

缺失 ORF73 或 ORF214 基因对重组鸡痘病毒免疫应答的影响

王彦红, 陈素娟, 刘武杰, 仇旭升, 董丽, 彭大新, 刘秀梵*

(扬州大学畜禽传染病学农业部重点开放实验室, 扬州 225009)

摘要:【目的】旨在研究鸡痘病毒 ORF73 和 ORF214 编码蛋白是否具有 IL-18 结合蛋白的功能, 以及 ORF73 或 ORF214 基因缺失后对重组病毒诱导免疫应答的影响。【方法】以缺失 ORF73 或 ORF214 基因并表达 H5 亚型 AIV HA 基因的重组鸡痘病毒 (rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A、rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A) 作为研究对象, 以未缺失 ORF73 或 ORF214 基因而表达 H5 亚型 AIV HA 基因的重组鸡痘病毒 (rFPV_{LP}-12LSH5A) 作为对照, 检测重组病毒体外诱导 SPF 鸡脾细胞和外周血淋巴细胞产生 IFN 情况, 同时检测重组病毒免疫 SPF 鸡后诱导的体液免疫、CD4⁺/CD8⁺ 比值、外周血淋巴细胞的增殖能力和 H5 亚型 AIV 强毒攻击后的免疫保护效力。【结果】rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A 和 rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A 体外诱导脾细胞产生的 IFN 量显著高于 rFPV_{LP}-12LSH5A, 而免疫 10 d 后的 CD4⁺/CD8⁺ 比值显著低于 rFPV_{LP}-12LSH5A; 3 种重组鸡痘病毒诱导外周血淋巴细胞增殖的能力没有明显差异; 3 种重组病毒在 SPF 鸡均产生针对 H5 亚型 AIV 的 HI 抗体, 免疫 14 d 后 rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A 组诱生的 HI 抗体水平显著低于 rFPV_{LP}-12LSH5A 组的抗体, 但 3 组在免疫 21 d 后 HP AIV 的致死性攻击时, 均 100% 被保护。【结论】鸡痘病毒 ORF73 和 ORF214 编码蛋白具有 IL-18 结合蛋白抑制 IFN 产生的功能, 虽然缺失株和亲本株重组鸡痘病毒在细胞和体液免疫应答存在一定差异, 但在 SPF 鸡均能诱导产生良好的免疫保护。

关键词: 重组鸡痘病毒; ORF73; ORF214; 免疫应答

中图分类号: S852 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0512-05

鸡痘病毒 (FPV) 是禽痘病毒属成员之一, Afonso^[1] 报道的美国强毒株 (FPVUS) 基因组为 288 kb, 有 260 个 ORF, 而英国 FP9 弱毒株基因组全长为 266 kbp^[2], 有 244 个 ORF, 弱毒株在筛选过程中丢失了部分毒力基因, 失去致病力, 但却因对机体能产生免疫保护力而成为疫苗株。疫苗株保留较多的参与免疫逃逸的基因, 这些基因编码的蛋白很多是细胞因子结合蛋白的同源物^[1-3], 如 IFN- γ -结合蛋白 (IFN- γ -binding proteins, FPV016) 和丝氨酸蛋白酶抑制物同源物 (serpin, FPV010 and FPV040)。

早期研究结果显示, FPV 282E4 株、102E6 株和 LP 株的 ORF73 和 ORF214 基因与 FPVUS 强毒株和 FP9 弱毒株完全一致^[4-5]。痘病毒的免疫调节因子在痘病毒的演化过程中非常保守, 几种不同地域、不同毒株的 FPV 的 ORF73 和 ORF214 序列完全一致, 提示了这两个基因可能是参与免疫调节相关的基因。发表的文献对 FPV 编码参与免疫逃逸的 IL-18 结合蛋白 (vIL-18BP) 的基因有两种不同的推测, 一种认为 ORF73, 一种认为是 ORF214, 但均没有实验证实^[1-2]。本文将表达 H5AIV (Avian Influenza

基金项目: 国家“863 计划” (2006AA10A205); “十一五” 国家支撑计划项目 (2006BAD06A16); 江苏省自然科学基金 (SBK200930422)

* 通信作者。Tel: +86-514-87991416; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

作者简介: 王彦红 (1974 -), 女, 安徽寿县人, 讲师, 博士研究生, 研究方向为预防兽医学。Tel: +86-514-87979036; E-mail: wyh7405@163.com.cn

收稿日期: 2009-08-13; **修回日期:** 2010-01-14

Virus, AIV) 的 HA 基因而缺失 ORF73 或 ORF214 基因的重组鸡痘病毒免疫 SPF 鸡, 通过检测细胞免疫和体液免疫应答, 以探讨 ORF73 和 ORF214 编码蛋白是否具有 IL-18 结合蛋白的功能, 以及 ORF73 或 ORF214 缺失对重组病毒诱导免疫应答和免疫保护的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料: SPF 鸡胚购自山东省家禽研究所。1 日龄 SPF 鸡由本实验室自行孵化。鹅源 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒 (Highly pathogenic avian influenza virus, HPAIV) A/Goose/Huadong/G5/2000 株 (简称 AIV G5 株) 和鸡痘病毒大空斑疫苗株 (wt-FPV_{LP}) 由本室保存。表达 H5 亚型禽流感病毒血凝素 (HA) 基因而缺失 FPV ORF73 或 ORF214 基因的重组鸡痘病毒 (rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A、rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A) 由作者构建 (未发表), 表达 H5 亚型 AIV HA 基因的重组鸡痘病毒 (rFPV_{LP}-12LSH5A) 由刘武杰等^[6] 构建。

1.1.2 主要试剂和仪器: 高致病性 H5 亚型禽流感油剂灭活疫苗由青岛易邦生物工程有限公司提供。ConA、XTT 和 PMS 购自 Sigma 公司, FITC 标记的 mouse anti-chicken CD4 和 PE 标记的 mouse anti-chicken CD8 α 购自 Southern Biotechnology Associates Inc。流式细胞仪购自 Becton Dickinson 公司。

1.2 重组病毒体外诱导 IFN 活性检测

无菌取 6 周龄 SPF 鸡的脾脏和抗凝血, 分离脾细胞和外周血淋巴细胞^[7]。取 0.01 MOI rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A、rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A 和 rFPV_{LP}-12LSH5A 分别接种鸡脾细胞和外周血淋巴细胞, 接种 12 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 后吸取上清液用于检测^[8]。每个时间段设 4 个重复, 上清用紫外光灭活 15 min^[8], 同时取部分上清置 60 $^{\circ}$ C 水浴箱, 作用 30 min, 未经热处理和热处理上清均按 10 \times 稀释, 参照 2005 年版《中国药典》中《干扰素效价测定 (细胞病变抑制法)》方法, 检测的 IFN 活性^[9]。结果按 Reed-Muench 法计算出 IFN 含量, 以国际单位 (IU) 表示。

1.3 外周血淋巴细胞中 CD4⁺/CD8⁺ 比值测定

20 只 6 周龄 SPF 雏鸡分为 4 组, 每组 5 只, 分别于颈部皮下免疫 rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A、rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A 和 rFPV_{LP}-12LSH5A, 剂量为 10⁵ PFU/只, 同时设 PBS 对照组, 剂量为 0.2 mL/只, 于免疫

3、7、10 和 14 d 后采集抗凝血分离外周血淋巴细胞^[7]。取 100 μ L 外周血淋巴细胞悬液 (细胞约 10⁷ 个/mL), 加入抗 CD4⁺ 和 CD8⁺ 抗体室温作用 20 - 30 min 后, 用 PBS 洗涤 3 次后, 再用 100 μ L PBS 悬浮后, 用流式细胞仪检测 CD4⁺/CD8⁺ 比值^[7]。

1.4 外周血淋巴细胞增殖试验

从 1.3 实验中获得外周血淋巴细胞悬液 (细胞约 10⁶ 个/mL), 以每孔 100 μ L 细胞悬液 (含终浓度为 15 μ g/mL 的 ConA) 加入 96 孔圆底板, 每个样品设 3 个重复。同时设无 ConA 对照细胞孔和 RPMI 1640 空白对照孔。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 48 h 后每孔加入 25 μ L XTT/PMS (5 mg/mL), 孵育 6 h 后测 450 nm 波长 OD 值。根据下列公式计算刺激指数 (SI) = ConA 刺激细胞孔 OD 值 (3 管平均值) / ConA 未刺激细胞孔 OD 值 (3 管平均值)^[10]。

1.5 体液免疫和免疫保护效力测定

7 日龄 SPF 雏鸡分别于颈部皮下免疫 rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A、rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A、rFPV_{LP}-12LSH5A 和 wt-FPV_{LP}, 剂量为 10⁵ PFU/只, 同时设 H5 亚型 AI 油剂灭活疫苗对照组, 每组 10 只, 剂量为 0.2 mL/只, 于免疫 7、14 和 21 d 后采集血清并用血凝抑制法 (Hemagglutination inhibition test, HI) 检测抗体滴度。免疫 21 d 后, 用剂量为 10⁵ ELD₅₀/只的 AIV G5 株强毒进行滴鼻攻击。所有试验鸡于攻毒后持续观察 18 d, 记录试验鸡的发病和死亡情况。

1.6 统计学分析

所用统计软件为 SPSS 12.0 for Windows。

2 结果

2.1 重组病毒体外诱导 IFN 活性检测

rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A、rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A 和 rFPV_{LP}-12LSH5A 刺激脾细胞后, 均产生一定活性的 IFN, 但缺失 ORF73 或 ORF214 的 rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A 和 rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A 刺激产生的 IFN 显著高于 rFPV_{LP}-12LSH5A (表 1)。在接种 rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A 和 rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A 72 h 和 96 h 后收集的上清经 60 $^{\circ}$ C 水浴作用 30 min, 其抗病毒活性与未作热处理的上清相比下降约 10 倍, 在其它时间点收集的上清热处理前后的抗病毒活性无变化, 而 rFPV_{LP}-12LSH5A 在所有时间点的采集的上清抗病毒活性均无变化。但是重组病毒刺激外周血淋巴细胞后, 其上清液没有抗病毒活性, 即重组病毒不能诱导外周血淋巴细胞产生 IFN。

表 1 重组鸡痘病毒刺激脾细胞产生 IFN

Table 1 IFN release by splenocytes after incubation with rFPV

Groups	Antiviral activity in splenocytes supernatant (IU/mL)				
	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
rFPV _{LP} - Δ 73LRH5A	40 \pm 5.29 ^a	100 \pm 0	100 \pm 0	316 \pm 10.19	316 \pm 12.94
rFPV _{LP} - Δ 214LRH5A	20 \pm 4.08	60 \pm 4.79	80 \pm 9.48	316 \pm 12.12	316 \pm 5.91
rFPV _{LP} -12LSH5A	<10	40 \pm 8.26	40 \pm 9.88	40 \pm 4.78	40 \pm 7.39

Note: ^a IFN titer (IU/ml) = mean IFN titer \pm standard deviation ($P < 0.05$)

2.2 外周血淋巴细胞中 CD4⁺/CD8⁺ 比值变化

用流式细胞仪检测 CD4⁺/CD8⁺ 比值, rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A 和 rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A 免疫组与 PBS 对照组相比较, 结果(图 1)是免疫 3 d 后其 CD4⁺/CD8⁺ 比值(3.85 \pm 1.32 和 3.11 \pm 0.51)略高于 PBS 对照组, 免疫 7 和 10 d 后其比值(2.22 \pm 0.64 和 2.02 \pm 0.92)略低于 PBS 对照组, 免疫 14 d 后其比值(2.30 \pm 0.82 和 2.42 \pm 0.91)高于 PBS 对照组, 无显著差异。然而, 在免疫 10 d 后未缺失 ORF73 和 ORF214 的 rFPV_{LP}-12LSH5A 免疫组 CD4⁺/CD8⁺ 比值(6.34 \pm 2.68)显著高于其他 3 组($P < 0.05$)。

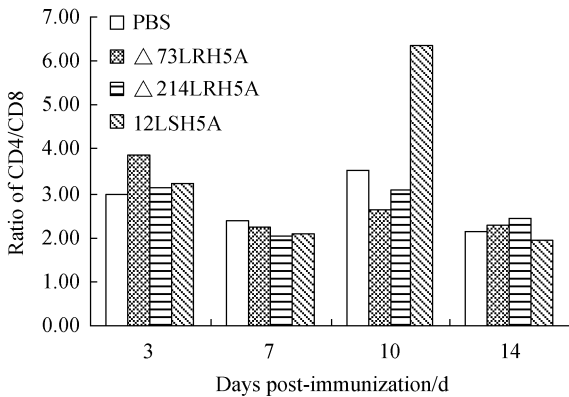
图 1 CD4⁺/CD8⁺ 比值变化

Fig. 1 Ratio of CD4⁺/CD8⁺ in SPF chicken.

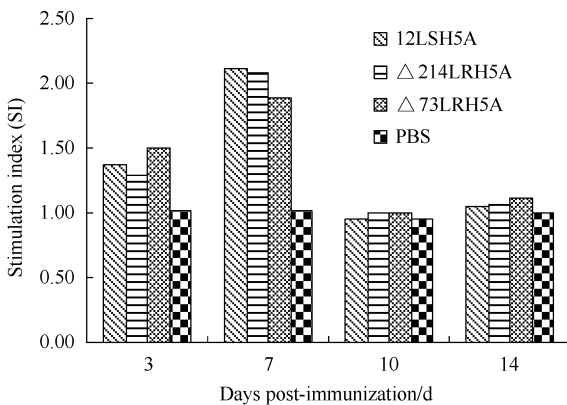


图 2 重组病毒接种后刺激雏鸡外周血淋巴细胞转化结果(刺激指数)

Fig. 2 rFPV in responsiveness of chicken peripheral lymphocytes (stimulation index).

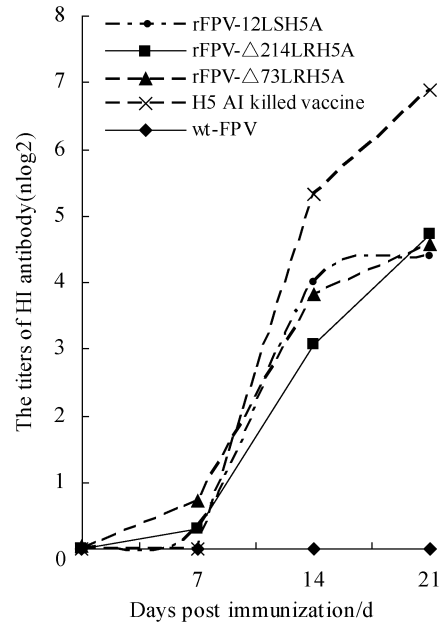


图 3 针对 H5 亚型 AIV 的 HI 抗体动态变化

Fig. 3 Kinetics of HI antibody titers against H5 subtype AIV.

2.3 外周血淋巴细胞增殖试验

外周血淋巴细胞增殖试验结果表明: rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A、rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A 和 rFPV_{LP}-12LSH5A 三种重组疫苗都能诱导外周血淋巴细胞的增殖, 在免疫 7 d 后增殖能力达到最高, 刺激指数分别为 1.89、2.08 和 2.12, 三者之间差异不显著, 在免疫 10 d 后增殖能力回归到正常(图 2)。

2.4 重组病毒诱导体液免疫应答和免疫效力

rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A、rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A、rFPV_{LP}-12LSH5A、wt-FPV_{LP} 和 H5 亚型 AI 油乳剂灭活疫苗分别免疫 SPF 鸡, 采集血清检测 HI 抗体(以 Log₂ⁿ 表示)。结果显示(图 3): 重组鸡痘病毒疫苗均能有效地诱导 HI 抗体产生, 但免疫 14 d 后, rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A 组诱生的 HI 抗体水平(3.07 \pm 0.25)显著低于 rFPV_{LP}-12LSH5A 免疫组的抗体(4.0 \pm 0.34) ($P < 0.05$), 免疫 14 和 21 d 后重组疫苗免疫组诱生的抗体水平(3.07-4.0 和 4.38-4.71)显著低于 H5 亚型 AI 油乳剂灭活疫苗免疫组(5.33 和 6.89) ($P < 0.05$)。免疫 21 d 后攻毒, 结果显示所有重组病毒和 H5 亚型 AI 油乳剂灭活疫苗均能 100% 保护试验鸡, 而

wt-FPV_{LP} 试验组鸡于 24-48 h 内全部死亡。

3 讨论

FPV 有一些基因的编码蛋白参与免疫逃逸, 其中部分编码蛋白的生物学功能仍不清楚, 一般仅是通过与其它病毒或细胞同源物类比来推测其功能, 例如对于 FPV 编码 vIL-18BP 的基因有不同的推测, 一种认为是 ORF73, 另一种认为是 ORF214^[1-2]。但是 ORF73 和 ORF214 编码蛋白是否具有 IL-18BP 的功能及其作用的分子机制还未见有报道。IL-18 是在机体先天性和获得性免疫中发挥重要作用的细胞因子, 它可诱导 NK 细胞和 T 细胞产生高水平的 IFN- γ , 同时它可诱导和加速幼稚 T 细胞向 Th1 细胞发育, 并促进 Th1 细胞对入侵微生物清除^[11]。痘病毒通过编码 IL-18BP 和丝氨酸蛋白酶抑制剂两种途径来拮抗 IL-18 的活性, 来达到免疫逃逸的作用^[12]。本研究中缺失 ORF73 或 ORF214 的重组鸡痘病毒 rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A 和 rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A 刺激 SPF 鸡脾细胞产生的 IFN 显著高于亲本株重组鸡痘病毒 rFPV_{LP}-12LSH5A, 而且这种差异从感染后 12 h 至 96 h 越来越显著(表 1), 表明 ORF73 和 ORF214 的编码蛋白都具有 IL-18BP 抑制 IFN 表达的功能, 致使 ORF73 或 ORF214 缺失后重组病毒均表现刺激 IFN 升高的效果。此外, 本试验中重组病毒不能诱导鸡外周血淋巴细胞分泌 IFN, Gobel 等^[13] 研究证实鸡 IL-18 刺激鸡外周血淋巴细胞分泌 IFN 时必须依赖 TCR cross-linking 或者巨噬细胞的辅助, 因此, 在体外试验中可能有较多因素限制了鸡外周血淋巴细胞分泌 IFN。

病毒免疫后, 引起 T 细胞应答, 导致 T 细胞活化、增殖, 产生效应 T 细胞包括 CD4⁺ 效应细胞、CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞(CTL)和分泌大量细胞因子。缺失 ORF73 或 ORF214 的重组鸡痘病毒免疫 SPF 鸡后, 刺激体内产生高水平的 IFN, 重组病毒在体内的复制受到强烈抑制, 由于病毒数量少, 因此只能产生较低水平的细胞应答, 而亲本株的重组鸡痘病毒免疫鸡则由于刺激产生的 IFN 水平低, 重组病毒在体内还能继续复制, 因此可以产生较强的细胞应答, 出现了 rFPV_{LP}-12LSH5A 免疫 10 d 后 CD4⁺/CD8⁺ 比值显著增高。然而, 外周血淋巴细胞增殖试验结果表明基因缺失株重组病毒免疫后与亲本株病毒相似, 能引起 T 淋巴细胞活化、增殖, 形成特异性免疫应答。

重组病毒免疫机体后, IFN 分泌增加, 有利于阻止病毒复制, 能提高吞噬细胞对病毒的吞噬和 T、B 淋巴细胞的活化能力, 增强体内的免疫应答。研究

发现 FPV 载体共表达外源基因和 IFN 时, 虽然 IFN 在一定程度上降低疫苗病毒复制水平和抗体表达水平, 但 IFN 可显著降低 FPV 接种造成的免疫鸡增重减缓的副反应, 并具有较好的保护效果^[14-17]。本研究中重组病毒免疫 SPF 鸡 14 d 后, rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A 免疫组诱生的 HI 抗体水平(3.07 \pm 0.25) 显著低于 rFPV_{LP}-12LSH5A 免疫组的抗体(4.0 \pm 0.34) ($P < 0.05$), rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A 免疫组的 HI 抗体水平(3.83 \pm 0.23) 略低于 rFPV_{LP}-12LSH5A 免疫组, 但免疫 21 d 后, 攻毒结果显示基因缺失株重组病毒均能 100% 保护试验鸡, 说明缺失 ORF73 或 ORF214 降低了重组病毒的免疫逃逸功能, 对细胞免疫和体液免疫功能均产生了一定影响, 但在 SPF 鸡的条件下尚未影响到保护效力。

参考文献

- [1] Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, et al. The genome of fowlpox virus. *Journal of Virology*, 2004, 74(8):3815-3831.
- [2] Laidlw SM, Skinner MA. Comparison of the genome sequence of FP9, an attenuated, tissue culture-adapted European strain of fowlpox virus, with those of virulent American and European viruses. *The Journal of General Virology*, 2004, 85(2):305-322.
- [3] Puehler F, Schwarz H, Waidner B, et al. An interferon-gamma-binding protein of novel structure encoded by the fowlpox virus. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(9), 6905 - 6911.
- [4] 王彦红, 马怀良, 胡顺林, 等. 鸡痘病毒 ORF073 基因克隆及原核表达. 扬州大学学报(农业与生命科学版) [*Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*], 2006, 27(4):5-8.
- [5] 王彦红, 马怀良, 时红星, 等. 鸡痘病毒 ORF214 原核表达蛋白单克隆抗体的制备及其初步鉴定. 细胞与分子免疫学杂志 (*Journal of Cellular and Molecular Immunology*), 2007, 23(12):1197-1199.
- [6] 刘武杰. H5 亚型禽流感或新城疫不同遗传背景的毒株在鸡体的交叉保护性. 扬州大学博士学位论文, 2009.
- [7] Fair JM, Taylor-McCabe KJ, Shou Y, et al. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: Individual variability and repeatability. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 125(3-4), 268-273.
- [8] Büttner M, Czerny CP, Lehner KH, et al. Interferon induction in peripheral blood mononuclear leukocytes of an and farm animals by poxvirus vector candidates and some poxvirus constructs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1995, 46(3-4):237-250.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第三部). 北京: 化学工业出版社, 2005.

- [10] Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, et al. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods*, 1991, 142(2): 257-265.
- [11] Novick D, Kim S H, Fantuzzi G, et al. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity*, 1999, 10(1): 127-136.
- [12] Peter C, Richard W. Poxvirus immune modulators: functional insights from animal models. *Virus Research*, 2002; 88(1-2): 35-53.
- [13] Gobel TW, Sejeoder K, Schaerer B, et al. IL-18 stimulates the proliferation and IFN- γ release of CD4 + T cells in the chicken; conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species. *The Journal of Immunology*, 2003, 171(4): 1809-1815.
- [14] 彭大新, 刘秀梵, 程坚, 等. 共表达 MDV 糖蛋白 B 和鸡 γ 干扰素基因的重组鸡痘病毒的构建. *微生物学报* (*Acta Microbiologica Sinica*), 2002, 42(5): 611-615.
- [15] 程坚, 刘秀梵, 彭大新, 等. 共表达 H9 亚型禽流行性感 冒病毒血凝素基因和鸡 II 型干扰素基因的重组鸡痘 病毒及其免疫效力. *病毒学报* (*Chinese Journal of Virology*), 2003, 19(1): 52-58.
- [16] Karaca K, Sharma JM, Winslow BJ, et al. Recombinant fowlpox virus coexpressing chicken type I interferon and Newcastle disease virus HN and F genes; influence of IFN on protective efficacy and humoral response of chicken following in ovo or posthatch administration of recombinant virus. *Vaccine*, 1998, 16(16): 1496-1503.
- [17] Rautenschlein S, Sharma JM, Winslow BJ, et al. Embryo vaccination of turkeys against Newcastle disease infection with recombinant fowlpox virus constructs containing interferons as adjuvants. *Vaccine*, 1999, 18(5-6): 426-433.

Induction of potent immune responses by recombinant fowlpox virus with deleted ORF73 or ORF214

Yanhong Wang, Sujuan Chen, Wujie Liu, Xusheng Qiu, Li Dong, Daxing Peng, Xiufan Liu*

(Animal Infectious Disease Laboratory, School of Veterinary Medicine, Yangzhou University, 225009 Yangzhou, China)

Abstract: [**Objective**] To determine if the fowlpox virus (FPV) ORF73 or ORF214 gene encoding protein has the function of IL-18 binding protein, and to assess the role that ORF73 or ORF214 gene in regulating the immune response. [**Methods**] We constructed recombinant fowlpox virus (rFPV) vector-based rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A or rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A, expressing avian influenza haemagglutinin gene (H5A) with ORF73 or ORF214 gene deletion, respectively. The parental recombinant virus expressing avian influenza haemagglutinin (rFPV_{LP}-12LSH5A) was used as the control virus. The production of interferon (IFN) *in vitro* by splenocytes and peripheral blood mononuclear leukocytes (PBML) of SPF chickens stimulated with rFPVs was detected. The immune efficacy, antibody responses, ratio of CD4 + / CD8 +^T lymphocyte and multiplication capacity of PBML induced by the rFPVs vector-based rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A, rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A and rFPV_{LP}-12LSH5A vaccine were evaluated in SPF chickens. [**Results**] The level of IFN production from splenocytes stimulated with rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A and rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A was significantly higher than that with rFPV_{LP}-12LSH5A *in vitro*, whereas the ratio of CD4 + / CD8 +^T lymphocyte in rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A and rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A groups was significantly lower than that in rFPV_{LP}-12LSH5A groups after 10 days post immunization (dpi). These rFPVs stimulated the proliferation of PBML without significant difference. All chickens immunized with rFPV_{LP}- Δ 73LRH5A, rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A or rFPV_{LP}-12LSH5A produced HI antibodies against H5 AIV HA antigen, and rFPV_{LP}- Δ 214LRH5A induced significantly lower HI titer than rFPV_{LP}-12LSH5A after 14 dpi. All immunized chickens were fully protected against lethal challenge of H5N1 AIV. [**Conclusion**] ORF73 and ORF214 encoding proteins blocked induction of IFN, suggesting that they are provided with IL-18BP functionality. Despite of decreasing humoral response and cell-mediated immune response, rFPV_w with deleted FPV73 or FPV214 gene could induce the effective efficacy in SPF chickens.

Keywords: recombinant fowlpox viruses; ORF73; ORF214; immune response

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2006AA10A205), the 11th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2006BAD06A16) and the Natural Science Foundation of Jiangsu (SBK200930422)

* Corresponding author. Tel: +86-514-87991416; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

Received: 13 August 2009 / Revised: 14 January 2010