

文章编号: 1674-7054(2023)04-0433-08



脂多糖刺激的鸡巨噬细胞源外体对文昌鸡树突状细胞的活化作用

邢巍文, 谢言, 覃尧

(海南大学动物科技学院, 海口 570228)

摘要: 为了探究脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS) 激活的鸡巨噬细胞来源的外体能否作为免疫佐剂应用于文昌鸡(*Gallus domesticus*)的疫病防控, 通过超速离心法提取外体, 应用透射电镜、粒径分析方法对外体进行鉴定; 然后通过 PKH67 染料标记外体, 将外体与文昌鸡骨髓来源的树突状细胞(dendritic cell, dc)共孵育, 最后利用荧光显微镜观察树突状细胞对外体的摄取情况以及活化情况。结果表明, 脂多糖刺激鸡巨噬细胞来源的外体可以被文昌鸡来源的树突状细胞摄取, 并能促进树突状细胞的活化。

关键词: 外体; 巨噬细胞; 树突状细胞; 文昌鸡; 脂多糖

中图分类号: S 851.4 **文献标志码:** A

引用格式: 邢巍文, 谢言, 覃尧. 脂多糖刺激的鸡巨噬细胞源外体对文昌鸡树突状细胞的活化作用 [J]. 热带生物学报, 2023, 14(4): 433-440. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2023.04.011

抗原呈递细胞(Antigen presenting cell, APC)如树突状细胞、巨噬细胞以及B细胞等是免疫系统中完成捕获与传递抗原信号、激活免疫应答的重要组成部分。APC分泌的外体可通过传递膜结合分子、细胞因子以及微RNA等组分参与调控免疫应答。巨噬细胞在免疫系统中发挥着重要作用, 主要有吞噬、抗原呈递和分泌炎症相关细胞因子等^[1]。巨噬细胞具有可塑性, 表现出不同的表型和功能。其中, 脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)常用于诱导巨噬细胞的活化。LPS是革兰氏阴性细菌细胞壁外壁的组成成分, 是由脂质和多糖构成的细菌内毒素。在免疫系统中, 巨噬细胞通过Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)识别革兰氏阴性菌的脂多糖, 激活细胞内途径, 如核因子 κ B途径, 诱导促炎细胞因子的表达, 促进抗原呈递以及炎症反应。有研究结果^[2-4]表明, 在细菌感染情况下的巨噬细胞会释放携带病原体相关分子模式(PAMP)的外体, 并通过Toll样受体激活巨噬细

胞分泌细胞因子, 进一步诱导记忆CD4⁺T和CD8⁺T细胞的成熟。

外体是由细胞分泌的含有多种生物活性物质, 主要由蛋白质、核苷酸和脂类等组成的具有膜结构的微小囊泡。作为天然纳米结构, 外体的直径为30~150 nm, 是参与细胞间通信的重要物质。免疫细胞分泌的外体可以通过传递膜结合分子和miRNAs等来实现调节免疫功能。LPS刺激的巨噬细胞所分泌的外体参与调节免疫反应^[5-6]。此类外体具有免疫佐剂的潜能。据报道, LPS诱导的小鼠巨噬细胞系分泌的外体可诱导小鼠体内产生大量的IFN- γ , 促进Th1型细胞免疫^[7]。并且, LPS刺激的鸡巨噬细胞(HD11)所分泌的外体通过MyD88/NF- κ B信号通路促进免疫应答^[8]。目前, 对脂多糖刺激鸡巨噬细胞产生的外体对免疫应答的影响并不完全清楚。成熟的树突状细胞能有效激活幼稚T细胞, 也可以直接激活CD4⁺T和CD8⁺T细胞, 处于启动、调控、并维持免疫应答

收稿日期: 2022-02-25

修回日期: 2022-05-10

基金项目: 国家自然科学基金(31802173); 海南大学E类引进人才科研启动项目[KYQD(ZR)1937]

第一作者: 邢巍文(1997-), 女, 海南大学动物科技学院2019级硕士研究生. E-mail: 547661826@qq.com

通信作者: 覃尧(1988-), 女, 博士, 讲师. 研究方向: 动物分子病毒学与免疫学. E-mail: 993746@hainanu.edu.cn

的中心环节^[9]。因此,作为重要的抗原呈递细胞,禽类树突状细胞能否被 LPS 诱导的 HD11 源外体活化是决定此类外体能否作为免疫佐剂用于家禽的疫病防控的关键因素。

家禽品种多且 MHC 分子等基因具有多态性,免疫性状及免疫相关分子应答亦有一定差异,因此不同品种的鸡对 HD11 源外体的免疫应答调控可能也存在差异。海南地方优良肉鸡品种文昌鸡 (*Gallus domesticus*) 与其他鸡种间存在较大差异的免疫性状,特别是在抗禽流感和新城疫病毒感染过程中,文昌鸡免疫性状明显优于国外引进鸡种^[10]。文昌鸡与其他种鸡之间 MHC 分子抗原呈递结构也存在差异^[11]。由于 HD11 细胞并不来源于文昌鸡,而外体的功能与外体来源及其作用的靶细胞息息相关。据此,本研究以文昌鸡骨髓源树突状细胞作为研究对象,探究 LPS 刺激的 HD11 源外体对其活化作用,为后期以 LPS 诱导的 HD11 源外体作为免疫佐剂用于文昌鸡疫病防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系 鸡源巨噬细胞系(HD11 细胞),文昌鸡骨髓源树突状细胞。

1.2 实验动物 14 日龄文昌鸡,用于提取骨髓源树突状细胞。

1.3 主要仪器 超净工作台(苏州净化),高速离心机(力康发展有限公司),各个规格移液枪(Eppendorf),超速离心机 Optima L-100XP(Beckman Coulter),全波长酶标仪 Infinite M200 PRO[瑞士 TECAN 勒菲生物科技(上海)有限公司],荧光显微镜 BX51(OLYMPUS 公司),荧光定量 PCR 仪 Q2000B(杭州朗基科学仪器有限公司),PCR 仪 S100TMTThermal Cycler(美国 Bio-Rad)。

1.4 主要试剂 脂多糖、淋巴细胞分离液购自索莱宝生物科技有限公司;RIPA 裂解液购自博士德生物公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海生物工程技术有限公司;PKH67 染料试剂盒、高糖培养基购自 HyClone;胎牛血清购自 Gibco;无外体血清购自 SBI;鸡脂多糖 ELISA 检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。重组鸡 GM-CSF、IL-4 细胞因子购于 Abcam 公司;总 RNA 提取试

剂盒、FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂和 SuperReal 荧光定量预混试剂购于天根生化科技有限公司;上下游引物由生工生物合成。

1.5 脂多糖诱导的 HD11 源外体的分离、提取与鉴定

1.5.1 细胞培养及刺激 用含有 10% 胎牛血清的培养基于培养箱(37 °C, 含 5% CO₂)中培养生长状态良好的 HD11 细胞,并在无菌条件下进行传代等操作。待细胞密度达 70%~80% 时,进行细胞传代操作,将 HD11 细胞分别按照 5×10^6 个·mL⁻¹ 细胞密度 5×10^6 个·mL⁻¹ 接种于 T25 细胞培养瓶中,并更换细胞培养液中的血清,配制 2% 含有无外体血清的培养液继续培养细胞,并将细胞分为试验组(脂多糖组)与对照组。试验组的细胞培养液中加入终浓度为 20 μg·mL⁻¹ 的脂多糖刺激细胞,继续培养 24 h。

1.5.2 外体的分离与提取 将未加脂多糖刺激的 HD11 细胞和加入脂多糖刺激的 HD11 细胞分别按照 5×10^6 个·mL⁻¹ 细胞密度接种于 T25 细胞培养瓶中,以 2% 无外体胎牛血清进行培养 24 h 后,每种细胞收集 100 mL 细胞培养上清。在 4 °C, 2 000×g 离心 30 min 条件下离心去除杂质,保留上清。将上清液移至新的离心管中,10 000 × g, 4 °C 离心 45 min 去除较大的囊泡或细胞碎片,然后经无菌 0.45 μm 滤膜过滤,收集过滤产物。将上述滤液加入 100 kDa 的超滤管中,于 4 °C 进行离心浓缩,将 100 mL 细胞上清总体积浓缩至 5 mL,经无菌 0.45 μm 滤膜过滤,收集过滤液。将过滤液移至超速离心管中,4 °C, 100 000 × g 离心 70 min,去除上清,用 10 mL 预冷的 1×PBS 重悬后,再次以 4 °C, 100 000 × g 条件,超速离心 70 min 后,收集沉淀即得到外体。收集全程均在超净台中完成,整个过程中使用的相关耗材及试剂均需高压灭菌或使用商品化无菌一次性材料。

1.5.3 脂多糖残留检测分析 收集超速离心洗涤外体的 PBS 上清液,用于检测其中的脂多糖残留量。配制脂多糖标准品溶液,并根据试剂盒说明书进行后续加样、洗板等操作。随后使用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。绘制标准曲线,并根据所得标准曲线计算洗涤外体后 PBS 上

清液中的脂多糖含量。

1.5.4 外体的鉴定 外体的透射电镜鉴定用 150 μL 预冷的 $1\times\text{PBS}$ (经 0.22 μm) 均匀重悬外体, 吸取样品 10 μL 滴加于铜网上沉淀 1 min, 滤纸吸去浮液。然后用磷钨酸 10 μL 滴加于铜网上沉淀 1 min, 滤纸吸去浮液。常温干燥数分钟后, 以 100 kv 进行电镜检测成像, 获得透射电镜成像结果。外体的粒径分析与纳米颗粒浓度测定取 10 μL 外体样本于 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴解冻, 用 PBS 进行稀释 ($V:V=1:1$), 直接用于粒径大小检测 (Flow NanoAnalyzer), 剩余外体于 -80°C 保存。

1.5.5 外体浓度测定 梯度稀释牛血清白蛋白 (BSA) 标准品, 制备 BCA 工作液 (具体操作按说明书进行)。将各个稀释浓度的蛋白质标准品和待测蛋白质样品加入酶标板中, 分别加入 200 μL BCA 工作液混匀。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。测定品在 562 nm 波长的吸光值。制作标准曲线, 并计算出外体样品的蛋白浓度。

1.5.6 外体染色 取无菌 1.5 mL 离心管, 加入稀释液 C 以及 PKH67 染料 (PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit, MERCK), 配制成染料工作液。在无菌条件下, 向每管分别加入稀释液 C 至总体积为 250 μL 。用枪轻柔吹打混匀 30 次, 再振荡 15 s。快速将 250 μL 外体稀释液加入到 250 μL PKH67 (MINI67, 购于 Sigma-Aldrich) 染料工作液中, 立即用枪轻柔吹打混匀 30 次。混合液孵育 3 min 后, 每管加入 500 μL 无外体血清并吹打混匀

30 次, 终止反应后并再次使用超速离心分离纯化外体, 以去除残留的染料。

1.6 文昌鸡骨髓源树突状细胞的制备 将在隔离器中饲养的 14 日龄文昌鸡麻醉处死后, 从其胫骨骨髓中分离得到骨髓, 制成骨髓细胞悬液备用。将骨髓细胞悬液 1500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清, 收集细胞沉淀, 加入 PBS 缓冲液离心洗涤 2~3 次, 弃上清后重悬, 制备单细胞悬液。然后, 加入与单细胞悬液等量的鸡骨髓淋巴细胞分离液 (购自索莱宝), 按说明书操作提取骨髓细胞后, 于 10% 胎牛血清 FBS, RM1640 培养基培养 (均购自 Gibco), 培养 24 h 后, 加入含细胞因子重组鸡 GM-CSF、IL-4 细胞因子 (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 购于 Abcam 公司) 培养液, 持续培养作用 7 d ~ 10 d, 前 3 d 每天换 1 次培养液, 之后可 2 d 换 1 次培养液。

1.7 LPS-Exo、Nor-Exo 刺激树突状细胞 用 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 终浓度的 Nor-Exo、LPS-Exo 刺激树突状细胞, 在刺激 24 h 后通过荧光显微镜观察 LPS-Exo、Nor-Exo 是否被树突状细胞摄取以及摄取后发生的形态变化。

1.8 荧光定量 PCR 分别收集无外体刺激的树突状细胞 (Ctrl 组) 以及经外体 Nor-Exo、LPS-Exo 作用后的树突状细胞, 提取细胞总 RNA 后反转录为 cDNA, 用于荧光定量 PCR。根据试剂盒说明书配制反应体系, 通过荧光定量 PCR, 以 β -actin 为内参, 检测细胞因子 IFN- γ 、IL-12p40 表达。IFN- γ 、IL-12p40、 β -actin 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

样本名称	Forward	Reverse
IFN- γ	ATCATACTGAGCCAGATTGTTTCG	TCTTTCACCTTCTTCACGCCAT
IL-12p40	ACTTTCCTTTGCTGCCCTTCTGG	GCTGGTGTCTCATCGTTCCACTC
IL-4	TCCCTCAAGGTAAGGCTCTGT	GGCTGTGTGAGAGGAGAACG
β -actin	ACGTCGCACTGGATTTCGAG	TGTCAGCAATGCCAGGGTAC

2 结果与分析

2.1 脂多糖诱导的 HD11 源外体的分离、提取与鉴定

2.1.1 HD11 细胞系的培养及刺激 生长状态良好的 HD11 细胞在更换培养液培养 24 h 后, 在倒置显微镜下观察其生长状态, 可见经脂多糖刺激

后的 HD11 细胞形态与刺激前相比发生了明显的变化。对照组 HD11 细胞并未发生明显的活化, 而脂多糖组 HD11 细胞大量活化 (图 1)。

2.1.2 外体的提取与鉴定 将已经制备好的脂多糖组 (LPS-Exo) 以及对照组 (Nor-Exo) 外体样本, 用于透射电镜以及粒径分析。通过透射电镜观察外体形态、粒径大小 (图 2)。在透射电镜中观察

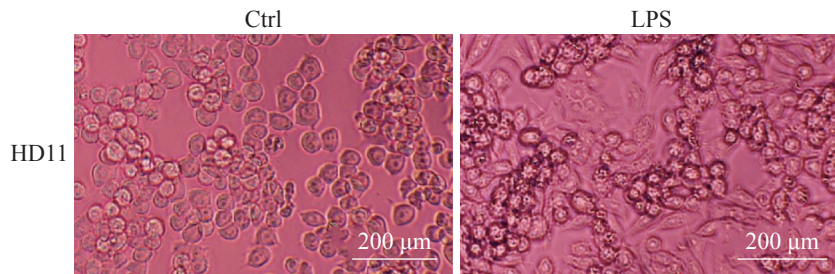


图1 脂多糖刺激 HD11 细胞前后

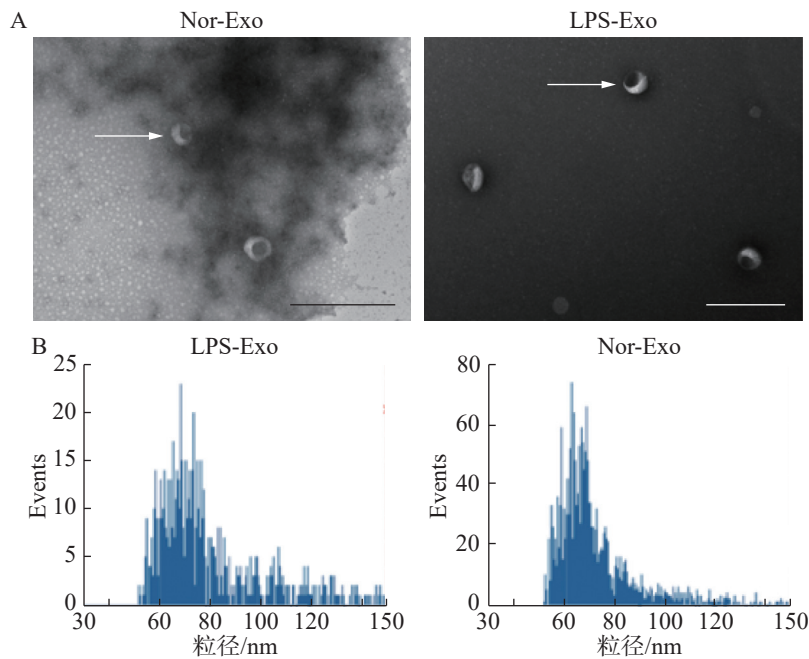


图2 透射电镜及粒径分析

A: 外体在透射电镜下的形态; B: 外体的粒径分析。LPS-Exo 平均粒径 74 nm, Nor-Exo 平均粒径 79 nm。

到 2 组样本的形态(图中白色箭头所指)均为一侧凹陷的半球型(图 2-A)。此外,通过粒径分析(图 2-B),样本中的颗粒均符合外体粒径范围(30 ~ 150 nm)(图 2-B)。综上所述,2 组样本的外体的形态与粒径大小均符合外体的描述,由此可以证明通过超速离心法分离得到了外体。

2.1.3 脂多糖残留检测分析 脂多糖残留的检测根据试剂盒说明书进行操作,随后用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长的 *OD* 值。依据 *OD* 值绘制标准曲线,根据标准曲线计算出 Nor-Exo 组、LPS-Exo 组外体经过洗涤后 PBS 上清中的脂多糖残留量。经过 1 次洗涤后,若洗涤外体的 PBS 中无脂多糖残留,则可以证明提取到的外体中无脂多糖残留。结果显示, Nor-Exo 组上清中脂多糖含量为 $0.0118 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, LPS-Exo 组上清中脂多糖含量为 $0.0128 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (EU 为内毒素单位), 2 组外体中脂多糖含量相近。由于 Nor-Exo 组在实验过

程中并未加入脂多糖,且 2 组脂多糖残留浓度无明显差异,通过对比 2 组外体洗涤后 PBS 上清中 LPS 含量可知 LPS-Exo 组的 LPS 含量属于正常范围。能够激活免疫细胞的 LPS 最小剂量为 $0.2 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 而本试验中检测到的脂多糖残留量不足以刺激细胞使其生理状态发生改变。综上所述, LPS-Exo 组中所添加的脂多糖已基本去除,且其残留量对后续试验结果没有影响。

2.2 文昌鸡骨髓源树突状细胞的提取 提取文昌鸡骨髓源细胞,并且加入细胞因子(GM-CSF、IL-4)刺激诱导其分化,悬浮的骨髓源细胞经过刺激 7 d 后出现贴壁的情况,有明显的细胞集落形成(图 3 中黑色箭头所指)。

2.3 树突状细胞摄取 LPS-Exo、Nor-Exo 后的形态变化 PKH67 是一种膜染料,可对细胞膜进行染色,使被染色的膜结构带有绿色荧光。外体经 PKH67 染色后,再次通过超速离心法去除游离的

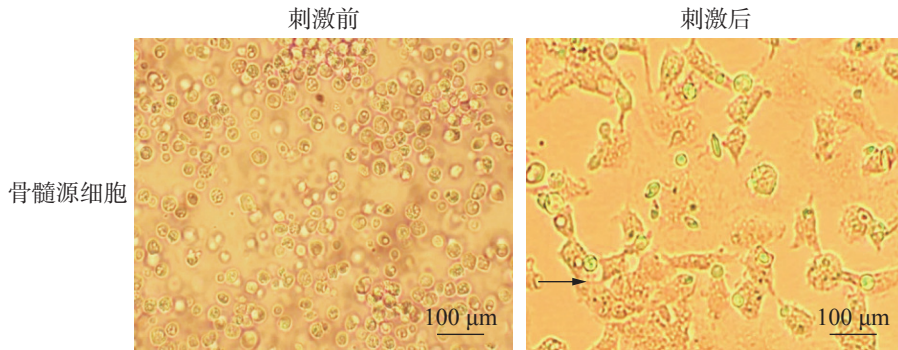


图 3 文昌鸡骨髓细胞诱导分化前后

染料分子, 将制备好的外体经 PKH67 染色后按照 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的终浓度刺激树突状细胞。通过荧光显微镜观察树突状细胞对这两种外体的摄取情况 (图 4)。存在树突状细胞的位置, 在荧光视野下可以检测到由 PKH67 标记外体的绿色荧光信号, 由

此可以证明 2 组外体均被树突状细胞摄取, 并且, LPS-Exo 刺激的树突状细胞伪足形成明显强于 Nor-exo 处理组, 说明 LPS-Exo 处理的树突状细胞活化水平较高。

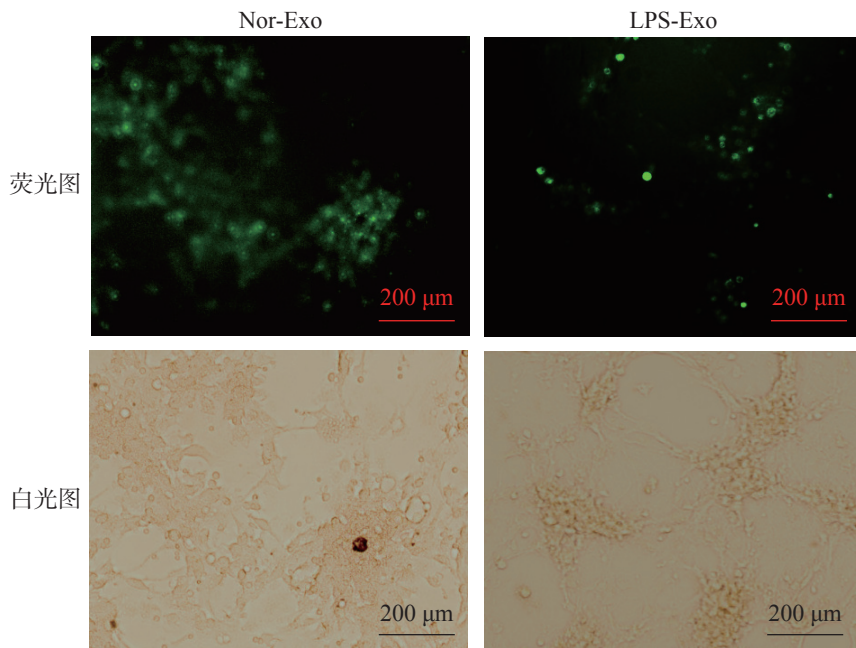


图 4 树突状细胞摄取外体

2.4 细胞因子表达水平 通过荧光定量 PCR 检测树突状细胞活化后产生诱导辅助型 T 淋巴细胞分型的相关细胞因子 IFN- γ 、IL-12p40 和 IL-4 的表达水平 (图 5)。与 Nor-Exo 组对比, 经 LPS-Exo 刺激后, 活化的树突状细胞产生诱导辅助型 T 细胞向 Th1 型分化的细胞因子 IFN- γ 、IL-12p40 表达量均上调, 而 Th2 型细胞因子 IL-4 的表达量无明显差异。该结果表明, LPS 诱导鸡巨噬细胞的外体可体外诱导文昌鸡树突状细胞活化产生分泌 Th1 型细胞因子, 促进细胞免疫应答。

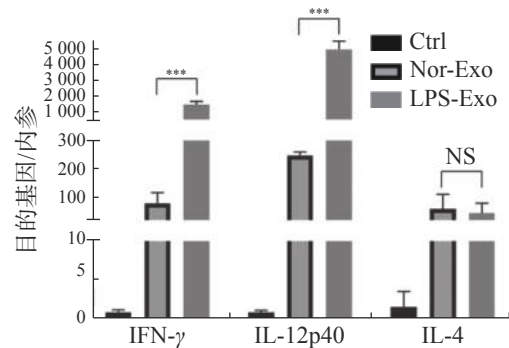


图 5 荧光定量 PCR 检测相关细胞因子表达量
统计学方法为 One-way ANOVA, ***表示 $P < 0.001$, 具有极显著差异, $n=3$ 。

3 讨论

本研究通过体外实验探究 LPS 刺激的鸡巨噬细胞的外体对文昌鸡骨髓树突状细胞活化的影响,结果表明,LPS 刺激鸡巨噬细胞产生的外体可被文昌鸡树突状细胞摄取并诱导树突状细胞活化,同时分泌大量的 Th1 型细胞因子以促进细胞免疫应答。本研究结果为开发脂多糖刺激巨噬细胞源外体(作为一种新型疫苗佐剂)用于文昌鸡的疫病防控提供了理论基础。

鸡的树突状细胞与哺乳动物类似,也具有主导辅助型 T 细胞向 Th1 型和 Th2 型分化的功能^[12]。其中, Th1 型细胞促进炎症反应以及活化巨噬细胞、NK 细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞,产生针对内源性抗原如病毒、胞内寄生菌和原虫感染的免疫应答。Th2 型细胞主要介导针对外源性抗原如胞外寄生虫、细菌、过敏原和毒素的体液免疫应答,产生大量抗体以及抗体介导的免疫反应的活化。Th2 型细胞在一定程度上抑制 Th1 型细胞的功能,以维持一定的炎症以及细胞损伤稳态。IFN- γ 、IL-12p40 均为 Th1 型细胞因子,可诱导 T 细胞向 Th1 型活化;而 IL-4 为 Th2 型细胞因子,可诱导 T 细胞向 Th2 型活化;其中 IL-12p40 可诱导自然杀伤细胞的增殖以及 IFN- γ 的产生,增强 CD8⁺T 细胞的作用^[13]; IFN- γ 可增强 MHC-II 类分子的作用,可拮抗 IL-4,抑制 Th2 增殖^[14]; IL-4 可以下调 IL-12 的水平而抑制 Th1 型分化^[15]。

有学者利用鸡重组 GM-CSF、IL-4 细胞因子实现了鸡骨髓源树突状细胞的体外构建,并用 LPS 诱导该类树突状细胞活化后检测到 IFN- γ 、IL-12p40 等 Th1 型细胞因子的表达上调以及 Th2 型细胞因子 IL-4 的下调表达,并通过淋巴细胞混合实验证实经 LPS 激活的树突状细胞具有提高 T 淋巴细胞增殖能力的功能^[16]。与上述研究结果相似,本研究通过荧光定量 PCR 分析 mRNA 水平的数据显示,与未加入外体刺激的树突状细胞相比,外体作用条件下,无论 Nor-Exo 或 LPS-Exo 均能诱导树突状细胞 Th1 型细胞因子 IFN- γ 、IL-12p40 的表达增多,而 IL-4 表达量无明显差异。Nor-Exo 对树突状细胞的活化作用可能由于其本身来源于非文昌鸡细胞,因此某些差异蛋白可能作为抗原被文昌鸡骨髓源树突状细胞识别而活化

并发生抗原呈递反应。但 LPS-Exo 刺激树突状细胞活化产生的细胞因子水平要显著高于 Nor-Exo,这也与本研究在光镜下观察到 LPS-Exo 诱导的树突状细胞伪足形成较多的结果相符。由于已排除残留 LPS 的干扰,因此,本研究表明 LPS 诱导鸡巨噬细胞源外体与 LPS 有相同的作用,可体外诱导文昌鸡树突状细胞活化并促进下游 Th1 免疫应答。由于 LPS 具有一定的毒性,使其作为佐剂使用受到限制。而外体的生物相容性好,所以 LPS-Exo 有望成为有效替代 LPS 的新型佐剂。

已有研究表明,被病原体感染的巨噬细胞会释放更多的外体,而携带 MHC-I、MHC-II 复合物等分子的这些巨噬细胞源外体特别是在存在树突状细胞的情况下,可以刺激 T 细胞使其活化^[2,17-18]。另一方面,有学者对 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的外体进行了蛋白组学的分析,结果显示其中含有大量促炎因子,并且该外体参与了多种炎症信号通路的激活^[19]。据此,LPS 刺激的鸡巨噬细胞源外体也可能由其携带的促炎因子或膜表面免疫复合物介导的树突状细胞活化,诱导产生 Th1 型细胞因子以促进清除病原感染细胞的免疫应答反应。后续需进一步探究鸡巨噬细胞源外体在免疫应答反应中参与的分子事件以及相关机制。

综上所述,脂多糖刺激鸡巨噬细胞释放的外体可被文昌鸡树突状细胞摄取,并且可以诱导文昌鸡树突状细胞活化,该外体具有作为免疫佐剂的潜在功能,有着良好的应用前景。

参考文献:

- [1] KOH T J, DIPIETRO L A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage [J]. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2011, 13: e23.
- [2] GIRI P K, SCHOREY J S. Exosomes derived from *M. bovis* BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2008, 3(6): e2461.
- [3] BHATNAGAR S, SHINAGAWA K, CASTELLINO F J, et al. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response *in vitro* and *in vivo* [J]. *Blood*, 2007, 110: 3234 - 3244.
- [4] CRONEMBERGER-ANDRADE A, ARAGÃO-FRANÇA L, DE ARAUJO C F, et al. Extracellular vesicles from *Leishmania*-infected macrophages confer an anti-infec-

- tion cytokine-production profile to naïve macrophages [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014, 8(9): e3161.
- [5] VEERMAN R E, GÜÇLÜLER AKPINAR G, ELDH M, et al. Immune cell-derived extracellular vesicles - functions and therapeutic applications [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2019, 25(5): 382 - 394.
- [6] VENTIMIGLIA L N, ALONSO M A. Biogenesis and function of T cell-derived exosomes [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2016, 4: 84.
- [7] SMITH V L, CHENG Y, BRYANT B R, et al. Exosomes function in antigen presentation during an *in vivo* *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 43578.
- [8] HONG Y, LEE J, VU T H, et al. Exosomes of lipopolysaccharide-stimulated chicken macrophages modulate immune response through the MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 115: 103908.
- [9] ADMYRE C, JOHANSSON S, PAULIE S, et al. Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT [J]. *European Journal of Immunology*, 2006, 36: 1772 - 1781.
- [10] 王存波, 王克华, 包文斌, 等. 不同鸡种间部分免疫性状的比较 [J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(3): 317 - 322.
- [11] 顾玉兰. 六个地方鸡品种遗传结构及其 MHC 基因的遗传变异研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [12] DEGEN W G J, VAN DAAL N, ROTHWELL L, et al. Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds [J]. *Veterinary Microbiology*, 2005, 105(3/4): 163 - 167.
- [13] DEGEN W G J, VAN DAAL N, VAN ZUILEKOM H I, et al. Identification and molecular cloning of functional chicken IL-12 [J]. *The Journal of Immunology*, 2004, 172(7): 4371 - 4380.
- [14] DAI M, XIE T, LIAO M, et al. Systematic identification of chicken type I, II and III interferon-stimulated genes [J]. *Veterinary Research*, 2020, 51(1): 70.
- [15] CHAUDHARI A A, KIM W H, LILLEHOJ H S. Interleukin-4 (IL-4) may regulate alternative activation of macrophage-like cells in chickens: A sequential study using novel and specific neutralizing monoclonal antibodies against chicken IL-4 [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2018, 205: 72 - 82.
- [16] WU Z, ROTHWELL L, YOUNG J R, et al. Generation and characterization of chicken bone marrow-derived dendritic cells [J]. *Immunology*, 2010, 129(1): 133 - 145.
- [17] RAMACHANDRA L, QU Y, WANG Y, et al. *Mycobacterium tuberculosis* synergizes with ATP to induce release of microvesicles and exosomes containing major histocompatibility complex class II molecules capable of antigen presentation [J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78: 5116 - 5125.
- [18] SCHOREY J S, HARDING C V. Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2016, 126: 1181 - 1189.
- [19] WANG G, JIN S, LING X, et al. Proteomic profiling of LPS-induced macrophage-derived exosomes indicates their involvement in acute liver injury [J]. *Proteomics*, 2019, 19(3): e1800274.

Exosomes derived from lipopolysaccharide-activated macrophage cell line HD 11 cell induce the activation of dendritic cells from Wenchang chicken *in vitro*

XING Niwen, XIE Yan, QIN Yao

(School of Animal Science and Technology, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: It has been demonstrated that exosomes derived from macrophages can be used as adjuvants to enhance cellular immune response. An attempt was made to explore whether exosomes derived from lipopolysaccharide-activated chicken macrophages could be used as immune adjuvants for the potential prevention and control of epidemic diseases in Wenchang chicken. The exosomes were extracted by ultracentrifugation and identified by transmission electron microscopy and particle size analysis. Subsequently, the exosomes were labeled with PKH67 dye and co-incubated with bone marrow-derived dendritic cells from Wenchang chicken. The uptake and activation of the exosomes by the dendritic cells were observed under a fluorescence microscope. The results showed that the exosomes derived from chicken macrophage HD 11 cells stimulated with lipopolysaccharides were ingested by amphioxus-derived dendritic cells and promoted the activation of dendritic cells.

Keywords: exosome; macrophage; dendritic cell; Wenchang chicken; lipopolysaccharide

(责任编辑:叶 静)

(上接第 404 页)

Advances in the interaction between mycoviruses and host fungi based on multi-omics

FAN Yu, HE Zhenrui, HUANG Xiaotong, YANG Mei, ZHOU Erxun

(Guangdong Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control/ College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: The principles, methods and steps of multi-omics, including metabonomics, transcriptomics and proteomics technologies, were described, and the current status, future research directions and the advantages of high sensitivity and high throughput of metabonomics, transcriptomics and proteomics technologies in the interaction between mycoviruses and host fungi were comprehensively analyzed in combination with their research cases in hypovirulent mycoviruses. This review is helpful for deep exploration of the effects of mycoviruses on host fungi and their molecular mechanisms, and provides methods and ideas to determine whether mycoviruses can be used as biological factors for control of plant fungal diseases.

Keywords: mycovirus; multi-omics; interaction; biological control

(责任编辑:潘学峰)