



蒲响林,潘仰栋,相权珈,等.巨型艾美耳球虫 Th1 类细胞因子刺激性分子 EmARM- β 对鸡 PBMC 和 T 细胞亚群免疫功能的影响[J].南京农业大学学报,2024,47(1):9-17.

PU Xianglin,PAN Yangdong, XIANG Quanjia, et al. Effects of EmARM- β , *Eimeria maxima* Th1 cytokine stimulatory molecule on immune function of chicken PBMC and T cell subsets[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(1): 9-17.

巨型艾美耳球虫 Th1 类细胞因子刺激性分子 EmARM- β 对鸡 PBMC 和 T 细胞亚群免疫功能的影响

蒲响林,潘仰栋,相权珈,孙晓婷,陆明敏,严若峰,徐立新,李祥瑞,宋小凯*

(南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]本文旨在探讨巨型艾美耳球虫 Th1 类细胞因子刺激性分子 Armadillo/ β -catenin 样重复序列蛋白(EmARM- β)对鸡免疫细胞功能的影响。[方法]利用密度梯度离心法和免疫磁珠分选法分别分离出鸡外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)、CD8⁺T 细胞和 CD4⁺CD25⁻T 细胞,之后将 EmARM- β 重组蛋白(rEmARM- β)分别与上述细胞进行体外共孵育 6 h,利用 CCK-8 试剂和 qPCR 法分别检测并分析其对上述细胞增殖能力及相关细胞因子分泌水平的影响。[结果]经免疫磁珠分选后,流式细胞术检测鸡 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺CD25⁻T 细胞的纯度分别为 93.01% 和 88.88%。与对照组相比,rEmARM- β 显著促进鸡 PBMC 的增殖能力,显著上调 Th1 类细胞因子(*ifn- γ* 和 *il-2*)和促炎性细胞因子(*il-1 β* 、*il-6* 和 *il-17a*) mRNA 水平;显著促进 CD8⁺T 细胞的增殖能力,显著上调其 *ifn- γ* 、*il-2* 和 *tnf- α* mRNA 水平,显著上调穿孔素、*fasl*(Fas 配体)和 *fas* mRNA 水平;能显著促进 CD4⁺CD25⁻T 细胞的增殖能力,显著上调其 *ifn- γ* 和 *il-2* mRNA 水平,下调 *il-4* 和 *il-10* mRNA 水平。[结论]EmARM- β 可以有效促进鸡 PBMC 和 T 细胞亚群(CD8⁺T 细胞和 CD4⁺CD25⁻T 细胞)的增殖能力,提升其 Th1 类细胞因子和促炎性细胞因子的分泌水平,提示 EmARM- β 具有研发鸡球虫病新型疫苗候选抗原的潜力。

关键词:巨型艾美耳球虫;Th1 类细胞因子刺激性分子;EmARM- β ;T 细胞亚群;免疫功能

中图分类号:S855.9⁺1

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)01-0009-09

Effects of EmARM- β , *Eimeria maxima* Th1 cytokine stimulatory molecule on immune function of chicken PBMC and T cell subsets

PU Xianglin, PAN Yangdong, XIANG Quanjia, SUN Xiaoting, LU Mingmin,
YAN Ruofeng, XU Lixin, LI Xiangrui, SONG Xiaokai*

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

Abstract:[Objectives] This study aimed to investigate the effect of Armadillo/ β -catenin like repeat containing protein (EmARM- β), a Th1 cytokine stimulatory molecule from *Eimeria maxima* on functions of chicken immune-related cells. [Methods] In this study, chicken peripheral blood mononuclear cell (PBMC), CD8⁺T cells, and CD4⁺CD25⁻T cells were isolated by density gradient cell centrifugation method and immunomagnetic bead sorting method, respectively. Subsequently, EmARM- β recombinant protein (rEmARM- β) was incubated with the above cells *in vitro*, CCK-8 solution and qPCR were used to detect and analyze the effects on the proliferation ability of the above cells and the secretion levels of cytokines, respectively. [Results] The results showed that purity of chicken CD8⁺T cells and CD4⁺CD25⁻T cells were 93.01% and 88.88%, respectively. rEmARM- β significantly enhanced the proliferation capacity, upregulated Th1 type cytokines (*ifn- γ* , and *il-2*) and proinflammatory cytokines (*il-1 β* , *il-6*, and *il-17a*) mRNA levels in chicken PBMC compared with the control group. Effective stimulations of rEmARM- β on the cell proliferation capacity and mRNA levels of *ifn- γ* , *il-2*, *tnf- α* , *perforin*, *fasl*, and *fas* in chicken CD8⁺T cells were also observed. The molecule significantly promoted cell proliferation capacity, upregulated the mRNA levels of *ifn- γ* and *il-2*, and downregulated the mRNA levels of *il-4* and *il-10* in chicken CD4⁺CD25⁻T cells. [Conclusions] EmARM- β , the Th1 cytokine stimulatory molecule, could effectively promote cell proliferation, secretions of Th1 cytokines and proinflammatory cytokines of chicken PBMC and T cell subsets, suggesting the EmARM- β is the potential candidate antigen to develop novel vaccine against chicken coccidiosis.

Keywords: *Eimeria maxima*; Th1 type cytokine stimulatory molecule; EmARM- β ; T cell subsets; immune function

收稿日期:2023-02-01

基金项目:广东省畜禽疫病防治重点实验室开放课题(YDWS202207);国家自然科学基金项目(31972705,32273034)

*通信作者:宋小凯,博士,教授,研究方向为兽医寄生虫病与免疫,E-mail:songxiaokai@njau.edu.cn。

鸡球虫病是由艾美耳球虫感染引起的一种肠道疾病^[1]。鸡球虫侵袭宿主肠道的不同部位^[2],破坏肠上皮细胞,导致饲料转化率降低、体重下降、血便等症状,甚至导致宿主死亡,同时还会抑制宿主免疫系统,引起继发感染,给养禽业带来了巨大经济损失^[3-6]。目前,鸡球虫病主要以药物防治为主^[7],但耐药性、药物残留、防治费用高等问题限制了药物的使用^[8-10]。虽然传统球虫活疫苗如 Coccivac 和 Immucox 等在世界范围内已经投入使用^[4,11],但其价格昂贵,难以推广,且具有导致球虫病暴发的风险^[12-13]。因此,开发安全有效的鸡球虫病新型疫苗迫在眉睫。

CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞可释放相关细胞因子,在抗鸡球虫感染过程中发挥重要作用。而相关研究表明,Th1 类细胞因子 IFN- γ 在鸡球虫保护性免疫中发挥着主导作用^[11,14],IFN- γ 可作为细胞因子佐剂增强抗原免疫力^[15],接种含有 IFN- γ 的 DNA 疫苗能提高鸡肠道免疫力水平并对鸡球虫病有保护作用^[16]。用重组 IFN- γ 处理鸡胚成纤维细胞后,柔嫩艾美耳球虫在细胞内的发育受到了抑制^[17]。体内接种重组 IFN- γ 后可有效减少堆型艾美耳球虫卵囊产量并增加雏鸡体重^[18]。IFN- γ 还可以刺激巨噬细胞的吞噬作用以及 NK 细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的杀伤作用,从而在调节抗球虫免疫反应过程中发挥重要作用^[19]。因此发现能刺激 Th1 类细胞因子分泌的分子是研发鸡球虫病新型疫苗的理想候选抗原。

Armadillo/ β -catenin 样重复序列蛋白(ARM- β)为果蝇体节极性蛋白 Armadillo 的同源物^[20],含有一个大约 42 个氨基酸的重复偶联序列^[21-22],在动物界普遍存在,其在信号传导、发育、细胞黏附和迁移以及肿瘤转移等方面发挥作用^[23]。对顶复门原虫研究发现其可激活宿主免疫反应,具有作为疫苗候选抗原的潜力。如 Udonsom 等^[24]发现犬新孢子虫 ARM 蛋白能被速殖子阳性牛血清所识别,具有显著的特异免疫反应性,提示其可作为防控犬新孢子虫病良好的疫苗候选抗原或药物靶标。Chen 等^[25]发现 EmARM- β 免疫雏鸡后,可抵抗巨型艾美耳球虫(*Eimeria maxima*, *E. maxima*)感染。

本课题组前期从 *E. maxima* 子孢子 cDNA 表达文库中筛选到了 EmARM- β ,发现其能刺激鸡体 Th1 类细胞因子的分泌,为进一步探究其对鸡免疫细胞功能的影响,将其分别与鸡 PBMC、CD8⁺T 细胞及 CD4⁺CD25⁻T 细胞进行共孵育,观察其对上述细胞增殖能力及免疫相关功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和试验动物 *E. maxima* pET-28a-arm- β 的菌种及重组质粒保存于南京农业大学兽医寄生虫病实验室。海兰白雏鸡饲养在经灭菌、消毒的无鸡球虫卵囊鸡舍中;自由饮水和采食;饮水及饲料均不含任何抗球虫药物。

1.1.2 主要试剂及仪器 His 标签蛋白纯化柱为 GE Healthcare 产品;人外周血淋巴细胞分离液购于天津灏洋公司;Total RNA Extraction Reagent 及 HiScript III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)购于 Vazyme 公司;PerfectStart™ Green qPCR Super Mix(+Dye II)购于 Transgen;ToxinEraser™ Endotoxin Removal Kit 为 GenScript 产品;小鼠抗鸡 CD4 和小鼠抗鸡 CD8 α 抗体购于 Southernbiotech 公司;Anti-PE MicroBeads, Anti-FITC MultiSort MicroBeads 和磁珠分选系统购于 Miltenyi Biotec;CCK-8 试剂购自碧云天公司;细胞培养箱、酶标仪和水平离心机购于 Thermo Scientific;荧光定量 PCR 仪为 ABI 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 EmARM- β 重组蛋白(rEmARM- β)的表达及纯化 用含有 pET-28a-arm- β 质粒的菌种表达 EmARM- β 重组蛋白,超声破碎菌体,获取蛋白样品。将蛋白样品依次用 0.8、0.45 和 0.22 μm 的滤器过滤后,使用 His 标签蛋白纯化柱纯化蛋白,再进行 SDS-PAGE 凝胶电泳以确定其纯化效果。用内毒素去除试剂盒去除蛋白样品中的内毒素,然后用 0.22 μm 的滤器过滤除菌,最后用 BCA 蛋白测定法测定重组蛋白浓度。

1.2.2 rEmARM- β 的 Western blot 验证 以 *E. maxima* 感染鸡血清(未感染鸡血清作为阴性对照)或 His-tag 小鼠单克隆抗体作为一抗,HRP 标记的山羊抗鸡 IgG 或 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 作为二抗,对重组蛋白进行 Western blot 验证。按如下操作,用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离 rEmARM- β ,将其转印至 PVDF 膜。50 g·L⁻¹ 脱脂奶粉对 PVDF 膜进行封闭后将其分别与感染鸡血清(1:100 稀释)和 His-tag 小鼠单克隆抗体(1:8 000 稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,然后将其分别与 HRP 标记的山羊抗鸡 IgG(1:5 000 稀释)和 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:10 000 稀释)室温孵育 1 h,滴加 ECL 发光液,在全自动发光成像系统中显影,观察结果。

1.2.3 鸡 PBMC 的分离及培养 用无菌采血管(含 4%枸橼酸钠)给健康雏鸡心脏采血,将抗凝血与无菌 PBS 按 1:1 比例(体积比)轻柔混合,将 5 mL 稀释鸡血沿管壁缓慢加入含有 5 mL 淋巴细胞分离液的 15 mL 离心管中,室温下 500 g 离心 20 min。吸取第 2 层乳白色淋巴细胞层,并转移至新的 15 mL 离心管中,用无菌 PBS 洗涤 2 次。最后用含有 10% FBS 和 1%青链霉素双抗的 RPMI 1640 完全培养基重悬细胞,计数细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。

1.2.4 鸡 CD8⁺T 细胞的磁珠分选 分离鸡 PBMC,用含有 0.5% BSA、2 mmol·L⁻¹ EDTA 的 PBS 调整细胞密度为 $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ (PBS 使用前需 4 °C 预冷),每 1 mL 加入 40 μL 藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)标记的小鼠抗鸡 CD8 α 荧光抗体,均匀混合后于 4 °C 避光孵育 30 min。每 1×10^8 个细胞加入 10~20 mL 的 PBS,混匀后 300 g 离心 10 min,洗去未结合的抗体。根据 Anti-PE MicroBeads 说明书加入二抗磁珠,于 4 °C 避光孵育 15 min,将 1×10^8 个细胞加入 10~20 mL 的 PBS,混匀后 300 g 离心 10 min,洗去未结合的抗体。用 PBS 重新调整细胞密度为 $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,根据磁珠分选系统说明书进行细胞磁珠分选,留在分选柱上的细胞为鸡 CD8⁺T 细胞,向分选柱中加入 5 mL PBS,并用针芯推尽液体,获得阳性细胞。

1.2.5 鸡 CD4⁺CD25⁻T 细胞的磁珠分选 将分离好的鸡 PBMC 用 PBS 调整细胞密度为 $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,每 1 mL 加入 40 μL FITC 标记的人抗鸡 CD25 荧光抗体,均匀混合后于 4 °C 避光孵育 30 min,再加入预冷的 PBS,混匀后 300 g 离心 10 min,洗去未结合的抗体。根据 Anti-FITC MultiSort Kit 说明书加入 Anti-FITC MultiSort MicroBeads,于 4 °C 避光孵育 15 min,用 PBS 洗去未结合的抗体。用 PBS 调整细胞密度为 $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,根据磁珠分选系统说明书进行细胞磁珠分选,留在分选柱上的细胞为鸡 CD25⁺细胞,流出细胞为鸡 CD25⁻细胞。用 PBS 将流出细胞调整细胞密度为 $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,根据说明书将 PE 标记的小鼠抗鸡 CD4 荧光抗体和 Anti-PE MicroBeads 二抗磁珠依次与细胞孵育后进行细胞磁珠分选,获得鸡 CD4⁺CD25⁻T 细胞。

1.2.6 流式细胞术检测细胞分选纯度 将空白细胞、分选前细胞和分选后细胞制成细胞悬液,用流式细胞仪对细胞悬液进行流式检测,检验细胞分选纯度。

1.2.7 rEmARM- β 对细胞增殖能力影响 用 RPMI 1640 完全培养基将分离的鸡 PBMC 以及分选后的鸡 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺CD25⁻T 细胞调整细胞密度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,然后铺到 96 孔细胞培养板上,每孔 100 μL 。将 rEmARM- β 以不同质量浓度(10、20、40 和 80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)与上述细胞共孵育,并设置 PBS 阴性对照组和 3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ConA 或 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 阳性对照组。将细胞培养板置于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中培养 24 h,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂,继续避光培养 4 h。同时设置只加入 10 μL CCK-8 试剂的 RPMI 1640 完全培养基作为对照组调零。将细胞培养板置于酶标仪,测定 450 nm 波长处的吸光值。细胞增殖指数以阴性对照组 D_{450} 值为 100% 进行计算。

1.2.8 qPCR 检测 rEmARM- β 对鸡 PBMC 相关细胞因子 mRNA 表达水平影响 将分离的鸡 PBMC 调整细胞密度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,铺于 12 孔细胞培养板,每孔 2 mL。将不同质量浓度的 rEmARM- β (10、20、40 和 80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)与鸡 PBMC 共孵育 6 h,并设置 PBS 阴性对照组和 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 阳性对照组。收集细胞,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,利用反转录试剂获取 cDNA。用于 qPCR 的细胞因子特异性引物由 NCBI 的 Primer-BLAST 设计,并以 β -actin 作为内参基因。特异性引物及其相关信息见表 1。根据说明书配制总体系为 10 μL 的 qPCR 反应体系,包括 2 \times PerfectStartTM Green qPCR Super Mix (+Dye II) 5 μL ,cDNA 模板 1 μL ,上、下游引物各 0.2 μL ,Rnase-free ddH₂O 3.6 μL 。反应程序为 94 °C 预变性 30 s;循环反应:94 °C 5 s,60 °C 30 s,40 个循环;熔解曲线建立程序:95 °C 15 s,60 °C 60 s,95 °C 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算细胞因子 mRNA 相对表达水平,分析 rEmARM- β 对鸡 PBMC 细胞因子 mRNA 表达水平的影响。

1.2.9 qPCR 检测 rEmARM- β 对鸡 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺CD25⁻T 细胞细胞因子 mRNA 表达水平影响 将 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ rEmARM- β 与 3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ConA 共刺激鸡 CD8⁺T 细胞或 CD4⁺CD25⁻T 细胞,并设置 ConA+PBS 阴性对照组和 ConA+2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 阳性对照组。于 5% CO₂ 细胞培养箱中 37 °C 培养 6 h,收集细胞,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,反转录为 cDNA,进行 qPCR 检测。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算细胞因子 mRNA 相对表达水平,分析 rEmARM- β 对鸡 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺CD25⁻T 细胞相关细胞因子 mRNA 表达水平的影响。特异性引物及其相关信息见表 1。

1.2.10 qPCR 检测 rEmARM- β 对鸡 CD8⁺T 细胞介导细胞杀伤相关基因 mRNA 表达水平影响 操作步骤同 1.2.9 节,将收集到的细胞用 Trizol 法提取细胞总 RNA,反转录为 cDNA,进行 qPCR 检测。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算介导细胞杀伤相关基因 mRNA 相对表达水平,分析 rEmARM- β 对鸡 CD8⁺T 细胞介导细胞杀伤相关

基因 mRNA 表达水平的影响。特异性引物及其相关信息见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for the quantitative real-time PCR

目的基因 RNA target	引物对序列 Primer sequence (5'→3')	序列号 Accession No.	产物大小/bp Length of product
<i>β-actin</i>	GCCAACAGAGAGAAGATGACAC/GTAACACCATCACCAGAGTCCA	NM_205518	140
<i>ifn-γ</i>	ATCATACTGAGCCAGATTGTTTCG/TCTTTACCTTCTTCACGCCAT	Y07922	140
<i>il-1β</i>	CAGCAGCCTCAGCGAAGAG/CTGTGGTGTGCTCAGAATCCA	NM_204524	86
<i>il-2</i>	TTCATCTCGAGCTCTACACCCAA/TGTCATCTTCAGTTTCTTCTTCAGAGT	NM_204153	108
<i>il-4</i>	AGCACTGCCACAAGAACCCTG/CCTGCTGCCGTGGGACAT	NM_001007079	100
<i>il-6</i>	GCGAGAACAGCATGGAGATG/GTAGGTCTGAAAGGCCGAACAG	NM_204628	143
<i>il-10</i>	CTTTGCTGCCAGTCTGTGTC/GCTCTGCTGATGACTGGTCT	NM_001004414	94
<i>il-17a</i>	CGATGAGGACCACAACCGCTTC/TGTTTGTATGGGCACGGAGTTGAC	NM_204460	117
<i>tgf-β1</i>	GCCGACACGCAGTACACCAA/TGCAGGCACGGACCACCAT	M31160	169
<i>tnf-α</i>	AGTTCAGATGAGTTGCCCTTCCTG/TTCAGAGCATCAACGCCAAAAGGGA	XM_015294124	153
<i>pf</i>	GCAAAGCCAAATCCAAAAC/GACAATAGAGGCGACCAACC	XM_046929135	176
<i>gram-a</i>	GGAGGCAGAGTTATTCTTGGAGC/TTTCGGGACAGTAGTCTGGGTAG	NM_204457	106
<i>fasl</i>	TAACAGGAAACCCACACAGC/CCGGAAGAGCACATTGGAGTA	AJ890143	149
<i>fas</i>	TGTTCCGTCATCACCCTCTATCG/TTCGTAGGCTCCTCCATTCC	NM_001199487	133

注: *β-actin*: β-肌动蛋白基因 Beta actin gene; *ifn-γ*: γ-干扰素基因 Interferon-γ gene; *il-1β*: 白细胞介素 1β 基因 Interleukin-1β gene; *il-2*: 白细胞介素 2 基因 Interleukin-2 gene; *il-4*: 白细胞介素 4 基因 Interleukin-4 gene; *il-6*: 白细胞介素 6 基因 Interleukin-6 gene; *il-10*: 白细胞介素 10 基因 Interleukin-10 gene; *il-17a*: 白细胞介素 17A 基因 Interleukin-17A gene; *tgf-β1*: 转化生长因子 β1 基因 Transforming growth factor-β1 gene; *tnf-α*: 肿瘤坏死因子 α 基因 Tumor necrosis factor-α gene; *pf*: 穿孔素基因 Perforin gene; *gram-a*: 颗粒酶 A 基因 Granzyme A gene; *fasl*: CD95 配体基因 CD95 ligand gene; *fas*: CD95 受体基因 CD95 receptor gene.

1.3 数据的统计分析

使用 SPSS 23.0 系统软件进行统计和分析, 采用 one-way ANOVA Duncan's 法对各组进行组间差异分析。

2 结果与分析

2.1 重组蛋白 EmARM-β 的表达、纯化及 Western blot 验证

对重组蛋白 EmARM-β 进行表达, 其表达情况如图 1-A 所示, 重组蛋白为可溶性蛋白, 且随着时间的延长, 其表达量越来越高。用 His 标签蛋白纯化柱对 rEmARM-β 进行纯化, 将纯化前及纯化后蛋白样品进行 SDS-PAGE, 结果如图 1-B。从图中可以看出: rEmARM-β 在相对分子质量 25×10^3 左右出现单一清晰的条带, 与预期蛋白相对分子质量一致, 表明蛋白纯化效果良好。

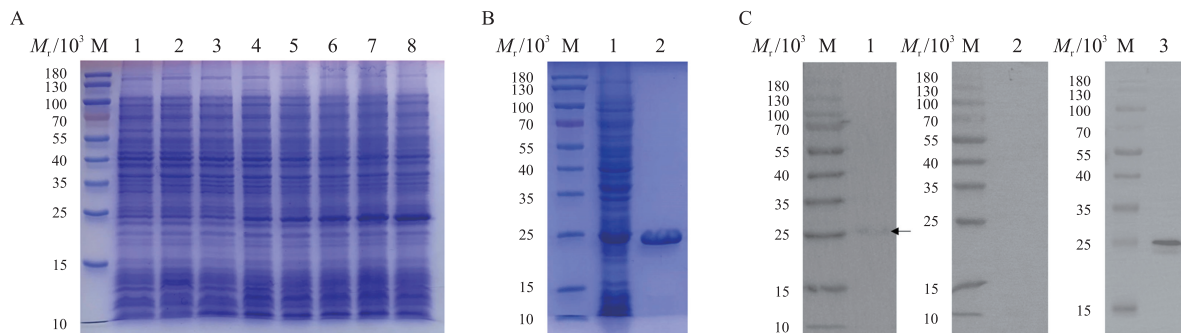


图 1 rEmARM-β 的表达、纯化及 Western blot 验证

Fig. 1 The expression, purification, and Western blot identification of rEmARM-β

A. rEmARM-β 的表达 (M. 标准分子质量蛋白; 1~2. pET-28a 诱导表达 0 和 5 h 后产物; 3~8. rEmARM-β 诱导表达 0~5 h 后产物)。B. rEmARM-β 的纯化 (M. 标准分子质量蛋白; 1. rEmARM-β 纯化前; 2. rEmARM-β 纯化后)。C. rEmARM-β 的 Western blot 验证 (M. 标准分子质量蛋白; 1. *E. maxima* 感染鸡血清识别 rEmARM-β; 2. 阴性鸡血清识别 rEmARM-β; 3. His-tag 小鼠单克隆抗体识别 rEmARM-β)。

A. The expression of rEmARM-β (M. Standard protein molecular marker; 1~2. pET-28a induced by IPTG for 0 and 5 h; 3~8. EmARM-β induced by IPTG for 0~5 h). B. The purification of rEmARM-β (M. Standard protein molecular marker; 1. rEmARM-β before purification; 2. Purified rEmARM-β). C. The Western blot identification of rEmARM-β (M. Standard protein molecular marker; 1. The recognition of rEmARM-β by chicken anti-*E. maxima* serum; 2. The recognition of rEmARM-β by negative chicken serum; 3. The recognition of His-tag in rEmARM-β by His-tag mouse monoclonal antibody).

分别使用巨型艾美耳球虫感染鸡血清和 His-tag 小鼠单克隆抗体识别 rEmARM-β,从 Western blot 结果(图 1-C)可以看出:感染鸡血清识别出 1 条相对分子质量为 25×10^3 左右的条带(泳道 1),这与 rEmARM-β 的相对分子质量一致;同时 His-tag 小鼠单克隆抗体也识别出 1 条相对分子质量为 25×10^3 左右的条带(泳道 3);作为对照,未感染鸡血清并没有识别出 rEmARM-β(泳道 2)。

2.2 鸡 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺CD25⁻T 细胞的磁珠分选

如图 2 所示:分选前 CD8⁺T 细胞占总外周血单个核细胞的比例为 16.34%(A2),细胞分选后,比例提高为 93.01%(A3);分选前 CD4⁺CD25⁻T 细胞占总外周血单个核细胞的比例为 12.14%(B2),细胞分选后,比例提高为 88.88%(B3),基本符合后续细胞共孵育试验。

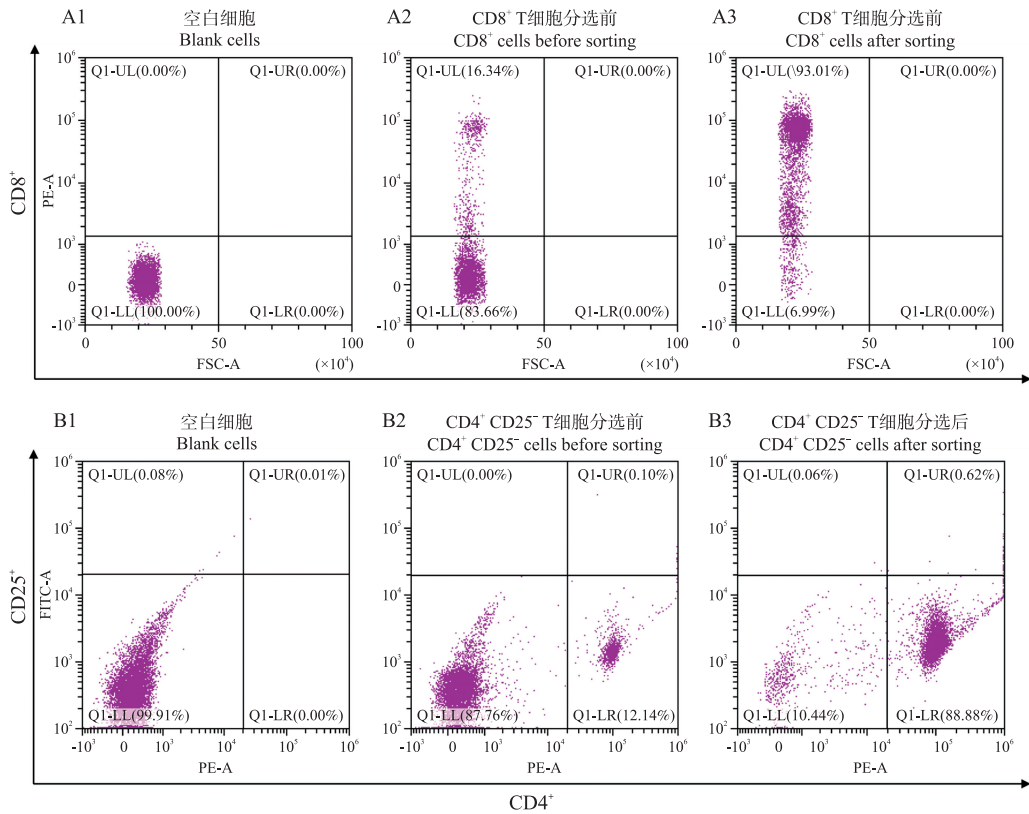


图 2 鸡 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺CD25⁻T 细胞磁珠分选的流式细胞术验证

Fig. 2 Verification of magnetic bead sorting of chicken CD8⁺T cells and CD4⁺CD25⁻T cells by flow cytometry

A1. 空白细胞(总 PBMC);A2. 鸡 CD8⁺T 细胞分选前;A3. 鸡 CD8⁺T 细胞分选后。B1. 空白细胞(总 PBMC);B2. CD4⁺CD25⁻T 细胞分选前;B3. CD4⁺CD25⁻T 细胞分选后。

A1. Blank cells(total PBMC);A2. CD8⁺T cells before sorting;A3. CD8⁺T cells after sorting. B1. Blank cells(total PBMC);B2. CD4⁺CD25⁻T cells before sorting;B3. CD4⁺CD25⁻T cells after sorting.

2.3 rEmARM-β 对细胞增殖能力的影响

细胞增殖能力检测结果如图 3 所示:与阴性对照 PBS 组相比,阳性对照 ConA 组能显著促进鸡 PBMC、CD8⁺T 细胞及 CD4⁺CD25⁻T 细胞的增殖能力($P < 0.05$)。80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ rEmARM-β 能显著促进鸡 PBMC 的增殖能力($P < 0.05$);rEmARM-β 在各浓度均能显著促进鸡 CD8⁺T 细胞及 CD4⁺CD25⁻T 细胞的增殖($P < 0.05$),且增殖能力随浓度的增加而逐渐加强。

2.4 rEmARM-β 对鸡 PBMC 细胞因子 mRNA 表达水平的影响

如图 4 所示:与阴性对照 PBS 组相比,rEmARM-β 均可以显著上调鸡 PBMC *ifn-γ*、*il-1β*、*il-2*、*il-4*、*il-6*、*il-10*、*il-17a* 和 *tgf-β1* mRNA 表达水平($P < 0.05$)。

2.5 rEmARM-β 对鸡 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺CD25⁻T 细胞细胞因子 mRNA 表达水平的影响

如图 5 所示:与阴性对照 PBS+ConA 组相比,rEmARM-β 可以显著上调鸡 CD8⁺T 细胞 *ifn-γ*、*il-2* 和 *tnf-α* mRNA 表达水平($P < 0.05$)(图 5-A),显著上调鸡 CD4⁺CD25⁻T 细胞 *ifn-γ*、*il-2* 和 *tgf-β1* mRNA 表达水平,显著下调 *il-4* 和 *il-10* mRNA 表达水平($P < 0.05$)(图 5-B)。

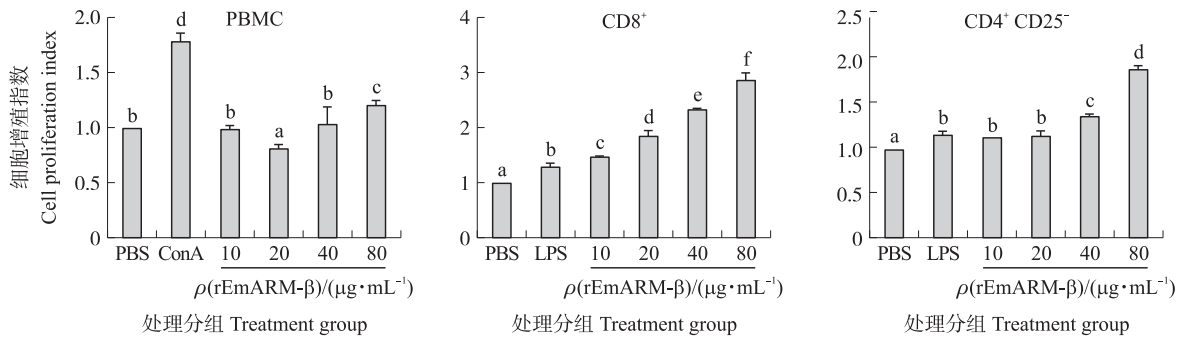


图 3 rEmARM-β 对鸡 PBMC 和 T 细胞亚群增殖能力的影响

Fig. 3 Effects of rEmARM-β on proliferation of PBMC and T cell subsets

PBS: 阴性对照组; ConA (LPS): 阳性对照组。采用 one-way ANOVA Duncan's 法对各组进行组间差异分析, 字母不相同表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

PBS: Negative control group; ConA (LPS): Positive control group. Differences among groups were analyzed by one-way ANOVA Duncan's method; the different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same below.

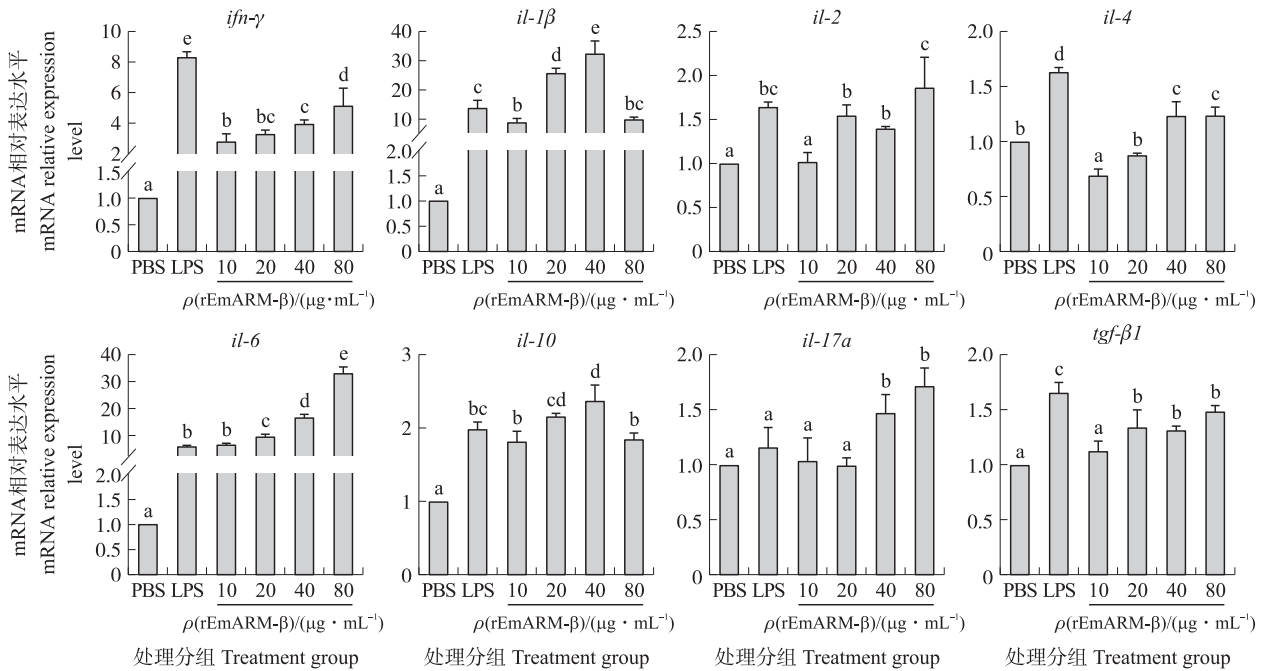


图 4 rEmARM-β 对鸡 PBMC Th1、Th2、Treg 类以及促炎性细胞因子 mRNA 水平的影响

Fig. 4 Effects of rEmARM-β on the mRNA levels of Th1, Th2, Treg and proinflammatory cytokines in chicken PBMC

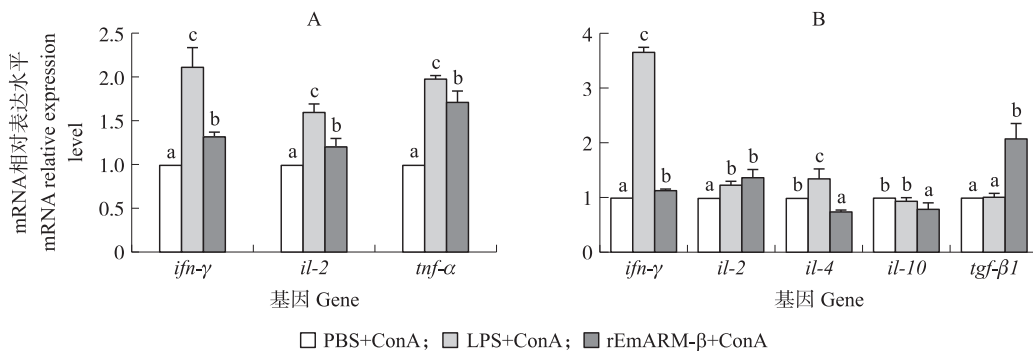


图 5 rEmARM-β 对鸡 CD8⁺ T 细胞 (A) 和 CD4⁺ CD25⁻ T 细胞 (B) 细胞因子 mRNA 水平的影响

Fig. 5 Effects of rEmARM-β on the mRNA levels of cytokines in chicken CD8⁺ T cells (A) and CD4⁺ CD25⁻ T cells (B)

PBS+ConA: 阴性对照组 Negative control group; LPS+ConA: 阳性对照组 Positive control group.

2.6 rEmARM-β 对鸡 CD8⁺T 细胞介导细胞杀伤相关基因 mRNA 表达水平的影响

结果如图 6 所示:与阴性对照 PBS+ConA 组相比,rEmARM-β 可以显著上调鸡 CD8⁺T 细胞穿孔素(*pf*)、*fasl* 和 *fas* 基因 mRNA 表达水平($P < 0.05$),对颗粒酶 A 基因(*gram-a*)mRNA 表达水平差异不显著($P > 0.05$)。

3 讨论

鸡球虫病严重威胁家禽的生产福利,对家禽养殖业造成了巨大的经济损失^[5,26]。在抗鸡球虫感染过程中,细胞免疫发挥着主导作用^[27-28],细胞免疫主要由 T 淋巴细胞、NK 细胞等介导,而 CD4⁺辅助性 T 细胞(Th 细胞)和 CD8⁺细胞毒性 T 细胞(CTL)均参与宿主抗鸡球虫感染免疫反应并发挥着重要的作用^[29],通过其细胞增殖试验或细胞亚群比例可以初步确定鸡球虫病疫苗的免疫保护效果。CD4⁺T 细胞可通过分泌细胞因子激活 NK 细胞和巨噬细胞以及自身分泌 IFN-γ 以抵抗艾美耳球虫感染^[30];激活的 CD8⁺T 细胞可通过细胞杀伤作用以及分泌 IFN-γ 和 TNF-α 等在球虫感染过程中起作用^[11,31]。给雏鸡注射抗 CD8 单克隆抗体后再感染 *Eimeria tenella* 和 *Eimeria acervulina*,发现卵囊排出量明显增加^[32]。用抗 CD4 单克隆抗体处理雏鸡后再感染球虫,同样出现卵囊排出量大幅增加,病变加重等现象^[27]。本研究将 rEmARM-β 分别与鸡 PBMC、CD8⁺T 细胞及 CD4⁺CD25⁻T 细胞进行共孵育,发现上述细胞增殖能力均得到显著促进,说明 EmARM-β 可以有效激活免疫反应。CTL 可以通过 FasL/Fas 和穿孔素/颗粒酶两条途径介导细胞杀伤,而 rEmARM-β 可以显著上调鸡 CD8⁺T 细胞穿孔素(*pf*)、*fasl* 和 *fas* 基因 mRNA 表达水平,说明其还可以有效促进鸡 CD8⁺T 细胞介导的细胞杀伤功能。

Th1 类细胞因子主要由活化的 CD4⁺Th1 细胞和 CD8⁺T 细胞分泌^[19,33]。在鸡球虫感染过程中,NK 细胞分泌 IFN-γ 及树突状细胞(DC)和巨噬细胞分泌 IL-12,从而诱导 Th1 细胞分化,Th1 细胞进一步分泌 IFN-γ、IL-2 等细胞因子介导细胞免疫,抵抗球虫感染^[11,19,34-35]。因此 Th1 类细胞因子及其介导的 Th1 型免疫反应被认为在抵抗鸡球虫感染中起主要作用^[36-37]。在鸡球虫感染过程中,Th2、Th17 以及 Treg 型等免疫反应在肠道免疫反应中也发挥着重要作用^[14,38]。IL-4 主要由 Th2 细胞分泌,可以促进 Th2 细胞的分化^[39]。除此之外,促炎性细胞因子 IL-1β、IL-6、IL-17A 等可以招募炎性细胞,参与炎症反应,并促进 Th17 细胞的分化,参与 Th17 型免疫反应,有助于机体对球虫做出反应并消除虫体^[40-43]。本研究中,rEmARM-β 可以显著促进鸡 PBMC、CD8⁺T 细胞及 CD4⁺CD25⁻T 细胞 Th1 类细胞因子 *ifn-γ* 和 *il-2* mRNA 表达水平,可以显著促进鸡 PBMC 促炎性细胞因子(*il-1β*、*il-6* 和 *il-17a*)mRNA 表达水平,证实了其刺激 Th1 类细胞因子和促炎性细胞因子分泌的作用。

CD4⁺T 细胞由 Th1、Th2、Th9、Th17、Treg(调节性 T 细胞)和 Tfh(滤泡辅助性 T 细胞)等亚型细胞组成,每种亚型细胞都可以分泌不同类型的细胞因子来帮助机体应对病原体的侵犯^[44]。而辅助性 T 细胞一般指不表达 CD25 分子的 CD4 细胞,即 CD4⁺CD25⁻T 细胞。鸡体内的 CD4⁺CD25⁺T 细胞是一种调节性 T 细胞,其功能为具有免疫抑制作用的免疫细胞,同哺乳动物一样,这些细胞分泌大量的 IL-10 和 TGF-β 等 Treg 类分子^[45]。研究表明,低水平的 IL-10 会增强宿主抵抗病原体的能力^[46-47],高水平的 IL-10 可抑制 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺T 细胞的活化与增殖^[48-49]。在本研究中,利用免疫磁珠分选技术消除掉 CD25⁺细胞,将 rEmARM-β 与 CD4⁺CD25⁻T 细胞共孵育后,发现 CD4⁺CD25⁻T 细胞的增殖受到促进,*il-10* mRNA 表达水平受到抑制的现象。有些原虫感染可能已经进化到刺激 Treg 细胞高分泌 IL-10,进一步抑制 IFN-γ 介导的 T 细胞反应和巨噬细胞分泌 NO,从而抑制宿主抵抗原虫感染^[50-53]。rEmARM-β 与 CD4⁺CD25⁻T 细胞共孵育后,显著促进了 *ifn-γ* 和 *il-2* 等 Th1 类细胞因子的 mRNA 表达水平而抑制了 *il-10* mRNA 表达水平,进一步验证了其刺激 Th1 类细胞因子分泌的作用。

本研究证实 EmARM-β 能有效促进鸡 PBMC 和 T 细胞亚群免疫功能,具有研发鸡球虫病新型疫苗候选抗原的潜力。

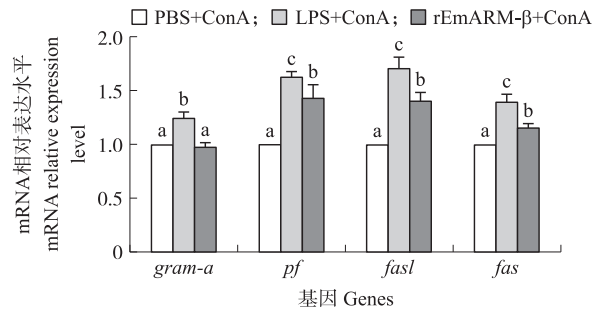


图 6 rEmARM-β 对鸡 CD8⁺T 细胞介导细胞杀伤相关基因 mRNA 水平影响

Fig. 6 Effects of rEmARM-β on the mRNA levels of mediated cell killing genes in chicken CD8⁺T cells

参考文献 References:

- [1] Rose M E, Hesketh P. Immunity to coccidiosis: T-lymphocyte- or B-lymphocyte-deficient animals[J]. *Infection and Immunity*, 1979, 26(2): 630-637.
- [2] El-Shall N A, Abd El-Hack M E, Albaqami N M, et al. Phytochemical control of poultry coccidiosis; a review[J]. *Poultry Science*, 2022, 101(1): 101542.
- [3] Blake D P. *Eimeria* genomics; where are we now and where are we going? [J]. *Veterinary Parasitology*, 2015, 212(1/2): 68-74.
- [4] Blake D P, Tomley F M. Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge[J]. *Trends in Parasitology*, 2014, 30(1): 12-19.
- [5] Fatoba A J, Adeleke M A. Diagnosis and control of chicken coccidiosis; a recent update[J]. *Journal of Parasitic Diseases*, 2018, 42(4): 483-493.
- [6] Blake D P, Knox J, Dehaeck B, et al. Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens[J]. *Veterinary Research*, 2020, 51(1): 115.
- [7] Chapman H D, Jeffers T K. Vaccination of chickens against coccidiosis ameliorates drug resistance in commercial poultry production[J]. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2014, 4(3): 214-217.
- [8] Clarke L, Fodey T L, Crooks S R, et al. A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food[J]. *Meat Science*, 2014, 97(3): 358-374.
- [9] Allen P C, Fetterer R H. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, 15(1): 58-65.
- [10] Pop L M, Varga E, Coroian M, et al. Efficacy of a commercial herbal formula in chicken experimental coccidiosis[J]. *Parasites & Vectors*, 2019, 12(1): 343.
- [11] Dalloul R A, Lillehoj H S. Poultry coccidiosis; recent advancements in control measures and vaccine development [J]. *Expert Review of Vaccines*, 2006, 5(1): 143-163.
- [12] Chen Y F, Tian D, Xu L X, et al. Rhomboid protein 2 of *Eimeria maxima* provided partial protection against infection by homologous species[J]. *Veterinary Research*, 2021, 52(1): 29.
- [13] Quiroz-Castañeda R E, Dantán-González E. Control of avian coccidiosis; future and present natural alternatives[J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 430610.
- [14] Kim W H, Chaudhari A A, Lillehoj H S. Involvement of T cell immunity in avian coccidiosis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2732.
- [15] Lillehoj H S, Ding X C, Quiroz M A, et al. Resistance to intestinal coccidiosis following DNA immunization with the cloned 3-1E *Eimeria* gene plus IL-2, IL-15, and IFN-gamma[J]. *Avian Diseases*, 2005, 49(1): 112-117.
- [16] Song X, Huang X, Yan R, et al. Efficacy of chimeric DNA vaccines encoding *Eimeria tenella* 5401 and chicken IFN- γ or IL-2 against coccidiosis in chickens[J]. *Experimental Parasitology*, 2015, 156: 19-25.
- [17] Lillehoj H S, Choi K D. Recombinant chicken interferon-gamma-mediated inhibition of *Eimeria tenella* development *in vitro* and reduction of oocyst production and body weight loss following *Eimeria acervulina* challenge infection[J]. *Avian Diseases*, 1998, 42(2): 307-314.
- [18] Lowenthal J W, York J J, O'Neil T E, et al. *In vivo* effects of chicken interferon-gamma during infection with *Eimeria*[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research; the Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 1997, 17(9): 551-558.
- [19] Lillehoj H S. Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis[J]. *International Journal for Parasitology*, 1998, 28(7): 1071-1081.
- [20] Riggelman B, Wieschaus E, Schedl P. Molecular analysis of the armadillo locus; uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene[J]. *Genes & Development*, 1989, 3(1): 96-113.
- [21] Peifer M, Berg S, Reynolds A B. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles[J]. *Cell*, 1994, 76(5): 789-791.
- [22] Huber A H, Nelson W J, Weis W I. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin[J]. *Cell*, 1997, 90(5): 871-882.
- [23] Li X, Liu B, Ji C N, et al. Cloning and expression of *ARMC3_v2*, a novel splicing variant of human *ARMC3* gene[J]. *Russian Journal of Genetics*, 2006, 42(7): 824-828.
- [24] Udonsom R, Reamtong O, Adisakwattana P, et al. Immunoproteomics to identify species-specific antigens in *Neospora caninum* recognised by infected bovine sera[J]. *Parasite (Paris, France)*, 2022, 29: 60.
- [25] Chen C, Zhang Y, Liu J, et al. An *Eimeria maxima* antigen; its functions on stimulating Th1 cytokines and protective efficacy against coccidiosis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 872015.
- [26] Gilbert W, Bellet C, Blake D P, et al. Revisiting the economic impacts of *Eimeria* and its control in European intensive broiler systems with a recursive modeling approach[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 558182.
- [27] Trout J M, Lillehoj H S. T lymphocyte roles during *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1996, 53(1/2): 163-172.
- [28] Rose M E, Hesketh P, Wakelin D. Immune control of murine coccidiosis: CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes contribute differentially in resistance to primary and secondary infections[J]. *Parasitology*, 1992, 105(3): 349-354.
- [29] Min W, Kim W H, Lillehoj E P, et al. Recent progress in host immunity to avian coccidiosis; IL-17 family cytokines as sentinels of the intestinal mucosa[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 41(3): 418-428.
- [30] Bessay M, Le Vern Y, Kerboeuf D, et al. Changes in intestinal intra-epithelial and systemic T-cell subpopulations after an *Eimeria* infection in

- chickens; comparative study between *E. acervulina* and *E. tenella*[J]. *Veterinary Research*,1996,27(4/5):503-514.
- [31] Vermeulen A N. Progress in recombinant vaccine development against coccidiosis A review and prospects into the next millennium [J]. *International Journal for Parasitology*,1998,28(7):1121-1130.
- [32] Lillehoj H S, Kim C H, Keeler C L, Jr, et al. Immunogenomic approaches to study host immunity to enteric pathogens[J]. *Poultry Science*,2007,86(7):1491-1500.
- [33] Lee Y, Lu M M, Lillehoj H S. Coccidiosis: recent progress in host immunity and alternatives to antibiotic strategies[J]. *Vaccines*,2022,10(2):215.
- [34] Lillehoj H S, Trout J M. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites[J]. *Clinical Microbiology Reviews*,1996,9(3):349-360.
- [35] Truong A D, Hoang C T, Hong Y, et al. Functional analyses of the interaction of chicken interleukin 23 subunit p19 with IL-12 subunit p40 to form the IL-23 complex[J]. *Molecular Immunology*,2017,92:54-67.
- [36] Cornelissen J B, Swinkels W J, Boersma W A, et al. Host response to simultaneous infections with *Eimeria acervulina*, *maxima* and *tenella*: a cumulation of single responses[J]. *Veterinary Parasitology*,2009,162(1/2):58-66.
- [37] Shah M A, Song X, Xu L, et al. Construction of DNA vaccines encoding *Eimeria acervulina* cSZ-2 with chicken IL-2 and IFN- γ and their efficacy against poultry coccidiosis[J]. *Research in Veterinary Science*,2011,90(1):72-77.
- [38] Lillehoj H S, Min W, Dalloul R A. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*[J]. *Poultry Science*,2004,83(4):611-623.
- [39] Zheng W, Flavell R A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells[J]. *Cell*,1997,89(4):587-596.
- [40] Hong Y H, Lillehoj H S, Lillehoj E P, et al. Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following *Eimeria maxima* infection of chickens[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*,2006,114(3/4):259-272.
- [41] Waititu S M, Yitbarek A, Matini E, et al. Effect of supplementing direct-fed microbials on broiler performance, nutrient digestibilities, and immune responses[J]. *Poultry Science*,2014,93(3):625-635.
- [42] Pappu R, Rutz S, Ouyang W J. Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines[J]. *Trends in Immunology*,2012,33(7):343-349.
- [43] Park I, Oh S, Goo D, et al. Effect of dietary sophorolipids on growth performance and gastrointestinal functionality of broiler chickens infected with *Eimeria maxima*[J]. *Poultry Science*,2022,101(7):101944.
- [44] Zhu J F, Paul W E. CD4 T cells: fates, functions, and faults[J]. *Blood*,2008,112(5):1557-1569.
- [45] Shanmugasundaram R, Selvaraj R K. Regulatory T cell properties of chicken CD4⁺ CD25⁺ cells[J]. *Journal of Immunology*,2011,186(4):1997-2002.
- [46] Moore K W, de Waal-Malefyt R, Coffman R L, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor[J]. *Annual Review of Immunology*,2001,19:683-765.
- [47] 张阿敏,李静怡,刘丹丹,等. 鸡毒害艾美耳球虫表面抗原基因(EnSAG)的克隆表达及其免疫保护力[J]. *畜牧与兽医*,2022,54(10):122-128.
- Zhang A M, Li J Y, Liu D D, et al. Cloning and expression of the surface antigen gene from *Eimeria necatrix* and its protective efficacy[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*,2022,54(10):123-128(in Chinese with English abstract).
- [48] Li S, Gowans E J, Choungnet C, et al. Natural regulatory T cells and persistent viral infection[J]. *Journal of Virology*,2008,82(1):21-30.
- [49] Belkaid Y, Rouse B T. Natural regulatory T cells in infectious disease[J]. *Nature Immunology*,2005,6(4):353-360.
- [50] McDowell M A, Sacks D L. Inhibition of host cell signal transduction by *Leishmania*: observations relevant to the selective impairment of IL-12 responses[J]. *Current Opinion in Microbiology*,1999,2(4):438-443.
- [51] Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa[J]. *Nature Immunology*,2002,3(11):1041-1047.
- [52] Mariano F S, Gutierrez F R S, Pavanelli W R, et al. The involvement of CD4⁺CD25⁺T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection[J]. *Microbes and Infection*,2008,10(7):825-833.
- [53] Wei G J, Tabel H. Regulatory T cells prevent control of experimental African trypanosomiasis[J]. *Journal of Immunology*(Baltimore, Md:1950),2008,180(4):2514-2521.

责任编辑:周广礼