



多肽 gCK-16 对鸡传染性法氏囊病弱毒疫苗 免疫效果的影响

张秋雨^{1,2,3}, 岳 锋⁴, 冯 康², 牛瑞燕², 李 鹏⁴, 朱艳平⁴, 祝仰钊⁴, 孙子龙^{2*}, 王选年^{1,3*}

(1. 河南农业大学动物医学学院 国家动物免疫学国际联合中心, 郑州 450046; 2. 山西农业大学动物医学学院, 晋中 030801; 3. 龙湖现代免疫实验室, 郑州 450046; 4. 新乡学院生物工程学院, 新乡 453003)

摘 要: 本试验旨在研究多肽 gCK-16 联合鸡传染性法氏囊病(infectious bursal disease, IBD)弱毒疫苗的免疫增强效果,并在鸡上进行攻毒保护试验的评价。通过将不同浓度的多肽 gCK-16 体外刺激细胞以及联合 IBD 弱毒疫苗免疫 14 日龄 SPF 鸡后,检测多肽的毒性、疫苗免疫效果以及血清中细胞因子(IFN- γ 、IL-4 和 IL-6)水平。同时,进行传染性法氏囊病病毒(IBDV)攻毒保护试验,检测存活率、囊重指数、脾淋巴细胞活性、法氏囊中免疫球蛋白(IgM 和 IgA)水平、血清中免疫球蛋白(IgY)水平、组织病理学变化以及凋亡相关蛋白表达水平。结果表明,多肽 gCK-16 在体内和体外没有明显的毒性,多肽 gCK-16 联合 IBDV 弱毒疫苗可以显著增加 IBDV 弱毒疫苗免疫鸡后血清中 IBDV 抗体水平和血清中细胞因子(IFN- γ 、IL-4 和 IL-6)的表达水平。另外,多肽 gCK-16 能显著促进 LPS、ConA 和 IBDV 对 PBMCs 的刺激指数。IBDV 攻毒试验也表明,多肽 gCK-16 能明显提高 IBDV 感染鸡后的存活率和囊重比,降低法氏囊组织病理学变化,而促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 表达水平显著降低,抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达水平显著升高。本研究发现多肽 gCK-16 能显著增强 IBDV 弱毒疫苗的体液免疫和细胞免疫应答,对感染 IBDV 的鸡可以起到有效的免疫保护效果,为该多肽作为 IBDV 弱毒疫苗免疫增强剂的应用提供了理论参考和数据支撑。

关键词: 多肽 gCK-16; 传染性法氏囊病; 免疫增强剂; 鸡; 免疫球蛋白; 免疫保护

中图分类号: S852.42

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)03-1683-14

The Effect of Peptide gCK-16 on the Immune Efficacy of Attenuated Vaccine of Infectious Bursal Disease in Chickens

ZHANG Qiuyu^{1,2,3}, YUE Feng⁴, FENG Kang², NIU Ruiyan², LI Peng⁴, ZHU Yanping⁴,
ZHU Yangzhao⁴, SUN zilong^{2*}, WANG Xuannian^{1,3*}

(1. International Joint Research Center of National Animal Immunology, College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China; 2. College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China; 3. Longhu Laboratory, Zhengzhou 450046, China; 4. College of Biological Engineering, Xinxiang University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: This experiment aims to study the immune-enhancing effects of peptide gCK-16 combined with the attenuated vaccine of infectious bursal disease (IBD) and to evaluate the protective effects of the vaccination on SPF chickens(14-day-old). To investigate the toxicity of the peptide gCK-16, the

收稿日期: 2025-04-14

基金项目: 国家自然科学基金(31272539; 31672540)

作者简介: 张秋雨, 主要从事禽疫苗免疫增强剂及其应用研究, E-mail: zhangqiuyu2025@163.com

* 通信作者: 王选年, 主要从事动物病理学和免疫学研究, E-mail: wangxuannian@163.com; 孙子龙, 主要从事环境刺激与机体应激研究, E-mail: sunzilong2000@outlook.com

immune effect of vaccine and the levels of cytokines (IFN- γ , IL-4 and IL-6) in serum, the cells were stimulated by the different concentrations of peptide gCK-16 *in vitro*, and then the chickens were immunized with the different concentrations of peptide gCK-6 in combination with attenuated vaccine of IBD. Meanwhile, the challenge protection of infectious bursal disease virus (IBDV) was performed by detecting the survival rate, the bursa-weight/body-weight index (BBIX), the splenic lymphocyte viability, the level of immunoglobulin (IgM and IgA), the level of immunoglobulin (IgY) in the serum, the histopathological changes and the expression level of apoptosis-related proteins in the bursa. The results show that peptide gCK-16 has no obvious toxicity both *in vivo* and *in vitro*, and peptide gCK-16 combined with the attenuated vaccine of IBD can significantly increase the antibody titer of IBDV in the serum of chickens immunized with the attenuated vaccine of IBD and the level of cytokines (IFN- γ , IL-4 and IL-6) in the serum. Moreover, the peptide gCK-16 significantly promoted the stimulation index of LPS, ConA and IBDV to PBMCs. Immunization and challenge experiments also showed that the peptide gCK-16 significantly increased the survival rate and BBIX of chickens infected with IBDV, and reduced the pathological changes of bursa tissues, while the expression levels of pro-apoptotic proteins Bax, Caspase-3, Caspase-9 were significantly decreased, and the expression level of anti-apoptotic protein Bcl-2 was significantly increased. In conclusion, peptide gCK-16 can significantly enhance the humoral and cellular immune responses of the attenuated vaccine of IBD, and achieved an effective immune protection in chickens infected with IBDV, which provides theoretical reference and data support for the application of this peptide as an immunopotentiator of the attenuated vaccine of IBD.

Keywords: peptide gCK-16; infectious bursal disease; immunopotentiator; chicken; immunoglobulin; immune protection

* **Corresponding authors:** WANG Xuannian, E-mail: wangxuannian@163.com; SUN Zilong, E-mail: sunzilong2000@outlook.com

传染性法氏囊病 (infectious bursal disease, IBD) 是由传染性法氏囊病病毒 (infectious bursal disease virus, IBDV) 引起的一种急性高度接触性传染病, 主要侵害 3~6 周龄的幼鸡, 通过破坏法氏囊中的未成熟 B 淋巴细胞, 降低机体的体液免疫反应能力^[1-3]。目前, IBD 的预防主要通过接种 HVT-VP2 重组活载体疫苗、免疫复合物疫苗和弱毒疫苗来实现, 其中弱毒疫苗使用过量可能会产生残留毒力并转化为致病性野生型的风险, 使鸡对其它疾病的易感性增加, 甚至导致免疫失败, 给家禽养殖业造成巨大的经济损失^[4-5]。疫苗免疫后至少需要 10~12 d 才能检测到抗体, 这段时间是 IBDV 的“危险窗口期”, 一旦生物安全措施防护不到位, 极容易遭受 IBDV 的感染, 引起严重的原发性免疫抑制, 从而使机体对其他病原的易感性增强, 并降低对疫苗的免疫反应^[6-8]。

目前, 疫苗接种是预防和控制传染病的最有效

手段之一^[9]。随着疫苗技术发展, 疫苗由最初的减毒活疫苗、灭活疫苗逐渐发展为亚单位疫苗、基因重组疫苗, 其安全性越来越高, 但是由于某些疫苗抗原的免疫原性有限, 这就要求添加合适的佐剂来提高疫苗的免疫效果, 起到疫病防控的作用^[10-12]。另外, 与其他家畜相比, 家禽养殖密度高、生长周期短、疾病种类多等因素, 其整个生长周期需要接种的疫苗数量和类型较多, 这既带来了疾病防控的保障, 也对家禽健康和生产效益带来了诸多挑战^[13-14]。如何在保证安全的前提下, 最大限度地提高家禽的免疫原性是现代疫苗领域亟需解决的重大问题。通常认为添加合适的佐剂来提高机体的免疫效果, 从而达到疫苗预防的目的。佐剂作为一种免疫增强剂, 是提前与已知抗原混合后注入机体, 能够增强机体对抗原免疫应答, 使其产生高效且持久的免疫应答, 同时能够减少免疫抗原的用量, 降低生产成本以及减弱免疫接种反应^[15]。传统疫苗佐剂 (如

铝佐剂)已广泛用于疫苗生产,其主要通过静电吸附和配体交换将抗原紧密结合以增强抗原递呈细胞的抗原摄取和递呈,但是难以诱导机体产生更强的细胞免疫应答能力^[16-17]。另外,铝盐佐剂带来的副作用也不容小觑,例如,发热、肿胀、神经毒性、体内残留等^[18]。越来越多的研究致力于设计更有效和更安全的免疫增强剂作为疫苗佐剂,以期更有效促进疫苗激活机体的免疫系统,使机体提前产生阳性抗体,从而有效抵御该病毒的侵袭^[17]。因此,迫切需要研制新型、安全、有效的疫苗佐剂。

研究表明,程序性细胞死亡受体 1(PD-1)/程序性细胞死亡配体 1(PD-L1)参与了导致机体淋巴细胞耗竭和凋亡的免疫逃逸机制,促进了慢性病毒感染导致的免疫抑制^[19-20]。PD-1 是一种免疫抑制性受体,其过度表达会导致 B 淋巴细胞免疫功能障碍,从而导致免疫抑制进展加快^[18]。笔者前期研究表明,IBDV 感染可以显著增强鸡法氏囊组织和 B 淋巴细胞中 PD-1/PD-L1 的表达;并筛选出靶向鸡 PD-1 高亲和力多肽 gCK-16,可以有效阻断 PD-1/PD-L1 结合,减弱 IBDV 感染引起的 B 淋巴细胞损伤,增强 B 淋巴细胞功能^[21]。但是多肽 gCK-16 在体内能否诱导高效的细胞免疫应答和体液免疫应答仍不清楚。

在本研究中,笔者利用 IBD 弱毒疫苗单独或联合多肽 gCK-16 免疫 SPF 鸡,并进行效力检验,评估多肽 gCK-16 对 IBD 弱毒疫苗诱导机体的免疫反应及其对 IBDV 感染提供保护的效力。这种以多肽 gCK-16 作为 IBD 弱毒疫苗免疫增强剂的研究,为提高机体的免疫应答和降低弱毒疫苗免疫剂量提供了理论支持。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒毒株和试验动物

鸡外周血单个核细胞(PBMCs)由本实验室分离和保存。DF-1 和 HD-11 细胞均由本实验室保存。鸡传染性法氏囊病活疫苗(B87 株)购自青岛易邦生物工程有限公司。IBDV LX 毒株由扬州大学刘爵教授馈赠。SPF 鸡胚购自勃林格殷格翰生物药业(中国)有限公司,SPF 鸡由本实验室自行进行孵化。本研究中所有试验方案和内容符合山西农业大学动物伦理、福利等相关条例要求。

1.2 主要试剂

多肽 gCK-16(CLEYYGGADYKTINLK)由上

海吉尔多肽有限公司合成。青链新霉素混合液(100×)、MTT 细胞毒性检测试剂盒、CCK-8 试剂盒、BCA 试剂、ECL Plus 超敏发光液、鸡外周血淋巴细胞分离液试剂盒和鸡脾脏淋巴细胞分离液试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司。胎牛血清购自美国 Invigentech 公司。鸡传染性法氏囊病病毒抗体(IBDV Ab)ELISA 检测试剂盒、鸡白细胞介素 4(IL-4)ELISA 检测试剂盒、鸡白细胞介素 6(IL-6)ELISA 检测试剂盒、鸡干扰素 γ (IFN- γ)ELISA 检测试剂盒、鸡免疫球蛋白 M(IgM)ELISA 检测试剂盒、鸡免疫球蛋白 A(IgA)ELISA 检测试剂盒和鸡免疫球蛋白 Y(IgY)ELISA 检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。鸡天门冬氨酸氨基转移酶(AST)ELISA 检测试剂盒和鸡丙氨酸氨基转移酶(ALT)ELISA 检测试剂盒购自武汉吉立德生物科技有限公司。Bax 抗体、Bcl-2 抗体、Caspase-3 抗体和 Caspase-9 抗体购自上海艾比玛特医药科技有限公司。

1.3 多肽体内安全性检测

将 40 只 2 周龄 SPF 鸡随机分为 4 组,每组 10 只,分别为对照组(Mock),10 μ g 多肽组,50 μ g 多肽组,100 μ g 多肽组,各组受试鸡注射剂量为 100 μ L 的 PBS 多肽 gCK-16 稀释液,其中 Mock 组注射 100 μ L PBS,在负压鸡隔离器中进行饲养。持续观察 10 d 鸡的临床表现,记录体温变化,并在 10 d 时分离血清。然后,按照 ELISA 试剂盒说明书的操作步骤,检测血清中 AST 和 ALT 的活性状况。

1.4 鸡 PBMCs 分离与培养

依据鸡外周血淋巴细胞分离液试剂盒说明书分离鸡 PBMCs。具体方法:采集 2 周龄的 SPF 鸡的抗凝血,加等体积稀释液进行稀释。然后,在 15 mL 离心管中加适量分离液,将稀释后的血液轻轻平铺到分离液液面上方,水平转子,1 000 g 离心 30 min,出现明显分层,中间的白膜层为淋巴细胞层。小心吸取白膜层细胞到 15 mL 洁净的离心管中,PBS 洗涤细胞,在含 10% 胎牛血清和 5% 鸡血清的 RPMI-1640 培养基中进行培养,用于后续试验。

1.5 MTT 方法检测多肽毒性

依据 MTT 细胞毒性检测试剂盒说明书检测多肽对细胞的毒性。具体方法:收集对数期细胞(PBMCs、DF-1 和 HD-11),调整细胞浓度,1 $\times$ 10⁴·孔⁻¹,铺于 96 孔板中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱

中继续培养 24 h, 加入不同浓度的多肽 (10、50、250 和 500 nmol·L⁻¹), 继续培养 24 h。然后, 弃上清, 加入 90 μL 新鲜培养液和 10 μL MTT 溶液, 继续培养 4 h, 弃上清, 加 110 μL Formazan 溶解液, 低速振荡 10 min。最后, 用酶标仪在 490 nm 处测定吸光值, 计算细胞毒性活力。

1.6 多肽免疫增强效果评价

将 150 只 2 周龄的 SPF 鸡随机分为 5 组, 每组 30 只, 分别为 Mock 组、疫苗组 (Vaccine)、疫苗 + gCK-16_低浓度组 (Vaccine + gCK-16_L, 6.25 μg·只⁻¹)、疫苗 + gCK-16_中浓度组 (Vaccine + gCK-16_M, 12.5 μg·只⁻¹) 和疫苗 + gCK-16_高浓度组 (Vaccine + gCK-16_H, 25 μg·只⁻¹), 按照 IBD 弱毒疫苗使用说明书进行免疫, Mock 组则用相同体积的生理盐水, 在负压鸡隔离器中进行饲养。受试鸡在免疫后 0、7、14、21、28 和 35 d 采集血液, 分离血清。然后, 按照 ELISA 试剂盒说明书的操作步骤, 检测血清中 IBDV 抗体水平和细胞因子 (IFN-γ、IL-4 和 IL-6) 水平。

1.7 PBMCs 刺激指数检测

采集免疫后 21 和 35 d 受试鸡的血液, 按照鸡外周血单个核细胞分离液试剂盒说明书进行 PBMCs 的分离。将分离的鸡 PBMCs 铺于 96 孔细胞培养板中, 每孔中分别加入脂多糖 (LPS)、刀豆素 (ConA) 和 IBDV, LPS 的终浓度为 10 μg·mL⁻¹, ConA 的终浓度为 5 μg·mL⁻¹, IBDV MOI=1, 未刺激孔不加 LPS、ConA 和 IBDV LX 毒株, 空白孔只加培养基。37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养 48 h 后, 加入 CCK-8 溶液继续培养 2 h, 用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度。依据以下公式计算刺激指数 (stimulation index), $\text{stimulation index} = (\text{LPS/ConA/IBDV 孔 OD}_{450\text{ nm}} - \text{空白孔 OD}_{450\text{ nm}}) / (\text{未刺激孔 OD}_{450\text{ nm}} - \text{空白孔 OD}_{450\text{ nm}})$ 。

1.8 攻毒保护试验

依据注射后的多肽免疫增强效果的评价结果对免疫鸡实施攻毒保护试验, 验证多肽 gCK-16 对 IBD 弱毒疫苗在鸡感染 IBDV LX 毒株后的保护效率, 其免疫后攻毒时间参照文献报道和疫苗说明书上的效力检验^[22]。将 120 只 2 周龄的 SPF 鸡随机分成 4 组, 每组 30 只, 分别为 Mock 组、IBDV 组、Vaccine + IBDV 组和 Vaccine + gCK-16 + IBDV 组。各免疫组鸡通过点眼/滴鼻途径接种 100 μL 的 IBDV 弱毒疫苗, 其多肽添加量为 12.5 μg·只⁻¹。免

疫 17 d 后攻毒 IBDV LX 毒株 (200 μL 的 10⁵ ELD₅₀), Mock 组为生理盐水, 在负压鸡隔离器中饲养。分别于攻毒后 0、1、3、5、7 和 10 d, 记录鸡体重、法氏囊重量、死亡情况, 并绘制生存曲线。采集血液, 分离脾淋巴细胞和血清, ELISA 检测免疫球蛋白 IgY 水平。同时, 解剖受试鸡, 取法氏囊组织分别保存在 4% 多聚甲醛溶液和 -80℃ 冰箱中, 进行后续的 HE 染色、ELISA 检测免疫球蛋白水平 (IgM 和 IgA) 和 Western blot 试验。根据记录的法氏囊重量计算鸡的囊重比 (Bursa of Fabricius weight/Body weight ratio, BF/BW), 其公式: $\text{BF/BW} = (\text{法氏囊重量/体重}) \times 1000$ ^[23]。

1.9 CCK-8 方法检测脾脏淋巴细胞活力

鸡脾脏淋巴细胞的分离方法, 参考鸡脾脏淋巴细胞分离液试剂盒的说明书和文献报道方法略有改动^[24]。首先, 安乐死鸡, 无菌摘取脾脏, 撕去脾脏表面的被膜, 用眼科剪剪碎研磨脾脏后过细胞过滤筛, 制备鸡脾脏单细胞悬液。水平转子 800 g, 常温离心 25 min 后, 离心管中细胞分四层, 用巴氏德吸管小心吸取由上至下第二层的环状乳白色淋巴细胞层到新的离心管中, 之后向离心管中加入适量的细胞洗涤液。然后, 水平转子 250 g, 常温离心 10 min 后, 弃上清, 用 5 mL 细胞洗涤液清洗 3 次, 用 RPMI-1640 完全培养基重悬细胞并进行计数。最后, 按照 CCK-8 试剂盒说明书中的细胞活性检测的要求进行操作, 评价肽 gCK-16 对 IBDV LX 毒株感染后脾淋巴细胞活力的影响。

1.10 法氏囊组织病理学观察

将上述在 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h 的法氏囊组织, 用不同浓度的酒精进行梯度脱水, 石蜡包埋法氏囊组织, 进行切片, 二甲苯脱蜡, 乙醇复水。最后, HE 染色, 树胶封片, 其法氏囊组织病变在光学显微镜下观察, 并拍照。

1.11 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达情况

将上述保存在 -80℃ 冰箱中的法氏囊组织, 用 RAPI (含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂) 进行裂解, 超声破碎后离心取上清, 通过 BCA 试剂检测蛋白浓度, 调整蛋白浓度为 4 μg·μL⁻¹, 其上样总蛋白为 20 μg。另外, 在蛋白样品中加 5×loading buffer, 100℃ 金属浴, 煮 8 min, 待冷却后进行凝胶电泳, 转至 NC 膜。然后, 5% 脱脂牛奶封闭, 一抗过夜, 二抗常温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次。最后, 使用 ECL Plus 超敏发光液显示, 并拍照。

1.12 数据统计与分析

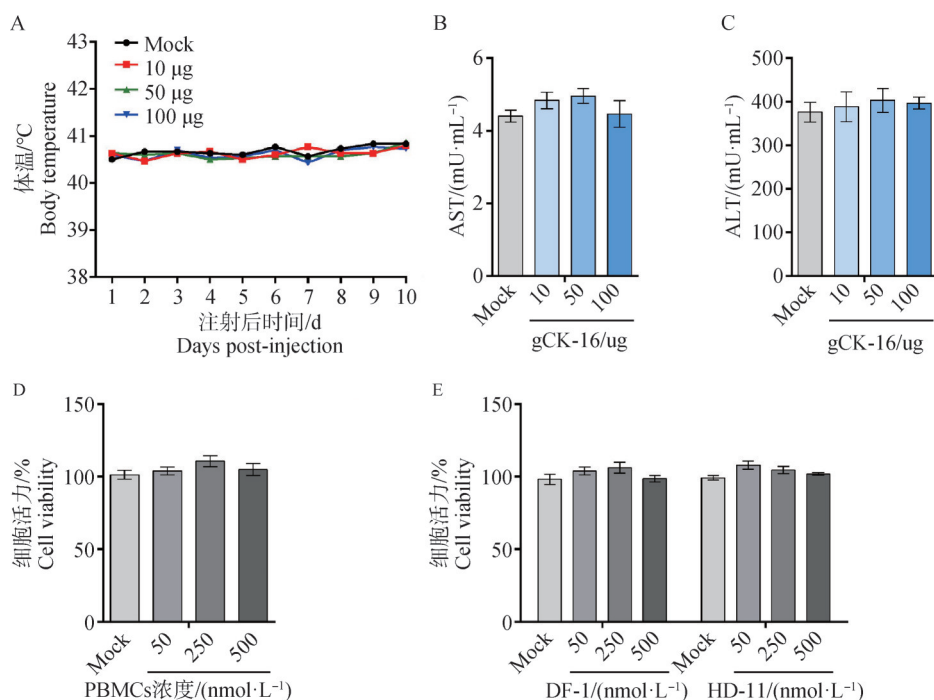
每组试验进行 3 次重复,采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行结果统计分析。所有数据以“平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm s_x$)”表示,除非另有特殊说明。数据分析采用单因素方差分析(*. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$)。

2 结果

2.1 多肽 gCK-16 的体内和体外安全性检测

如图 1A 所示,与对照组相比,不同剂量的多肽

gCK-16 注射鸡后无明显的体温变化。ELISA 结果显示,与 Mock 相比,注射不同剂量的多肽 gCK-16 后,鸡血清中 AST 和 ALT 含量均没有显著差异,说明多肽对肝脏没有毒性(图 1B 和 C)。MTT 方法结果显示,不同浓度的多肽 gCK-16 处理 PBMCs、DF-1 和 HD-11 后,其细胞活力均在 100% 左右(图 1D 和 E)。这些结果表明,多肽 gCK-16 在体内和体外具有较好的安全性,没有明显的毒性。



A. 不同剂量的多肽 gCK-16 对鸡体温变化; B. AST 水平; C. ALT 水平; D. MTT 方法检测多肽 gCK-16 对 PBMCs 细胞毒性; E. 多肽 gCK-16 对 DF-1 和 HD-11 的毒性

A. Temperature changes after injection with different doses of peptide gCK-16; B. The levels of AST; C. The levels of ALT levels; D. The toxicity of peptide gCK-16 to PBMCs; E. The toxicity of peptide gCK-16 to DF-1 and HD-11

图 1 多肽 gCK-16 对体内温度变化和体外细胞毒性的影响

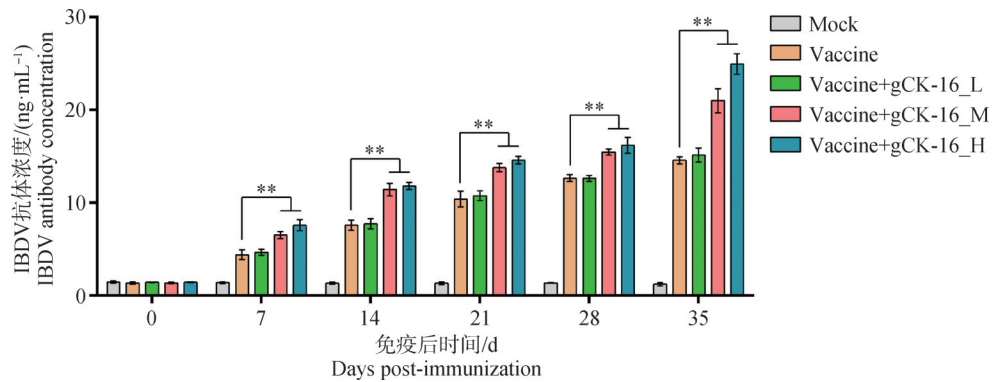
Fig. 1 The effects of peptide gCK-16 on the change of body temperature and *in vitro* cytotoxicity

2.2 多肽 gCK-16 对鸡血清中抗体效价水平的影响

采用 ELISA 试剂盒对所采集的免疫后 0、7、14、21、28 和 35 d 鸡血清中 IBDV 抗体浓度进行检测,从图 2 可以看出,在免疫 0 d 后,各组 IBDV 抗体浓度没有明显差异,而在免疫后 7、14、21、28 和 35 d,与 Vaccine 组相比, Vaccine+gCK-16_M 组和 Vaccine+gCK-16_H 组抗体浓度显著升高。这些结果表明,多肽 gCK-16 联合 IBD 弱毒疫苗免疫后,能显著提高鸡血清中 IBDV 特异性抗体水平。

2.3 多肽 gCK-16 对鸡血清中细胞因子水平的影响

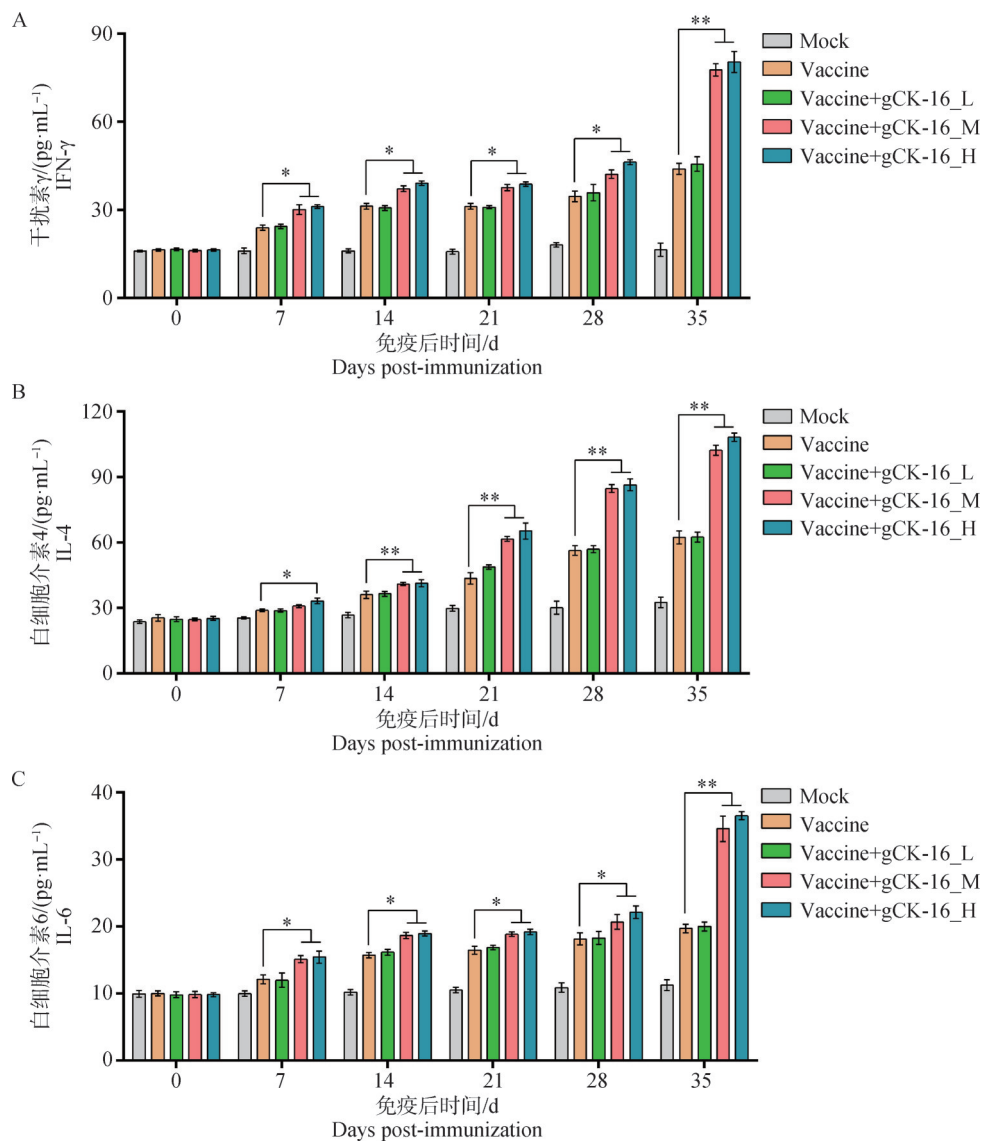
采用 ELISA 试剂盒对所采集的免疫鸡群的血清中细胞因子 IFN- γ 、IL-4 和 IL-6 水平进行检测,从图 3 可以看出,在免疫后 0 d,各组细胞因子 IFN- γ 、IL-4 和 IL-6 水平没有明显变化,而在免疫后 7、14、21、28 和 35 d,与 Vaccine 组相比, Vaccine+gCK-16_M 组和 Vaccine+gCK-16_H 组 IFN- γ 、IL-4 和 IL-6 水平显著升高。这些结果表明,多肽 gCK-16 联合 IBD 弱毒疫苗免疫后,能显著提高鸡血清中细胞因子水平。



** $P < 0.01$

图2 多肽gCK-16增强IBD弱毒疫苗诱导鸡的血清特异性抗体水平

Fig. 2 Peptide gCK-16 enhanced the level of specific antibody in serum of chicken immunized by the attenuated vaccine of IBD



A. IFN- γ 水平; B. IL-4水平; C. IL-6水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

B. The levels of IFN- γ ; B. The levels of IL-4; C. The levels of IL-6. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

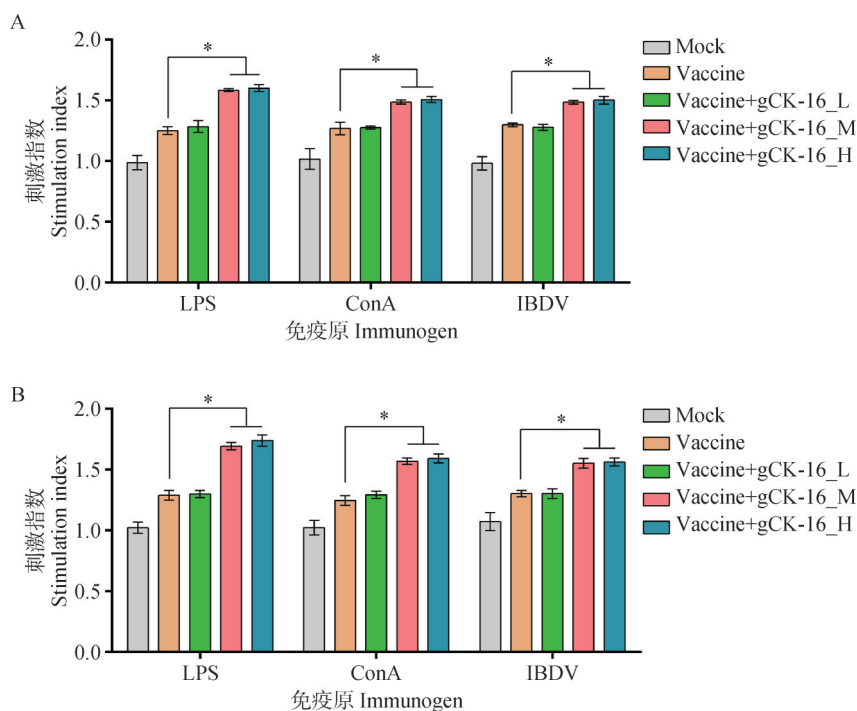
图3 多肽gCK-16增强IBD弱毒疫苗诱导鸡的血清中细胞因子水平

Fig. 3 Peptide gCK-16 enhanced the level of cytokines in serum of chicken immunized by the attenuated vaccine of IBD

2.4 多肽 gCK-16 对鸡 PBMCs 增殖效应的影响

通过 CCK-8 方法测定多肽 gCK-16 对鸡 PBMCs 增殖效果,从图 4A 中可见,在免疫后 21 d, PBMCs 经 LPS、ConA 和 IBDV 刺激后,与 Vaccine 组相比, Vaccine+gCK-16_M 组和 Vaccine+

gCK-16_H 组刺激指数均升高。在免疫后 35 d, PBMCs 经 LPS、ConA 和 IBDV 刺激后,与 Vaccine 组相比, Vaccine+gCK-16_M 组和 Vaccine+gCK-16_H 组刺激指数均升高(图 4B)。这些结果表明,多肽 gCK-16 能显著增加 PBMCs 增殖效应。



A. 免疫后 21 d; B. 免疫后 35 d. *. $P < 0.05$

A. 21 days post-immunization; B. 35 days post-immunization. *. $P < 0.05$

图 4 多肽 gCK-16 增强 IBD 弱毒疫苗诱导鸡的 PBMCs 增殖效应

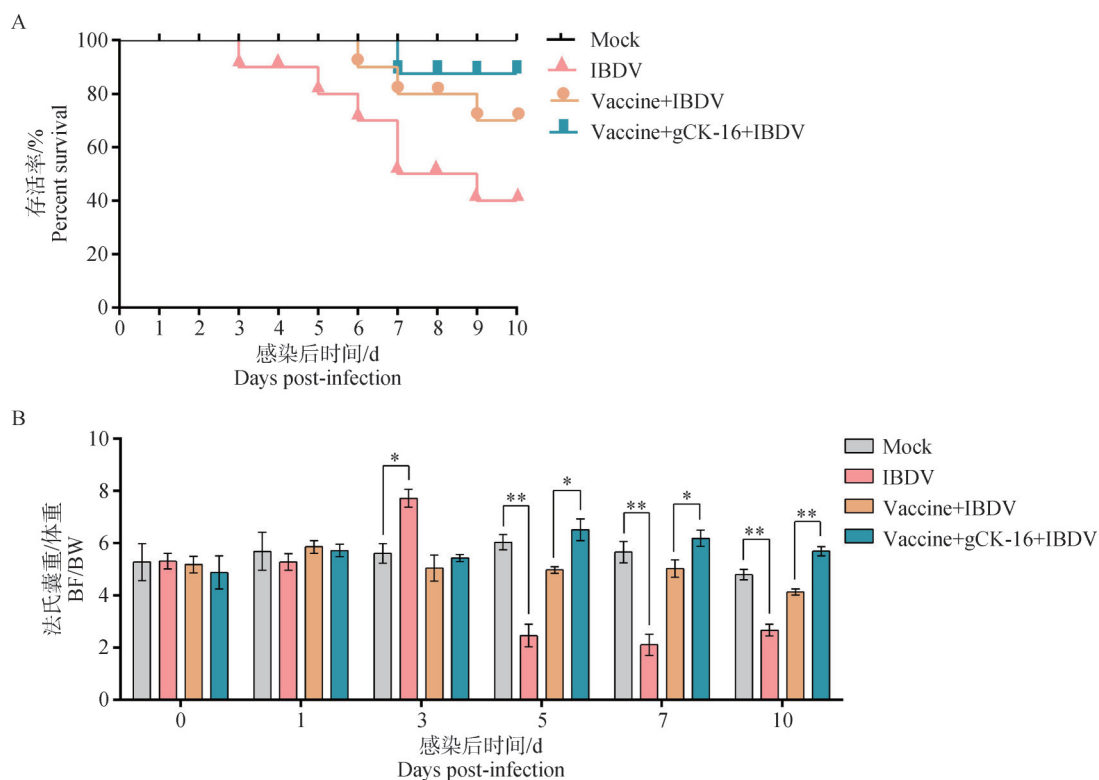
Fig. 4 Peptide gCK-16 enhanced the proliferation of PBMCs in chicken immunized by the attenuated vaccine of IBD

2.5 多肽 gCK-16 对 IBDV 感染后鸡存活率和法氏囊指数的影响

用 IBDV 毒株分别对两组免疫组和对对照组鸡进行攻毒,连续 10 d 观察鸡的临床症状,并记录死亡状况、体重及法氏囊重量,从图 5A 中可见,在攻毒后 10 d 时存活率:Mock 组为 100%、IBDV 组为 40%、Vaccine+IBDV 组为 70% 和 Vaccine+gCK-16+IBDV 组为 90%。囊重比结果显示,与 Mock 组相比,IBDV 感染后 3 d,囊重比明显升高,IBDV 感染后 3、5、7 d 和 10 d,囊重比明显下降;与 Vaccine+IBDV 组相比,IBDV 感染后 5、7 和 10 d, Vaccine+gCK-16+IBDV 组囊重比明显升高(图 5B)。攻毒保护试验结果表明,多肽 gCK-16 可以显著提高鸡存活率和囊重比,并且可以有效保护法氏囊的正常发育。

2.6 多肽 gCK-16 对 IBDV 感染后脾淋巴细胞活力和免疫球蛋白水平的影响

通过 CCK-8 方法检测多肽 gCK-16 对 IBDV 感染后脾淋巴细胞的活力,从图 8A 中可见,与 Mock 组相比,IBDV 攻毒后 3、5、7 和 10 d 显著降低了脾淋巴细胞的活力,而与 Vaccine+IBDV 组相比, Vaccine+gCK-16+IBDV 组脾淋巴细胞活力趋于正常(图 6A)。ELISA 结果显示,与 Mock 组相比, IBDV 攻毒后 7 和 10 d 显著降低法氏囊中 IgM 水平,呈下降趋势;而与 Vaccine+gCK-16+IBDV 组相比, IBDV 攻毒后 5、7 和 10 d 显著降低 Vaccine+IBDV 组法氏囊中 IgM 水平(图 6B)。此外,与 Mock 组相比,IBDV 攻毒后 5、7 和 10 d 显著降低法氏囊中 IgM 和血清中 IgY 水平;而与 Vaccine+gCK-16+IBDV 组相比,IBDV 攻毒后 3、5、7 和 10 d 显著降低 Vaccine+IBDV 组法氏囊中 IgM 和血清



A. 存活率; B. 囊重比 (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)

A. Survival rate; B. BBIX (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)

图5 多肽 gCK-16 对 IBDV 感染后鸡存活率和法氏囊指数的影响

Fig. 5 The effects of peptide gCK-16 on the survival rate and BBIX in IBDV-infected chickens

中 IgA 水平 (图 6C 和 D)。这些结果表明, 多肽 gCK-16 联合 IBD 弱毒疫苗免疫后可以逆转 IBDV 感染导致鸡脾淋巴细胞活力和免疫球蛋白水平的下降。

2.7 多肽 gCK-16 对 IBDV 感染后法氏囊组织病理学变化的影响

如图 7 所示, 与 Mock 组相比, IBDV 攻毒后 1 d, 法氏囊组织病理变化较轻; 在攻毒后 3 d, 淋巴滤泡水肿, 髓质内淋巴细胞坏死、数量明显减少, 皮质变薄; 在攻毒后 5 d, 淋巴滤泡严重萎缩, 滤泡间可见纤维组织增生, 皮质大部分消失、脱落, 髓质内淋巴细胞大量坏死减少、崩解, 形成数量不等的空泡状, 其周围环绕着未脱落的皮质; 在攻毒后 7 和 10 d, 淋巴滤泡持续萎缩、间隙明显增宽, 淋巴细胞坏死脱落, 随着感染时间延长, 其病理变化越来越明显, 尤其是皮髓质分界不清; 而 Vaccine+IBDV 组在 IBDV 攻毒后 7 d, 法氏囊有轻微的病理变化, 淋巴滤泡间隙增宽, 尤其是攻毒后 10 d, 淋巴滤泡结构模糊, 皮质有明显的脱落, 分界不清晰; 而 Vaccine+gCK-16+IBDV 组法氏囊淋巴滤泡结构完整, 发育正常,

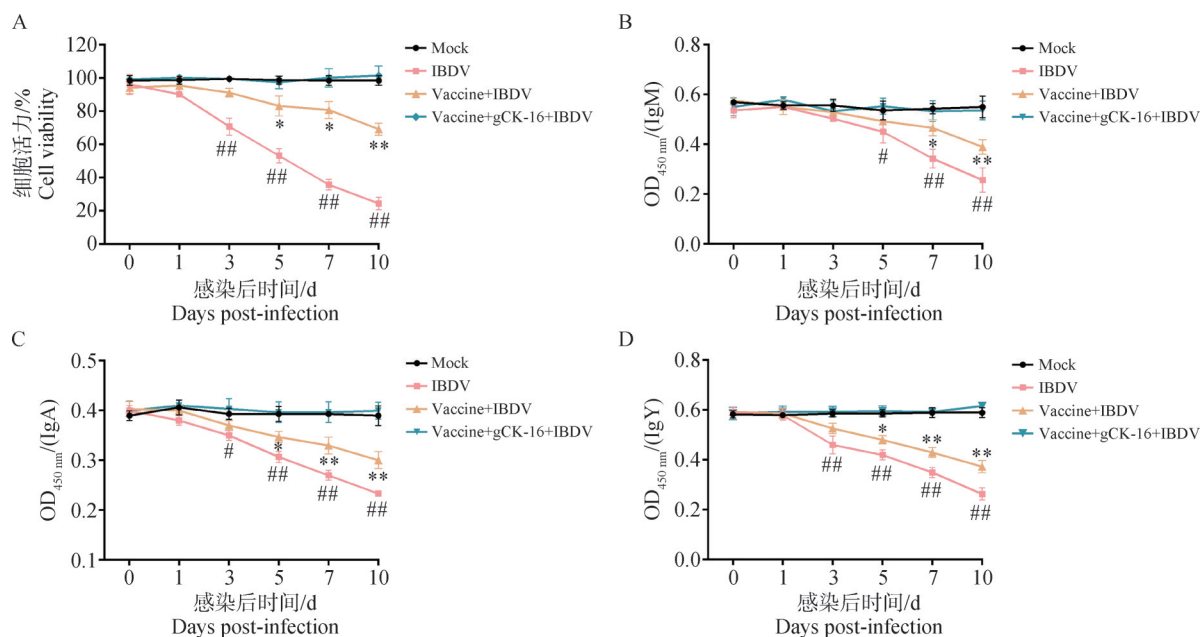
未见明显异常的病理变化。这些结果表明, 多肽 gCK-16 联合 IBD 弱毒疫苗免疫后可以显著降低 IBDV 感染引起的法氏囊损伤。

2.8 多肽 gCK-16 对 IBDV 感染后法氏囊凋亡相关蛋白的影响

Western blotting 结果显示, IBDV 感染后 0 和 1 d, 各组之间凋亡相关蛋白水平没有明显变化 (图 8A 和 B)。IBDV 攻毒后 3、5、7 和 10 d, 与 Mock 组相比, IBDV 组促凋亡相关蛋白 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 表达水平显著升高, 抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 蛋白水平显著降低, 而与 Vaccine+IBDV 组相比, Vaccine+gCK-16+IBDV 组显著降低了促凋亡相关蛋白 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 表达水平, 促进抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达水平 (图 8C、D、E 和 F)。这些结果表明, 多肽 gCK-16 联合 IBD 弱毒疫苗免疫后可以显著降低 IBDV 感染引起的法氏囊细胞凋亡。

3 讨论

IBD 弱毒疫苗正在全球范围内广泛使用, 以控



A. 脾淋巴细胞活力; B. 法氏囊中 IgM 水平; C. 法氏囊中 IgA 水平; D. 血清中 IgY 水平。与 Mock 组相比, # 表示差异显著 ($P < 0.05$), 而 ## 表示差异极显著 ($P < 0.01$); 与 Vaccine+gCK-16+IBDV 组相比, * 表示差异显著 ($P < 0.05$), 而 ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)

A. Splenic lymphocyte viability; B. The levels of IgM in the BF; C. The levels of IgA in the BF; D. The levels of IgY in the serum. Compared with the Mock group, # indicates a significant difference ($P < 0.05$), ## indicates an extremely significant difference ($P < 0.01$); Compared with the Vaccine+gCK-16+IBDV group, * indicates a significant difference ($P < 0.05$), ** indicates an extremely significant difference ($P < 0.01$)

图 6 多肽 gCK-16 增强 IBDV 感染后鸡脾淋巴细胞活力和免疫球蛋白水平

Fig. 6 Peptide gCK-16 enhanced the vitality of splenic lymphocytes and the level of immunoglobulins in IBDV-infected chickens

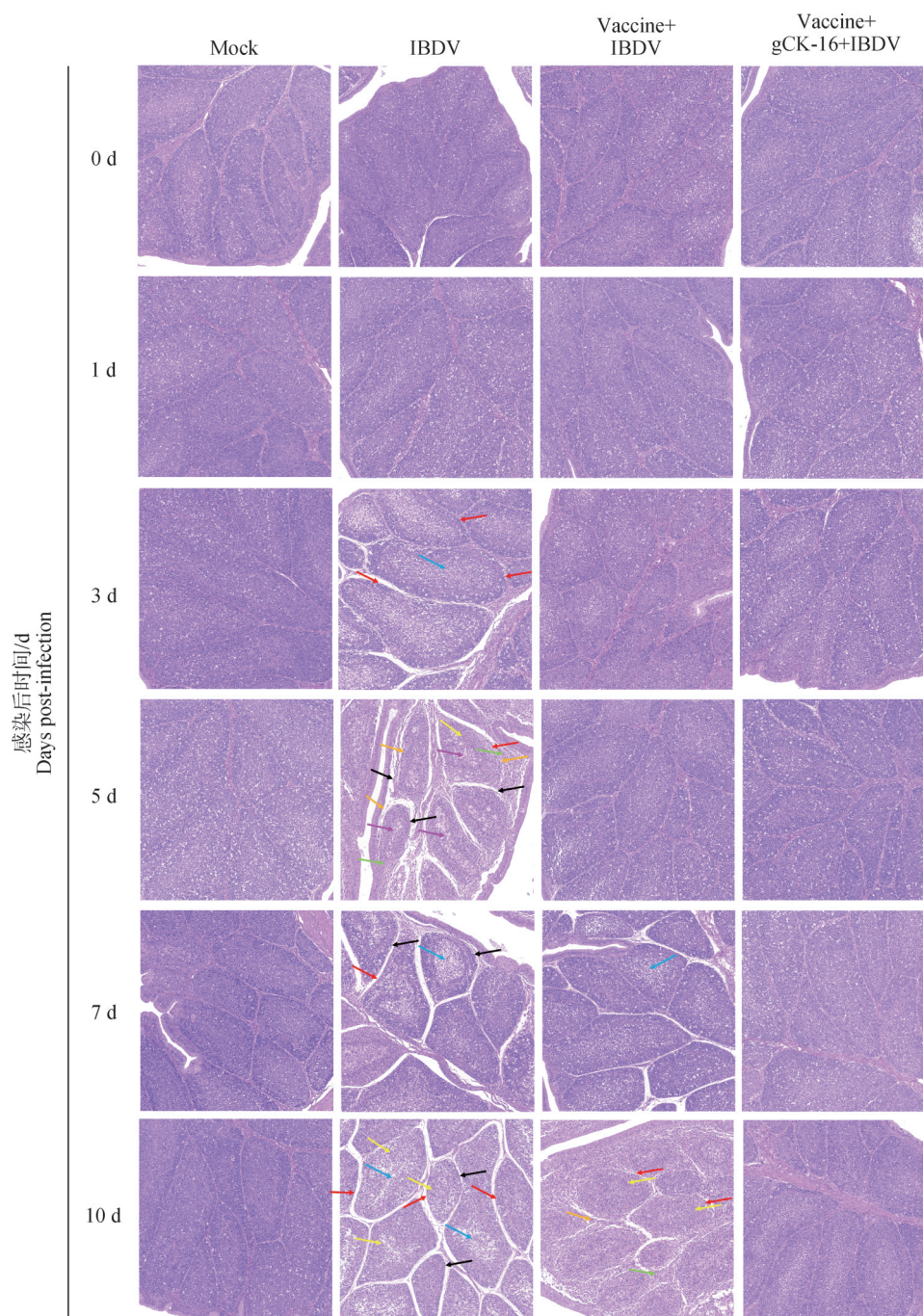
制该疾病,其效果也各不相同,尤其是在 IBDV 毒株变异和广泛流行的国家^[25-27]。但鸡群中经常出现免疫力低下以及严重的疫苗接种反应,导致免疫保护效果不佳,继发或混合感染一些其他病原体。这是由于 IBDV 弱毒疫苗通常会引起法氏囊中度或重度萎缩,这与淋巴细胞耗竭有关,导致免疫抑制^[28-29]。克服这些缺点的可用方法是开发免疫复合物疫苗或在免疫过程中尽量减少疫苗的接种体积^[30-31]。因此,将免疫增强剂与 IBD 弱毒疫苗联合使用是解决这一问题的一种有效方法。

前期研究我们已成功设计和筛选可用于有效阻断 PD-1/PD-L1 结合的多肽 gCK-16,在体外增强鸡 B 淋巴细胞功能方面进行了充分的验证^[21]。在本研究中,多肽 gCK-16 联合 IBD 弱毒疫苗免疫鸡后,可以显著增强疫苗的免疫反应。另外,攻毒保护实验也表明,多肽 gCK-16 可以有效地促进针对 IBDV 感染的免疫保护作用。

PBMCs 包含 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 NK 细

胞^[32]。其中,T 淋巴细胞执行细胞免疫功能,B 淋巴细胞是抗体产生的依赖性细胞,受抗原刺激之后发育为成熟的浆细胞,分泌抗体^[33-34]。因此,淋巴细胞增殖通常用于评估淋巴细胞在体液和细胞免疫反应中的作用^[35]。T 淋巴细胞对 Con A 有反应,而 B 淋巴细胞对 LPS 有反应^[36]。在本研究中,与仅用 IBD 弱毒疫苗免疫组相比,用含有多肽 gCK-16 联合 IBD 弱毒疫苗的鸡分离的 PBMCs 对 Con A 或 LPS 的增殖反应显著增加,表明 T 和 B 淋巴细胞都被激活。同时,在使用多肽 gCK-16 联合 IBD 弱毒疫苗组中,鸡血清中 IBDV 特异性抗体水平明显升高,与 IBDV 刺激的淋巴细胞增殖反应增加是一致的。这种增强的免疫反应可能是由于多肽 gCK-16 和 IBD 弱毒疫苗共同作用的结果。

细胞因子在禽类对致病性病原体的免疫反应中起着至关重要的作用^[37-38]。Th1 和 Th2 细胞是辅助 T 细胞中极其重要的两个亚群,Th1 细胞主要通过分泌 IFN- γ 参与细胞免疫反应,而 Th2 细胞则主



滤泡萎缩(黑色箭头);皮质变薄(红色箭头);皮质有明显的脱落(橘色箭头);髓质内淋巴细胞坏死、减少(蓝色箭头);滤泡间纤维组织增生(绿色箭头);空泡状(粉色箭头);皮髓质分界不清楚(黄色箭头)

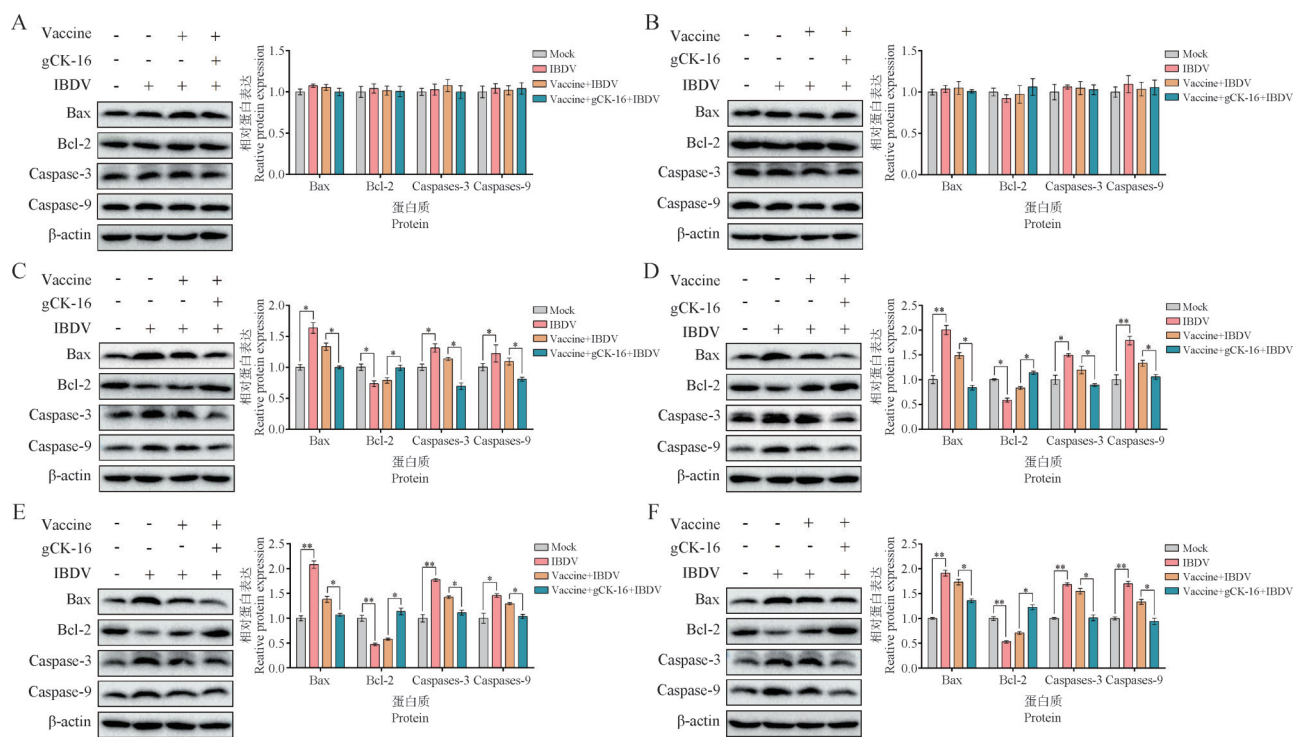
Follicular atrophy (Black arrow); Cortical thinning (Red arrow); Cortical with obvious exfoliation (Orange arrow); Lymphocyte necrosis and reduction in the medulla (Blue arrow); Fibrous tissue hyperplasia between follicles (Green arrow); Porous (Pink arrow); Indistinct boundary between the cortex and medulla (Yellow arrow)

图7 多肽gCK-16降低IBDV感染鸡后法氏囊组织病理变化(HE, 100×)

Fig. 7 Peptide gCK-16 decreased the histopathological change of BF in IBDV-infected chickens (HE, 100×)

要参与体液免疫应答,通过分泌IL-4和IL-6等细胞因子,促进B淋巴细胞的增殖、分化和抗体的产生^[39]。研究表明,鸡接种经典IBDV毒株疫苗后,可

导致血清中IFN- γ 和IL-6的上调^[40]。此外,血清中IL-4水平的含量也是评价疫苗免疫效果的重要指标之一^[41]。本研究结果表明,多肽gCK-16联合



A. IBDV 感染 0 d; B. IBDV 感染 1 d; C. IBDV 感染 3 d; D. IBDV 感染 5 d; E. IBDV 感染 7 d; F. IBDV 感染 10 d. *. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$

A. 0 d post-IBDV infection; B. 1 d post-IBDV infection; C. 3 d post-IBDV infection; D. 5 d post-IBDV infection; E. 7 d post-IBDV infection; F. 10 d post-IBDV infection. *. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$

图 8 多肽 gCK-16 对 IBDV 感染后法氏囊凋亡相关蛋白的影响

Fig. 8 The effects of peptide gCK-16 on the apoptosis-related proteins of BF tissues in IBDV-infected chickens

IBD 弱毒疫苗免疫后可以显著提高血清中 IFN- γ 、IL-6 和 IL-4 的表达水平,表明多肽 gCK-16 可以刺激 Th1 和 Th2 免疫反应,维持机体的正常免疫功能。

免疫器官的重量是评价家禽最常用的免疫指标之一^[42]。在本研究中,发现 IBDV 攻毒后体重显著降低。此外,在感染后 5、7 和 10 d,其法氏囊指数显著降低,这意味着 IBDV 感染的鸡法氏囊发生了严重病变,包括法氏囊萎缩和脱水。但是在感染后 3 d 法氏囊重量是增加的,这可能是由于在感染早期的代偿作用,而导致的法氏囊肿大。这些结果与之前的研究报道一致^[43-44]。先前的一项研究表明,法氏囊病变与 B 淋巴细胞耗竭的程度有关^[45]。本研究的攻毒保护试验结果显示,多肽 gCK-16 能显著提高鸡的存活率和法氏囊指数。IBDV 感染导致法氏囊组织中淋巴细胞广泛坏死和耗竭,核损伤。重要的是,法氏囊由 64.7% 以上的 B 淋巴细胞组成^[46]。此外,之前的研究表明,IBDV 感染可以溶解 B 淋巴细胞,导致 B 淋巴细胞急剧减少,严重影响机

体的免疫功能,降低机体特异性抗体水平,并增加疾病的易感性^[47]。因此,本研究分析多肽 gCK-16 对 IBDV 感染后法氏囊中 IgM 和 IgA 以及血清中 IgY 水平的影响。ELISA 分析结果显示,多肽 gCK-16 联合 IBD 弱毒疫苗免疫后,能显著提高 IgM、IgA 和 IgY 抗体水平,对免疫功能有正面影响。组织病理学分析也表明,多肽 gCK-16 可以减弱 IBDV 感染引起的法氏囊受损,与法氏囊指数基本相一致。

细胞凋亡在鸡的法氏囊损伤和免疫功能降低中起着至关重要的作用^[48]。IBDV 感染可以诱导法氏囊组织凋亡,笔者以前的研究结果也证实了这一点^[21]。因此,炎症和细胞凋亡导致 IBDV 诱导的免疫损伤,可能是这些因素相互作用,导致机体的免疫抑制^[49]。Western blotting 结果表明,IBDV 感染后,多肽 gCK-16 能显著抑制促凋亡相关蛋白 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 表达,促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达。总的来说,本研究的结果清楚地表明,根据 PBMCs 刺激指数、IBDV 抗体水平、细胞因子水平、存活率、法氏囊指数、免疫球蛋白水平、法氏囊组织

病理学病变和凋亡相关蛋白水平等相关指标,多肽 gCK-16 对 IBD 弱毒疫苗具有显著的免疫增强作用,但其作为免疫增强剂应用到商品化疫苗中还需要后续大量的临床试验数据进行验证和支撑。

4 结 论

总之,在本研究中,证明了多肽 gCK-16 显著增强 IBD 弱毒疫苗的体液免疫和细胞免疫应答,在 IBDV 攻毒试验中,具有较好的保护效果。基于综合研究结果可以得出结论,多肽 gCK-16 作为 IBD 弱毒疫苗的免疫增强剂具有显著的潜力和价值。本研究为开发有效和易获得的免疫增强剂开辟了一条新的途径,为解决 IBD 弱毒疫苗使用过程中存在的问题提供了迫切办法。

参考文献 (References):

- [1] LI G P, KUANG H Y, GUO H X, et al. Development of a recombinant VP2 vaccine for the prevention of novel variant strains of infectious bursal disease virus [J]. *Avian Pathol*, 2020, 49: 557-571.
- [2] NAZKI S, REDDY VRAP, KAMBLE N, et al. CD4+TGF β cells infiltrated the bursa of Fabricius following IBDV infection, and correlated with a delayed viral clearance, but did not correlate with disease severity, or immunosuppression [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1197746.
- [3] RAMON G, LEGNARDI M, CECCHINATO M, et al. Efficacy of live attenuated, vector and immune complex infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines in preventing field strain bursa colonization: A European multicentric study [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 978901.
- [4] MAHGOUB H A, BAILEY M, KAISER P. An overview of infectious bursal disease [J]. *Arch Virol*, 2012, 157: 2047-57.
- [5] GIMENO I M, SCHAT K A. Virus-induced immunosuppression in chickens. *Avian Dis*, 2018, 62 (3): 272-285.
- [6] GAO H, WANG Y Q, GAO L, et al. Genetic insight into the interaction of IBDV with host-A clue to the development of novel IBDV vaccines [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 8255. 14, 15.
- [7] 李向辉. 兽用刺五加多糖纳米制剂研制及其增强免疫力机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.
- LI X H. Study on preparation and immunity enhancement mechanism of *acanthopanax senticosus* polysaccharide nanoparticles [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021. (in Chinese)
- [8] 王雨龙. 鸡传染性法氏囊病病毒的基因分型及新型变异株亚单位疫苗的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- WANG Y L. An improved scheme for infectious bursal disease virus genotype classification and development of a subunit candidate vaccine against novel variant infectious bursal disease virus [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021. (in Chinese)
- [9] 罗世美, 陈韵伊, 李其沙, 等. 蓝舌病毒感染对绵羊微血管内皮细胞中 I 型干扰素应答的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55(12): 5631-5640.
- LUO S M, CHEN Y Y, LI Q S, et al. Effect of bluetongue virus infection on type I interferon responses in sheep lung microvascular endothelial cells [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2024, 55 (2): 5631-5640. (in Chinese)
- [10] LIM L W C, LEE J Y, CHEN C H, et al. Virus-like particles-based vaccine to combat neurodegenerative diseases [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2024.
- [11] WANG C X, YUAN F. A comprehensive comparison of DNA and RNA vaccines [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2024, 210: 115340.
- [12] 孙 洁. 羊口疮病毒作为 PCV2 亚单位疫苗及 PRRS 灭活疫苗佐剂的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2024.
- SUN J. Orf virus as adjuvant for PCV2 subunit vaccine and PRRS inactivated vaccine [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2024. (in Chinese)
- [13] CLARK I J D, OAKES R D, REDHEAD K, et al. Eimeria species parasites as novel vaccine delivery vectors: anti-Campylobacter jejuni protective immunity induced by Eimeria tenella-delivered CjaA [J]. *Vaccine*, 2012, 30: 2683-8.
- [14] MARUGAN-HRENANDEZ V, COCKLE C, MACDONALD S, et al. Viral proteins expressed in the protozoan parasite Eimeria tenella are detected by the chicken immune system [J]. *Parasit Vectors*, 2016, 9: 463.
- [15] ZHAO T M, CAI Y L, JIANG Y J, et al. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8: 283.
- [16] HOGENESCH H, O'HAGAN D T, FOX C B. Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in

- vaccines: you might just get what you want [J]. *NPJ Vaccines*, 2018, 3: 51.
- [17] 王若瑄. 大口黑鲈蛙虹彩病毒纳米铝佐剂灭活疫苗及免疫机制研究[D]. 天津:天津农学院, 2023.
- WANG R X. Development and immune mechanism study on the largemouth bass ranavirus-inactivated vaccine with nano-aluminum adjuvant [D]. Tianjin: Tianjin Agricultural University, 2023. (in Chinese)
- [18] THANH LE T, ANDREADAKIS Z, KUMAR A, et al. The COVID-19 vaccine development landscape [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19: 305-306.
- [19] LU J, WU J, MAO L X, et al. Revisiting PD-1/PD-L pathway in T and B cell response: Beyond immunosuppression [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2022, 67: 58-65.
- [20] OKAGAWA T, KONNAI S, GOTO S, et al. Development of a high-affinity anti-bovine PD-1 rabbit-bovine chimeric antibody using an efficient selection and large production system [J]. *Vet Res*, 2023, 54: 82.
- [21] ZHANG Q Y, SUN G P, YUE F, et al. Peptide-directed interference of PD-1/PD-L1 binding increases B lymphocyte function after infectious bursal disease viral infection [J]. *Poult Sci*, 2024, 103: 104389.
- [22] 潘进喆. 鸡传染性法氏囊亚单位疫苗的制备及免疫效果的应用基础研究[D]. 南京:南京农业大学, 2019.
- PAN J Z. Basic research on preparation and immune effect of infectious bursal of chicken subunit vaccine [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [23] LUPINI C, FELICE V, SILVEIRA F, et al. Comparative *in vivo* pathogenicity study of an ITA genotype isolate (G6) of infectious bursal disease virus [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67(2): 1025-1031.
- [24] 宋幸辉. 人参皂苷 Rb1 对鸡传染性法氏囊弱毒疫苗免疫增强作用及其机制研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2022.
- SONG X H. Immunoenhancement effect of ginsenoside Rb1 on chicken infectious bursal disease attenuated vaccine and its mechanism [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [25] YANG H, WANG Y, YE C J. Rapid generation of attenuated infectious bursal disease virus from dual-promoter plasmids by reduction of viral ribonucleoprotein activity [J]. *J Virol*, 2020, 94: e01569-19.
- [26] TAKAHASHI M, OGURO S, KATO A, et al. Novel antigenic variant infectious bursal disease virus outbreaks in Japan from 2014 to 2023 and characterization of an isolate from chicken [J]. *Pathogens*, 2024, 13: 1141.
- [27] OKURA T, OTOMO H, SUZUKI S, et al. Efficacy of a novel in ovo-attenuated live vaccine and recombinant vaccine against a very virulent infectious bursal disease virus in chickens [J]. *J Vet Med Sci*, 2021, 83: 1686-1693.
- [28] GRAZIOSI G, CATELLI E, FANELLI A, et al. Infectious bursal disease virus in free-living wild birds: A systematic review and meta-analysis of its sero-viroprevalence on a global scale [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69: 2800-2815.
- [29] ZHANG T, WANG S Y, LIU Y Z, et al. Advances on adaptive immune responses affected by infectious bursal disease virus in chicken [J]. *Front Immunol*, 2024, 14: 1330576.
- [30] WU P P, LU J H, FENG L, et al. Antigen-sparing and enhanced efficacy of multivalent vaccines adjuvanted with immunopotentiators in chickens [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 927.
- [31] 叶丽娜, 李林, 沈佳, 等. 鸡传染性法氏囊病免疫复合物疫苗与活疫苗体外介导鸡淋巴细胞 NF- κ B 表达的调节通路研究 [J]. *动物医学进展*, 2020, 41(6): 42-46.
- YE L N, LI L, SHEN J, et al. Regulation pathways of NF- κ B expression *in vitro* lymphocytes of chicken induced by infectious bursal disease immune complex vaccine and live vaccine [J]. *Advances in Animal Medicine*, 2020, 41(6): 42-46. (in Chinese)
- [32] XIONG L L, DU R L, NIU R Z, et al. Single-cell RNA sequencing reveals peripheral immunological features in Parkinson's disease [J]. *NPJ Parkinsons Dis*. 2024, 10(1): 185.
- [33] CHAPLE A R, VISPUTE M M, MAHAJAN S, et al. Relational interaction between T-lymphocytes and SARS-CoV-2: A review [J]. *Acta Virol*, 2021, 65: 107-114.
- [34] 李亚防. B 淋巴细胞调控 Th1/Th2 失衡参与饲养者肺炎损伤的分子机制研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学, 2022.
- LI Y F. B Lymphocytes regulating Th1/Th2 imbalance is involved in the immune mechanism of pigeon shedding-induced fibrotic allergic pneumonia [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2022. (in Chinese)

- [35] SHARMA R, SMOLKIN R M, CHOWDHURY P, et al. Distinct metabolic requirements regulate B cell activation and germinal center responses [J]. *Nat Immunol*, 2023, 24: 1358-1369.
- [36] SHARMA A, KHAN M A, TIRPUDE N V. Leupeptin maintains redox homeostasis via targeting ROS-autophagy-inflammatory axis in LPS-stimulated macrophages and cytokines dichotomy in Con-A challenged lymphocyte [J]. *Peptides*, 2023, 168: 171066.
- [37] LEVKOVICH G, ALMAGOR D, SAIBABA G, et al. A decline in avian cytokine expression with age revealed by commercially available cytokine array [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1171782.
- [38] MIN S L, HE P, ZHOU Q T, et al. The dual role of cytokine responses to Chlamydia trachomatis infection in host pathogen crosstalk [J]. *Microb Pathog*, 2022, 173: 105812.
- [39] MA X, BI S, WANG Y, et al. Combined adjuvant effect of ginseng stem-leaf saponins and selenium on immune responses to a live bivalent vaccine of Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus in chickens [J]. *Poult Sci*, 2019, 98: 3548-3556.
- [40] BUTCHER M J, ZHU J. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice [J]. *Fac Rev*, 2021, 10: 30.
- [41] JAIME J, VARGAS-BERMUDEZ D S, YITBAREK A, et al. Differential immunomodulatory effect of vitamin D (1, 25 (OH) 2 D3) on the innate immune response in different types of cells infected *in vitro* with infectious bursal disease virus [J]. *Poult Sci*, 2020, 99: 4265-4277.
- [42] WANG Z, LI X, DU S H, et al. Protective effects of zinc on *Salmonella* invasion, intestinal morphology and immune response of young pigeons infected with *Salmonella enterica* serovar typhimurium [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2022, 200: 4817-4827.
- [43] XU Z Y, YU Y, FU S X, et al. The effect of ghrelin on bursa and cecal tonsils of chickens infected with an attenuated virus strain of infectious bursal disease virus [J]. *Poult Sci*, 2024, 103: 103547.
- [44] 刘文健, 刘吉文, 覃依依, 等. 2 株肉鸡源传染性法氏囊病毒的分离鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56(05): 73-81.
- LIU W J, LIU J W, QIN Y Y, et al. Isolation and identification of two strains of infectious bursal disease virus from broilers [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2024, 56(05): 73-81. (in Chinese)
- [45] TRAPP-RAGNETF L, SCHERMULY J, KHN M, et al. Marek's disease virus prolongs survival of primary chicken B-cells by inducing a senescence-like phenotype [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17: e1010006.
- [46] LIU AJ, PAN Q, WANG S Y, et al. Identification of chicken CD44 as a novel B lymphocyte receptor for infectious bursal disease virus [J]. *J Virol*, 2022, 96: e0011322.
- [47] ZHANG Q, LUO D L, GU XD, et al. MiR-144-3p targets STC1 to activate PI3K/AKT pathway to induce cell apoptosis and cell cycle arrest in selenium deficiency broilers [J]. *J Inorg Biochem*, 2022, 226: 111665.
- [48] SHAH A U, LI Y, OUYANG W, et al. From nasal to basal: single-cell sequencing of the bursa of Fabricius highlights the IBDV infection mechanism in chickens [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11: 212.
- [49] HUANG XW, LIU W, ZHANG JY, et al. Very virulent infectious bursal disease virus-induced immune injury is involved in inflammation, apoptosis, and inflammatory cytokines imbalance in the bursa of Fabricius [J]. *Dev Comp Immunol*, 2021, 114: 103839.

(编辑 白永平)