

程序性死亡分子 1 胞外区的表达及其 抗血清对 PCV2 增殖的影响

王林青^{1,2}, 徐朋丽², 陈曦旻², 李洪炫², 陈红英^{2*}, 赵 丽^{3*}

(1. 郑州师范学院分子生物学郑州市重点实验室, 郑州 450044; 2. 河南农业大学动物医学院, 郑州 450046;
3. 河南牧业经济学院动物医药学院, 郑州 450046)

摘要: 为研究猪的程序性死亡分子 1 (PD-1) 胞外区参与猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus type 2, PCV2) 感染的免疫调节功能, PCR 扩增健康猪舌组织中 *PD-1* 胞外区, 构建重组表达质粒 pET-28a-*PD-1*, 转化至 Rosetta (DE3)。经 IPTG 诱导表达后, 采用 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测重组 PD-1 胞外段蛋白 exPD-1 表达情况。结果显示, 重组菌 pET-28a-*PD-1*/DE3, 在 37 °C、0.5 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导 8 h 时, exPD-1 蛋白的表达量最高, 大小约为 20 kDa, 且以包涵体形式表达。然后将经纯化和复性获得的 exPD-1 辅以佐剂免疫新西兰兔, 制备兔抗 exPD-1 血清, 经 Western Blot 检测结果显示该抗血清具有较好的反应原性。用 PCV2 感染猪肾 (Porcine kidney-15, PK-15) 细胞, 采用荧光定量 PCR 检测 *PD-1* 转录水平, 结果显示 PCV2 感染 PK-15 细胞 1~48 h 时 *PD-1* 的 mRNA 转录水平均下调; 用兔抗 exPD-1 血清处理 PK-15 细胞后感染 PCV2, *PD-1* 的转录水平显著上调 ($P < 0.01$), 且明显地抑制了 PCV2 的复制 ($P < 0.01$)。上述结果表明, 在体外 PCV2 感染可引起 *PD-1* 转录水平下调, 兔抗 exPD-1 血清可通过封闭 PD-1/PD-L1 通路, 抑制 PCV2 增殖。

关键词: 程序性死亡分子 1; 表达; 兔抗 PD-1 血清; PCV2

中图分类号: S858.285.53

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2022)03-0443-06

Expression of PD-1 extracellular domain and affection on PCV2 proliferation of rabbit serums against PD-1

WANG Linqing^{1,2}, XU Pengli², CHEN Ximeng², LI Hongxuan², CHEN Hongying², ZHAO Li³

(1. Zhengzhou Key Laboratory of Molecular Biology, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044;

2. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046;

3. College of Veterinary Medicine, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046)

Abstract: To investigate the immune regulation function of extracellular domain of programmed death molecule 1 (PD-1) involved in porcine circovirus type 2 (PCV2) infection, the extracellular domain gene of programmed death 1 (*PD-1*) was amplified from pig tongue tissue, and the recombinant expression plasmid pet-28a-*PD-1* was constructed and transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3). After induced with IPTG, the expression of the recombinant *PD-1* extracellular segment protein expd-1 was detected by SDS-PAGE and Western Blot. The results showed that the highest level of recombinant protein was observed when recombinant bacteria were induced by using 0.5 mmol·L⁻¹ IPTG at 37 °C for 8 h. Western Blot showed that there was about 20 kDa specific brown red protein (inclusion body) band in the expected position. Then New Zealand rabbits were immunized with purified and renatured exPD-1 supplemented with adjuvant to prepare rabbit anti-exPD-1 serum. The results of fluorescence quantitative PCR showed that *PD-1* was down-regulated in porcine kidney-15 (PK-15) cells infected with PCV2 for 1 - 48 h; the transcription level of *PD-1* was significantly up-regulated ($P < 0.01$), and the replication of PCV2 was inhibited significantly ($P < 0.01$) after the treatment of PK-15 cells with rabbit anti-PD-1 sera. The experiment results showed that PCV2 infection can cause the down regulation of *PD-1* transcription level *in vitro*, and anti-exPD-1

收稿日期: 2021-08-13

基金项目: 中原千人计划项目 (204200510015), 河南省高校科技创新人才支持计划 (21HASTIT039), 河南省高等学校青年骨干教师培养计划 (2018GGJS161) 和河南牧业经济学院博士启动资金 (2020HNUAHEDF010) 共同资助。

作者简介: 王林青, 博士, 副教授。E-mail: wanglinsing@163.com

* 通信作者: 陈红英, 教授。E-mail: chhy927@163.com 赵 丽, 教授。E-mail: 578764509@qq.com

serum can inhibit the proliferation of PCV2 by blocking PD-1 / PD-L1 pathway.

Key words: programmed death 1; expression; rabbit anti-PD-1 serum; PCV2

程序性死亡分子 1(programmed death 1, PD-1) 由日本京都大学的 Honjo 及其同事于 1992 年发现^[1]。PD-1 是主要表达于活化的 T 细胞、B 细胞、自然杀伤细胞、单核细胞以及间充质干细胞的一个重要的免疫抑制受体^[2], PD-1 属于 I 型跨膜糖蛋白, 含有 IgV 样结构域^[3]。由于 PD-1 膜近端无半胱氨酸残基, 故不能形成二聚体, 因此只能以单体形式出现在细胞表面^[4]。

PD-1 的配体为 PD-L1 和 PD-L2^[5-6]。研究表明 PD-1 的表达与病毒的持续感染相关, 一项感染慢性淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒的小鼠试验表明, PD-1 的高表达与病毒特异性 T 细胞功能障碍有关^[3], 同样的现象也出现在人类持续感染 HIV^[7]和 HCV^[8]中。PD-1 与其配体 PD-L1 结合可下调 CD4⁺和 CD8⁺细胞的免疫活性^[9], 减少 IL-2 和 IFN- γ 的分泌。当阻断 PD-1/PD-L1 通路后, 效应 T 细胞数量增加, 功能加强^[10]。研究表明 PD-1/PD-L1 通路的阻断是一种治疗持续性病毒感染的有效方法^[11]。

近年来, 细菌、寄生虫等病原体尤其是病毒的感染, 使全球猪业遭受了难以估量的经济损失。有些病毒也可以引起猪发生持续性感染, 但调节机制尚不清楚。猪圆环病毒 2 型(PCV2) 是危害猪群健康的 4 种最主要病毒性传染病病原之一。PCV2 感染

可引起断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS), 减缓猪群的生长速度, 饲料产出比下降, 养殖成本增加; 而且破坏猪体免疫系统, 导致免疫功能减弱; 严重消耗机体淋巴细胞, 导致免疫细胞数量减少; 并出现免疫抑制, 极易引起继发其他病原感染并增加其死亡率^[12]。预防和控制猪圆环病毒相关疾病的常见措施主要有疫苗接种以及通过改进管理控制合并感染等。由于宿主素、外源因素及病毒自身因素等多种不同影响 PCV2 的感染与复制, 迄今临床上缺乏有效的抗病毒治疗措施来控制感染。

本研究首先从健康猪舌组织中克隆 PD-1 全基因, 并表达了该 PD-1 胞外段蛋白(exPD-1) 和制备 exPD-1 抗血清, 探究其对 PCV2 体外在 PK-15 细胞上增殖的影响, 以期研究 PCV2 的致病机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 组织、细胞、菌种、质粒及试验动物

健康猪舌组织和 PK-15 细胞由郑州市猪重大疫病防控重点实验室保存; 大肠杆菌 DH-5 α 和 Rosetta (DE3)感受态细胞购自博迈德生物技术有限公司; 克隆载体 pMD18-T 及原核表达载体 pET-28a 购自 TaKaRa 公司。新西兰兔购自郑州大学实验动物中心。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物	序列	目的片段长度/bp
P1	5'-GATTATCGCTCCGGGCATGG-3'	984
P2	5'-TGATGATGTCCAACCCCGGCT-3'	
P3	5'- <u>CAGAATTC</u> CCTCCTAGATGCC-3'	455
P4	5'- <u>GTCGACT</u> CACTGGCCCTCTAAG-3'	
S1	5'-CCAAGACACAGATCAACGAGAG-3'	377
S2	5'-GAAGACGATGGTGGCGTATT-3'	
PCV2-F	5'-TAGGAGAAGGGCTGGGTTAT-3'	113
PCV2-R	5'-GGCTCCACTGCTGTATTCT-3'	
PD-1-F	5'-CCCTCTTCTGGGCTTGTGTTC-3'	127
PD-1-R	5'-CTTGGTAGACGATGGTGGCG-3'	

注: P3 和 P4 引物划线部分分别为 EcoRI 和 SalI 的酶切位点。

1.2 主要试剂

Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; DNA Marker 2000、DNA Marker 5000、柱式动物组织总 RNA 和 DNA 抽提试剂盒购自上海生物工程股份有限公司; 低分子量蛋

白质 Marker、Quick CutTM EcoRI、Quick CutTM SalI 及 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus)等购自宝生物工程(大连)有限公司; DAB 显色试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自武汉博士德生物公司; 鼠源 6 \times His 单克隆抗体 (MAb)、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自武汉三鹰生物公司。

1.3 引物设计及合成

参照 GenBank 登录的 *PD-1* 基因(NM_001204379) 和 *PCV2* 基因(AY035820)序列, 利用软件 Primer premier 6.0 设计了 5 对特异性引物(表 1): 引物 P1/2 和 P3/4 分别用于扩增 *PD-1* 全基因及其胞外域(上、下游引物中分别含有 *EcoR*I 和 *Sal*I 位点); S1/2 用于检测 *PD-1*; *PCV2*F/R 和 *PD-1*F/R 分别为检测 *PCV2* 和 *PD-1* 的荧光定量 PCR 引物。引物由上海生物工程股份有限公司合成。

1.4 重组质粒 pET-28a-*PD-1* 的构建与鉴定

利用柱式动物组织总 RNA 抽提纯化试剂盒提取健康猪舌组织总 RNA, 将其反转录为 cDNA。利用引物 P1/2, 经 PCR 扩增 *PD-1* 全基因。将纯化的 PCR 产物克隆到载体 pMD18-T 中并进行测序鉴定。以测序正确的重组质粒为模板, 利用 *PD-1* 特异性引物 P3/4, PCR 扩增 *PD-1* 胞外域。将纯化的 PCR 产物与 pMD18-T 连接, 构建重组质粒 pMD18-*PD-1*, 并对重组质粒进行 PCR 测序鉴定构建是否正确。

利用 *EcoR*I 和 *Sal*I 分别酶切质粒 pMD18-*PD-1* 和载体 pET28-a, 将获得的 *PD-1* 胞外域片段与 pET-28a 进行连接, 构建重组表达质粒 pET-28a-*PD-1*, 转化至大肠杆菌 Rosetta(DE3)感受态细胞中, 筛选阳性单个菌落并进行测序鉴定。

1.5 重组蛋白 exPD-1 的诱导表达、纯化、复性及鉴定

将 IPTG 浓度设为 0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 和 1.5 mmol·L⁻¹, 诱导时间设为 2、4、6 和 8 h, 筛选诱导重组蛋白 exPD-1 表达的最佳 IPTG 剂量和时间。通过尿素 (0.5~9 mol·L⁻¹) 溶液来确定包涵体最佳的洗涤纯化浓度。利用不同浓度的尿素复性缓冲溶液体系 (7、6、5、4、3、2、1 和 0.5 mol·L⁻¹ 和 PBS) 进行重组蛋白的复性。SDS-PAGE 电泳检测纯化产物, 用紫外分光光度计测定重组蛋白浓度。

1.6 兔抗 exPD-1 血清的制备、效价的测定及其特异性的检测

首次用纯化的 exPD-1 与等量弗氏完全佐剂乳化的油剂 (按照每只兔体重 1 kg 免疫 exPD-1 蛋白 1 mg) 免疫新西兰兔, 2 周后用 exPD-1 与等量弗氏不完全佐剂制备的油剂二免。二免后 2 周, 第 3 次免疫, 免疫原同二免。三免后 1 周, 用间接 ELISA 测定抗血清效价。当血清效价达到 1:12 800 时, 心脏采血, 分离血清, -20℃ 保存备用。

采用重组蛋白 exPD-1 作为抗原, 三免后以分离的兔抗 exPD-1 血清作为一抗, HRP 标记羊抗兔抗体 (1:3 000 稀释) 作为二抗, 经 Western Blot

检测兔抗 exPD-1 血清的特异性^[13-14]。

1.7 PCV2 感染 PK-15 细胞后 *PD-1* 转录水平检测

将 PK-15 细胞均匀铺在 12 孔培养板并接种 PCV2(剂量为 5.78 TCID₅₀/0.1 mL), 同时设未接种 PCV2 的 PK-15 细胞作为阴性对照。37℃ 吸附 1 h 后, 收获接毒组及阴性对照组的细胞各一孔并于 -80℃ 冻存。其余各孔均在洗涤后加入 2% 细胞维持液, 继续培养 6、12、24、36、48 和 72 h 时, 收获接毒组和阴性对照组细胞, 提取各组细胞的 mRNA, 通过荧光定量 PCR 检测 PCV2 感染 PK-15 细胞后的 *PD-1* 转录水平^[14-15]。

1.8 *PD-1* 受体的检测及兔抗 exPD-1 血清对 PCV2 增殖的影响

以 PK-15 细胞总 cDNA 作为模板, 利用 *PD-1* 特异性引物 S1/2, PCR 检测 PK-15 细胞中的 *PD-1* 受体。PCR 反应程序为: 95℃ 5 min, 95℃ 45 s, 60℃ 25 s, 72℃ 30 s, 共 35 个循环, 终延伸 72℃ 10 min, 最后 4℃ 10 min。

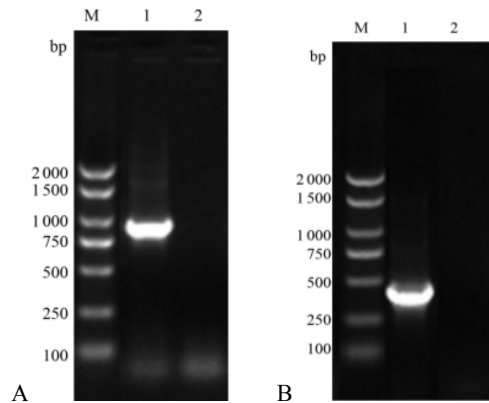
将 12 孔培养板的 PK-15 细胞分为 4 组: 抗 exPD-1 阳性血清组、阴性血清组、PCV2 组和空白对照组。4 组 PK-15 细胞分别 37℃ 5% CO₂ 培养 2 h, 后用 D'Hanks 洗涤 3 次。抗 exPD-1 阳性血清组、阴性血清组和 PCV2 组分别接种 PCV2(剂量为 5.78 TCID₅₀/0.1 mL), 空白对照组添加等量无血清培养液。37℃ 吸附 1 h 后弃去病毒液, D'Hanks 洗涤 3 次, 加入细胞维持液。孵育到 12 h 时, 收获细胞液, 检测 PCV2 的增殖情况, 并通过荧光引物 *PD-1* F/R 和 *PCV2* F/R 进行荧光定量 PCR 对 *PD-1* 转录情况进行检测^[13,15]。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pET-28a-*PD-1* 的构建与鉴定结果

以反转录的猪舌组织 cDNA 为模板, 利用引物 P1/2 进行 PCR 扩增 *PD-1* 全基因。结果显示, 从猪舌组织中扩增出产 1 条约为 948 bp 的目的条带, 与预期相符(图 1A)。测序显示, 所克隆的目的 DNA 片段大小为 948 bp, 与 GenBank 中的 *PD-1* 全长基因序列对比, *PD-1* 全基因在 634—636 位存在 AAG 3 个连续碱基缺失外, 其余序列与参考序列吻合一致。

以构建 *PD-1* 全基因重组质粒为模板, 利用 *PD-1* 胞外域特异引物 P3/4 进行 PCR 扩增。结果显示, 扩增出 1 条约为 455 bp 的片段, 与预期一致(图 1B)。测序结果显示, 目的片段为 455 bp, 与克隆的 *PD-1* 全基因序列进行比对, 同源率为 100%, 表明获得的 *PD-1* 胞外域基因序列正确。



M: DNA 2000 Marker; 1: *PD-1*; 2: 阴性对照。

图 1 *PD-1* 全基因 (A) 及胞外域 (B) 扩增结果

Figure 1 Amplification of complete gene of *PD-1*(A) and extracellular region gene of *PD-1* (B)

重组质粒 pET-28a-*PD-1* 经 *Xho* I 单酶切、电泳出现一条大小约 5 824 bp 的带；经 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切后电泳出现 2 条带：其中一条带为载体质粒，约 5 369 bp，另一条带为所克隆的 *PD-1* 胞外域基因片段，约 455 bp (图 2)，与预期相符。测序结果证实 *PD-1* 基因胞外完全正确地插入到原核表达载体的插入位点，且读码框正确，表明重组质粒 pET-28a-*PD-1* 构建正确。



M. DM 5000+ DNA Marker; 1. 质粒 pET-28a 质粒 *Xho* I 单酶切; 2. *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切产物。

图 2 重组质粒的酶切图

Figure 2 Identification of the recombinant plasmids

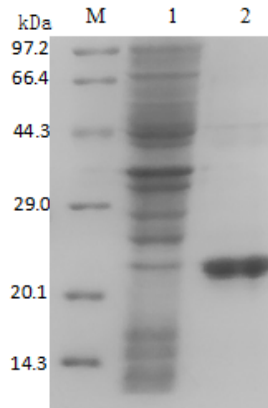
2.2 重组蛋白 exPD-1 的诱导表达、纯化、复性及鉴定结果

筛选优化 IPTG 剂量和时间结果显示，在 37 °C、IPTG 为 0.5 mmol·L⁻¹ 时，诱导时间 8 h，重组蛋白 exPD-1 表达量最高。

利用 2~4 mol·L⁻¹ 尿素溶液进行洗涤纯化、8 mol·L⁻¹ 尿素溶液进行溶解，采用尿素溶液梯度透析对重组蛋白进行复性，最后蔗糖浓缩。经紫外分光光度计测量，重组蛋白为 1.1 mg·mL⁻¹。

SDS-PAGE 结果显示，可清晰地可见 1 条约 20 kDa 的蛋白条，与预期大小相一致(图 3)。Western Blot 结果显示，在约 20 kDa 处可见 1 条特异性的棕

红色阳性条带(图 4)，证明成功表达目的蛋白。

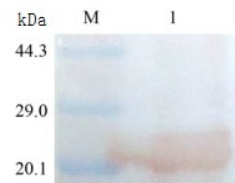


M.标准蛋白分子量非预染 Marker; 1.pET-28a; 2.*PD-1* 基因的诱导表达。

图 3 纯化后的重组质粒 pET-28a-*PD-1* 的表达

Figure 3 Expression results of pET-28a-*PD1* after purification

重组菌破碎后，上清及沉淀分别进行 SDS-PAGE，沉淀中出现 1 条约 20 kDa 大小的蛋白，与预期结果相符，而上清并未有目的蛋白存在，说明重组蛋白主要以包涵体形式存在。



M. 彩色预染蛋白 Marker; 1. *PD-1*。

图 4 兔多抗血清的 Western Blot 检测

Figure 4 The specificity of rabbits polyclonal serum by Western Blot

2.3 兔抗 exPD-1 血清的制备、效价的测定及其特异性的检测结果

将重组蛋白 exPD-1 免疫兔子 3 次后，经 ELISA

方法检测,兔抗 exPD-1 血清抗体效价达到 1:12 800。Western Blot 鉴定,在约为 20 kDa 处有 1 条特异的蛋白带,与预期结果相符,表明兔抗 PD-1 血清特异性良好(图 4)。

2.4 PCV2 感染 PK-15 细胞后的 *PD-1* 转录变化

PCV2 感染 PK-15 细胞后,分别于 0、1、6、12、24、36、48 和 72 h 时收取细胞。通过试剂盒提取 PK-15 细胞的总 RNA 并反转录成 cDNA,利用引物 *PD-1* F/R 进行荧光定量 PCR 检测,检测 *PD-1* 转录情况。结果显示,在 PCV2 感染 1~48 h 时,*PD-1* 均为转录下调(图 5),表明体外条件下 PCV2 感染可激活 PD-1/PD-L1 信号通路。

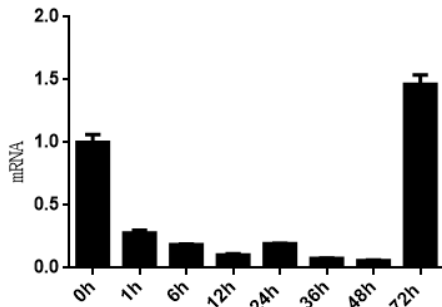
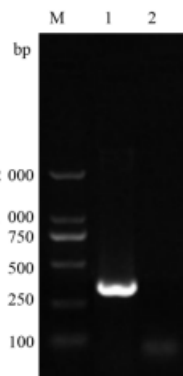


图 5 PCV2 感染 PK-15 后 *PD-1* 转录变化

Figure 5 The transcriptional profiles of *PD-1* after PK-15 cells infected with PCV2

2.5 PD-1 受体的检测结果及兔抗 exPD-1 血清对 PCV2 增殖的影响

利用引物 S1/2,对 PK-15 细胞总 RNA 反转录的 cDNA 进行 PCR 扩增、电泳,出现 1 条约 377 bp 的条带(图 6),与预期大小相符。表明 PK-15 细胞中存在 *PD-1* 受体 mRNA 的转录。



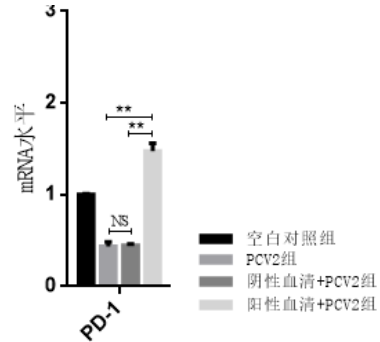
M: DNA 2000 Marker; 1: *PD-1*; 2: 阴性对照。

图 6 PK-15 细胞中 *PD-1* 检测结果

Figure 6 Detection of *PD-1* in PK-15

PCV2 感染 12 h 时,收取各组细胞,通过荧光引物 PD1F/R 和 PCV2F/R 进行荧光定量 PCR 对 *PD-1* 和 *PCV2* 进行检测。结果显示,当 PD-1 受体

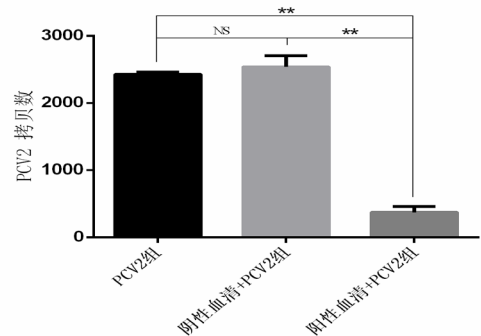
被兔抗 exPD-1 血清封闭时,抗 exPD-1 阳性血清组 *PD-1* 转录水平显著上调($P < 0.01$)(图 7),而阴性血清组、PCV2 组与空白对照组无明显差异。而且,当 PD-1 受体被封闭时,与阴性血清处理组及正常 PCV2 组相比,抗 PD-1 血清组 PCV2 增殖明显被抑制($P < 0.01$)(图 8)。



*表示组间差异显著($P < 0.05$), **表示组间差异极显著($P < 0.01$), NS 表示无明显差异。

图 7 *PD-1* 受体阻断试验检测结果

Figure 7 Detection results of the *PD-1* blocking test



*表示组间差异显著($P < 0.05$); **表示组间差异极显著($P < 0.01$); NS 表示无明显差异。

图 8 *PD-1* 受体阻断时 PCV2 的增殖情况

Figure 8 Detection of PCV2 proliferation in the *PD-1* blocking test

3 讨论与结论

本研究从猪舌组织中 PCR 扩增获得了 *PD-1* 全基因序列,与 Peng 等^[16]所获全基因进行比对发现,所得 *PD-1* 全基因在 634—636 位存在 AAG 3 个连续碱基的缺失,但不影响蛋白的表达;以 *PD-1* 全基因为模板,PCR 扩增获得其胞外域,通过构建原核表达载体 pET-28a 进行胞外域结构蛋白表达,通过对其最佳诱导时间、IPTG 最佳诱导浓度,以及纯化和复性条件的摸索最终获得重组蛋白。最佳诱导条件为,在 37 °C 条件下,用 0.5 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导 8 h 时,目的蛋白的产量最高。可溶性试验显示目的蛋白为包涵体,且 2~4 mol·L⁻¹ 尿素溶液对包涵体具有较好的洗涤效果。利用 8 mol·L⁻¹ 尿素溶液使包涵体蛋白完全变性溶解后,采用尿素溶液梯度

透析进行蛋白复性,然后蔗糖浓缩,最终得到浓度为 $1.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的重组蛋白。本研究采用尿素纯化及梯度透析复性的方法,操作简便,价格便宜,同时在纯化过程中目的蛋白损耗较少,除杂彻底。并将获得的重组蛋白 exPD-1 经 3 次免疫新西兰大白兔制备抗 exPD-1 血清。

PD-1 作为一种具有负性调节作用的 CD28 家族的协同刺激受体分子,广泛表达于免疫细胞和相关组织细胞的胞膜上^[17]。前期研究表明,在某些病毒感染过程中,病原可通过影响 PD-1/PD-L1 信号通路的激活与抑制来诱发免疫抑制,以此来促进病毒躲避宿主机体免疫而造成持续感染; Peng 等^[6]在研究 PD-1 的表达与猪病毒持续感染的关系时发现,PD-1 能够抑制 IFN- γ 和 IL-2 的分泌,使其分别下降 64%和 53%,且猪 PD-1/PD-L1 交互作用表现出负调节的模式;Yue 等^[18]在探究 PD-1 信号通路及 CSFV 感染免疫应答损害的关系中发现,当猪感染 CSFV 后,猪外周血淋巴细胞中除 PD-L1 转录水平上调外,PD-1、IFN- γ 及 IL-2 表达无明显变化;多项研究表明 PD-1/PD-L1 信号通路在介导猪的免疫抑制和持续性感染中或许发挥调节作用^[16, 18-20]。本研究通过在体外利用 PCV2 感染 PK-15 (非免疫细胞)细胞,初步确定了在体外 PCV2 感染可引起 PD-1 转录水平下调,证实了体外条件下 PCV2 感染可激活 PD-1/PD-L1 信号通路。另外,同样在体外条件下,当 PD-1/PD-L1 通路被封闭时,可抑制 PCV2 增殖。PD-Ls 的过量表达是 PMWS 引起免疫抑制的重要分子机制,通过研究 PD-1 对 PCV2 感染后的免疫调节,为进一步探究 PCV2 的免疫抑制机理及抗病毒免疫提供了新方法和新思路,为研究 PCV2 的新型免疫调节佐剂和致病机制奠定实验基础,对 PCV2 相关疾病的治疗和防控、开发新型细胞因子免疫调节佐剂等具有一定的市场应用潜在价值。然而,PCV2 感染时如何激活 PD-1/PD-L1 通路,还有待深入探究。

参考文献:

- [1] ISHIDA Y, AGATA Y, SHIBAHARA K, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death[J]. EMBO J, 1992, 11(11): 3887-3895.
- [2] BÖGER C, BEHRENS H M, MATHIAK M, et al. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients[J]. Oncotarget, 2016, 7(17): 24269-24283.
- [3] 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.
- [4] ZHANG X W, SCHWARTZ J C D, GUO X L, et al. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1[J]. Immunity, 2004, 20(3): 337-347.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] PENNA A, PILLI M, ZERBINI A, et al. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection[J]. Hepatology, 2007, 45(3): 588-601.
- [9] LAURA L, CARTER, LYNETTE A, et al. PD-1: PD-1 inhibitory pathway affects both CD4⁺ and CD8⁺ T cells and is overcome by IL-2 [J]. Eur J Immunol, 2002, 32(3): 634-643.
- [10] ARAKI K, YOUNGBLOOD B, AHMED R. Programmed cell death 1-directed immunotherapy for enhancing T-cell function[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2013, 78: 239-247.
- [11] HA S J, MUELLER S N, WHERRY E J, et al. Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection[J]. J Exp Med, 2008, 205(3): 543-555.
- [12] 李静, 曾威, 朱玲, 等. 猪细小病毒 2 型、3 型、6 型多重 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42(1): 29-32.
- [13] 刘珊珊. 抗牛 PD-1 抗体制备及 PD-1 多抗阻断对 BVDV 感染 PBL 细胞增殖和凋亡的影响[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2019.
- [14] 江慧, 康巧珍, 黄夏冰, 等. 小鼠 PD-1 胞外段重组蛋白表达及其包涵体复性[J]. 郑州大学学报(理学版), 2017, 49(2): 112-116.
- [15] 付楚溪. PD-1/PD-L1 抗体的制备与鉴定研究[D]. 沈阳: 沈阳师范大学, 2019.
- [16] PENG J M, TIAN Z J, LIU H G, et al. Cloning and identification of porcine programmed death 1[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2010, 136(1/2): 157-162.
- [17] TIAN M, ZHANG Y H, LIU Z Z, et al. The PD-1/PD-L1 inhibitory pathway is altered in pre-eclampsia and regulates T cell responses in pre-eclamptic rats[J]. Sci Rep, 2016, 6: 27683.
- [18] YUE F, CHENG A C, ZHU Y P, et al. Overexpression of programmed death ligands in naturally occurring post-weaning multisystemic wasting syndrome[J]. Viral Immunol, 2015, 28(2): 101-106.
- [19] RICHMOND O, CECERE T E, ERDOGAN E, et al. PD-L1 expression is increased in monocyte derived dendritic cells in response to porcine *Circovirus* type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2015, 168(1/2): 24-29.
- [20] YUE F, ZHU Y P, ZHANG Y F, et al. Up-regulated expression of PD-1 and its ligands during acute Classical Swine Fever virus infection in swine[J]. Res Vet Sci, 2014, 97(2): 251-256.