

刘迪文,卫振,陈雁虹,等. 不同 FMDV 易感性豚鼠 PBLC 对模拟 FMDV 感染细胞的杀伤作用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 201-207.

Liu DW, Wei Z, Chen YH, et al. Peripheral blood lymphocytes from food-and-mouth disease virus resistant guinea pigs show increased cytotoxicity to cells with simulative viral infection [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 201-207.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2020. 02. 008

不同 FMDV 易感性豚鼠 PBLC 对模拟 FMDV 感染细胞的杀伤作用

刘迪文*, 卫振, 陈雁虹, 谭海明

(浙江大学实验动物中心, 杭州 310013)

【摘要】 目的 探究豚鼠对口蹄疫病毒(FMDV)抗性的遗传学和免疫学机制。阐明 FMDV 假病毒感染的细胞用于研究 FMDV 发病机制的可行性。**方法** 通过含有 FMDV-VP1 片段的慢病毒载体侵染豚鼠原代肾细胞,构建 FMDV 假病毒感染的靶细胞。分离 FMDV 易感性(Zmu-1:DHP 品系)和抵抗性(英国种)的两个品系豚鼠外周血淋巴细胞(PBLC,未经抗原处理),与假病毒侵染的靶细胞共培养,用细胞毒性实验测定 PBLC 的杀伤率,并使用 ELISA 检测细胞培养上清中细胞因子的含量。通过流式细胞分选测定两个品系豚鼠 PBLC 中 CD3⁺/CD4⁺及 CD3⁺/CD8⁺细胞的比例。**结果** 对于两个品系豚鼠而言,实验组 PBLC 的细胞毒性均显著大于各自的对照组($P < 0.01$);抵抗性品系豚鼠 PBLC 对靶细胞的细胞毒性显著大于易感性品系豚鼠($P < 0.01$);抵抗性品系豚鼠 PBLC 分泌的细胞杀伤因子 PF、GRA、GRB 及细胞表面 Fas 表达量显著大于易感性品系豚鼠($P < 0.01$),但分泌的 FasL 表达量无显著差异($P > 0.05$);抵抗性品系豚鼠 PBLC 分泌的细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 及 IL-12 含量显著大于易感品系($P < 0.05$),细胞表面 MHC I 及 MHC II 差异不显著($P > 0.05$);含有 FMDV-VP1 片段的慢病毒载体侵染豚鼠原代肾细胞,可使细胞表面表达 FMDV-VP1 蛋白;抵抗性品系豚鼠 PBLC 中 CD4⁺细胞数量显著少于易感性品系($P < 0.05$),抵抗性品系豚鼠 CD8⁺细胞数量显著高于易感性品系($P < 0.05$)。**结论** FMDV-VP1 片段显著激发了效应细胞的免疫反应,增强效应细胞对靶细胞的细胞毒性;抵抗性豚鼠 PBLC 对 FMDV 感染细胞具有较强的天然细胞毒性;效应细胞对靶细胞产生细胞毒性的过程中,效应细胞分泌的细胞免疫因子参与了相关过程;通过含有 FMDV-VP1 片段的慢病毒载体侵染豚鼠原代肾细胞,构建 FMDV 假病毒感染的靶细胞有效模拟 FMDV 对靶细胞的感染,可提升后续研究工作的安全性。不同品系豚鼠的遗传特性决定了其对 FMDV 易感性的差异。

【关键词】 FMDV 抗性;豚鼠;细胞免疫;天然免疫

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 02-0201-07

Peripheral blood lymphocytes from food-and-mouth disease virus resistant guinea pigs show increased cytotoxicity to cells with simulative viral infection

LIU Diwen*, WEI Zhen, CHEN Yanhong, TAN Haiming

(Laboratory Animal Centre, Zhejiang University, Hangzhou 310013, China)

Corresponding author: LIU Diwen. E-mail: liudiwen2004@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the genetic and immunologic mechanisms of resistance to foot-and-mouth disease virus (FMDV) in guinea pigs and to assess the possibility of using pseudo-FMDV in the pathogenetic study of FMVD. **Methods** FMDV-VP1 peptide was expressed in primary renal cells derived from two different strains of guinea pigs using lentivirus. Peripheral blood lymphocytes (PBLC, without antigen processing) derived from two different strains

[基金项目] 卫生部科学研究基金(98-2-323)。

Funded by the Scientific Research Foundation of Ministry of Health(98-2-323).

[通信作者] 刘迪文(1958—),男,研究员,研究方向:遗传育种及种质特性。Email:liudiwen2004@163.com

of guinea pigs were isolated and cultured with lentivirus infected primary renal cells. PBLC cytotoxicity was determined using the lactate dehydrogenase (LDH) assay, and supernatant cytokines were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Moreover, the proportions of CD3⁺/CD4⁺ and CD3⁺/CD8⁺ cells were measured via flow cytometry. **Results** The cytotoxicity of PBLCs in experimental groups was significantly higher than in corresponding control groups ($P < 0.01$). The cytotoxicity of PBLCs to target cells was significantly higher in the FMDV-resistant strain than in the FMDV-sensitive strain ($P < 0.01$). Levels of PF, GRA, GRB, and Fas in serum derived from the FMDV-resistant strain were higher than in serum derived from the FMDV-sensitive strain ($P < 0.01$). However, the expression of FasL showed no significant difference ($P > 0.05$). Similarly, levels of IFN- γ , TNF- α , IL-2, and IL-12 were also higher ($P < 0.05$). However, the expression of cell-surface MHC class I and II showed no significant difference ($P > 0.05$). The FMDV-VP1 peptide was expressed on the surfaces of primary renal cells derived from guinea pigs when cells were infected by lentiviral-vector containing the DNA sequence of the FMDV-VP1 fragment. The quantity of CD4⁺ cells in PBLCs derived from the FMDV-resistant strain was significantly lower than in PBLCs derived from the FMDV-sensitive strain ($P < 0.05$). The opposite trend was seen for the quantity of CD8⁺ cells ($P < 0.05$). **Conclusions** FMDV-VP1 peptides stimulate immunoreactions of effector cells and enhance the cytotoxicity of effector cells to target cells. PBLCs derived from the FMDV-resistant strain exerted strong cytotoxicity to FMDV infected cells. Cytokines secreted by effector cells participate in the cytotoxicity reaction. Primary renal cells derived from guinea pigs infected by lentiviral-vector containing the DNA sequence of the FMDV-VP1 fragment can be used to simulate FMDV infected cells, which could help to reduce risks associated with FMDV research. Finally, the genetic characteristics of different strains of guinea pigs determine their sensitivities to FMDV.

[Keywords] FMDV resistance; guinea pig; cytoimmunity; natural immunity

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

口蹄疫(foot and mouth disease, FMD)是严重危害国家经济和人民健康的重大传染病,以往对该病的研究大都基于病毒和疫苗方面,很少见于宿主的免疫机制,特别是机体天然抗性及免疫遗传方面的研究。实际上,生物机体由于遗传背景差异的关系,常会导致不同个体或品种对同一种病原体产生不同的免疫,即呈现易感型及抵抗型个体或品种。2006 年,本课题组在豚鼠中发现不同品系对口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus, FMDV)呈现不同抗性的现象^[1],而后又发现这种抗性可能与豚鼠的细胞免疫功能有关^[2],这些发现提示豚鼠免疫系统可能存在对 FMDV 天然敏感或抗性的遗传特性。

VP1 是 FMDV 的主要表位抗原,在机体内起着启动体液和细胞免疫的关键性作用^[3]。实验豚鼠的肾细胞是研究机体对 FMDV 等多种病毒免疫机制的活体材料,使用原代细胞进行免疫学等研究比用相应细胞系更能反映机体的生理状态^[4]。另外,在研究 FMDV 细胞免疫机制中,直接用 FMDV 感染体细胞制作靶细胞也是必要的^[5]。然而由于进行 FMDV 感染细胞试验受到生物安全的限制,为此本课题组通过构建重组 VP1 的慢病毒质粒,替代 FMDV 感染豚鼠肾小管上皮细胞,制备表达 VP1 蛋白的肾原代细胞,然后通过豚鼠免疫细胞(效应细胞)对 FMDV 感染靶细胞的杀伤作用的研究,阐明

模拟 FMDV 感染细胞的可行性,在免疫细胞层面上探究机体 FMDV 天然抗性的免疫机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

Zmu-1;DHP 豚鼠系浙江大学实验动物中心培育的白色品系^[11],DHP 系该中心繁育的英国种花色品系^[12],均为普通级,选用体重 300 ~ 400 g,1 ~ 2 月龄。豚鼠饲养及实验均位于浙江大学实验动物中心,生产许可证编号【SCXK(浙)2018-0006】,使用许可证编号为【SYXK(浙)2018-0016】。所有动物均实施人道关怀。

1.1.2 试剂和仪器

VP1 保存质粒(浙大动科院赠送)、pLVX-GFP 表达质粒及 293T 细胞系(浙大医学院赠送)、慢病毒质粒包装系统:pLP1 包装质粒、pLP2 促翻译质粒及 pLP/VSVG 包膜质粒(Invitrogen)、磷酸钙转染试剂(吉诺生物)、PCR 试剂盒(上海生工)、EcoRI 及 BamHI 内切酶、T4 DNA 连接酶及 CytoTOX96 Non-Radiative Cytotoxicity AssayKit (Promega) 等。CO₂ 孵箱(MCO-15AC 型,Therm)、荧光倒置显微镜(DMI 3000 M 型,Leica)、生物安全柜(NuAIRE)、倒置显微镜(Leica)、PCR 仪(ABI)、电泳仪(Bio-Rad)、凝

胶成像仪 (Bio-Rad)、冷冻离心机 (5804R, Eppendorf)、酶标仪 (Bio-Rad) 等。

1.2 方法

1.2.1 FMDV 感染的豚鼠靶细胞制备

(1) 豚鼠原代肾细胞的制备及培养, 详见参考文献^[4]。

(2) 重组 VP1 的慢病毒表达质粒构建

① VP1 亚克隆

通过查找 pLVX 质粒图谱及保存质粒的 VP1 序列, 设计扩增 VP1 的上下游引物: 5'-TAG ↓ AATTCATACCACCTCTACAGGT-3', 5'-CTG ↓ GATCCTTACAAA GACTGCTTTAC-3', 引物分别带有 EcoRI 和 BamHI 酶切位点。从 VP1 保存质粒中扩增出 VP1 片段, 用 BamHI 和 EcoRI 内切酶先后酶切 VP1 片段和 pLVX-GFP 表达质粒, 电泳收集 VP1 目的片段, 用连接酶将 VP1 重组入 pLVX-GFP 表达质粒, 转化至大肠杆菌内扩增。从大肠杆菌中提取 pLVX-VP1-GFP 表达质粒, 通过 PCR 和双酶切法对其进行鉴定, 并对 VP1 片段进行测序。

② 含 VP1 的慢病毒组装

将慢病毒包装系统的 4 个质粒 pLVX-VP1-GFP、pLP1、pLP2 及 pLP/VSVG 通过磷酸钙法转染入 293T 细胞进行慢病毒组装。培养至 24 h 观察 GFP 绿色荧光, 进行鉴定。

③ 慢病毒感染力鉴定

培养至 48 h 过滤抽提慢病毒上清液, 感染 293T 细胞。再培养 48 h, 根据绿色荧光 GFP 表达鉴定慢病毒感染及 VP1 表达率。当细胞感染率达到 90% 以上时, 证明慢病毒已能稳定表达 VP1 蛋白, 适合于感染应用。

(3) 慢病毒感染豚鼠肾细胞(靶细胞)

将含 VP1 的慢病毒上清液感染培养 10 d 的豚鼠原代肾细胞(基本长满培养皿底部), 制备高效稳定感染和表达 VP1 蛋白的靶细胞, 然后通过观察 GFP 绿色荧光证实感染效果。再用抗 O 型口蹄疫 VP1 小鼠单抗(哈兽研赠送)染色细胞, 通过观察二抗 CY5 红色荧光标记, 直接鉴定肾细胞表达 VP1 蛋白。同时, 制备感染空载慢病毒的靶细胞作对照。

1.2.2 淋巴细胞(效应细胞)的提取及其杀伤性测定

取约 300 g 的豚鼠, 戊巴比妥麻醉后施行心脏采血, 每只豚鼠取 2 mL 肝素抗凝血。用淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品公司)分离出混合的单核细胞, 作为效应细胞。然后弃去感染 VP1 豚鼠原代肾细胞培养液, 用胰酶消化分散细胞。细胞计数后

按 20:1 的比例, 吸取效应细胞与感染 VP1 的靶细胞作为实验组, 置于微量反应板的孔中, 同时设空载 VP1 慢病毒的阴性对照组和无感染慢病毒的空白对照组, 每个样本做复孔, 加培养液置 CO₂ 孵箱内混合培养。

次日, 参照试剂盒说明书, 用 LDH 法测定细胞上清液中靶细胞 LDH 释放量的 OC 值, 从标准曲线查出并计算免疫细胞杀伤的百分率。

1.2.3 豚鼠效应细胞及靶细胞的杀伤因子测定

吸取混合细胞培养的上清液, 参照试剂盒说明书, 用 ELISA 法分别测定颗粒酶 GRA 及 GRB、穿孔素 PF、细胞凋亡因子 FAS 及其受体 FASL 的含量。

1.2.4 豚鼠效应细胞及靶细胞的免疫因子测定

吸取混合细胞培养的上清液, 参照试剂盒说明书, 用 ELISA 法分别测定主要组织相容性复合物 MHC I 及 MHC II、IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 及 IL-12 的含量。

1.2.5 豚鼠 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞比例测定

在流式细胞管中分别加入 5 μ L CD4⁺、CD8⁺ 单抗及 50 μ L 豚鼠抗凝血, 对 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞染色, 然后用溶血素裂解红细胞。加 PBS, 离心, 弃去上清。加入 0.5 mL PBS 重悬细胞, 用流式细胞法检测 CD4⁺、CD8⁺ 细胞在淋巴细胞中的比例。

1.3 统计学分析

用软件对数据进行统计, 以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计算组间 t 值, 并检验组间差异的显著性, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

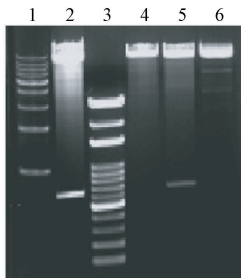
2 结果

2.1 含 VP1 片段的慢病毒载体质粒的鉴定

重组慢病毒载体质粒 pLVX-VP1-GFP 的 PCR 产物电泳图谱如图 1, 可见 650 bp 附近呈现目的片段(泳道 1、3), 而对照质粒(即不含 VP1 片段的载体质粒)则没有相应的片段(泳道 2、4), 说明 VP1 片段已经重组进入了慢病毒载体质粒。(pLVX-VP1-GFP 发光, pLVX-GFP 不发光, 图片未显示, 证明质粒中插入外源性片段)。

BamHI 和 EcoRI 酶切重组质粒, 所得酶切片段的电泳图谱见图 2, 可见在 650 bp 附近呈现目的片段(泳道 1、2、3、4), 说明酶切位点无误, 与设计的引物碱基序列一致, VP1 片段被插入到慢病毒载体质粒的 MCS 区两位点之间。

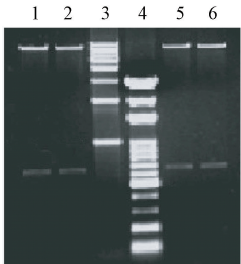
提取的质粒样品和设计引物送上海生工测序, 结果经 NCBI 查询为福建 O 型口蹄疫病毒 VP1 片段, 目标片段验证无误。经过上述实验验证, 含口蹄疫 VP1 片段的慢病毒载体质粒构建是正确的。



注:泳道 1;DNA Marker(1000 bp);泳道 3;DNA Marker(100 bp);泳道 2、5;目的片段;泳道 4、6;DNA 空质粒。

图 1 PLVX 质粒 PCR 片段扩增出 VP1 片段
Note. Lane 1, DNA Marker(1000 bp). Lane 3, DNA Marker(100 bp). Lane 2, 5, Target fragment. Lane 4, 6, Empty vector.

Figure 1 VP1 fragment amplified by PCR from PLVX plasmid



注:泳道 1、2、5、6;目的片段;泳道 3;DNA Marker(1000 bp);泳道 4;Marker(100 bp)。

图 2 重构质粒双酶切电泳验证得到 VP1 片段
Note. Lane 1, 2, 5, 6, Target fragment. Lane 3, DNA Marker(1000 bp). Lane 4, DNA Marker(100 bp).

Figure 2 VP1 fragment gained by enzyme digestion from the restructure plasmid

2.2 完整慢病毒的构建及感染力测定

慢病毒包装系统的 4 质粒经 293T 细胞包装,细胞表面表达 GFP 荧光(见图 3),表明质粒已组装成完整的慢病毒。为了证明该慢病毒的感染性,将病毒上清液感染 293T 细胞,结果细胞表面仍表达 GFP 绿色荧光(见图 4),表明该慢病毒具有较强的感染力。

2.3 豚鼠肾小管上皮细胞感染慢病毒及其 VP1 蛋白的表达

如图 5 所示,豚鼠肾小管上皮细胞长满培养皿。慢病毒上清液感染豚鼠肾小管上皮细胞表达荧光(见图 6),可见慢病毒已几乎感染所有豚鼠肾原代细胞。用 VP1 抗体对豚鼠肾小管上皮细胞(靶细胞)染色,出现红色荧光(见图 7),证实肾小管上皮细胞已被慢病毒感染,并表达口蹄疫病毒 VP1 蛋白,而阴性对照样本没有显色。

2.4 效应细胞对靶细胞的杀伤作用

将两个品系豚鼠的淋巴细胞分离液提取的效应细胞分别与两个品系豚鼠(每品系 1 只)感染 FMDV VP1 的靶细胞进行细胞毒性(杀伤性)反应,

结果见表 1 及图 8。

从图表中可见,两个品系豚鼠实验组的杀伤率都显著大于对照组($P < 0.01$),表明 VP1 蛋白显著地激发了效应细胞的免疫反应,效应细胞杀伤靶细胞的效果非常明显;DHP 豚鼠实验组的杀伤率显著大于 Zmu-1;DHP 豚鼠($P < 0.01$),表明 DHP 品系豚鼠对 FMDV 感染细胞具有较大的自然杀伤性。

2.5 豚鼠细胞上清液杀伤因子含量

为了研究免疫细胞对靶细胞的杀伤机理,测定了混合细胞杀伤后培养基上清液中的杀伤因子含量,结果见表 2 及图 9。

由图表可见,两个品系豚鼠效应细胞分泌的穿孔素 PF、细胞凋亡因子 FAS、颗粒酶 GR A 及 GR B 呈极显著差异($P < 0.01$),即 DHP 品系豚鼠极显著的大于 Zmu-1;DHP 豚鼠,而两个品系的细胞凋亡因子受体 FASL 无差异($P > 0.05$)。

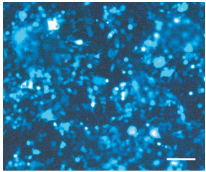


图 3 293T 细胞内组装的慢病毒 GFP 荧光(标尺:50 μm)
Figure 3 GFP fluorescence of assembly lentivirus in 293T cell (Scale bar:50 μm)

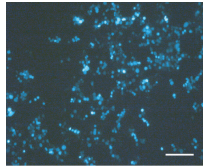


图 4 慢病毒感染 293T 细胞的 GFP 荧光(标尺:100 μm)
Figure 4 GFP fluorescence of 293T cell infected with lentivirus (Scale bar:100 μm)

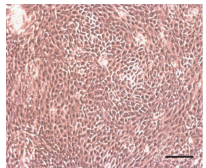


图 5 肾小管原代上皮细胞(标尺:100 μm)
Figure 5 Primary epithelial cells of renal superior tubule (Scale bar:100 μm)

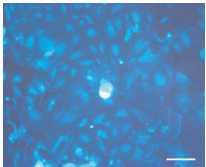


图 6 72 h GFP 表达图(标尺:20 μm)
Figure 6 GFP fluorescence expression 72 h latter (Scale bar:20 μm)

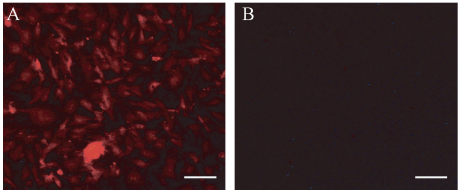


图7 VP1 蛋白荧光染色图(A)和阴性对照图(B)(标尺:50 μm)

Figure 7 Fluorescent staining image of VP1 protein (A) and negative control image (B) (Scale bar:50 μm)

2.6 豚鼠细胞上清液免疫分子含量

为了研究效应细胞对靶细胞的免疫机理,测定了混合细胞杀伤后培养基上清液中的免疫分子含量,结果见表 3 及图 10。从图表可见,两个品系豚鼠效应细胞分泌的 IFN-γ 和 TNF-α 呈极显著差异($P < 0.01$),

即 DHP 品系豚鼠极显著的大于 Zmu-1;DHP 豚鼠;IL-12、IL-2 呈显著差异($P < 0.05$),即 DHP 品系显著的大于 Zmu-1;DHP;而两个品系的细胞 MHC I 及 II 无差异($P > 0.05$)。

2.7 豚鼠 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞亚类比例

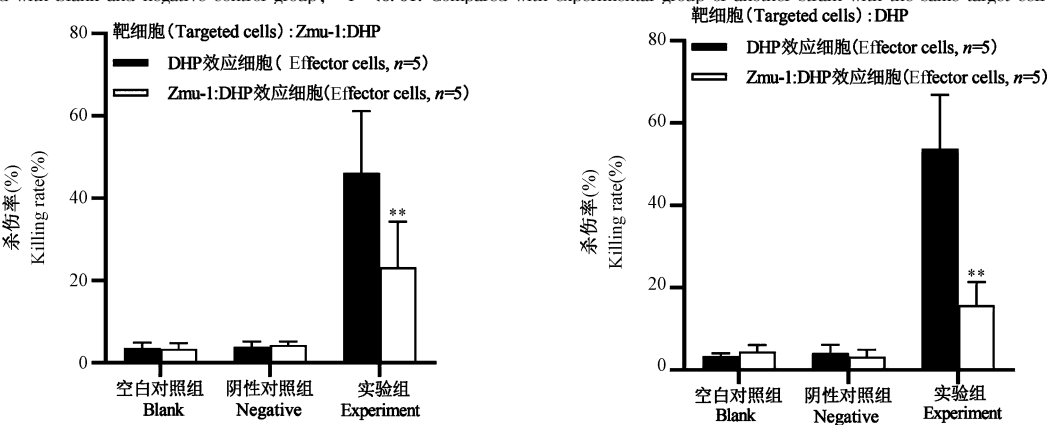
从血液提取的免疫细胞中对靶细胞产生杀伤作用的主要是 CD8⁺ 及 NK 细胞,由于目前市场上没有鉴定豚鼠 NK 细胞的单抗,因此拟通过测定 CD8⁺ 细胞比例,初步推断效应(杀伤)细胞是 CD8⁺ 细胞还是 NK 细胞。豚鼠 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞亚类的测定结果见表 4 及图 11。从图表可见,在未经特异性抗原免疫的情况下,DHP 品系豚鼠的 CD8⁺ 细胞含量显著大于 Zmu-1;DHP 豚鼠($P < 0.05$)。

表 1 豚鼠淋巴细胞对靶细胞的杀伤率(%,n=5)

Table 1 Killing rate of lymphocyte to target cells(%,n=5)

提供效应细胞的豚鼠品系 Guinea pig strains providing effector cell	组 别 Groups	提供靶细胞的豚鼠品系 Guinea pig strains providing target cell	
		Zmu-1;DHP	DHP
DHP	空白对照组 Blank	3.58 ± 1.35	3.31 ± 0.69
	阴性对照组 Negative	3.84 ± 1.34	4.08 ± 2.04
	实验组 Experiment	46.08 ± 15.09 ^{***}	53.77 ± 13.06 ^{***}
Zmu-1;DHP	空白对照组 Blank	3.38 ± 1.36	4.44 ± 1.56
	阴性对照组 Negative	4.33 ± 0.86	3.25 ± 1.67
	实验组 Experiment	23.14 ± 11.18 ^{***}	15.71 ± 5.71 ^{***}

注:与同品系空白、阴性对照组比较, ** $P < 0.01$ 。与相同靶细胞的另一品系实验组对照, ^{###} $P < 0.01$ 。
Note. Compared with blank and negative control group, ** $P < 0.01$. Compared with experimental group of another strain with the same target cell, ^{###} $P < 0.01$.



注:与另一品系比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下图同)

图 8 豚鼠淋巴细胞对靶细胞的杀伤性

Note.Compared with the another strain, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.(The same in the following figures)

Figure 8 Killing rate of lymphocyte to target cells

表 2 两个品系豚鼠细胞杀伤因子含量(pg/mL,n=5)

Table 2 Content of cell killing factors in two strains of guinea pigs(pg/mL,n=5)

品系 Strains	指标含量 Content				
	PF	GR A	GR B	FAS	FASL
DHP	457.75±74.54	790.75±267.93	1565.75±64.94	472.25±126.63	100.25±1.89
Zmu-1;DHP	152.50±34.95	127.25±18.54	165.25±62.13	110.50±7.05	99.75±1.50
P 值 P value	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	> 0.05
DHP/Zmu-1;DHP 比值					
DHP/Zmu-1;DHP ratio	3.00	6.21	9.48	4.27	1.01

表 3 两个品系豚鼠细胞因子含量 (pg/mL, n=5)

品系 Strains	指标含量 Content					
	MHC I	MHC II	IL-2	IL-12	IFN-γ	TNF-α
DHP	108. 25±9. 67	107. 25±5. 80	418. 75±36. 62	268. 26±14. 71	974. 50±598. 73	891. 50±246. 56
Zmu-1; DHP	102. 25±2. 22	115. 25±25. 29	347. 00±43. 73	229. 75±26. 21	203. 00±126. 31	267. 50±127. 99
P 值 P value	> 0. 05	> 0. 05	< 0. 05	< 0. 05	< 0. 01	< 0. 01
DHP/Zmu-1; DHP 比值	1. 06	0. 93	1. 12	1. 17	4. 80	3. 33
DHP/Zmu-1; DHP ratio						

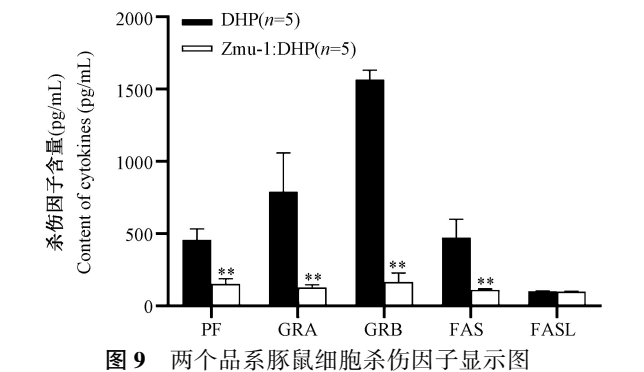


Figure 9 Image of cell killing factors in two strains of guinea pigs

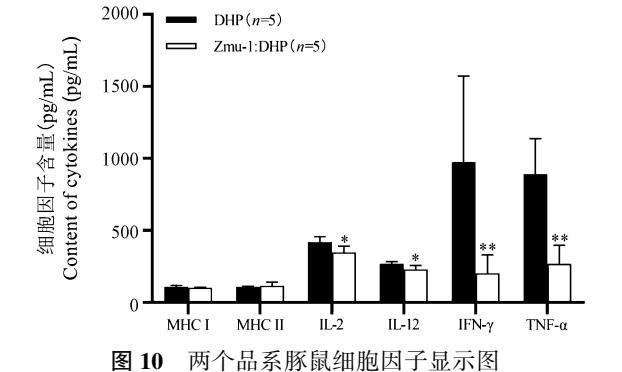


Figure 10 Tow strains of guinea pig cytokine

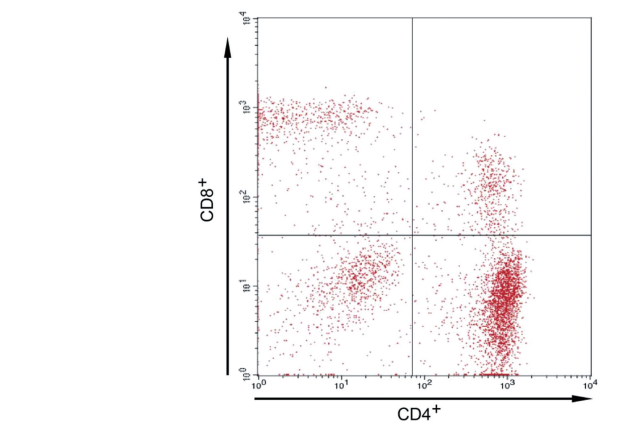


Figure 11 Chart of T lymphocyte subset determined by flow cytometry

表 4 豚鼠 T 细胞亚类测定结果 (% , n=5)		
Table 4 Results of T lymphocyte subset of guinea pig (% , n=5)		
品系 Strains	T 细胞亚类 T lymphocyte subset	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Zmu-1; DHP	56. 83 ± 9. 75 *	18. 55 ± 8. 37 *
DHP	41. 03 ± 10. 01	31. 93 ± 6. 44

注: 与另一品系比较, * P < 0. 05。
Note. Compared with the another strain, * P < 0. 05.

3 讨论

口蹄疫传染性非常之强,被国际有关机构列为头等烈性传染病。传染病是机体与病原体抗争的过程,从机体方面对传染病进行免疫机理研究是新的课题。由于物种间或物种内个体的遗传背景差异,往往会导致对疾病的抵抗性不同。目前国内外

培育出疾病抗性物种,如吉林大学的天然抗猪瘟猪^[6],哥伦比亚筛选的抗口蹄疫病毒牛^[7]等等,这些事例都说明物种中蕴藏着许多天然抗病性状或基因,研究和挖掘这些抗性基因对防治疾病发生有非常重要的意义。本课题组在培育实验豚鼠品系过程中,发现不同品系及毛色豚鼠与抗口蹄疫病毒遗传特性有关,有的品系对口蹄疫病毒呈完全易感,有的则呈完全抗性^[1],该现象的发现促使课题组进一步研究疾病抗性 with 机体细胞的免疫遗传关系

病毒侵入机体及感染靶细胞后,机体免疫细胞如 NK 自然杀伤细胞和 CD8⁺ T 淋巴细胞等将以固有及特异性免疫的形式对感染细胞进行杀伤^[8],以驱除病毒、维持机体内环境稳定。其作用机理是分

泌杀伤和免疫蛋白等,破坏靶细胞及调节天然和适应性免疫^[9]。因此,课题组对不同抗性豚鼠免疫细胞杀伤病毒感染细胞的机理进行了体外研究。从结果可见,抗性品系豚鼠的免疫细胞对病毒感染靶细胞的杀伤率远大于易感豚鼠($P < 0.01$),且其效应细胞表达的大部分杀伤和免疫因子含量远高于易感品系,某些指标达到 3 ~ 9 倍,证明在这过程中机体的天然细胞免疫可能起着抗击病毒的第一道防线的重要作用。

作者研究发现,FMDV 抗性豚鼠杀伤靶细胞不需要相应抗原刺激,产生杀伤的时间为 4 ~ 96 h,相对特异性免疫细胞杀伤的 4 ~ 14 d 时间较短,杀伤细胞不需要 MHC 参与,与两种豚鼠靶细胞及效应细胞表达的 MHC 无关,这些结果都与文献^[10]报道的天然免疫机制基本一致。目前缺乏分离豚鼠天然免疫细胞的特异性标记抗体,对研究豚鼠天然免疫特性造成一定限制,因此最终究竟何种细胞起主要作用有待进一步证实。本实验用淋巴细胞分离液提取的细胞包含 T、B 和 NK 等免疫细胞,从流式分析来看,DHP 品系豚鼠 CD8⁺T 细胞数量也有增高的趋势,说明 CD8⁺细胞也可能参与部分免疫作用。

检测机体免疫细胞杀伤 FMDV 的功能需要制备 FMDV 感染的靶细胞,这涉及到生物安全问题。本文通过慢病毒将 FMDV 主要免疫片段 VP1 导入靶细胞,经鉴定表达 VP1 蛋白,证明靶细胞确实感染了 VP1 基因,并表达相应病毒蛋白,制备模拟病毒自然感染性靶细胞的方法是成功的。VP1 作为 FMDV 的主要抗原基因,已有多篇文献报道了其特性,并将其制成重组疫苗用于免疫动物^[13-14],由此可见该片段在体内是安全可靠的。本文采用小型动物作为模式动物替代大型动物,为进一步研究效应细胞杀伤功能,揭示 FMD 天然抗性的机制提供了技术平台。

参 考 文 献(References)

- [1] 刘迪文. Zmu-1;DHP 豚鼠部分生物学特性研究[J]. 畜牧兽医学报,2006,37(5):492-495.
Liu DW. Study on some biological characters of Zmu-1; DHP guinea pig [J]. Acta Vet Zoo Sin, 2006, 37(5): 492-495.
- [2] 刘迪文. Zmu-1;DHP 豚鼠免疫学特性研究[J]. 浙江农业学报,2006,18(4):246-249.
Liu DW. Study on the immune function of Zmu-1; DHP guinea pig [J]. Acta Agr Zhejiang, 2006, 18(4): 246-249.
- [3] Carrillo C, Wigdorovitz A, Trono K, et al. Induction of virus-specific antibody response to foot and mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants [J]. Viral Immunol, 2001, 14(1): 49-57.
- [4] 孙玉竹,刘迪文,吴旧生. 豚鼠肾小管上皮原代细胞的培养[J]. 中国实验动物学报,2013,21(1):84-86.
Sun YZ, Liu DW, Wu JS. Study on primary culture of guinea pig renal tubular epithelial cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2013, 21(1): 84-86.
- [5] 王永录,张永光,方玉珍等. 牛 O-A 型口蹄疫双价灭活苗研究[J]. 中国兽医科技,1997,27(1):5-7.
Wang YL, Zhang YG, Fang YZ. Study on inactivated bivalent vaccine against bovine foot-and-mouth disease(FMD) type O and A-cell-mediated immune response in mice inoculated with the vaccine [J]. Chin J Vet Sci Technol, 1997, 27(1): 5-7.
- [6] 王浩然. 世界首例“带有抗猪瘟病毒基因的克隆猪”诞生[J]. 中国兽医学报,2008,28(9):封底.
Wang HR. World's first "cloned pig with swine fever virus resistance gene" is born [J]. Chin J Vet Sci, 2008, 28(9): last page.
- [7] 哥伦比亚发现口蹄疫免疫基因[J]. 饲料与畜牧. 2001,3:33.
Foot-and-mouth disease immune gene found in Colombia [J]. Feed Anim Husband, 2001, 3: 33.
- [8] 周光炎. 免疫学原理[M]. 上海:上海科学技术出版社,2007.
Zhou GY. Immunology Principle [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2007.
- [9] 章晓联. 病毒免疫学[M]. 北京:科学出版社,2010.
Zhang XL. Virological Immunology [M]. Beijing: Science Press, 2010.
- [10] 舒红兵. 抗病毒天然免疫[M]. 北京:科学出版社,2009.
Shu HB. Antiviral Natural Immunity [M]. Beijing: Science Press, 2009.
- [11] 刘迪文,谢敏,陈雁虹等. Zmu-1; DHP 近交系豚鼠的培育及其分子遗传结构初步鉴定[J]. 中国实验动物学报,2017,25(1):90-96.
Liu DW, Xie M, Chen YH, et al. Breeding of Zmu-1; DHP inbred strain guinea pig and preliminary analysis of molecular genetic structure of the strain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(1): 90-96.
- [12] 钟品仁. 哺乳类实验动物[M],北京:人民卫生出版社,1983:251-265.
Zhong PR. Mammalian Laboratory Animal [M]. Beijing: People's Health Publisher, 1983:251-265.
- [13] 李继东,才学鹏. O 型口蹄疫病毒 VP1 基因重组山羊痘病毒活载体疫苗的研究[J]. 宁夏大学学报(自然科学版),2017,38(4):371-376.
Li JD, Cai XP. Research on VP1 Gene of O Type Foot-and-mouth Disease Virus Genetic Recombinant Capripox Virus Living-vector Vaccine [J]. J Ningxia Univ (Nat Sci), 2017, 38(4): 371-376.
- [14] 刘佳旭,陈创夫,乔军等. O 型口蹄疫病毒 VP1 基因重组痘苗病毒的构建与鉴定[J]. 《黑龙江畜牧兽医》,2011,1:96-98.
Liu JX, Chen CF, Qiao J, et al. Construction and identification of recombinant vaccinia virus of foot and mouth disease virus type VP1 gene [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2011, 1: 96-98.