

口蹄疫病毒与塞内卡病毒灭活抗原免疫小鼠脾脏的转录组学差异分析

郑紫萱^{1,2}, 马雪青², 李坤², 孙普², 黄书伦², 董开恒², 赵琼琼¹,
卢曾军^{2*}, 钱平^{1*}

1 华中农业大学 动物医学院 农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室, 湖北 武汉 430070

2 中国农业科学院 兰州兽医研究所 动物疫病防控全国重点实验室 国家口蹄疫参考实验室,
甘肃 兰州 730046

郑紫萱, 马雪青, 李坤, 孙普, 黄书伦, 董开恒, 赵琼琼, 卢曾军, 钱平. 口蹄疫病毒与塞内卡病毒灭活抗原免疫小鼠脾脏的转录组学差异分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4493-4508.

ZHENG Zixuan, MA Xueqing, LI Kun, SUN Pu, HUANG Shulun, DONG Kaiheng, ZHAO Qiongqiong, LU Zengjun, QIAN Ping. Transcriptomic differences between the spleens of mice immunized with inactivated antigens of foot-and-mouth disease virus and Senecavirus A[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4493-4508.

摘要: 本研究旨在探究 C57BL/6 小鼠免疫口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus, FMDV)与塞内卡病毒(Senecavirus A, SVA) 2 种病原的免疫应答差异, 为解析获得性免疫调控机制提供理论基础。将灭活纯化的 FMDV 与 SVA 抗原分别免疫 C57BL/6 小鼠, 设置 PBS 免疫对照组; 利用流式细胞术分析免疫 14、28 d 后各组小鼠脾淋巴细胞中 Th1 与 Th2 细胞的比例, 并进行小鼠脾脏转录组测序和分析; 通过体外抗原刺激鼠巨噬细胞验证筛选差异表达基因。结果显示, 小鼠免疫 14 d 后, FMDV 与 SVA 抗原免疫组诱导 Th1/Th2 型免疫应答水平无显著差异, 免疫 28 d 后, SVA 抗原免疫组诱导 Th1 型与 Th2 型免疫应答水平均高于 FMDV 抗原免疫组; 转录组测序获得 2 种抗原免疫后 2 组共有差异基因 *Rsad2* 和 *Tspan8* 等, 可能参与 FMDV 和 SVA 抗原激活 Th1/Th2 型免疫应答反应的过程; FMDV 与 SVA 抗原体外刺激巨噬细胞分泌 IL-12、IL-33, 差异基因 *Tspan8*、*Rsad2* 的表达趋势与转录组测序结果一致, *Rsad2* 的表达受 I 型干扰素(IFN α 、IFN β)的调控。本研究获得了 2 种小鼠脾脏中抗原免疫应答相关的差异基因, 为进一步研究 FMDV 和 SVA 免疫应答机制奠定基础。

关键词: 口蹄疫病毒; A 型塞内卡病毒; Th1/Th2 型免疫应答; 脾脏; 转录组测序

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1800300)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1800300).

*Corresponding authors. E-mail: QIAN Ping, qianp@mail.hzau.edu.cn; LU Zengjun, luzengjun@caas.cn

Received: 2024-01-30; Accepted: 2024-05-14; Published online: 2024-05-16

Transcriptomic differences between the spleens of mice immunized with inactivated antigens of foot-and-mouth disease virus and Senecavirus A

ZHENG Zixuan^{1,2}, MA Xueqing², LI Kun², SUN Pu², HUANG Shulun², DONG Kaiheng², ZHAO Qiongqiong¹, LU Zengjun^{2*}, QIAN Ping^{1*}

1 National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

2 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: The aim of this study was to compare the immune responses of C57BL/6 mice immunized with two pathogens, foot-and-mouth disease virus (FMDV) and Senecavirus A (SVA), and to provide clues for revealing the regulatory mechanisms of acquired immunity. Inactivated and purified FMDV and SVA antigens were used to immunize C57BL/6 mice respectively, and the mice immunized with PBS were taken as the control. The percentages of Th1 and Th2 cells in the spleen lymphocytes of mice in each group were analyzed by flow cytometry at 14 and 28 days after immunization. RNA-Seq was performed for the spleen. Mouse macrophages were stimulated with the antigens *in vitro* to examine the expression of the differentially expressed genes (DEGs) screened out. The results showed that 14 days after immunization, there was no significant difference in the magnitude of the Th1/Th2 immune response elicited by the FMDV and SVA antigens. After 28 days, the magnitudes of the Th1 and Th2 immune responses elicited by the SVA antigen were higher than those elicited by the FMDV antigen. RNA-Seq revealed two common DEGs, *Rsad2* and *Tspan8*, between the two immunization groups, which indicated that the two genes may be involved in the activation of the Th1/Th2 immune responses by FMDV and SVA antigens. FMDV and SVA antigens stimulated macrophages to secrete interleukin (IL)-12 and IL-33 *in vitro*, and the expression of *Tspan8* and *Rsad2* was consistent with the RNA-Seq results. The expression of *Rsad2* was regulated by type I interferons (IFN α , IFN β). In this study, we obtained the DEGs involved in the immune responses to the two antigens in mouse spleen, which provides a molecular basis for investigating the immune response mechanisms induced by FMDV and SVA.

Keywords: foot-and-mouth disease virus (FMDV); Senecavirus A (SVA); Th1/Th2 immune response; spleen; RNA-seq

口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus, FMDV)是引起猪、牛、羊等偶蹄动物口蹄疫(foot and mouth disease, FMD)的重要病原,为小RNA病毒科口疮病毒属,具有A、O、C、Asia1与SAT1-3这7种血清型及多种亚型,不

同血清型抗原之间交叉保护力弱^[1]。A型塞内卡病毒(Senecavirus A, SVA),为小RNA病毒科塞内卡病毒属的成员,仅包含1种血清型,自2014年以来与SVA相关的水疱病陆续暴发,患病猪的特征与感染FMDV、水泡性口炎病毒

(vesicular stomatitis virus, VSV)后引起的临床症状难以区分^[2]。一般情况下,病毒灭活抗原免疫主要诱导体液免疫,细胞免疫水平低甚至缺失。口蹄疫疫苗在接种牛或猪后,最早可在接种 3–4 d 后检测到特异性 IgM 抗体,在接种 4–6 d 后可检测到 IgG1 和 IgG2^[3–4]。此外,有研究表明经 FMDV 灭活疫苗多次免疫后,动物体内能检测到 CD8⁺ T 细胞的应答^[5]。同为小 RNA 病毒科成员的 A 型塞内卡病毒 SVA 感染或免疫接种猪后, IgM 抗体最大浓度可在动物体内维持约 10 d,但 21 d 后特异性 IgG 抗体的产生逐渐增强,病毒血症持续时间较 FMDV 感染长,感染后 30 d 仍然存在排毒现象^[6–7]。

脾脏作为哺乳动物体内一个重要的次级淋巴器官,主要负责血液的免疫监视,连通天然免疫和获得性免疫^[8]。脾脏是淋巴细胞再循环的重要器官,具有清除血液中的抗原、微生物及老化的红细胞的功能^[9]。宿主在接触到胞外抗原时,抗原递呈细胞吞噬抗原,通过 MHC-II 类分子介导的抗原递呈过程递呈胞外抗原肽,激活 CD4⁺ T 细胞应答,包括 Th1/Th2 这 2 种不同的 T 细胞应答方向^[10]。Th1 细胞主要分泌 IL-2、IFN- γ 等细胞因子,参与细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)介导的细胞免疫,而 Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 及 IL-13 等细胞因子,其功能主要为刺激 B 细胞增殖及嗜酸性粒细胞活化,促进抗体 IgG1 和 IgE 的产生,参与体液免疫,在抗细胞外感染与致敏原引起的免疫应答中起主要作用^[11]。

目前 RNA 高通量测序技术已经在生物学研究领域广泛应用,其中转录组测序(RNA sequencing, RNA-seq)技术是利用 Illumina 高通量测序平台对生物体所有 RNA 进行测序^[12]。RNA 作为遗传信息的载体,参与基因的调控、转录和转运等生物学过程,高通量测序技

术可以从单个转录组获得数百万个核苷酸序列,因此 RNA-seq 技术是研究 RNA 功能的重要手段^[13]。本研究将纯化后的灭活 FMDV 与 SVA 抗原免疫 C57BL/6 小鼠,采用流式细胞染色分析免疫后小鼠脾脏淋巴细胞中 Th1 与 Th2 细胞比例差异,对免疫后小鼠与猪脾脏进行转录组测序(RNA-seq),并对测序数据进行拼接、注释和差异表达基因分析,获得调控 Th1/Th2 免疫应答差异的基因,以期为研究 FMDV 和 SVA 免疫应答机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

RAW264.7 细胞由国家口蹄疫参考实验室保存。PE-Cy5 标记的鼠 CD3 抗体、BUV395 标记的鼠 CD4 抗体、FITC 标记的鼠 CD8 抗体、BUV496 标记的鼠 CD45RA 抗体、APC 标记的鼠 IL-4 抗体、PE-Cy7 标记的鼠 IFN γ 抗体和细胞固定透化试剂盒(fixation/permeabilization solution kit)均购自碧迪医疗器械有限公司。佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)购自西格玛奥德里奇贸易有限公司。布雷非德菌素 A (brefeldin A, BFA)和离子霉素钙盐购自翌圣生物科技股份有限公司。RNA 提取试剂盒(E.Z.N.A total RNA kit I)购自上海伟进生物技术有限公司。反转录试剂(Hiscript III all-in-one RT super mix)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。高特异性 qPCR 试剂(TB green[®] premix EX Taq[™] II)购自宝日生物技术有限公司。

1.2 灭活抗原乳化

FMDV O 型灭活抗原由中农威特生物科技股份有限公司惠赠, SVA HN/11/2017 灭活抗原由中国农业科学院兰州兽医研究所宿主抗病毒感染与免疫生物学团队制备并保存。将 FMDV

灭活病毒抗原、SVA 灭活病毒抗原及 PBS 分别与 ISA 201VG 佐剂按照体积比为 1:1 的比例乳化, 最终免疫剂量为 100 μL /只, 灭活病毒抗原浓度为 2 μg /只。

1.3 动物免疫试验分组与免疫方案

将 36 只 6–8 周龄清洁级 C57BL/6 雌鼠, 适应性喂养 3 d, 随机分为 FMDV 抗原免疫组、SVA 抗原免疫组及 PBS 免疫对照组, 每组 12 只。经后腿肌肉免疫, 首免 14 d 后加强免疫 1 次, 于免疫 14 d 和 28 d 后在无菌条件下采集鼠脾脏, 并按照常规方法分离脾脏淋巴细胞。本研究的所有动物实验均由中国农业科学院兰州兽医研究所伦理审查委员会批准[许可证号: SYXK(甘)2020-0010]。

1.4 多色流式分析

制备小鼠脾细胞悬液, 将细胞接种到 24 孔板, 每孔 1.5×10^6 个脾细胞。样品中加入 PMA/离子霉素钙盐/BFA 混合物(终浓度 50 ng/mL、500 ng/mL、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 阴性对照样品添加 BFA 混合物(终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 将培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱 4 h 后, 置于冰上。使用 CD3-PE-Cy5/CD4-BUV395/CD8-FITC/CD45RA-BUV496 荧光抗体组合进行标记, 固定破膜后使用 IL4-APC/IFN γ -PE-Cy7 荧光抗体组合进行小鼠脾细胞染色标记。利用 CytoFLEX LX 流式细胞仪进行上机检测, 使用 CytExpert 软件进行细胞比例分析。

1.5 转录组测序分析

将小鼠脾脏样品寄送至百迈克生物公司进行转录组测序, 测序获得的 Clean Reads 与小鼠参考基因组(GenBank 登录号: GCA_000001635.8)进行比对, 使用 StringTie 组装比对成功的 reads, 重构转录组用于后续分析。对样品中的 Mapped Reads 的数量和转录组长度进行归一化, 采用 FPKM (fragments per kilobase of transcript

per million fragments mapped)衡量基因表达水平。基于基因在各个样本中的 Count 值, 利用 DESeq2 软件并设置 Fold Change ≥ 1.5 且 P -value < 0.05 为筛选标准, 以 \log_2 FC 的数值表示差异的显著性, 筛选差异表达基因。利用 R/topGO 2.48.0 软件与 R/clusterProfiler 4.4.4 软件, 将差异基因与 GO 数据库(<http://www.geneontology.org/>)和 KEGG 数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>)比对, 进行 GO 富集和 KEGG 富集分析。筛选 FDR=0.01、FC=2 的差异基因, 对差异分组进行 Venn 分析以及 KEGG 富集分析差异基因的分子功能, 筛选关键基因。

1.6 巨噬细胞培养、分组和抗原刺激

用含 10%胎牛血清、1%双抗(青霉素、链霉素)的 DMEM 培养鼠巨噬细胞 RAW264.7, 将巨噬细胞接种至 6 孔培养板(2.5×10^5 /孔), 分为 FMDV 抗原组、SVA 抗原组及空白对照组, 每组 3 孔。待巨噬细胞贴壁 3 h 后, 分别加入 FMDV 与 SVA 灭活抗原, 每孔 4 μg , 刺激分化 48 h, 收集各组刺激后细胞样品, 使用 E.Z.N.A total RNA kit I 试剂盒提取细胞总 RNA, 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)检测 *IL-12*、*IL-33*、*IFN α* 、*IFN β* 、*Tspan8* 和 *Rsad2* 的转录水平。qPCR 引物序列列表见表 1。

1.7 qPCR

使用 E.Z.N.A total RNA kit I 试剂盒提取小鼠脾脏组织总 RNA, qPCR 检测 *Bactin*、*Rsad2*、*Tspan8*、*Samd11*、*Gypa* 和 *Apol11b* 的转录水平。qPCR 引物序列列表见表 1。

1.8 数据统计分析

使用 GraphPad Prism 8.0.1 软件对数据进行处理和统计分析。采用双因素方差分析(two-way ANOVA)对免疫后不同组小鼠脾脏淋巴细胞中 Th1/Th2 细胞比例均数进行统计分析, 采用 t 检验(t -test)对 qPCR 结果进行统计分析, *代表

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 qPCR primer sequences

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Product size (bp)
<i>Bactin</i> -mus-F	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	171
<i>Bactin</i> -mus-R	ATGGAGCCACCGATCCACA	
<i>Rsad2</i> -mus-F	GATGGTTCAAGGACTATGGGGA	143
<i>Rsad2</i> -mus-R	GCACCACCTCCTCAGCTTTT	
<i>Tspan8</i> -mus-F	TGCTCTCTATTTCTACCCCGA	207
<i>Tspan8</i> -mus-R	CAGTGTACCACATACCCGAACA	
<i>Samd11</i> -mus-F	GGCTGATGGGACACCTTTTG	154
<i>Samd11</i> -mus-R	CTTGCCATCAATTTCTGCTCTT	
<i>Apol11b</i> -mus-F	TCAGAGGACATTAGGAAAGTGGA	75
<i>Apol11b</i> -mus-R	TGTTATTAATCTTCCGTGGCGTT	
<i>Gypa</i> -mus-F	GCTGTGACAACATCAGGTCATTC	212
<i>Gypa</i> -mus-R	GGGGCCGTGTGATAAGTTGA	
<i>IL-12</i> -mus-F	GATCGACGCACCTTGTCCTTG	201
<i>IL-12</i> -mus-R	CCAAAAAGAGGAGGTAGCGTG	
<i>IL-33</i> -mus-F	GATGGGAAGAAGCTGATGGTG	140
<i>IL-33</i> -mus-R	TTGTGAAGGACGAAGAAGGC	
<i>IFNα</i> -mus-F	AGGACTTTGGATTCCCCTTG	115
<i>IFNα</i> -mus-R	TCCTTTGATGTGAAGAGGGTCAG	
<i>IFNβ</i> -mus-F	ATGAACAACAGGTGGATCCTCC	125
<i>IFNβ</i> -mus-R	AGGAGCTCCTGACATTTCCGAA	

$P < 0.05$, **代表 $P < 0.01$, ***代表 $P < 0.001$, ****代表 $P < 0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 免疫后小鼠 Th1/Th2 T 淋巴细胞流式分析

为探究 FMDV 与 SVA 灭活抗原免疫小鼠后诱导 Th1/Th2 型免疫应答水平的差异, 在小鼠脾细胞免疫 14 d 与 28 d 后, 每组各取 3 只小鼠的脾脏, 流式染色分析分泌细胞因子 IFN- γ 、IL-4 的 CD4⁺ T 淋巴细胞比例。结果显示免疫 14 d、28 d 后, FMDV 与 SVA 灭活抗原免疫后分泌 IFN- γ 、IL-4 的细胞比例均显著高于 PBS 组($P < 0.001$), 表明小鼠免疫 14 d、28 d 后, FMDV 与 SVA 抗原免疫组诱导的 Th1/Th2 型免疫应答均高于 PBS 对照组。进一步比较抗原免疫组间诱导小鼠 Th1/Th2 型免疫应答水平

差异发现免疫 14 d 后, FMDV 抗原免疫组分泌 IFN- γ 的细胞比例高于 SVA 抗原免疫组, 但无显著差异, 分泌 IL-4 的细胞比例相近。免疫 28 d 后, SVA 抗原免疫组分泌 IFN- γ 、IL-4 的细胞比例均显著高于 FMDV 抗原免疫组($P < 0.05$), 这表明小鼠免疫 28 d 后, SVA 抗原免疫组诱导 Th1 型与 Th2 型免疫应答水平均高于 FMDV 抗原免疫组(图 1A-1D)。

2.2 小鼠脾脏样本测序质控与样本相关性分析

小鼠免疫 28 d 后, 每组各取 3 只小鼠的脾脏进行转录组测序, 共获得 61.13 Gb 高质量读取条带, 各样品 Q30 碱基百分比均不小于 93.41%。通过与参考基因比对, 获取 Reads 在参考基因组上的定位信息, 对各组样品的比对率统计结果显示, 比对效率在 89.71%–97.33% 之间。基于 Spearman 相关系数对所有转录组

样本进行相关性分析, 根据 FPKM 分布构建表达量相关矩阵, 验证不同抗原免疫组与 PBS 对照组收集的样本的生物重复的一致性。结果显示 SVA 抗原免疫组、FMDV 抗原

免疫组与 PBS 对照组的脾脏样品位于不同分支, 而组内重复样品位于同一聚类分支, 表明基因在组内样本间表达相似度高, 样本相关性高(图 2)。

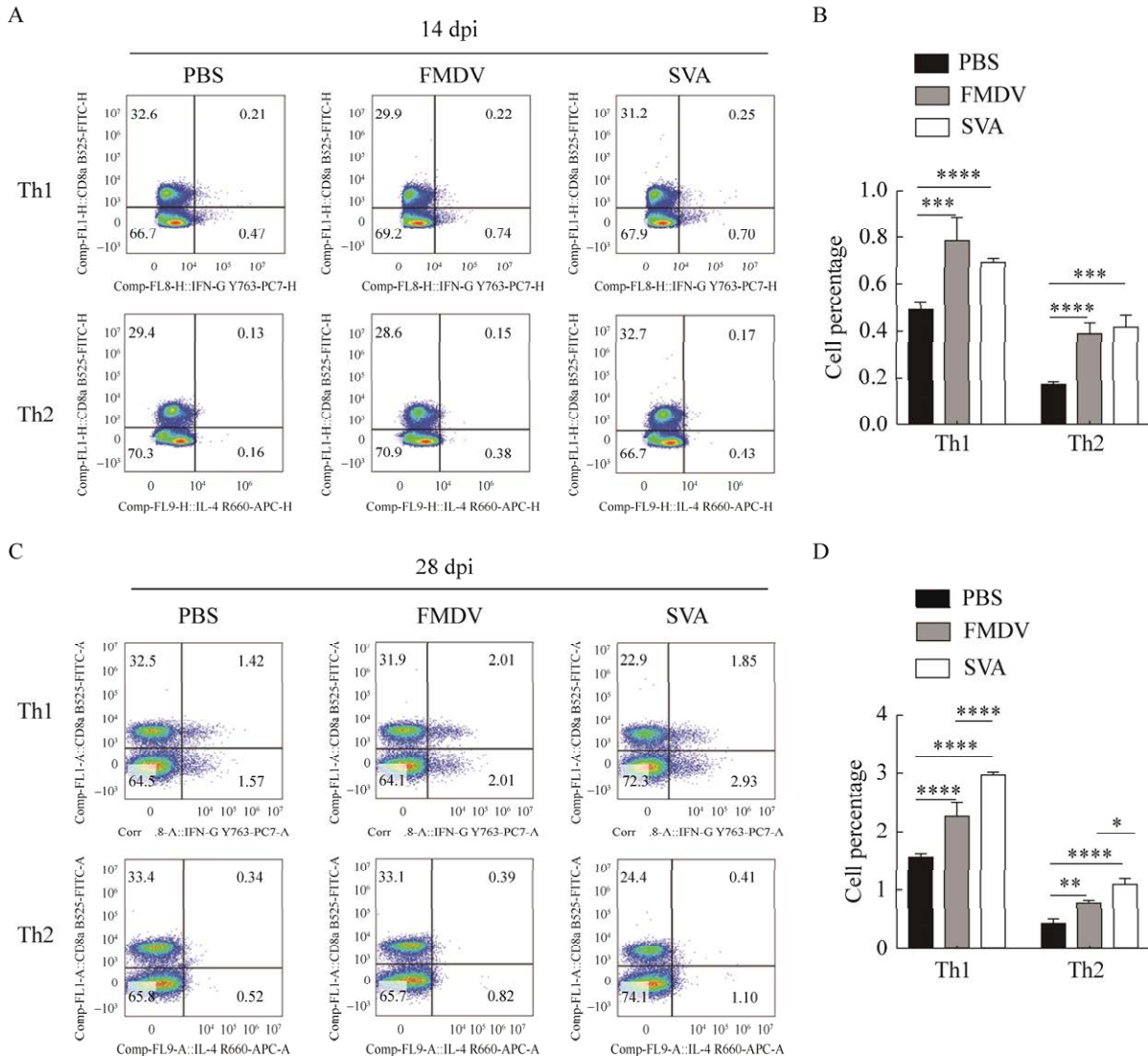


图 1 小鼠脾细胞多色流式染色分析 A: 免疫 14 d 后 Th1/Th2 淋巴细胞的细胞比例流式分析图. B: 免疫 14 d 后 Th1/Th2 淋巴细胞的细胞比例柱状图. C: 免疫 28 d 后 Th1/Th2 淋巴细胞的细胞比例分析. D: 免疫 28 d 后 Th1/Th2 淋巴细胞的细胞比例柱状图. *代表 $P < 0.05$; **代表 $P < 0.01$; ***代表 $P < 0.001$; ****代表 $P < 0.0001$

Figure 1 Multicolour flow staining analysis of mouse splenocytes. A: Flow analysis graph of Th1/Th2 lymphocyte cell ratio at 14 days after immunization. B: Histogram of Th1/Th2 lymphocyte cell ratio at 14 days post-immunisation. C: Analysis of Th1/Th2 lymphocyte cell ratio at 28 days post-immunization. D: Histogram of Th1/Th2 lymphocyte cell ratio at 28 days post-immunization. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

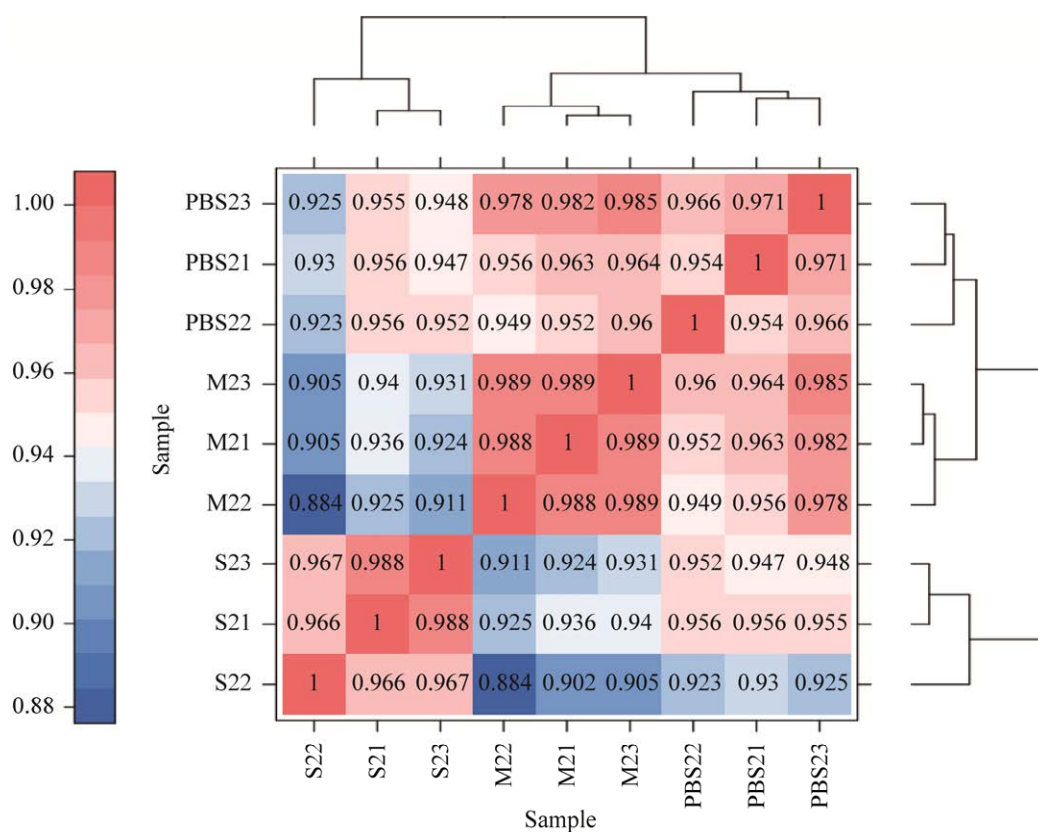


图2 样本间相关性热图 PBS 对照组脾脏样本: PBS21, PBS22, PBS23; FMDV 抗原免疫组脾脏样本: M21, M22, M23; SVA 抗原免疫组脾脏样本: S21, S22, S23

Figure 2 Correlation heatmap between samples. Spleen samples from PBS control group: PBS21, PBS22, PBS23; Spleen samples from FMDV antigen-immunized group: M21, M22, M23; Spleen samples from SVA antigen-immunized group: S21, S22, S23.

2.3 基因差异表达分析

不同样本中表达水平存在显著差异的基因称之为差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 根据两组样品之间表达水平的相对高低, 差异表达基因可划分为上调基因(up-regulated gene)和下调基因(down-regulated gene)^[14]。为了获得不同抗原免疫小鼠后造成基因表达的差异, 基于基因在各个样本中的 Count 值, 使用 DESeq2 软件分析, 筛选标准为 Fold Change ≥ 2 且 P -value < 0.05 。结果显示, 将 FMDV 抗原免疫组与 SVA 抗原免疫组进行差异基因比较, 共获得 2 267 个差异基因, 其中 479 个基因上调表达和 1 788 个基因下调表

达。将 SVA 抗原免疫组与 PBS 对照组进行比较, 共获得 1 410 个差异表达基因, 其中 417 个基因下调表达和 993 个基因上调表达。将 FMDV 抗原免疫组与 PBS 对照组进行比较, 共获得 770 个差异表达基因, 其中 629 个基因下调表达和 141 个基因上调表达。结果表明, 不同抗原免疫小鼠后能引起小鼠脾脏的转录组发生变化(图 3A-3D)。

2.4 GO 与 KEGG 富集分析

为了解 SVA 抗原与 FMDV 抗原免疫小鼠后在小鼠脾细胞产生功能方面的变化, 对差异分组 PBS vs. SVA 与 PBS vs. FMDV 中获得的差异基因进行 GO 富集分析。结果显示, 差异分

组在细胞组分、分子功能、生物过程这 3 个不同过程中, SVA 灭活抗原组差异基因表现为普遍上调表达, 其中在生物学过程中主要参与细胞对 DNA 损伤刺激反应(*cellular response to DNA damage stimulus*)和调节细胞周期(*regulation of cell cycle*)等, 在细胞组分中主要参与细胞质(*cytosol*)和线粒体(*mitochondrion*)部分, 在分子功能中主要参与了 ATP 结合(*ATP binding*)、金属离子结合(*metal ion binding*)和自身蛋白质结合(*identical protein binding*)等过程(图 4A)。FMDV 灭活抗原组差异基因表达普遍下调, 其中在生物学过程中主要参与天然免疫反应(*innate immune response*)和 B 细胞活化的正向

调节(*positive regulation of B cell activation*)等过程, 在细胞组分中主要参与到细胞质(*cytosol*)和线粒体(*mitochondrion*)部分, 在分子功能中主要参与了 ATP 结合(*ATP binding*)和蛋白同源二聚化活性(*protein homodimerization activity*)等过程(图 4B)。

为了进一步分析 SVA 抗原与 FMDV 抗原免疫小鼠后, 造成 2 组 Th1/Th2 型免疫应答程度出现差异的调控基因差异, 对 PBS vs. SVA 与 PBS vs. FMDV 差异分组中获得的总 DEGs 进行 KEGG 富集分析。结果显示, SVA 抗原免疫小鼠后获得的 1 410 个总 DEGs 共富集到 313 个信号通路, 并富集到 Th1 与 Th2 细胞分化、

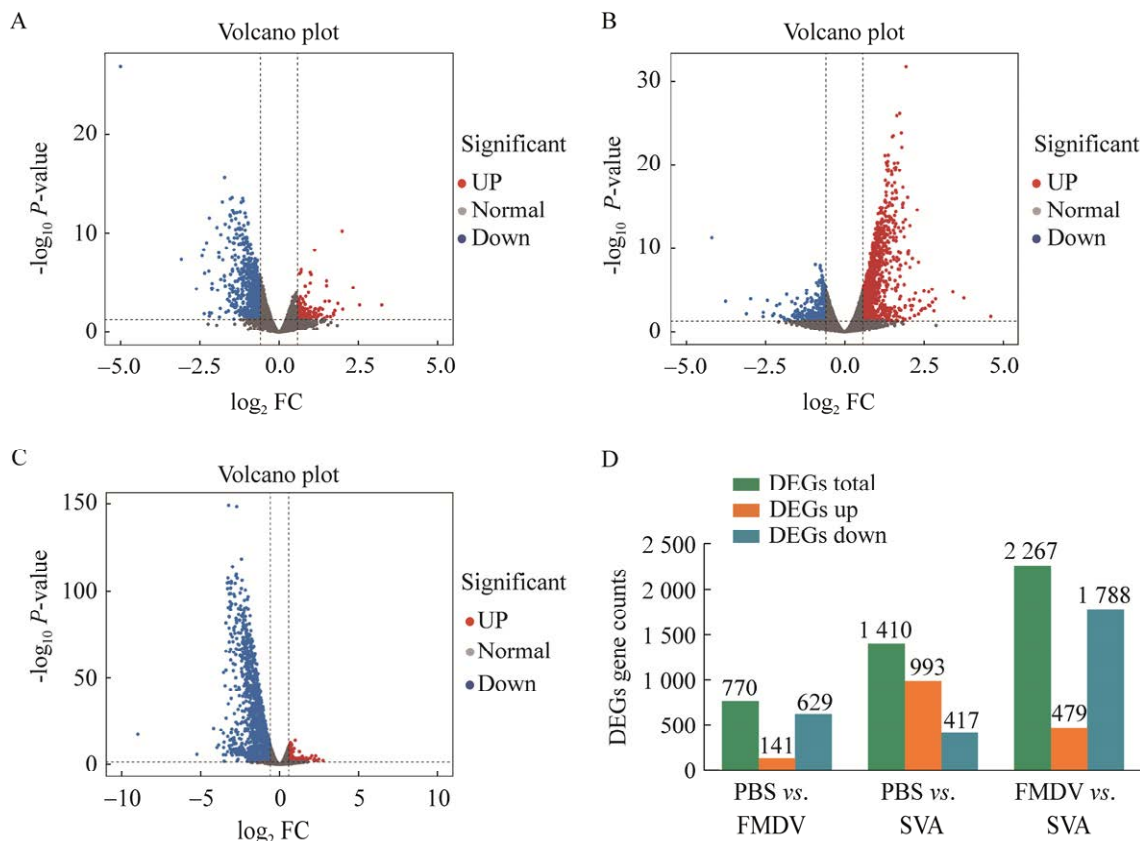


图 3 差异表达基因火山图与柱状图 A: PBS vs. FMDV 分组 DEGs 火山图. B: PBS vs. SVA 分组 DEGs 火山图. C: FMDV vs. SVA 分组 DEGs 火山图. D: DEGs 数目柱状图

Figure 3 DEGs volcano and histogram. A: PBS vs. FMDV grouped DEGs volcano. B: PBS vs. SVA grouped DEGs volcano. C: FMDV vs. SVA grouped DEGs volcano. D: DEGs number histogram.

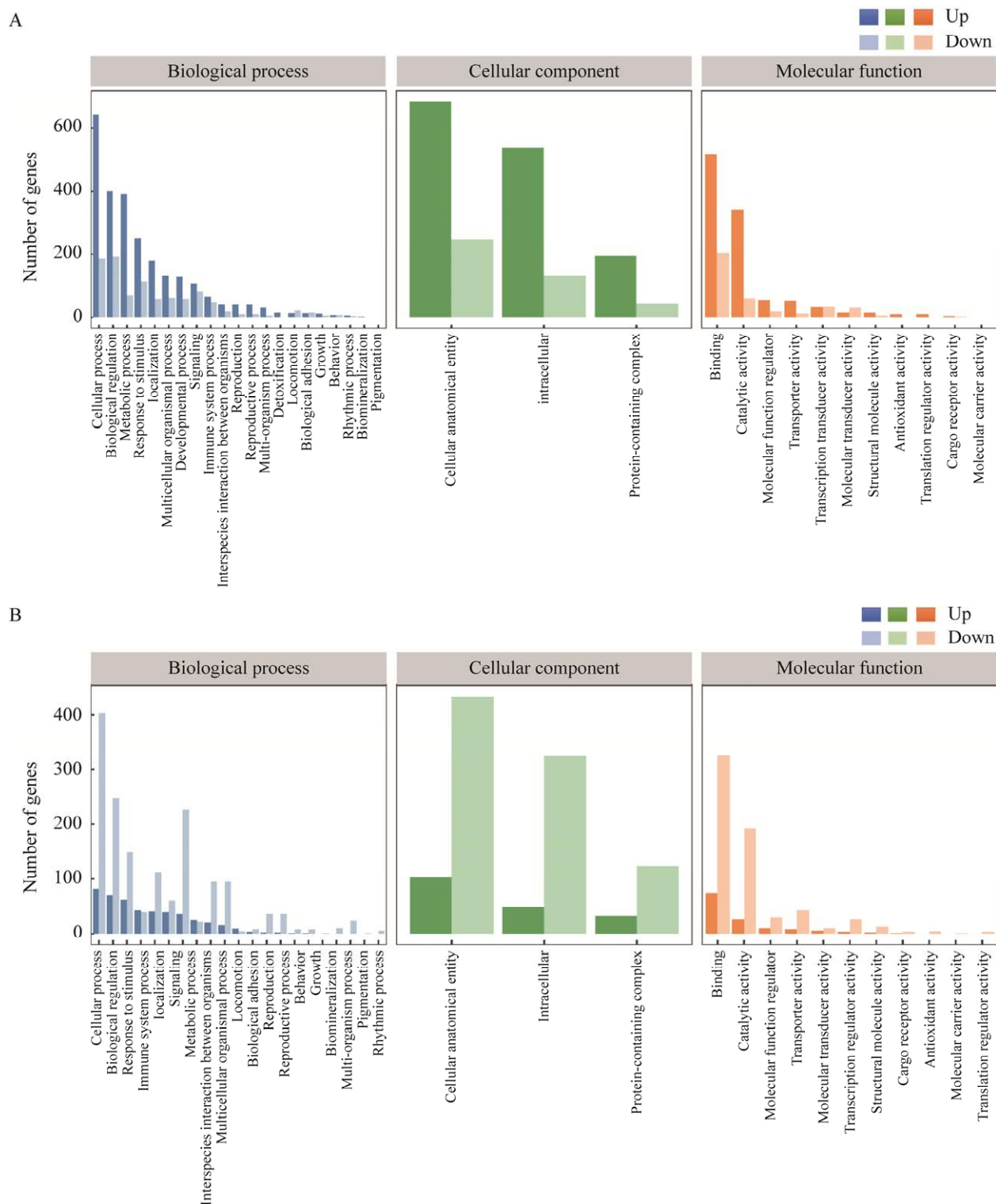


图 4 差异基因 GO 富集分析 A: PBS vs. SVA 差异基因 GO 富集. B: PBS vs. FMDV 差异基因 GO 富集

Figure 4 GO enrichment analysis of DEGs. A: PBS vs. SVA DEGs GO enrichment. B: PBS vs. FMDV DEGs GO enrichment.

PI3k-Akt、T 细胞受体、FcεRI、MAPK 和 NOD 样受体等免疫应答相关信号通路(图 5A)。而 FMDV 抗原免疫小鼠后获得的 770 个总 DEGs 共富集到 278 个信号通路,包括 Th1 与 Th2 细胞分化、Notch、TNF、NF-κB 和 FcεRI 等免疫应答相关信号通路(图 5B)。结果表明, FMDV 与 SVA 抗原免疫小鼠后可引起调控小鼠机体免疫应答过程中多种基因的差异表达。

2.5 样本间 Venn 分析与差异表达基因筛选

为获得 FMDV 与 SVA 抗原免疫后组间共有或特有的差异表达基因,对差异分组 PBS vs. SVA 与 PBS vs. FMDV 的总 DEGs 进行 Venn 分析。结果显示,两组间共有差异表达基因为 468 个, SVA 抗原免疫后特有 DEGs 共 942 个, FMDV 抗原免疫后特有 DEGs 共 302 个。对 468 个共有 DEGs 进行汇总分析,其中包括 426 个注释基因和 42 个未注释新基因(图 6A)。分析 426 个注释基因在 FMDV 与 SVA 抗原免疫后基因相对表达水平差异,共 398 个基因在 SVA 抗原免疫后表现为上调表达而在 FMDV 免疫后表现为下调表达。

基于 FMDV 与 SVA 抗原免疫小鼠后, SVA 抗原免疫组刺激诱导小鼠 Th1/Th2 型免疫应答水平高于 FMDV 抗原免疫组的结果。为了寻找 FMDV 与 SVA 不同抗原免疫小鼠后诱导 Th1/Th2 型免疫应答差异的关键基因,对抗原免疫组间 398 个共有差异表达基因进行 KEGG 富集分析。结果显示,其中共 92 个基因位于 Th1/Th2 细胞分化信号通路及相关信号通路,包括 B 细胞受体信号通路、Fcγ 受体信号通路、FcεRI 信号通路、NF-κB 信号通路和钙离子信号通路等(图 6B)。为了进一步寻找调控 Th1/Th2 免疫应答水平的差异基因,对获得的 92 个差异基因按照差异倍数进行排序,筛选差异表达排名前 15 的基因,包括 *Gypa*、*Dmtn*、

Apol11b、*Btl10*、*Tspan8*、*Trim10*、*Tmcc2*、*Trim58*、*Hbq1b*、*Slfn14*、*Rsad2*、*Ypel4*、*Samd11*、*Slc6a9* 和 *Icam4* (图 6C, 表 2)。

2.6 qPCR 验证脾脏转录组测序结果的准确性

为了验证转录组测序结果的准确性,结合基因功能,挑选其中 5 个基因,通过 qPCR 进行验证,引物序列见表 1。结果显示,差异基因 *Rsad2*、*Samd11*、*Tspan8*、*Gypa* 和 *Apol11b* 在 SVA 抗原免疫组小鼠脾脏中表现为上调表达,在 FMDV 抗原免疫组小鼠脾脏中表现为下调表达, qPCR 结果与转录组测序结果一致,表明转录组测序结果准确($P < 0.05$)(图 7)。

2.7 抗原刺激鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞因子的表达

鼠巨噬细胞 RAW264.7 为抗原递呈细胞,分泌细胞因子 IL-12 与 IL-33,分别刺激 Th1 与 Th2 细胞的分化^[15-16]。为了进一步验证转录组测序结果中的差异基因 *Tspan8* 和 *Rsad2* 的功能,将 FMDV 与 SVA 抗原体外刺激鼠巨噬细胞,通过 qPCR 检测 *IL-12*、*IL-33*、*Tspan8* 和 *Rsad2* 的表达。结果显示,与空白对照组相比, FMDV 与 SVA 抗原体外刺激巨噬细胞均促进细胞因子 *IL-33* 表达,且 FMDV 抗原组刺激 *IL-33* 表达的程度高于 SVA 抗原组,此外, SVA 抗原体外刺激巨噬细胞表达细胞因子 *IL-12* 的表达,提示在免疫初期 FMDV 抗原免疫诱导 Th2 型免疫反应水平高于 SVA, SVA 抗原免疫诱导 Th1 型免疫反应水平高于 FMDV。FMDV 抗原刺激巨噬细胞后下调差异基因 *Tspan8*、*Rsad2* 表达,而 SVA 抗原刺激巨噬细胞后上调差异基因 *Tspan8*、*Rsad2* 表达,结果与转录组测序结果一致。*Rsad2* 是一种干扰素刺激基因,探究了 *Rsad2* 是否通过 I 型干扰素而发挥功能,结果显示 SVA 抗原刺激巨噬细胞后可上调 *Rsad2* 的

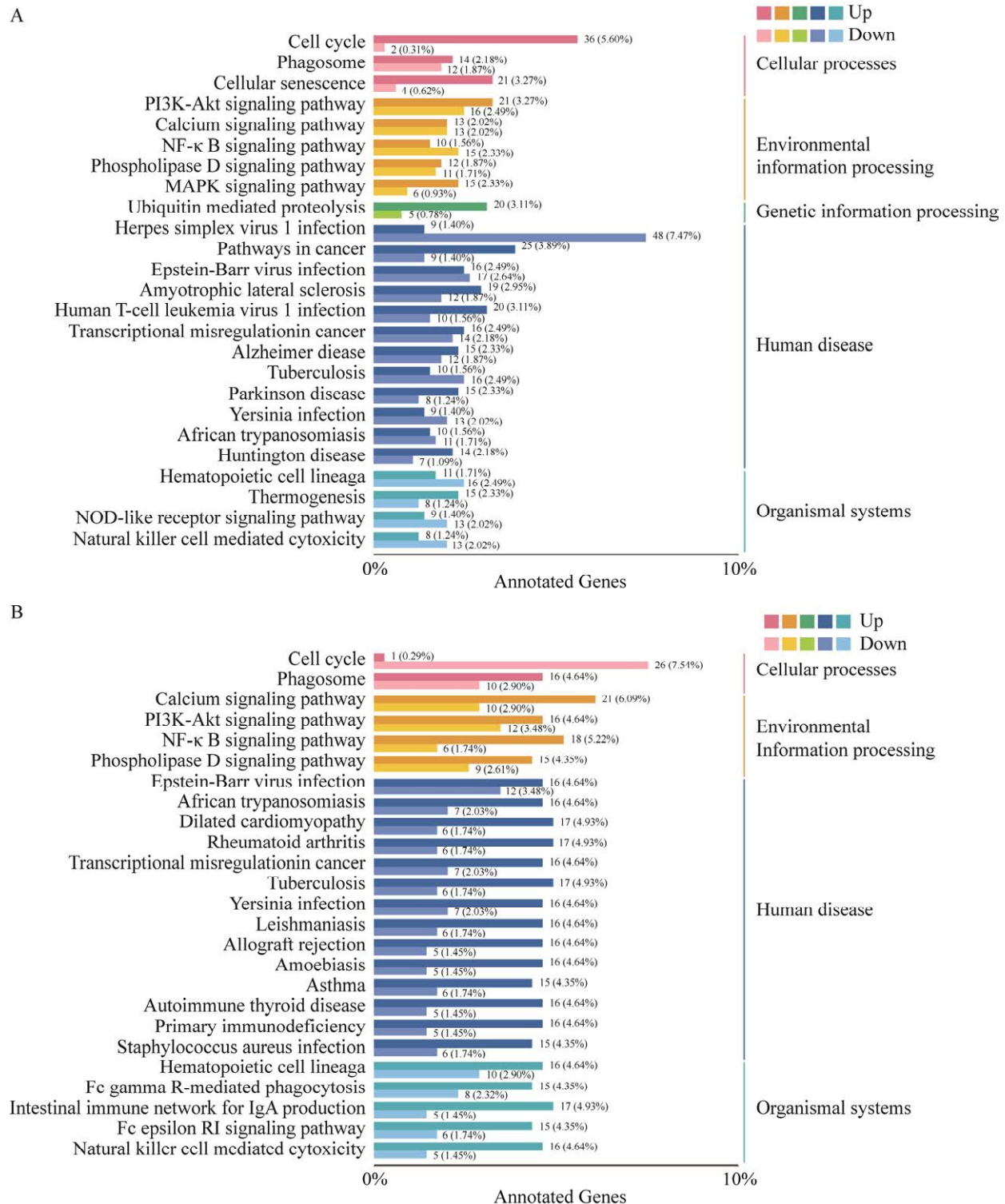


图 5 差异基因 KEGG 富集分析 A: PBS vs. SVA 差异基因 KEGG 富集. B: PBS vs. FMDV 差异基因 KEGG 富集

Figure 5 KEGG enrichment analysis of DEGs. A: PBS vs. SVA DEGs KEGG enrichment. B: PBS vs. FMDV DEGs KEGG enrichment.

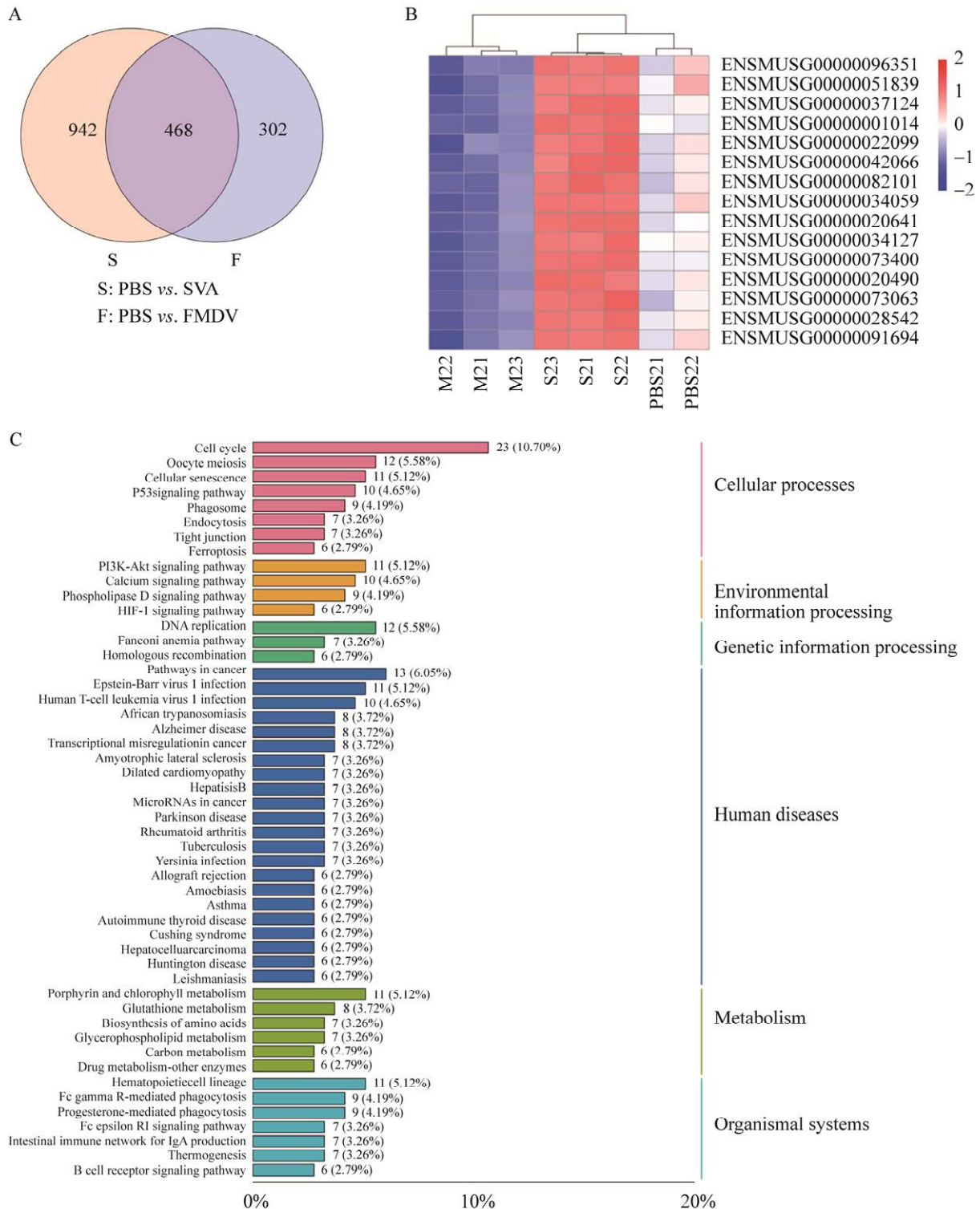


图6 差异基因 Venn 分析和 KEGG 富集分析 A: 差异基因 Venn 分析. B: 筛选差异基因热图. C: 共有差异表达基因 KEGG 富集分析

Figure 6 Venn analysis and KEGG enrichment analysis of DEGs. A: Venn analysis of DEGs. B: Heatmap of DEGs. C: KEGG enrichment analysis of DEGs.

表 2 筛选差异基因信息表

Table 2 Screening for differential genes information sheet

Gene ID	Gene name	SVA group	FMDV group	Protein annotation
ENSMUSG00000051839	<i>Gypa</i>	Up	Down	Glycophorin-A
ENSMUSG00000020641	<i>Rsad2</i>	Up	Down	Radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 2
ENSMUSG00000091694	<i>Apol11b</i>	Up	Down	Apolipoprotein L 11b
ENSMUSG00000020490	<i>Btml10</i>	Up	Down	Butyrophilin-like protein 10 variant 1 precursor
ENSMUSG00000034127	<i>Tspan8</i>	Up	Down	Tetraspanin-8
ENSMUSG00000073400	<i>Trim10</i>	Up	Down	Tripartite motif-containing protein 10
ENSMUSG00000042066	<i>Tmcc2</i>	Up	Down	Transmembrane and coiled-coil domains protein 2 isoform
ENSMUSG00000037124	<i>Trim58</i>	Up	Down	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM58
ENSMUSG00000073063	<i>Hbq1b</i>	Up	Down	Hemoglobin subunit theta-1
ENSMUSG00000082101	<i>Slfn14</i>	Up	Down	Protein SLFN14
ENSMUSG00000022099	<i>Dmtn</i>	Up	Down	Dematin isoform 1
ENSMUSG00000034059	<i>Ypel4</i>	Up	Down	Protein yippee-like 4
ENSMUSG00000096351	<i>Samd11</i>	Up	Down	Sterile alpha motif domain-containing protein 11 isoform 1
ENSMUSG00000028542	<i>Slc6a9</i>	Up	Down	Solute carrier family 6
ENSMUSG00000001014	<i>Icam4</i>	Up	Down	Intercellular adhesion molecule 4 isoform 2 precursor

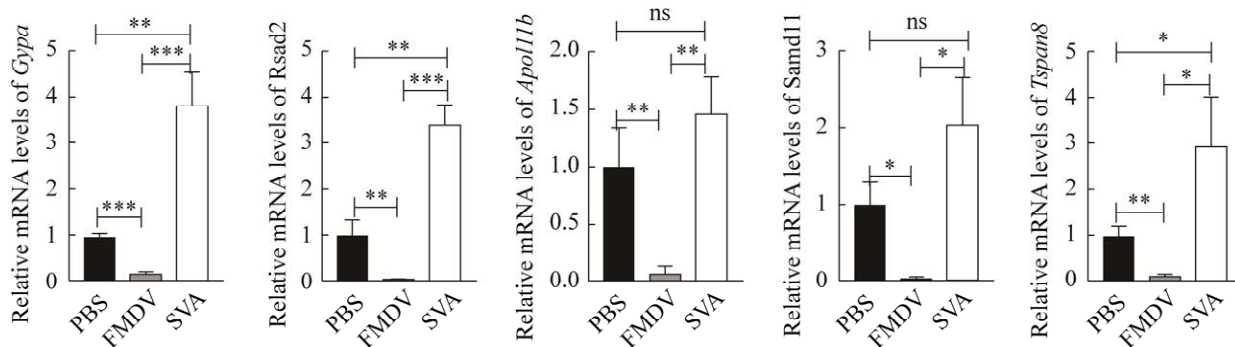


图 7 小鼠转录组 qPCR 验证 *代表 $P < 0.05$; **代表 $P < 0.01$; ***代表 $P < 0.001$; ns 代表 not significant
 Figure 7 Mouse transcript qPCR validation. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: Not significant.

表达, 且 I 型干扰素 $IFN\alpha$ 、 $IFN\beta$ 的表达上调, 提示 *Rsad2* 的表达可能通过 I 型干扰素途径发挥作用(图 8)。

3 讨论与结论

口蹄疫(foot and mouth disease, FMD)是一种高度传染性的病毒性疾病, 已有 100 多年的历史, 主要感染偶蹄动物, 如牛、羊、猪

等, 以及少数非蹄类动物, 如老鼠和大象。本研究将 FMDV 与 SVA 抗原免疫 C57BL/6 小鼠, 与 PBS 对照组相比, 免疫 14 d 与 28 d 后均产生较高水平的 Th1 与 Th2 细胞的分化, 表明 FMDV 与 SVA 抗原免疫后均能诱导小鼠产生一定程度的体液免疫和细胞免疫。这与在口蹄疫病毒感染或疫苗接种免疫牛和猪后, 均能检测到 $CD4^+$ T 淋巴细胞增殖, 以及在 FMDV 野外

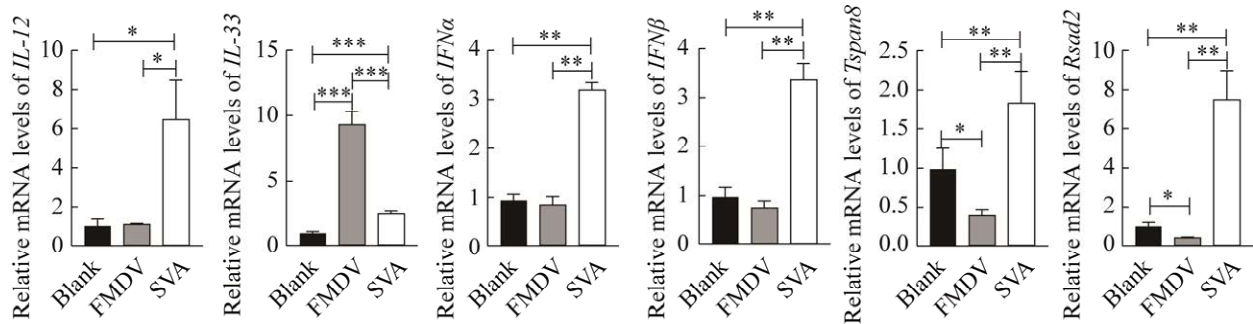


图 8 抗原刺激巨噬细胞 RAW264.7 qPCR 验证

Figure 8 Antigen stimulation RAW264.7 qPCR validation. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

毒株 A24 感染的猪能诱发 $CD8^+$ T 淋巴细胞反应的结果一致^[17-18]。比较 FMDV 灭活抗原免疫组与 SVA 灭活抗原免疫组间的 Th1/Th2 型细胞比例差异, SVA 灭活抗原组诱导分化 Th2 型细胞比例高于 FMDV 灭活抗原组。Th1 型细胞比例在免疫 14 d 后, FMDV 灭活抗原免疫组细胞比例高,但在小鼠免疫 28 d 后, SVA 灭活抗原组诱导分化 Th1 型细胞比例高于 FMDV 灭活抗原组。这一结果印证了 SVA 感染或免疫后抗体水平高,而 FMDV 感染或免疫后中和抗体水平较低的现象^[19]。

本研究重点关注参与 Th1/Th2 细胞分化途径。对差异基因进行 KEGG 富集分析,结果显示在 FMDV 抗原免疫组与 SVA 抗原免疫组均富集到 Th1/Th2 细胞分化信号通路的相关信号通路,包括钙离子信号通路、NF- κ B 信号通路, FMDV 抗原免疫组富集的差异基因集中在 Fc ϵ RI 信号通路, SVA 抗原免疫组富集到 P13k-Akt 信号通路、MAPK 信号通路和 NOD 样受体信号通路等。在本研究的测序结果中,富集到与 Th1/Th2 细胞分化信号通路的相关信号通路中差异表达显著的前 15 个基因包括 *Rsad2*、*Samd11*、*Tspan8*、*Gypa*、*Apol11b* 等。挑选其中 *Tspan8* 与 *Rsad2* 基因进行体外细胞实验验证。将 FMDV 与 SVA 灭活抗原分别刺激

巨噬细胞 RAW264.7 分析细胞因子水平,结果显示 FMDV 与 SVA 抗原后可刺激巨噬细胞分泌 IL-12、IL-33,且不同抗原刺激后诱导细胞因子 IL-12、IL-33 的表达结果不一致,提示巨噬细胞吞噬 FMDV 与 SVA 灭活抗原后,刺激巨噬细胞极化以及递呈胞外抗原肽的过程中存在差异,在激活 $CD4^+$ T 细胞分化并产生 Th1 与 Th2 的 T 细胞应答方面也存在差异。这一结果表明 FMDV、SVA 灭活抗原免疫小鼠后,诱导小鼠体内 Th1 与 Th2 免疫应答水平存在差异。

Rsad2 是一种干扰素刺激基因(interferon-stimulated gene, ISG),编码与内质网相关联的干扰素的病毒抑制性蛋白 Viperin, Viperin 最早从干扰素处理后人类巨噬细胞中克隆获得,主要参与天然免疫,属于抗病毒蛋白^[20]。Jang 等在研究 *Rsad2* 介导的适应性反应机制时发现,在 LPS 刺激的成熟 DC (mature dendritic cells, mDCs)中, *Rsad2* 被刺激呈现高表达,并且在 *Rsad2* 敲低的条件下, mDCs 的功能显著减弱, *Rsad2* 通过 IRF7 介导的信号通路实现功能,在 *Rsad2* 基因敲除小鼠中 mDCs 失去了抗肿瘤功能,表明 *Rsad2* 是 DCs 成熟必需且明显的特异性标志物^[21]。Wiedemann 等^[22]对自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)的研究发现,在小鼠巨细胞病毒(mouse cytomegalovirus, MCMV)感

染期间, *Rsad2* 是活化 NK 细胞中高表达的干扰素刺激基因之一。在 *Rsad2* 影响 T 细胞发育的研究中发现, 缺失 *Rsad2* 表达的 CD4⁺ T 细胞中 *Gata-3* 诱导受损, Th2 细胞的发育成熟过程受 *Rsad2* 表达的影响^[23]。本研究将 FMDV 与 SVA 抗原体外刺激巨噬细胞 RAW264.7, SVA 抗原刺激巨噬细胞 RAW264.7 后上调 *Rsad2* 的表达, 与转录组测序结果一致。为探究 *Rsad2* 是否通过 I 型干扰素而发挥作用, 检测 I 型干扰素 IFN α 、IFN β 的表达, 发现 SVA 抗原刺激巨噬细胞后 IFN α 、IFN β 上调表达。结合前人的研究结果^[20-23], 提示 *Rsad2* 基因可能参与 FMDV 或 SVA 抗原激活 Th1/Th2 型免疫反应过程, 可能通过 I 型干扰素途径发挥作用, 后续可进一步验证 *Rsad2* 基因功能。

综上所述, 本研究采用多色流式分析 FMDV 与 SVA 抗原免疫后诱导 Th1/Th2 型免疫反应水平, 通过 RNA-seq 测序分析影响 Th1/Th2 型免疫应答水平的差异表达基因。研究发现, FMDV 与 SVA 抗原免疫后均能诱导出 Th1/Th2 型免疫反应, 且免疫 28 d 后, SVA 抗原免疫组诱导 Th1/Th2 型免疫应答水平高于 FMDV 抗原免疫组; 发现了差异表达基因 *Rsad2*, 在 FMDV 抗原免疫组表现为下调表达, 在 SVA 抗原免疫组表现为上调表达, 进一步表明 *Rsad2* 可能通过 I 型干扰素途径发挥作用, 这为解析体液免疫与细胞免疫的协同机制提供了思路。

REFERENCES

- [1] LI KL, WANG CC, YANG F, CAO WJ, ZHU ZX, ZHENG HX. Virus-host interactions in foot-and-mouth disease virus infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 571509.
- [2] ZHAO K, ZHANG SX, LIU XN, GUO XR, GUO ZM, ZHANG XZ, YUAN WZ. The game between host antiviral innate immunity and immune evasion strategies of senecavirus A-A cell biological perspective[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1107173.
- [3] HABIELA M, SEAGO J, PEREZ-MARTIN E, WATERS R, WINDSOR M, SALGUERO FJ, WOOD J, CHARLESTON B, JULEFF N. Laboratory animal models to study foot-and-mouth disease: a review with emphasis on natural and vaccine-induced immunity[J]. *The Journal of General Virology*, 2014, 95(Pt 11): 2329-2345.
- [4] YANG L, LIU ZC, LI JB, HE KL, KONG LN, GUO RQ, LIU WJ, GAO YD, ZHONG JF. Association of the expression of Th cytokines with peripheral CD4 and CD8 lymphocyte subsets after vaccination with FMD vaccine in Holstein young sires[J]. *Research in Veterinary Science*, 2018, 119: 79-84.
- [5] AIEWSAKUN P, PAMORNCHAINAVAKUL N, INCHAISRI C. Early origin and global colonisation of foot-and-mouth disease virus[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 15268.
- [6] ZHANG JY, LI CH, MENG Y, XIE YB, SHI N, ZHANG H, YU CD, NAN FL, XIE CZ, HA Z, HAN JC, LI ZX, LI QX, WANG P, GAO X, JIN NY, LU HJ. Pathogenicity of Seneca Valley virus in pigs and detection in *Culicoides* from an infected pig farm[J]. *Virology Journal*, 2021, 18(1): 209.
- [7] ZHANG XL, ZHU ZX, YANG F, CAO WJ, TIAN H, ZHANG KS, ZHENG HX, LIU XT. Review of Seneca valley virus: a call for increased surveillance and research[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 940.
- [8] ZHANG Y, SHEN J, CHENG W, ROY B, ZHAO RZ, CHAI TL, SHENG YF, ZHANG Z, CHEN XT, LIANG WM, HU WN, LIAO QJ, PAN SS, ZHUANG W, ZHANG YR, CHEN RX, MEI JP, WEI H, FANG XD. Microbiota-mediated shaping of mouse spleen structure and immune function characterized by scRNA-seq and Stereo-seq[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2023, 50(9): 688-701.
- [9] HASAN AA, ALTAEY OY, SULTAN GA. Morphological, histological, and histochemical study of the adult golden hamster (*Mesocricetus auratus*) spleen[J]. *Open Veterinary Journal*, 2023, 13(3): 253-261.
- [10] CAO QM, TIAN DB, HEFFRON CL, SUBRAMANIAM S, OPRIESSNIG T, FOSS DL, CALVERT JG, MENG XJ. Cytotoxic T lymphocyte epitopes identified from a contemporary strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus

- enhance CD4+CD8+ T, CD8+ T, and $\gamma\delta$ T cell responses[J]. *Virology*, 2019, 538: 35-44.
- [11] DONG C. Cytokine regulation and function in T cells[J]. *Annual Review of Immunology*, 2021, 39: 51-76.
- [12] GONDANE A, ITKONEN HM. Revealing the history and mystery of RNA-seq[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2023, 45(3): 1860-1874.
- [13] DESHPANDE D, CHHUGANI K, CHANG YT, KARLSBERG A, LOEFFLER C, ZHANG JY, MUSZYŃSKA A, MUNTEANU V, YANG H, ROTMAN J, TAO L, BALLIU B, TSENG E, ESKIN E, ZHAO FQ, MOHAMMADI P, ŁABAJ PP, MANGUL S. RNA-seq data science: from raw data to effective interpretation[J]. *Frontiers in Genetics*, 2023, 14: 997383.
- [14] JOLY JH, LOWRY WE, GRAHAM NA. Differential gene set enrichment analysis: a statistical approach to quantify the relative enrichment of two gene sets[J]. *Bioinformatics*, 2021, 36(21): 5247-5254.
- [15] KAUR H, KAUR G, ALI SA. IL-33's role in the gut immune system: a comprehensive review of its crosstalk and regulation[J]. *Life Sciences*, 2023, 327: 121868.
- [16] LEÓN B. A model of Th2 differentiation based on polarizing cytokine repression[J]. *Trends in Immunology*, 2023, 44(6): 399-407.
- [17] LU ZM, YU S, WANG WJ, CHEN WX, WANG XY, WU KK, LI XW, FAN SQ, DING HX, YI L, CHEN JD. Development of foot-and-mouth disease vaccines in recent years[J]. *Vaccines*, 2022, 10(11): 1817.
- [18] RODRÍGUEZ-HABIBE I, CELIS-GIRALDO C, PATARROYO ME, AVENDAÑO C, PATARROYO MA. A comprehensive review of the immunological response against foot-and-mouth disease virus infection and its evasion mechanisms[J]. *Vaccines*, 2020, 8(4): 764.
- [19] LI N, QIAO QL, GUO HF, WANG BY, HUANG Q, WANG Z, LI YT, ZHAO J. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a novel Senecavirus A strain-based inactivated vaccine in mice[J]. *Research in Veterinary Science*, 2021, 142: 133-140.
- [20] CHOI KM, KIM JJ, YOO J, KIM KS, GU Y, EOM J, JEONG H, KIM K, NAM KT, PARK YS, CHUNG JY, SEO JY. The interferon-inducible protein viperin controls cancer metabolic reprogramming to enhance cancer progression[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2022, 132(24): e157302.
- [21] JANG JS, LEE JH, JUNG NC, CHOI SY, PARK SY, YOO JY, SONG JY, SEO HG, LEE HS, LIM DS. *Rsd2* is necessary for mouse dendritic cell maturation *via* the IRF7-mediated signaling pathway[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9: 823.
- [22] WIEDEMANN GM, GEARY CD, LAU CM, SUN JC. Cutting edge: STAT1-mediated epigenetic control of *Rsd2* promotes clonal expansion of antiviral NK cells[J]. *Journal of Immunology*, 2020, 205(1): 21-25.
- [23] QIU LQ, CRESSWELL P, CHIN KC. Viperin is required for optimal Th2 responses and T-cell receptor-mediated activation of NF-kappaB and AP-1[J]. *Blood*, 2009, 113(15): 3520-3529.

(本文责编 郝丽芳)