

分类号: S855.3

授予学位单位代码: 10434
学号: 2022120592

山東農業大學

硕士专业学位论文

香菇多糖对雏鸡感染马立克氏病病毒的抑制作用研究

Study on the Inhibitory Effect of Lentinan on Chicks Against
Marek's Disease Virus Infection

姓 名 : 高启明
学 位 类 别 : 兽医硕士
专 业 : 兽医
研 究 方 向 : 动物疫病防控
学 院 : 动物医学院
指 导 教 师 : 常爽 副教授

2024 年 5 月 25 日

论 文 提 交 日 期: 2024.04.07

论 文 答 辩 日 期: 2024.05.18

学 位 授 予 日 期: 2024.06

学 位 类 别: 兽医 硕士

答 辩 委 员 会 主 席: 秦卓明

符号说明

bp	Base pair	碱基对
CEF	Chicken embryo fibroblasts	鸡胚成纤维细胞
d	Day	天
dpi	Days post infection	感染后天数
g	Gram	克
IL-2	Interleukin-2	白细胞介素-2
IL-4	Interleukin-4	白细胞介素-4
IL-6	Interleukin-6	白细胞介素-6
IL-18	Interleukin-18	白细胞介素-18
IFN- α	Interferon- α	干扰素- α
IFN- β	Interferon- β	干扰素- β
IFN- γ	Interferon- γ	干扰素- γ
IRS	Internal repeat short	短内部重复区
IRL	Internal repeat long	长内部重复区
LNT	Lentinan	香菇多糖
MD	Marek's disease	马立克氏病
MDV	Marek's disease virus	马立克氏病病毒
Meq	Marek's disease virus oncogene	鸡马立克氏病病毒致癌基因
mL	Milliliter	毫升
mRNA	Messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
min	Minute	分钟
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PFU	Plaque forming unit	蚀斑形成单位

RT	Reverse transcription	反转录
s	Second	秒
SPF	Specific pathogen free	无特定病原
TNF- α	Tumor necrosis factor - α	肿瘤坏死因子- α
μ L	Microliter	微升
UL	Unique long region	长独特区
US	Unique short region	短独特区
vMDV	Virulent Marek's disease virus	强毒型马立克氏病病毒
vvMDV	Very virulent Marek's disease virus	超强毒型马立克氏病病毒
vv+MDV	Very virulent plus Marek's disease virus	特超强毒型马立克氏病病毒

目 录

1 前言.....	1
1.1 鸡马立克氏病.....	1
1.1.1 病原学.....	1
1.1.2 流行病学.....	2
1.1.3 临床症状及病理变化.....	2
1.1.4 诊断方法.....	3
1.1.5 防控措施.....	3
1.1.6 MDV 感染模型	5
1.1.7 MDV 感染所引起机体免疫应答	5
1.2 与 MDV 感染相关的细胞因子	6
1.2.1 干扰素- γ	6
1.2.2 白细胞介素-2	7
1.2.3 白细胞介素-6	7
1.2.4 白细胞介素-18	7
1.2.5 肿瘤坏死因子- α	8
1.2.6 Mx 抗病毒蛋白	8
1.3 香菇多糖.....	8
1.3.1 结构与构效关系.....	9
1.3.2 提取.....	9
1.3.3 纯化.....	10
1.3.4 生物学活性.....	11
1.4 本研究的目的与意义.....	13
2 材料与方法.....	14
2.1 材料.....	14
2.1.1 实验动物.....	14
2.1.2 病毒.....	14
2.1.3 疫苗.....	14
2.1.4 香菇多糖.....	14
2.1.5 主要试剂.....	14
2.1.6 主要仪器.....	15
2.2 实时荧光定量 PCR 检测方法.....	15
2.2.1 基于细胞因子基因与内参基因的实时荧光定量 PCR 检测方法	15
2.2.2 基于 Meq 基因的实时荧光定量 PCR 检测方法	15

2.2.3 实时荧光定量 PCR 反应体系	16
2.3 香菇多糖对 SPF 雏鸡的免疫增强作用研究	16
2.3.1 动物实验设计	16
2.3.2 体重	17
2.3.3 细胞因子表达情况	17
2.3.4 细胞免疫水平	17
2.4 香菇多糖预防性使用对 MDV 感染的抑制作用研究	17
2.4.1 动物实验设计	17
2.4.2 体重	18
2.4.3 器官发育指数	18
2.4.4 外周淋巴细胞病毒载量	18
2.4.5 内脏病毒载量	18
2.5 香菇多糖治疗性使用对 MDV 感染的抑制作用研究	18
2.5.1 动物实验设计	18
2.5.2 体重	19
2.5.3 器官发育指数	19
2.5.4 外周淋巴细胞病毒载量	19
2.5.5 AIV-H9 抗体效价	19
2.6 香菇多糖与疫苗联合使用对 vMDV 感染的抑制作用研究	19
2.6.1 动物实验设计	19
2.6.2 体重	20
2.6.3 器官发育指数	20
2.6.4 外周淋巴细胞病毒载量	20
2.6.5 内脏病毒载量	20
2.6.6 羽毛囊病毒载量	21
2.7 香菇多糖与疫苗联合使用对 vvMDV 感染的抑制作用研究	21
2.7.1 动物实验设计	21
2.7.2 体重	21
2.7.3 器官发育指数	21
2.7.4 外周淋巴细胞病毒载量	22
2.7.5 内脏病毒载量	22
2.7.6 羽毛囊病毒载量	22
2.8 各实验指标的检测方法	22
2.8.1 器官发育指数的检测	22
2.8.2 细胞因子表达情况的检测	22
2.8.3 细胞免疫水平的检测	24
2.8.4 MDV 病毒载量的检测	24
2.8.5 血凝与血凝抑制试验检测 AIV-H9 抗体效价	25

3 结果与分析.....	27
3.1 香菇多糖对 SPF 雏鸡的免疫增强作用.....	27
3.1.1 体重.....	27
3.1.2 细胞因子表达情况.....	27
3.1.3 细胞免疫水平.....	28
3.2 香菇多糖预防性使用对 MDV 感染的抑制作用.....	30
3.2.1 体重.....	30
3.2.2 器官发育指数.....	31
3.2.3 外周淋巴细胞中 MDV 病毒载量检测.....	32
3.2.4 内脏器官中 MDV 病毒载量检测.....	32
3.3 香菇多糖治疗性使用对 MDV 感染的抑制作用.....	34
3.3.1 体重.....	34
3.3.2 器官发育指数.....	35
3.3.3 外周淋巴细胞中 MDV 病毒载量检测.....	37
3.3.4 不同组别 AIV-H9 抗体效价测定.....	38
3.4 香菇多糖与疫苗联合使用对 vMDV 感染的抑制作用.....	39
3.4.1 体重.....	39
3.4.2 器官发育指数.....	40
3.4.3 外周淋巴细胞中 MDV 病毒载量检测.....	41
3.4.4 内脏器官中 MDV 病毒载量检测.....	41
3.4.5 羽毛囊病毒载量.....	41
3.5 香菇多糖与疫苗联合使用对 vvMDV 感染的抑制作用.....	43
3.5.1 体重.....	43
3.5.2 器官发育指数.....	44
3.5.3 外周淋巴细胞 MDV 病毒载量.....	45
3.5.4 内脏器官中 MDV 病毒载量检测.....	46
3.5.5 羽毛囊病毒载量.....	46
4 讨论.....	48
4.1 香菇多糖对 SPF 雏鸡的免疫增强作用.....	48
4.2 香菇多糖预防性使用对缓解 MDV 感染的作用.....	49
4.3 香菇多糖治疗性使用对缓解 MDV 感染的作用.....	50
4.4 香菇多糖对马立克氏病疫苗的免疫增强作用.....	51
4.5 香菇多糖的免疫增强作用以及不同方式应用时对缓解 MDV 感染的作用分析.....	52
5 结论.....	54
6 参考文献.....	55

中文摘要

马立克氏病 (Marek's disease, MD) 是由马立克氏病病毒 (Marek's disease virus, MDV) 感染引起的鸡的一种淋巴组织增生性免疫抑制性传染病。MDV 是一种重要的致肿瘤病毒, 可引起鸡群发生严重的免疫抑制。近年来的流行病学调查结果显示, MDV 在我国流行有增强的趋势。疫苗免疫是控制 MDV 感染最有效的手段, 随着毒株毒力增强以及与免疫抑制病毒的混合感染经常导致疫苗免疫失败, 为此很多企业试图通过一些辅助措施增强对该病的防控效果, 其中香菇多糖 (Lentinan, LNT) 的应用潜力备受关注。

LNT 是一种从香菇中提取的含有 β -葡聚糖的免疫调节剂, 可通过刺激免疫细胞成熟、分化、增殖和产生细胞因子等方式发挥免疫作用, 从而改善或恢复宿主的机体平衡, 提高宿主细胞对淋巴因子、激素等生物活性因子的反应性, 在免疫调节、抗病毒、抗肿瘤等方面被广泛应用。

为研究 LNT 对 SPF 雏鸡的免疫调节作用以及对抗 MDV 感染及其引起的免疫抑制的作用, 本研究首先进行了 LNT 对 SPF 雏鸡的免疫增强作用的研究, 并在其基础上进行了预防性使用 LNT 对 MDV 感染的作用研究, 治疗性使用 LNT 对 MDV 感染的作用研究以及 LNT 与疫苗联合使用对 vMDV 和 vvMDV 感染的作用研究。

在 LNT 对 SPF 雏鸡的免疫增强作用研究中, 结果表明, 在 7 日龄, 连续使用 LNT 6 天的 LNT 组的体重显著高于 Control 组 ($P<0.01$), LNT 组的干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-2 (IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、Mx 抗病毒蛋白 (Mx protein) 等多种细胞因子较 Control 组上调, 且 LNT 组的 CD4+T 淋巴细胞比重及其与 CD8+T 淋巴细胞比重的比值也明显上调 ($P<0.01$)。在预防性使用 LNT 对 MDV 感染的作用研究中, 结果表明, 在攻毒后 35d, 未使用 LNT 的攻毒组 MDV 组的体重极显著低于预防性使用 LNT 的 LNT+MDV 组和 Negative control 组 ($P<0.0001$), MDV 组的肝脏发育指数和脾脏发育指数显著高于 LNT+MDV 组和 Negative control 组, 而 LNT+MDV 组和 Negative control 组的上述指标无显著差异 ($P>0.05$), 且在攻毒后 21、35d, LNT+MDV 组的外周淋巴细胞、肝脏和脾脏中的 MDV 病毒载量均极显著低于 MDV 组 ($P<0.01$)。

在治疗性使用 LNT 对 MDV 感染的作用研究中, 结果表明, 在攻毒后 42d, 未使用 LNT 的攻毒组 MDV 组的体重显著低于治疗性使用低剂量 LNT 的攻毒组 Low-dose LNT

组,治疗性使用高剂量 LNT 的攻毒组 High-dose LNT 组和 Negative control 组 ($P<0.01$), MDV 组的肝脏发育指数显著高于 Low-dose LNT 组 ($P<0.05$), 极显著高于 High-dose LNT 组和 Negative control 组 ($P<0.01$), 而 Low-dose LNT 组、High-dose LNT 组和 Negative control 组之间的上述指标无统计学差异 ($P>0.05$)。在攻毒后 14、28d, Low-dose LNT 组和 High-dose LNT 组的外周淋巴细胞中的 MDV 病毒载量极显著低于 MDV 组 ($P<0.0001$), 且 High-dose LNT 组的外周淋巴细胞中的 MDV 病毒载量极显著低于 Low-dose LNT 组 ($P<0.01$)。

在 LNT 与疫苗联合使用对 vMDV 和 vvMDV 感染的作用研究中,结果表明,在面对 vMDV 感染时,只使用疫苗的攻毒组 SC9-1 组的外周淋巴细胞、肝脏、脾脏和羽毛囊中的 MDV 病毒载量均低于未使用 LNT 和疫苗的攻毒组 SDAU1501 组,且使用 LNT 和疫苗的攻毒组 LNT+SC9-1 组的上述 MDV 病毒载量又进一步低于 SC9-1 组,并在攻毒后 21d, LNT+SC9-1 组的外周淋巴细胞中的 MDV 病毒载量极显著低于 SC9-1 组 ($P<0.0001$)。在面对 vvMDV 感染时,SC9-1 组的体重高于 Md5 组,而 LNT+SC9-1 组的体重高于 SC9-1 组,并在攻毒后 3、21d, LNT+SC9-1 组的体重显著高于 SC9-1 组 ($P<0.05$)。SC9-1 组的外周淋巴细胞、肝脏、脾脏和羽毛囊中的 MDV 病毒载量均低于 Md5 组,且 LNT+SC9-1 组的上述 MDV 病毒载量又进一步低于 SC9-1 组,并且在攻毒后 14d, LNT+SC9-1 组的外周淋巴细胞和脾脏中的 MDV 病毒载量极显著低于 SC9-1 组 ($P<0.001$),在攻毒后 21d, LNT+SC9-1 组的肝脏中的 MDV 病毒载量显著低于 SC9-1 组 ($P<0.0001$)。

根据上述结果,本研究证实了 LNT 可以促进 SPF 雏鸡育雏期的生长发育,提高 SPF 雏鸡的先天免疫水平和细胞免疫水平。预防性使用或治疗性使用 LNT 均可以抑制在雏鸡体内的复制,缓解 MDV 感染及其引起的免疫抑制。LNT 可以提高鸡马立克氏病基因缺失活疫苗(SC9-1 株)的免疫效果,更好的抑制 MDV 在雏鸡体内的复制以及预防或缓解 vMDV 或 vvMDV 感染及其引起的免疫抑制。为更好的控制 MDV 感染提供了辅助性措施。

关键词: 马立克氏病病毒, 免疫抑制, 香菇多糖, 免疫调节, 疫苗免疫

Study on the Inhibitory Effect of Lentinan on Chicks Against Marek's Disease Virus Infection

Abstract

Marek's disease (MD) is a lymphoproliferative immunosuppressive disease of chickens caused by Marek's disease virus (MDV). MDV is an important oncogenic virus, which can cause severe immune suppression in chicken flocks. Epidemiological studies have revealed a rising trend in MDV prevalence in China in recent years. While vaccination is the most effective means of preventing and controlling the MDV infection, co-infection with immunosuppressive viruses frequently results in vaccination failure increase the virulence of the strain.

Lentinan (LNT), an immunomodulator containing β -glucan extracted from shiitake mushrooms, it can play an immunological role by stimulating immune cell maturation, differentiation, proliferation, and production of cytokines, thus improving or restoring the host's homeostasis and increasing the responsiveness of host cells to biologically active factors like lymphokines and hormones. Consequently, it finds extensive application in various domains such as immunological modulation, antiviral therapy, and anti-tumor therapy.

To study the immunomodulatory effects of LNT on SPF chicks and its effects against MDV infection and its induced immunosuppression, firstly, this study was to investigated the immune-enhancing effects of LNT on SPF chicks. A study on the protective effect of LNT against MDV infection was carried out based on this, therapeutic effect of LNT on MDV infection, and the combined use of LNT with vaccine against vMDV and vvMDV infections.

In study of the immune-enhancing effect of LNT on SPF chicks, the results showed that the body weight of the LNT group, which had been continuously using LNT for 6 days was significantly higher than that of the Control group at 7 days of age ($P < 0.01$), interferon-gamma (IFN-gamma), interleukin-2 (IL-2), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and Mx antiviral protein (Mx protein) and many other cytokines in the LNT group were up-regulated compared with the Control group, and the proportion of CD4⁺ T lymphocytes and its ratio to CD8⁺T lymphocytes were also significantly up-regulated in the LNT group ($P < 0.01$). In the study of the prophylactic use of LNT on MDV infection, the results showed that the body weight of the MDV group without LNT treatment group, was extremely

significantly lower than that of the LNT+MDV group and the Negative control group, which were prophylactic use of LNT ($P < 0.0001$) after 35 days post infection (dpi), the samples of liver and spleen development index in the MDV group were significantly higher than those of the LNT+MDV group and Negative control group, whereas there was no significant difference in the above indicators between the LNT+MDV group and the Negative control group ($P > 0.05$), the MDV viral loads in peripheral lymphocytes, liver and spleen of the LNT+MDV group were all extremely significantly lower than those of the MDV group after 21 and 35 dpi ($P > 0.05$).

In the study of the therapeutic effect of LNT on MDV infection, the results showed that after 42 dpi the body weight of the MDV group without LNT treatment group, was significantly lower than that of the Low-dose LNT treatment group, and that of the High-dose LNT treatment group with therapeutic use of high doses and the Negative control group ($P < 0.01$), the liver development index of the MDV group was significantly higher than that of the Low-dose LNT group ($P < 0.05$), and extremely significantly higher than that of the High-dose LNT group and Negative control group ($P < 0.01$), however, there was no statistically significant different in the above indicators between the Low-dose LNT group High-dose LNT group and Negative control group ($P > 0.05$). After 14 and 28 dpi, the MDV viral load in peripheral lymphocytes of the Low-dose LNT group and High-dose LNT group was extremely significantly lower than that of the MDV group ($P < 0.0001$), and the MDV viral load in peripheral lymphocytes of the High-dose LNT group was extremely significantly lower than that of the Low-dose LNT group ($P < 0.01$).

In the study of the effect of LNT combined with vaccine on vMDV and vvMDV infections, the results showed that when infected with vMDV infections, the MDV viral loads in peripheral lymphocytes, liver, spleen, and feather sacs, vaccine only treatment group with SC9-1 were lower than those of the SDAU1501 group, which did not use both LNT and vaccine, and the MDV viral load of the LNT+SC9-1 group, which were treatment group with LNT and vaccine further lower than those of the SC9-1 group. After 21 dpi, MDV viral loads in peripheral lymphocytes of the LNT+SC9-1 group was significantly lower than those of the SC9-1 group ($P < 0.0001$). When infected with vvMDV infection, the body weight of the SC9-1 group was higher than that of the Md5 group, however, the body weight of the LNT+SC9-1 group was higher than that of the SC9-1 group, and was significantly higher than that of the SC9-1 group after 3 and 21 dpi ($P < 0.05$). The MDV viral loads in peripheral lymphocytes, the samples of liver, spleen, and the feathered sacs of the SC9-1 group were

lower than those of the Md5 group, and the MDV viral loads in the LNT+SC9-1 group were further lower than those in the SC9-1 group, the MDV viral loads in peripheral lymphocytes and spleen of the LNT+SC9-1 group was highly significantly lower than those of the SC9-1 group after 14 dpi ($P < 0.001$), the MDV viral loads in the liver of the LNT+SC9-1 group after 21 dpi was significantly lower than that of the SC9-1 group ($P < 0.0001$).

Based on the above results, the present study confirmed that LNT could promote the growth and development of SPF chicks during the brooding period and improve the innate immunity level and cellular immunity levels of SPF chicks. The preventive and therapeutic use of LNT can inhibit the replication of MDV in chicks and alleviate MDV infection and its immunosuppression, and LNT can enhance the immunization effect of the meq-deleted Marek's disease virus vaccine strain SC9-1, better inhibit the replication of MDV in chicks, and prevent or alleviate vMDV or vvMDV infection and its immunosuppression. It provides an adjunctive measure for better control of MDV infection.

Keyword: Marek's disease virus, immunosuppression, lentinan, immunomodulation, vaccine immunization

1 前言

1.1 鸡马立克氏病

马立克氏病 (Marek's disease, MD) 是由马立克氏病病毒 (Marek's disease virus, MDV) 引起的鸡的一种淋巴组织增生性免疫抑制性传染病。MDV 是鸡群中广泛流行的一种免疫抑制病毒, 可引起鸡只的淋巴组织增生、淋巴肿瘤和免疫器官损伤 (Witter 1997; Witter *et al.*, 2003)。近年来的流行病学调查结果显示, MDV 在中国的流行有增强的趋势 (Yu *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2022)。疫苗免疫是控制 MDV 感染最有效的手段 (Nair, V, 2022), 但鸡传染性贫血病毒 (CIAV)、禽网状内皮组织增殖病病毒 (REV) 等免疫抑制病毒的混合感染经常导致疫苗免疫失败 (Li *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2022)。此外, 有些毒株突破现有疫苗保护的报道也在逐渐增多 (Li *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023)。

1.1.1 病原学

MDV 属于疱疹病毒科, α -疱疹病毒亚科的马立克氏病毒属, 病毒形态呈球形、有囊膜。有囊膜的病毒粒子直径为 130~170 毫微米, 通常存在于羽毛囊上皮细胞中, 呈非细胞结合性, 可脱离细胞存活, 对外界环境抵抗力强, 是实际生产中造成 MDV 大规模传播的主要原因。无囊膜的裸体粒子直径为 85~100 毫微米, 存在于肿瘤组织中, 呈严格的细胞结合性, 细胞破裂时病毒亦死亡。MDV 可通过鸡胚培养或细胞培养分离病毒 (孙百明, 2011; Osterrieder *et al.*, 2004)。MDV 基因组为具有 E 类结构的线性双链 DNA 分子, 分为 6 个区域, 包括末端重复长区域 (TRL)、独特长区域 (UL)、内部重复长区域 (IRL)、内部重复短区域 (IRS)、独特短区域 (US) 和末端重复短 (TRS) 区域 (Davison *et al.*, 2010; Lole *et al.*, 1999; McGeoch *et al.*, 2006)。根据病毒的血清学反应, 将 MDV 分为 MDV1、MDV2 和 MDV3 三个血清型, 其中 MDV 血清 1 型包括不同致病性 (如导致肿瘤、免疫抑制、神经损伤以及死亡等) 的野毒株, 按照致病性从弱到强分为弱毒 (mMDV)、强毒 (vMDV)、超强毒 (vvMDV) 和特超强毒 (vv+MDV) (Lee *et al.*, 1983; Schat *et al.*, 2013; Witter *et al.*, 2005)。MDV 血清 2 型是从临床健康鸡中分离出来的非致病性毒株, 该毒株类型不致癌, 属于天然的无毒毒株。MDV 血清 3 型是从火鸡体内分离到的非致病性毒株, 称为火鸡疱疹病毒 (Herpesvirus of

tuvkeys, HVT) (崔治中等, 2019; Biggs *et al.*, 2001)。

1.1.2 流行病学

鸡是最 MDV 重要的自然宿主, 所有品种或品系的鸡均能感染 MDV, 但不同品种或品系的鸡具有多样化的遗传结构, 因此对 MDV 感染的抵抗力有所差异 (Barrow *et al.*, 2003a)。病鸡和带毒鸡是主要的传染源, 传播途径主要为病毒在羽囊上皮细胞中复制后通过羽毛和皮屑经呼吸道传播, 雏鸡和雌性鸡易感, 日龄越小的雏鸡越易感 (Barrow *et al.*, 2003b; Calnek *et al.*, 2003)。

1.1.3 临床症状及病理变化

MDV 主要以造成鸡的神经损伤和淋巴肿瘤为主, 因感染野毒株不同, 主要症状也不同, 根据临床症状和病变部位分为神经型、内脏型、皮肤型和眼型 (Schat *et al.*, 2008)。

1.1.3.1 神经型

常见单侧或双侧坐骨神经或臂神经损伤, 病鸡表现为翅膀下垂, 头颈歪斜, 单侧或双侧腿部站立不稳, 运动障碍, 腿部呈“劈叉状”。神经病变部位出现外周神经变粗, 比正常时粗 2-3 倍, 颜色变淡变暗呈灰白色或灰黄色, 横纹消失 (周林宜等, 2019; Gimeno *et al.*, 1999)。

1.1.3.2 内脏型

病鸡体形消瘦, 精神不振, 食欲下降, 被毛蓬乱, 冠髯苍白, 少部分病鸡冠髯发黑; 腹泻下痢, 排白色或黄绿色稀便, 发病快, 死亡率高。卵巢、心脏、肝脏、肾脏等多个器官出现弥漫性肿大并出现灰白色淋巴性肿瘤, 以肝脏和脾脏最为明显。法氏囊和胸腺萎缩或正常, 但可能出现滤泡间淋巴样细胞浸润 (杨德康等, 2009; Calnek *et al.*, 1998)。

1.1.3.3 皮肤型

病鸡表现为颈部、背部、大腿部毛囊肿胀并且出现白色小结节, 病变部位出现羽毛囊上皮增生, 炎性细胞和淋巴样细胞浸润 (褚秀玲等, 2009)。

1.1.3.4 眼型

病鸡表现为瞳孔缩小, 严重者缩小至针尖大小, 虹膜边缘不整齐, 颜色变为弥漫性灰白色, 眼神经和眼部病变部位出现炎性细胞浸润 (冯元璋等, 2006)。

1.1.4 诊断方法

1.1.4.1 病毒分离鉴定

鸡胚和雏鸡肾细胞 (Chicken Kidney Cell, CKC), 鸡胚成纤维细胞 (Chicken Embryo Fibroblast, CEF) 和鸭胚成纤维细胞 (Duck Embryo Fibroblast, DEF) 等禽源细胞是 MDV 分离株的良好培养细胞。其中 CEF 是 MDV 分离株常用的培养细胞, CKC 制备比较困难, 不易大量制备, 但 CKC 和 DEF 更有利于 MDV 分离株的体外繁殖 (Churchill *et al.*, 1967; Schat *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2008)。一般向细胞中接种 MDV 分离株 2-8 d 后便能产生噬斑, 其特征是圆形屈光细胞或合胞体的小到中等斑块。

1.1.4.2 病毒抗原的检测

自二十世纪 60 年代 MD 病原体分离和鉴定成功后, MDV 抗原的免疫学鉴定和 MDV 特异性抗体的检测得到了广泛应用 (Churchill *et al.*, 1969)。琼脂凝胶沉淀素 (AGP) 试验, 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 以及直接或间接免疫荧光法等陆续应用在 MDV 的检测中。

1.1.4.3 聚合酶链反应 (PCR) 技术

上世纪 80 年代, 聚合酶链式反应 (PCR) 的发明改变了包括 MDV 在内的许多传染病病原的检测。三种血清型的 MDV 的基因组 DNA 序列已进行完整的测序分析 (Afonso *et al.*, 2001; Izumiya *et al.*, 2001; Tulman *et al.*, 2000)。可以设计特定的 PCR 引物, 并结合核酸电泳对 MDV 进行诊断。

1.1.4.4 实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术

随着 MD 冷冻活疫苗的使用, 区分野毒和疫苗株对检测方式的灵敏性提出了更高的要求。实时荧光定量 PCR 技术可以在高灵敏性的基础上对 MDV 进行绝对定量及相对定量检测, 并解释 MDV 感染的相关过程 (刘蔓蔓等, 2023; Baigent, 2005; Walkden-Brown *et al.*, 2013)。

1.1.5 防控措施

1.1.5.1 疫苗免疫防控

疫苗接种是防控本病的关键, 通过大规模的疫苗接种计划, MD 的爆发在世界范围内得到了控制, 对防止出雏和育雏早期感染和减少损失起到了重要作用, 使 MD 成为第

一种可以通过有效疫苗预防的鸡肿瘤性疾病 (Boodhoo *et al.*, 2016; Haq *et al.*, 2013)。用于制造疫苗的 MDV 毒株有 3 种, 即人工致弱的 MDV 血清 1 型 (如 CVI988)、自然不致瘤的 MDV 血清 2 型 (如 SB1Z4) 和 MDV 血清 3 型 (HVT) (如 FC126) (Okazaki *et al.*, 1970; Rispens *et al.*, 1972; Schat *et al.*, 1978; Witter *et al.*, 1970)。人工致弱的 MDV 血清 1 型和自然不致瘤的 MDV 血清 2 型毒株在制备 MDV 疫苗时, 为了保持 MDV 疫苗的效力, 疫苗病毒必须寄生在活细胞内, 所以需制成细胞结合疫苗, 需要特殊的处理并在液氮条件下保存, 因此保持适当的冷链和快速精确的疫苗稀释对于疫苗的保护效力较为关键。MDV 血清 3 型 (HVT) 疫苗制苗成本经济而且可制成冻干制剂, 保存和使用较方便 (葛成菲等, 2023; Witter *et al.*, 1992)。由于自然不致瘤的 MDV 血清 2 型疫苗和 MDV 血清 3 型 (HVT) 疫苗对新的毒性更强的 MDV 毒株的保护能力有限, 因此两者联合使用可显著提高对 vvMDV 毒株的协同保护 (Witter *et al.*, 1982; Witter *et al.*, 1984)。鸡马立克氏病 CVI988 冷冻活疫苗 (也称为 Rispens CVI988 毒株, 以其开发者的名称命名) 是迄今为止最有效的疫苗, 能够保护鸡只免受不同毒力 MDV 毒株的攻击, 被认为是 MDV 疫苗的“金标准” (Bullock, 1977; Witter *et al.*, 2004)。另外我国自主研发的鸡马立克氏病基因缺失活疫苗 (SC9-1 株) 也表现出不亚于其他 MD 商业疫苗的保护效力, 并已进行商业化生产, 获得行业认可 (段伦涛等, 2014; 颜文光等, 2018; Su *et al.*, 2015)。

1.1.5.2 免疫调节剂的应用

在我国畜禽养殖业逐步向规模化、集约化发展, 养殖密度逐渐增加, 畜禽感染病原的机会多和种类多的情况下, 以及我国为应对日益严峻的乱用、滥用抗菌药所导致的耐药性问题提出减抗、禁抗的正确决策下, 免疫调节剂无疑成为防控或辅助防控畜禽疾病, 尤其是免疫抑制病的突破口。免疫调节剂单独或与 MD 疫苗联合使用, 可以增强机体的先天免疫反应, 提高鸡的免疫系统作用。中医与中药起源于我国, 并有悠久的历史传承, 是我国重要的文化瑰宝。我国作为一个中药大国, 在兽用中药及其制剂方面的研究也一直走在世界前列。植物中的多糖成分目前在防控畜禽传染病方面已被广泛研究 (农可懿等, 2021)。其中黄芪多糖、白术多糖、香菇多糖、板蓝根多糖在针对防控 MDV 并减轻其所造成的损伤方面表现出重要作用 (郝艳红等, 1999; 师调调等, 2022; 龚乐乐等, 2023)。

1.1.5.3 遗传抗性

不同品种或品系的鸡对 MDV 的易感性和抗病能力不同，对 MDV 疫苗免疫后所产生的免疫力也有所差异。因此 选育生产性能好的抗病品系商品鸡是未来防控 MD 的一个重要方面（Lee *et al.*, 2008; Venugopal *et al.*, 2000）。

1.1.5.4 生物安全措施

疫苗免疫之外，育雏期严格的生物安全措施也是防控 MDV 的重中之重。做好卫生消毒和饲养隔离是重要前提。另外，在卫生环境中孵化、运输和饲喂雏鸡。制定鸡舍、饮水、饲料和饲喂工具消毒方案，注意防虫防鼠，以及防止野鸟等可疑传染源进入鸡舍。加强饲养管理，避免应激，保持鸡只良好的健康状态。提高工作人员的生物安全意识和专业素养，做好自身消毒，防止交叉感染。定期对动物进行健康监测，及时发现潜在的疫情，做到早发现，早隔离，早处理等。

1.1.6 MDV 感染模型

MDV 生命周期也被称为“Cornell 模型”。该模型描述了从 MDV 初始感染到羽毛囊上皮细胞中 MDV 感染并排毒的顺序（Calnek *et al.*, 1986）。MDV 的生命周期可以分为进入、复制、潜伏和传播这四个交错的主要阶段。MDV 感染始于鸡只吸入含有传染性病毒的灰尘，所以在病鸡肺脏中的巨噬细胞和 B 细胞中首先检测到初始病毒复制，巨噬细胞可将病毒转运至淋巴组织和免疫器官，其他免疫细胞在这些部位受到感染（Baaten *et al.*, 2009; Davison *et al.*, 2005）。细胞中的 MDV 感染分为早期溶细胞、潜伏、晚期溶细胞和转化这四个重复的阶段。在细胞溶解阶段，病毒在巨噬细胞以及 B 和 T 淋巴细胞中复制。早期溶细胞感染之后，在感染后 7 天建立潜伏感染，潜伏感染的淋巴细胞能够被转化，在感染后 14 和 21 天之间，可引起内脏器官中的淋巴瘤（McPherson *et al.*, 2016）。

1.1.7 MDV 感染所引起机体免疫应答

1.1.7.1 先天性免疫

在 MDV 感染鸡只后，引发先天性免疫应答，包括巨噬细胞（macrophage, Mφ）和自然杀伤细胞（natural killer cell, NK）的活化、I 型干扰素（IFN）和促炎细胞因子的分泌等。此外，Toll 样受体（TLR）和抗菌肽（AMP）先天免疫系统的其他组分也可能

被触发,但其在诱导对 MDV 的免疫应答中的作用需要进一步研究 (Akbari *et al.*, 2008; Abdul-Careem *et al.*, 2009)。M ϕ 具有吞噬、杀灭病原和肿瘤细胞的功能,并且还可以通过充当抗原呈递细胞 (APC) 来调控适应性免疫应答 (Qureshi *et al.*, 2000)。M ϕ 被激活后,通过吞噬作用以及释放一氧化氮 (NO) 和细胞因子等介质内化病原以及抑制病原的活力,从而发挥其在防御机制中的作用。活化的 M ϕ 产生 NO 是一种重要的先天反应,对于 M ϕ 的杀菌活性和抑制病毒复制至关重要 (Bogdan *et al.*, 2001)。而且,MDV 感染诱导型 NO 合酶 (iNOS) 的表达,导致 NO 的产生增加,这可抑制 MDV 复制 (Jarosinski *et al.*, 2002)。MDV 感染对 iNOS 的上调与 IFN- γ 等细胞因子的产生有关。在 MDV 感染后,各种组织中 NO 和 IFN- γ 表达之间的关联已被充分证实 (Abdul-Careem *et al.*, 2007; Abdul-Careem *et al.*, 2008)。另外,M ϕ 可以将 MDV 从初步感染的呼吸器官转运到法氏囊等淋巴器官,表明 M ϕ 在 MDV 感染后的病毒转运、分布和控制中起到重要作用 (Barrow *et al.*, 2003a)。

1.1.7.2 适应性免疫

适应性免疫应答本质上是抗原抗体的特异性反应。在 MDV 感染鸡只后,除了引发 CD 4 + 辅助性 T 淋巴细胞和 CD 8 + 细胞毒性 T 淋巴细胞针对病毒感染细胞和肿瘤细胞的应答外,还引发浆细胞分泌针对各种 MDV 蛋白的抗体 (Kindt *et al.*, 2007)。这些抗体具有通过阻断病毒进入宿主细胞的保护作用和诱导抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用,进一步帮助 MDV 感染细胞的裂解。另外抗体可在建立抗 MD 的免疫力中发挥作用,母体抗体的存在降低了 MD 的、发病率、死亡率、临床症状和肿瘤形成 (Calnek *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1992; Davison *et al.*, 2004)。但是,由于 MDV 是一种高度细胞相关的病毒,抗体介导的免疫应答被认为不如 T 细胞介导的应答重要。在先天性免疫反应与抗体介导的免疫应答之后,CD 4 + 辅助性 T 淋巴细胞和针对疱疹病毒的各种包膜糖蛋白的 CD 8 + 细胞毒性 T 淋巴细胞在控制疱疹病毒感染中起重要作用。并且 CD 8 + 细胞毒性 T 淋巴细胞与 MD 疫苗所赋予的免疫力有密切联系 (Morimura *et al.*, 1997; Parvizi *et al.*, 2010)。

1.2 与 MDV 感染相关的细胞因子

1.2.1 干扰素- γ

干扰素- γ (IFN- γ) 主要由活化的 CD4+Th1 细胞、CD8+T 细胞及 NK 细胞分泌。IFN- γ

具有抗病毒、抗肿瘤活性,能促进 Th0 细胞向 Th1 细胞分化从而抑制 Th2 型反应,是 Th1 型免疫反应的标志。IFN- γ 可以通过增强 NK 细胞杀伤功能和 M ϕ 的吞噬能力及炎症反应控制胞内病原感染(孙进华等, 2009)。IFN- γ 在 MDV 致病性及机体的免疫反应中具有重要作用,MDV 感染后鸡体内 IFN- γ 含量升高,升高程度取决于宿主的遗传背景及病毒毒力。病毒毒力越强,诱导产生的 IFN- γ 越多,越能突显不同 MD 抗性鸡感染后产生 IFN- γ 量的差异。而低毒力毒株不足以诱导产生显著的差异(Jarosinski *et al.*, 2005)。IFN- γ 可激活 iNOS 的转录,增加 M ϕ 中 iNOS 的含量催化 NO 的产生,而 NO 可抑制 MDV 的复制(Xing *et al.*, 2000a)。抗性鸡脾细胞中 IFN- γ 先于易感鸡脾细胞中 IFN- γ 达到高峰可能是因为抗性鸡中 IFN- γ 的快速高表达加速了其体内 MDV 进入潜伏感染阶段抑制了疾病的发展。MDV 溶细胞感染期,鸡脾脏中 CD4+T 细胞和 CD8+T 细胞中 IFN- γ 转录水平不同程度上调,CD4+T 细胞分泌的 IFN- γ 可促进免疫反应向 Th1 方向发展辅助病毒特异性的 CD8+T 细胞分化、增殖,促使 CD8+T 细胞发挥抗病毒功能。在 MDV 感染早期,抗性鸡外周血单核细胞中 IFN- γ 含量高于易感鸡(Parvizi *et al.*, 2009)。

1.2.2 白细胞介素-2

白细胞介素-2 (IL-2) 主要由 CD4+T 细胞产生,CD8+T 细胞也可少量分泌。不同品系鸡 IL-2 序列存在差异。IL-2 能增强 T 细胞依赖性免疫应答,诱导杀伤性细胞产生 IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子从而介导抗病毒作用。IL-2 可以促进 B 细胞的增殖、分化和抗体产生具有重要的免疫调节功能(Schmandt *et al.*, 1992)。IL-2 可能与 MDV 的长程感染有关,有研究表明在 21dpi 时鸡体内 IL-2 转录活性增高(Kaiser *et al.*, 2003)。

1.2.3 白细胞介素-6

白细胞介素-6 (IL-6) 是一种多功能细胞因子,几乎能影响免疫系统的所有细胞。IL-6 于感染早期产生,诱导先天性免疫应答。MDV 感染后 IL-6 的表达情况与 IL-18 相似,IL-18 可诱导 IL-6 的表达 IL-6 随着 IL-18 含量的增多而增多,病变越严重的组织 IL-6 含量越高,且与宿主的遗传背景有关。MDV 溶细胞感染期,易感鸡脾细胞中 IL-6 水平显著升高而 IL-6 的高水平转录又指示了病变的加剧促进了淋巴瘤的发生而抗性鸡中 IL-6 含量无变化利于疾病的转归(蔡文博等, 2011)。

1.2.4 白细胞介素-18

白细胞介素-18 (IL-18) 为促炎细胞因子,由巨噬细胞、小胶质细胞、血管内皮细

胞等多种细胞产生 可促进 Th1 细胞的分化和成熟 除了通过诱导 Th1、NK 细胞产生 IFN- γ 发挥抗感染、促生长的作用。除此之外, 还可以 IL-18 诱导 IL-2、TNF- α 等多种细胞因子的产生。IL-18 和凋亡素共同作用可诱导有效的抗肿瘤免疫反应(Song *et al.*, 2017)。IL-18 在 MDV 感染中具有重要的免疫调节作用 其转录水平与鸡的品系及病毒毒株有关。感染组织中 IL-18 含量随疾病发展而增多 (Abdul-Careem *et al.*, 2006)。

1.2.5 肿瘤坏死因子- α

肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 可由 NK 细胞和巨噬细胞等分泌, 传染性或炎性刺激物能促进 TNF- α 的生成。TNF- α 参与先天性免疫反应, 促进 T 细胞和 B 细胞的增殖, 提高 NK 细胞活性, 促进吞噬细胞的功能, 作为炎症介质参与炎症反应, 介导细胞凋亡, 调节抗原递呈细胞的表达, 是多种细胞介导免疫的最初调节因子。具有杀伤或抑制肿瘤细胞; 杀伤或抑制靶细胞; 提高嗜中性粒细胞的吞噬能力, 增强 ADCC 功能, 刺激细胞分泌过氧化物酶等免疫作用(王黎霞等, 2011; Havell *et al.*, 1988; Rudle *et al.*, 1987)。

1.2.6 Mx 抗病毒蛋白

干扰素并不直接杀伤或抑制病毒, 而主要是通过自分泌或旁分泌途径与细胞膜上的特异性受体结合后使细胞产生抗病毒蛋白(冀君等, 2014)。其中 Mx 蛋白是 I 型和 III 型干扰素 (IFN) 诱导的细胞自身天然抗病毒效应蛋白。在多个物种上都被证实具有广泛的抗病毒作用和 GTP 酶活性, 对多种病毒都有广谱性的作用, 并且在抗病毒与品种鸡抗病育种筛选等方面有广泛应用前景(闫若潜等, 2004; 孙业平等, 2010; Charleston *et al.*, 1993)。

1.3 香菇多糖

香菇多糖 (Lentinan, LNT) 是从香菇子实体中分离提取的棕黄色或灰白色粉末状物质, 具有吸湿性, 能溶于水和稀碱溶液, 且在热水中溶解度增加, 不溶于丙酮、乙醚、乙醇等有机溶剂 (Ramberg *et al.*, 2010)。近年来 LNT 作为一种免疫增强剂备受关注, 并在鸡群中广泛使用, LNT 主要通过它含有的 β -葡聚糖刺激免疫细胞成熟、分化、增殖和产生细胞因子等方式发挥免疫作用, 从而改善或恢复宿主的机体平衡, 提高宿主细胞对淋巴因子、激素等生物活性因子的反应性, 产生有效的抗病毒、抗肿瘤和免疫增强活性 (Chen *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2002; Pandya *et al.*, 2019)。

1.3.1 结构与构效关系

1.3.1.1 结构

LNT 的活性与其化学结构密切相关, 具有 β -糖苷键的葡聚糖是香菇多糖发挥作用的主要形式。LNT 是以 $(1\rightarrow3)$ - β -D-葡聚糖为主链, $(1\rightarrow6)$ - β -D-葡萄糖残基为侧链的大分子, 其化学结构为 1 条 $(1\rightarrow3)$ - β -D-葡聚糖主链和 2 条 $(1\rightarrow6)$ - β -D-葡萄糖残基侧链, 每 5 个葡萄糖单元连接 2 个葡萄糖残基 (Chihara *et al.*, 1969; Hazime *et al.*, 1979; Sasaki, 1976)。多数关于 LNT 相对分子质量的研究经凝胶渗透色谱法(GPC)和准弹性光散射法测得其相对分子质量为 $3 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ (Wang *et al.*, 2021)。刚果红实验初步证实香菇多糖具有螺旋空间构象, 采用现代仪器分析技术, 通过原子力显微镜 (AFM) 观察进一步证实 LNT 具有三螺旋空间构象 (Wang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014)。

1.3.1.2 构效关系

LNT 的抗肿瘤作用与主链结构有着紧密联系, 其中抗肿瘤活性最强的是以 β -(1-3)-D-葡聚糖 为主链、并有 β -(1-6)分支结构的多糖, 而以 β -(1-6)连接为主链的香菇多糖活性较低 (Zhang *et al.*, 2011)。多糖主链的分支度也是影响其活性的重要因素。活性最强的多糖分支度一般在 20%~33% (Meng *et al.*, 2016)。高相对分子质量多糖形成三螺旋结构是需要 β -D-吡喃葡萄糖基分支侧链来 提高稳定性的。高相对分子质量的 LNT 的分支度较小, 更利于形成三螺旋结构, 从而发挥更强的抗肿瘤作用 (Sheng *et al.*, 2021)。LNT 的三螺旋结构对抗肿瘤作用影响较大。研究发现, 当 LNT 的空间结构发生改变后, 其抗肿瘤活性会降低 (Zhang *et al.*, 2005)。多糖的相对分子质量是影响其生物学活性的关键因素。多糖相对分子质量小, 无法形成有活性的聚合结构而发挥作用, 而高相对分子质量多糖分子体积较大, 不利于多糖跨越多重细胞膜屏障进入生物体内发挥生物学效应 (Soltanian S *et al.*, 2009; Wasser *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2018)。目前认为香菇多糖相对分子质量范围在 $5 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ 之间活性最强。总体而言, LNT 的结构与其生物学活性密切相关。具有 $(1\rightarrow3)$ - β -D-葡聚糖主链结构、相对分子质量相对较高、具有三螺旋结构、分支度较小的 LNT 生物学活性较好。

1.3.2 提取

LNT 的常规溶剂提取方式有以下两种:

(1) 热水浸提法: 热水浸提法是一种广泛使用的提取方法, 其优点是操作简单方

便，提取成本低，提取率较高，其缺点是提取时间较长，能耗较大（Ya *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2011）。

（2）酸碱提取法：酸碱提取法是一种较为常见的提取方法，其优点是操作简单方便、提取时间短、提取成本低，其缺点是酸性溶液易破坏多糖的糖苷键，碱性溶液会使提取物中色素分子沉淀，酸碱浓度过高导致多糖的生物活性降低（连希希等，2022）。

另外在热水浸提法的基础上还有以下几种辅助提取方法，以提高 LNT 的提取效率：

（1）酶辅助提取法：酶辅助提取法酶解辅助提取法是一种非常规提取方法，是通过酶水解蛋白质以破碎细胞壁，促进多糖的释放，其优点是提取率高，提取温度低、提取时间短，其缺点是操作复杂，提取成本高，需灭酶并脱酶（Lyu *et al.*, 2020）。

（2）超声辅助提取法：超声辅助提取法是在热水提取过程中应用超声设备进行超声处理，通过超声波的热效应、机械效应和空穴效应破坏细胞壁，促进多糖的释放，其优点是提取率高，提取温度低、提取时间短，提取成本低，其缺点是会降解多糖分子，导致多糖的生物活性降低（李红卫等，2008; Roselló-Soto *et al.*, 2015）。

（3）微波辅助提取法：微波辅助提取法使利用微波的加热效应和生物破壁效应，使细胞膜和细胞壁破裂，胞外溶液易进入细胞内，溶解多糖并促进溶剂向胞内扩散及多糖向胞外扩散，其优点是提取率高，提取时间短，其缺点是容易使多糖结构破坏，使多糖分子变性失活（Lin *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2014）。

（4）高压和高压微射流辅助提取法：高压和高压微射流辅助提取法利用高温热水使组织膨胀破裂，细胞壁软化，通过高压微射流处理带来的剪切力、冲击力和高频振动使多糖更易释放，其优点是提取率高，其缺点是微射流的机械力和空穴效应容易降解多糖分子（Huang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018）。

（5）复合辅助提取法：复合辅助提取法是将以上两种及两种以上提取方法结合起来使用，其优点是，相较于单一的提取方法提取率更高，提取时间进一步缩短，其缺点是操作复杂并兼具各辅助提取法的缺点。

1.3.3 纯化

提取方法的不同，对多糖的复杂的理化性质和结构性质产生重要影响。提取得到的粗多糖往往含有色素、蛋白质、脂质、维生素、多酚等物质，所以经过脱色、脱蛋白、

多糖分级才能进行结构与生物活性的深入研究。

1.3.3.1 脱蛋白

蛋白质与多糖都是不溶于醇的大分子，醇沉后蛋白质会和多糖混合在一起，从而影响多糖的结构鉴定及活性研究。一般采用化学试剂使蛋白质变性沉淀，再经离心实现脱蛋白质。脱蛋白质方法主要有以下几种：蛋白酶-Sevag 法、碱法、酸法、醋酸铅法、三氯乙酸法、酶法和树脂吸附法等（Qian *et al.*, 2018）。

1.3.3.2 脱色

多糖常用的脱色方法有：活性炭吸附法、有机溶剂漂洗法、阴离子交换大孔树脂吸附法和过氧化氢氧化法等（Chen *et al.*, 2019）。

1.3.3.3 分级

多糖的分子量分布范围较宽，因为小分子化合物所规定的纯度标准不同，一般要去掉小分子化合物。多糖纯品一般是指在一定分子量范围内具有较强生物活性的多糖。没有分级的多糖分子量分布范围较宽，生物活性没有达到最佳，因此要对多糖进行分级，提高其生物活性。常见的分级方法有分级沉淀法、季铵盐沉淀法、凝胶柱层析法、超滤分离法等（Wang *et al.*, 2020）。

1.3.4 生物学活性

1.3.4.1 免疫调节

LNT 是一种免疫调节剂，对机体的非特异性免疫和特异性免疫均起到一定程度的免疫调节或免疫增强作用（Hamuro *et al.*, 1980; Péter *et al.*, 1988）。LNT 主要激活 Th1 型细胞介导的反应，其可以下调由 Th2 型细胞介导的反应，还能将 Th2 型反应转变为 Th1 介导的应答，即香菇多糖主要刺激细胞免疫激活（Yoshino *et al.*, 2000）。T 辅助细胞（Th）应答作为免疫反应的上游调控机制可分为 Th1 型和 Th2 型两类。Th1 型细胞主要分泌与炎症反应相关及能诱导细胞免疫抵抗癌细胞或细菌的细胞因子（如 IL-2、IFN- γ 等）。而 Th2 型细胞主要分泌有助于 B 淋巴细胞增殖、分化及与体液免疫相关的细胞因子（Murata *et al.*, 2002）。LNT 能激活抗原呈递细胞（APC）使其将组织相容性蛋白复合物 II（MHC II）暴露出来，促进 T 辅助细胞（Th）识别并连接 MHC II 而被激活，从而导致多种细胞因子的上调，提高体液免疫水平，并活化 B 淋巴细胞、T 淋

巴细胞、巨噬细胞等，激活细胞并加强 T 细胞应答能力、自然杀伤细胞活性和巨噬细胞吞噬作用效果，以达免疫调节的目的（Moradali *et al.*, 2007; Stephany *et al.*, 2016）。

1.3.4.2 抗氧化

LNT 氧化作用的机制主要体现在清除超氧化物自由基，阻断脂质过氧化反应以及增强机体多种抗氧化酶活性这两个方面（Tian *et al.*, 2012）。新陈代谢过程大量积累的活性氧（Reactive Oxygen Species, ROS）造成机体氧化损伤，自由基过量累积导致脂质过氧化反应形成丙二醛（Malondialdehyde, MDA）（Tiberi *et al.*, 2023）。LNT 可以螯合二价铁离子（Fe²⁺），抑制血液自由基和 ROS 合成，从而有效阻止机体过氧化反应，增强机体抗氧化性能（Ren *et al.*, 2018）。另外，LNT 可通过其自身结构含有酚类物质和黄酮类物质发挥抗氧化作用，抑制过氧化反应，增强抗氧化酶的活性，以及通过诱导激活 Nrf2-ARE 抗氧化信号通路，引起多种抗氧化酶的表达，起到抗氧化作用（Stastny *et al.*, 2022）。

1.3.4.3 抗病毒

LNT 对一些病毒呈现出抗病毒活性，其抗病毒机制主要包括直接使病毒失活和抑制病毒的复制，可刺激体内巨噬细胞的功能水平，增强其吞噬能力，从而达到抑制或杀灭病毒的目的。

1.3.4.4 抗肿瘤

LNT 的抗肿瘤作用有多个层面。LNT 可通过刺激抗原呈递细胞（APC）激活下游细胞及体液免疫（Bisen *et al.*, 2010; Hamano *et al.*, 1999）。LNT 可调节体内淋巴细胞亚群的变化，调节 Th1 和 Th2 的平衡以调节免疫反应。LNT 可活化激活巨噬细胞和自然杀伤性细胞并增加其数量，增强其杀伤肿瘤细胞活性，发挥抗肿瘤作用（Fukuchi *et al.*, 2014; Tani *et al.*, 1992）。LNT 通过 ROS 介导的内源途径和 TNF- α 介导的外源途径诱导肿瘤细胞凋亡，从而直接发挥抗肿瘤作用（Wang *et al.*, 2017）。LNT 可以增加血清中肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）、干扰素- γ （IFN- γ ）和白介素-2（IL-2）的浓度，且 IFN- γ 和 IL-2 能够抑制肿瘤细胞血管的生成从而抑制肿瘤生长（Arinaga *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2005）。所以，LNT 可通过调节先天免疫功能，调节体内淋巴细胞亚群及功能，调节单核-巨噬细胞的功能和抑制肿瘤细胞生长等发挥抗肿瘤作用。

1.4 本研究的目的是与意义

MD 作为一种免疫抑制病在全球流行广泛，并随着 MDV 毒力增强以及与其他免疫抑制病的共感染经常导致免疫失败，因此单纯靠现有疫苗防控 MDV 的效果可能并不理想。另外，MDV 导致的免疫抑制会增大其他传染性疾病继发感染的可能性。因此，除了聚焦发展新型 MDV 疫苗的同时，也要探究通过使用免疫调剂类药物对 MDV 进行防控。LNT 作为一种免疫调节剂，在发挥免疫增强作用，提高机体免疫力以及与疫苗免疫发挥协同作用，提高疫苗免疫效果方面具有重要意义。目前，对于 LNT 诱导鸡先天免疫、T 细胞免疫，抗 MDV 感染和对 MDV 疫苗的免疫效果等方面的能力还缺乏系统研究数据。因此本研究旨在通过从 LNT 对 SPF 雏鸡的免疫增强作用研究，预防性使用 LNT 对 MDV 感染的作用研究，治疗性使用 LNT 对 MDV 感染的作用研究以及 LNT 与疫苗联合使用对 vMDV 和 vvMDV 感染的作用研究这五个方面对 LNT 与抗 MDV 感染及其引起的免疫抑制的作用进行探究，为 LNT 与雏鸡先天免疫和细胞免疫的作用以及 LNT 抗 MDV 感染及其引起的免疫抑制的作用等方面的系统研究提供基础参考。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 实验动物

1 胚龄 SPF 鸡胚、1 日龄 SPF 雏鸡购自山东济南赛斯家禽科技有限公司，1 日龄海兰褐雏鸡购自山东泰安东岳种禽有限公司。

2.1.2 病毒

MDV 野毒 SDAU1501 株由本实验室刘英楠从已免疫 CVI988 疫苗的白羽肉鸡中分离得到，且鉴定为强毒株，并接种鸡胚成纤维细胞（CEF）进行扩增、定量和保存，病毒含量为 1.05×10^6 PFU/mL。MDV 感染性克隆化病毒 Md5 株为超强毒株，由本实验室接种鸡胚成纤维细胞进行扩增、定量和保存，病毒含量为 3.6×10^6 PFU/mL。

2.1.3 疫苗

鸡马立克氏病基因缺失活疫苗（SC9-1 株）由北京翎羽生物科技有限公司生产并提供；H9 亚型禽流感病毒（AIV-H9）灭活疫苗由山东信得科技股份有限公司生产并提供。

2.1.4 香菇多糖

商品化香菇多糖粉（Lentinan Powder）由山东信得科技股份有限公司生产并提供。

2.1.5 主要试剂

AIV-H9 血凝抑制试验抗原，购自北京中海生物科技有限公司。1×PBS、DMSO、肝素钠、两性霉素、氨苄青霉素和鸡外周血淋巴细胞分离液购自北京索莱宝科技有限公司；血液/组织/细胞 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司；血液/组织/细胞 RNA 提取试剂盒和质粒提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司；Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒（含去除 gDNA 试剂，用于 qPCR）和 SYBR Green Premix Pro taq HS 预混型 qPCR 试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司；DMEM 培养基和胎牛血清购自赛默飞世尔科技有限公司；APC 标记鼠抗鸡 CD3 抗体、PE 标记鼠抗鸡 CD4 抗体和 FITC 标记鼠抗鸡 CD8 抗体购自美国 SouthernBiotech 公司。

2.1.6 主要仪器

生物安全柜（Heal Force，香港）；PCR 仪（ABI，美国）；实时荧光定量 PCR 仪（LightCycler 96，美国）；高端分析型流式细胞仪（BD LSRFortessa，美国）；台式高速冷冻离心机和微型离心机（Eppendorf，德国）；超净工作台（Cabinets，加拿大）；生化培养箱和 CO₂ 培养箱（SANYO，日本）超低温冰箱（海尔，青岛）；电子天平和 WD-9405B 型水平摇床（六一，北京）；电动搅拌器（博奥龙，苏州）；恒温水浴锅（Grant，英国）。

2.2 实时荧光定量 PCR 检测方法

2.2.1 基于细胞因子基因与内参基因的实时荧光定量 PCR 检测方法

使用β-actin 作为内参基因，通过相对定量的方式对细胞因子基因进行检测。基于细胞因子基因与内参基因的实时荧光定量 PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司设计、验证并合成。引物序列见表 1。

表 1 检测细胞因子的实时荧光定量 PCR 引物信息

Table 1 Information on quantitative real-time PCR primers for detection of cytokines

引物名称	序列（5'-3'）	产物长度（bp）
IFN-γ-F	TGAGCCAGATTGTTTCGATG	153
IFN-γ-R	CTTGGCCAGGTCCATGATA	
TNF-α-F	GTCGTGGCATCGTCCTCTCAG	102
TNF-α-R	CACCAAGTTTGTTCCTTCTCAGCAC	
Mx-F	CAGCTCCAGAATGCATCAGA	156
Mx-R	GGCAATTCCAGGAAGATCAA	
IL-2-F	TTCATCTCGAGCTCTACACACCAA	200
IL-2-R	GCATTCACCTCCGGTGTGATTTA	
IL-6-F	TCTGTTTCGCCTTTCAGACCTA	142
IL-6-R	GACCACCTCATCGGGATTAT	
IL-18-F	ACAGAGAGGTTGGAGATGGGGAAG	71
IL-18-R	TGGGTAGGTGAAGCAGCATAATGTG	
β-actin-F	GAGAAATTGTGCGTGACATCA	190
β-actin-R	CCTGAACCTCTCATTGCCA	

2.2.2 基于 Meq 基因的实时荧光定量 PCR 检测方法

通过绝对定量的方式对 Meq 基因进行检测，基于 Meq 基因的实时荧光定量 PCR 引物由本实验室薛如玉设计并验证，由上海生工生物工程技术有限公司合成。基于 Meq 基因的实时荧光定量 PCR 标准曲线由本实验室薛如玉构建，MDV 拷贝数（x）与 C_q 值（y）的方程为 $y = -3.3271x + 37.94$ ， $R^2 > 0.98$ （薛如玉，2023）。引物序列见表 2。

表 2 检测 MDV 的实时荧光定量 PCR 引物信息

Table 2 Information on Quantitative Real-time PCR primers for detection of SDAU1501 strain

引物名称	序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
Meq-F	GACGCCGCTCGGAGAAGAC	126
Meq-R	CCATAGGGCAAACCTGGCTCAT	

2.2.3 实时荧光定量 PCR 反应体系

荧光定量 PCR 反应体系为 20 μ L。反应体系见表 3。反应采用两步法, 反应条件为:

- (1) 95°C 预变性 30 s, 1 个循环;
- (2) 95°C 变性 5 s $\rightarrow$ 60°C 退火和延伸 34 s, 40 个循环;
- (3) 反应结束后添加溶解曲线程序: 95°C, 10 s; 65°C, 1 min; 97°C, 1 s, 根据溶解曲线判断反应的特异性。

表 3 荧光定量 PCR 体系

Table 3 Real-time PCR system

试剂	体积 (μ L)
SYBR Premix Ex Taq TM (2 $\times$)	10
ddH ₂ O	7.2
Forward Primer (10 μ M)	0.4
Reverse Primer (10 μ M)	0.4
Template DNA	2
Total	20

2.3 香菇多糖对 SPF 雏鸡的免疫增强作用研究

2.3.1 动物实验设计

将 30 只 1 日龄 SPF 雏鸡平均分为 2 组, 第一组在 1-6 日龄每天通过饮水饲喂 LNT 溶液 (0.5 g LNT 粉末+1 L 水), 标记为 LNT 组; 第二组不使用 LNT, 标记为 Control 组。处理方式见表 4。

表 4 香菇多糖对 SPF 雏鸡的免疫增强作用动物实验设计

Table 4 Animal experimental design for the immune-enhancing effect of Lentinan on SPF chicks

分组	SPF 雏鸡数量 (只)	处理方式
LNT 组	15	1-6 日龄使用 LNT (0.5 g LNT 粉末+1 L 水)
Control 组	15	无操作

2.3.2 体重

在 7 日龄分别对两组 SPF 雏鸡进行称重，比较体重差异。

2.3.3 细胞因子表达情况

在 7 日龄分别从 LNT 组和 Control 组中随机采集 6 只 SPF 雏鸡的颈静脉血液，分离淋巴细胞后提取淋巴细胞中的总 RNA，通过 RT-qPCR，使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法 ($\Delta C_t = C_t$ (目标基因) - C_t (内参基因)； $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (试验组) - ΔC_t (对照组))，以 β -actin 作为内参基因进行相对定量检测 LNT 组的 IFN- γ 、TNF- α 、Mx 蛋白、IL-2、IL-6、IL-18 这 6 种细胞因子相比于 Control 组的表达情况。

2.3.4 细胞免疫水平

在 7 日龄分别从 LNT 组和 Control 组中随机采集 6 只 SPF 雏鸡的颈静脉血液，分离淋巴细胞后通过流式细胞术检测 CD4+T 淋巴细胞比重、CD8+T 淋巴细胞比重，并计算 CD4+T 淋巴细胞比重与 CD8+T 淋巴细胞比重的比值。

2.4 香菇多糖预防性使用对 MDV 感染的抑制作用研究

2.4.1 动物实验设计

将 60 只 1 日龄 SPF 雏鸡平均分为 3 组，将 MDV 强毒株 SDAU1501 株病毒原液使用 DMEM 稀释为 1000 PFU/100 μ L，其中 20 只 SPF 雏鸡在 7 日龄腹腔接种 SDAU1501 株，接种剂量为每只 SPF 雏鸡 2000 PFU，标记为 MDV 组；20 只 SPF 雏鸡在 1-6 日龄每天通过饮水饲喂 LNT 溶液 (0.5 g LNT 粉末+1 L 水)，在 7 日龄腹腔接种 SDAU1501 株，剂量为每只 SPF 雏鸡 2000 PFU，标记为 LNT+MDV 组；剩余 20 只 SPF 雏鸡在 7 日龄腹腔接种等体积的无菌生理盐水，不使用 LNT，标记为 Negative control 组。处理方式见表 5。

表 5 香菇多糖预防性使用对 MDV 感染的抑制作用动物实验设计

Table 5 Animal experimental design for the inhibitory effect of Lentinan prophylactic use on MDV infection

分组	SPF 雏鸡数量 (只)	处理方式
MDV 组	20	7 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 MDV 强毒株 SDAU1501 株
LNT+MDV 组	20	1-6 日龄使用 LNT (0.5 g LNT 粉末+1 L 水) 7 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 MDV 强毒株 SDAU1501 株
Negative control 组	20	7 日龄腹腔接种与 2000 PFU 的 MDV 强毒株 SDAU1501 株同等体积的无菌生理盐水

2.4.2 体重

在攻毒后 3、7、21、35d, 对三组 SPF 雏鸡称重, 比较体重差异。

2.4.3 器官发育指数

在攻毒后 7、21、35d, 分别从每组各随机选取 6 只 SPF 雏鸡进行剖检, 称取肝脏、脾脏、胸腺、法氏囊重量, 计算器官发育指数。

2.4.4 外周淋巴细胞病毒载量

在攻毒后 3、7、21、35d, 分别从每组各随机采集 6 只 SPF 雏鸡的颈静脉血液, 分离淋巴细胞后, 提取淋巴细胞中的总 DNA, 通过 qPCR 检测外周淋巴细胞中的 MDV 复制情况。

2.4.5 内脏病毒载量

在攻毒后 7、21、35d, 分别从每组各随机选取 6 只 SPF 雏鸡进行剖检, 对肝脏和脾脏组织进行研磨、匀浆后提取肝脏和脾脏组织中的总 DNA, 通过 qPCR 检测肝脏和脾脏中的 MDV 复制情况。

2.5 香菇多糖治疗性使用对 MDV 感染的抑制作用研究

2.5.1 动物实验设计

将 100 只 1 日龄 SPF 雏鸡平均分为 4 组, 将 MDV 强毒株 SDAU1501 株病毒原液使用 DMEM 稀释为 1000 PFU/100 μ L, 其中 25 只 SPF 雏鸡在 3 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 SDAU1501 株, 标记为 MDV 组; 25 只 SPF 雏鸡在 3 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 SDAU1501 株, 3-9 日龄每天通过饮水饲喂低剂量 LNT 溶液 (0.5 g LNT 粉末+1 L 水), 标记为 Low-dose LNT 组; 25 只 SPF 雏鸡在 3 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 SDAU1501 株, 3-9 日龄每天通过饮水饲喂高剂量 LNT 溶液 (1 g LNT 粉末+1 L 水), 标记为 High-dose LNT 组; 剩余 25 只 SPF 雏鸡在 3 日龄腹腔接种等体积的无菌生理盐水, 不使用 LNT, 标记为 Negative control 组。以上四组所有 SPF 雏鸡在 7 日龄免疫 AIV-H9 灭活疫苗。处理方式见表 6。

表 6 香菇多糖治疗性使用对 MDV 感染的抑制作用动物实验设计

Table 6 Animal experimental design for the inhibitory effect of Lentinan therapeutic use on MDV infection

分组	海兰褐雏鸡数量（只）	处理方式
MDV 组	25	3 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 MDV 强毒株 SDAU1501 株 7 日龄免疫 AIV-H9 灭活疫苗
Low-dose LNT 组	25	3 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 MDV 强毒株 SDAU1501 株 3-9 日龄使用低剂量 LNT（0.5 g LNT 粉末+1 L 水） 7 日龄免疫 AIV-H9 灭活疫苗
High-dose LNT 组	25	3 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 MDV 强毒株 SDAU1501 株 3-9 日龄使用高剂量 LNT（1 g LNT 粉末+1 L 水） 7 日龄免疫 AIV-H9 灭活疫苗
Negative control 组	25	3 日龄腹腔接种与 2000 PFU 的 MDV 强毒株 SDAU1501 株同等 体积的无菌生理盐水 7 日龄免疫 AIV-H9 灭活疫苗

2.5.2 体重

在攻毒后 3、7、14、28、42d，对四组 SPF 雏鸡称重，比较体重差异。

2.5.3 器官发育指数

在攻毒后 7、14、28、42d，分别从每组各随机选取 6 只 SPF 雏鸡进行剖检，称取肝脏、脾脏、胸腺、法氏囊重量，计算器官发育指数。

2.5.4 外周淋巴细胞病毒载量

在攻毒后 3、7、14、28、42d，分别从每组各随机采集 6 只 SPF 雏鸡的颈静脉血液，分离淋巴细胞后，提取淋巴细胞中的总 DNA，通过 qPCR 检测外周淋巴细胞中的 MDV 复制情况。

2.5.5 AIV-H9 抗体效价

在接种 AIV-H9 灭活疫苗后 21 和 35d，分别从每组各随机采集 6 只 SPF 雏鸡的颈静脉血液，分离血清后使用禽流感病毒（H9 亚型）血凝抑制试验抗原，进行血凝与血凝抑制试验测定各组 SPF 雏鸡血清中 AIV-H9 抗体效价。

2.6 香菇多糖与疫苗联合使用对 vMDV 感染的抑制作用研究

2.6.1 动物实验设计

将 100 只 1 日龄海兰褐雏鸡平均分为 4 组，将 MDV 强毒株 SDAU1501 株病毒原液使用 DMEM 稀释为 1000 PFU/100 μ L，其中 25 只海兰褐雏鸡在 5 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 SDAU1501 株，标记为 SDAU1501 组；25 只海兰褐雏鸡，在 1 日龄颈部皮下接种鸡

马立克氏病基因缺失活疫苗（SC9-1 株），在 5 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 SDAU1501 株，标记为 SC9-1 组；25 只海兰褐雏鸡，在 1 日龄颈部皮下接种鸡马立克氏病基因缺失活疫苗（SC9-1 株），在 1-5 日龄每天通过饮水饲喂 LNT 溶液（0.5 g LNT 粉末+1 L 水），在 5 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 SDAU1501 株，标记为 LNT+SC9-1 组；剩余 25 只海兰褐雏鸡在 5 日龄腹腔接种等体积的无菌生理盐水，标记为 Negative control 组。处理方式见表 7。

表 7 香菇多糖与疫苗联合使用对 vMDV 感染的抑制作用动物实验设计

Table 7 Animal experimental design for the inhibitory effect of Lentinan in combination with vaccine on vMDV infection

分组	海兰褐雏鸡数量（只）	处理方式
SDAU1501 组	25	5 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 MDV 强毒株 SDAU1501 株
SC9-1 组	25	1 日龄免疫鸡马立克氏病基因缺失活疫苗（SC9-1 株） 5 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 MDV 强毒株 SDAU1501 株
LNT+SC9-1 组	25	1 日龄免疫鸡马立克氏病基因缺失活疫苗（SC9-1 株） 1-5 日龄使用高剂量 LNT（0.5 g LNT 粉末+1 L 水） 5 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 MDV 强毒株 SDAU1501 株
Negative control 组	25	5 日龄腹腔接种与 2000 PFU 的 MDV 强毒株 SDAU1501 株同等体积的无菌生理盐水

2.6.2 体重

在攻毒后 3、7、14、21d，对 4 组海兰褐雏鸡称重，比较体重差异。

2.6.3 器官发育指数

在攻毒后 21d，分别从每组各随机选取 6 只海兰褐雏鸡进行剖检，称取肝脏、脾脏、胸腺、法氏囊重量，计算器官发育指数。

2.6.4 外周淋巴细胞病毒载量

在攻毒后 3、7、14、21d，分别从每组各随机采集 6 只海兰褐雏鸡的颈静脉血液，分离淋巴细胞后，提取淋巴细胞中的总 DNA，通过 qPCR 检测外周淋巴细胞中的 MDV 复制情况。

2.6.5 内脏病毒载量

在攻毒后 3、7、14、21d，分别从每组各随机选取 6 只海兰褐雏鸡进行剖检，对肝脏和脾脏组织进行研磨、匀浆后提取肝脏和脾脏组织中的总 DNA，通过 qPCR 检测肝脏和脾脏中的 MDV 复制情况。

2.6.6 羽毛囊病毒载量

在攻毒后 14、21d，分别从每组各随机选取 6 只海兰褐雏鸡采集羽毛囊，对羽毛囊组织进行研磨、匀浆后提取羽毛囊组织中的总 DNA，通过 qPCR 检测肝脏和脾脏中的 MDV 复制情况。

2.7 香菇多糖与疫苗联合使用对 vvMDV 感染的抑制作用研究

2.7.1 动物实验设计

将 100 只 1 日龄海兰褐雏鸡平均分为 4 组，将 MDV 超强毒株 Md5 株病毒原液使用 DMEM 稀释为 1000 PFU/100 μ L，其中 25 只海兰褐雏鸡在 5 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 Md5 株，标记为 Md5 组；25 只海兰褐雏鸡，在 1 日龄颈部皮下接种鸡马立克氏病基因缺失活疫苗（SC9-1 株），在 5 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 Md5 株，标记为 SC9-1 组；25 只海兰褐雏鸡，在 1 日龄颈部皮下接种鸡马立克氏病基因缺失活疫苗（SC9-1 株），在 1-5 日龄每天通过饮水饲喂 LNT 溶液（0.5 g LNT 粉末+1 L 水），在 5 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 Md5 株，标记为 LNT+SC9-1 组；剩余 25 只海兰褐雏鸡在 5 日龄腹腔接种等体积的无菌生理盐水，标记为 Negative control 组。处理方式见表 8。

表 8 香菇多糖与疫苗联合使用对 vvMDV 感染的抑制作用动物实验设计

Table 8 Animal experimental design for the inhibitory effect of Lentinan in combination with vaccine on vvMDV infection

分组	SPF 雏鸡数量（只）	处理方式
Md5 组	25	5 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 MDV 超强毒株 Md5 株
SC9-1 组	25	1 日龄免疫鸡马立克氏病基因缺失活疫苗（SC9-1 株） 5 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 MDV 超强毒株 Md5 株
LNT+SC9-1 组	25	1 日龄免疫鸡马立克氏病基因缺失活疫苗（SC9-1 株） 1-5 日龄使用高剂量 LNT（0.5 g LNT 粉末+1 L 水） 5 日龄腹腔接种 2000 PFU 的 MDV 超强毒株 Md5 株
Negative control 组	25	5 日龄腹腔接种与 2000PFU 的 MDV 超强毒株 Md5 株同等体积的无菌生理盐水

2.7.2 体重

同 2.6.2。

2.7.3 器官发育指数

同 2.6.3。

2.7.4 外周淋巴细胞病毒载量

同 2.6.4。

2.7.5 内脏病毒载量

同 2.6.5。

2.7.6 羽毛囊病毒载量

同 2.6.6。

2.8 各实验指标的检测方法

2.8.1 器官发育指数的检测

器官发育指数=器官重量(g)/雏鸡体重(g)×100%。

2.8.2 细胞因子表达情况的检测

2.8.2.1 外周淋巴细胞的分离

(1) 将 1 mL 抗凝血加入等量的血液稀释液中混匀稀释。

(2) 将混匀稀释后的抗凝血样品沿壁缓慢倒入含有等量体积(2mL)外周淋巴分离液的离心管中,保持液体分层避免剧烈晃动。

(3) 离心,2000 rcf,25℃,20 min。离心后离心管中分为4层(由上到下):第一层 血浆层;第二层 环状乳白色淋巴细胞层;第三层 透明分离液层;第四层 红细胞层。

(4) 用移液枪小心吸取第二层的环状乳白色淋巴细胞至新离心管中,加入适量体积的淋巴细胞洗涤液并混匀。

(5) 离心,12,000 rpm,25℃,10 min,弃上清后加入 1 mL 淋巴细胞洗涤液重悬后转至 1.5 mL 离心管中。

(6) 离心,12,000 rpm,25℃,2 min,弃上清后加入适量 1×PBS 或 GA 重悬。

2.8.2.2 RNA 的提取

(1) 向外周淋巴细胞中加入 1×PBS 150 uL,重悬后转至 1.5 mL RNA 离心管中。

- (2) 向 1.5 mL RNA 离心管中加 QVL 裂解液 500 uL, 室温放置 5~10 min。
- (3) 向 1.5 mL RNA 离心管中加无水乙醇 350 uL, 振荡混匀。
- (4) 吸取 750 uL 1.5 mL RNA 离心管中液体至套好收集管的吸附柱中, 离心, 12,000 rpm, 4°C, 1 min, 弃废液。
- (5) 向吸附柱中加 VHB 500 uL, 离心, 12,000 rpm, 4°C, 1 min, 弃废液。
- (6) 向吸附柱中加 RNA wash water BufferII 500uL, 离心, 12,000 rpm, 4°C, 1 min, 弃废液。
- (7) 重复上一步。
- (8) 空离, 12,000 rpm, 4°C, 2 min, 弃废液。
- (9) 将吸附柱套入新 1.5 mL RNA 离心管中, 在超净台中风干 5 min。
- (10) 向吸附柱膜上均匀滴加 20-50 uL (一般是 35 uL) DEPC water, 后 37°C 孵育 5 min。
- (11) 离心, 12,000 rpm, 4°C, 2 min, 得到 RNA 滤液, 可 -80°C 保存。

2.8.2.3 RT-qPCR 检测细胞因子表达情况

步骤一: 以外周淋巴细胞中提取的 RNA 作为模版, 使用 Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒 (含去除 gDNA 试剂, 用于 qPCR) 配置反应体系合成 cDNA。反应条件为: 37°C 15 min, 85°C 5s, 4°C +∞。反应体系见表 9。

表 9 RT-qPCR 反应体系
Table 9 Reaction system of RT-qPCR

试剂	体积 (uL)
SYBR Premix Ex TaqTM (2×)	10
ddH ₂ O	7.2
Forward Primer (10 μM)	0.4
Reverse Primer (10 μM)	0.4
Template DNA	2
Total	20

步骤二: 以步骤一合成的 cDNA 作为模板, 通过 qPCR 检测外周淋巴细胞中细胞因子表达情况。步骤同 2.2.3。

2.8.3 细胞免疫水平的检测

2.8.3.1 外周淋巴细胞的分离

步骤同 2.8.2.1。

2.8.3.2 流式细胞术检测细胞免疫水平

(1) 对外周淋巴细胞进行定量，稀释至合适浓度后处理为外周淋巴细胞悬液。

(2) 吸取 1 mL 外周淋巴细胞悬液至 1.5 mL 棕色离心管中，并单独留出 4 个 1.5 mL 棕色离心管作为空白管、APC 标记鼠抗鸡 CD3 抗体单染管、PE 标记鼠抗鸡 CD4 抗体单染管和 FITC 标记鼠抗鸡 CD8 抗体单染管。

(3) 将 APC 标记鼠抗鸡 CD3 抗体、PE 标记鼠抗鸡 CD4 抗体和 FITC 标记鼠抗鸡 CD8 抗体根据用量进行 100 倍稀释。

(4) 向棕色离心管中加入稀释后的 APC 标记鼠抗鸡 CD3 抗体、PE 标记鼠抗鸡 CD4 抗体和 FITC 标记鼠抗鸡 CD8 抗体各 50 uL，向 APC 标记鼠抗鸡 CD3 抗体单染管、PE 标记鼠抗鸡 CD4 抗体单染管和 FITC 标记鼠抗鸡 CD8 抗体单染管中分别单独加入 APC 标记鼠抗鸡 CD3 抗体、PE 标记鼠抗鸡 CD4 抗体和 FITC 标记鼠抗鸡 CD8 抗体各 50 uL。

(5) 使用流式细胞仪上机检测。

2.8.4 MDV 病毒载量的检测

2.8.4.1 DNA 的提取

(1) 若为外周细胞样品，则向外周淋巴细胞中加入 GA 200 uL，重悬后转至 1.5 mL 离心管中，加入 20 uL Proteinase K 混匀；若为脏器组织样品，则取绿豆粒大小，研磨、匀浆后处理为细胞悬液，加入 GA 200 uL，重悬后转至 1.5 mL 离心管中，加入 20 uL Proteinase K 混匀后 56℃水浴 1-3 h。

(2) 向 1.5 mL 离心管中加入 GB 200 uL，混匀后 70℃水浴 10 min。

(3) 向 1.5 mL 离心管中加入无水乙醇 200 uL，混匀后微离。

(4) 吸取 600 uL 1.5 mL 离心管中液体至套好收集管的吸附柱中，离心，12,000 rpm，4℃，1 min，弃废液。

(5) 向吸附柱中加入 GD 500 uL，离心，12,000 rpm，4℃，1 min 弃废液。

- (6) 向吸附柱中加入 PW 600 uL, 离心, 12,000 rpm, 4°C, 1 min 弃废液。
- (7) 重复上一步。
- (8) 空离 12,000 rpm, 2 min, 弃废液。
- (9) 将吸附柱套入新 1.5 mL 离心管中, 在超净台中风干 5 min。
- (10) 点膜: 向柱子膜上均匀滴加 TE 50~200 uL (一般是 55 uL), 37°C 孵育 5 min。
- (11) 12,000 rpm, 4°C, 2 min, 得到 DNA 滤液。可 -20°C 保存。

2.8.4.2 qPCR 检测 MDV 病毒载量

以外周淋巴细胞和肝脏、脾脏、羽毛囊组织提取的 DNA 作为模板, 通过 qPCR 检测各类样本中 MDV 病毒载量。步骤同 2.2.3。

2.8.5 血凝与血凝抑制试验检测 AIV-H9 抗体效价

血凝试验 (HA):

- (1) 向 96 孔 V 型微量血凝板中每孔加入 1×PBS 25 uL。
- (2) 取抗原 25 uL 加入第 1 孔中, 反复吹吸 3~5 次混匀。
- (3) 从第 1 孔中吸取 25 uL 液体加入第 2 孔, 混匀后取 25 uL 加入第 3 孔, 依此 2 倍比稀释至第 11 孔, 第 12 孔作为对照孔。
- (4) 向 96 孔 V 型微量血凝板中每孔补加 1×PBS 25 uL。
- (5) 向 96 孔 V 型微量血凝板中每孔加入 1% (体积分数) 鸡红细胞悬液 25 uL。
- (6) 结果判定。轻扣反应板混合反应物, 室温 (约 20°C) 静置 40 min, 环境温度过高时可在 4°C 条件下静置 60 min, 当对照孔的红细胞呈显著纽扣状时判定结果。判定时, 将反应板倾斜 60°, 观察红细胞有无泪珠状流淌, 完全无泪珠样流淌 (100%凝集) 的最高稀释倍数判为血凝效价。

血凝抑制试验 (HI):

- (1) 根据 HA 试验测定的血凝效价, 配制 4 个血凝单位 (4 HAU) 的抗原。举例: 血凝效价为 1:128, 即 $128/4=32$ (即稀释倍数为 1:32)。取 PBS 9 mL, 加入抗原 1.0 mL, (即 1:10 稀释) 震荡混匀取 1.0 mL, 加入 2.2 mL PBS 中, 使最终浓度为 1:32。对其

血凝价进行回归检验校准后，2~8℃存放待用。

(2) 向 96 孔 V 型微量血凝板 1~11 孔每孔加入 1×PBS 25uL，第 12 孔加入 1×PBS 50uL 作为空白对照。

(3) 取待检血清 25 uL 加入第 1 孔中，血清与 1×PBS 充分混匀后，从第 1 孔中吸取 25 uL 液体加入第 2 孔，混匀取 25 uL 加入第 3 孔，依次倍比稀释至第 10 孔，从第 10 孔吸取 25 uL 弃去，第 11 孔作为抗原对照。

(4) 在 1~11 孔中每孔加入 4HAU 抗原 25 uL，在室温（约 20℃）下静置 30 min 或 4℃下静置 60 min。

(5) 每孔加入 1%（体积分数）鸡红细胞悬液 25 uL，震荡混匀，在室温（约 20℃）下静置 40 min 或 4℃下静置 60 min。

(6) 结果判定。判定时，将反应板倾斜 60°，当抗原对照孔（第 11 孔）完全凝集，且阴性对照血清抗体效价不高于 1:4（2 或 $2\log_2$ ），阳性对照血清抗体效价与已知效价误差不超过 1 个滴度时，试验方可成立。以完全抑制 4HAU 抗原的最高血清稀释倍数判为该血清的 H1 抗体效价。用于检测抗体，检测鸡血清时，H1 抗体效价不高于 1:8（ 2^3 或 $3\log_2$ ）判为阴性，不低于 1:16（ 2^4 或 $4\log_2$ ）判为阳性。

3 结果与分析

3.1 香菇多糖对 SPF 雏鸡的免疫增强作用

3.1.1 体重

在使用 LNT 6d 后, LNT 组的平均体重为 $82.5 \pm 8.2\text{g}$, Control 组的平均体重为 $74 \pm 6.7\text{g}$ 。如图 1 所示, LNT 组的体重极显著高于 Control 组 ($P < 0.01$)。表明 LNT 可以促进 SPF 雏鸡的生长发育。

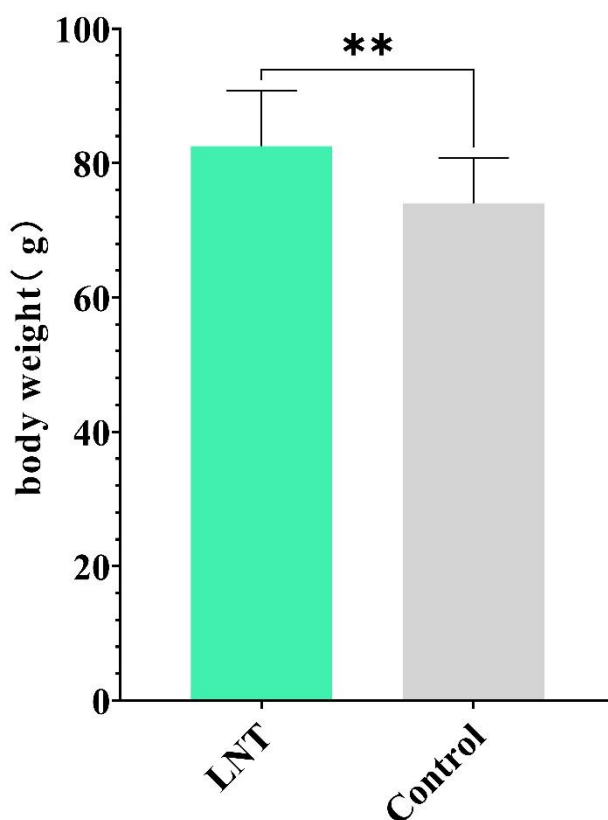


图 1 不同组的体重 (**: $P < 0.01$)

Fig. 1 Body weight of different groups (**: $P < 0.01$)

3.1.2 细胞因子表达情况

在使用 LNT 6d 后, LNT 组的 IFN- γ 、TNF- α 、Mx 蛋白、IL-2、IL-6、IL-18 这 6 种细胞因子的表达水平较 Control 组均上调。其中 Mx 蛋白上调倍数最高且上调极显著 (P

< 0.01), 为 4.056 倍, 其次是 $\text{IFN-}\gamma$ 和 $\text{TNF-}\alpha$, 其上调倍数显著 ($P < 0.05$), 分别为 2.007 和 1.701 倍 (表 5)。表明 LNT 可以提高 SPF 雏鸡的先天免疫水平。

表 10 LNT 对 6 种细胞因子表达的影响

Table 10 Expression of six cytokines effects of LNT

细胞因子	组别	ΔCT	$2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$
$\text{IFN-}\gamma$	LNT	7.593 ± 0.383	$2.007 \pm 0.533\text{B}$
	Negative control	8.556 ± 1.104	$1.000 \pm 0.000\text{A}$
$\text{TNF-}\alpha$	LNT	7.764 ± 0.491	$1.701 \pm 0.521\text{B}$
	Negative control	8.465 ± 0.723	$1.000 \pm 0.000\text{A}$
Mx proteins	LNT	8.148 ± 0.759	$4.056 \pm 1.921\text{B}$
	Negative control	10.012 ± 1.562	$1.000 \pm 0.000\text{A}$
IL-2	LNT	8.313 ± 0.510	$1.573 \pm 0.502\text{b}$
	Negative control	8.896 ± 0.453	$1.000 \pm 0.000\text{a}$
IL-6	LNT	5.886 ± 0.302	$1.036 \pm 0.221\text{a}$
	Negative control	5.911 ± 0.501	$1.000 \pm 0.000\text{a}$
IL-18	LNT	6.524 ± 0.541	$1.067 \pm 0.511\text{a}$
	Negative control	6.517 ± 1.334	$1.000 \pm 0.000\text{a}$

注: 同列数据肩标大写字母不同表示差异极显著 ($P < 0.01$), 肩标小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 字母相同或无标记表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Note: In the same column, the data with different uppercase letter superscripts show highly significant difference ($P < 0.01$), the data with different lowercase letter superscripts show significant difference ($P < 0.05$), and the data with the same letter or no letter superscript show no significant difference ($P > 0.05$).

3.1.3 细胞免疫水平

在使用 LNT 6d 后, LNT 组的 $\text{CD4}^+\text{T}$ 淋巴细胞比重较 Control 组显著上调 ($P < 0.001$); LNT 组的 $\text{CD8}^+\text{T}$ 淋巴细胞比重较 Control 组上调但并不显著 ($P > 0.05$); LNT 组的 $\text{CD4}^+\text{T}$ 淋巴细胞比重与 $\text{CD8}^+\text{T}$ 淋巴细胞比重的比值较 Control 组显著上调 ($P < 0.01$) (图 2)。表明 LNT 可以激活 SPF 雏鸡的细胞免疫, 促进 $\text{CD4}^+\text{T}$ 淋巴细胞和 $\text{CD8}^+\text{T}$ 淋巴细胞的成熟与分化, 尤其是 $\text{CD4}^+\text{T}$ 淋巴细胞的成熟与分化, 提高 SPF 雏鸡的细胞免疫水平。

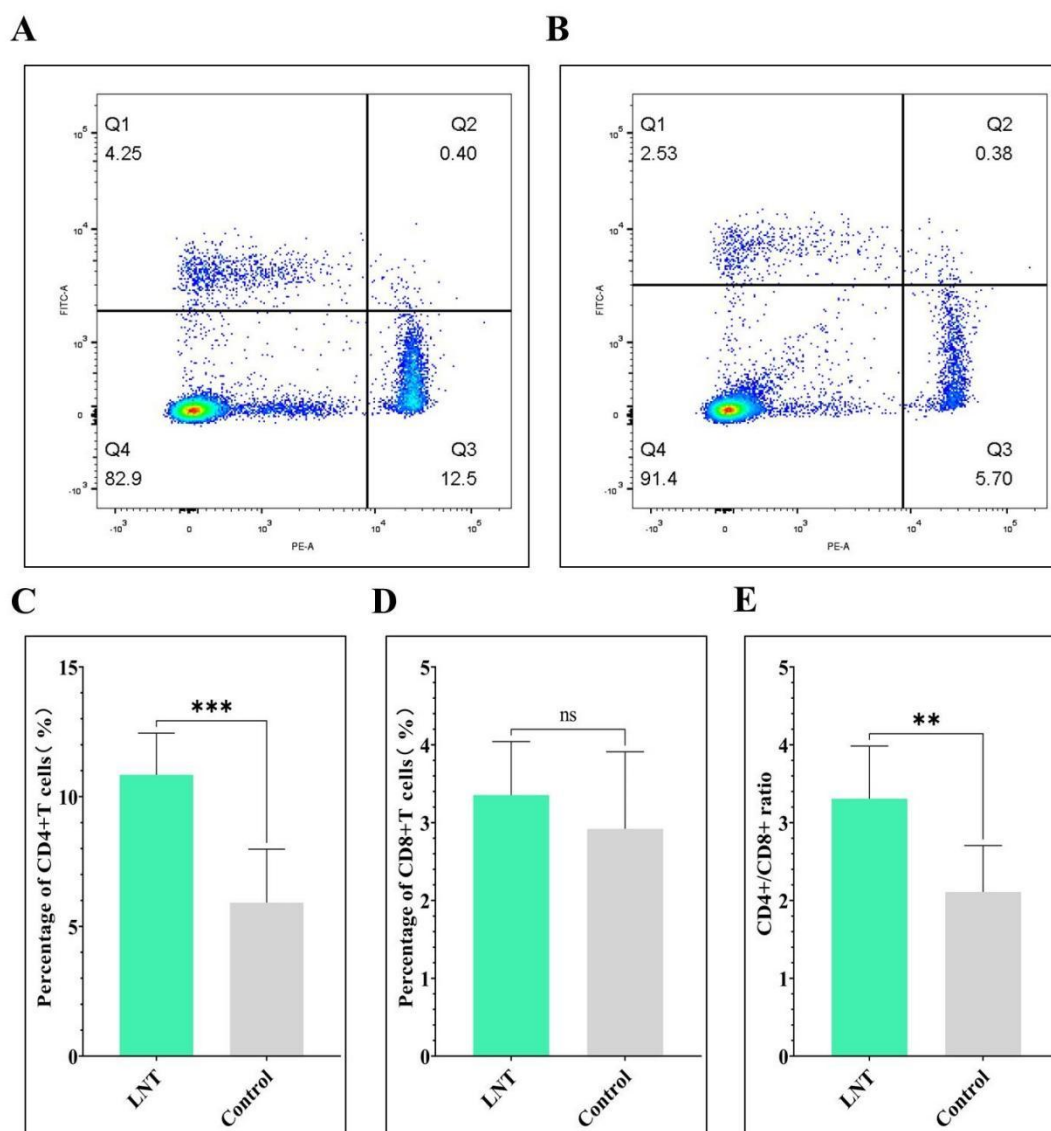


图 2 LNT 对细胞免疫的影响

Fig. 2 Cellular immunity effects of LNT

(A) LNT 组的流式细胞术结果, (B) 阴性对照组的流式细胞术结果, (C) CD4⁺ T 淋巴细胞比重, (D) CD8⁺ T 淋巴细胞比重, (E) CD4⁺ T 淋巴细胞与 CD8⁺ T 淋巴细胞的比例。(ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$)

(A) Flow cytometry results of the LNT group, (B) Flow cytometry results of the negative control group, (C) CD4⁺ T lymphocyte-specific gravity, (D) CD8⁺ T lymphocyte-specific gravity, (E) Ratio of CD4⁺ T lymphocytes to CD8⁺ T lymphocytes. (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$)

3.2 香菇多糖预防性使用对 MDV 感染的抑制作用

3.2.1 体重

在攻毒后 3、7、21d, 未使用 LNT 的攻毒组 MDV 组的体重是三组中最低的, 而预防性使用 LNT 的攻毒组 LNT+MDV 组的体重与 Negative control 组接近, 但三组之间的体重无统计学差异 ($P > 0.05$); 在攻毒后 35d, MDV 组的体重极显著低于 Negative control 组 ($P < 0.0001$), 也极显著低于 LNT+MDV 组 ($P < 0.0001$), 而 LNT+MDV 组的体重与 Negative control 组无显著差异 ($P > 0.05$) (图 3)。表明 MDV 感染导致 SPF 雏鸡体重增重迟缓, 预防性使用 LNT 后减轻了 MDV 感染对 SPF 雏鸡生长的抑制作用。

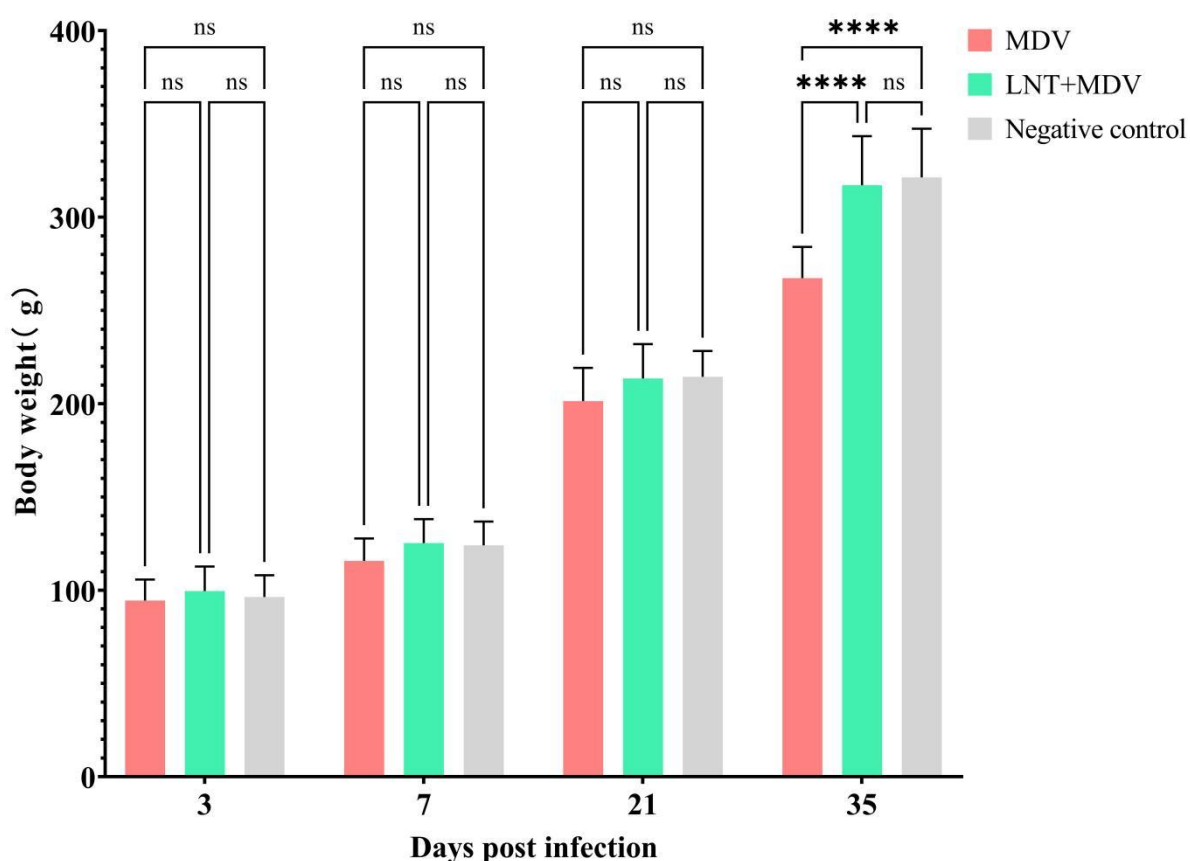


图 3 不同组的体重 (ns: $P > 0.05$, ****: $P < 0.001$)

Fig. 3 Body weight of different groups (ns: $P > 0.05$, ****: $P < 0.001$)

3.2.2 器官发育指数

在攻毒后 7、21、35d, 未使用 LNT 的攻毒组 MDV 组的肝脏发育指数均高于 Negative control 组和预防性使用 LNT 的攻毒组 LNT+MDV 组; 且在攻毒后 7d, MDV 组的肝脏发育指数显著高于 Negative control 组 ($P < 0.05$); 在攻毒后 21d, MDV 组的肝脏发育指数显著高于 Negative control 组和 LNT+MDV 组 ($P < 0.05$); 在攻毒后 35d, MDV 组的肝脏发育指数极显著高于 Negative control 组和 LNT+MDV 组 ($P < 0.01$), 而在攻毒后 7、21、35d, LNT+MDV 组的肝脏发育指数与 Negative control 组均无统计学差异 ($P > 0.05$) (图 4 A)。在攻毒后 7d, MDV 组和 LNT+MDV 组的脾脏发育指数均极显著高于 Negative control 组 ($P < 0.001$); 在攻毒后 21d, MDV 组和 LNT+MDV 组的脾脏发育指数也均极显著高于 Negative control 组 ($P < 0.001$); 且在攻毒后 7、21d, MDV 组和 LNT+MDV 组的脾脏发育指数均无统计学差异 ($P > 0.05$); 而在攻毒后 35d, MDV 组的脾脏发育指数仍然极显著高于 Negative control 组 ($P < 0.01$), 但 LNT+MDV 组的脾脏发育指数出现下降, 显著低于 MDV 组 ($P < 0.05$), 并与 Negative control 组无统计学差异 ($P > 0.05$) (图 4 B)。在攻毒后 7、21、35d, 三组之间的法氏囊发育指数和胸腺发育指数均接近且统计学无差异 ($P > 0.05$) (图 4 C, D)。表明 MDV 感染导致 SPF 雏鸡肝脏和脾脏的肿大, 预防性使用 LNT 缓解了 MDV 感染导致的 SPF 雏鸡肝脏和脾脏的肿大。

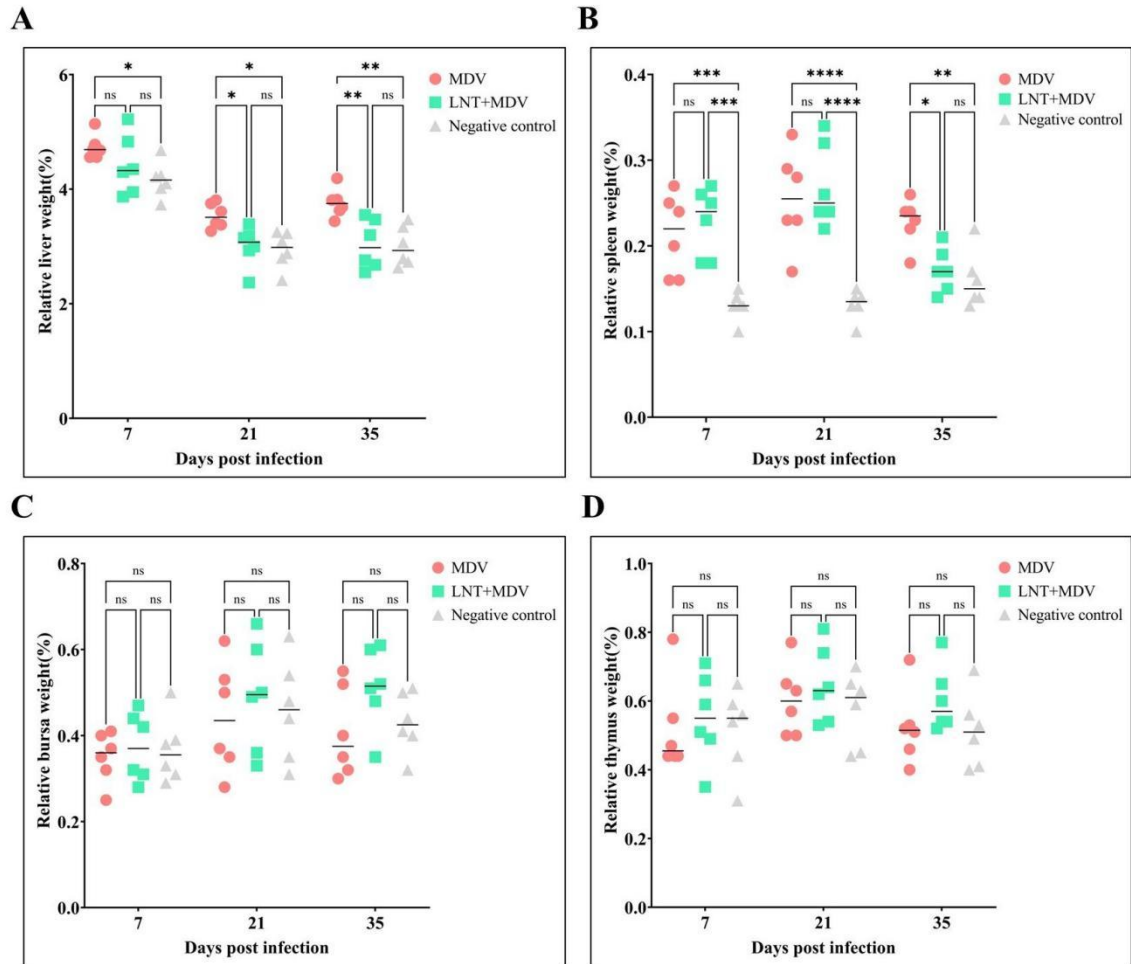


图4 不同组的器官发育指数

Fig.4 Organ indexes in different groups

(A) 肝脏 (B) 脾脏 (C) 法氏囊 (D) 胸腺 (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$)

(A) Liver (B) Spleen (C) Bursa (D) Thymus (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$)

3.2.3 外周淋巴细胞中 MDV 病毒载量检测

在攻毒后 3、7、35d, 预防性使用 LNT 的攻毒组 LNT+MDV 组的外周淋巴细胞病毒载量均极显著低于未使用 LNT 的攻毒组 MDV 组 ($P < 0.01$), 而在攻毒后 21d, 这种极显著的差异状态更为明显 ($P < 0.0001$) (图 5 A)。表明预防性使用 LNT 抑制了 MDV 在 SPF 雏鸡外周淋巴细胞中的复制。

3.2.4 内脏器官中 MDV 病毒载量检测

在攻毒后 7、21、35d, 预防性使用 LNT 的攻毒组 LNT+MDV 组的肝脏病毒载量和脾脏病毒载量均低于未使用 LNT 的攻毒组 MDV 组。在攻毒后 7d, LNT+MDV 组的肝

脏病毒载量显著低于 MDV 组 ($P < 0.05$)；在攻毒后 21、35d，LNT+MDV 组的肝脏病毒载量和脾脏病毒载量均极显著低于 MDV 组 ($P < 0.0001$) (图 5 B, C)。表明预防性使用 LNT 抑制了 MDV 在 SPF 雏鸡肝脏和脾脏中的复制。

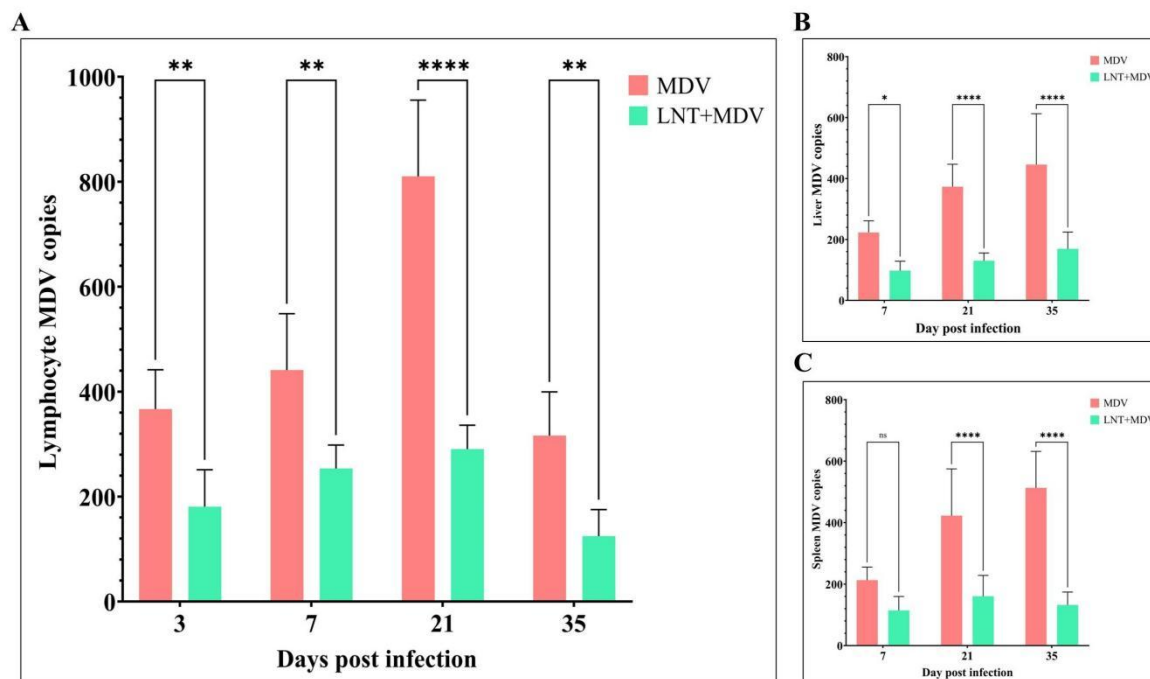


图 5 不同组淋巴细胞、肝脏和脾脏组织的病毒载量

Fig. 5 The virus load of lymphocyte, liver, and spleen tissues in different groups

(A) 淋巴细胞 (B) 肝脏 (C) 脾脏 (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$)

(A) Lymphocyte (B) Liver (C) Spleen (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$)

3.3 香菇多糖治疗性使用对 MDV 感染的抑制作用

3.3.1 体重

在攻毒后 3、7、14、28d，未使用 LNT 的攻毒组 MDV 组的体重是四组中最低的，而治疗性使用低剂量 LNT 的攻毒组 Low-dose LNT 组和治疗性使用高剂量 LNT 的攻毒组 High-dose LNT 组的体重与 Negative control 组接近，但四组体重无统计学差异 ($P > 0.05$)；在攻毒后 42d，MDV 组的体重极显著低于 Negative control 组和 Low-dose LNT 组 ($P < 0.001$)，也极显著低于 High-dose LNT 组 ($P < 0.01$)，而 Low-dose LNT 组、High-dose LNT 组和 Negative control 组之间的体重统计学无差异 ($P > 0.05$) (图 6)。表明 MDV 感染导致 SPF 雏鸡体重增重迟缓，治疗性使用两种剂量的 LNT 后均减轻了 MDV 感染对 SPF 雏鸡生长的抑制作用。

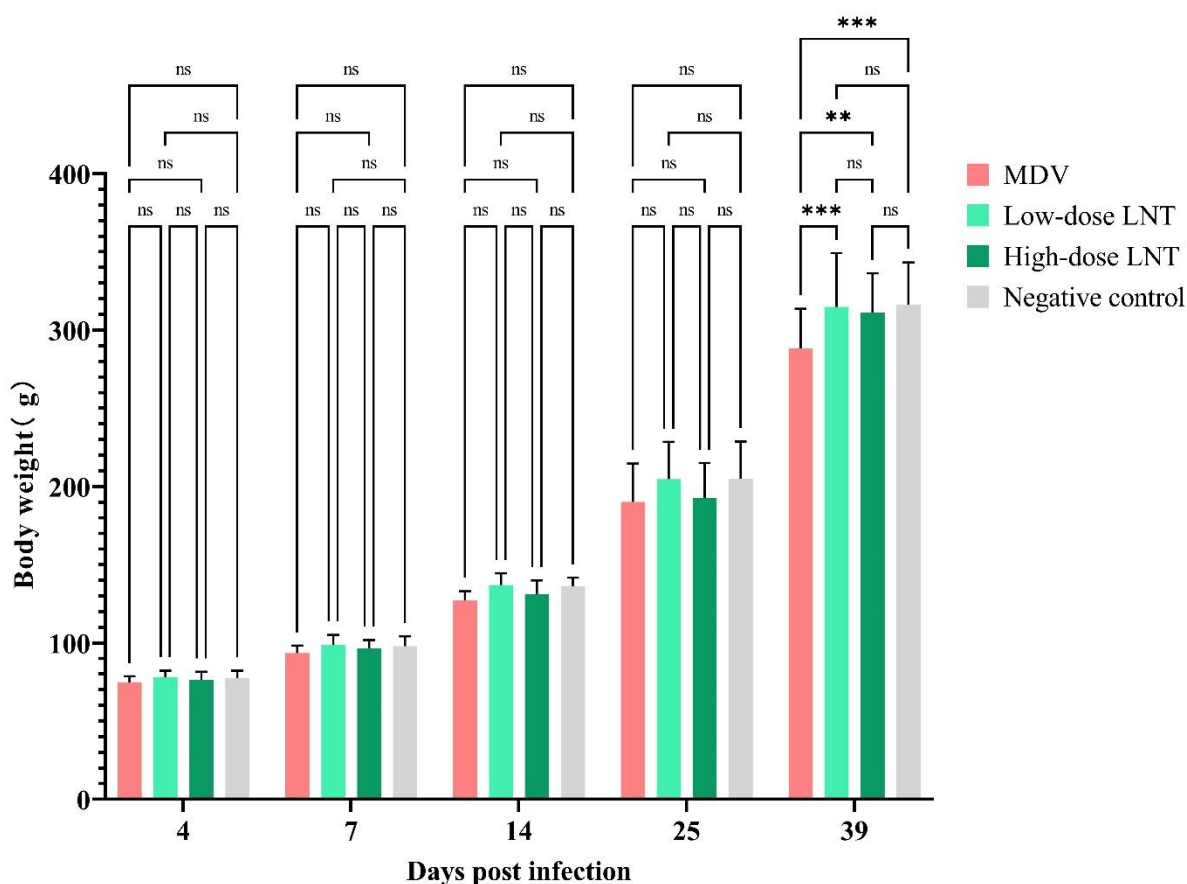


图 6 不同组的体重 (ns: $P > 0.05$, ****: $P < 0.001$)

Fig. 6 Body weight of different groups (ns: $P > 0.05$, ****: $P < 0.001$)

3.3.2 器官发育指数

在攻毒后 7、14、28d, 未使用 LNT 的攻毒组 MDV 组、治疗性使用低剂量 LNT 的攻毒组 Low-dose LNT 组和治疗性使用高剂量 LNT 的攻毒组 High-dose LNT 组的肝脏发育指数均极显著高于 Negative control 组 ($P < 0.001$); 但在攻毒后 42d, MDV 组的肝脏发育指数极显著高于 Negative control 组和 High-dose LNT 组 ($P < 0.01$), 并显著高于 Low-dose LNT 组 ($P < 0.05$), 而 Low-dose LNT 组、High-dose LNT 组和 Negative control 组之间的肝脏发育指数统计学无差异 ($P > 0.05$) (图 7 A)。在攻毒后 7、14d, MDV 组的脾脏发育指数显著高于 Negative control 组 ($P < 0.05$); 在攻毒后 28、42d, MDV 组的脾脏发育指数极显著高于 Negative control 组 ($P < 0.01$); 而在攻毒后 7、14、28、42d, Low-dose LNT 组、High-dose LNT 组和 Negative control 组之间的脾脏发育指数无统计学差异 ($P > 0.05$) (图 7 B)。在攻毒后 7、14、28、42d, 四组之间的法氏囊发育指数和胸腺发育指数均接近且统计学无差异 ($P > 0.05$) (图 7 C, D)。表明 MDV 感染导致 SPF 雏鸡肝脏和脾脏的肿大, 治疗性使用两种剂量的 LNT 均缓解了 MDV 感染导致的 SPF 雏鸡肝脏和脾脏的肿大。

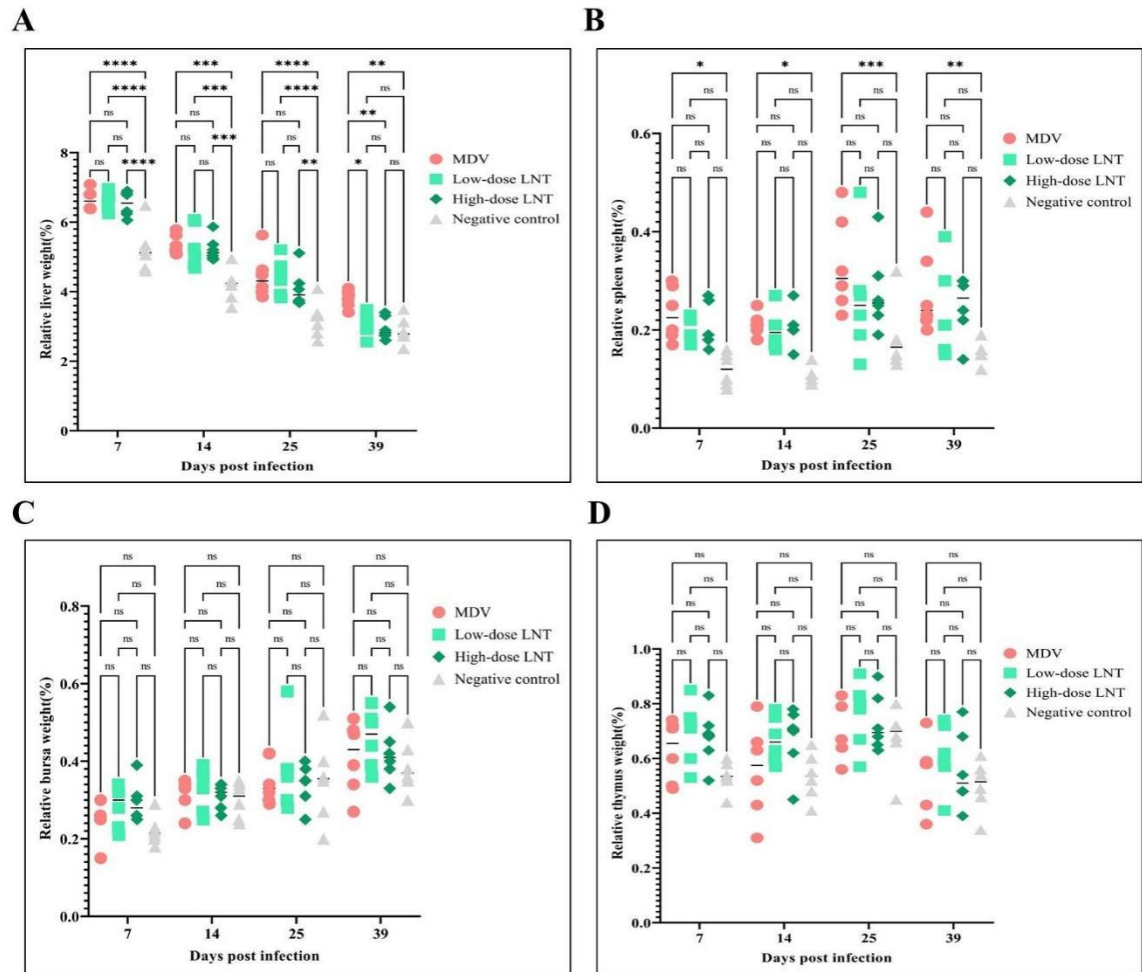


图7 不同组的器官发育指数

Fig. 7 Organ indexes in different groups

(A) 肝脏 (B) 脾脏 (C) 法氏囊 (D) 胸腺 (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$)

(A) Liver (B) Spleen (C) Bursa (D) Thymus (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$)

3.3.3 外周淋巴细胞中 MDV 病毒载量检测

在攻毒后 3、7、14、28、42d，治疗性使用低剂量 LNT 的攻毒组 Low-dose LNT 组和治疗性使用高剂量 LNT 的攻毒组 High-dose LNT 组的外周淋巴细胞病毒载量均低于未使用 LNT 的攻毒组 MDV 组，且 High-dose LNT 组的外周淋巴细胞病毒载量均低于 Low-dose LNT 组。Low-dose LNT 组的外周淋巴细胞病毒载量在攻毒后 7d 显著低于 MDV 组 ($P < 0.05$)，在攻毒后 14、25d 极显著低于 MDV 组 ($P < 0.0001$)。High-dose LNT 组的外周淋巴细胞病毒载量在攻毒后 7、14、28、42d 极显著低于 MDV 组 ($P < 0.01$)，且在攻毒后 14、28d 极显著低于 Low-dose LNT 组 ($P < 0.01$)。（图 8）。表明治疗性使用两种剂量的 LNT 均抑制了 MDV 在 SPF 雏鸡外周淋巴细胞中的复制，且抑制作用与 LNT 的剂量呈正相关。

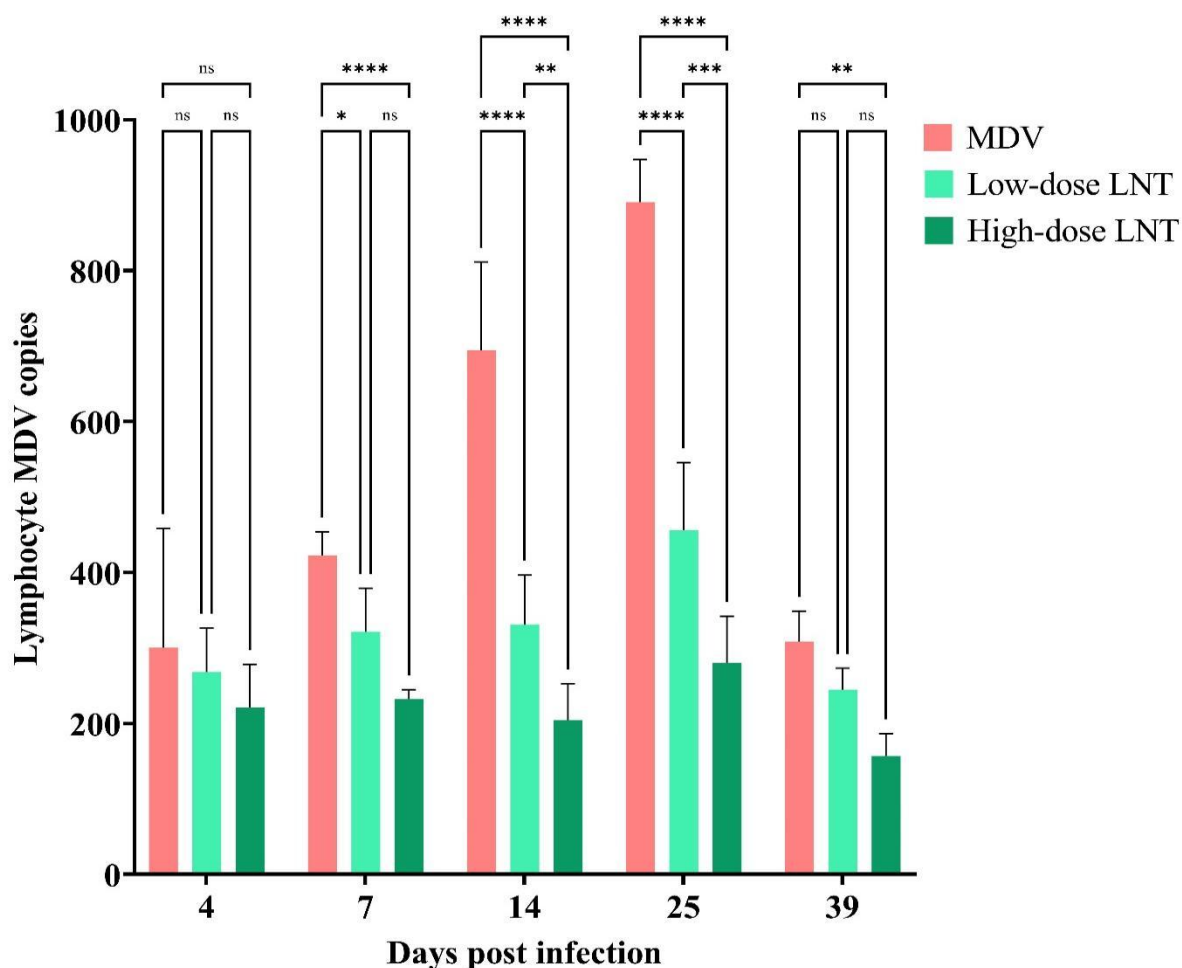


图 8 不同组淋巴细胞的病毒载量 (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$)

Fig. 8 The virus load of lymphocyte in different groups (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$)

3.3.4 不同组别 AIV-H9 抗体效价测定

在免疫 AIV-H9 灭活疫苗后 21、35d，未使用 LNT 的攻毒组 MDV 组的 AIV-H9 抗体滴度最低，极显著低于 Negative control 组，治疗性使用低剂量 LNT 的攻毒组 Low-dose LNT 组和治疗性使用高剂量 LNT 的攻毒组 High-dose LNT 组 ($P < 0.0001$)；而在免疫 AIV-H9 灭活疫苗后 21d，Low-dose LNT 组、High-dose LNT 组和 Negative control 组之间的 AIV-H9 抗体滴度无统计学差异 ($P > 0.05$)；但在免疫 AIV-H9 灭活疫苗后 35d，Low-dose LNT 组的 AIV-H9 抗体滴度显著低于 Negative control 组 ($P < 0.05$)，而 High-dose LNT 组的 AIV-H9 抗体滴度与 Negative control 组无显著差异 ($P > 0.05$)（图 9）。表明 MDV 感染导致 SPF 雏鸡发生严重的免疫抑制，使其对 AIV-H9 灭活疫苗的免疫应答能力下降，治疗性使用两种剂量的 LNT 均缓解了 MDV 感染所引起的免疫抑制，且缓解作用与 LNT 的剂量呈正相关。

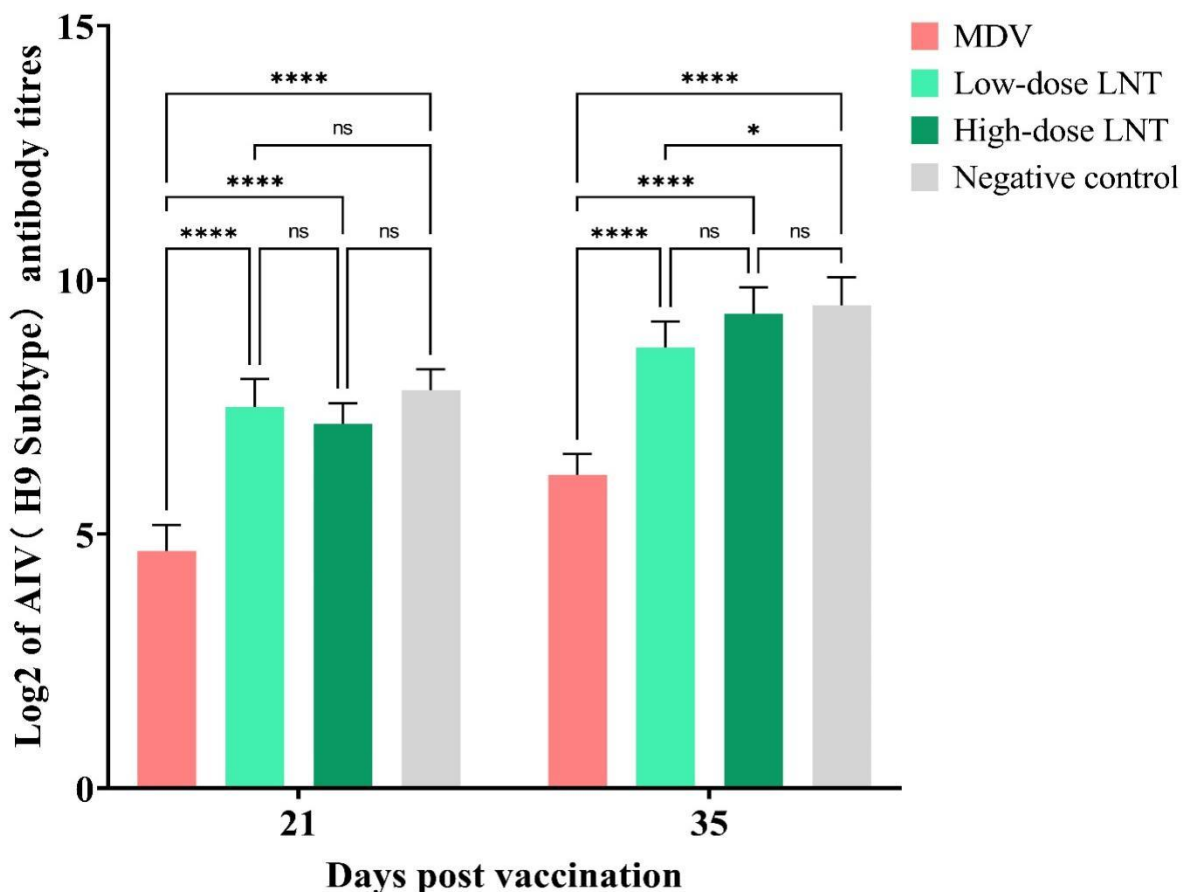


图 9 不同组禽流感病毒 (H9 亚型) 抗体滴度 (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.001$)

Fig. 9 Avian Influenza Virus (H9 subtype) antibody titers in different groups (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.001$)

3.4 香菇多糖与疫苗联合使用对 vMDV 感染的抑制作用

3.4.1 体重

在攻毒后 3、7、14、21d, 未使用 LNT 和疫苗的攻毒组 SDAU1501 组的体重是四组中最低的。SDAU1501 组的体重在攻毒后 3d 极显著低于 LNT+SC9-1 组 ($P < 0.001$), 在攻毒后 7、14d 显著低于 LNT+SC9-1 组 ($P < 0.05$), 在攻毒后 21d 极显著低于 LNT+SC9-1 组、SC9-1 组和 Negative control 组 ($P < 0.0001$)。在攻毒后 3、7、14、21d, 使用 LNT 和疫苗的攻毒组 LNT+SC9-1 组的体重略高于 Negative control 组, 只使用疫苗的攻毒组 SC9-1 组体重略低于 Negative control 组, LNT+SC9-1 组和 SC9-1 组的体重与 Negative control 组均无显著差异 ($P > 0.05$), 但在攻毒后 3d, SC9-1 组的体重显著低于 LNT+SC9-1 组 ($P < 0.05$) (图 10)。表明 vMDV 感染导致海兰褐雏鸡体重增重迟缓, 免疫鸡马立克氏病基因缺失活疫苗 (SC9-1 株) 可以预防 vMDV 感染导致的海兰褐雏鸡增重迟缓, 而 LNT 与鸡马立克氏病基因缺失活疫苗 (SC9-1 株) 联合使用更好的减轻了 MDV 感染对海兰褐雏鸡生长的抑制作用。

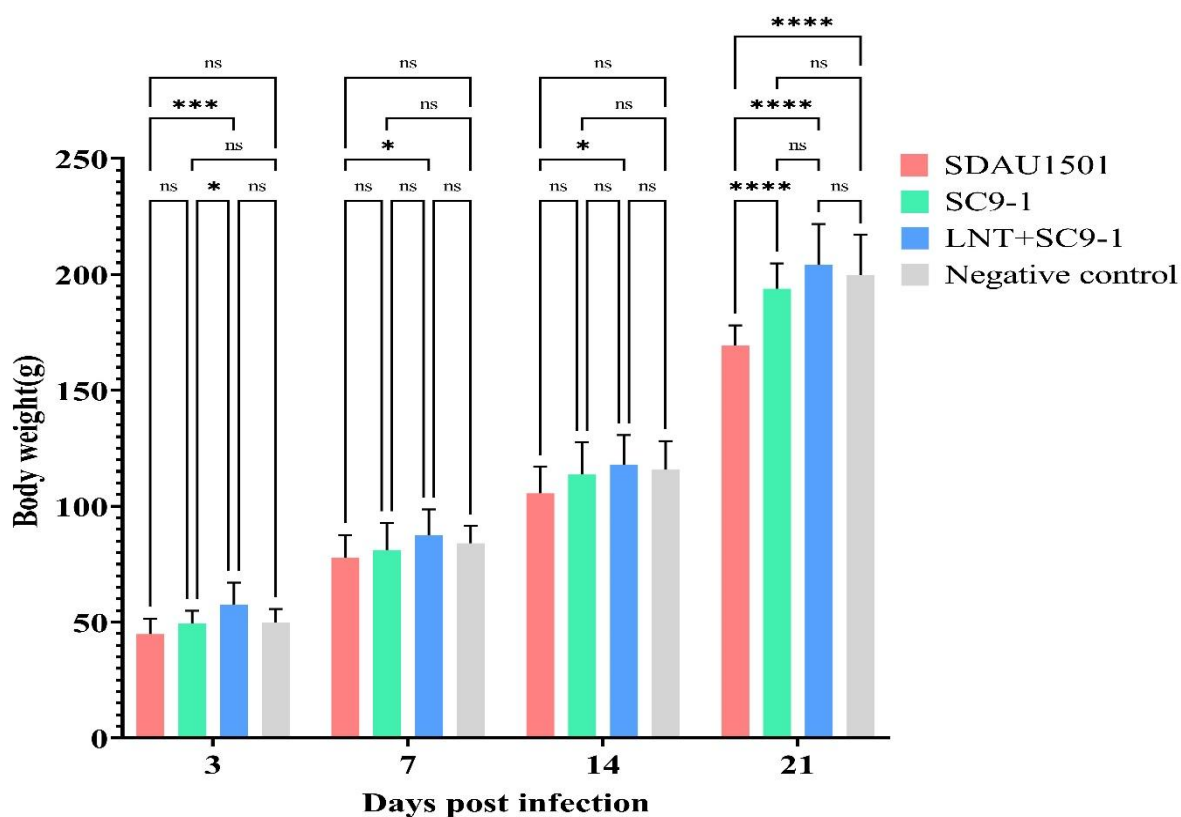


图 10 不同组的体重 (ns: $P > 0.05$, ****: $P < 0.001$)

Fig. 10 Body weight of different groups (ns: $P > 0.05$, ****: $P < 0.001$)

3.4.2 器官发育指数

在攻毒后 21d, 尽管四组之间的肝脏发育指数、脾脏发育指数、法氏囊发育指数和胸腺发育指数无显著的统计学差异 ($P > 0.05$), 但不难看出, 未使用 LNT 和疫苗的攻毒组 SDAU1501 组的肝脏发育指数和脾脏发育指数最高, 只使用疫苗的攻毒组 SC9-1 组的肝脏发育指数高于使用 LNT 和疫苗的攻毒组 LNT+SC9-1 组和 Negative control 组, 而 LNT+SC9-1 组的肝脏发育指数和脾脏发育指数与 Negative control 组接近 (图 11)。

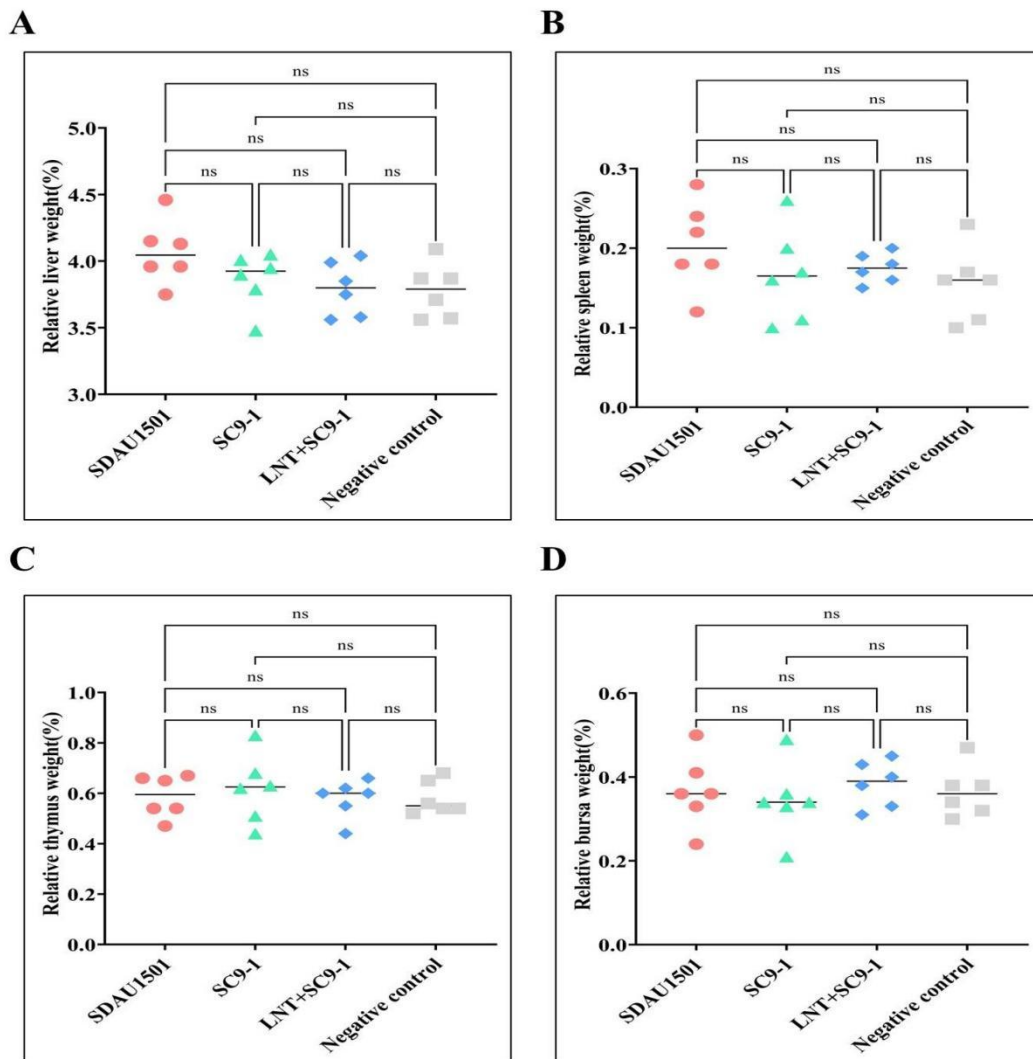


图 11 不同组的器官发育指数

Fig. 11 Organ indexes in different groups

(A) 肝脏 (B) 脾脏 (C) 法氏囊 (D) 胸腺 (ns: $P > 0.05$)

(A) Liver (B) Spleen (C) Bursa (D) Thymus (ns: $P > 0.05$)

3.4.3 外周淋巴细胞中 MDV 病毒载量检测

在攻毒后 7、14、21d, 只使用疫苗的攻毒组 SC9-1 组和使用 LNT 和疫苗的攻毒组 LNT+SC9-1 组的外周淋巴细胞病毒载量均低于未使用 LNT 和疫苗的攻毒组 SDAU1501 组, 且在攻毒后 7、21d, LNT+SC9-1 组的外周淋巴细胞病毒载量均低于 SC9-1 组。在攻毒后 14d, SC9-1 组和 LNT+SC9-1 组的外周淋巴细胞病毒载量均极显著低于 SDAU1501 组 ($P < 0.01$)。在攻毒后 21d, SC9-1 组和 LNT+SC9-1 组的外周淋巴细胞 MDV 病毒载量也极显著低于 SDAU1501 组 ($P < 0.0001$), 且 LNT+SC9-1 组的外周淋巴细胞病毒载量极显著低于 SC9-1 组 ($P < 0.0001$) (图 12A)。上述结果表明免疫鸡马立克氏病基因缺失活疫苗 (SC9-1 株) 抑制了 vMDV 在海兰褐雏鸡外周淋巴细胞中的复制, 而 LNT 与鸡马立克氏病基因缺失活疫苗 (SC9-1 株) 联合使用更好的抑制了 vMDV 在海兰褐雏鸡外周淋巴细胞中的复制。

3.4.4 内脏器官中 MDV 病毒载量检测

在攻毒后 7、14、21d, 只使用疫苗的攻毒组 SC9-1 组和使用 LNT 和疫苗的攻毒组 LNT+SC9-1 组的肝脏病毒载量均低于未使用 LNT 和疫苗的攻毒组 SDAU1501 组, 且 LNT+SC9-1 组的肝脏病毒载量均低于 SC9-1 组。在攻毒后 7d, SC9-1 组的肝脏病毒载量显著低于 SDAU1501 组 ($P < 0.05$), 而 LNT+SC9-1 组的肝脏病毒载量则极显著低于 SDAU1501 组 ($P < 0.001$), 且 LNT+SC9-1 组的肝脏病毒载量显著低于 SC9-1 组 ($P < 0.05$)。在攻毒后 14d, SC9-1 组和 LNT+SC9-1 组的肝脏病毒载量均极显著低于 SDAU1501 组 ($P < 0.0001$) (图 12B)。在攻毒后 3、7、14、21d, SC9-1 组和 LNT+SC9-1 组的脾脏病毒载量均极显著低于 SDAU1501 组 ($P < 0.001$); 且不难看出, 在攻毒后 7、21d, LNT+SC9-1 组的脾脏病毒载量低于 SC9-1 组, 虽然统计学差异并不显著 ($P > 0.05$) (图 12C)。表明免疫鸡马立克氏病基因缺失活疫苗 (SC9-1 株) 抑制了 vMDV 在海兰褐雏鸡肝脏和脾脏中的复制, 而 LNT 与鸡马立克氏病基因缺失活疫苗 (SC9-1 株) 联合使用更好的抑制了 vMDV 在海兰褐雏鸡肝脏和脾脏中的复制。

3.4.5 羽毛囊病毒载量

在攻毒后 14d, 只使用疫苗的攻毒组 SC9-1 组的羽毛囊病毒载量极显著低于未使用 LNT 和疫苗的攻毒组 SDAU1501 组 ($P < 0.01$), 使用 LNT 和疫苗的攻毒组 LNT+SC9-1 组的羽毛囊病毒载量也极显著低于 SDAU1501 组 ($P < 0.001$), 且不难看出, LNT+SC9-1

组的羽毛囊病毒载量低于 SC9-1 组, 虽然统计学差异并不显著 ($P > 0.05$); 而在攻毒后 21d, SC9-1 组和 LNT+SC9-1 组的羽毛囊病毒载量均极显著低于 SDAU1501 组 ($P < 0.0001$) (图 12D)。表明免疫鸡马立克氏病基因缺失活疫苗 (SC9-1 株) 抑制了 vMDV 在海兰褐雏鸡羽毛囊中的复制和排毒, 而 LNT 与鸡马立克氏病 Meq 基因缺失活疫苗 (SC9-1 株) 联合使用更好的抑制了 vMDV 在海兰褐雏鸡羽毛囊中的复制和排毒。

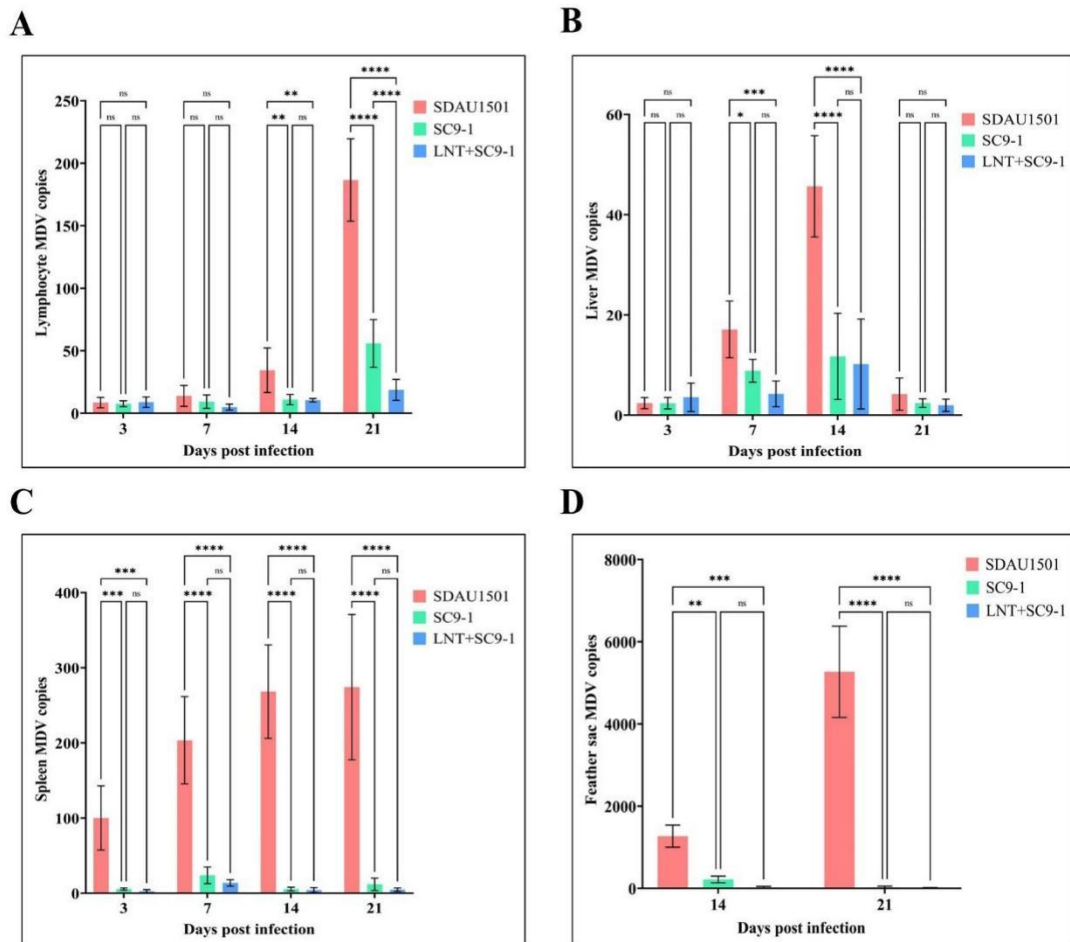


图 12 不同组淋巴细胞、肝脏、脾脏和羽毛囊组织的病毒载量

Fig. 12 The virus load of lymphocyte, liver, spleen and feather tissues in different groups

(A) 淋巴细胞 (B) 肝脏 (C) 脾脏 (D) 羽毛囊 (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$)

(A) Lymphocyte (B) Liver (C) Spleen (D) Feather (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$)

3.5 香菇多糖与疫苗联合使用对 vvMDV 感染的抑制作用

3.5.1 体重

在攻毒后 3、7、14、21d，未使用 LNT 和疫苗的攻毒组 Md5 组的体重是四组中最低的，其次是只使用疫苗的攻毒组 SC9-1 组。Md5 组的体重在攻毒后 3d 极显著低于 LNT+SC9-1 组 ($P < 0.0001$)，在攻毒后 7d 极显著低于 Negative control 组 ($P < 0.001$)，在攻毒后 14d 极显著低于 Negative control 组和 LNT+SC9-1 组 ($P < 0.0001$)，在攻毒后 21d 极显著低于 Negative control 组、SC9-1 组和 LNT+SC9-1 组 ($P < 0.0001$)。SC9-1 组的体重在攻毒后 14、21d 极显著低于 Negative control 组 ($P < 0.01$)，在攻毒后 3、21d 显著低于 LNT+SC9-1 组 ($P < 0.05$)。而使用 LNT 和疫苗的攻毒组 LNT+SC9-1 组的体重在攻毒后 3d 略高于 Negative control 组，在攻毒后 7、14、21d 与 Negative control 组相近，但均无统计学差异 ($P > 0.05$) (图 13)。表明 vvMDV 感染导致海兰褐雏鸡体重增重迟缓，免疫鸡马立克氏病基因缺失活疫苗 (SC9-1 株) 可以预防 vvMDV 感染导致的海兰褐雏鸡增重迟缓，而 LNT 与鸡马立克氏病基因缺失活疫苗 (SC9-1 株) 联合使用更好的减轻了 MDV 感染对海兰褐雏鸡生长的抑制作用。

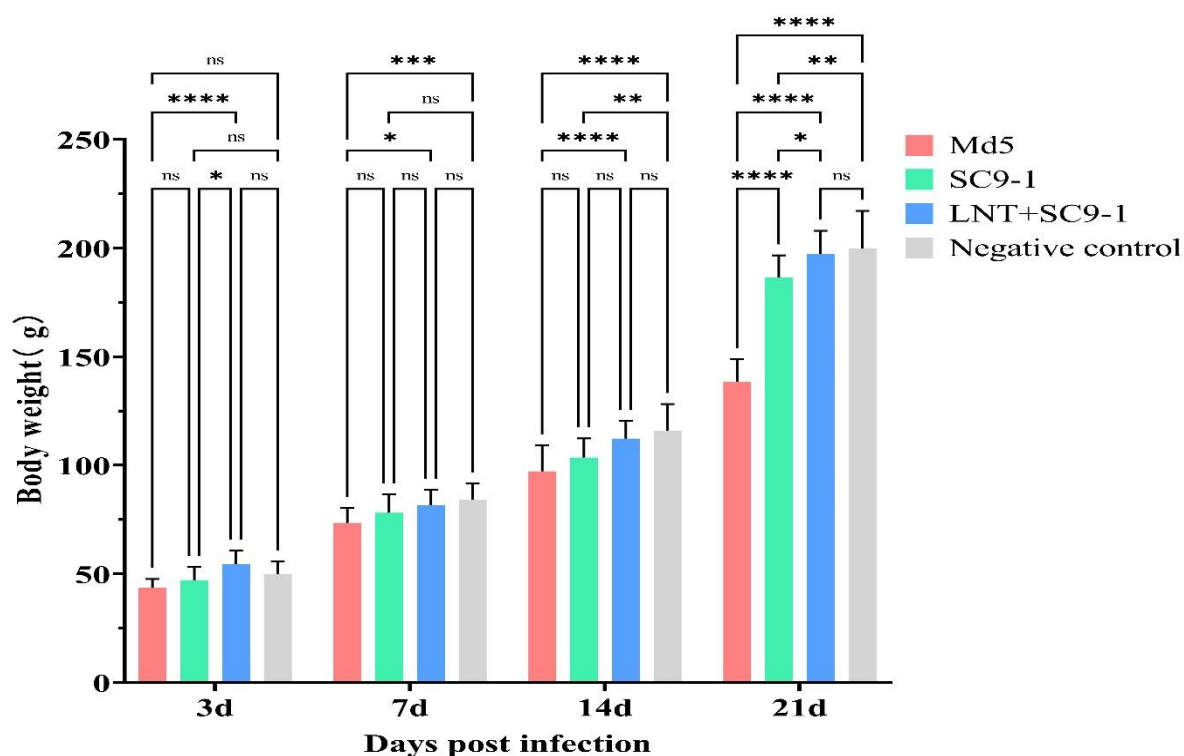


图 13 不同组的体重 (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ****: $P < 0.001$)

Fig. 13 Body weight of different groups (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ****: $P < 0.001$)

3.5.2 器官发育指数

在攻毒后 21d, 未使用 LNT 和疫苗的攻毒组 Md5 组的肝脏发育指数显著高于 Negative control 组 ($P < 0.05$), 而只使用疫苗的攻毒组 SC9-1 组、使用 LNT 和疫苗的攻毒组 LNT+SC9-1 组和 Negative control 组之间的肝脏发育指数无统计学差异 ($P > 0.05$), 但不难看出 SC9-1 组的肝脏发育指数高于 LNT+SC9-1 组和 Negative control 组, 而 LNT+SC9-1 组的肝脏发育指数与 Negative control 组几乎持平 (图 14 A)。另外, 尽管四组之间的脾脏发育指数、法氏囊发育指数和胸腺发育指数无显著的统计学差异 ($P > 0.05$), 但不难看出, Md5 组的脾脏发育指数最高, SC9-1 组的脾脏发育指数高于 LNT+SC9-1 组和 Negative control 组, 而 LNT+SC9-1 组的脾脏发育指数与 Negative control 组接近 (图 14 B, C, D)。表明 vvMDV 感染导致海兰褐雏鸡肝脏的肿大, 免疫鸡马立克氏病基因缺失活疫苗 (SC9-1 株) 缓解了 vvMDV 感染引起的海兰褐雏鸡肝脏的肿大, 而 LNT 与鸡马立克氏病基因缺失活疫苗 (SC9-1 株) 联合使用更好的缓解了 vvMDV 感染引起的海兰褐雏鸡肝脏的肿大。

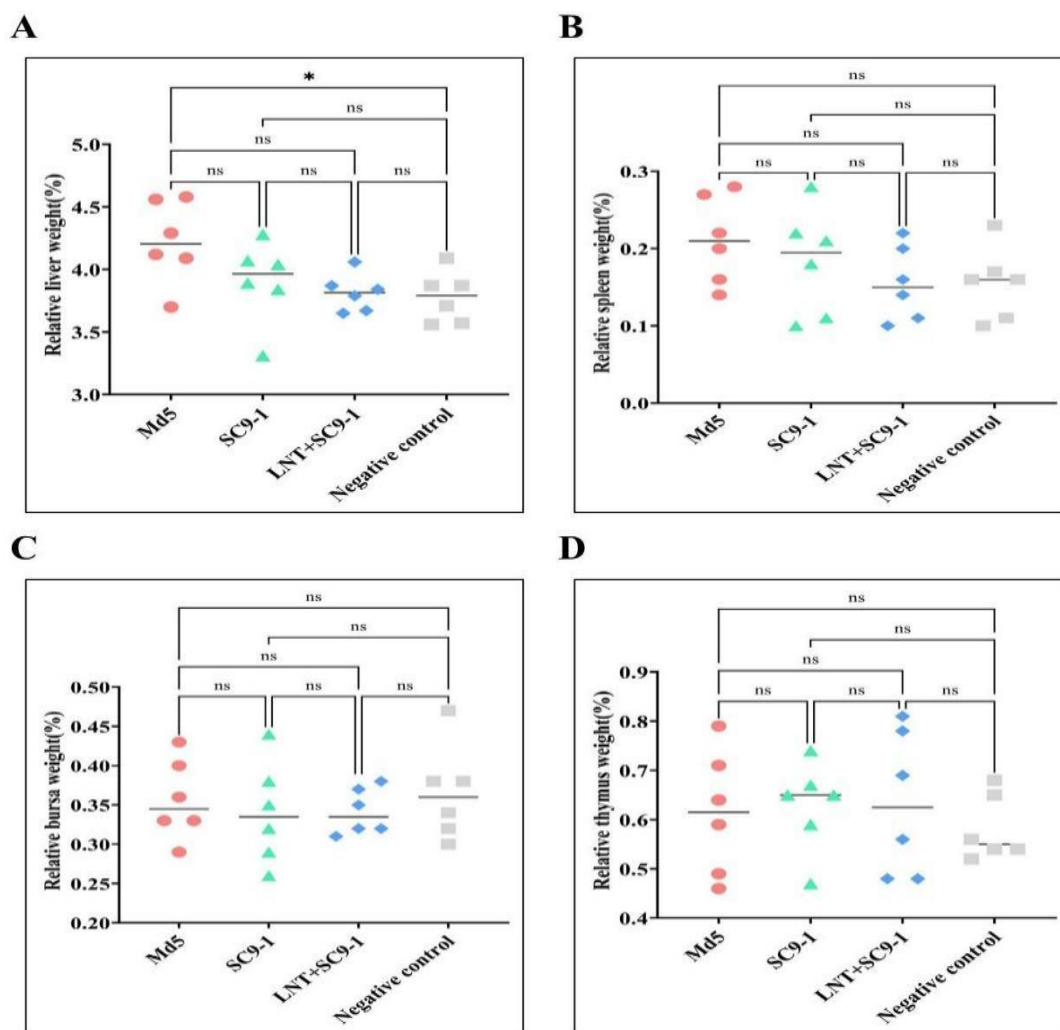


图 14 不同组的器官发育指数

Fig. 14 Organ indexes in different groups

 (A) 肝脏 (B) 脾脏 (C) 法氏囊 (D) 胸腺 (ns: $P > 0.05$)

 (A) Liver (B) Spleen (C) Bursa (D) Thymus (ns: $P > 0.05$)

3.5.3 外周淋巴细胞 MDV 病毒载量

在攻毒后 7、14、21d, 只使用疫苗的攻毒组 SC9-1 组和使用 LNT 和疫苗的攻毒组 LNT+SC9-1 组的外周淋巴细胞病毒载量均低于未使用 LNT 和疫苗的攻毒组 Md5 组, 且 LNT+SC9-1 组的外周淋巴细胞病毒载量均低于 SC9-1 组。SC9-1 组的外周淋巴细胞病毒载量在攻毒后 14、21d 极显著低于 Md5 组 ($P < 0.0001$)。LNT+SC9-1 组的外周淋巴细胞病毒载量在攻毒后 7d 显著低于 Md5 组 ($P < 0.05$), 在攻毒后 14、21d 极显著低于 Md5 组 ($P < 0.0001$), 且在攻毒后 14d 极显著低于 SC9-1 组 ($P < 0.0001$) (图 15 A)。表明免疫鸡马立克氏病基因缺失活疫苗 (SC9-1 株) 抑制了 vvMDV 在海兰褐雏鸡外周

淋巴细胞中的复制，而 LNT 与鸡马立克氏病基因缺失活疫苗（SC9-1 株）联合使用更好的抑制了 vvMDV 在海兰褐雏鸡外周淋巴细胞中的复制。

3.5.4 内脏器官中 MDV 病毒载量检测

在攻毒后 7、14、21d，只使用疫苗的攻毒组 SC9-1 组和使用 LNT 和疫苗的攻毒组 LNT+SC9-1 组的肝脏病毒载量均极显著低于未使用 LNT 和疫苗的攻毒组 Md5 组（ $P < 0.0001$ ），且 LNT+SC9-1 组的肝脏病毒载量均低于 SC9-1 组，并在攻毒后 21d 差异极显著（ $P < 0.0001$ ）（图 15 B）。在攻毒后 3、7、14、21d，SC9-1 组和 LNT+SC9-1 组的脾脏病毒载量均低于 Md5 组，并在攻毒后 7、14、21d 差异极显著（ $P < 0.0001$ ），且在攻毒后 7、14、21d，LNT+SC9-1 组的脾脏病毒载量均低于 SC9-1 组，并在攻毒后 14d 差异极显著（ $P < 0.001$ ）（图 15 C）。表明免疫鸡马立克氏病基因缺失活疫苗（SC9-1 株）抑制了 vvMDV 在海兰褐雏鸡肝脏和脾脏中的复制，而 LNT 与鸡马立克氏病基因缺失活疫苗（SC9-1 株）联合使用更好的抑制了 vvMDV 在海兰褐雏鸡肝脏和脾脏中的复制。

3.5.5 羽毛囊病毒载量

在攻毒后 14d，只使用疫苗的攻毒组 SC9-1 组和使用 LNT 和疫苗的攻毒组 LNT+SC9-1 组的羽毛囊病毒载量极显著低于未使用 LNT 和疫苗的攻毒组 Md5 组（ $P < 0.001$ ），而在攻毒后 21d，SC9-1 组和 LNT+SC9-1 组的羽毛囊病毒载量也极显著低于 Md5 组（ $P < 0.0001$ ）。且不难看出，在攻毒后 14、21d，LNT+SC9-1 组的羽毛囊病毒载量低于 SC9-1 组，虽然统计学差异并不显著（ $P > 0.05$ ）（图 15 D）。表明免疫鸡马立克氏病基因缺失活疫苗（SC9-1 株）抑制了 vvMDV 在海兰褐雏鸡羽毛囊中的复制和

排毒，而 LNT 与鸡马立克氏病基因缺失活疫苗（SC9-1 株）联合使用更好的抑制了 vvMDV 在海兰褐雏鸡羽毛囊中的复制和排毒。

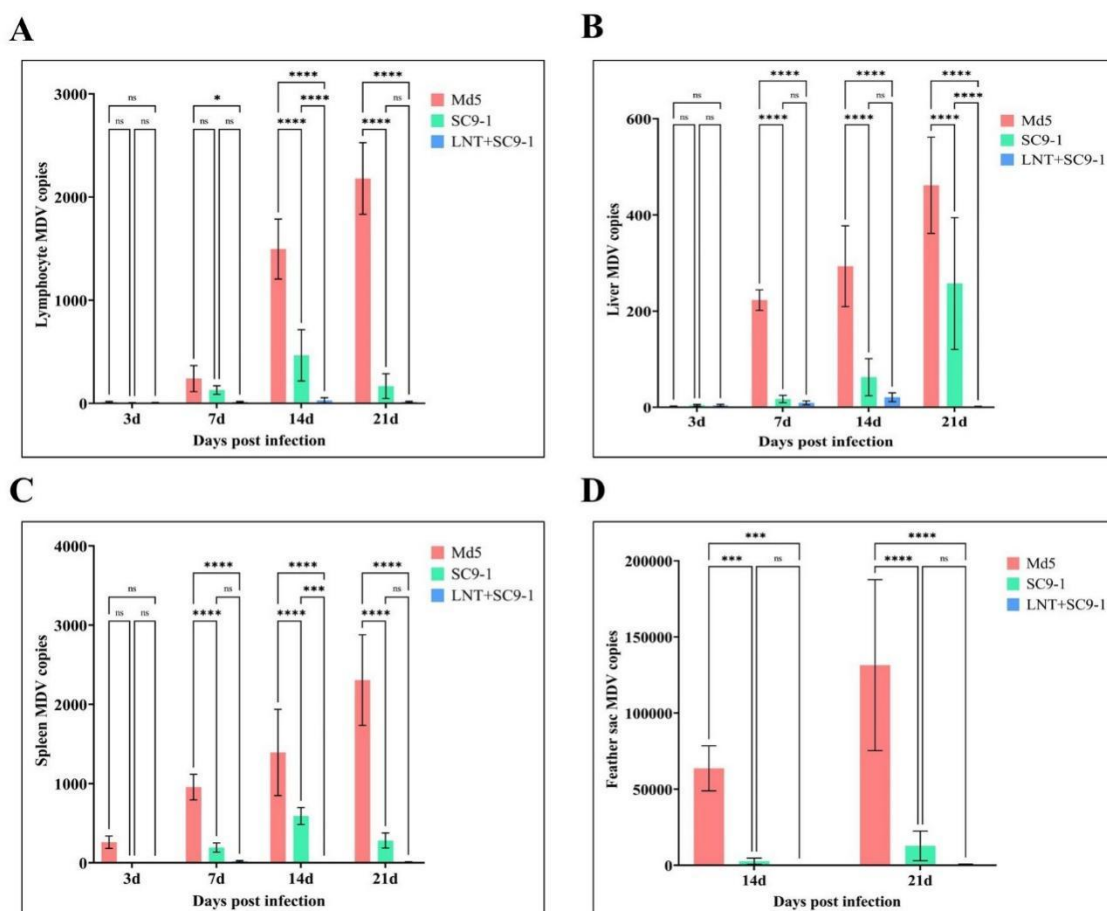


图 15 不同组淋巴细胞、肝脏、脾脏和羽毛囊组织的病毒载量

Fig. 15 The virus load of lymphocyte, liver, spleen and feather tissues in different groups

(A) 淋巴细胞 (B) 肝脏 (C) 脾脏 (D) 羽毛囊 (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.001$)

(A) Lymphocyte (B) Liver (C) Spleen (D) Feather (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.001$)

4 讨论

鸡马立克氏病是鸡群三种常见的病毒性肿瘤病之一，也是三种常见的病毒性肿瘤病中唯一可以通过疫苗免疫来防控的疾病。长期以来，MD 疫苗的使用降低了 MDV 发病的风险，减少了 MDV 感染所造成的鸡群死亡或生产性能下降等现象，缓解了 MDV 感染所引起的肿瘤发生和免疫抑制等危害。但随着疫苗使用时间的延长以及近年来中国 MDV 的流行呈现逐渐上升的趋势，一些免疫保护失败的案例也不断增多。尤其是在我国品种复杂的鸡群中，一些 MDV 野毒株突破现有疫苗保护的案例也开始不断出现，同时一些免疫抑制性病毒与 MDV 混合感染所引起 MD 疫苗免疫失败的案例也多有报道（Zhang *et al.*, 2015），因此很多养殖企业尝试探索其它辅助措施强化来对 MDV 的防控效果。其中 LNT 在控制 MDV 感染中的潜在价值已经被关注，LNT 在临床使用时缓解 MDV 感染的危害展示出良好的效果，但其发挥作用的主要途径尚不清楚。LNT 是从香菇中提取的天然多糖，为香菇的主要活性成分，具有显著的免疫调节、抑制肿瘤细胞增殖和抗氧化等生物学功能（Roszczyk *et al.*, 2022）。此前已有研究观察了 LNT 对肉鸡生产性能、肉品质和免疫功能的影响（雷莉辉等，2017；李伟等，2022），LNT 对 MD 强毒感染雏鸡巨噬细胞活性和白细胞介素-1 体外诱生活性的影响，以及 LNT 对 MD 强毒感染雏鸡 IL-2 活性和淋巴细胞增殖反应的影响（刘永杰等，1999；孟宪荣等，2002）。

4.1 香菇多糖对 SPF 雏鸡的免疫增强作用

基于以前的研究报道，我们首先在 LNT 对 SPF 雏鸡的免疫增强作用研究中观察了使用 LNT 后对 SPF 雏鸡育雏期间体重、多种细胞因子表达水平以及细胞免疫水平的影响。结果表明，使用 LNT 对 SPF 雏鸡育雏期间体重有促进作用，且与未使用 LNT 的 SPF 雏鸡差异显著。更重要的是，使用 LNT 后，SPF 雏鸡 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-18 等多种细胞因子以及 Mx 蛋白较未使用 LNT 的 SPF 雏鸡均有倍比上调，而这些细胞因子多数具有广谱的抗病毒活性。不仅是先天免疫方面，在细胞免疫方面，LNT 也具有有良好的激活作用。使用 LNT 后，SPF 雏鸡的 CD4+T 淋巴细胞比重以及 CD4+T 淋巴细胞比重与 CD8+T 淋巴细胞比重的比值较未使用 LNT 的 SPF 雏鸡显著上调，而 MDV 作为典型的细胞结合性病毒，细胞免疫在宿主抵抗 MDV 感染中也发挥了重要作用。因此我们推测使用 LNT 对 MDV 感染及其引起的免疫抑制具有缓解作用。

在 MDV 感染早期,淋巴器官中的病毒开始复制,此时抑制淋巴细胞复制的抑制性巨噬细胞出现并引起的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞功能的破坏 (Davidson *et al.*, 2020)。并且此时 I 类和 II 类主要组织相容性复合物抗原下调、B 淋巴细胞持续减少、外周 T 淋巴细胞中的 CD8⁺T 淋巴细胞表达减少、CD 4⁺T 淋巴细胞被诱导凋亡 (Lee *et al.*, 1978; Schat *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2013)。在接种 MDV 疫苗后,活化的自然杀伤(NK)细胞诱导受感染的 B 细胞凋亡和 IFN- γ 的产生,IFN- γ 进而活化巨噬细胞,使其产生对 MDV 复制具有直接抑制作用的一氧化氮(NO) (Schat *et al.*, 2000; Heidari *et al.*, 2023)。有研究表明,鸡体内一氧化氮合成酶(iNOS)的抑制导致病毒载量的增加,表明 NO 在控制 MDV 复制中起到关键作用 (Xing *et al.*, 2000b; Djeraba *et al.*, 2002),因此 NO 对病毒复制的抑制作用可能是巨噬细胞对抗疱疹病毒感染的主要机制之一 (Vilcek *et al.*, 1994)。LNT 对不同亚群的淋巴细胞均具有免疫增强效应。在细胞免疫方面,LNT 可以调节巨噬细胞、中性粒细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞以及 NK 细胞的功能 (Finimundy *et al.*, 2014),并且 LNT 可以刺激脾脏淋巴细胞增殖并促进 IL-2 和 NO 的生成 (Chen *et al.*, 2003)。因此促进免疫细胞 NO 的生成可能是 LNT 的主要免疫作用机理之一。在应对 MDV 感染方面,有研究表明 IFN- γ 可以抑制 MDV 在体内的复制和肿瘤发生 (Bertzbach *et al.*, 2019)。另有研究证实 LNT 可以通过增加 IFN γ 的产生抑制肿瘤血管生成,该作用的产生并不需要 T 淋巴细胞的参与 (Deng *et al.*, 2018)。此外,上调最为显著的 Mx 蛋白也可能发挥重要作用。Mx 蛋白是 I 型和 III 型干扰素 (IFN) 诱导的细胞自身天然抗病毒抗性的关键效应分子,它们作用于病毒进入细胞后不久、病毒基因组复制之前,抑制病毒复制周期的早期阶段,具有广泛的抗病毒活性 (MacMicking *et al.*, 2004; Haller *et al.*, 2007),SPF 雏鸡在使用 LNT 后其 Mx 蛋白上调了高达 4.056 倍,无疑对多种病毒的感染具有可能的抑制作用。

4.2 香菇多糖预防性使用对缓解 MDV 感染的作用

LNT 对 MDV 感染及其引起的免疫抑制的缓解作用在预防性使用 LNT 对 MDV 感染的作用研究中得到了证实。在攻毒后 3、7、21、35d, LNT+MDV 组的外周淋巴细胞中的 MDV 病毒载量显著低于 MDV 组。在攻毒后 21、35d, LNT+MDV 组的肝脏和脾脏中的 MDV 病毒载量显著低于 MDV 组。说明,预防性使用 LNT 可以抑制 MDV 在 SPF 雏鸡外周淋巴细胞、肝脏和脾脏中的复制。在攻毒后 35d, MDV 组的体重显著低于 Negative control 组,而 LNT+MDV 组 SPF 雏鸡的体重和 Negative control 组无显著差异。

说明, MDV 的复制被抑制后, 其对 SPF 雏鸡体重增长的抑制得到了有效缓解, 而预防性使用 LNT 可以缓解 MDV 感染对 SPF 雏鸡体重增长的抑制作用。在攻毒后 7、21、35d, MDV 组 SPF 雏鸡的肝脏和脾脏相比于 Negative control 组显著肿大, 而 LNT+MDV 组 SPF 雏鸡的肝脏和 Negative control 组无显著差异; 在攻毒后 35d, LNT+MDV 组 SPF 雏鸡的脾脏和 Negative control 组无显著差异。说明 MDV 的复制被抑制后, 其对 SPF 雏鸡免疫器官的损伤得到了有效缓解, 而预防性使用 LNT 可以缓解 MDV 感染对 SPF 雏鸡肝脏和脾脏的损伤。

4.3 香菇多糖治疗性使用对缓解 MDV 感染的作用

在预防性使用 LNT 对 MDV 感染的作用研究结果的基础上, 开展治疗性使用 LNT 对 MDV 感染的作用研究, 探究当 MDV 感染后, LNT 作为治疗性药物使用时对 MDV 在 SPF 雏鸡体内复制以及引发 SPF 雏鸡免疫抑制的缓解作用。在攻毒后各日龄, 外周淋巴细胞 MDV 病毒载量呈 MDV 组 > Low-dose LNT 组 > High-dose LNT 组的趋势。说明, 治疗性使用两种剂量的 LNT 均可以抑制 MDV 在 SPF 雏鸡外周淋巴细胞中的复制, 并且 LNT 对 MDV 在 SPF 雏鸡外周淋巴细胞中的复制的抑制作用与剂量呈正相关。生产性能的损伤是免疫抑制病毒发挥免疫抑制作用最直观的影响。在攻毒后 42d, MDV 组的体重显著低于 Negative control 组, 体现出对 MDV 感染后对 SPF 雏鸡体重增长的显著抑制作用, 而 Low-dose LNT 组、High-dose LNT 组和 Negative control 组的体重无显著差异。说明, 治疗性使用两种剂量的 LNT 均可以缓解 MDV 感染对 SPF 雏鸡体重增长的抑制作用。MDV 感染诱导的免疫抑制作用多与其对免疫器官的损伤有关, 在攻毒后各日龄, MDV 组的肝脏和脾脏相比于 Negative control 组显著肿大。而在攻毒后 42d, Low-dose LNT 组、High-dose LNT 组和 Negative control 组的肝脏无显著差异。在攻毒后 7、14、28、42d, Low-dose LNT 组、High-dose LNT 组和 Negative control 组的脾脏无显著差异。说明, 治疗性使用两种剂量的 LNT 均可以缓解 MDV 感染对肝脏和脾脏的损伤。由免疫抑制病毒感染引起 SPF 雏鸡对疫苗的免疫应答能力下降是其隐形的危害之一, 在免疫 AIV-H9 灭活疫苗后 21、35d, MDV 组的 AIV-H9 抗体 HI 滴度相比于 Negative control 组下降了约 $3\log_2$; 而在免疫 AIV-H9 灭活疫苗后 21d, Low-dose LNT 组、High-dose LNT 组和 Negative control 组的 AIV-H9 抗体 HI 滴度几乎持平; 在免疫 AIV-H9 灭活疫苗后 35d, Low-dose LNT 组的 AIV-H9 抗体 HI 滴度显著低于 Negative control 组, High-dose LNT 组和 Negative control 组的 AIV-H9 抗体 HI 滴度几乎持平。说明, 治疗性使用两种

剂量的 LNT 均可以缓解 MDV 感染引起的 SPF 雏鸡对疫苗的免疫应答能力下降,这对于确保各种疫苗的免疫效果非常重要,并且 LNT 对 MDV 感染引起的 SPF 雏鸡对疫苗的免疫应答能力下降的缓解作用与剂量呈正相关。

4.4 香菇多糖对马立克氏病疫苗的免疫增强作用

疫苗免疫虽然可以有效降低 MDV 感染所引起的肿瘤发生,但不能阻止 MDV 野毒株的感染、带毒以及引起免疫抑制。对此,进行了 LNT 与疫苗联合使用对 vMDV 感染的作用研究和 LNT 与疫苗联合使用对 vvMDV 感染的作用研究,探究在疫苗免疫的基础上增加辅助措施,以提高疫苗的免疫保护效果,尽可能抑制不同毒力的 MDV 毒株在体内的长期增殖并控制不同毒力的 MDV 毒株感染所引起的危害。在 LNT 与疫苗联合使用对 vMDV 感染的作用研究中,在攻毒后各日龄,海兰褐雏鸡外周淋巴细胞、肝脏和脾脏中的 vMDV 病毒载量并不高,但依然可以体现 vMDV 病毒载量为 SDAU1501 组 > SC9-1 组 > LNT+SC9-1 组的趋势,并在多数日龄差异显著。说明,疫苗单独使用和 LNT 与疫苗联合使用均可以抑制 vMDV 在海兰褐雏鸡外周淋巴细胞、肝脏和脾脏中的复制,并且 LNT 与疫苗联合使用对 vMDV 复制的抑制作用更好。在攻毒后 14、21d,SDAU1501 组的羽毛囊 MDV 病毒载量极显著高于 SC9-1 组和 LNT+SC9-1 组。说明,疫苗单独使用和 LNT 与疫苗联合使用均可以抑制 vMDV 在海兰褐雏鸡羽毛囊中的排毒。在攻毒后 3d, SC9-1 组的体重显著低于 LNT+SC9-1 组;在攻毒后 3、7、14、21d,SDAU 1501 组的体重显著低于 LNT+SC9-1 组;在攻毒后 21d,SDAU 1501 组的体重极显著低于 Negative control 组,而 SC9-1 组、LNT+SC9-1 组和 Negative control 组的体重无显著差异。说明,疫苗单独使用和 LNT 与疫苗联合使用对 vMDV 感染引起的海兰褐雏鸡体重下降均有缓解作用,并且无论是在 vMDV 感染初期,还是在整个较长的感染过程中,LNT 与疫苗联合使用对缓解 vMDV 感染对海兰褐雏鸡体重增长的抑制作用优于疫苗单独使用。在攻毒后 21d,SDAU1501 组、SC9-1 组、LNT+SC9-1 组和 Negative control 组的肝脏、脾脏、法氏囊和胸腺的器官发育指数无显著差异。这可能与海兰褐雏鸡自身较高的抵抗力和先天免疫水平有关。

在 LNT 与疫苗联合使用对 vvMDV 感染的作用研究中,在攻毒后 3d,LNT+SC9-1 组的体重显著高于 Md5 组和 SC9-1 组。在攻毒后 7、14、21d,各组之间的体重呈 Md5 组 < SC9-1 组 < LNT+SC9-1 组 < Negative control 组的趋势。并且在攻毒后各日龄,

LNT+SC9-1 组和 Negative control 组的体重无显著差异。说明, 疫苗单独使用和 LNT 与疫苗联合使用对 vvMDV 感染引起的海兰褐雏鸡体重下降均有缓解作用, 但无论是在 vvMDV 感染初期, 还是在整个较长的感染过程中, LNT 与疫苗联合使用对缓解 vvMDV 感染对 SPF 雏鸡体重增长的抑制作用优于疫苗单独使用。在攻毒后 21d, Md5 组的肝脏相比于 Negative control 组显著肿大, 而 SC9-1 组、LNT+SC9-1 组和 Negative control 组的肝脏显著差异。说明, 疫苗单独使用和 LNT 与疫苗联合使用均可以缓解 vvMDV 感染对肝脏的损伤。在攻毒后 7、14、21d, 海兰褐雏鸡外周淋巴细胞、肝脏和脾脏中的 vvMDV 病毒载量呈 Md5 组 > SC9-1 组 > LNT+SC9-1 组的趋势, 并在多数日龄有显著或极显著的差异。说明, 疫苗单独使用和 LNT 与疫苗联合使用均可以抑制 vvMDV 在 SPF 雏鸡外周淋巴细胞、肝脏和脾脏中的复制, 但 LNT 与疫苗联合使用对 vvMDV 复制的抑制作用更好。在攻毒后 14、21d, Md5 组的羽毛囊 vvMDV 病毒载量极显著低于 SC9-1 组和 LNT+SC9-1 组, 而 LNT+SC9-1 组的羽毛囊 vvMDV 病毒载量低于 SC9-1 组。说明, 疫苗单独使用和 LNT 与疫苗联合使用均可以抑制 vvMDV 在海兰褐雏鸡羽毛囊中的排毒, 但 LNT 与疫苗联合使用对 vvMDV 排毒的抑制作用更好。

另外, 在 LNT 与疫苗联合使用对 vMDV 感染的作用研究中, 在攻毒后 3d, LNT+SC9-1 组的体重显著高于 SC9-1 组。在 LNT 与疫苗联合使用对 vvMDV 感染的作用研究中, 在攻毒后 3d, LNT+SC9-1 组的体重显著高于 SC9-1 组。对此推测在疫苗免疫或者攻毒时海兰褐雏鸡可能产生应激, 而使用 LNT 可能缓解海兰褐雏鸡的应激, 促进海兰褐雏鸡的生长发育。

4.5 香菇多糖的免疫增强作用以及不同方式应用时对缓解 MDV 感染的作用分析

在 LNT 对 SPF 雏鸡的免疫增强作用研究中, 验证了 LNT 对 SPF 雏鸡生长发育的促进的作用, 对 SPF 雏鸡先天免疫水平的提高作用和对 SPF 雏鸡细胞免疫水平的激活作用。在预防性使用 LNT 对 MDV 感染的作用研究中, 验证了预防性使用 LNT 对 SPF 雏鸡感染 MDV 后外周淋巴细胞、肝脏和脾脏中病毒复制的抑制作用, 对 SPF 雏鸡感染 MDV 后生长发育抑制的缓解作用和对 SPF 雏鸡感染 MDV 后肝脏和脾脏损伤的缓解作用。在治疗性使用 LNT 对 MDV 感染的作用研究中, 验证了治疗性使用 LNT 对 SPF 雏鸡感染 MDV 后外周淋巴细胞中病毒复制的抑制作用, 对 SPF 雏鸡感染 MDV 后生长发

育抑制的缓解作用和对 SPF 雏鸡感染 MDV 后肝脏和脾脏损伤的缓解作用。其中预防性使用 LNT 对 MDV 感染的作用研究和治疗性使用 LNT 对 MDV 感染的作用研究验证了无论是预防性还是治疗性使用 LNT, 均可有效缓解 MDV 在 SPF 雏鸡体内的感染并缓解 MDV 感染引起的 SPF 雏鸡免疫抑制, 以及高剂量的 LNT 对 MDV 感染及其引起的免疫抑制的治疗效果更优。在 LNT 与疫苗联合使用对 vMDV 感染的作用研究和 LNT 与疫苗联合使用对 vvMDV 感染的作用研究中, 验证了鸡马立克氏病基因缺失活疫苗 (SC9-1 株) 单独使用和 LNT 与鸡马立克氏病基因缺失活疫苗 (SC9-1 株) 联合使用对海兰褐雏鸡感染 vMDV 和 vvMDV 后外周淋巴细胞、肝脏和脾脏中病毒复制的抑制作用, 对海兰褐雏鸡感染 vMDV 和 vvMDV 后羽毛囊排毒的抑制作用, 对海兰褐雏鸡感染 vMDV 和 vvMDV 后生长发育抑制的缓解作用和对海兰褐雏鸡感染 vMDV 和 vvMDV 后肝脏和脾脏损伤的缓解作用, 这有助于疫苗在 LNT 的协助下提高对 MDV 野毒株抑制的能力, 降低 MDV 高水平复制以及持续带毒的风险。

5 结论

5.1 香菇多糖可以促进 SPF 雏鸡育雏期的生长发育，并提高 SPF 雏鸡的先天免疫水平和细胞免疫水平。

5.2 香菇多糖预防性使用及治疗性使用均可以缓解 MDV 感染及其引起的免疫抑制。

5.3 香菇多糖可以提高鸡马立克氏病基因缺失活疫苗（SC9-1 株）的免疫效果，更好的防控不同毒力的 MDV 感染及其引起的免疫抑制。

6 参考文献

- 蔡文博, 韩凌霞. Th1、Th2 型细胞因子在鸡马立克氏病中的研究进展. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(07): 820-822.
- 褚秀玲, 苏建青, 付本懂, 王鲁, 王春元, 申海青, 韦旭斌. 鸡马立克病研究进展. 动物医学进展, 2009, 30(01):80-84.
- 崔治中, 苏帅, 罗俊, 钱琨, 庄国庆, 孙爱军, 滕蔓. 鸡马立克病毒的研究进展. 微生物学通报, 2019, 46(07):1812-1826.
- 段伦涛, 苏帅, 王一新, 李思菲, 孙鹏, 陈文青, 崔治中. 敲除 Meq 基因的重组鸡马立克氏病毒与 CVI988/Rispens 疫苗株免疫保护效力的比较. 微生物学报, 2014, 54(11):1353-1361.
- 冯元璋, 周碧君, 古飞霞. 鸡马立克氏病的流行特点与防制对策. 中国家禽, 2006, (23):43-45.
- 葛成菲, 陆杭琼, 刘长军. 鸡马立克病病毒的进化及疫苗研究进展. 中国科学:生命科学, 2023, 53(12):1722-1732.
- 龚乐乐, 秦静霖, 林树乾, 贺秀媛, 庄国庆, 孙爱军. 板蓝根多糖对马立克病病毒在鸡胚成纤维细胞中复制的影响.中国兽医学报, 2023, 43(06):1167-1174.
- 郝艳红, 李庆章. 黄芪多糖和香菇多糖对 vMDV 所致雏鸡自由基损伤的保护作用研究. 中国预防兽医学报, 1999, (06):471-473.
- 冀君, 许鑫, 唐青海, 邱初, 唐存多, 阚云超, 姚伦广. 鸡 Mx 蛋白抗病毒作用研究进展. 动物医学进展, 2014, 35(11):79-83.
- 雷莉辉, 孙健, 艾君涛, 乔立东. 香菇多糖对肉仔鸡生产性能和部分免疫指标的影响. 黑龙江畜牧兽医, 2017, (14):164-166.
- 李红卫, 周国燕, 郭慧青, 胡琦玮. 从香菇中浸提香菇多糖的方法对比研究. 食品科学, 2008, 29(11):173-175.
- 李伟, 艾勇波. 饲料添加香菇多糖对肉鸡生产性能、肉品质和免疫功能的影响. 中国饲料, 2022, (10):40-43.

- 连希希, 孙佳宁, 孙伶俐, 刘佳, 王联芝, 段正超. 香菇多糖的研究进展. 化学与生物工程, 2022, 39(02):1-5.
- 刘永杰, 李庆章, 郝艳红. 香菇多糖和黄芪多糖对马立克氏病强毒感染雏鸡白细胞介素 2 活性和淋巴细胞增殖反应的影响. 中国兽医杂志, 1999, (07):3-5.
- 刘蔓蔓, 温贵兰, 李涛, 李波, 田兴舟, 胡璇, 孙芸, 罗东还, 赵静, 徐飞. 马立克氏病病毒 SYBR GreenI 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用. 中国兽医科学, 2023, 53(02):170-175.
- 孙进华, 徐良梅, 李建平, 单安山. 鸡 γ -干扰素的功能及临床应用. 中国家禽, 2009, 31(9):38-42.
- 孙业平, 高福. 天然免疫抗病毒效应分子 Mx 蛋白的结构与功能研究进展. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(07):699-706.
- 孙百明. 马立克氏病的免疫及疫苗研究进展. 中国预防兽医学报, 2011, 33(12):988-991.
- 孟宪荣, 李庆章, 曲琪环, 高文学, 刘玉芬. 黄芪多糖和香菇多糖对马立克氏病强毒感染雏鸡巨噬细胞活性和白细胞介素-1 体外诱生活性的影响. 中国兽医杂志, 2002, (07):33-34.
- 农可懿, 房鑫, 刘又铭, 张海文. 植物源多糖替代畜禽抗生素的研究进展. 饲料研究, 2021, 44(21):124-127.
- 师调调, 陈家雪, 陈俊良, 龚美玲, 刘美兰, 吴思宸, 宋照风, 赵海全. 白术多糖对南海麻黄鸡马立克氏病疫苗免疫的影响. 黑龙江畜牧兽医, 2022, (20):121-128+145-146.
- 王黎霞, 王彩霞, 张建军, 阮文科, 徐赓, 安健. 鸡肿瘤坏死因子- α 原核表达及生物活性鉴定. 中国兽医杂志, 2011, 47(11):6-9.
- 薛如玉. 鸡马立克氏病 SC9-1 与 CVI988 疫苗对野毒复制、排毒及其 Meq 蛋白表达的影响. 泰安: 山东农业大学, 2023.
- 闫若潜, 吴文学, 夏春, 李新生. Mx 蛋白研究进展. 动物医学进展, 2004, 25(6):52-55.
- 颜文光, 屠颀, 刘云迎, 刘有昌, 何叶峰, 刘长清, 周煜, 崔治中, 何海蓉. 鸡马立克氏病 meq 基因缺失疫苗(SC9-1 株)的临床应用效果比较研究. 中国家禽, 2018, 40(08):13-18.

- 杨德康, 丁维民. 内脏型鸡马立克氏病的诊治. 中国家禽, 2009, 31(16):52-53.
- 周林宜, 张艳萍, 孙国荣, 张峰, 于正浩, 高玉龙, 祁小乐, 李凯, 王笑梅, 刘长军. 鸡马立克氏病病毒感染对鸡神经系统损伤的研究. 中国预防兽医学报, 2019, 41(02):113-117.
- Abdul-Careem M. F., Hunter B. D., Sarson A. J., Mayameei A., Zhou H., and Sharif S.. Marek's disease virus-induced transient paralysis is associated with cytokine gene expression in the nervous system. *Viral immunology*, 2006, 19(2):167-176.
- Abdul-Careem M. F., Hunter B. D., Parvizi P., Haghighi H. R., Thanthrige-Don N., and Sharif S.. Cytokine gene expression patterns associated with immunization against Marek's disease in chickens. *Vaccine*, 2007, 25:424-432.
- Abdul-Careem M. F., Hunter B. D., Lee L. F., Fairbrother J. H., Haghighi H. R., Read L., Parvizi P., Heidari M., and Sharif S.. Host responses in the bursa of Fabricius of chickens infected with virulent Marek's disease virus. *Virology*, 2008, 379:256-265.
- Abdul-Careem M. F., Haq K., Shanmuganathan S., Read L. R., Schat K. A., Heidari M., and Sharif S.. Induction of innate host responses in the lungs of chickens following infection with a very virulent strain of Marek's disease virus. *Virology*, 2009, 393:250-257.
- Afonso C. L., Tulman E. R., Lu Z., Zsak L., Rock D. L., and Kutish G. F.. The genome of turkey herpesvirus. *J Virol*, 2001, 75:971-978.
- Akbari M. R., Haghighi H. R., Chambers J. R., Brisbin J., Read L. R., and Sharif S.. Expression of antimicrobial peptides in cecal tonsils of chickens treated with probiotics and infected with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15:1689-1693.
- Arinaga S., Karimine N., Takamuku K., Nanbara S., Nagamatsu M., Ueo H., and Akiyoshi T.. Enhanced production of interleukin 1 and tumor necrosis factor by peripheral monocytes after lentinan administration in patients with gastric carcinoma. *Int J Immunopharmacol*, 1992, 14(1):43-47.
- Baaten B. J., Staines K. A., Smith L. P., Skinner H., Davison T. F., and Butter C.. Early replication in pulmonary B cells after infection with Marek's disease herpesvirus by the respiratory route. *Viral Immunol*, 2009, 22:431-444.

- Baigent S. J., Petherbridge L. J., Howes K., Smith L. P., Currie R. J., and Nair V. K.. Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR. *J Virol Methods*, 2005, 123:53-64
- Barrow A. D., Burgess S. C., Baigent S. J., Howes K., and Nair V. K.. Infection of macrophages by a lymphotropic herpesvirus: a new tropism for Marek's disease virus. *J Gen Virol*, 2003a, 84(10):2635-2645.
- Barrow A. D., Burgess S. C., Howes K., and Nair V.K.. Monocytosis is associated with the onset of leukocyte and viral infiltration of the brain in chickens infected with the very virulent Marek's disease virus strain C12/130. *Avian Pathol*, 2003b, 32(2):183-91.
- Bertzbach, L. D., Harlin O., Härtle S., Fehler F., Vychodil T., Kaufer B. B., and Kaspers B.. IFN α and IFN γ Impede Marek's Disease Progression. *Viruses*. 2019, 11:1103.
- Biggs P M.. The history and biology of Marek's disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 255:1-24
- Bisen P. S., Baghel R. K., Sanodiya B. S., Thakur G. S., Prasad G. B.. *Lentinus edodes*: a macrofungus with pharmacological activities. *Curr Med Chem*, 2010, 17(22):2419-2430.
- Bogdan C.. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, 2001, 2(10):907-916.
- Boodhoo N., Gurung A., Sharif S., and Behboudi S.. Marek's disease in chickens: a review with focus on immunology. *Vet Res*, 2016, 47(1):119.
- Bullock V. V.. Further characterization of the CVI988 strain of Marek's disease virus. *Avian Pathol*, 1977, 6:395-403.
- Calnek B. W.. Marek's disease vaccines. *Developments in Biological Standardization*, 1982, 52:401-405.
- Calnek B. W.. Marek's disease—a model for herpesvirus oncology. *Crit Rev Microbiol*, 1986, 12:293-320.
- Calnek, B. W., Harris R. W., Buscaglia C., Schat K. A., and Lucio B.. Relationship between the immunosuppressive potential and the pathotype of Marek's disease virus isolates. *Avian Dis*, 1998, 42:124-132.
- Calnek, B.W. Pathogenesis of Marek's disease virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 255:25-55.

- Charleston B., and Stewart H. J.. An interferon-induced Mx protein: cDNA sequence and high-level expression in the endometrium of pregnant sheep. *Gene*, 1993, 137(2):327-331.
- Chen, H. L., Li D. F., Chang B. Y., Gong L. M., Piao X. S., Yi G. F., and Zhang J. X.. Effects of lentinan on broiler splenocyte proliferation, interleukin-2 production, and signal transduction. *Poult Sci*, 2003, 82:760-766.
- Chen K. L., Weng B. C., Chang M. T., Liao Y. H., Chen T. T., and Chu C.. Direct enhancement of the phagocytic and bactericidal capability of abdominal macrophage of chicks by beta-1,3-1,6-glucan. *Poult Sci*, 2008, 87:2242-2249.
- Chen X., and Velicer L. F.. Expression of the Marek's disease virus homolog of herpes simplex virus glycoprotein B in Escherichia coli and its identification as B antigen. *Journal of Virology*, 1992, 66:4390-4398.
- Chen, X. F., Qi, T., Zhang, Y., Wang, T., and Fan, Y. Q.. Facile pore size tuning and characterization of nanoporous ceramic membranes for the purification of polysaccharide. *Journal of Membrane Science*, 2019, 597:117631.
- Chihara G., Maeda Y., Hamuro J., Sasaki T., Fukuoka F.. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature*, 1969, 222(5194):687-688.
- Churchill A. E., Biggs P. M.. Agent of Marek's disease in tissue culture. *Nature*, 1967, 215:528-530.
- Churchill A. E., Chubb R. C., and Baxendale W.. The attenuation, with loss of oncogenicity, of the herpes-type virus of Marek's disease (strain HPRS-16) on passage in cell culture. *J Gen Virol*, 1969, 4:557-564.
- Davison A. J. Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol*, 2010, 143:52-69.
- Davison F and Kaiser P. Immunity to Marek's disease. In: Davison F and Nair V (eds) *Marek's Disease: An Evolving Problem*, 1st ed. London: Elsevier, 2004, p.126-139.
- Davison F., and Nair V.. Use of Marek's disease vaccines: Could they be driving the virus to increasing virulence? *Expert Rev Vaccines*, 2005, 4(1):77-88.
- Davidson I.. Out of Sight, but Not Out of Mind: Aspects of the Avian Oncogenic Herpesvirus, Marek's Disease Virus. *Animals (Basel)*, 2020, 10:1319.

- Deng, S. M., Zhang G. X., Kuai J. J., Fan P., Wang X. X., Zhou P., Yang D., Zheng X. C., Liu X. M., Wu Q. L., and Huang Y. H.. Lentinan inhibits tumor angiogenesis via interferon γ and in a T cell independent manner. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37:260.
- Djeraba, A., Musset E., Bernardet N., Vern Y. Le, and QuéréP.. Similar pattern of iNOS expression, NO production and cytokine response in genetic and vaccination-acquired resistance to Marek's disease. *Vet Immunol Immunopathol*, 2002, 85:63-75.
- Finimundy, T. C., Aldo José Pinheiro Dillon, Joo Antnio Pêgas Henriques, and Ely, M. R.. A review of general nutritional compounds and pharmacological properties of the lenticular edodes mushroom. *Food and Nutrition Sciences*, 2014, 5(12):1095-1105.
- Fukuchi M., Mochiki E., Ishiguro T., Tsuji Y., Suzuki O., Sobajima J., Baba H., Kumagai Y., Ishibashi K., and Ishida H.. Evaluation of immunity in elderly patients with unresectable gastric cancer receiving S-1/lentinan combination chemotherapy. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2014, 41(10):1264-1266.
- Gimeno I. M., Witter R. L., Reed W. M.. Four distinct neurologic syndromes in Marek's disease: effect of viral strain and pathotype. *Avian Dis*, 1999, 43:721-737
- Haller, O., P. Staeheli, and G. Kochs.. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie*, 2007, 89:812-818.
- Hamuro J., Röllinghoff M., and Wagner H.. Induction of cytotoxic peritoneal exudate cells by T-cell immune adjuvants of the beta(1 leads to 3) glucan-type lentinan and its analogues. *Immunology*, 1980, 39(4):551-559.
- Hamano K., Gohra H., Katoh T., Fujimura Y., Zempo N., and Esato K.. The preoperative administration of lentinan ameliorated the impairment of natural killer activity after cardiopulmonary bypass. *Int J Immunopharmacol*. 1999, 21(8):531-40.
- Haq K., Schat K. A., and Sharif S.. Immunity to Marek's disease: where are we now? *Dev Comp Immunol*, 2013, 41(3):439-446.
- Havell E. A., Fiers W., and North R. J., The antitumor function oftumor necrosis factor (TNF), I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent and limited by severe toxicity. *Exp Med*, 1988, 167(3):1067-1085.
- Hazime S., Ohki T., and Sasaki T. A ^{13}C -nuclear magnetic resonance study of polysaccharide gels. Molecular architecture in the gels consisting of fungal, branched

- (1→3)-β-D-glucans(lentinan and schizo-phyllan)as manifested by conformational changes in-duced by sodium hydroxide. *Carbohydrate Re-search*, 1979, 74(1):227-240.
- Heidari, M., Zhang H., Sunkara L. T., and Ahmad S. M.. Role of T Cells in Vaccine-Mediated Immunity against Marek's Disease. *Viruses*, 2023, 15:648.
- Huang X.Q., Tu Z. C., Jiang Y., Xiao H., Zhang Q. T., and Wang H. Dynamic high pressure microfluidization-assisted extraction and antioxidant activities of lentinan. *Int J Biol Macromol*, 2012, 51(5):926-32.
- Izumiya Y., Jang H. K., Ono M., and Mikami T.. A complete genomic DNA sequence of Marek's disease virus type 2, strain HPRS24. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 255:191-221.
- Jarosinski K. W., Yunis R., O'Connell P. H., Markowski-Grimsrud C. J., and Schat K. A.. Influence of genetic resistance of the chicken and virulence of Marek's disease virus (MDV) on nitric oxide responses after MDV infection. *Avian Diseases*, 2002, 46:636-649.
- Jarosinski K. W., Njaa B. L., O'connell, P. H., and Schat, K. A.. Pro-inflammatory responses in chicken spleen and brain tissues after infection with very virulent plus Marek's disease virus. *Viral immunology*, 2005, 18(1):148-161.
- Kaiser P., Underwood G., and Davison F.. Differential cytokine responses following Marek's disease virus infection of chickens differing in resistance to Marek's disease. *J Virol*, 2003, 77(1):762-768.
- Kindt T. J, Goldsby R. A and Osborne B. A.. Cells and organs of the immune system. In *Immunology*, 6th ed. W.H. Freeman and Company, NewYork: 2007, p.23-52.
- Lee L. F., Sharma J. M., Nazerian K., and Witter R. L.. Suppression of mitogen-induced proliferation of normal spleen cells by macrophages from chickens inoculated with Marek's disease virus. *J Immunol*, 1978, 120:1554-1559.
- Lee L. F., Liu X., and Witter R. L.. Monoclonal antibodies with specificity for three different serotypes of Marek's disease viruses in chickens. *J Immunol*, 1983, 130:1003-1006.
- Lee L. F., Lupiani B., Silva R. F., Kung H. J., and Reddy S. M.. Recombinant Marek's disease virus (MDV) lacking the Meq oncogene confers protection against challenge with a very virulent plus strain of MDV. *Vaccine*, 2008, 26(15):1887-92.

- Li, H. M., Ge Z. X., Luo Q., Fu Q., and Chen R. A.. A highly pathogenic Marek's disease virus isolate from chickens immunized with a bivalent vaccine in China. *Arch Virol*, 2022, 167:861-870.
- Li, M., Wang P. K., Li Q. H., Deng Q. M., Shi M. Y., Mo M. L., Wei T. C., Huang T., and Wei P.. Reemergence of reticuloendotheliosis virus and Marek's disease virus co-infection in Yellow-Chickens in Southern China. *Poult Sci*, 2021, 100:101099.
- Li W. W., Wang J. Y., Chen Z. Q., Gao X. D., Chen Y., Xue Z. H., Guo Q. W., Ma Q. Q., and Chen H. X.. Physicochemical properties of polysaccharides from *Lentinus edodes* under high pressure cooking treatment and its enhanced anticancer effects. *Int J Biol Macromol*, 2018, 115:994-1001.
- Lin Y. Y., Zeng H. Y., Wang K., Lin H., Li P. F., Huang Y.X., Zhou S. Y., Zhang W., Chen C., and Fan H. J.. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of diverse polysaccharides from *Lentinus edodes*: Process optimization, structure characterization and antioxidant activity. *Int J Biol Macromol*, 2019, 136:305-315.
- Liu, J. L., Teng M., Zheng L. P., Zhu F. X., Ma S. X., Li L. Y., Zhang Z. H., Chai S. J., Yao Y. X., and Luo J.. Emerging Hypervirulent Marek's Disease Virus Variants Significantly Overcome Protection Conferred by Commercial Vaccines. *Viruses*, 2023, 15:1434.
- Lole, K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., Gadkari, D., Kulkarni, S. S., Novak, N. G., Ingersoll R., Sheppard H. W.. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol*, 1999, 73:152-160.
- Lyu F. Z., Xu X. J., Zhang L. N.. Natural polysaccharides with different conformations: extraction, structure and anti-tumor activity. *J Mater Chem B*, 2020, 8(42):9652-9667.
- Ma Y. A., Cheng Y. M., Huang J. W., Jen J. F., Huang Y. S., and Yu C. C.. Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2014, 37(8):1543-9.
- MacMicking J. D.. IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens. *Trends Immunol*, 2004, 25:601-609.
- McGeoch D. J., Rixon F. J., and Davison A. J.. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res*, 2006, 117:90-104.

- McPherson M. C., and Delany M. E.. Virus and host genomic, molecular, and cellular interactions during Marek's disease pathogenesis and oncogenesis. *Poult Sci*, 2016, 95(2):412-29.
- Meng, X., Liang H. B., and Luo L. X.. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydr Res*, 2016, 424:30-41.
- Morimura T., Ohashi K., Kon Y., Hattori M., Sugimoto C., and Onuma M.. Apoptosis in peripheral CD4⁺T cells and thymocytes by Marek's disease virus-infection. *Leukemia*, 1997, 11:206-208.
- Moradali M. F., Mostafavi H., Ghods S., Hedjaroude G. A.. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(6):701-724.
- Murata Y., Shimamura T., Tagami T., Takatsuki F., and Hamuro J.. The skewing to Th1 induced by lentinan is directed through the distinctive cytokine production by macrophages with elevated intracellular glutathione content. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2(5):673-689.
- Nair, V. Successful control of Marek's disease by vaccination. *Dev Biol (Basel)*, 2004, 119:147-154.
- Ng M. L., and Yap A. T.. Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). *J Altern Complement Med*, 2002, 8:581-589.
- Okazaki W., Purchase H.G., and Burmester B.R.. Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys. *Avian Dis*, 1970, 14:413-429.
- Osterrieder K., and Vautherot J F.. The genome content of Marek's disease-like viruses. In: Davison F and Nair V (eds). *Marek's Disease an Evolving Problem*. London: Elsevier, 2004.
- Pandya U., Dhuldhaj U., and Sahay N. S.. Bioactive mushroom polysaccharides as antitumor: an overview. *Nat Prod Res*, 2019, 33:2668-2680.
- Parvizi P., Read L. R., Abdul-Careem M. F., Sarson A. J., Lusty C., Lambourne M., Thanthrige-Don N., Burgess S. C., and Sharif S.. Cytokine gene expression in splenic CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets of genetically resistant and susceptible chickens infected with Marek's disease virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 132(2-4):209-217.

- Parvizi, P., Abdul-Careem, M. F., Haq, K., Thanthrige-Don, N., Schat, K. A., & Sharif, S.. Immune responses against Marek's disease virus. *Anim Health Res Rev*, 2010,11(2):123-134.
- Péter G., Károly V., Imre B., János F., and Kaneko Y. Effects of lentinan on cytotoxic functions of human lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1988, 10(2):157-63.
- Qian Y. L., Wang D. F., Fan M. H., Xu Y., Sun X., and Wang J. W.. Effects of intrinsic metal ions of lentinan with different molecular weights from *Lentinus edodes* on the antioxidant capacity and activity against proliferation of cancer cells. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120(Pt A):73-81.
- Qureshi M. A., Heggen C. L., and Hussain I.. Avian macrophage: effector functions in health and disease. *Dev Comp Immunol*, 2000, 24:103-119.
- Ramberg J. E., Nelson E. D., Sinnott R. A.. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. *Nutrition Journal*, 2010, 9(1):54.
- Ren Z. Z., Liu W. B., Song X. L., Qi Y. R., Zhang C., Gao Z., Zhang J. J., and Jia L.. Antioxidant and anti-inflammation of enzymatic-hydrolysis residue polysaccharides by *Lentinula edodes*. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120(Pt A):811-822.
- Rispens, B.H., van Vloten H., Mastenbroek N., Maas J.L., and Schat K.A.. Control of Marek's disease in the Netherlands. II. Field trials on vaccination with an avirulent strain (CVI 988) of Marek's disease virus. *Avian Dis*, 1972, 16:126-138.
- Roszczyk A., Turło J., Zagożdżon R., and Kaleta B.. Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from *Lentinula edodes*. *Int J Mol Sci*, 2022, 23:8980.
- Roselló-Soto E., Galanakis C. M., Brncic M., Orlie V., Trujillo F. J., Mawson R., Knoerzer K., Tiwari, B. K., and Barba, F. J..Clean recovery of antioxidant compounds from plant foods , byproducts and algae assisted by ultrasounds processing. modelingapproaches to optimize processing conditions. *Trends in FoodScience & Technology*, 2015, 42(2):134-149.
- Rudle N. H., and Schmid D. S . The role of lymphotoxin in T-cell-mediated cytotoxicity. *Ann Inst Pasteur Immunol*, 1987, 138(2):314-320.
- Sasaki T.. Further study of the structure of lentinan ,and anti-tumor polysaccharide from *lentinus edodes*. *Carbohydr Res*, 1976, 47(1):99-104.

- Schmandt R., Fung M., Arima N., Zhang N., Leung B., May C., Gibson S., Hill M., Green W., and Mills G. B.. T-lymphocyte proliferation: Tyrosine kinases in interleukin 2 signal transduction. *Baillieres Clin Haematol*, 1992, 5:551-573.
- Schat K.A., and Calnek, B.W. Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. *J Natl Cancer Inst*, 1978, 60:1075-1082.
- Schat, K. A., and Xing Z.. Specific and nonspecific immune responses to Marek's disease virus, *Dev Comp Immunol*. 2000, 24:201-221.
- Schat, K. A., and Markowski-Grimsrud C. J.. Immune responses to Marek's disease virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 255:91-120.
- Schat K. A.. Isolation of Marek's disease virus: revisited. *Avian Pathol*, 2005, 34:91-95.
- Schat K. A., and Nair V.. Marek's disease. In: Diseases of Poultry: 12th ed. Blackwell Publishing, Ames, IA: 2008, p.452-514. .
- Schat K.A., and Nair, V.. Marek's disease. In Diseases of Poultry: 13th ed. Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L., Nair, V.L., Eds. Wiley-Blackwell, Ames, IA: 2013, p.515-552.
- Sheng K. J., Wang C. L., Chen B. T., Kang M. J., Wang M. C., Liu K., and Wang M.. Recent advances in polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.): Isolation, structures and bioactivities. *Food Chem*, 2021, 358:129883.
- Song B., Li X., Ma J., Yu L., Feng Z., Liu Z., and Cui Y.. Prokaryotic Expression and Anti-IBDV Activity of Chicken Interleukin-18 and Interferon- γ . *Cytogenetic Genome Res*, 2017, 153(1):36-45.
- Soltanian S., Stuyven E., Cox E., Sorgeloos P., and Bossier P.. Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. *Crit Rev Microbiol*, 2009, 35(2):109-38.
- Stastny J., Marsik P., Tauchen J., Bozik M., Mascellani A., Havlik J., Landa P., Jablonsky I., Tremel J., Herczogova P., Bleha R., Synytsya A., and Kloucek P.. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Five Medicinal Mushrooms of the Genus *Pleurotus*. *Antioxidants (Basel)*, 2022,11(8):1569.
- Stephany M. P., Chung S., Handler M. Z., Handler N. S., Handler G. A., Schwartz R. A.. Shiitake mushroom dermatitis: a review. *Am J Clin Dermatol*, 2016, 17(5):485-489.

- Su S., Cui N., Zhou Y., Chen Z. M., Li Y. P., Ding J. B., Wang Y. X., Duan L. T., and Cui, Z. Z.. A recombinant field strain of Marek's disease (MD) virus with reticuloendotheliosis virus long terminal repeat insert lacking the meq gene as a vaccine against MD. *Vaccine*, 2015, 33(5):596–603.
- Tan J., Cooke J., Clarke N., and Tannock G. A.. Optimization of methods for the isolation of Marek's disease viruses in primary chicken cell cultures. *J Virol Methods*, 2008, 147(2):312-8.
- Tani M., Tanimura H., Yamaue H., Iwahashi M., Tsunoda T., Tamai M., Noguchi K., and Arii K.. In vitro generation of activated natural killer cells and cytotoxic macrophages with lentinan. *European journal of clinical pharmacology*, 1992, 42(6):623-627.
- Tian Y. T., Zeng H., Xu Z. B., Lin Y. X., Gan Y. X., and Martin Lo L.. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88(2):522-529.
- Tiberi J., Cesarini V., Stefanelli R., Canterini S., Fiorenza M. T., and La Rosa P.. Sex differences in antioxidant defence and the regulation of redox homeostasis in physiology and pathology. *Mech Ageing Dev*, 2023, 211:111802.
- Tulman E. R., Afonso C. L., Lu Z., Zsak L., Rock D. L., and Kutish G. F.. The genome of a very virulent Marek's disease virus. *J Virol*, 2000, 74:7980-7988.
- Venugopal K.. Marek's disease: An update on oncogenic mechanisms and control. *Res Vet Sci*, 2000, 69:17-23.
- Vilcek, J., and Oliveira I. C.. Recent progress in the elucidation of interferon-gamma actions: molecular biology and biological functions. *Int Arch Allergy Immunol*, 1994, 104:311-316.
- Walkden-Brown S. W., Islam A. F., Groves P. J., Rubite A., Sharpe S. M., and Burgess S. K.. Development, application, and results of routine monitoring of Marek's disease virus in broiler house dust using real-time quantitative PCR. *Avian Dis*, 2013, 57:544-554.
- Wang J. L., Li W. Y., Huang X., Liu Y., Li Q., Zheng Z. M., and Wang K. P.. A polysaccharide from *Lentinus edodes* inhibits human colon cancer cell proliferation and suppresses tumor growth in athymic nude mice. *Oncotarget*, 2017, 8(1):610-623.

- Witter R.L., Nazerian K., Purchase H.G., and Burgoyne G.H.. Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. *Am J Vet Res*, 1970, 31:525-538.
- Witter R. L.. Protection by attenuated and polyvalent vaccines against highly virulent strains of Marek's disease virus1. *Avian Pathol*, 1982, 11:49-62.
- Witter R.L., and Lee L.. Polyvalent Marek's disease vaccines: Safety, efficacy and protective synergism in chickens with maternal antibodies1. *Avian Pathol*, 1984, 13:75-92.
- Witter R.L. . Influence of serotype and virus strain on synergism between Marek's disease vaccine viruses. *Avian Pathol*, 1992, 21:601-614.
- Witter RL. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Dis*, 1997, 41(1):149-63.
- Witter R. L., and Schat K. A.. Marek's disease. Diseases of Poultry: Y. M. Saif (Ed.), Blackwell Publishing, Ames, IA: 2003, p.407-467.
- Witter R. L., and Kreager K. S.. Serotype 1 viruses modified by backpassage or insertional mutagenesis: approaching the threshold of vaccine efficacy in Marek's disease. *Avian Dis*, 2004, 48(4):768-782.
- Witter R. L., Calnek B. W., Buscaglia C., Gimeno I. M., and Schat K. A.. Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology. *Avian Pathol*, 2005, 34:75-90.
- Wang K. P., Zhang Q. L., Liu Y., Wang J., Cheng Y., and Zhang Y.. Structure and inducing tumor cell apoptosis activity of polysaccharides isolated from *Lentinus edodes*. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(41):9849-9858.
- Wang K. P., Wang J., Li Q., Zhang Q. L., You R. X., Cheng Y., Luo Y., and Zhang Y.. Structural differences and conformational characterization of five bioactive polysaccharides from *Lentinus edodes*. *Food Res Int*, 2014, 62:223-232.
- Wang K. J., Guo J. T., Cheng J. X., Zhao X. H., Ma B. H., Yang X. B., Shao H. J.. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from spent *Lentinus edodes* substrate: Process optimization, precipitation, structural characterization and antioxidant activity. *Int J Biol Macromol*, 2021, 191:1038-1045.

- Wang Y. P., Guo M. R.. Purification and structural characterization of polysaccharides isolated from *Auricularia cornea* var. *Li*. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 230:115680.
- Wang X. E., Wang Y. H., Zhou Q., Peng M., Zhang J., Chen M., Ma L. J., and Xie G. M.. Immunomodulatory Effect of Lentinan on Aberrant T Subsets and Cytokines Profile in Non-small Cell Lung Cancer Patients. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(1):499-505.
- Wasser S.. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbio and Biotechnol*, 2002, 60(3):258-274.
- Xing Z., and Schat K. A.. Expression of cytokine genes in Marek's disease virus-infected chickens and chicken embryo fibroblast cultures. *Immunology*, 2000a, 100(1):70-76.
- Xing, Z., and Schat K. A.. Inhibitory effects of nitric oxide and gamma interferon on in vitro and in vivo replication of Marek's disease virus. *J Virol*, 2000b, 74:3605-3612.
- Ya G. W.. A *Lentinus edodes* polysaccharide induces mitochondrial-mediated apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells. *Int J Biol Macromol*, 2017, 103:676-682.
- Yoshino S., Tabata T., Hazama S., Iizuka N., Yamamoto K., Hirayama M., Tangoku A., and Oka M.. Immunoregulatory effects of the antitumor polysaccharide lentinan on Th1/Th2 balance in patients with digestive cancers. *Anticancer Res*, 2000, 20(6C):4707-4711.
- Yu, C., Liu Q., Qin A. J., Hu X. M., Xu W. C., Qian K., Shao H. X., and Jin W. J.. Expression kinetics of chicken β 2-microglobulin and Class I MHC in vitro and in vivo during Marek's disease viral infections. *Vet Res Commun*, 2013, 37:277-283.
- Yu, Z. H., Zhang Y. P., Lan X. G., Wang Y. N., Guo R. R., Li K., Gao L., Qi X. L., Cui H. Y., Wang X. M., Gao Y. L., and Liu C. J.. Differences in Pathogenicity and Vaccine Resistance Discovered between Two Epidemic Strains of Marek's Disease Virus in China. *Viruses*, 2023, 15:945.
- Zhang L. N., Li X. L., Xu X. J., and Zeng F. B.. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. *Carbohydr Res*, 2005, 340(8):1515-1521.
- Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Zhang, L., and Cheung, P. C. K.. Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(2):196-206.

- Zhang, Y. K., Cui N., Han N., Wu J. Y., Cui Z. Z., and Su S.. Depression of Vaccinal Immunity to Marek's Disease by Infection with Chicken Infectious Anemia Virus. *Front Microbiol*, 2017, 8:1863.
- Zhang Y. P., Lan X. G., Wang Y. N., Lin Y. M., Yu Z. H., Guo R. R., Li K., Cui H. Y., Qi X. L., Wang Y. Q., Gao L., Pan Q., Liu A. J., Gao Y. L., Wang X. M., and Liu C. J.. Emerging natural recombinant Marek's disease virus between vaccine and virulence strains and their pathogenicity. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69:1702-1709.
- Zhang Z. J., Liu S. Q., Ma C. T., Zhao P., and Cui Z. Z.. Absolute quantification of a very virulent Marek's disease virus dynamic quantity and distributions in different tissues. *Poult Sci*, 2015, 94:1150-1157.
- Zhao Y. M., Yang J. M., Liu Y. H., Zhao M., and Wang J.. Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from *Lentinus edodes* and its anti-hepatitis B activity in vitro. *Int J Biol Macromol*, 2018, 107(Pt B):2217-2223.
- Zheng, L. P., Teng M., Li G. X., Zhang W. K., Wang W. D., Liu J. L., Li L. Y., Yao Y., Nair V., and Luo J.. Current Epidemiology and Co-Infections of Avian Immunosuppressive and Neoplastic Diseases in Chicken Flocks in Central China. *Viruses*, 2022, 14:2599.
- Zheng R., Jie S., Hanchuan D., and Moucheng W.. Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5(5):811-20..
- Zheng W. F., Zhang M. M., Zhao Y. X., Miao K. J., Pan S. Y., Cao F, and Dai Y. C.. Analysis of antioxidant metabolites by solvent extraction from sclerotia of *Inonotus obliquus* (Chaga). *Phytochem Anal*, 2011, 22(2):95-102.