

不同剂量 CpG 序列对仔猪的免疫增强效果

田兴山, 张玲华, 邝哲师, 陈 薇, 李健雄

(广东省农业科学研究院 农业生物技术研究所, 广东 广州 510640)

摘要:以伪狂犬病毒为模式病毒,按照仔猪体重质量分别将 100、10、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CpG 序列同猪伪狂犬疫苗联合免疫接种仔猪,检测仔猪的体液及细胞免疫反应。试验结果表明:不同浓度的 CpG 序列均能显著提高仔猪的特异性抗体滴度、白细胞介素(IL)-2 诱生活活性以及淋巴细胞增殖反应,证明 CpG 序列能显著增强仔猪对常规疫苗的免疫应答能力。

关键词:胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸序列; 免疫应答; 仔猪; 伪狂犬病活疫苗

中图分类号:S852.52

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2004)01-0096-03

Effect of different dosages of CpG motifs on immune responses in piglets

TIAN Xing-shan, ZHANG Ling-hua, KUANG Zhe-shi, CHEN Wei, LI Jian-xiong

(Bio-Tech Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Piglets were inoculated with CpG motifs and pseudorabies attenuated vaccine simultaneously, the CpG motifs inoculation dosages were 100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The titer of specific antibodies to pseudorabies attenuated vaccine, the proliferation of lymphocytes and induced IL-2 activities were assessed. The results showed that the above-mentioned immune response of the piglets to vaccine with different dosages of CpG motifs added was significantly stronger than conventional immunization.

Key words: CpG motifs; immune response; piglets; pseudorabies attenuated vaccine

胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸(CpG)序列称为免疫刺激序列(immunostimulatory DNA sequence, ISS),是具有免疫刺激功能的 DNA 短序(CpGOND),一种非甲基化具有回文结构的六聚体,一般为 5'-嘌呤-嘌呤-CG-嘧啶-嘧啶-3' (如 5'-GACGTC-3', 5'-AGCGCT-3', 5'-AACGTT-3')。近来大量免疫学研究证实:含 CpG 基序的 DNA 分子具有以下免疫效果:(1)诱导 B 细胞增殖、分化、成熟和分泌免疫球蛋白;(2)抗诱生的细胞凋亡;(3)诱导单核细胞分泌白细胞介素(IL)-12 及其他细胞因子;(4)活化自然杀伤(NK)细胞的裂解活性和干扰素(IFN- γ)分泌。从而既能诱导强的体液免疫,又可以诱导细胞免疫和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应,唤醒机体先天性的免疫保护机制,国际上被称为第三代非特异性免疫增强剂^[1-3]。目前国内多数以小鼠和豚鼠作为研究对象,为了探讨不

同剂量 CpG 序列对仔猪常规疫苗(如伪狂犬疫苗)的免疫增强效果,本试验人工合成了 CpG 序列,以伪狂犬病毒为模式病毒,研究了不同剂量 CpG 序列对仔猪免疫系统和免疫应答的佐剂效应,为进一步研究畜禽常规疫苗的新型高效安全免疫佐剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 CpG 序列 自行设计具有 ISS 重复序列的 90 bp 的 CpG 序列,同时设计了扩增这一序列的 PCR 引物(由上海博亚生物技术公司合成),用 PCR 体外扩增合成的 CpG。

1.1.2 试验动物 仔猪,1 日龄,大白 $\times$ 长白二元杂交猪,体质量 1 kg,广东省农业科学院良种猪育种中心提供。

1.1.3 主要试剂 RPMI-1640 培养基(Gibco 公司, Cat NO: 1120708),植物血凝素(PHA,广州医药研究所,批号:20021010),淋巴细胞分离液(上海华精生物高科技发展公司,批号:20021107),伪狂犬病毒抗体检测试剂盒(IDEXX, Ser NO: 04-01452-03),伪狂犬病活疫苗(中国科学院哈尔滨兽医研究所,批号: 20021003),MTT(四甲基偶氮唑盐,Sigma 公司,编号: m2128).

1.2 方法

1.2.1 动物接种 大白×长白二元杂交仔猪 50 只,随机分成 5 组,每组 10 只. 采用滴鼻免疫仔猪. a 组:生理盐水组;b 组:伪狂犬病活疫苗组;c 组:100 μg/kg CpG 序列 + 伪狂犬病活疫苗组;d 组:10 μg/kg CpG 序列 + 伪狂犬病活疫苗组;e 组:1 μg/kg CpG 序列 + 伪狂犬病活疫苗组. 接种第 21 d(除 a、b 两组外)按照每组要求再次注射相应剂量的 CpG 序列(不再注射伪狂犬病活疫苗).

1.2.2 血样收集 分别在第 1、3、7、14、21、28、35 d 抽取血样,用于检测血清中的特异性抗体. 接种前从每组仔猪中随机挑选 5 只,接种后按计划从每组仔猪中随机选取 5 只,于前腔静脉取血,分离血清, - 20 ℃冻存,备用.

1.2.3 血清中抗原特异性抗体滴度的测定 按照 IDEXX 公司的伪狂犬病毒抗体检测试剂盒(Pseudorabies Virus Antibody Test Kit)说明书进行.

1.2.4 淋巴细胞增殖反应试验 无菌条件下用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,离心收集细胞,洗涤 2 次后,用完全 RPMI-1640 培养液悬浮细胞,细胞计数后,调节细胞数为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$. 将制备的仔猪淋巴细胞,加到 96 孔培养板中,每孔加 100 μL (细胞数为 1×10^5),向各孔内加入 PHA 至终质量浓度 10 μg/mL, 37 ℃、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养 21 h,每孔加入 10 μL MTT(5 mg/mL,溶于灭菌生理盐水),继续培养 1 h,加入 100 μL 酸化 SDS(质量分数为 10% SDS 溶于 0.01 mol/L HCl),充分混匀,以溶解甲臜颗粒. 用酶标仪以检测波长 570 nm 测定 $D_{570 \text{ nm}}$ 值,减去培养液对照 $D_{570 \text{ nm}}$ 值,即为待测样品 $D_{570 \text{ nm}}$ 值. 以刺激指数作为判断淋巴细胞转化程度的参数. 刺激指数 = 试验孔 $D_{570 \text{ nm}}$ 均值/对照孔 $D_{570 \text{ nm}}$ 均值^[4].

1.2.5 IL-2 活性测定 无菌条件下用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,离心收集细胞,洗涤 2 次后,用完全 RPMI-1640 培养液悬浮细胞,细胞计数后,调节细胞数为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$. 于 96 孔培养板中,加入 100 μL

细胞悬液,加入 PHA,37 ℃,体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,离心沉淀,收集上清, - 20 ℃冻存备用. 在 96 孔板中每孔加 100 μL 不同稀释度的 IL-2 待测样品,培养液对照和不同单位(U)IL-2 标准品对照,均做 3 复孔. 向各孔内加入 100 μL 检测细胞(CTLL-2 每孔细胞数 1×10^4),37 ℃,体积分数为 5% CO₂ 温箱中培养 21 h,每孔加入 10 μL MTT(5 mg/mL,溶于灭菌生理盐水),继续培养 1 h,加入 100 μL 酸化 SDS(质量分数为 10% SDS 溶于 0.01 mol/L HCl),充分混匀,以溶解甲臜颗粒. 用酶标仪检测 570 nm 波长处吸收值. 减去培养液对照的 $D_{570 \text{ nm}}$ 值,用 log₂ 稀释度(X)和各稀释度对应的 $D_{570 \text{ nm}}$ 值(Y)作直线回归. 按概率单位分析法计算待测样品的 IL-2 活性单位. 样品 IL-2 活性(U/mL) = (样品稀释度/标准品稀释度) × 标准品的 IL-2 活性单位^[4].

2 结果

2.1 免疫仔猪血清中的抗原特异性抗体滴度测定结果

仔猪免疫前及免疫后按计划静脉取血,分离血清,作适当稀释后,用伪狂犬病毒抗体检测试剂盒测定抗体滴度(表 1).

由表 1 可知,仔猪在免疫 3 d 后,b、c、d、e 组均检测到特异性抗体的滴度;抗体水平的趋势均是在第 3 d 就达到较高水平,到第 7 d 抗体滴度达到最高. 用 CpG 序列联合免疫仔猪在第 7 d 的抗体平均水平是伪狂犬病活疫苗单独免疫组的 3~5 倍,其中不同 CpG 序列的接种剂量,其免疫增强效果亦不同;10 μg/kg CpG 序列联合免疫组的抗体滴度水平最高. 在第 21 d 用 CpG 序列对 c、d、e 组进行二免后,该 3 组的特异性抗体滴度再一次提高,而对照组和伪狂犬病活疫苗组的抗体均保持较低. 由此可见,CpG 序列能有效地刺激猪伪狂犬抗原特异性抗体的表达.

表 1 不同免疫组仔猪血清中特异性抗体滴度

Tab. 1 Titres of specific antibodies in different groups of immunized piglets

组别	t/d						
group	0	3	7	14	21	28	35
a	160	100	80	50	50	50	50
b	200	400	500	200	100	100	100
c	160	2 000	2 400	1 200	400	800	400
d	200	1 800	2 500	1 600	400	1 000	400
e	160	1 000	1 600	1 000	300	700	300

2.2 免疫仔猪淋巴细胞增殖反应

试验结果如图1所示,在免疫的0~21 d内 CpG 序列联合免疫组(c、d、e组)淋巴细胞的刺激指数明显高于对照组(a组)和伪狂犬病活疫苗组(b组);在免疫第21 d再次注射 CpG 序列,注射后的第7 d 淋巴细胞的刺激指数又出现1个高峰,而伪狂犬病活疫苗组(b组)在14 d后淋巴细胞的刺激指数与空白对照组(a组)非常接近,始终保持在较低水平;在试验中使用不同接种剂量的 CpG 序列的免疫刺激效果虽然不同,但都比较接近,其中效果最佳的是c组。

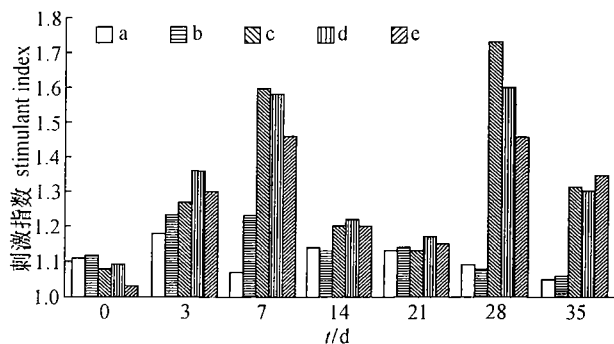


图1 不同免疫组仔猪淋巴细胞增殖反应

Fig. 1 Proliferation of lymphocytes in different groups of immunized piglets

2.3 免疫仔猪淋巴细胞 IL-2 诱生活性的变化情况

免疫后每组仔猪淋巴细胞 IL-2 诱生活性情况统计见图2。结果发现免疫仔猪淋巴细胞 IL-2 诱生活性的变化情况与免疫仔猪淋巴细胞增殖反应比较相似:在免疫的0~21 d内 CpG 序列联合免疫组(c、d、e组)IL-2 的诱生能力明显高于对照组(a组)和伪狂犬病活疫苗组(b组);在免疫第21 d再次注射 CpG 序列,注射后的第14 d IL-2 出现了高峰,而伪狂犬病活疫苗组(b组)在第14 d后 IL-2 水平与空白对照组(a组)非常接近,始终保持在较低水平;虽然c、d、e组使用不同接种剂量的 CpG 序列,但对 IL-2 的诱生能力都比较接近,效果最佳的是e组。

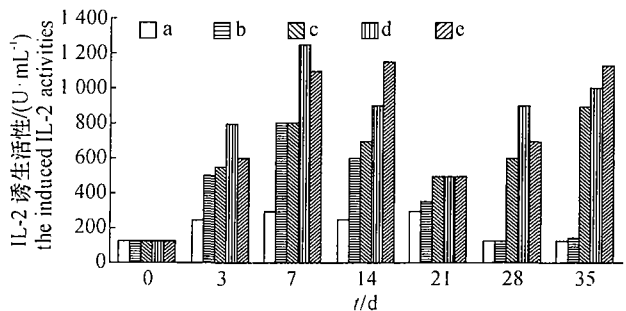


图2 不同免疫组仔猪淋巴细胞 IL-2 诱生活性

Fig. 2 Induced IL-2 activities in different groups of immunized piglets

3 讨论

早在80年代中期,Tokunaga等^[5]发现牛分枝杆菌卡介苗中分离的DNA有很强的抗肿瘤活性,这种活性是通过DNA中具有特征性结构的免疫序列(CpG序列)激活多种免疫细胞的。近年来的研究证实,CpG序列能直接促进树突状细胞、巨噬细胞等抗原呈递细胞的成熟与分化,以及IL-2、IL-12、IL-18、IFN-2等Th1型细胞因子的分泌,从而诱导特异性CTL应答反应^[6-7]。CpG序列是近年来众多学者研究的热点,已证明是一种免疫佐剂,现多数将小鼠和豚鼠作为研究对象,其应用研究主要集中于人类疾病的DNA疫苗方面。本试验以伪狂犬病毒为模式病毒,探讨了不同剂量的CpG序列对仔猪免疫活性的影响。结果发现:3个联合免疫组的特异性抗体滴度、淋巴细胞增殖反应和IL-2诱生活性明显增强,3组的CpG序列接种剂量虽然相差较大(c组接种剂量高达100 µg/kg,e组接种剂量低至1 µg/kg),均能显著提高仔猪对常规疫苗(伪狂犬病活疫苗)的体液和细胞免疫应答。

本试验结果提示CpG序列有希望成为高效安全的新颖动物疫苗免疫增强剂。

参考文献:

- [1] KRIEG A M, YI A K, KLINMAN D M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation[J]. *Nature*, 1995, 374: 546 - 549.
- [2] KLINMAN D M, YI A K, BEAUCAGE S L, et al. CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon γ [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 879 - 883.
- [3] KLINMAN D M, YAMSHCHIKOV G, ISHIGATSUBO Y. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines[J]. *J Immunol*, 1997, 158(8): 3 635 - 3 655.
- [4] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002. 336 - 337, 396 - 397.
- [5] TOKUNAGA T, YAMAMOTO H, SHIMADA S, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from mycobacterium bovis BCG isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1984, 72: 955 - 962.
- [6] 于冬冬, 于修平. CpG特征结构的免疫效应及应用研究[J]. *国外医学病毒学分册*, 2000, 7(4): 117 - 120.
- [7] CHU R S, TARGONI O S, KRIEG A M, et al. CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity[J]. *J Exp Med*, 1997, 186(10): 1 623 - 1 631.

【责任编辑 柴 焰】