



李丽,蒋作仪,李茵婧,等. H9N2 AIV 灭活疫苗免疫 SPF 鸡攻毒后肺组织免疫相关基因表达变化研究[J]. 南京农业大学学报,2024,47(1):18-27.

LI Li,JIANG Zuoyi,LI Yinjing,et al. Study on the changes in the expression of immune related genes in the lung of SPF chickens immunized with H9N2 AIV inactivated vaccine and followed by viral infection[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(1):18-27.

H9N2 AIV 灭活疫苗免疫 SPF 鸡攻毒后肺组织 免疫相关基因表达变化研究

李丽,蒋作仪,李茵婧,常丽凤,辛震东,平继辉,苏娟*

(南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]本试验旨在探究 H9N2 亚型禽流感病毒攻击对 H9 灭活疫苗免疫 SPF 鸡呼吸系统的影响。[方法]选用 36 只 3 周龄 SPF 鸡,随机分为对照组(Con)、攻毒组(Flu)、免疫后攻毒组(Vac+Flu)。以每只 0.4 mL 剂量免疫接种 H9 灭活疫苗,3 周后以 10^6 EID₅₀ 的病毒量进行攻毒,采集拭子、血清、气管、肺组织等样品,通过血凝抑制(HI)试验、RT-PCR、荧光定量 PCR(qPCR)等方法检测血清中 HI 抗体滴度、肺脏流感病毒 M 基因拷贝数以及免疫相关基因 CD4、CD8、GATA3、T-bet、IL-4、IL-13、TNF- α 、IFN- γ 、Perforin、Granzyme、FasL、Fas 等的表达量;并利用 HE 染色、免疫组织化学的方法观察气管、肺脏的病理变化及病毒特异性抗原 NP 蛋白的分布特征。[结果]HI 试验结果显示,SPF 鸡疫苗免疫后可产生较高的 H9N2 AIV 抗体效价。免疫保护试验和 RT-PCR 结果显示,SPF 鸡疫苗免疫后攻毒仍能检测到机体排毒和流感病毒 M 基因在肺脏组织中的表达。HE 染色和免疫组化结果显示,接种 H9N2 AIV 灭活疫苗后能够明显减轻 SPF 鸡气管和肺脏的病理损伤,降低气管、肺脏中的病毒载量。荧光定量 PCR 结果显示,接种 H9N2 AIV 灭活疫苗后能够提高 SPF 鸡肺脏中 Th1、Th2 细胞因子分泌水平,促进穿孔素/颗粒酶途径相关基因表达进而增强肺脏中细胞毒性反应。[结论]H9N2 疫苗免疫鸡感染 H9 病毒后虽然仍存在排毒现象,但其抗病毒免疫系统活跃、其主要器官病毒载量降低,建议按照流感疫苗免疫程序进行免疫接种,提高对流感的防控水平。

关键词:SPF 鸡;H9N2 亚型禽流感病毒;灭活疫苗;肺;免疫相关基因

中图分类号:S855.3

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)01-0018-10

Study on the changes in the expression of immune related genes in the lung of SPF chickens immunized with H9N2 AIV inactivated vaccine and followed by viral infection

LI Li,JIANG Zuoyi,LI Yinjing,CHANG Lifeng,XIN Zhendong,PING Jihui,SU Juan*

(College of Veterinary Medicine,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China)

Abstract:[Objectives]The aim of this experiment was to explore the effect of H9N2 subtype avian influenza virus attack on the respiratory system of SPF chicken immunized with H9 inactivated vaccine. [Methods]36 SPF chickens were selected and randomly divided into the control group(Con),the challenge group(Flu)and the immunization followed challenge group(Vac+Flu). Chickens were immunized with H9 inactivated vaccine at a dose of 0.4 mL per chicken,and after 3 weeks,they were challenged at a dose of 10^6 EID₅₀ of virus. The swabs,serum,trachea,lung and other samples were collected. Hemagglutination inhibition(HI)antibody titer,the genomes copies of influenza virus M gene and the expression levels of immune related genes CD4,CD8,GATA3,T-bet,IL-4,IL-13,TNF- α ,IFN- γ ,Perforin,Granzyme,FasL,Fas were separately detected by HI assay,RT-PCR and quantitative PCR(qPCR). And the pathological changes and distribution of virus specific antigen NP protein of trachea and lung were individually observed by hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry. [Results]The results of HI assay showed that SPF chicken could produce high H9N2 AIV antibody titer after immunization. The results of immune protection test and RT-PCR showed that the virus shedding and the expression of influenza virus M gene in lung tissue could still be detected after SPF chickens were immunized with vaccine and followed by viral infection. The result of hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry showed that inoculating the H9N2 AIV inactivated vaccine significantly alleviated the pathological damage of trachea and lung and significantly reduced the viral load of trachea and lung. Quantitative PCR showed that inoculating the H9N2 AIV inactivated vaccine significantly up-regulated the secretion of Th1 and Th2

收稿日期:2022-12-21

基金项目:国家重点研发计划项目(2021YFD1800205);国家自然科学基金项目(31772775)

*通信作者:苏娟,副教授,主要从事神经内分泌与免疫研究,E-mail:sujuan@njau.edu.cn。

cytokines and promoted the expression of perforin/granzyme pathway related genes to enhance cytotoxicity in the lung. [Conclusions] Although chickens inoculated with H9N2 vaccine were infected with H9 virus, there was still a phenomenon of virus shedding. Their antiviral immune system was active and the viral load of main organs was reduced. It is recommended to carry out vaccination according to the influenza vaccine immunization procedure to improve the level of influenza prevention.

Keywords: SPF chicken; H9N2 subtype avian influenza virus; inactivated vaccine; lung; immune-related gene

禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)属于正黏病毒科、流感病毒属、有包膜的 RNA 病毒^[1]。H9N2 AIV 是禽流感病毒的主要亚型之一,在世界多地广泛分布。H9N2 AIV 是一种低致病性禽流感病毒(low pathogenic avian influenza virus, LPAIV),然而,与其他病原体混合感染可使患病禽病情加重,导致病死率增加进而给养殖业造成严重的经济损失^[2-3]。

在家禽养殖业中通常使用灭活疫苗控制 H9N2 AIV 感染,尽管体液免疫是禽类抵抗 AIV 感染的主要保护性免疫,但疫苗接种并不能带来完全理想的效果,疫情仍持续发生^[4]。

由 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞介导的细胞免疫反应是抗流感病毒免疫的重要组成部分^[5]。CD8⁺T 细胞是主要效应细胞,可杀死受到流感病毒感染的细胞,而 CD4⁺T 细胞则产生适应性免疫反应所需的细胞因子^[6-7]。流感病毒感染后,活化的 CD4⁺T 细胞分化成多种 Th 细胞亚群,例如 Th1、Th2、Th17 等^[8]。Th1 细胞分泌细胞因子 IFN- γ 、TNF、IL-2 等和 Th2 细胞产生细胞因子 IL-4、IL-5、IL-13 等参与细胞免疫反应^[9-11]。已有研究表明,小鼠经皮肤接种 cGAMP 佐剂多价流感 mRNA 疫苗利于平衡 Th1/Th2 型反应,增加脾脏中 IFN- γ 、IL-4 分泌细胞和病毒特异性 CD8⁺T 细胞以及肺中 CD4⁺常驻记忆 T 细胞(TRM)数量,并对同源毒株提供完全保护^[12]。细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)和自然杀伤细胞(NK)通过穿孔素/颗粒酶和 Fas-FasL 途径诱导靶细胞凋亡进而发挥免疫调节的作用^[13]。鸡 T 细胞已被证明在抵抗病毒感染、提供持久和交叉保护方面发挥关键作用,并具有开发通用疫苗的潜力^[14]。

然而目前关于已免疫动物受同源病毒攻击后肺组织中免疫相关基因表达变化的研究报道较少。因此,本研究基于 H9N2 AIV 疫苗免疫后再次发生病毒感染,机体仍向体外排毒这一重要临床现象,通过探究在 H9N2 AIV 灭活疫苗免疫情况下,H9N2 AIV 感染 SPF 鸡后排毒情况、呼吸道器官的形态学变化以及肺组织中免疫相关因子的表达水平差异,以期了解 H9N2 AIV 灭活疫苗在肺组织中发挥免疫作用及不能有效抑制 H9N2 流感感染的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 试验动物及分组处理

36 只 3 周龄 SPF 鸡购自济南赛斯家禽科技有限公司。SPF 鸡随机分为对照组(Con)、攻毒组(Flu)、免疫后攻毒组(Vac+Flu)3 组。免疫后攻毒组,以 A/chicken/Anhui/BRI-99/2017(H9N2)(简称:Anhui/99 H9N2)毒株制备的油乳剂灭活疫苗在每只鸡颈背部皮下免疫接种 0.4 mL,对照组和攻毒组鸡免疫无菌 PBS。3 周后,通过滴鼻点眼的方式用同源病毒 Anhui/99 进行攻毒,攻毒剂量为每只 1×10^6 EID₅₀。对照组用等量 PBS 滴鼻点眼。攻毒后观察各组 SPF 鸡临床症状并做好记录。

1.2 样品采集及处理

在攻毒后 1、3、5 和 7 d,对每组 SPF 鸡采集喉头和泄殖腔拭子,分别置于含 1 mL 样品保存液(含青、链霉素)的 2 mL 离心管中,-80 °C 保存。采集血液样品,静置 30 min,3 000 g 离心 10 min 后取血清,-20 °C 保存备用。同时每组 3 只鸡通过颈动脉放血处死,采集气管、肺脏,其中一部分放入液氮速冻,后转入-80 °C 冰箱保存,另一部分置于 4%多聚甲醛中固定。

1.3 血凝抑制(HI)抗体测定

在 96 孔 V 型血凝板的 1~12 孔分别加入 25 μ L 灭菌 PBS 缓冲液,吸取 25 μ L 待检血清加至第 1 孔,反复吹打混匀。依次从前一个孔中吸取 25 μ L 液体加至下一个孔,进行倍比稀释,至第 11 孔时弃去 25 μ L 液体,最后 1 个孔为对照孔,然后,每孔加入 8 单位抗原 25 μ L,混匀后室温静置 30 min。随后每孔加入 50 μ L 1%的鸡红细胞悬液,室温静置 30 min。结果判定:倾斜血凝板,从背面观察,当对照孔的结果成立时,观察被测样品孔红细胞有无呈泪滴状流淌,记录红细胞未发生凝集的最高稀释倍数。

1.4 SPF 鸡排毒情况分析

喉头和泄殖腔拭子样品经反复挤压后弃去棉拭子,4 °C、12 000 g 离心 10 min 后取上清液。每个拭子

样品经尿囊腔接种3枚10日龄鸡胚,置于37℃温箱培养48h。48h后收集每个鸡胚的尿囊液,检测鸡胚尿囊液HA效价,分析各组SPF鸡的呼吸道和泄殖腔排毒情况。

1.5 RT-PCR法检测肺组织中流感病毒M基因的表达

称取20mg肺组织,加入液氮后快速研磨均匀,用RNA提取试剂盒(南京诺唯赞生物科技公司)提取总RNA。测定总RNA浓度后用DEPC水将其稀释为 $500\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,利用反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技公司)将RNA反转录为cDNA。PCR反应体系:*Taq Mix* 12.5 μL ,双蒸水 8.5 μL ,cDNA 2 μL ,上、下游引物各1 μL 。以H9N2 AIV的M基因序列设计PCR扩增引物,并以*GAPDH*为内参基因。引物序列见表1。PCR扩增结束后,琼脂糖凝胶电泳分析PCR扩增结果。

表1 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of the target genes

基因 Genes	引物对序列 Primer pairs sequence(5'→3')	序列号 GenBank number
<i>CD4</i>	TGTGGAAGTGCACCTCGTG/CACATGCATGCAAGGCCAAT	XM_046906553.1
<i>CD8</i>	GCTGTACTTCAGCTCGGGAC/ATGTCCTTGTGACGTGGCT	XM_046915618.1
<i>GATA3</i>	GGCTGGACGGGAGCAAAG/AGCAGCGGGTAAACGGA	XM_046908462.1
<i>T-bet</i>	GGGAACCGCCTCTACCTG/AGTGATGTCGGCGTCTGG	XM_040692014.2
<i>IL-4</i>	GGTCTCTTCCTCAACATGCCGTGAG/TCCATTGAAGTAGTGTGCCCTGCTG	XM_046900385.1
<i>IL-13</i>	CTGCCCTGCTCTCTCTGT/CCTGCACTCTCTGTTGAGCTT	NM_001007085.3
<i>TNF-α</i>	GCTGTTCTATGACCGCCAGTT/AACAACCACTATGCACCCCA	XM_046927265.1
<i>IFN-γ</i>	TGAGCCAGATTGTTTCGATG/CTTGCCAGGTCCATGATA	NM_205149.2
<i>Perforin</i>	ATGGCCGAGGTGACAGTGA/TGGCCTGCACCGGTAATTC	XM_046929135.1
<i>Granzyme</i>	ACTCATGTCGAGGGGATTCA/TGTAGACACCAGGACCACCA	XM_046934668.1
<i>FasL</i>	CCTTACCAGTGGCATTTCAGTACC/CCTCGTTGTCACAGTGCCTTCC	NM_001031559.2
<i>Fas</i>	CTGCATAAATGATACAGAAGTTCCC/CGACATTCATACACTCTCCAAATC	XM_046919846.1
<i>Matrix</i>	ATCAAGTGAACAGGCAGCGGAAG/ACCATCGTCAACATCCACAGCAC	AOC37194.1
<i>GAPDH</i>	GACGTGCAGCAGGAACACTA/TCTCCATGCTGGTGAAGACA	NM_204305.2

注:*CD4*:CD4分子基因 CD4 molecule gene;*CD8*:CD8分子基因 CD8 molecule gene;*GATA3*:GATA3结合蛋白3基因 GATA binding protein 3 gene;*T-bet*:T-box 基因家族转录因子基因 T-box transcription factor gene;*IL-4*:IL-4基因 Interleukin-4 gene;*IL-13*:IL-13基因 Interleukin-13 gene;*TNF- α* :肿瘤坏死因子 α 基因 Tumor necrosis factor α gene;*IFN- γ* :干扰素 γ 基因 Interferon gamma gene;*Perforin*:穿孔素基因 Perforin gene;*Granzyme*:颗粒酶基因 Granzyme gene;*FasL*:Fas配体基因 Fas ligand gene;*Fas*:Fas细胞表面死亡受体基因 Fas cell surface death receptor gene;*Matrix*:H9N2禽流感病毒基质蛋白基因 H9N2 AIV matrix protein gene;*GAPDH*:甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. 下同 The same below.

1.6 HE染色观察气管、肺脏组织的病理变化

气管和肺组织经4%多聚甲醛固定48h后,修剪出适当大小的组织块,放入梯度浓度乙醇中脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片(厚度为5 μm)。苏木精-伊红(HE)染色,脱水透明后用中性树胶封片。最后利用光学显微镜(尼康,日本)观察并拍照。

1.7 免疫组织化学染色检测病毒抗原

将制备好的石蜡切片进行脱蜡、水化,再放入3% H_2O_2 溶液封闭,置于 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH6.0)中进行抗原修复,滴加BSA封闭液并于37℃温箱中封闭40min。弃封闭液,切片上滴加一抗(鼠源流感病毒核蛋白抗体,1:1000稀释)并置于4℃过夜,阴性对照用PBS替代一抗。第2天,PBS缓冲液冲洗后用HRP标记抗鼠IgG(Proteintech,USA)在室温孵育0.5h。滴加DAB显色工作液50~100 μL ,室温孵育5~10min。蒸馏水润洗15s以终止显色;苏木素复染2min,蒸馏水润洗5min。置于梯度浓度乙醇中脱水,放入二甲苯2min后,中性树胶封片,显微镜下观察。结果判定:在显微镜下视野中细胞核/或细胞质出现棕黄色染色为病毒阳性反应。

1.8 RT-qPCR法检测肺脏中免疫相关基因mRNA相对表达水平

提取肺脏组织RNA并反转录为cDNA,步骤同1.5节。用SYBR Green酶(南京诺唯赞生物科技公司)进行荧光定量PCR,体系为10 μL ,包括SYBR Green 5 μL ,上、下游引物各0.5 μL ,双蒸水3 μL ,cDNA 1 μL 。以*GAPDH*为内参基因,每个样品3次重复。用荧光定量PCR仪(Roche)按照扩增程序进行扩增反应。结果用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行相对定量分析。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。引物序列见表1。

1.9 数据处理与结果统计

结果数据以平均值 \pm 标准误($\bar{x}\pm\text{SE}$)表示,用GraphPad prism 8软件对数据进行双因素方差分析和差异显著性检验($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 攻毒后各组 SPF 鸡临床症状

H9N2 AIV 感染后,对照组和免疫后攻毒组 SPF 鸡均未出现临床症状,精神状况、采食状况良好。感染后,攻毒组 SPF 鸡出现精神沉郁,食欲下降,咳嗽、打喷嚏等轻度呼吸系统症状。说明 SPF 鸡提前接种灭活疫苗可改善 H9N2 AIV 引起的轻微临床症状。

2.2 各组 SPF 鸡 HI 抗体水平

通过血凝抑制试验监测 SPF 鸡免疫 H9N2 AIV 灭活疫苗后攻毒对血清抗体水平的影响。结果如图 1 所示,对照组 SPF 鸡血清中抗 H9N2 AIV 的 HI 抗体为阴性。攻毒组在感染后第 1、3 天未检测到 HI 抗体,在第 5 天检测到 HI 抗体,抗体滴度(\log_2)平均值为 4.5。在第 9 天,攻毒组中抗体滴度(\log_2)平均值为 8.3。免疫后攻毒组在试验期间抗体滴度都大于 6,第 9 天的抗体滴度(\log_2)平均值为 11。感染后第 5、9 天,免疫后攻毒组的 HI 抗体滴度均极显著高于对照组、攻毒组($P < 0.001$),感染后第 7 天,免疫后攻毒组 HI 抗体滴度与攻毒组差异不显著($P > 0.05$)。从整体来看,SPF 鸡接种 H9N2 AIV 后可产生较高的 H9N2 亚型 AIV 抗体效价。

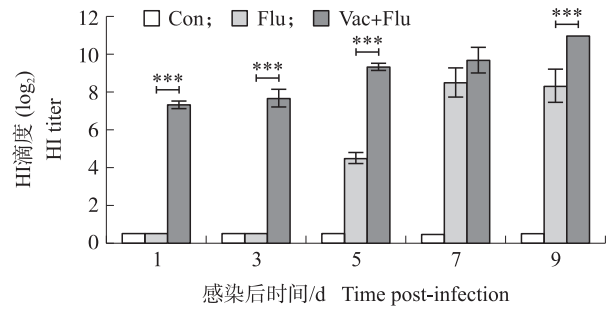


图 1 H9N2 AIV 灭活疫苗免疫后攻毒在不同时间点 SPF 鸡体内 HI 抗体水平

Fig. 1 HI antibody levels in SPF chickens at different time points after immunization with H9N2 AIV inactivated vaccine and followed by viral infection

Con、Flu、Vac+Flu 分别代表对照组、攻毒组和免疫后攻毒组。下同。

Con, Flu and Vac+Flu represent the control group, the challenge group and the immunization followed challenge group, respectively. The same below.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. The same below.

2.3 灭活疫苗免疫并攻毒后不同脏器中的病毒水平检测与鉴定

2.3.1 咽喉/泄殖腔的病毒水平 咽喉/泄殖腔的病毒水平如表 2 所示,在感染后的第 3、5 天,攻毒组在咽喉、泄殖腔中均能检测到病毒,其中咽喉的排毒率最高;而免疫后攻毒组在感染后第 3、5 天,只有在咽拭子中检测到病毒。SPF 鸡提前接种灭活疫苗,病毒感染后仍能检测到机体排毒,说明 H9N2 AIV 灭活疫苗不能提供完全免疫保护。

表 2 SPF 鸡接种 H9N2 AIV 灭活疫苗并攻毒后的排毒情况

Table 2 The virus shedding of SPF chickens after inoculation with H9N2 AIV inactivated vaccine and followed by viral infection

组别 Groups	攻毒后时间/d Time post inactivated							
	1		3		5		7	
	咽喉 Throat	泄殖腔 Cloaca	咽喉 Throat	泄殖腔 Cloaca	咽喉 Throat	泄殖腔 Cloaca	咽喉 Throat	泄殖腔 Cloaca
Con	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Flu	0/3	0/3	3/3	1/3	2/3	1/3	0/3	0/3
Vac+Flu	0/3	0/3	1/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3

注:表中数值为攻毒后排毒鸡数/鸡总数。The value in the table represent the number of detoxified chickens after the attack/total number of chickens.

2.3.2 肺组织中的病毒检测 研究表明流感病毒感染可对肺组织造成损伤,因此,本研究对攻毒后第 1、3、5 和 7 天肺组织中的流感病毒 M 基因表达进行测定。如图 2 所示:在感染后第 3、5 天,攻毒组在肺组织中均能检测到流感病毒 M 基因的表达;免疫后攻毒组肺脏组织中仅在感染后第 5 天检测到流感病毒 M 基因的表达。以上结果表明 H9N2 灭活疫苗免疫可以明显抑制流感病毒在肺脏组织中的复制,但不能完全抑制。

2.4 灭活疫苗免疫并攻毒后气管、肺脏组织病理变化

免疫 H9N2 AIV 灭活疫苗后病毒感染对 SPF 鸡气管以及肺组织形态学变化的影响结果如图 3 所示。对照组 SPF 鸡气管黏膜比较完整,无脱落,肺组织有散在的少量红细胞、炎性细胞。感染后第 3 天,攻毒

组气管有黏膜层脱落现象,免疫后攻毒组无明显病变。感染后第 5 天,攻毒组气管黏膜层炎性细胞增多,免疫后攻毒组气管有轻微的黏膜层脱落现象。感染后第 7 天,攻毒组和免疫后攻毒组气管未见明显病变。在感染后第 3 天,攻毒组和免疫后攻毒组肺脏组织可见散在大量红细胞和少量炎性细胞。在感染后第 5、7 天,攻毒组中可见肺脏组织结构损伤加剧,大量炎症细胞聚集,肺泡间隔明显增厚。免疫后攻毒组肺脏组织红细胞、炎性细胞数量相对对照组明显增多,但损伤程度轻于攻毒组。以上结果表明,免疫后攻毒组中 SPF 鸡气管、肺组织损伤轻于攻毒组;疫苗免疫可以有效减轻 H9N2 亚型流感病毒对 SPF 鸡气管、肺组织的损伤。

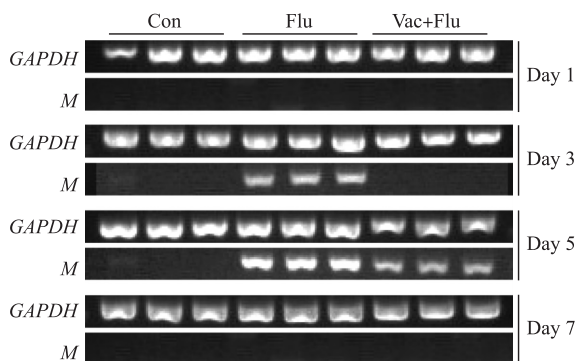


图 2 H9N2 AIV 灭活疫苗免疫并攻毒后在不同时间点 SPF 鸡肺脏组织中流感病毒 M 基因表达情况

Fig. 2 The expression of influenza virus M gene in lung tissues of SPF chickens at different time points after immunization with H9N2 AIV inactivated vaccine and followed by viral infection

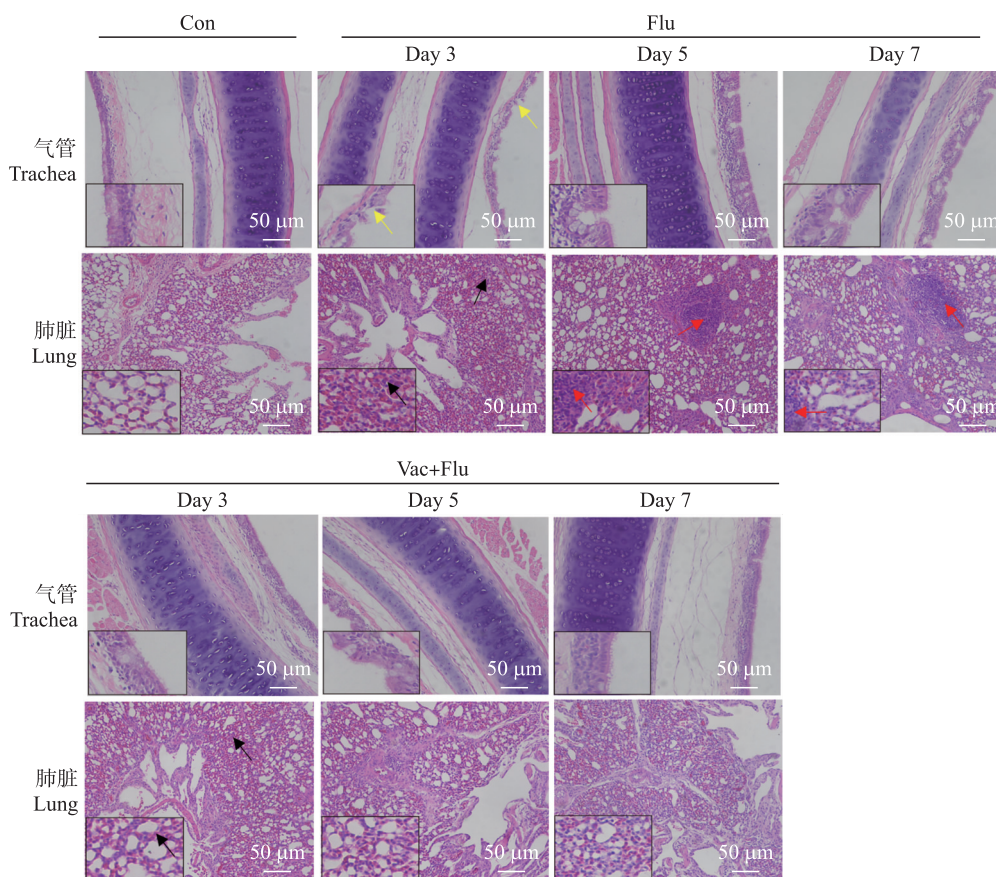


图 3 H9N2 AIV 灭活疫苗免疫后攻毒在不同时间点对 SPF 鸡气管、肺脏组织形态的影响

Fig. 3 The effect of immunization with H9N2 AIV inactivated vaccine and followed by viral infection on the morphology of trachea and lung in SPF chickens at different time points

黄色箭头示气管黏膜层脱落,黑色箭头示肺脏组织中散在的大量红细胞,红色箭头示肺脏组织中聚集的炎性细胞。

The yellow arrow indicates the detachment of the tracheal mucosal layer, the black arrow indicates a large number of scattered red blood cells in the lung tissue, and the red arrow indicates the accumulation of inflammatory cells in the lung tissue.

2.5 灭活疫苗免疫并攻毒后气管和肺组织病原学观察

通过免疫组织化学方法来检测病毒感染后 SPF 鸡气管和肺脏组织中流感病毒抗原核蛋白(NP)的表达情况。结果如图 4 所示:在感染后第 3 天,攻毒组和免疫后攻毒组气管中均可检测到大量 NP 蛋白存在,攻毒组肺脏组织中有大量 NP 蛋白存在,而免疫后攻毒组肺脏组织中基本无 NP 蛋白存在。在感染后

第 5 天,攻毒组气管和肺脏组织有大量 NP 蛋白存在,免疫后攻毒组气管、肺脏组织可见少量 NP 蛋白存在。在感染后第 7 天,攻毒组及免疫后攻毒组气管中仅见少量 NP 蛋白存在,肺脏组织中均未见 NP 蛋白存在。以上结果表明,疫苗免疫可以明显抑制流感病毒在气管、肺脏组织中的复制。

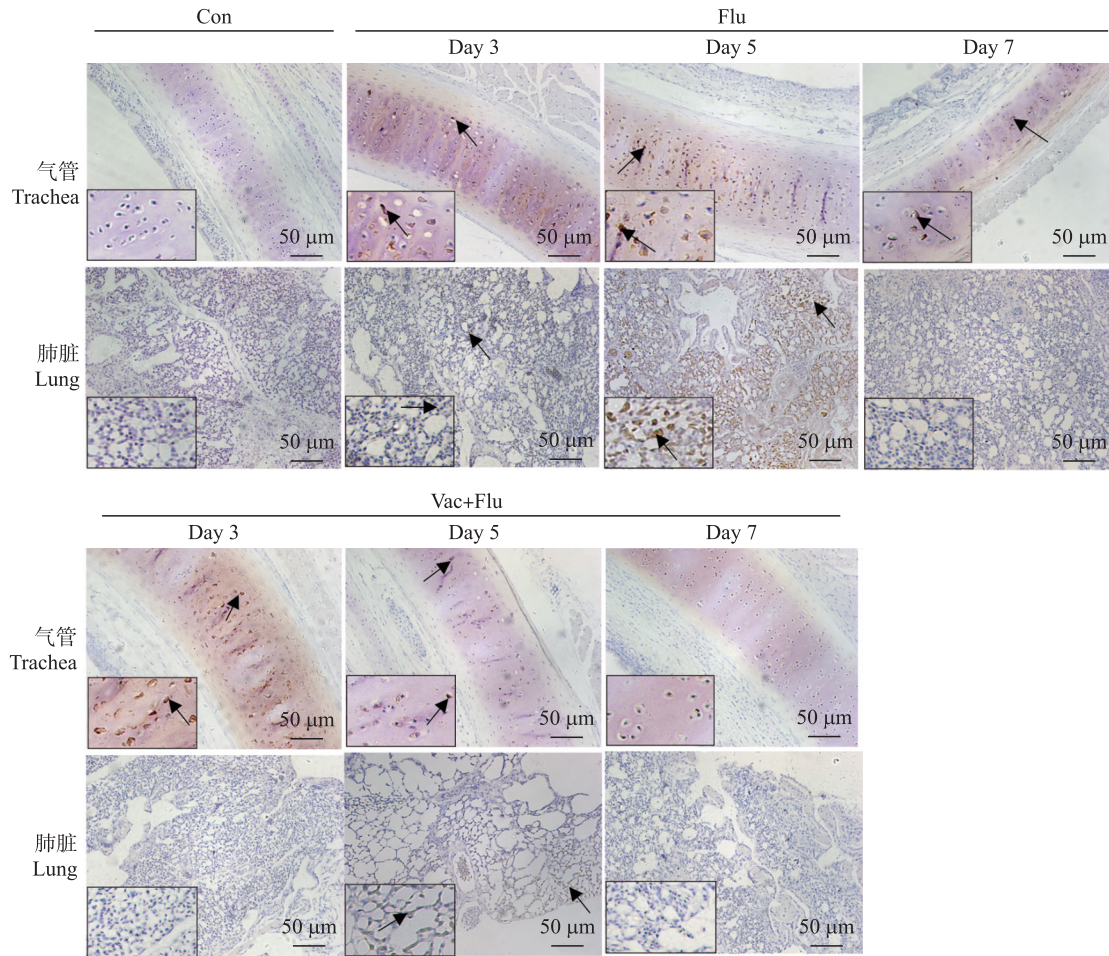


图 4 H9N2 AIV 灭活疫苗免疫后攻毒在不同时间点 SPF 鸡气管和肺组织中 NP 蛋白表达情况

Fig. 4 The expression of NP protein in trachea and lung tissues of SPF chickens after immunization with H9N2 inactivated AIV vaccine and followed by viral infection at different time points

箭头表示 NP 抗原阳性。Arrows indicate NP antigen positivity.

2.6 灭活疫苗免疫并攻毒后肺组织中 CD4 和 CD8 分子基因表达的变化

白细胞表面分化抗原 CD4 和 CD8 在宿主免疫应答中发挥着重要作用^[15],因此,本试验检测了 SPF 鸡免疫 H9N2 AIV 灭活疫苗后再感染流感病毒对肺组织中 CD4 和 CD8 表达的影响。结果如图 5 所示:感染后第 5 天,免疫后攻毒组鸡肺脏中 CD4 mRNA 表达量与对照组相比显著升高($P < 0.05$),与攻毒组相比略

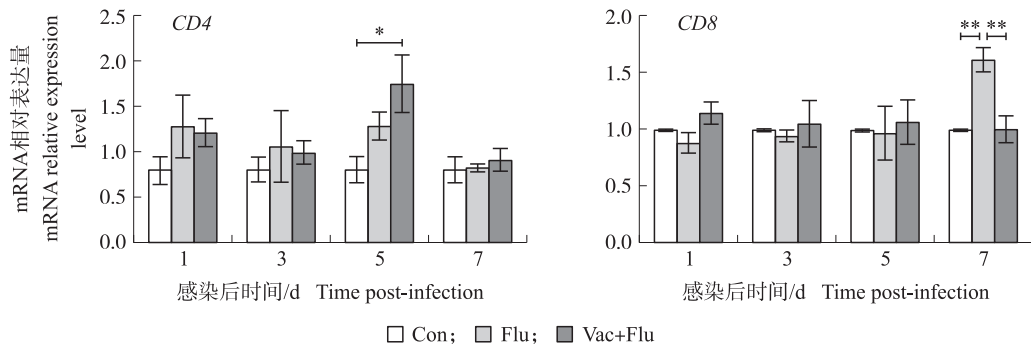


图 5 H9N2 AIV 灭活疫苗免疫后攻毒不同时间点肺组织中 CD4、CD8 基因的表达

Fig. 5 The expression of CD4 and CD8 genes in lung tissue at different time points after immunization with H9N2 AIV inactivated vaccine and followed by viral infection

有升高但差异不显著($P>0.05$);感染后第 7 天,攻毒组鸡肺脏中 *CD8* mRNA 表达量极显著高于对照组、免疫后攻毒组($P<0.01$)。以上结果表明,先免疫后病毒感染能够促进肺组织中 *CD4* 分子基因的表达,而病毒感染能促进肺组织中 *CD8* 分子基因的表达。

2.7 灭活疫苗免疫并攻毒后对肺组织 Th1/Th2 细胞分化特异性转录因子及细胞因子基因表达的影响

GATA3 和 T-bet 分别是 Th2 和 Th1 细胞特异性转录因子,IL-4、IL-13 为 Th2 细胞标志性细胞因子,IFN- γ 、TNF- α 为细胞毒性 Th1 细胞标志性细胞因子^[9-10]。以上因子可调节 T 细胞分化、参与细胞免疫反应,本试验检测了 SPF 鸡免疫 H9N2 AIV 灭活疫苗后再感染流感病毒对肺组织中上述因子表达的影响。结果如图 6 所示:感染后第 5 天,免疫后攻毒组 *GATA3* mRNA 表达量显著高于对照组($P<0.05$),极显著高于攻毒组($P<0.01$)。感染后第 7 天,攻毒组 *T-bet* mRNA 表达量极显著高于对照组($P<0.01$)。虽然攻毒组 *T-bet* mRNA 表达量高于免疫后攻毒组但差异不显著($P>0.05$)。感染后第 5 天,免疫后攻毒组 *IL-4* mRNA 表达量极显著高于对照组和攻毒组($P<0.001$);感染病毒后,鸡肺组织中 *IL-13* mRNA 表达量在各组之间差异均不显著($P>0.05$)。感染后第 3 天,免疫后攻毒组 *TNF- α* mRNA 表达量极显著高于攻毒组($P<0.01$),也高于对照组但差异不显著($P>0.05$);感染后第 7 天,攻毒组与免疫后攻毒组中 *TNF- α* mRNA 表达量均显著高于对照组($P<0.05$)。感染后第 5 天,攻毒组 *IFN- γ* mRNA 表达量极显著高于对照组、免疫后攻毒组($P<0.01$);感染后第 7 天,免疫后攻毒组 *IFN- γ* mRNA 表达量极显著高于对照组、攻毒组($P<0.001$)。以上结果表明,疫苗免疫后病毒感染促进了 SPF 鸡肺组织中 Th2 细胞转录因子及 Th1、Th2 相关细胞因子的表达以增强细胞免疫反应,而未免疫鸡感染病毒则主要促进肺组织中 Th1 细胞转录因子及相关细胞因子的表达进而增强细胞免疫反应。

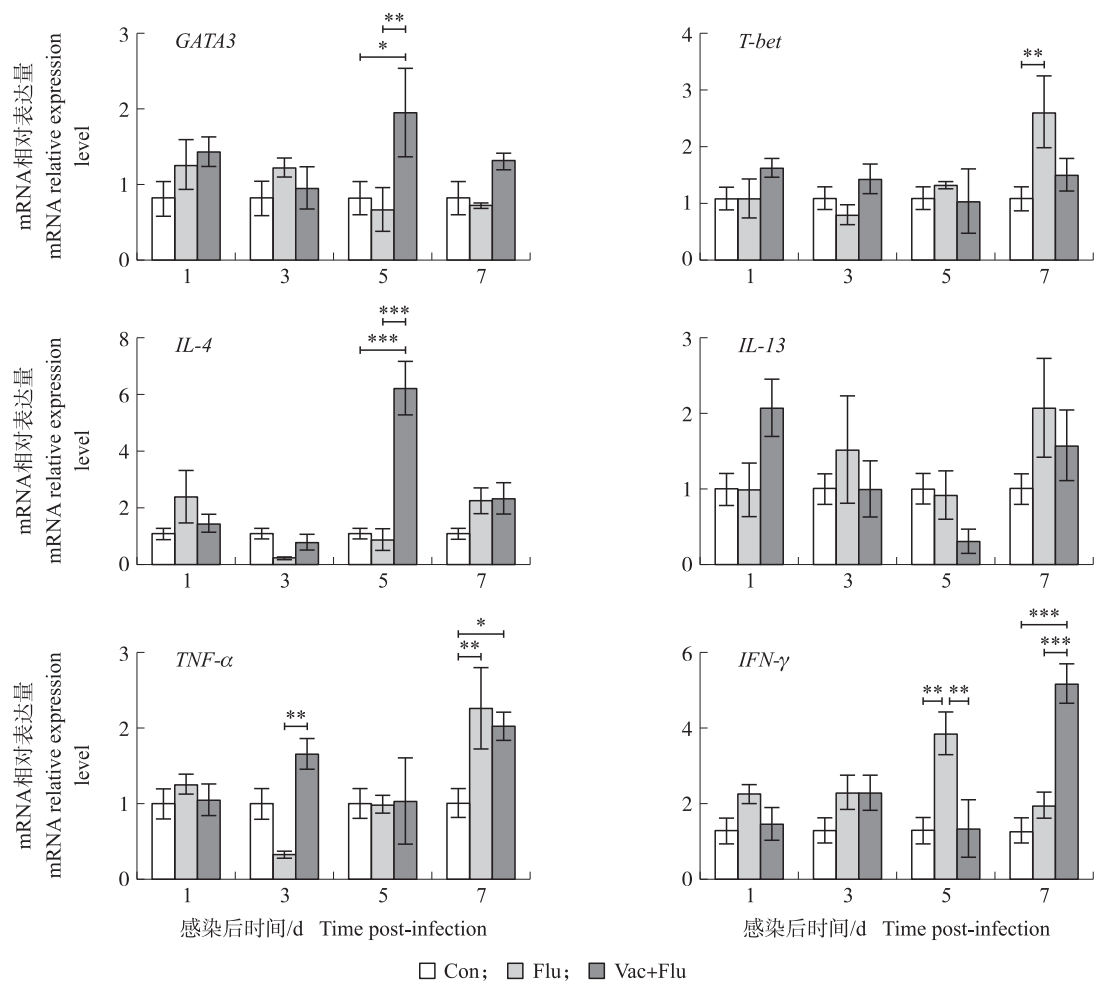


图 6 H9N2 AIV 灭活疫苗免疫后攻毒不同时间点肺组织 Th1、Th2 细胞分化特异性转录因子及细胞因子基因的表达

Fig. 6 The expression of Th1, Th2 cell differentiation specific transcription factor and cytokines in lung tissue at different time points after immunization with H9N2 AIV inactivated vaccine and followed by viral infection

2.8 灭活疫苗免疫并攻毒后肺组织中细胞毒性相关基因表达的变化

本试验检测了 SPF 鸡免疫 H9N2 AIV 灭活疫苗后再感染流感病毒对肺组织中穿孔素/颗粒酶和 Fas 和 FasL 两种相互作用的细胞溶解途径相关基因表达的影响。结果如图 7 所示:感染后第 3 天,与对照组相比,攻毒组 *Perforin* mRNA 表达量显著升高($P<0.05$),免疫后攻毒组 *Perforin* mRNA 表达量极显著升高($P<0.01$)。感染后第 7 天,攻毒组 *Perforin* mRNA 表达量极显著高于对照组($P<0.01$),高于免疫后攻毒组但差异不显著($P>0.05$)。感染后第 3 天,攻毒组 *Granzyme* mRNA 表达量极显著高于对照组($P<0.001$),免疫后攻毒组 *Granzyme* mRNA 表达量极显著高于对照组($P<0.001$)、攻毒组($P<0.01$)。感染后第 7 天,攻毒组 *Granzyme* mRNA 表达量与对照组相比极显著升高($P<0.01$),与免疫后攻毒组相比显著升高($P<0.05$)。感染后第 1 天,免疫后攻毒组 *FasL* mRNA 表达量显著高于对照组($P<0.05$),高于攻毒组但差异不显著($P>0.05$)。感染后第 5 天,免疫后攻毒组 *FasL* mRNA 表达量显著高于攻毒组($P<0.05$)。感染后, *Fas* mRNA 表达量在各组之间差异不显著($P>0.05$)。以上结果表明,流感病毒在肺脏组织中可能主要通过促进穿孔素/颗粒酶途径相关基因的表达引发细胞毒性反应进而引起 T 细胞介导的流感病毒在肺组织中被清除。

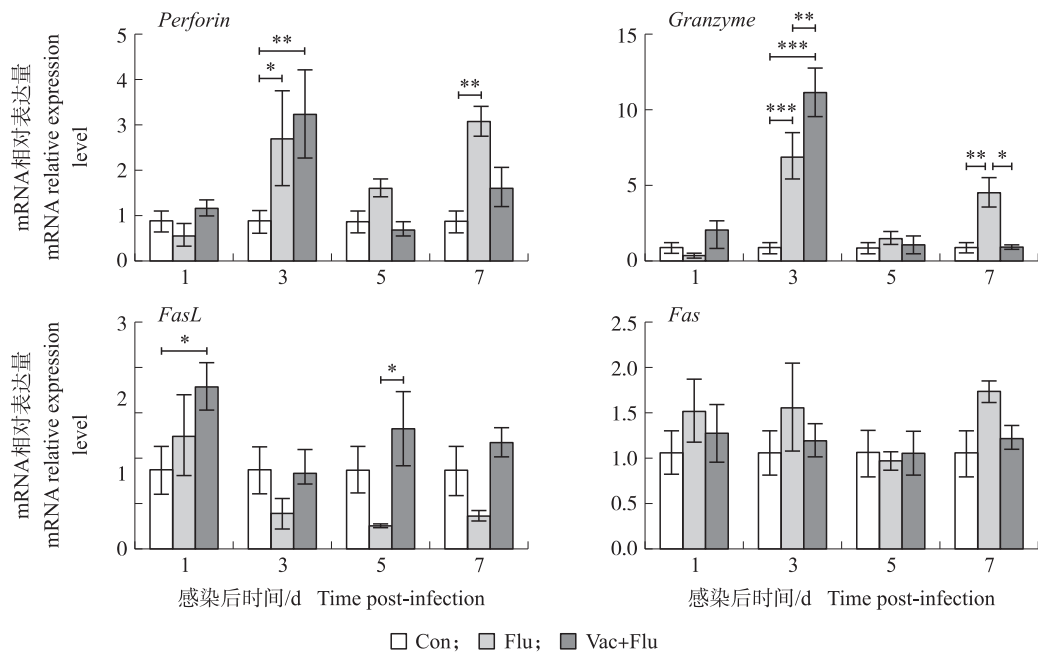


图 7 H9N2 AIV 灭活疫苗免疫后攻毒不同时间点肺组织中细胞毒性相关基因的表达

Fig. 7 The expression of cytotoxicity related genes in lung tissue at different time points after immunization with H9N2 AIV inactivated vaccine and followed by viral infection

3 讨论

H9N2 AIV 感染对家禽养殖业影响巨大,而疫苗接种仍然是控制和预防 AIV 在家禽中传播的最有效方法。目前,大多数商用禽流感疫苗是全病毒灭活疫苗^[16]。但灭活疫苗只能刺激体液免疫,无法有效抑制禽流感病毒在群体中的复制和传播^[8]。禽流感灭活疫苗免疫后血清中 HI 抗体滴度是反映免疫效果的重要指标。本研究结果表明 SPF 鸡接种灭活疫苗后 10 d 内 HI 抗体效价就可达到 6 以上。H9N2 AIV 在禽类之间可通过消化道或呼吸道传播^[17-18]。有研究发现,SPF 鸡提前接种 H9N2 AIV 灭活疫苗或 HA 突变体灭活苗,流感病毒感染后仍能在口咽、泄殖腔中检测到不同程度的病毒脱落^[19]。本研究结果表明,对 SPF 鸡提前进行免疫保护可减少病毒感染后经咽喉、泄殖腔的排毒,但仍不能完全阻断排毒。

有研究发现,提前接种 H9N2 灭活疫苗的鸡再感染 AIV 后,仍引起轻度肺炎,并在肺脏组织中检测到 H9 基因的表达^[20]。本试验中,免疫后攻毒组的 SPF 鸡肺间质有少量红细胞和炎性细胞聚集,但与攻毒组相比气管、肺组织结构破坏较轻,说明 H9N2 AIV 灭活疫苗能减轻流感病毒感染后导致的气管、肺脏组织结构损伤。本试验结果与先前的研究一致:免疫后再攻毒通过 RT-PCR 能检测到肺组织中流感病毒 M 基因的表达。免疫组化与 RT-PCR 结果一致,免疫后再攻毒在肺组织中出现病毒特异性抗原 NP 阳性信号。

这可能与接种灭活疫苗后不产生 IgA 和 IgM, 仅出现高水平的 IgG, 且 IgG 不能转运到肺部有关^[21]。

已有研究表明, 疫苗免疫后促进外周血淋巴细胞(PBL)中 CD4⁺T 细胞百分比的增加, 而没有促进 CD8⁺T 细胞百分比的增加^[16]。本试验中, 只病毒感染促进肺组织中 CD8 mRNA 表达量的上调, 而免疫后病毒感染则促进肺组织中 CD4 mRNA 表达量的上调。说明在肺组织中, 疫苗免疫更易诱导 CD4⁺T 细胞反应。Th1、Th2 细胞及其产生的细胞因子对调节细胞内外病原体引起的免疫应答反应至关重要^[13]。本研究发现, 免疫后攻毒能够增加肺组织中 Th2 细胞转录因子及 Th1、Th2 相关细胞因子的表达, 而只攻毒仅增加肺组织中 Th1 细胞转录因子及相关细胞因子的表达, 对 Th2 细胞转录因子及相关细胞因子的表达未产生明显影响。因此, 明确疫苗免疫后攻毒对 SPF 鸡肺组织免疫相关细胞因子表达的影响对完善 H9N2 灭活疫苗的免疫效果提供研究思路及方向。

有研究者发现, 在巨噬细胞中, H9N2 感染 10 h 后 *FasL* 基因表达量上调 25.1 倍^[22]。本试验中, 攻毒组鸡肺脏中 *FasL* 基因表达量与对照组相比未出现显著差异。有研究者通过全基因组宿主基因表达分析, 发现鸡感染 H5N1 病毒会引起肺组织中与炎症和免疫反应相关基因表达水平的强烈变化, 但是在感染 H9N2 病毒的鸡肺组织中大多数这些基因的表达水平保持不变^[23]。由此可见, 病毒毒株的强弱、检测样本或取样时间点的不同可能会导致结果出现差异。本研究发现, 病毒感染后鸡肺组织 *Perforin* 和 *Granzyme* 基因表达量均显著上调, 免疫后攻毒组中肺组织 *FasL* 基因表达量显著上调, 而 *Fas* 基因表达量在各组肺组织中无显著差异变化。以上结果提示, 病毒感染肺脏后, 病毒主要通过穿孔素/颗粒酶途径引起细胞毒性反应介导流感病毒在肺组织中的清除。

综上, SPF 鸡接种灭活疫苗后再进行 H9N2 AIV 感染, 易引起肺组织中 Th2、Th1 细胞因子的产生, 以促进抗体的产生, 诱导体液免疫应答。但是免疫后攻毒组 SPF 鸡肺组织在前期通过穿孔素/颗粒酶途径引起细胞毒性反应能力较强, 后期减弱, 这可能是导致灭活疫苗免疫保护不足的部分原因。这些发现进一步解释了 H9N2 AIV 灭活疫苗在肺组织中发挥免疫作用的机制及可能导致免疫保护不足的原因, 但是疫苗免疫对 T 细胞分化通路的具体影响仍需进一步研究。

参考文献 References:

- [1] Lao G J, Ma K X, Qiu Z W, et al. Real-time visualization of the infection and replication of a mouse-lethal recombinant H9N2 avian influenza virus[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 849178.
- [2] Sikht F Z, Ducatez M, Touzani C D, et al. Avian influenza a H9N2 viruses in Morocco, 2018–2019[J]. *Viruses*, 2022, 14(3): 529.
- [3] 蒋作仪, 李丽, 李茵婧, 等. 自噬在 H9N2 亚型禽流感病毒和大肠杆菌共感染中的作用研究[J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55(2): 91–102.
Jiang Z Y, Li L, Li Y J, et al. Role of autophagy in the pathogenicity caused by co-infection with H9N2 avian influenza virus and *Escherichia coli*[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 55(2): 91–102 (in Chinese with English abstract).
- [4] Fallah Mehrabadi M H, Ghalyanchilangeroudi A, Ghafouri S A, et al. Comparison of autogenous and commercial H9N2 avian influenza vaccines in a challenge with recent dominant virus[J]. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 2020, 21(2): 109–114.
- [5] Seo S H, Webster R G. Cross-reactive, cell-mediated immunity and protection of chickens from lethal H5N1 influenza virus infection in Hong Kong poultry markets[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(6): 2516–2525.
- [6] La Gruta N L, Turner S J. T cell mediated immunity to influenza: mechanisms of viral control[J]. *Trends in Immunology*, 2014, 35(8): 396–402.
- [7] 特列克·阿依恒别克, 赛福丁·阿不拉, 萨比热·热夏提, 等. 骆驼刺酸性多糖对小鼠脾脏淋巴细胞免疫增强作用的研究[J]. *南京农业大学学报*, 2022, 45(6): 1220–1226. DOI: 10.7685/jnau.202108009.
Telieke·Ayihengbieke, Saifuding·Abula, Sabire·Rexiati, et al. Study on the immune enhancement effect of acidic *Alhagi sparsifolia* shap polysaccharide on splenic lymphocytes of mice[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2022, 45(6): 1220–1226 (in Chinese with English abstract).
- [8] Wang T, Wei F H, Liu J H. Emerging role of mucosal vaccine in preventing infection with avian influenza A viruses[J]. *Viruses*, 2020, 12(8): 862.
- [9] Zhu J F, Paul W E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells[J]. *Cell Research*, 2010, 20(1): 4–12.
- [10] Belz G T, Wodarz D, Diaz G, et al. Compromised influenza virus-specific CD8(+)-T-cell memory in CD4(+)-T-cell-deficient mice[J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(23): 12388–12393.
- [11] Okoye I S, Wilson M S. CD4⁺T helper 2 cells-microbial triggers, differentiation requirements and effector functions[J]. *Immunology*, 2011, 134(4): 368–377.
- [12] Zhu W D, Wei L, Dong C H, et al. cGAMP-adjuvanted multivalent influenza mRNA vaccines induce broadly protective immunity through cutaneous vaccination in mice[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2022, 30: 421–437.

- [13] Dai M M, Xu C G, Chen W S, et al. Progress on chicken T cell immunity to viruses[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2019, 76(14): 2779–2788.
- [14] Wattrang E, Magnusson S E, Näslund K, et al. Expression of perforin, granzyme A and Fas ligand mRNA in caecal tissues upon *Eimeria tenella* infection of naïve and immune chickens[J]. Parasite Immunology, 2016, 38(7): 419–430.
- [15] 岳华, 黄兴, 杨发龙, 等. 荧光定量 RT-PCR 检测鸡 *CD4*、*CD8* 基因表达水平[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(6): 784–790.
Yue H, Huang X, Yang F L, et al. Development of real-time RT-PCR for detecting the expression level of *CD4* and *CD8* mRNA in chicken[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2008, 39(6): 784–790 (in Chinese with English abstract).
- [16] Dai M M, Li S B, Sun H, et al. Comparative analysis of key immune protection factors in H9N2 avian influenza viruses infected and immunized specific pathogen-free chicken[J]. Poultry Science, 2021, 100(1): 39–46.
- [17] Guan J W, Fu Q G, Chan M, et al. Aerosol transmission of an avian influenza H9N2 virus with a tropism for the respiratory tract of chickens[J]. Avian Diseases, 2013, 57(3): 645–649.
- [18] Jegede A, Fu Q G, Lin M, et al. Aerosol exposure enhanced infection of low pathogenic avian influenza viruses in chickens[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2019, 66(1): 435–444.
- [19] Fan M L, Liang B, Zhao Y Z, et al. Mutations of 127, 183 and 212 residues on the HA globular head affect the antigenicity, replication and pathogenicity of H9N2 avian influenza virus[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2022, 69(4): e659–e670.
- [20] Degen W G J, Smith J, Simmelink B, et al. Molecular immunophenotyping of lungs and spleens in naïve and vaccinated chickens early after pulmonary avian influenza A (H9N2) virus infection[J]. Vaccine, 2006, 24(35/36): 6096–6109.
- [21] 史之玉, 王飞. 鸡的黏膜免疫及其在鸡病防治中的应用[J]. 湖北畜牧兽医, 2006, 27(2): 35–36.
Shi Z Y, Wang F. Mucosal immunity of chickens and its application in the prevention and treatment of chicken diseases[J]. Hubei Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2006, 27(2): 35–36 (in Chinese).
- [22] Xing Z, Cardona C J, Adams S, et al. Differential regulation of antiviral and proinflammatory cytokines and suppression of Fas-mediated apoptosis by NS1 of H9N2 avian influenza virus in chicken macrophages[J]. Journal of General Virology, 2009, 90(5): 1109–1118.
- [23] Ranaware P B, Mishra A, Vijayakumar P, et al. Genome wide host gene expression analysis in chicken lungs infected with avian influenza viruses[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153671.

责任编辑: 周广礼