖與呼吸綜合症病毒感染對豬隻免疫細胞之影響及其可能之致病機制

Effects of Porcine Circovirus Type 2 and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection, Singular or Combined, on Swine Alveolar Macrophages

計畫編號：93-2313-B-002-043

執行期限：93年8月1日至94年7月31日

主持人：龐飛 國立臺灣大學獸醫學系

摘要

離乳豬多系統消耗性症候群 (Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 是由第二型豬環狀病毒 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 引起，由於 PCV2 患豬常伴有繼發性病原感染，且 PCV2 與豬生殖與呼吸綜合症病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 在豬場的混合感染情形極為普遍，加上 PCV2 及 PRRSV 感染的標的細胞皆為單核球及巨噬細胞，因此釐清 PCV2 之致病機制及混合 PRRSV 感染對免疫細胞的影響，在對本病之控制及減輕其危害上將有所助益。第一年度的研究已針對 PCV2 與 PRRSV 單獨或不同順序混合感染豬肺臟巨噬細胞 (AMs) 之病毒感染率、細胞死亡及凋亡率、細胞對念珠菌的吞噬力及殺菌能力、氧自由基及細胞激素 IL-1 β 、IFN- α 、IL-8 及 TNF- α 產生能力進行探討，同時亦證實 PCV2 感染 AMs 可誘導產生 IFN- α 而抑制同時或後續的 PRRSV 感染。本年度則進一步發現 PCV2 感染 AMs 能促進其表現多種細胞驅化激素，含 alveolar macrophage-derived neutrophil chemotactic factors II (AMCF-II)、granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)、monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) 及 IL-8，亦發現 PCV2 單獨感染能增加 AMs 表現與肺臟急性炎症及上皮細胞凋亡相關之 Fas ligand (FasL)，但 Fas 的表現則不受影響。以上結果推測這些因 PCV2 感染 AMs 所誘導增加的炎

症中介物與 PMWS 感染豬所呈現的間質性肺炎之致病機制具重要的相關性。此外，本實驗亦證實相對於 PCV2 或 PRRSV 之單獨感染，PCV2 與 PRRSV 在共同感染情形下，可偵測到同時有 TNF- α 、IL-8 及 IFN- α 之表現增加，且 FasL 表現更有顯著增加之情形，這些現象可用以部分解釋臨床觀察所見之 PMWS 豬隻在 PRRSV 共同感染所導致加重病情之致病機制。

關鍵詞：離乳豬多系統消耗性症候群、第二型豬環狀病毒、豬生殖與呼吸綜合症病毒、豬肺臟巨噬細胞、細胞激素、細胞驅化激素

Abstract

Porcine circovirus 2 (PCV2) is currently considered the primary causative agent of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS); however, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) has been suggested as a co-factor needed for the full development of PMWS. Both viruses attack monocyte/macrophage lineage cells and are suggested immunocompromised. In our previous study, we have demonstrated the effects of the infection of both viruses, singular or combined, on the infectious rate, viability, apoptosis, phagocytosis and microbial killing function of swine alveolar macrophages (AMs). We also have proved the high level of interferon- α

induced by PCV2-infected AMs may cause a reduction in PRRSV replication and PRRSV-related AM dysfunction. In present study, we revealed that the levels of tumor necrosis alpha (TNF- α), interleukin 8 (IL-8), alveolar macrophage-derived neutrophil chemotactic factors II (AMCF-II), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), and a commonly known apoptotic inducer and also an inflammatory mediator, Fas ligand (FasL), were strongly up-regulated in PCV2-infected AMs. The enhanced expression levels of various inflammatory cytokines, chemokines and FasL in PCV2-infected AMs may contribute to the pathogenesis of interstitial pneumonia in pigs with PMWS. Moreover, a significant increase in the expression of FasL and a concurrent appearance of TNF- α , IL-8, and IFN- α were observed in PCV2 and PRRSV dually infected groups as compared with PCV2- or PRRSV-infected AMs. The result may contribute, at least partially, to the enhancement of PMWS in PRRSV co-infected cases and the pathogenesis of the full development of PMWS clinically.

Keywords: Porcine circovirus 2 (PCV2), postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), swine alveolar macrophages (AMs), cytokine, chemokine

計畫緣由與目的

離乳豬多系統消耗症候群(Postweaning multisystemic wasting syndrome ; PMWS)為一新興豬病，病因已證實為豬第二型環狀病毒(Porcine circovirus type 2; PCV2)，世界各國包括台灣各地養豬場皆受到本病侵襲，並且至今為止仍無法有效控制，造成嚴重損失。田間調

查發現許多 PMWS 病例常伴隨有豬生殖與呼吸綜合症病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV)感染(Segales and Domingo, 2002)，實驗更證實同時以 PCV2 混合 PRRSV 共同接種豬隻可造成典型 PMWS 疾病呈現，而單純的 PCV2 感染則少有典型病症(Harms et al., 2001; Rovira et al., 2002)。由於 PCV2 及 PRRSV 感染的標的細胞皆為單核巨噬細胞，且根據 Winkler 及 Cheville 研究指出(1987)，豬隻血液中 75%病原多經由肺臟清除，豬肺泡巨噬細胞(alveolar macrophages; AMs)在豬肺臟防禦系統中更扮演重要角色。故本研究以 PCV2 活體外感染 AMs 方式，評估 PCV2 及 PRRSV 感染對豬 AMs 病原防禦或相關之致病影響。在去年度本實驗室已針對 PCV2 與 PRRSV 單獨或不同順序混合感染 AMs 之病毒感染率、細胞死亡及凋亡率、細胞對念珠菌的吞噬力及殺菌能力、氧自由基及細胞激素 IL-1 β 、IFN- α 、IL-8 及 TNF- α 產生能力進行探討，更證實 PCV2 感染 AMs 可誘導其產生 IFN- α ，進而抑制同時或後續的 PRRSV 感染(Chang et al., 2005)。由於 PMWS 豬隻常呈現以組織球為主的肉芽腫性病變並伴隨有許多炎症細胞浸潤之間質性肺炎(Rosell et al., 1999)，過多細胞產生及釋放的炎症中介物被認為與肺臟細胞浸潤及炎症反應病變有關。腫瘤壞死因子 TNF- α 及中介素 IL-1 β 被認為是急性期炎症反應相關之炎症早期中介物，可導致動物發燒、組織破壞、休克、甚至死亡(Dinarello, 2000)。中介素 IL-8 為細胞驅化物，除了能有效進行多核炎症細胞及中性球之吸引作用外(Baggiolini et al., 1994)，並能協同單核球驅化物 MCP-1 促進吸引單核球之貼附於血管內皮(Gerszten et al., 1999)；相似於 IL-8，豬肺臟巨噬細胞衍生的中性球驅化物(alveolar macrophage-derived neutrophil chemotactic factors II; AMCF-II)及調控正常 T 細胞表現及分泌之激素(regulated on activation

normal T-cell expressed and secreted; RANTES) (Yoshioka et al., 2004)與吸引多核炎症細胞至肺臟亦有相關(Goodman et al., 1991)；而 G-CSF，不但與吸引多核炎症細胞有關，亦與刺激骨髓多核炎症細胞之前驅細胞產生有關(Zhang et al., 2000)；GM-CSF 則與吸引嗜中性球、刺激單核細胞之成熟及分化有關(Shen et al., 2004)；MCP-1 及 MCP-2 為強的單核球驅化能有效的吸引單核球至病變區(Baier et al., 2004)，因此為瞭解 PCV2 在肺臟導致之間質性肉芽腫性肺炎之致病機制，本實驗以 ELISA 及 multiprobe ribonuclease protection assay (RPA)方式檢測 PCV2 感染 AMs 之上清液 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-8 產量及細胞內 AMCF-II、GM-CSF、G-CSF、MCP-1、MCP-2、IL-8 及 RANTES 訊息 RNA (messenger RNA)表現量。另外，根據最近的文獻指出 Fas (CD95)及 Fas ligand (FasL)之表現與誘導免疫細胞及肺臟上皮細胞凋亡(Nakamura et al., 2004)與直接促進肺臟急性炎症反應及吸引炎症細胞有關(DosReis and Borges, 2003)，因此，實驗接著以反轉錄聚合酶鏈鎖反應 RT-PCR 進行 PCV2 單獨感染或與 PRRSV 共同感染情形下細胞 Fas 及 FasL 表現之檢測。

結果與討論

在 RPA 實驗結果發現 PCV2 感染 AMs 能促進細胞表現細胞驅化激素 AMCF-II、G-CSF、MCP-1 及 IL-8，另外在上清液細胞激素 IL-8 及 IFN- α 亦有增加之情形；此外亦發現 PCV2 或 PRRSV 單獨感染皆能增加細胞表現與肺臟急性炎症及上皮細胞凋亡相關之 FasL，然而 Fas 的表現在所有感染的 AMs 則皆不受影響。綜合以上結果推測這些增加的炎症中介物與 PMWS 感染豬所呈現之間質性肺炎之致病機制，包括吸引炎症細胞到肺臟促進炎症，及造成上皮及炎症細胞的凋亡具重要相關性。另外，根據之前及本次實驗我們亦發

現，在 PCV2 與 PRRSV 同時感染下，可促進 AMs 同時產生大量急性炎症前驅細胞激素 TNF- α 、IL-8 及 IFN- α ，而 FasL 的表現量相對於 PCV2 或 PRRSV 單獨感染組更有顯著增加表現之情形，這些同時增加的細胞激素或細胞表現的 ligand 推測可進行協同作用，更加遽 PMWS 豬隻所呈現之間質性肺炎，這與臨床豬場所見之 PMWS 豬隻在 PRRSV 同時感染下，能加重豬所呈現之 PMWS 之免疫致病機制相關。

計畫成果自評

本研究已成功應用 multiprobe ribonuclease protection assay (RPA)技術，同時分析多種細胞激素及驅化激素，本方法可加速細胞激素或蛋白質的分析，並解決因部分豬細胞激素檢測試劑尚未開發之不便；另外，亦成功以 RT-PCR 方法檢測豬之 Fas/FasL 之表現，而本研究室先前及本計畫中所獲得的部分結果，已經整理並發表於 *Veterinary Microbiology* (Chang et al., 2005)，目前正整理另一部分結果中，相信該成果亦將可發表於相關的國際性學術雜誌。

參考文獻

- Baggiolini, M., Dewed, B., Moser, B., 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55, 97-179.
- Baier, R.J., Majid, A., Parupia, H., Loggins, J., Kruger, T.E., 2004. CC chemokine concentrations increase in respiratory distress syndrome and correlate with development of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr. Pulmonol.* 37, 137-148.
- Chang, H.W., Jeng, C.R., Liu, J.J., Lin, T.L., Chang, C.C., Chia, M.Y., Tsai, Y.C., Pang, V.F., 2005. Reduction of porcine reproductive and

- respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha. *Vet. Microbiol.* (in press).
- Dinarello, C., 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118, 503-508.
- DosReis, G.A., Borges, V.M., 2003. Role of Fas-ligand induced apoptosis in pulmonary inflammation and injury. *Curr. Drug. Targets. Inflamm. Allergy.* 2, 161-167.
- Gerszten, R.E., Garcia-Zepeda, E.A., Lim, Y.C., Yoshida, M., Ding, H.A., Gimbrone, M.A., Jr., Luster, A.D., Luscinskas, F.W., Rosenzweig, A., 1999. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398, 718-723.
- Goodman, R.B., Forstrom, J.W., Osborn, S.G., Chi, E.Y., Martin, T.R., 1991. Identification of two neutrophil chemotactic peptides produced by porcine alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* 266, 8455-8463.
- Harms, P.A., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Bolin, S.R., Lager, K.M., Morozov, I., Paul, P.S., 2001. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol* 38, 528-539.
- Nakamura, M., Matute-Bello, G., Liles, W.C., Hayashi, S., Kajikawa, O., Lin, S.M., Frevert, C.W., Martin, T.R., 2004. Differential response of human lung epithelial cells to fas-induced apoptosis. *Am. J. Pathol.* 164, 1949-1958.
- Rosell, C., Segales, J., Plana-Duran, J., Balasch, M., Rodriguez-Arriola, G.M., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S., Domingo, M., 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 120, 59-78.
- Rovira, A., Balasch, M., Segales, J., Garcia, L., Plana-Duran, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., Domingo, M., 2002. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol* 76, 3232-3239.
- Segales, J., Domingo, M., 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q* 24, 109-124.
- Shen, L., Fahey, J.V., Hussey, S.B., Asin, S.N., Wira, C.R., Fanger, M.W., 2004. Synergy between IL-8 and GM-CSF in reproductive tract epithelial cell secretions promotes enhanced neutrophil chemotaxis. *Cell. Immunol.* 230, 23-32.
- Winkler, G.C., Cheville, N.F., 1987. Postnatal colonization of porcine lung capillaries by intravascular macrophages: an ultrastructural, morphometric analysis. *Microvasc Res* 33, 224-232.
- Yoshioka, S., Mukae, H., Sugiyama, K., Kakugawa, T., Sakamoto, N., Nakayama, S., Abe, K., Fujii, T., Kadota, J., Kohno, S., 2004. High-BAL fluid concentrations of RANTES in nonspecific interstitial pneumonia compared with usual interstitial pneumonia. *Respir. Med.* 98, 945-951.
- Zhang, P., Summer, W.R., Bagby, G.J., Nelson, S., 2000. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol. Rev.* 173, 39-51.