



杨兴森,曹梓毓,金繁鑫,等. 日本脑炎病毒感染商品猪软腭扁桃体的检测与鉴定[J]. 南京农业大学学报,2026,49(3):559-571.
Yang X M, Cao Z Y, Jin F X, et al. Detection and characterization of Japanese encephalitis virus-infected soft palate tonsils in commercial pigs[J].
Journal of Nanjing Agricultural University, 2026, 49(3): 559-571.

日本脑炎病毒感染商品猪软腭扁桃体的检测与鉴定

杨兴森,曹梓毓,金繁鑫,杨笑笑,王雯,赵韵笛,谢盛达,曹瑞兵*

(南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]本试验旨在检测商品猪软腭扁桃体中的日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV),鉴定 JEV 感染特性。[方法]从屠宰场采集商品猪软腭扁桃体 20 头份,用 RT-PCR 筛选 JEV 阳性样本。将阳性样本的匀浆上清液过滤后接种 BHK-21 细胞进行病毒分离,采用间接免疫荧光、蛋白免疫印迹和噬斑形成试验鉴定分离病毒。PCR 扩增分离毒株的 E 基因序列并对其进行遗传进化分析。用免疫组化和间接免疫荧光法鉴定 JEV 感染猪软腭扁桃体特征。[结果]20 份软腭扁桃体中检测出 2 例 JEV 阳性,检出率为 10%。成功分离到 2 株 G1b 型 JEV,分离株 E 基因核苷酸相似性为 97.5%,分别命名为 JEV NJ202408 株和 NJ202409 株。在 JEV 阳性软腭扁桃体中,JEV 抗原阳性细胞主要分布在淋巴滤泡边缘附近和周围弥散的淋巴组织中,细胞核较大、形态不规则且颜色淡染。免疫荧光检测结果显示,JEV 阳性软腭扁桃体中 JEV 分别与 CD11b、CD163、iNOS、TNF- α 和 MHC-II 细胞标志物共定位,说明 JEV 阳性细胞多为巨噬细胞或树突状细胞并引发巨噬细胞 M1 极化。JEV 感染并未明显改变猪软腭扁桃体淋巴滤泡内 MHC-II⁺B 细胞和淋巴滤泡间 CD3⁺T 细胞的分布。[结论]在实际生产中 JEV 可在商品猪软腭扁桃体定殖,JEV 阳性细胞主要为巨噬细胞或树突状细胞,为 JEV 感染猪的临床监测和日本脑炎的防控提供了参考。

关键词:日本脑炎病毒;猪;软腭扁桃体;感染;监测

中图分类号:S855.3

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2026)03-0559-13

Detection and characterization of Japanese encephalitis virus-infected soft palate tonsils in commercial pigs

YANG Xingmiao, CAO Ziyu, JIN Fanxin, YANG Xiaoxiao, WANG Wen,
ZHAO Yundi, XIE Shengda, CAO Ruibing*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract:[Objectives] This study aimed to detect the Japanese encephalitis virus (JEV) in the soft palate tonsils of commercial pigs and characterize the nature of JEV infection. [Methods] Soft palate tonsils were collected from 20 commercial pigs at abattoirs, and JEV-positive samples were identified using RT-PCR. The homogenate supernatant of each positive sample was filtered and inoculated into BHK-21 cells for virus isolation. The isolated virus was characterized by indirect immunofluorescence, western blot, and plaque formation assays. The E gene sequence of the isolated strain was amplified via PCR and analyzed for genetic evolution. Immunohistochemistry and immunofluorescence were used to examine the characteristics of JEV-infected soft palate tonsils in pigs. [Results] Two JEV-positive cases were detected among 20 soft palate tonsil samples, yielding a detection rate of 10%. Two G1b-type JEV strains were successfully isolated from these samples and were designated JEV strain NJ202408 and strain NJ202409, with a nucleotide similarity of 97.5% in their E genes. In JEV-positive tonsils, JEV antigen-positive cells were primarily located near the edges of lymphoid follicles and within the surrounding diffuse lymphoid tissue. These cells exhibited large, irregularly shaped, pale-staining nuclei. Immunofluorescence analysis showed that JEV NS1' co-localized with CD11b, CD163, iNOS, TNF- α , and MHC-II cell markers, suggesting that most JEV-positive cells were macrophages or dendritic cells and that the infection induced macrophage M1 polarization. JEV infection did not significantly alter the distribution of MHC-II⁺B cells within lymphoid follicles or CD3⁺T cells between lymphoid follicles in the soft palate tonsils of pigs. [Conclusions] In commercial pig production, JEV can colonize the soft palate tonsils, with most JEV-positive cells identified as macrophages or dendritic cells. This finding serves as a reference for clinical monitoring, of JEV-infected pigs and for the prevention and control of Japanese encephalitis.

Keywords: Japanese encephalitis virus; pigs; soft palate tonsils; infect; surveillance

收稿日期:2024-11-04

基金项目:国家自然科学基金项目(32273040);国家重点研发计划项目(2022YFD1800102)

*通信作者:曹瑞兵,教授,研究方向为动物传染病诊断与免疫, E-mail: crb@njau.edu.cn。

日本脑炎是由日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 感染引起的一种蚊媒传播的人兽共患传染病^[1]。JEV 属于黄病毒科正黏黄病毒属的单股正链 RNA 病毒^[2]。三带喙库蚊是其主要传播媒介,涉水鸟类和猪是 JEV 在自然界的扩增宿主。在病毒和宿主蛋白酶的作用下,JEV 编码的多聚蛋白被切割为 3 种结构蛋白 (C、prM、E) 和 7 种非结构蛋白 (NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5)。JEV 等日本脑炎血清群病毒还可表达非结构蛋白 NS1',是在病毒翻译过程中由于 NS2A 基因起始端的程序性 1 核糖体移码基序 (PRF) 使核糖体移码产生的^[3]。JEV 弱毒疫苗株 SA14-14-2 不表达分泌 NS1',因此 NS1'可作为 JEV 野病毒感染的诊断标志^[4]。JEV 能引发人和马病毒性脑炎,感染猪后主要影响猪的生殖性能。JEV 感染种公猪会导致精液品质下降,感染怀孕母猪会导致流产,死胎和先天性畸形的风险增高。值得一提的是,商品猪多呈隐性感染。Ricklin 等^[5]研究表明,7 周龄瑞士大白猪经静脉和颈部皮内注射 10⁷ TCID₅₀ JEV 1 d 后出现发热、采食下降及不喜动等轻微临床症状,持续 4~5 d 后恢复正常,未观察到神经症状。

猪扁桃体作为一种重要的免疫器官,分布于消化道和呼吸道交界处及口鼻通道周围。鉴于其所处位置较易接触并隐藏外来污染物或微生物,因此猪扁桃体常作为猪群疫病病原诊断的临床样品。非洲猪瘟病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、伪狂犬病毒、猪圆环病毒、猪细小病毒、猪瘟病毒、水泡口炎病毒、猪链球菌、胸膜肺炎放线杆菌和多杀性巴氏杆菌等多种病原微生物均可侵袭猪扁桃体^[6-9],并在扁桃体中检出。JEV 除了经蚊媒传播还可通过猪口腔鼻腔分泌物在猪群间水平传播,猪扁桃体在水平传播中具有重要意义。Ricklin 等^[5]研究表明,通过皮内注射感染 JEV 的猪能通过口鼻接触将 JEV 水平传染给未感染猪,在此传播过程中 JEV 对中枢神经系统和扁桃体具有很强的趋向性。即使猪体内存在中和抗体 JEV 仍可在扁桃体中定殖长达 25 d,在此期间可从扁桃体中分离出 JEV。Redant 等^[10]研究表明,8 周龄猪皮内接种 10⁵TCID₅₀ JEV 3 d 后可在扁桃体中检测到 JEV 并持续存在至少 21 d。本实验室前期研究发现在 JEV 感染仔猪软腭扁桃体中 JEV 阳性细胞多为巨噬细胞或树突状细胞^[11],NS1'蛋白可促进病毒感染中枢神经系统和扁桃体^[12]。

上述关于 JEV 在猪扁桃体中定殖的研究均在实验室环境中获得,试验猪的日龄相对较小且扁桃体处于发育阶段。JEV 感染临床商品猪群的相关研究尚未报道。我国是 JEV 流行地区之一,生猪集约化养殖具有数量多、分布广的特点,在实际生产过程中 JEV 能否持续感染猪扁桃体引发广泛关注。因此,本研究通过采集临床商品猪软腭扁桃体样本并检测 JEV 定殖情况,探究 JEV 感染扁桃体的靶细胞,为进一步揭示 JEV 感染与传播机制、防控日本脑炎提供参考。

1 材料与方法

1.1 商品猪扁桃体样本

于 2024 年 7、8、9 月在某屠宰场各采集 5、5、10 共计 20 头份健康商品猪的软腭扁桃体样本。具体信息见表 1。将每个扁桃体组织样本分为 2 份:一份进行 4% 多聚甲醛固定,用于免疫组化和免疫荧光分析;另一份样品于-80 ℃ 保存,用于 JEV 的 PCR 检测和病原分离鉴定。

1.2 试验材料

乳仓鼠肾细胞 (BHK-21) 和 JEV NS1、NS1'、E 鼠源单抗由本课题组保存或制备;JEV prM (GTX131833)、NS3 兔源多抗 (GTX125868) 购自 GeneTex 公司;猪 CD11b 兔源单抗 (ab133357)、猪 CD163 兔源单抗 (ab87099) 购自 Abcam 公司;猪 TNF-α 羊源多抗 (AF690) 购自 R&D 公司;猪 iNOS 兔源多抗 (NB300-605) 购自 Novusbio 公司;猪 SLA-DR (MCA2314GA)、猪 CD3 (MCA5951GA) 鼠源单抗购自 Bio-Rad 公司;羊抗兔 IgG Alexa Fluor 488 (A-11008)、羊抗鼠 IgG Alexa Fluor 555 (A-21434) 荧光二抗购自 Invitrogen 公司;羊抗鼠 IgG-FITC 荧光二抗 (abs20003) 购自 absin 公司;羊抗兔 IgG Alexa Fluor 555 (ab150078)、驴抗羊 IgG Alexa Fluor 488 (ab150129) 和驴抗鼠 IgG Alexa Fluor 568 (ab175472) 荧光二抗购自 Abcam 公司;4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI, KGA1808) 购自 KeyGEN BioTECH 公司;病毒核酸提取试剂盒 (RC311) 购自 Vazyme 公司;长链反转录试剂盒 (6210A)、PrimeSTAR HS 高保真酶 (R040Q) 购自 TaKaRa 公司;免疫组化试剂盒 (CW2069S) 购自 CWBIO 公司;免疫染色封闭液 (P0102) 购自 Beyotime 公司;DMEM 细胞培养基

表 1 商品猪扁桃体样本

Table 1 Sample of soft palate tonsils of commercial pigs

采集时间 Sampling time	样本编号 Sample number
2024.07	0710、0720、0730、0740、0750
2024.08	0830、0845、0866、0870、0880
2024.09	0950、0960、0966、0970、0971、0972、0973、0980、0985、0990

(C11995500BT)及胎牛血清(A5256701)购自 Gibco 公司;PVDF 膜(1620177)及 ECL 化学发光液(1705061)购自 Bio-Rad 公司。

1.3 JEV 的检测及分离鉴定

1.3.1 RT-PCR 检测 JEV 为检测猪软腭扁桃体组织样品中 JEV,针对 *JEV NS1* 基因设计普通 PCR 检测引物。采用病毒核酸提取试剂盒对软腭扁桃体样品组织研磨上清液进行病毒 RNA 提取,用长链反转录试剂对提取的 RNA 进行反转录。以反转录产物为模板,用 PrimeSTAR HS 高保真酶进行普通 PCR。PCR 反应体系:PrimeSTAR HS Mix 12.5 μ L,上、下游引物各 1 μ L,cDNA 模板 2.5 μ L,DEPC 水 8 μ L。反应条件:98 $^{\circ}$ C 10 s;55 $^{\circ}$ C 15 s;72 $^{\circ}$ C 1 min,40 个循环。反应结束后取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

根据 NCBI 上登录的 JEV 基因组序列,设计针对 *JEV E* 基因的扩增引物。扩增阳性样本 *JEV E* 基因,将 PCR 产物采用胶回收并纯化后直接送通用生物(安徽)股份有限公司测序。所用引物序列见表 2。

表 2 目的基因 PCR 引物对的序列

Table 2 Primer pairs sequences of the target genes

基因 Genes	引物对序列 Primer pairs sequence(5'→3')	产物大小/bp PCR product size
<i>JEV NS1</i>	GACACTGGATGTGCCATTGAC/GGCATTCTCTTGTCTCAGGTC	430
<i>JEV E</i>	TGGATTCAACGAAAGCCACAC/ATCTGGGCGTTTCTGGCAA	1 788

1.3.2 JEV 的细胞分离及鉴定 将 JEV 阳性样品的组织研磨上清液经 0.22 μ m 滤器过滤并稀释后接种 BHK-21 细胞,在 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中静置 2 h 后弃去吸附液,换成含 2% 血清的 DMEM 细胞培养液。每日观察细胞形态,待细胞出现 75% 病变后于 -20 $^{\circ}$ C 条件下反复冻融 3 次,4 $^{\circ}$ C、12 000 g 离心 5 min 后收集上清液。以同样的方法进行后续传代,将病毒培养上清液于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

1.4 间接免疫荧光(IFA)鉴定 JEV

将 BHK-21 细胞以每孔 2.2×10^5 的密度提前接种 24 孔细胞培养板,培养过夜后次日接种感染 JEV。在感染后 36 h,弃去上清液,加入 4% 多聚甲醛并于 37 $^{\circ}$ C 固定 10 min。PBS 清洗后加 1% Triton X-100 于室温下透膜 10 min。经 PBS 洗涤后每孔加入鼠源抗 NS1' 单克隆抗体(1:200),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。每孔加入稀释过的羊抗鼠 IgG Alexa Fluor 555 二抗,于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h。洗涤后每孔加入 250 μ L DAPI 染液并于室温染核 5 min,用倒置荧光显微镜(ZEISS Axio vert.A1)观察荧光并拍照。

1.5 蛋白免疫印迹(western blot)鉴定 JEV

BHK-21 细胞被 JEV 分离株感染 72 h 后用预冷的 PBS 清洗 3 次,加入 1 mL PBS 后用细胞刮片轻轻将细胞刮下。1 000 g 离心 5 min 后收集细胞于 EP 管中,每管加入 200 μ L RIPA 裂解液,冰上裂解 20 min。离心后收集裂解液上清液,按比例加入 5 $\times$ SDS 裂解缓冲液后放入锅中煮沸 10 min。采用 SDS-PAGE 分离裂解液中的蛋白质,将其转印至 PVDF 膜上。经 50 g $\cdot$ L $^{-1}$ 脱脂奶粉封闭后用相应的 JEV 抗体进行检测,同时设 GAPDH 作为对照。

1.6 噬斑形成试验(PFA)鉴定 JEV

将 BHK-21 细胞铺于 6 孔细胞培养板中,待细胞刚长满底部时,用不含血清和青/链霉素的培养基将病毒按照体积比为 1:10 进行梯度稀释,将病毒稀释液(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5})依次加入 6 孔板,接种感染细胞,剩余 1 孔添加细胞培养基作为阴性对照,放置细胞培养箱中培养 1.5 h。采用 100 $^{\circ}$ C 水浴加热预先融化的 20 g $\cdot$ L $^{-1}$ 低熔点琼脂糖,待其彻底融化后自然冷却。将低熔点琼脂糖和 2 $\times$ DMEM(含 40 g $\cdot$ L $^{-1}$ FBS、200 U $\cdot$ mL $^{-1}$ 青霉素和 200 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 链霉素)按照体积比为 1:1 混合,添加至 6 孔板内,将 6 孔板置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中 10 min,待琼脂糖彻底凝固后转移至细胞培养箱。培养 3 d 后待底部培养孔细胞出现空白的斑点时加入 1 mL 1% 结晶紫染液,染色 4 h 后用流水将琼脂糖冲掉,晾干后计算空斑数。

1.7 猪软腭扁桃体的免疫组织化学检测

将保存于 4% 多聚甲醛中的扁桃体样品进行梯度乙醇脱水、二甲苯透化、石蜡包埋并切片后再根据免疫组化试剂盒说明书进行免疫组化染色,封片后采用数字扫描显微成像系统(Grundium Ocus 40)进行全景扫描。本试验中使用抗体为针对 JEV NS1'。

1.8 猪软腭扁桃体的免疫荧光技术检测

取 1.7 节制备的猪软腭扁桃体石蜡切片,经脱蜡、水化、抗原修复后用免疫染色封闭液进行透膜封闭,加入对应的一抗后 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗涤后加对应种属的荧光二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,加 4',6-二脒基-2-苯

基吖啶 (DAPI) 染核,充分洗涤并封片后用激光共聚焦显微镜 (Nikon A1) 观察并拍照。

1.9 数据分析

用 Image J 软件的 Plot Profile 对整张合并图片进行荧光共定位分析,分别得出红色和绿色荧光的荧光强度,在 GraphPad Prism 7.0 软件中将荧光强度拟合为折线图。红色和绿色折线变化趋势一致表示红色荧光和绿色荧光共定位。

2 结果与分析

2.1 商品猪软腭扁桃体中 JEV 的分离与鉴定

将 20 份软腭扁桃体通过组织匀浆仪匀浆破碎后离心,取上清液抽提核酸,用 JEV 特异性引物进行 RT-PCR。只有 0866 和 0950 号软腭扁桃体组织样品扩增得到大小约为 430 bp 的 JEV 特异性条带 (图 1-A),基因测序结果分析表明其为 JEV 阳性。为了确定检测 JEV 的基因型,针对 *JEV E* 基因设计引物,扩增包含完整 *JEV E* 基因,通过琼脂糖凝胶纯化后测序 (图 1-B)。将 2 份阳性组织样本匀浆上清液过滤稀释后接种 BHK-21 细胞并连续盲传至第 2 代,在接种后 72 h 发现细胞出现皱缩、变形的明显病变 (图 1-C),与 JEV 感染细胞导致的病变相似。将第 2 代感染细胞后反复冻融 3 次,离心后取上清液,50 倍稀释后感

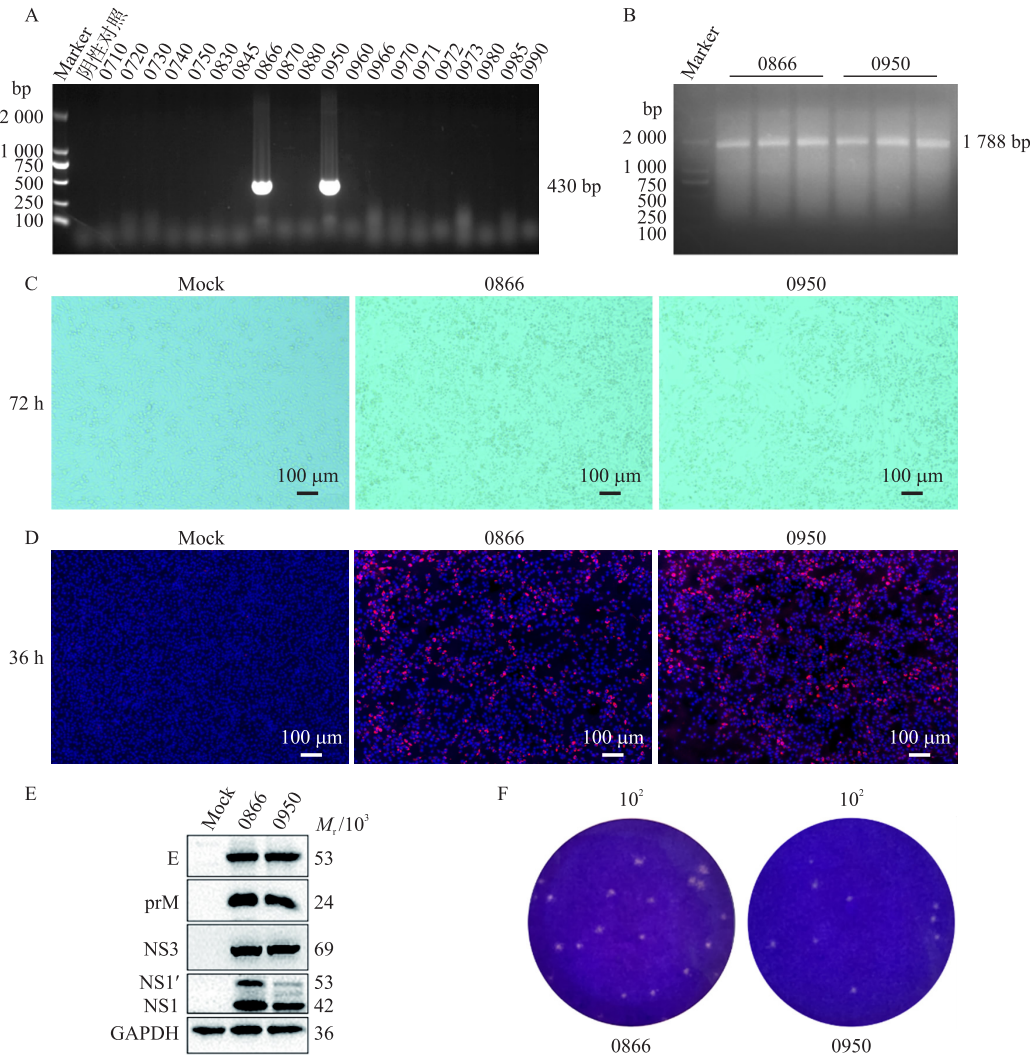


图 1 JEV 的分离与鉴定

Fig. 1 Isolation and characterization of JEV

A. 猪软腭扁桃体样本 JEV 的 PCR 检测结果;B. *JEV E* 基因 PCR 检测结果;C. JEV 感染 BHK-21 细胞后病变观察结果 (100 ×); D. 间接免疫荧光鉴定 JEV (100 ×);E. JEV E 蛋白的免疫印迹检测;F. 噬斑形成试验测定 JEV (10² 为病毒稀释倍数)。

A. PCR detection results of JEV pigs soft palate tonsils samples;B. PCR amplification results of *JEV E* gene;C. The observation of CPE in JEV-infected BHK-21 cells (100 ×);D. Identification of JEV via indirect immunofluorescence assay (100 ×);E. Detection of JEV E protein via Western blot;F. JEV were determined by plaque forming assay (10² is the dilution factor).

染 BHK-21 细胞,36 h 后进行 IFA 检测。结果(图 1-D)显示,感染细胞能够与 JEV NS1'蛋白鼠源单抗产生特异性结合,呈现红色荧光,而对照组细胞无特异性红色荧光,表明感染细胞中含有 JEV。

在接种后 72 h 收取第 4 代感染细胞,Western blot 分析结果表明细胞中可检测到 JEV E 蛋白(图 1-E)。噬斑形成试验鉴定第 5 代病毒,结果表明,从 0866 和 0950 样品分离得到的 JEV 感染 BHK-21 细胞后均可形成大小形态相对均一的病毒噬斑,且 0866 样品来源病毒形成的噬斑略大于 0950 样品来源病毒(图 1-F)。上述结果表明成功从 0866 和 0950 两份猪软腭扁桃体样品中分离得到 JEV。

2.2 JEV 分离毒株遗传进化分析

用 MegAlign 软件比对 2 株 JEV E 基因序列,二者核苷酸相似性为 97.5%,氨基酸相似性为 100%。因此,根据分离地点和月份将 2 株 JEV 分别命名为 JEV NJ202408 株和 JEV NJ202409 株。

从 NCBI Nucleotide 数据库中筛选获得 106 条背景信息清晰的 JEV E 基因核苷酸序列。采用 MEGA X 进行 Clustal W 多序列比对,通过 Maximum Likelihood(最大似然法)对 E 基因序列进行遗传进化分析,Bootstrap 为 1 000。结果(图 2-A)显示,JEV NJ202408 株和 JEV NJ202409 株与 G I 型毒株聚类在同一分支,表明 2 个 JEV 分离株属于 G I 型。JEV NJ202408 株与 2018 年从浙江省三代喙库蚊分离的 JEV ZJ-JY-16-18 株(GenBank:MK095877.1)E 基因相似性最高达 99.4%,氨基酸相似性 100%。JEV NJ202409 株与 2020 年从四川省猪分离的 JEV-SC-2020-1 株(GenBank:OK423757.1)E 基因相似性最高达 99.7%,氨基酸相似性 100%。

采用 MegAlign 软件中 Sequence Distance 分析 JEV 分离株 NJ202408、NJ202409 分别与 G I 型(54 条)、G III 型(46 条)、G II 型(2 条)、G IV 型(2 条)和 G V 型(2 条)JEV E 基因序列的相似性。结果显示,JEV NJ202408 株、NJ202409 株与 G I 型 JEV E 基因的核苷酸相似性最高分别为 91.6%~99.4%和 91.7%~99.7%。JEV NJ202408 株、NJ202409 株与 G II 型 JEV E 基因的核苷酸相似性分别为 88.4%~89.1%和 88.5%~89.1%,与 G III 型 JEV 核苷酸相似性分别为 87.2%~88.3%和 87.1%~88.1%,与 G IV 型 JEV 核苷酸相似性分别为 82.7%~83.0%和 82.3%~82.9%。JEV NJ202408 株、NJ202409 株与 G V 型 JEV 核苷酸相似性最低,分别为 77.2%~77.3%和 76.4%~77.0%。分离得到的 2 株 JEV 与 G I 型 JEV E 蛋白氨基酸相似性最高,为 98.2%~100.0%,与 G II 型 JEV E 蛋白氨基酸相似性为 98.6%~99.2%,与 G III 型 JEV 氨基酸相似性为 97.4%~99.2%,与 G IV 型 JEV 氨基酸相似性为 95.6%,与 G V 型 JEV 氨基酸相似性最低,为 91.6%。

JEV E 蛋白氨基酸序列比对结果(图 2-B)表明第 222 和 327 位氨基酸具有基因型特异性,同种基因型 JEV 上述 2 个位点氨基酸高度保守。JEV NJ202408 株、NJ202409 株 E 蛋白第 129 和 141 位氨基酸分别为 M(甲硫氨酸)和 I(异亮氨酸)(图 2-B),JEV E 蛋白 129M 和 141I 是 G Ib 毒株的特征^[13],表明本研究分离得到的 2 株 JEV 均属于 G Ib 型。

2.3 免疫组化鉴定商品猪软腭扁桃体中 JEV 抗原阳性细胞的分布与形态特征

采用免疫组化试验对采集的 JEV 阳性猪软腭扁桃体样品 0866、0950 和 JEV 阴性扁桃体样本 0880 进行分析,鉴定软腭扁桃体内 JEV 感染阳性细胞的分布与形态特征。NS1'是 JEV 在翻译过程中核糖体移码导致翻译提前终止产生的,相对于之后编码的非结构蛋白表达量较多。NS1'是鉴定 JEV 野病毒感染的诊断标志^[4],因此选择 NS1'蛋白作为检测靶标。免疫组化检测结果(图 3)显示,JEV NS1'抗原阳性细胞主要分布在软腭扁桃体淋巴滤泡边缘附近和周围弥散的淋巴组织中。JEV 阳性细胞主要在弥散的淋巴组织中呈 10~20 个细胞聚集分布(图 3-A、B),且这些细胞核有大有小、形态不一。同时也可见 JEV 阳性细胞单个零星分布在弥散的淋巴组织(图 3-C、D)及 3~5 个零散分布于淋巴滤泡边缘内侧(图 3-E)。JEV NS1'抗原阳性细胞核较大且颜色淡染,因此推测 JEV 阳性细胞主要为巨噬细胞或树突状细胞。在 JEV 核酸阴性猪软腭扁桃体中未检测到 JEV 阳性抗原信号(图 3-F)。

2.4 间接免疫荧光鉴定商品猪软腭扁桃体中 JEV 细胞嗜性

免疫组化试验结果(图 4)表明,JEV 阳性细胞核的形态类似巨噬细胞或树突状细胞。CD163 表达限于单核-巨噬细胞^[14],CD11b 是鉴别猪树突状细胞常用的分子标记之一^[15-16],因此选择这 2 种细胞标志物进一步鉴定 JEV 阳性细胞。免疫荧光结果(图 4-C)表明,在 JEV 核酸阴性的软腭扁桃体中并未观察到 JEV 抗原特异性红色荧光,CD11b⁺或 CD163⁺阳性细胞主要分散于弥散的淋巴组织。猪软腭扁桃体中 CD11b⁺阳性细胞的数量多于 CD163⁺阳性细胞,除去树突状细胞表达 CD11b 外,单核-巨噬细胞、中性粒细胞和自然杀伤细胞同样表达。

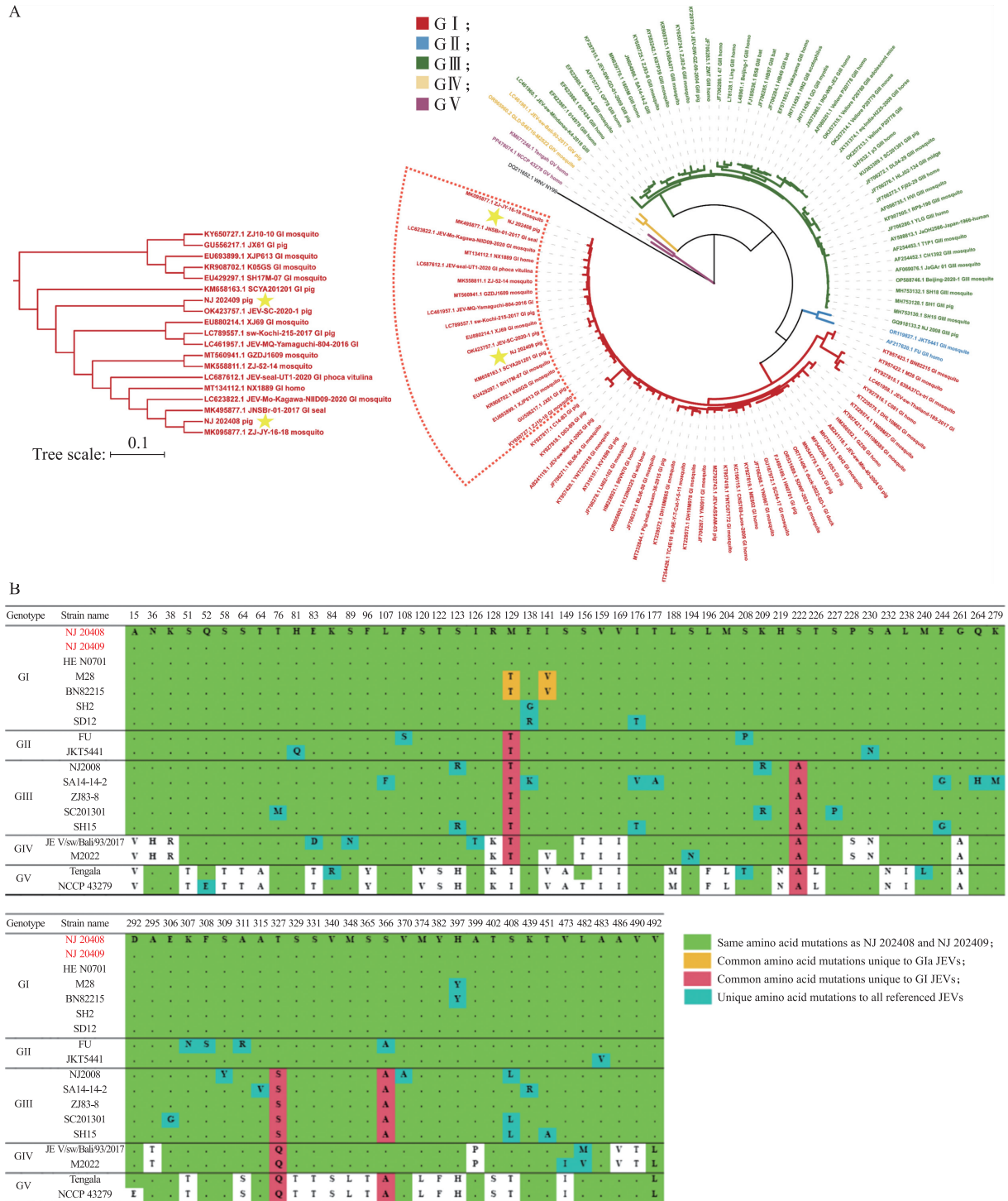


图 2 JEV 分离株遗传进化分析

Fig. 2 Genetic evolutionary analysis of isolate JEV

A. JEV 分离株 *E* 基因的遗传进化树(★表示本研究分离毒株);B. JEV 分离株 *E* 蛋白氨基酸比对结果。

A. Genetic evolutionary tree of *E* gene of isolate JEV(★ indicate the isolated virus strains in this study);B. Comparative analysis of the amino acid sequences of an isolated JEV *E* protein.

在 JEV 核酸阳性的猪软腭扁桃体中,JEV NS1'分别与 CD11b⁺或 CD163⁺阳性细胞共定位(图 4-A、B)。JEV NS1'与 CD11b⁺共定位细胞主要分布于淋巴滤泡边缘及周围弥散的淋巴组织中,还可见少量 JEV 抗原阴性 CD11b⁺阳性细胞(图 4-B)。JEV NS1'与 CD163⁺共定位细胞主要分布于淋巴滤泡边界附近,淋巴滤泡内外均有分布。在 JEV 核酸阳性的软腭扁桃体中存在 JEV 抗原阴性 CD163⁺阳性巨噬细胞(图 4-A)。JEV NS1'与 CD163⁺共定位细胞数量少于 JEV NS1'与 CD11b⁺共定位细胞。

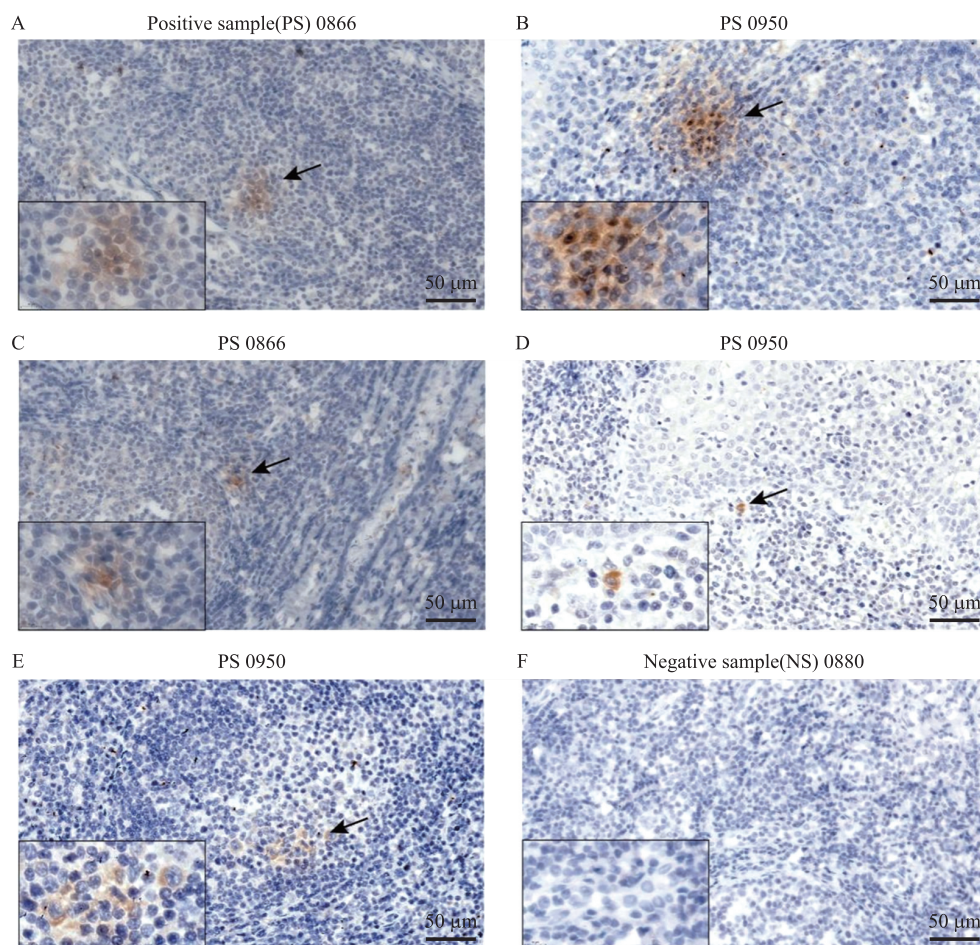


图3 JEV 阳性猪软腭扁桃体组织(JEV NS1'蛋白)免疫组化结果

Fig. 3 Immunohistochemistry results of piglet tonsils with JEV NS1' protein

A—E. JEV 阳性软腭扁桃体;F. JEV 阴性软腭扁桃体。箭头指示 JEV NS1'抗原阳性;方框内为局部放大。

A—E. JEV positive-pigs soft palate tonsils; F. JEV negative-pigs soft palate tonsils. Arrows indicate JEV NS1' antigen positivity; the box represents local enlargement.

上述结果表明在商品猪软腭扁桃体实质中 JEV 主要感染巨噬细胞和树突状细胞。JEV 感染影响巨噬细胞和树突状细胞的分布,使其从弥散的淋巴组织向淋巴滤泡靠近。

2.5 JEV 阳性猪软腭扁桃体中 MHC- II⁺细胞分布

巨噬细胞、树突状细胞和 B 细胞作为抗原加工提呈细胞均表达 MHC- II 类分子。B 细胞是扁桃体中数量最多的淋巴细胞^[17],B 细胞的增殖、分化和成熟是扁桃体产生抗体的基础。活化 B 细胞和记忆 B 细胞均表达 MHC- II 分子,而一旦转变为浆细胞后 MHC- II 表达逐渐下调^[18]。免疫荧光检测结果(图 5)表明 MHC- II⁺阳性细胞主要分布在淋巴滤泡内,这与扁桃体中 B 细胞分布在淋巴滤泡内的报道^[19]一致。此外,还有部分 MHC- II⁺阳性细胞零散分布在弥散的淋巴组织中。为了鉴定 JEV 能否在猪软腭扁桃体病毒阳性的细胞中复制,本试验选择 NS3 蛋白作为检测靶标。JEV 感染并未明显改变淋巴滤泡内 MHC- II⁺阳性细胞分布,JEV NS3 和 MHC- II 共定位细胞分布于淋巴滤泡边缘和周围弥散淋巴组织(图 5),表明这些细胞为巨噬细胞或树突状细胞,JEV 可在病毒阳性细胞内复制。

2.6 猪软腭扁桃体中 JEV 阳性细胞促炎状态分析

巨噬细胞活化分为 M1 型和 M2 型,在对抗病毒感染过程中 M1 型巨噬细胞诱导 TNF- α 、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)和 IL-6 等炎症介质表达^[20-21],促进 Th1 和 Th17 免疫反应。为分析 JEV 感染细胞是否会诱导炎症介质的表达,选择 TNF- α 和 iNOS 作为靶标进行免疫荧光分析与 JEV NS1'共定位情况。扁桃体内 iNOS 主要在巨噬细胞、树突状细胞和 T 细胞中表达,iNOS 是 M1 型巨噬细胞的标志物。试验结果表明 JEV NS1'与 iNOS 共定位,双阳性细胞分布在淋巴滤泡边缘附近和周围弥散的淋巴组织中。在 JEV 阴性的软腭扁桃体中 iNOS⁺阳性细胞也有分布,主要在滤泡周围弥散的淋巴组织中(图 6)。

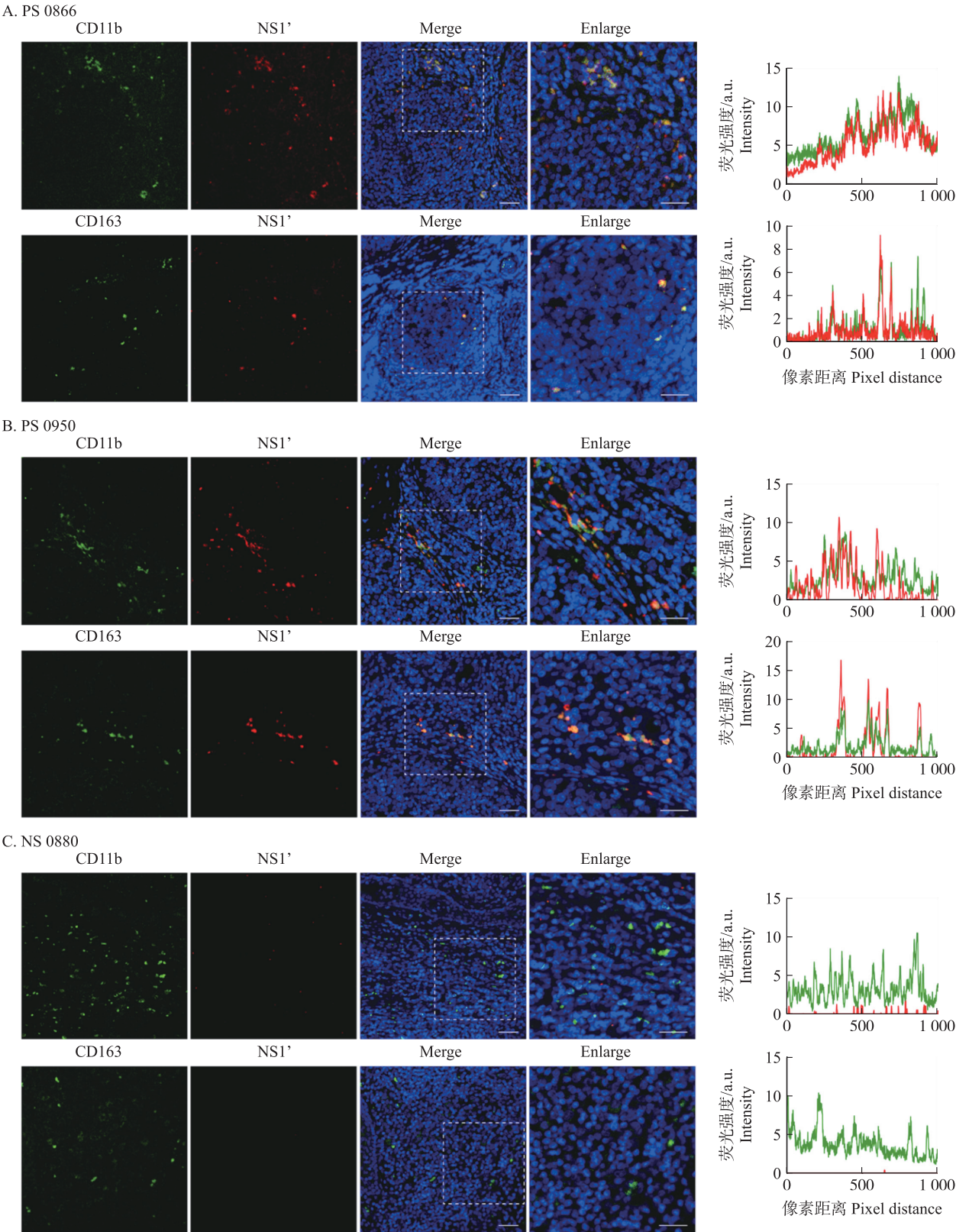


图 4 猪软腭扁桃体中 JEV 阳性细胞与 CD11b⁺、CD163⁺ 阳性细胞的间接免疫荧光检测 (IFA) 结果

Fig. 4 Indirect immunofluorescence (IFA) detect results of JEV-positive, CD11b⁺ and CD163⁺ cells in porcine soft palate tonsils

A~B. JEV 阳性软腭扁桃体;C. JEV 阴性软腭扁桃体。标尺代表 20 μm 。右图为针对左图虚框部位的荧光共定位分析图(下同)。

A~B. JEV positive-pigs soft palate tonsils;C. JEV negative-pigs soft palate tonsils.Scale bars represent 20 μm . The right figure shows the fluorescence colocalization analysis of the dashed box area in the left figure(The same below).

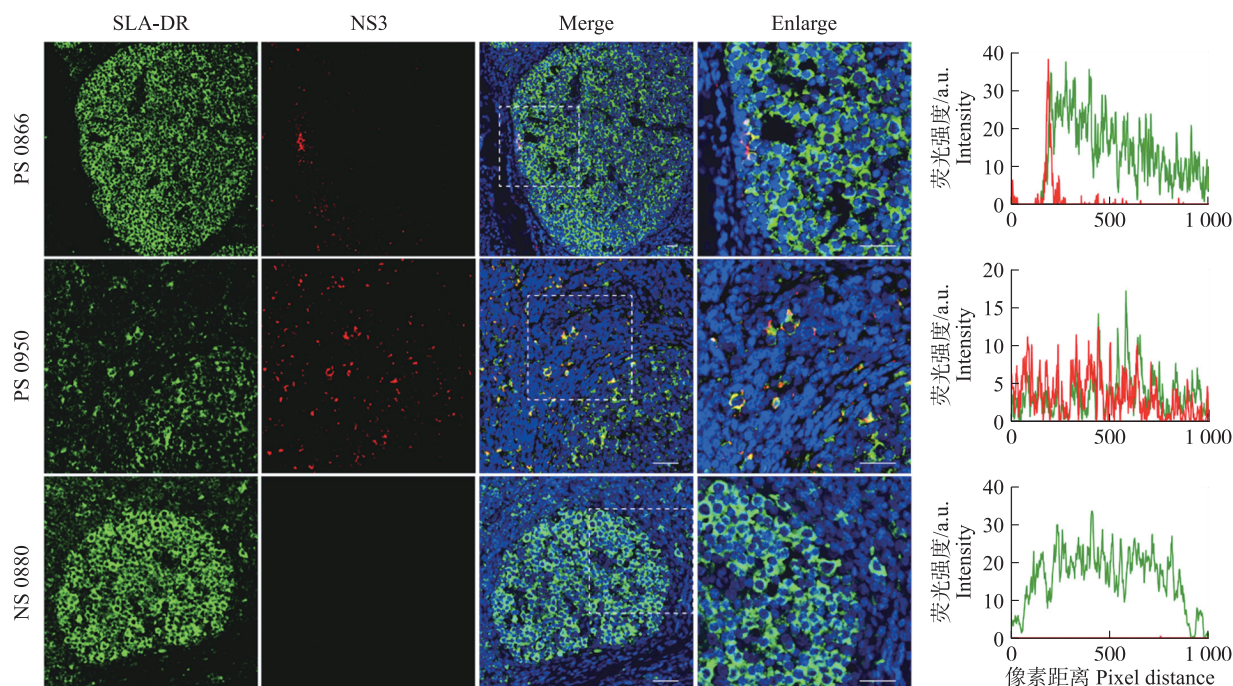


图5 猪软腭扁桃体中 JEV 阳性细胞与 MHC-Ⅱ⁺阳性细胞的 IFA 检测结果

Fig. 5 IFA detect results of JEV-positive and MHC-Ⅱ⁺ cells in porcine soft palate tonsils

标尺代表 20 μm。Scale bars represent 20 μm.

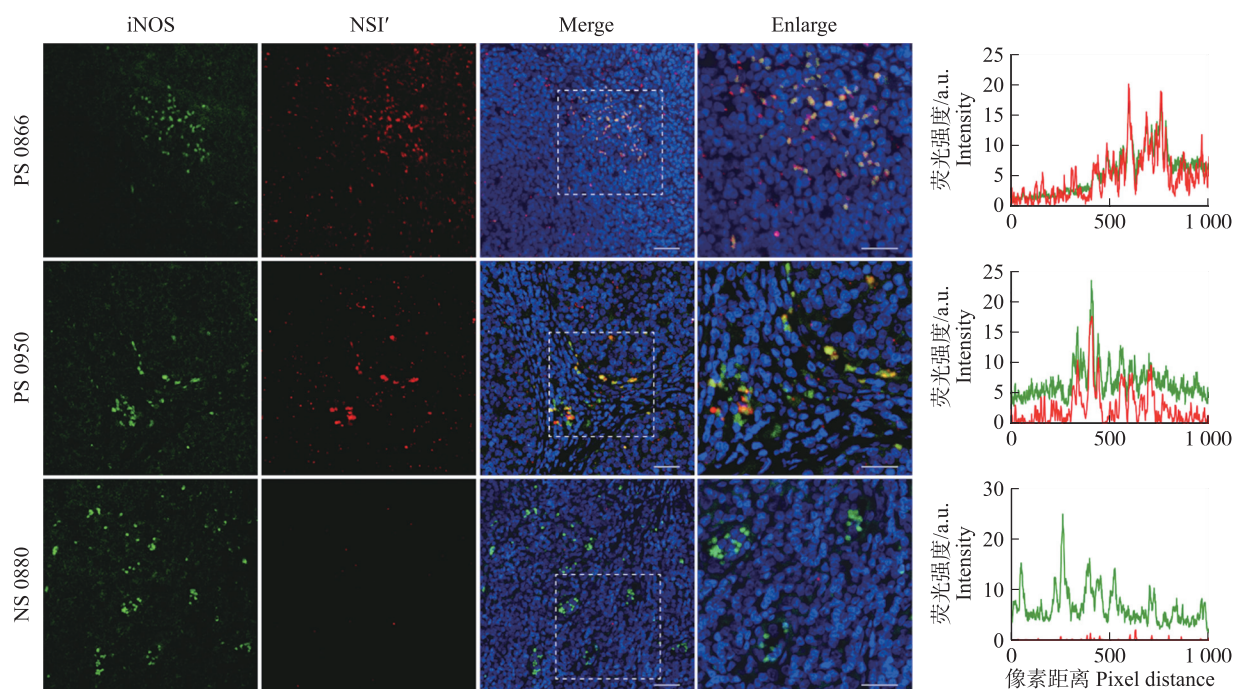


图6 猪软腭扁桃体中 JEV 阳性细胞与 iNOS⁺阳性细胞的 IFA 检测结果

Fig. 6 IFA detect results of JEV-positive and iNOS⁺ cells in porcine soft palate tonsils

标尺代表 20 μm。Scale bars represent 20 μm.

间接免疫荧光(IFA)检测结果(图7)表明,TNF- α 与JEV NSI'细胞共定位,其双阳性细胞在淋巴滤泡边缘和周围弥散的淋巴组织中均有分布。在JEV阴性软腭扁桃体的淋巴滤泡内也存在一些TNF- α ⁺阳性细胞。有研究报道包括巨噬细胞、树突状细胞、T细胞、B细胞、中性粒细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞、上皮细胞、成纤维细胞和平滑肌细胞等类型细胞均可表达TNF- α ^[22-23]。结合2.5节中淋巴滤泡内均为MHC-Ⅱ⁺阳性细胞,推测淋巴滤泡内的B细胞、巨噬细胞和树突状细胞均表达TNF- α 。JEV NSI'阳性细胞分别与iNOS和TNF- α 共定位,且二者双阳性细胞分布相似,表明JEV感染巨噬细胞引发M1极化。

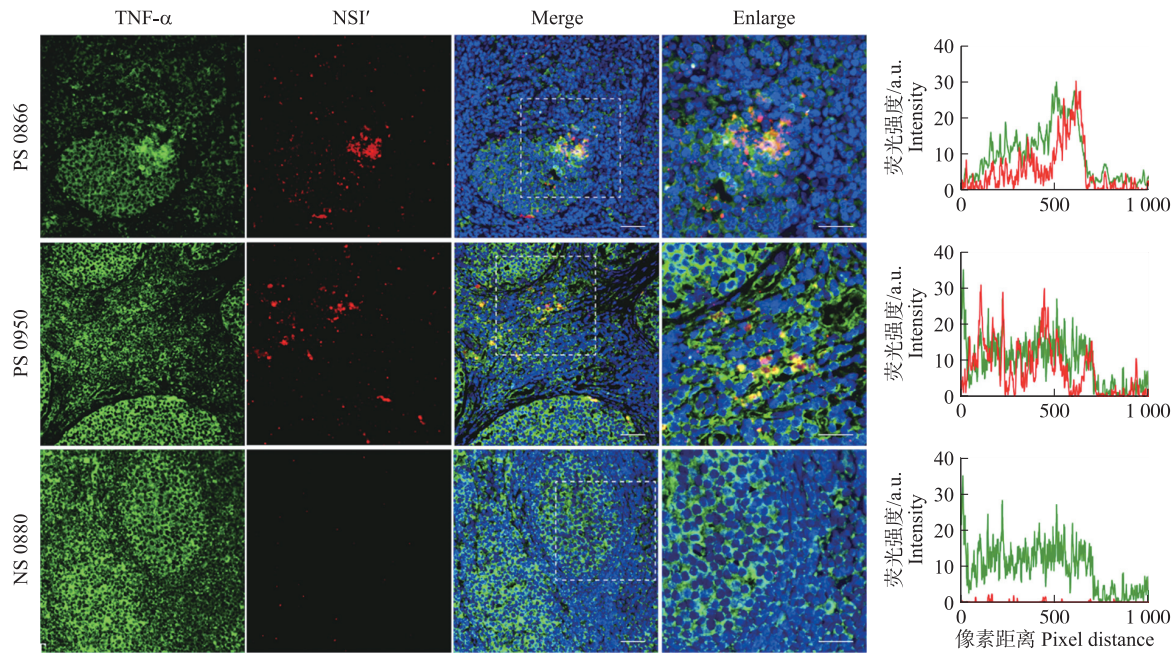


图 7 猪软腭扁桃体中 JEV 阳性细胞与 $\text{TNF-}\alpha^+$ 阳性细胞的 IFA 检测结果

Fig. 7 IFA detect results of JEV-positive and $\text{TNF-}\alpha^+$ cells in porcine soft palate tonsils

标尺代表 $20\text{ }\mu\text{m}$ 。Scale bars represent $20\text{ }\mu\text{m}$.

2.7 JEV 阳性猪软腭扁桃体中 CD3^+ 细胞分布

猪扁桃体作为次级淋巴器官,免疫细胞数量丰富,T 细胞含量仅次于 B 细胞^[17]。 CD3 存在于所有成熟的 T 细胞表面,可代表总 T 细胞。本试验进一步鉴定 JEV 感染是否影响软腭扁桃体中 CD3^+ T 细胞的数量与分布。IFA 结果(图 8)表明,在 JEV 阴性的软腭扁桃体中, CD3^+ T 细胞主要分布于淋巴滤泡间的弥散淋巴组织中,淋巴滤泡内也有分散的 CD3^+ 阳性 T 细胞。猪软腭扁桃体中 CD3^+ T 细胞分布与已报道的扁桃体中 T 细胞分布情况一致^[15,19]。虽然在 0866 样本弥散的淋巴组织中观测到相对较少的 CD3^+ T 细胞,但 JEV 感染并未明显改变 CD3^+ T 细胞分布。

值得一提的是,IFA 试验结果(图 8)表明 JEV NS3 与 CD3 也存在明显共定位,其双阳性细胞分布在淋巴滤泡外周的弥散淋巴组织中。这一发现与本文 2.3 节部分聚集分布的 10~20 个 JEV 阳性细胞形态结果一致,说明 JEV 在猪软腭扁桃体的微环境中可能会感染 T 细胞。

3 讨论

本研究通过采集屠宰场商品猪软腭扁桃体样本并进行 JEV 检测和分离鉴定,成功分离得到 2 株 JEV 毒株。2 株 JEV 均属于 G1 型,其 E 蛋白 129M 和 141I 属于 G1b 毒株的特征。近年来,G1 型是我国流行的 JEV 优势基因型,且多属于 G1b^[24],G1a 仅在我国云南省有过报道^[13]。通过免疫组化技术和免疫荧光试验发现 JEV 感染软腭扁桃体中的巨噬细胞和树突状细胞,诱导炎症介质 iNOS 和 $\text{TNF-}\alpha$ 表达,JEV 感染巨噬细胞引发 M1 极化。JEV 感染并未明显改变淋巴滤泡内 MHC-II^+ B 细胞和淋巴滤泡间 CD3^+ T 细胞分布。

JEV 感染人和多种动物呈现隐性感染的特征。JEV 感染商品化猪群通常没有明显的临床表现,只有感染处于特殊状态的猪群才表现出明显的发病。例如,处于性成熟的公猪感染 JEV 可能会出现睾丸炎,处于妊娠状态的母猪感染 JEV 可能会出现流产,但是否发病也受免疫状态和遗传多样性的影响。同样,JEV 感染儿童或免疫力低下的老年人可能导致部分个体表现为发病^[25],然而,JEV 感染青壮年人群通常没有明显的临床症状^[26]。JEV 感染人和猪群,其病毒血症持续时间通常为 3~5 d^[5],然后很快消失,因此从猪群采血检测 JEV 通常阳性率较低。本研究在健康商品猪软腭扁桃体中检测并分离到 JEV 表明,猪扁桃体是监测 JEV 流行的理想样品,这进一步验证了文献报道的 JEV 可在猪扁桃体持续感染的发现^[5]。与 JEV 感染人和小鼠引发中枢神经系统不可控制的炎症反应截然不同,9 周龄猪通过鼻腔或皮内接种 10^5TCID_{50} JEV 后不引起明显神经症状,核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体表达也并未上调^[27]。JEV 在猪群间水平传播隐蔽性强,不但威胁猪群安全,还给人类的公共卫生带来隐患。

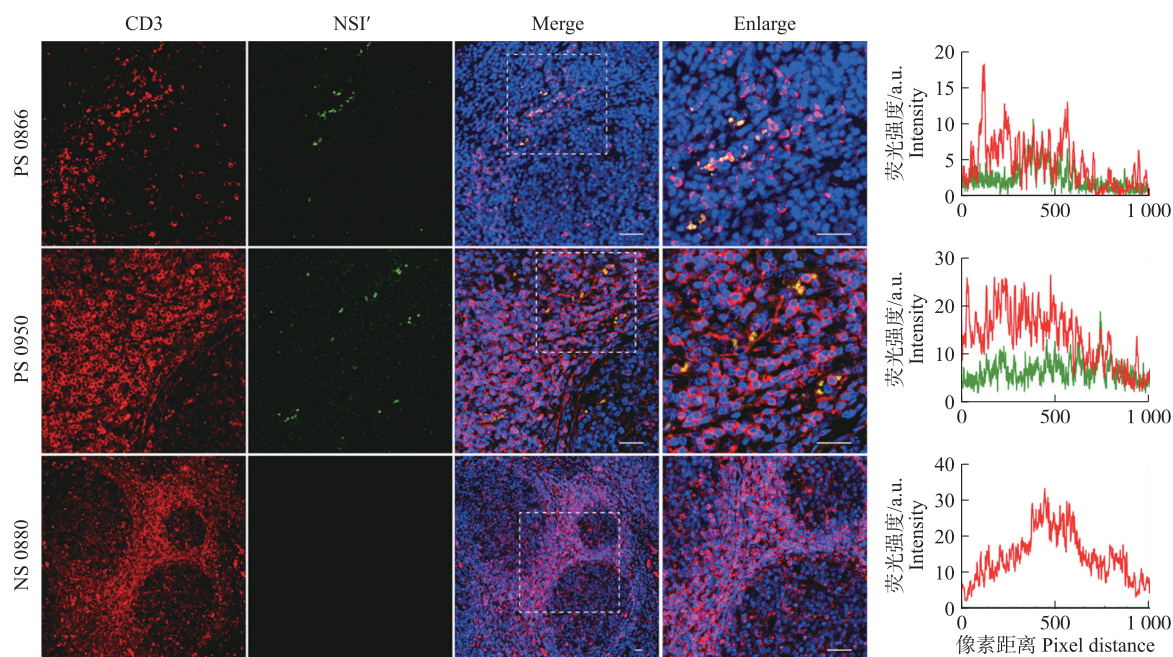


图8 猪软腭扁桃体中 JEV 阳性细胞与 CD3⁺ 阳性细胞的 IFA 检测结果

Fig. 8 IFA detect results of JEV-positive and CD3⁺ cells in porcine soft palate tonsils

标尺代表 20 μm 。Scale bars represent 20 μm .

Marti 等^[28]研究表明,GI 型 JEV 通过口鼻在猪群间水平传播 10 代后会增加其在猪体内的适应性,导致更高水平病毒血症,通过鼻黏膜分泌更多病毒。值得一提的是,高代次 JEV 感染猪后会引发更强的先天性免疫反应,不同代次 JEV 感染猪后引发的疾病临床特征基本相似^[28]。随着 JEV 在猪群水平传播的代次增多,E 蛋白会出现 M374L 适应性突变^[28]。比对本研究分离得到的 JEV 毒株 E 基因序列并未出现类似突变,提示这 2 株 JEV 在猪群间水平传播的代次有限。但目前尚未有研究表明蚊子获取猪适应性 JEV 的能力及对人致病性的影响,因此在猪场适当降低饲养密度的同时,仍应做好防蚊灭蚊工作。

JEV 感染猪,无论经蚊媒传播或经口鼻接触水平传播,其共同点都是对扁桃体和中枢神经系统有较强的嗜性。猪有 4 对扁桃体,均分布在口咽和鼻咽的黏膜中,类似于人类的韦氏环^[29],属于黏膜相关淋巴组织。在 JEV 入侵猪鼻黏膜过程中同样靶向单核-巨噬细胞。JEV 首先感染猪鼻黏膜上皮细胞后释放单核-巨噬细胞趋化因子诱导单核-巨噬细胞迁移到黏膜下层,JEV 感染单核-巨噬细胞后大量增殖^[30]。此外,Xi 等^[31]研究表明 JEV 能感染从仔猪扁桃体分离得到的上皮细胞,实现病毒复制。软腭扁桃体作为猪主要的扁桃体,是抵御病原入侵的重要屏障,在口腔或鼻腔免疫防御中具有重要作用。猪扁桃体随着年龄增长及外界刺激逐渐发育。Yang 等^[15]研究表明,随着猪日龄的增加,软腭扁桃体的复层鳞状上皮和淋巴层变得更厚,隐窝变得更深更复杂,树突状细胞、CD3⁺T 细胞和 IgA⁺B 细胞的数量持续增加。本研究发现 JEV 感染商品猪软腭扁桃体的靶细胞为巨噬细胞和树突状细胞,这与 JEV 感染仔猪软腭扁桃体的细胞嗜性一致^[11],表明在扁桃体发育过程中 JEV 的细胞嗜性并未改变。

NS1'是一种可分泌到细胞外的非结构蛋白^[4],软腭扁桃体中的 JEV NS1'阳性细胞有可能是主动吞噬 NS1'蛋白或病毒感染。淋巴滤泡边缘及周围弥散淋巴组织中 JEV NS3 和 MHC-II 共定位表明 JEV 在巨噬细胞或树突状细胞内复制。JEV 在猪扁桃体中长期定殖引发免疫逃逸并实现有效增殖是学术界持续关注的问题。本研究发现软腭扁桃体中 JEV 感染巨噬细胞和树突状细胞均表达 iNOS 和 TNF- α 炎症介质。M1 型巨噬细胞高表达 iNOS 可催化 L-精氨酸合成一氧化氮(NO)和 L-瓜氨酸,NO 作为一种活性氧可协助巨噬细胞抵抗多种病原入侵^[32-33]。另一方面,NO 可使 IRF5 Tyr74 和 Tyr104 硝基化从而干扰 IRF5 激活启动子的能力,从转录水平抑制巨噬细胞 M1 极化^[34-35]。JEV 感染可能诱导 iNOS 表达通过 NO 调控巨噬细胞的极化状态使 JEV 在巨噬细胞中低水平复制。相对于 JEV 阴性软腭扁桃体,JEV 感染并未明显改变淋巴滤泡内 MHC-II⁺B 细胞和淋巴滤泡间 CD3⁺T 细胞的分布,但仍需进一步验证 IgG⁺、IgA⁺B 细胞和 CD4⁺、CD8⁺T 细胞在软腭扁桃体中的分布。此外,Redant 等^[10]研究表明 JEV 阳性猪扁桃体不同类型 T 细胞数量相对于对照组明显下调,由此导致的适应性免疫减弱可能有利于 JEV 在巨噬细胞和树突状细胞中

定殖。

值得一提的是,本研究发现软腭扁桃体中 JEV NS3 阳性细胞与 CD3⁺T 细胞共定位,免疫组化结果也支撑了这一点。在软腭扁桃体中 JEV 感染细胞形式不唯一,除了单个或 3~5 个 JEV 阳性细胞零散分布外,还可见 10~20 个 JEV 阳性细胞聚集分布。在这种聚集分布的细胞中除去形态较大且不规则、颜色淡染的细胞核外,还存在形态较小染色较深的细胞核,推测为 T 细胞。Wang 等^[36]通过共培养的方式证明 DC-SIGN 可促进树突状细胞和 T 细胞间形成病毒突触从而介导 JEV 感染 T 细胞。此外,TNF- α 除了激活多种炎症信号通路外,还可改变细胞表面受体水平影响病毒的细胞嗜性^[37-38],或是 JEV 阳性细胞产生的 TNF- α 作用于临近 T 细胞,调控细胞表面 JEV 受体水平(例如 sTIM-1^[39-40])实现对 T 细胞的感染。

本研究采集的 20 份猪软腭扁桃体样本中检出 2 份 JEV 核酸阳性,检出率为 10%。本研究目的是检测并鉴定 JEV 感染商品猪软腭扁桃体的特性,由于采集样本量较少无法反映商品猪群中 JEV 流行情况,并且收集的临床样本只有软腭扁桃体,无法判定其他 3 对扁桃体是否存在 JEV 感染。杯状细胞分泌的黏液有利于病原微生物的黏附和排出,刘志学^[17]研究表明杯状细胞仅分布在咽扁桃体和咽鼓管扁桃体黏膜上皮之间,JEV 能否借助杯状细胞分泌的黏液从鼻咽部扁桃体排出,实现水平传播有待探究。此外,由于临床样本个体的复杂性并未排除是否有其他病原协同感染,JEV 在软腭扁桃体中的存在时间同样未知。总之,本研究证明 JEV 可感染商品猪软腭扁桃体的巨噬细胞和树突状细胞,将 JEV 列入猪扁桃体病原学检测指标对于保障猪群及相关人员安全具有重要意义。

参考文献 References:

- [1] 潘俊慧,刘亚林,梁真洁,等. 日本脑炎病毒 NS1 蛋白致脑血管内皮细胞损伤研究[J]. 南京农业大学学报,2023,46(6):1107-1115. DOI:10.7685/jnau.202206025.
Pan J H, Liu Y L, Liang Z J, et al. Study on injury of brain endothelium cell by Japanese encephalitis virus NS1 protein[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2023, 46(6): 1107-1115 (in Chinese with English abstract).
- [2] Postler T S, Beer M, Blitvich B J, et al. Renaming of the genus Flavivirus to Orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family Flaviviridae[J]. Archives of Virology, 2023, 168(9): 224.
- [3] Melian E B, Hinzman E, Nagasaki T, et al. NS1' of flaviviruses in the Japanese encephalitis virus serogroup is a product of ribosomal frameshifting and plays a role in viral neuroinvasiveness[J]. Journal of Virology, 2010, 84(3): 1641-1647.
- [4] Wang J M, Li X F, Gu J Y, et al. The A66G back mutation in NS2A of JEV SA14-14-2 strain contributes to production of NS1' protein and the secreted NS1' can be used for diagnostic biomarker for virulent virus infection[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2015, 36: 116-125.
- [5] Ricklin M E, García-Nicolás O, Brechbühl D, et al. Vector-free transmission and persistence of Japanese encephalitis virus in pigs[J]. Nature Communications, 2016, 7: 10832.
- [6] 翟新验,汪葆玥,李晓霞,等. 猪扁桃体病原学监测意义及采样技术[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(3): 105-107.
Zhai X Y, Wang B Y, Li X X, et al. Significance of pathogen monitoring and sampling technology of pig tonsil[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2015, 51(3): 105-107 (in Chinese).
- [7] 王卫国,何世成,王昌建,等. 屠宰猪常见病毒隐性感染情况的监测与分析[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(3): 10-11, 19.
Wang W G, He S C, Wang C J, et al. Surveillance and analysis on silent infection of common viruses in slaughtered pigs[J]. China Animal Health Inspection, 2016, 33(3): 10-11, 19 (in Chinese with English abstract).
- [8] Vargas-Bermudez D S, Mogollon J D, Franco-Rodriguez C, et al. The novel porcine parvoviruses: current state of knowledge and their possible implications in clinical syndromes in pigs[J]. Viruses, 2023, 15(12): 2398.
- [9] 卞晨. 江浙地区屠宰场猪链球菌流行病学调查及猪链球菌血清 7 型病原与耐药特征[D]. 南京:南京农业大学, 2021.
Bian C. The epidemiological survey of *Streptococcus Suis* from slaughterhouses in Jiangsu and Zhejiang Provinces and pathogenicity and antimicrobial resistance of *S. Suis* serotype 7[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [10] Redant V, Favoreel H W, Dallmeier K, et al. Japanese encephalitis virus persistence in porcine tonsils is associated with a weak induction of the innate immune response, an absence of IFN γ mRNA expression, and a decreased frequency of CD4⁺CD8⁺ double-positive T cells[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 834888.
- [11] 张秋婷,关如婷,潘俊慧,等. 日本脑炎病毒感染仔猪扁桃体的细胞嗜性研究[J]. 南京农业大学学报, 2021, 44(2): 315-321. DOI:10.7685/jnau.202002010.
Zhang Q T, Guan R T, Pan J H, et al. Cellular tropism of Japanese encephalitis virus in the tonsils of piglets[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2021, 44(2): 315-321 (in Chinese with English abstract).
- [12] Xie S D, Pan J H, Zhang Q T, et al. Japanese encephalitis virus (JEV) NS1' enhances the viral infection of dendritic cells (DCs) and macrophages in pig tonsils[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(4): e01147-e01122.
- [13] Li F, Feng Y, Wang G W, et al. Tracing the spatiotemporal phylodynamics of Japanese encephalitis virus genotype I throughout Asia and the western Pacific[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2023, 17(4): e0011192.

- [14] Sánchez C, Doménech N, Vázquez J, et al. The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation [J]. *Journal of Immunology*, 1999, 162(9): 5230–5237.
- [15] Yang Y H, Jing Y C, Wang J L, et al. Histological studies on the development of porcine tonsils after birth [J]. *Journal of Morphology*, 2018, 279(8): 1185–1193.
- [16] Bimczok D, Post A, Tschernig T, et al. Phenotype and distribution of dendritic cells in the porcine small intestinal and tracheal mucosa and their spatial relationship to epithelial cells [J]. *Cell and Tissue Research*, 2006, 325(3): 461–468.
- [17] 刘志学. 猪扁桃体组织形态学研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
Liu Z X. Study on the histomorphology of tonsils in pig [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008 (in Chinese with English abstract).
- [18] Duan M X, Nguyen D C, Joyner C J, et al. Understanding heterogeneity of human bone marrow plasma cell maturation and survival pathways by single-cell analyses [J]. *Cell Reports*, 2023, 42(7): 112682.
- [19] 葛振华, 林忠清, 王若愚. 人体正常扁桃体和淋巴结 T、B 淋巴细胞亚群的研究 [J]. *实验生物学报*, 1989, 22(1): 75–85.
Ge Z H, Lin Z Q, Wang R Y. A study of lymphocyte subsets in human normal tonsil and lymph node [J]. *Acta Biologica Experimentalis Sinica*, 1989, 22(1): 75–85 (in Chinese with English abstract).
- [20] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization; *in vivo* veritas [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122(3): 787–795.
- [21] Martinez F O, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages; an immunologic functional perspective [J]. *Annual Review of Immunology*, 2009, 27: 451–483.
- [22] Aggarwal B B. Signalling pathways of the TNF superfamily; a double-edged sword [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3(9): 745–756.
- [23] Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S I, et al. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents [J]. *Rheumatology*, 2010, 49(7): 1215–1228.
- [24] Gao X Y, Liu H, Li X L, et al. Changing geographic distribution of Japanese encephalitis virus genotypes, 1935–2017 [J]. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 2019, 19(1): 35–44.
- [25] 吴丹, 尹遵栋, 李军宏, 等. 中国 2014—2018 年流行性乙型脑炎流行病学特征 [J]. *中国疫苗和免疫*, 2020, 26(1): 1–4.
Wu D, Yin Z D, Li J H, et al. Epidemiology of Japanese encephalitis in China, 2014–2018 [J]. *Chinese Journal of Vaccines and Immunization*, 2020, 26(1): 1–4 (in Chinese).
- [26] Redant V, Favoreel H W, Dallmeier K, et al. Efficient control of Japanese encephalitis virus in the central nervous system of infected pigs occurs in the absence of a pronounced inflammatory immune response [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2020, 17: 315.
- [27] Marti A, Nater A, Magalhaes P J, et al. Fitness adaptations of Japanese encephalitis virus in pigs following vector-free serial passaging [J]. *PLoS Pathogens*, 2024, 20(8): e1012059.
- [28] Lee S J, Suh C W, Lee S I, et al. Clinical characteristics, pathological distribution, and prognostic factors in non-Hodgkin lymphoma of Waldeyer's ring: nationwide Korean study [J]. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 2014, 29(3): 352–360.
- [29] García-Nicolás O, Braun R O, Milona P, et al. Targeting of the nasal mucosa by Japanese encephalitis virus for non-vector-borne transmission [J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(24): e01091–e01018.
- [30] Xi S M, Liu K, Xiao C G, et al. Establishment and characterization of the pig tonsil epithelial (PT) cell line as a new model for persist infection of Japanese Encephalitis Virus [J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 242: 108587.
- [31] Bogdan C, Röhlhoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity; NO in innate immunity [J]. *Immunological Reviews*, 2000, 173(1): 17–26.
- [32] Uehara E U, de Stefano Shida B, de Brito C A. Role of nitric oxide in immune responses against viruses; beyond microbicidal activity [J]. *Inflammation Research*, 2015, 64(11): 845–852.
- [33] Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1–TH17 responses [J]. *Nature Immunology*, 2011, 12(3): 231–238.
- [34] Lu G M, Zhang R H, Geng S, et al. Myeloid cell-derived inducible nitric oxide synthase suppresses M1 macrophage polarization [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6676.
- [35] Wang P, Li M, Lu W, et al. DC-SIGN promotes Japanese encephalitis virus transmission from dendritic cells to T cells *via* virological synapses [J]. *Virologica Sinica*, 2017, 32(6): 495–502.
- [36] McFadden G, Mohamed M R, Rahman M M, et al. Cytokine determinants of viral tropism [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(9): 645–655.
- [37] Takano T, Hohdatsu T, Toda A, et al. TNF- α , produced by feline infectious peritonitis virus (FIPV)-infected macrophages, upregulates expression of type II FIPV receptor feline aminopeptidase N in feline macrophages [J]. *Virology*, 2007, 364(1): 64–72.
- [38] Jiao W L, Xie S D, Liang Z J, et al. P34L Mutation of swine TIM-1 enhances its ability to mediate Japanese encephalitis virus infection [J]. *Veterinary Microbiology*, 2022, 274: 109555.
- [39] 焦文龙, 杨兴森, 梁真洁, 等. 猪源 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白域蛋白-1 (TIM-1) 多克隆抗体制备与鉴定 [J]. *畜牧与兽医*, 2022, 54(10): 116–121.
Jiao W L, Yang X M, Liang Z J, et al. Preparation and identification of polyclonal antibody against swine TIM-1 protein [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 54(10): 116–121 (in Chinese with English abstract).