

# IBDV 感染鸡后外周血淋巴细胞 PD-1 及其配体 PD-L1/PD-L2 转录变化的初步分析

王爱国<sup>1,2</sup>, 孙国鹏<sup>1</sup>, 李博文<sup>1,2</sup>, 岳 锋<sup>1</sup>, 张艳芳<sup>1</sup>, 朱艳平<sup>1</sup>,  
银 梅<sup>2</sup>, 杨 媛<sup>2</sup>, 郭东光<sup>1</sup>, 王选年<sup>1,2\*</sup>

(1. 新乡学院生物技术研究中心生命科学与技术系, 新乡 453003; 2. 河南科技学院动物科学学院, 新乡 453003)

**摘 要:** 建立鸡 PD-1 及配体 PD-L1/PD-L2 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法, 并用所建立的方法研究和分析雏鸡感染 IBDV 的不同阶段体内 PD-1 及配体 PD-L1/PD-L2 的转录变化。根据 GenBank 中 PD-1、PD-L1 和 PD-L2 的基因序列, 分别设计特异引物扩增目的基因, 得到各自阳性克隆质粒, 以阳性质粒作为标准品建立标准曲线, 并进行敏感性、特异性和重复性试验。应用所建立的实时荧光定量 RT-PCR 方法对 4 周龄健康雏鸡人工感染 IBDV 后第 3、5、7、10 天 PBMC 中 PD-1 及配体 PD-L1/PD-L2 的转录变化进行检测, 同时用半定量 RT-PCR 方法以及 IBDV 快速检测试纸条对病毒感染后各时间点法氏囊组织中 IBDV 的载量进行检测。结果表明, 建立的方法在  $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^9$  copies  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  模板范围内具有良好的线性关系 ( $R^2 > 0.99$ ), 可检测至少  $10^1$  copies  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$  的阳性标准样品, 且具有较好的特异性和重复性。IBDV 感染后, 病毒在雏鸡体内复制逐渐增加, 至第 5 天病毒载量达到最高。实时荧光定量 RT-PCR 检测结果表明, PD-1 及配体 PD-L1/PD-L2 在病毒感染后不同阶段转录量均有所升高, 其中 PD-1 在病毒感染后第 7 天显著 ( $P < 0.05$ ) 升高, 在病毒感染后第 3 天 PD-L1 极显著 ( $P < 0.01$ ) 升高, PD-L2 显著 ( $P < 0.05$ ) 升高。本研究成功建立了 PD-1 及配体 PD-L1/PD-L2 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法; 并应用该方法初步分析了 PD-1 及配体 PD-L1/PD-L2 在 IBDV 感染不同阶段的转录变化, 发现 IBDV 感染后不同阶段 PD-1 及配体 PD-L1/PD-L2 的转录均升高, 且 PD-L1、PD-L2 的转录先于 PD-1 升高, 并与病毒载量呈正相关。

**关键词:** 鸡; 传染性法氏囊病病毒; PD-1; PD-L1; PD-L2

中图分类号: S858.315.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)04-0654-07

## An Elementary Analysis for PD-1, PD-L1 and PD-L2 Genes Transcription Level of Peripheral Blood Lymphocytes in Chicken after IBDV Infection

WANG Ai-guo<sup>1,2</sup>, SUN Guo-peng<sup>1</sup>, LI Bo-wen<sup>1,2</sup>, YUE Feng<sup>1</sup>, ZHANG Yan-fang<sup>1</sup>, ZHU Yan-ping<sup>1</sup>,  
YIN Mei<sup>2</sup>, YANG Yuan<sup>2</sup>, GUO Dong-guang<sup>1</sup>, WANG Xuan-nian<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Science and Biotechnology, Biotechnology Research Center,  
Xinxiang University, Xinxiang 453003, China;

2. College of Animal Sciences, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

**Abstract:** An assay of SYBR Green I real-time fluorescent quantitative RT-PCR was established to investigate the expression pattern of chicken PD-1, PD-L1 and PD-L2 genes at different stages after IBDV infection. The specific primers were designed according to the sequences of PD-1, PD-L1 and PD-L2 from GenBank to amplify the objective genes for corresponding plasmids construction, and then they were used as quantitative template to construct the standard curve and melting

curve for detection sensitivity, specificity and repeatability. The established SYBRS Green I real-time fluorescent quantitative PCR (Real time FQ-PCR) assay worked well with a good coefficient correlation ( $R^2 > 0.99$ ) while the template concentration was from  $1 \times 10^1 - 1 \times 10^9$  copies  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ , the sensitivity was sufficient to detect at least  $10^1$  copies of the samples. The relative transcription levels of chicken PD-1, PD-L1 and PD-L2 mRNA in PBMCs from chicken were detected on the 3rd, 5th, 7th and 10th day after IBDV infection by the developed Real time FQ-PCR assay. At the same time, the semi quantitative RT-PCR and IBDV rapid test strip for detection were carried out to analyze the viral loads in bursal tissue. Real-time RT-PCR analysis show that the expression of PD-1 increased significantly ( $P < 0.05$ ) in the 7th day after infection, the expression of PD-L1 and PD-L2 increased significantly ( $P < 0.01, P < 0.05$ ) in the 3rd day after infection and the IBDV loads in bursal tissue are highest in the 5th days after infection. The established assay was able to detect the expression of the three genes in PBMC. Our results revealing the pattern of chicken PD-1, PD-L1 and PD-L2 genes at different stages after IBDV infection, which showed that the gene transcription increased positively correlated with IBDV loads, and PD-L1, PD-L2 increasing transcription precede PD-1.

**Key words:** chicken; infectious bursal disease virus; PD-1; PD-L1; PD-L2

鸡传染性法氏囊病(infectious bursal disease, IBD)是由传染性法氏囊病毒(infectious bursal disease virus, IBDV)引起的雏鸡的一种急性、高度接触性传染病。研究表明,IBDV 感染后可引起机体的免疫抑制状态和持续性感染<sup>[1-2]</sup>。病毒感染的靶器官为法氏囊,病毒在 B 细胞内复制导致法氏囊淋巴滤泡损伤、破坏, B 淋巴细胞溶解。同时,病毒在法氏囊单核-巨噬细胞系统内复制导致炎性介质的分泌,病毒扩散和损伤加剧,形成败血性休克综合征,导致严重的 B 细胞免疫反应抑制并加剧了病鸡的死亡<sup>[3-4]</sup>。另外,IBDV 感染后前 B 淋巴细胞增殖的抑制和凋亡的发生,也是造成体液免疫抑制的重要原因<sup>[5]</sup>。

程序性死亡分子 1(programmed death-1, PD-1 或 CD279)是免疫球蛋白超家族成员之一,经证实 PD-1 是 T 细胞表面的一种抑制性受体,阻断 PD-1 与其配体的结合可以使病毒持续性感染时功能障碍或衰竭的 CD8<sup>+</sup> T 细胞功能恢复<sup>[6-7]</sup>。PD-1 主要表达在 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞、自然杀伤性 T 细胞、B 细胞、单核细胞及树突状细胞等表面<sup>[8-10]</sup>。迄今,已发现 PD-1 的配体(ligands of programmed death-1, PD-Ls)有 2 种类型,分别为 PD-L1(也称 B7-H1 或 CD274)及 PD-L2(也称 B7-DC 或 CD273),都是 B7 家族成员<sup>[11-12]</sup>。PD-L1 主要表达于 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和树突状细胞(dendritic cell, DC)上,在活化后的细胞上表达上调<sup>[13]</sup>。相反,PD-L2 的表

达相对较局限,主要表达在抗原递呈细胞上,如活化的巨噬细胞、DC 等<sup>[14-15]</sup>。

在免疫调节方面,有研究证明 PD-1 与其配体 PD-Ls 结合后,可以抑制抗原特异性 T 细胞和 B 细胞的功能,对 T 细胞的增殖、细胞因子的分泌及杀伤能力都有抑制作用,阻断该通路后可以恢复 T 细胞的大部分功能<sup>[16-19]</sup>。经相关研究证实某些疾病引起机体 PD-1 及其配体 PD-Ls 表达量变化与免疫抑制和持续性感染密切相关<sup>[20-21]</sup>。在动物免疫抑制性疾病或病毒持续性感染方面, T 细胞免疫抑制性受体 PD-1; PD-Ls 的研究才刚刚起步,特别是在家禽类该方面的研究还少见报道,而 IBDV 感染时对 PD-1; PD-Ls 通路的影响还未见报道。本研究使用相对荧光定量 PCR 技术,通过分析和研究 IBDV 感染不同阶段雏鸡 PBMC 中 PD-1 及 PD-Ls 的转录变化,探讨机体 IBDV 载量与 PD-1 及 PD-Ls 的关系,为进一步揭示 IBDV 引起免疫抑制的发生机理,研究 PD-1 及其配体在鸡免疫抑制性疾病中发挥的生物学功能及其作用机制奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物和菌种

1 日龄健康雏鸡, SPF 隔离器中饲养至 4 周龄。IBDV(xin-1 株), LD<sub>50</sub>  $10^6 \cdot 0.1 \text{ mL}^{-1}$ , 本实验室分离并保存。大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  为本实验室保存。

## 1.2 主要试剂和仪器

淋巴细胞分离液购自天津灏阳生物有限公司。IBDV 快速检测试纸条购自河南省百奥生物工程有限公司。PCR 产物纯化回收试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司。Ex Taq DNA 聚合酶、反转录试剂盒、pMD 18-T 载体购自大连宝生物工程有限公司。SYBR Green I、TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司。ABI 7500 Fast 型荧光定量

PCR 仪, Life Technologies 产品。

## 1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 中 IBDV、PD-1、PD-L1、PD-L2 基因及参考基因  $\beta actin$  的序列, 在保守区设计特异引物(表 1), 其中 IBDV 引物用于半定量 RT-PCR 病毒载量检测, PD-1、PD-L1、PD-L2 及  $\beta actin$  引物用于荧光定量 PCR 检测分析。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

表 1 PD-1、PD-L1、PD-L2 及  $\beta actin$  基因荧光定量 PCR 引物及 IBDV 基因半定量 RT-PCR 引物

Table 1 The primers used for real-time PCR of PD-1, PD-L1, PD-L2 and  $\beta actin$  and semi quantitative RT-PCR of IBDV

基因 Genes	引物序列 Primer sequences	退火温度/°C Annealing temperature	产物大小/bp Size of product
IBDV	F: 5'-ACCAGCGAGATAACCCAGCCAAT-3' R: 5'-GCCAAATGCTCCTGCAATCTTCA-3'	57	416
$\beta actin$	F: 5'-TCCACCGCAAATGCTTCTAAAC-3' R: 5'-CTGCTGACACCTTCACCATTCC-3'	58	170
PD-1	F: 5'-GGACTACGGTGTGCTGGAGTT-3' R: 5'-TCTTTCCTCGCTCTGGTGTG-3'	57	133
PD-L1	F: 5'-TTCAGGGACGGATAAAGCTG-3' R: 5'-CGTCTCTGAGCTTCACGTTG-3'	59	93
PD-L2	F: 5'-CCGCAATGGGAAAGCAC-3' R: 5'-TGACGCTGGTAATGTGAAGGA-3'	58	113

## 1.4 鸡 PBMC 总 RNA 的提取与反转录

采 4 周龄雏鸡外周血, 参照淋巴细胞分离液的说明书分离外周血的淋巴细胞, 参照 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂盒说明书和相关文献进行总 RNA 的提取。提取的总 RNA 参照反转录试剂盒说明书反转录成 cDNA, 保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。

## 1.5 阳性标准品的制备

采用常规 PCR 扩增 PD-1、PD-L1、PD-L2 及  $\beta actin$  目的基因片段, 目的基因片段经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收纯化, 与 pMD 18-T 载体连接后转化至感受态细胞 DH5 $\alpha$  中, 提取重组质粒, 经 PCR 及测序鉴定正确, 作为阳性标准品。用核酸蛋白分光光度计测定质粒纯度, 按照以下公式计算质粒拷贝数: 拷贝数 ( $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) = 浓度 ( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )  $\times 6.02 \times 10^{14}$  / 分子质量。将各质粒按体积比 1 : 10 倍比稀释为  $1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^9$   $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 1.6 PD-1、PD-L1 及 PD-L2 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

以浓度在  $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^7$   $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  阳性质粒为模板进行荧光定量 RT-PCR。PCR 反应体系为: 2  $\mu\text{L}$  质粒模板, F、R 引物 ( $20\text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各 0.2  $\mu\text{L}$ , SYBR Green I MAX 10  $\mu\text{L}$ , 三蒸水 7.6  $\mu\text{L}$ , 建立 20  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系, 应用 ABI 7500 Fast 型荧光定量 PCR 仪检测。上述反应结束后, 仪器配套的软件会自动显示标准曲线。

以阳性标准品 1 : 10 倍比稀释(浓度在  $10^0 \sim 10^9$   $\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 10 个梯度为模板。按上述反应条件进行荧光定量 PCR 扩增, 确定检出下限。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析和溶解曲线分析。将 4 种标准品质粒稀释成 3 个浓度梯度, 作为组内重复; 每个梯度每次反应进行 3 次重复, 作为组间重复, 确定所建立检测方法的重复性。

### 1.7 感染后法氏囊内 IBDV 载量检测

为了确定感染后第 3、5、7、10 天法氏囊组织中 IBDV 的含量,采用半定量 RT-PCR 方法对 IBDV 目的基因和  $\beta actin$  内参基因进行同管扩增,在分子水平上对病毒载量进行检测。提取法氏囊组织中总 RNA,并参照反转录试剂盒说明书反转录合成 cDNA。PCR 反应体系:模板 cDNA 1  $\mu L$ , F、R 引物 (20  $\mu mol \cdot L^{-1}$ ) 各 1  $\mu L$ , dNTP 2  $\mu L$ , 10  $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu L$ , Ex *Taq* 酶 0.5  $\mu L$ , 三蒸水 16  $\mu L$ , 建立 25  $\mu L$  PCR 反应体系。PCR 反应条件:95  $^{\circ}C$  5 min, 然后进行 30 循环:94  $^{\circ}C$  45 s, 55  $^{\circ}C$  30 s, 72  $^{\circ}C$  30 s; 72  $^{\circ}C$  10 min, 4  $^{\circ}C$  保存。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,鉴定其亮度和特异性。同时应用 IBDV 快速检测试纸条在抗原水平上对攻毒组病毒载量进一步检测和确定。

### 1.8 IBDV 感染后鸡 PD-1、PD-L1 和 PD-L2 动态转录水平检测

10 只 1 日龄健康雏鸡饲养至 4 周龄,经琼扩试验对 IBDV 母源抗体水平检测,确定 IBDV 母源抗体消失后,随机分为对照组和试验组各 5 只。其中试验组通过点眼、滴鼻感染 IBDV 稀释液 0.1 mL  $\cdot$  只<sup>-1</sup>;对照组用灭菌 PBS 作相同处理。分别于感染后第 3、5、7、10 天,采集翅下静脉 10% 柠檬酸钠抗凝血 2 mL,参照外周血淋巴细胞分离液的说明书进行分离外周血淋巴细胞,用于总 RNA 的提取。提取的 RNA 经微量分光光度计测定浓度,严格按照反转录试剂盒操作说明书反转录成 cDNA,置于 -20  $^{\circ}C$  保存备用。利用上述建立的荧光定量 PCR 方法,对鸡 PD-1、PD-L1、PD-L2 的 mRNA 相对转录量进行检测。

### 1.9 数据分析

应用 SPSS 17.0 对数据进行方差分析,  $P < 0.05$  表示差异显著。本研究采用  $\beta actin$  为参考基因,应用公式  $ratio = (E_{target})^{\Delta CP(control-sample)/target} / (E_{ref})^{\Delta CP(control-sample)/ref}$  [22] 在 IBDV 感染不同阶段对鸡 PD-1、PD-L1、PD-L2 mRNA 的动态转录进行分析。

## 2 结果

### 2.1 质粒标准品的制备

从 4 周龄健康雏鸡外周血单核细胞中提取总 RNA,反转录成 cDNA 后用特异性引物进行常规

PCR 扩增,得到与目的基因大小一致的扩增产物。产物经回收、连接、转化后获得阳性克隆。对构建的重组质粒进行了 PCR 和测序分析鉴定,与预期结果一致。阳性质粒纯化后 OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub> 值均在 1.80~2.00。

### 2.2 鸡 PD-1、PD-L1、PD-L2 以及 $\beta actin$ 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

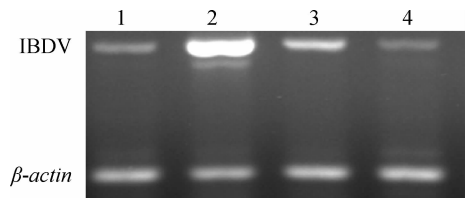
4 种分子的阳性质粒以 1:10 倍比稀释(浓度在  $10^7 \sim 10^2$  copies  $\cdot \mu L^{-1}$  范围)共 6 个浓度梯度的标准阳性质粒作为模板,进行 Real-time PCR 扩增。结果显示,4 种分子的标准曲线线性关系较好,直线回归方程的相关系数  $R^2$  均  $\geq 0.990$ 。

4 种分子熔解曲线均出现单一狭窄峰,说明引物的特异性较好。琼脂糖凝胶电泳分析表明,Real-time RT-PCR 扩增结果为单一特异性目的片段。在  $10^9 \sim 10^0$  copies  $\cdot \mu L^{-1}$  的 10 组不同浓度标准阳性质粒进行 Real-time PCR 检测结果显示,  $10^1$  copies  $\cdot \mu L^{-1}$  仍能检测到荧光信号,其浓度与  $C_t$  值之间有较好的线性关系,敏感性较高。

分别对 PD-1、PD-L1、PD-L2 及  $\beta actin$  基因进行重复性试验。组内和组间重复性试验结果表明,变异系数均在 3% 以内,所建立的荧光定量检测方法重复性较好。

### 2.3 IBDV 感染后不同阶段法氏囊内 IBDV 载量检测

半定量 RT-PCR 结果表明,在 IBDV 感染后第 3、5、7、10 日均能明显的检测到 IBDV,法氏囊内的病毒载量于感染后第 5 天到达最高,之后逐渐降低(图 1)。IBDV 快速检测试纸条检测结果表明,IBDV 感染后第 3、5、7 日均能检测到 IBDV,第 10 天检测不到 IBDV(图 2)。这与半定量 RT-PCR 结果相一致。

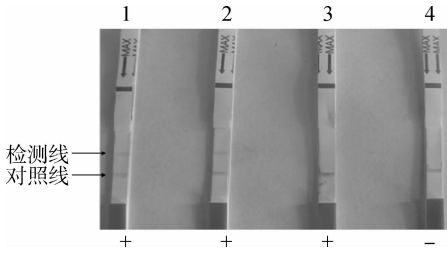


1~4. IBDV 感染后第 3、5、7、10 天法氏囊组织中 IBDV 载量半定量 RT-PCR 产物

1-4. Semi quantitative RT-PCR for IBDV loads in bursal tissue on the 3rd, 5th, 7th and 10th day after IBDV infection

图 1 IBDV 载量半定量 RT-PCR 产物的电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis analysis of semi quantitative RT-PCR for IBDV loads



1~4. IBDV 快速检测试纸条检测 IBDV 感染后第 3、5、7、10 天法氏囊组织中 IBDV 载量

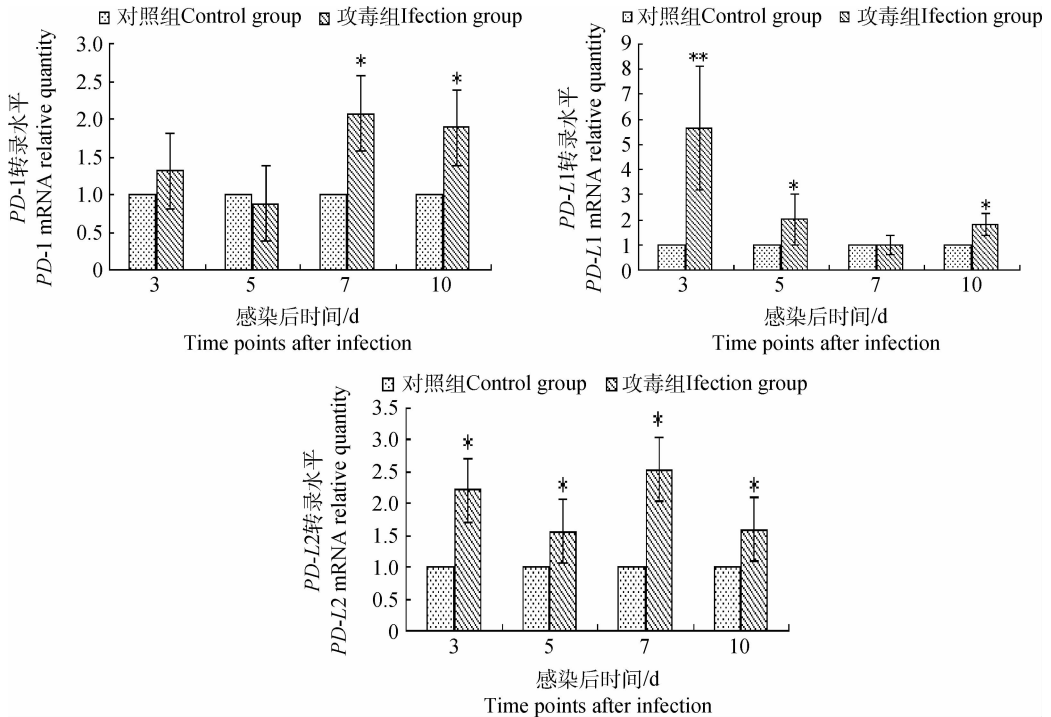
1-4. Rapid test strip detection for IBDV loads in bursal tissue on the 3rd, 5th, 7th and 10th day after IBDV infection

图 2 IBDV 快速检测试纸条检测法氏囊组织中 IBDV 载量结果

Fig. 2 The results of IBDV loads in bursal by test rapid strip for detection

## 2.4 IBDV 感染后不同阶段鸡 PD-1、PD-L1 及 PD-L2 动态转录变化

应用建立的实时荧光定量 RT-PCR 方法对 IBDV 感染后第 3、5、7、10 天雏鸡 PBMC 中 PD-1、PD-L1 和 PD-L2 mRNA 的动态转录水平进行检测。结果表明, PD-1 转录量在感染后第 3、5 天变化不显著, 没有统计学意义, 第 7 天显著 ( $P < 0.05$ ) 升高并持续到第 10 天; PD-L1 转录量在感染后第 3~10 天的大部分时段(第 7 天除外)显著 ( $P < 0.05$ ) 升高, 其中第 3 天升高极显著 ( $P < 0.01$ ), 第 5 天有所回落, 但仍显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 第 7 天变化不显著, 没有统计学意义, 第 10 天又显著 ( $P < 0.05$ ) 升高; PD-L2 转录量在感染后持续升高且差异显著 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。



\* 表示差异显著  $P < 0.05$ , \*\* 表示差异极显著  $P < 0.01$

The values designated by an asterisk are significantly different from blank control (\*  $P < 0.05$ ), double asterisk are very significantly different from blank control (\*\*  $P < 0.01$ )

图 3 PD-1、PD-L1 和 PD-L2 mRNA 的 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测结果

Fig. 3 Detections of PD-1, PD-L1 and PD-L2 mRNA by the SYBR Green I real-time fluorescent quantitative RT-PCR

## 3 讨论

由于 PD-1:PD-Ls 通路能够在中枢免疫和外周免疫反应中传递免疫耐受和免疫抑制信号, PD-1 及其配体 PD-L1 成为近年来人们在人类及鼠慢性持

续性病毒感染、免疫耐受性疾病、肿瘤等免疫抑制性疾病研究中关注的热点<sup>[23-24]</sup>。研究发现, 某些病毒的感染可以诱导 PD-1 及其配体 PD-Ls 的表达从而影响 PD-1:PD-Ls 通路, 使病毒逃避免疫系统的监视与杀伤, 引起机体产生免疫抑制和持续性感染。

在 LCMV(淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒)、HIV(人类免疫缺陷病毒)、HCV(丙型肝炎病毒)以及 HBV(乙型肝炎病毒)所导致的慢性感染性疾病的研究中,均发现 PD-1 高表达于功能异常的 CD8<sup>+</sup> 和 CD4<sup>+</sup> T 细胞表面,并能抑制抗病毒 T 细胞免疫,且与疾病的严重程度、病毒载量和疾病的进展呈正相关。对于这些病毒感染性疾病,阻断 PD-1:PD-L1 途径均可以改善 T 细胞功能。然而关于这些分子功能在鸡的报道很少,目前仅有 2 篇关于鸡感染马立克病毒时 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞表达 PD-1 及其配体 PD-L1 升高的报道<sup>[25-26]</sup>。

鸡传染性法氏囊病是一种免疫抑制性传染病。IBDV 的临床或亚临床感染均可引起严重的免疫抑制反应,导致对其它病原易感性增强和免疫反应性降低。特别是在疫苗的免疫压力下,亚临床感染引起的免疫抑制更为普遍,损失更加严重<sup>[27]</sup>。因此,对 IBDV 免疫抑制机制的研究一直是人们关注的焦点,而 IBDV 感染时对 PD-1:PD-Ls 通路影响的相关研究还未见报道。本研究利用所建立敏感性高和特异性强的 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测方法,对鸡感染 IBDV 后不同阶段 PD-1 及配体 PD-L1/PD-L2 的转录变化进行了检测和分析。

笔者的研究表明,IBDV 感染后第 5 天达到病毒载量峰值,随着病毒在机体内的复制,PD-1 及其配体 PD-L1 的转录量均有所升高,这与已有关于 MDV 感染后 PD-1 及其配体 PD-L1 转录变化的结果<sup>[26]</sup>相似。同时笔者发现 PD-L2 在 IBDV 感染后持续显著增高,这在以往禽病相关的研究中没有提及。在 MDV 相关研究当中,PD-1 及 PD-L1 在体内 MDV 载量达到最高时其转录水平达到峰值。而在笔者的研究中,在 IBDV 感染后第 3 天,PD-L1 和 PD-L2 的转录水平显著增高,PD-1 则在 IBDV 载量达到峰值之后其转录水平显著增加。这种结果可能是由于 IBDV 的致病机制不同于 MDV,MDV 感染鸡的淋巴细胞,在其中潜伏并复制,主要损害鸡的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞,而 IBDV 主要侵害鸡的 B 细胞和单核-巨噬细胞系统。在人类的慢性病毒性疾病的研究中已证明,由于 PD-L2 的转录相对局限,且转录量较低,免疫抑制性受体 PD-1 主要是通过配体 PD-L1 的结合来发挥免疫抑制作用。基于本研究结果,推测禽类中 PD-L2 所发挥的生物学功能可能不同于人类,PD-L2 与 PD-L1 共同参与 PD-1:PD-Ls 免疫抑制通路介导的免疫抑制信号传导,

这有待于进一步深入探讨和研究。

本研究首次对 IBDV 感染不同阶段免疫抑制性受体 PD-1 及配体 PD-L1/PD-L2 的转录变化进行检测及分析。结果表明,IBDV 感染后诱导鸡体内 PD-1 及其配体 PD-L1/PD-L2 转录升高,继而影响 PD-1:PD-Ls 通路,且上述 PD-1 及 PD-Ls 的转录升高呈现了一种“分期”的模式,即 PD-L1、PD-L2 的转录先于 PD-1 升高,同时三者转录的升高均与机体内 IBDV 病毒载量呈正相关。IBDV 感染后诱导 PD-L2 转录的升高,提示在 IBDV 感染引起的鸡免疫抑制疾病当中,PD-L2 可能与 PD-L1 共同参与了 PD-1:PD-Ls 免疫抑制通路介导的免疫抑制信号传导,这有待于进一步研究。以上研究将有助于深入揭示免疫抑制性受体 PD-1 及配体 PD-L1/PD-L2 在免疫抑制病中发挥的作用,丰富 IBDV 引起鸡免疫抑制性疾病的机理。

#### 4 结 论

成功建立了 PD-1 及配体 PD-L1/PD-L2 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法;并应用该方法初步分析了 PD-1 及其配体 PD-L1/PD-L2 在 IBDV 感染不同阶段的转录变化,发现 IBDV 感染后不同阶段 PD-1 及其配体 PD-L1/PD-L2 的转录均升高,且 PD-L1、PD-L2 的转录先于 PD-1 升高,并与病毒载量呈正相关。

#### 参考文献:

- [1] van den BERG T P. Acute infectious bursal disease in poultry: a review[J]. *Avian Pathol*, 2000, 29(3): 175-194.
- [2] LUO J, ZHANG H, TENG M, et al. Surface IgM on DT40 cells may be a component of the putative receptor complex responsible for the binding of infectious bursal disease virus [J]. *Avian Pathol*, 2010, 39(5): 359-365.
- [3] SHARMA J M, KIM I J, RAUTENSCHLEIN S, et al. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression [J]. *Dev Comp Immunol*, 2000, 24(2-3): 223-235.
- [4] RAUW F, LAMBRECHT B, van den BERG T P. Pivotal role of ChIFN $\gamma$  in the pathogenesis and immunosuppression of infectious bursal disease [J]. *Avian Pathol*, 2007, 36(5): 367-374.
- [5] RODRÍGUEZ-LECOMPTE J C, NIÑO-FONG R,

- LOPEZ A, et al. Infectious bursal disease virus (IBDV) induces apoptosis in chicken B cells[J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2005, 28(4): 321-337.
- [6] VELU V, TITANJI K, ZHU B, et al. Enhancing SIV-specific immunity *in vivo* by PD-1 blockade[J]. *Nature*, 2009, 458(7235): 206-210.
- [7] BARBER D L, WHERRY E J, MASOPUST D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection[J]. *Nature*, 2006, 439(7077): 682-687.
- [8] YAMAZAKI T, AKIBA H, IWAI H, et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC[J]. *J Immunol*, 2002, 169(10): 5538-5545.
- [9] KEIR M E, BUTTE M J, FREEMAN G J, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity[J]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 677-704.
- [10] FRANCISCO L M, SAGA P T, SHARPE A H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity[J]. *Immunol Rev*, 2010, 236: 219-242.
- [11] FREEMAN G J, LONG A J, IWAI Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(7): 1027-1034.
- [12] LATCHMAN Y, WOOD C R, CHERNOVA T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(3): 261-268.
- [13] LIANG S C, LATCHMAN Y E, BUHLMANN J E, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses[J]. *Eur J Immunol*, 2007, 33(10): 2706-2716.
- [14] OKAZAKI T, HONJO T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application[J]. *Int Immunol*, 2007, 19(7): 813-824.
- [15] ISHIDA M, IWAI Y, TANAKA Y, et al. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues[J]. *Immunol Lett*, 2002, 84(1): 57-62.
- [16] SALAMA A D, CHITNIS T, IMITOLA J, et al. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Exp Med*, 2003, 198(1): 71-78.
- [17] DAY C L, KAUFMANN D E, KIEPIELA P, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression[J]. *Nature*, 2006, 443(7109): 350-354.
- [18] MUENST S, HOELLER S, WILLI N, et al. Diagnostic and prognostic utility of PD-1 in B cell lymphomas[J]. *Dis Markers*, 2010, 29: 47-53.
- [19] BLACKURN S D, SHIN H, FREEMAN G G, et al. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(39): 15016-15021.
- [20] TRAUTMANN L, JANBAZIAN L, CHOMONT N, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells leads to reversible immune dysfunction[J]. *Nat Med*, 2006, 12(10): 1198-1202.
- [21] BONI C, FISICARO P, VALDATTA C, et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection[J]. *J Virol*, 2007, 81(8): 4215-4225.
- [22] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9): e45.
- [23] HAMANISHI J, MANDAI M, IWASAKI M, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor infiltrating CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(9): 3360-3365.
- [24] IKEBUCHI R, KONNAI S, SHIRAI T, et al. Increase of cells expressing PD-L1 in bovine leukemia virus infection and enhancement of anti-viral immune responses *in vitro* via PD-L1 blockade[J]. *Vet Res*, 2011, 42(1): 103-117.
- [25] PARVIZI P, ANDRZEJEWSKI K, READ L R, et al. Expression profiling of genes associated with regulatory functions of T-cell subsets in Marek's disease virus-infected chickens[J]. *Avian Pathol*, 2010, 39(5): 367-373.
- [26] MATSUYAMA K A, MURATA S, ISEZAKI M, et al. Molecular characterization of immunoinhibitory factors PD-1/PD-L1 in chickens infected with Marek's disease virus[J]. *Viro J*, 2012, 9(1): 94.
- [27] BALAMURUGAN V, KATARIA J M. Economically important non-oncogenic immunosuppressive viral diseases of chicken-current status[J]. *Vet Res Commun*, 2006, 30(5): 541-566.