

邹舒展, 李冰, 陈安妮, 等. 3 种免疫增强剂对猪伪狂犬灭活疫苗的免疫效果评价[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(4): 1-6.

3 种免疫增强剂对猪伪狂犬灭活疫苗的 免疫效果评价

邹舒展, 李 冰, 陈安妮, 吴佳骏, 姜 增, 罗满林
(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】评价盐酸左旋咪唑 (LH)、刀豆素 (ConA) 和胞壁酰二肽 (MDP) 3 种免疫增强剂对猪伪狂犬病毒 (PRV) 灭活疫苗的免疫增强作用。【方法】将免疫增强剂混入灭活的 PRV 水相, 和油相乳化后制成相应含有免疫增强剂的灭活疫苗, 使各免疫增强剂终剂量为: LH 7.5 mg·mL⁻¹、ConA 25.0 mg·mL⁻¹、MDP 150.0 mg·mL⁻¹。首次免疫后 14 d 进行二次免疫, 首次免疫后 14 d、二次免疫后 7 和 14 d 采取小鼠血清, 检测相关的细胞因子和特异性抗体水平, 并在二次免疫后 14 d 攻毒, 计算最终的攻毒保护率。【结果】相对于白油组, ConA 组和 MDP 组在二次免疫后 14 d 对小鼠白介素 2(IL-2) 含量提升效果极显著; LH 组在首次免疫后 14 d、MDP 组在二次免疫后 14 d 对白介素 4(IL-4) 含量提升效果显著; 3 种免疫增强剂分别在二次免疫后 14 和 7 d 对干扰素 (IFN-γ) 和特异性抗体含量提升效果极显著, 并提高了攻毒保护率, LH 组和 ConA 组存活率为 20%, MDP 组存活率为 60%。【结论】3 种免疫增强剂使用试验剂量均能不同程度地提升猪伪狂犬灭活疫苗的免疫效果, 具有较好的应用前景。本研究结果为后续复合免疫增强剂筛选打下了基础。

关键词: 免疫增强剂; 猪伪狂犬灭活疫苗; 免疫增强效果; 攻毒保护率
中图分类号: S851.3; S855 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2018)04-0001-06

Evaluation of the immune effects of three immunopotentiators on pseudorabies virus inactivated vaccine

ZOU Shuzhan, LI Bing, CHEN Anni, WU Jiajun, JIANG Zeng, LUO Manlin
(College of Veterinary, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To evaluate the immunopotential effects of levamisole hydrochloride (LH), concanavalin A (ConA) and muramyl dipeptide (MDP) on pseudorabies virus (PRV) inactivated vaccine. 【Method】The immunopotentiators were mixed into inactivated PRV virus aqueous phase, and emulsified with oil phase to make inactivated vaccines containing immunopotentiators. The final concentrations of immunopotentiators were LH 7.5 mg·mL⁻¹, ConA 25.0 mg·mL⁻¹ and MDP 150.0 mg·mL⁻¹ respectively. The second immunization was on the 14th day after the first immunization. Mouse serum samples were collected on the 14th day after the first immunization, 7th and 14th day after the second immunization to detect relative cytokines (IL-2, IL-4, IFN-γ) and specific antibody levels. On the 14th day after the second immunization, all mice were attacked and the final attack protective rate was calculated. 【Result】Compared to Baiyou group, ConA and MDP groups extremely significantly improved IL-2 content in mouse serum on the 14th day after the

second immunization. LH group significantly improved IL-4 content on the 14th day after the first immunization, and MDP group significantly improved IL-4 content on the 14th day after the second immunization. The three immunopotentiators extremely significantly enhanced IFN- γ contents and specific antibody levels on the 14th and 7th day after the second immunization respectively, and also improved the attack protective rates. The survival rates of LH and ConA groups were 20%, while that of MDP group was 60%.
【Conclusion】 Three immunopotentiators within the range of the experimental dosages can enhance the immune effects of PRV inactivated vaccine in varying degrees.

Key words: immunopotentiator; pseudorabies virus inactivated vaccine; immune enhancement effect; attack protective rate

相对于弱毒活疫苗,灭活疫苗安全性更好,但很难诱导细胞免疫反应。研究证明,使用免疫增强剂能够有效提升灭活疫苗的细胞免疫指标从而提高疫苗的保护效果^[1]。免疫增强剂是一类单独或与抗原配合使用,通过提升机体免疫系统对抗原或免疫原的免疫应答反应或改变免疫应答类型,从而增强动物机体免疫应答的物质。自 1925 年法国免疫学家拉蒙 (Gaston Ramon) 发现在疫苗中加入某些物质可以特异性地增强机体的免疫应答反应以来,医学和兽医学界对免疫增强剂开展了不同程度的研究,兽用疫苗中一部分免疫增强剂如猪支原体疫苗佐剂 Amphigen[®]等已经商品化^[2]。细胞因子作为一种重要的免疫调节因子,在机体免疫网络中发挥着重要的传递信号的作用,可以作为疫苗免疫效果的评价指标之一^[3]。

盐酸左旋咪唑 (Levamisole hydrochloride, LH) 作为驱虫剂使用,具有免疫调节功能,是一种使用范围较广的免疫增强剂^[4-5]。刀豆素 (Concanavalin A, ConA) 具有广谱抗病毒作用,对细菌性疾病也有治疗作用^[6-7]。胞壁酰二肽 (Muramyl dipeptide, MDP) 具有很强的佐剂活性,能增强体液免疫和细胞免疫,提高疫苗、菌苗、病毒亚单位及寄生虫苗的保护力^[8-9]。因此,本研究以这 3 种免疫增强剂为材料进行免疫效果的对比。

本试验以猪伪狂犬灭活疫苗为例,在小鼠模型上进行免疫效果评估,为后续筛选复合免疫增强剂及进行猪体试验提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物

18~22 g 4 周龄雌性昆明小鼠,购于南方医科大学实验动物中心。

1.2 试验材料

猪伪狂犬病毒 (Psuedorabies virus, PRV) 强毒

株 QY 株^[10]为华南农业大学兽医学院传染病教研室保存,病毒效价为 $10^{8.5}$ TCID₅₀·mL⁻¹; LH、ConA 和 MDP 分别购自广州昂科生物科技有限公司、天行健生物科技有限公司和湖北拓楚慷元医药化工有限公司。

1.3 试剂和试剂盒

DMEM 高糖细胞培养液、w 为 0.25% 的细胞胰酶消化液、胎牛血清和 PRV 的 ELISA 抗体检测试剂盒均购自武汉科前生物股份有限公司;小鼠白介素 2(IL-2)、白介素 4(IL-4) 和干扰素 γ (IFN- γ) 的 ELISA 检测试剂盒均购自欣博盛生物科技有限公司;HRP 标记羊抗鼠二抗购自 bioWORLD 公司;白油、SPAN-80、硬脂酸铝、吐温-80 和其他常用试剂均为国产分析纯。

1.4 免疫增强剂剂量确定

在预备试验中,每种药物设计低、中、高剂量进行小鼠的免疫增强试验 (表 1),筛选出各免疫增强剂作为灭活疫苗免疫增强剂的最佳应用剂量,分别为: LH 7.5 mg·mL⁻¹、ConA 25.0 mg·mL⁻¹、MDP 150.0 mg·mL⁻¹。

表 1 3 种免疫增强剂剂量设计

Table 1 Dose designs of three immunopotentiators

免疫增强剂	$\rho/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$		
	低	中	高
盐酸左旋咪唑(LH)	7.5	22.5	67.5
刀豆素(ConA)	25.0	75.0	225.0
胞壁酰二肽(MDP)	37.5	75.0	150.0

1.5 疫苗制备

灭活疫苗制备参照裴春生等^[11]的方法,具体制备步骤为:将增强剂混入含灭活 PRV 病毒的水相,然后与油相乳化,使免疫增强剂的最终剂量为设计剂量,制成相应的灭活疫苗。其中水相灭活后抗原剂量为 63.94 ng·L⁻¹。

1.6 小鼠分组与免疫

将 25 只 SPF 级雌性昆明小鼠随机分成 5 组, 每组 5 只, 设对照组、白油组和免疫增强剂组。3 种免疫增强剂各成 1 组, 即 LH 低剂量组、ConA 低剂量组和 MDP 高剂量组。

免疫程序: 白油组和免疫增强剂组在每只小鼠腿部肌肉注射 100 μL 相应的灭活疫苗, 对照组在相同部位注射 100 μL PBS 缓冲液, 14 d 后二次免疫。各组小鼠分别于首次免疫后 14 d, 二次免疫后 7、14 d 断尾采血, 用 ELISA 试剂盒检测血清中各细胞因子 (IL-2、IL-4 和 IFN- γ) 含量变化和 PRV 特异性抗体水平。二次免疫后 14 d 攻毒, 每只小鼠腹腔注射 100 μL 10^5 LD₅₀PRV 强毒株, 观察小鼠生活状态, 记录死亡时间并计算攻毒保护率。

1.7 小鼠血清细胞因子含量与 PRV 抗体水平检测

1.7.1 小鼠血清 IL-2、IL-4 及 IFN- γ 含量测定 密封的孔板恢复室温后, 解封; 设置空白孔、标准孔和样品孔, 空白孔加 100 μL 标准品和标本通用稀释液, 标准孔加相应的标准品, 样品孔加 20 μL 样品和 80 μL 稀释液, 用封板胶纸将反应孔封住, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 90 min, 然后用洗涤液洗板 5 次, 拍干; 空白孔加 100 μL 生物素化抗体稀释液, 标准孔和样品孔加 100 μL 生物素化抗体工作液, 用新封板胶纸将反应孔封住, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 60 min, 用洗涤液洗板 5 次, 拍干; 空白孔加 100 μL 酶结合物稀释液, 标准孔和样品孔加 100 μL 酶结合物工作液, 用新封板胶纸封住反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱避光孵育 30 min, 用洗涤液洗板 5 次, 拍干; 提前打开酶标仪电源, 仪器预热, 并设置检测程序, 每孔加 100 μL 显色底物

(TMB), 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱避光孵育 15 min, 每孔加 100 μL 终止液, 混匀后立即测量孔板的 $D_{450\text{ nm}}$ 值。

1.7.2 小鼠血清 PRV 抗体水平检测 将 PRV 的 ELISA 抗体检测试剂盒中的二抗换成 HRP-羊抗鼠 IgG 来测定小鼠血清中的 PRV 抗体, 经试验, 二抗最适稀释度为 1:8 000, 同时将原有 AB 液显色更换为 TMB 显色, 测 $D_{450\text{ nm}}$ 值。具体检测步骤如下: 按照需求数量拆抗原包被板, 稀释好的待检血清样品和对照血清各取 100 μL 加入抗原包被板孔中, 待检样品设 1 孔, 阴性、阳性对照各设 2 孔, 轻轻震荡孔板, 使孔中样品混匀, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱温育 45 min; 弃孔中液体, 每孔加 300 μL 洗涤液, 静置 3 min 后弃洗涤液, 在吸水纸上拍干, 共计洗涤 5 次; 每孔加稀释度为 1:8 000 的 HRP-羊抗鼠 IgG 100 μL , 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱温育 30 min; 弃孔中液体, 每孔加 300 μL 洗涤液, 静置 3 min 后弃洗涤液, 在吸水纸上拍干, 共计洗涤 5 次; 每孔加显色液 (TMB) 100 μL , 混匀后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱避光显色 10 min; 每孔加 50 μL 终止液, 10 min 内测定 $D_{450\text{ nm}}$ 值。因二抗更换, 检测结果为抗体滴度, 用 $D_{450\text{ nm}}$ 值表示。

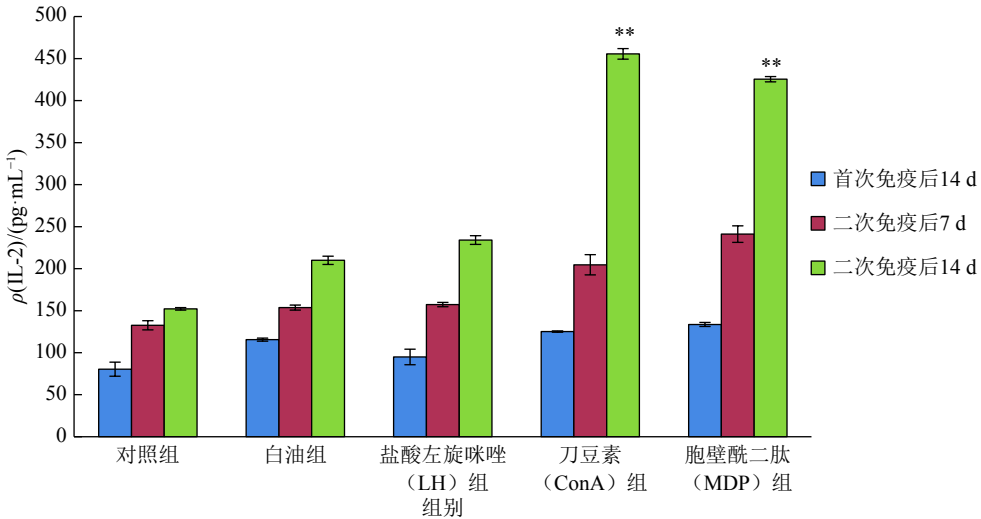
1.8 数据分析

数据均以平均值 $\pm$ 标准差表示, 用 SPSS 17.0 软件进行统计分析比较。处理间差异显著性分析采用 t 检验法, 以 $P<0.01$ 或 $P<0.05$ 为有显著差异。

2 结果与分析

2.1 小鼠血清 IL-2 含量

从图 1 可看出, 各组小鼠血清中 IL-2 含量均随时间推移而增加。以二次免疫后 14 d 做比较, 相对



相同颜色柱子上“***”表示与白油组相比, 差异达到 0.01 的显著水平 (t 检验)

图 1 小鼠血清中 IL-2 含量

Fig. 1 The content of IL-2 in mouse serum

于对照组,白油组和免疫增强剂组对小鼠血清中 IL-2 含量提升效果明显;相对于白油组,ConA 组和 MDP 组对小鼠血清中 IL-2 含量提升效果极显著 ($P<0.01$),其中,ConA 组小鼠血清 IL-2 含量为 $455.58\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$,MDP 组 IL-2 含量为 $425.41\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$,LH 组对 IL-2 含量的提升效果不明显。

2.2 小鼠血清 IL-4 含量

从图 2 可看出,白油组和免疫增强剂组对小鼠血清中 IL-4 含量均有提升效果。LH 组在首次免疫后 14 d 提升效果最佳,相比其他组差异显著 ($P<0.05$),IL-4 含量为 $32.43\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$,二次免疫后 14 d 恢复到正常水平。白油组、ConA 组和 MDP 组的提升效果在二次免疫后 14 d 较好,且 MDP 组效果最

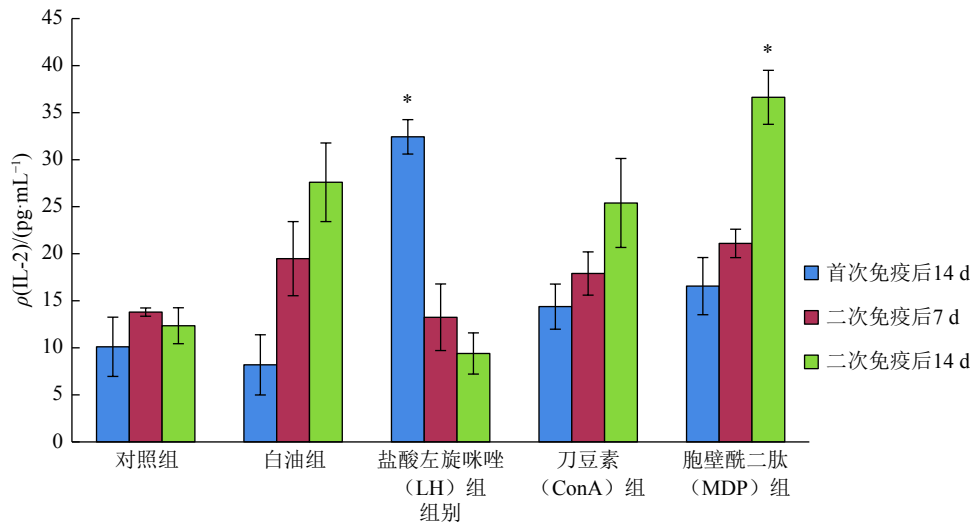
优,相对于白油组有显著提升 ($P<0.05$),IL-4 含量为 $36.63\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 小鼠血清 IFN- γ 含量

从图 3 可看出,各组小鼠血清中 IFN- γ 含量随时间呈递增趋势,二次免疫后 14 d,白油组和免疫增强剂组提升效果明显。相对于白油组,免疫增强剂组提升效果极显著 ($P<0.01$),含量分别为 LH 组 $227.88\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、ConA 组 $218.42\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、MDP 组 $237.16\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$,免疫增强剂组组间提升效果差异不明显。

2.4 小鼠血清 PRV 抗体含量

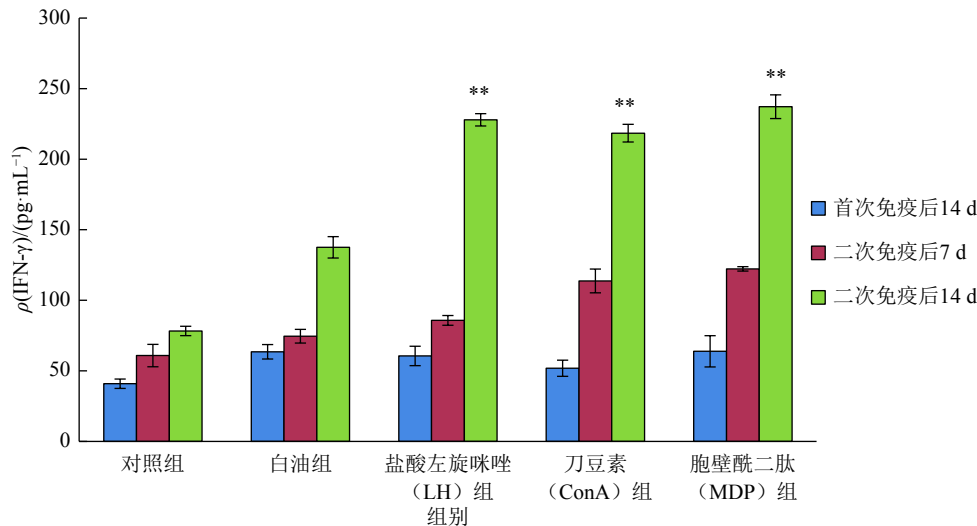
从图 4 可看出,相对于对照组,白油组和免疫增强剂组抗体水平均有明显提高,且免疫增强剂组



相同颜色柱子上“*”表示与白油组相比,差异达到 0.05 的显著水平 (t 检验)

图 2 小鼠血清中 IL-4 含量

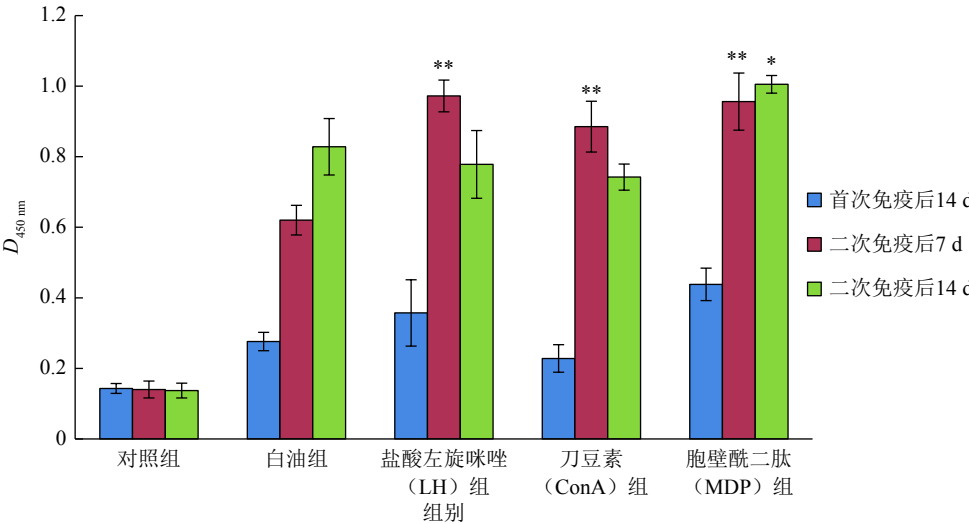
Fig. 2 The content of IL-4 in mouse serum



相同颜色柱子上“**”表示与白油组相比,差异达到 0.01 的显著水平 (t 检验)

图 3 小鼠血清中 IFN- γ 含量

Fig. 3 The content of IFN- γ in mouse serum



相同颜色柱子上“*”、“**”分别表示与白油组相比, 差异达到 0.05、0.01 的显著水平 (*t* 检验)

图 4 小鼠血清中猪伪狂犬病毒抗体含量

Fig. 4 The content of pseudorabies virus antibody in mouse serum

效果较优。二次免疫后 7 d, 免疫增强剂组抗体水平较白油组提升极显著 ($P<0.01$), LH 和 MDP 组效果优于 ConA 组, 此时各组 $D_{450\text{ nm}}$ 值分别为 LH 组 0.972、ConA 组 0.885、MDP 组 0.956。二次免疫后 14 d, 白油组和 MDP 组抗体含量达较高水平, LH 组和 ConA 组抗体水平较二次免疫后 7 d 有所下降且低于白油组, 此时所有组别中, MDP 组对抗体含量提升效果最好, $D_{450\text{ nm}}$ 值为 1.005, 较白油组提升效果显著 ($P<0.05$)。

2.5 攻毒保护率

试验过程中以小鼠是否出现奇痒、废食以及被毛糙乱等症状判定发病与否。

从表 2 可看出, 攻毒后, 对照组、白油组和 ConA 组小鼠全部发病, LH 组和 MDP 组发病率较低。对照组小鼠死亡速度最快, 72 h 内全部死亡。相对于免疫增强剂组, 白油组小鼠死亡速度稍快, 120 h 内全部死亡。LH 组和 ConA 组最终存活率一致, 但 ConA 组发病率高于 LH 组。MDP 组

效果最好, 发病率最低, 小鼠死亡速度最慢, 存活率最高。

3 讨论与结论

本研究在猪伪狂犬灭活疫苗中加入所选的 3 种免疫增强剂, 使用文中所述剂量均有较好的免疫增强效果。免疫增强剂组在提升抗体水平的速度和质量上明显优于白油组, 说明所选免疫增强剂与猪伪狂犬灭活疫苗联用后可以刺激机体产生更强的体液免疫应答, 使机体产生更多的特异性抗体。除此之外, 相对于白油组, 小鼠血清中 IL-2、IL-4、IFN- γ 和 PRV 抗体含量明显升高, 说明所选免疫增强剂与疫苗联用能增强机体的细胞免疫应答, IFN- γ 等细胞因子含量的提高使 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ T 细胞数量增多, 从而增强机体抗病毒感染的能力^[12]。

机体 Th1 细胞主要分泌 IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、TNF- α 和 IFN- γ 等细胞因子, 具有激活巨噬细胞并增强吞噬病原微生物的能力。Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 及 IL-13 等细胞因子, 具有促进嗜酸性粒细胞激活和分化的能力。Th1 和 Th2 细胞分泌的细胞因子在体内具交互抑制作用。Th1 分泌的 IFN- γ 等细胞因子可促进 Th1 型细胞的增殖分化, 却抑制 Th2 型细胞的分化; Th2 细胞分泌的 IL-4 也会抑制 Th1 型细胞的生成^[13]。本研究 LH 组首次免疫后 14 d 小鼠血清中 IL-4 含量明显高于 ConA 组和 MDP 组, 而 IL-2 含量提升速度较慢; ConA 组和 MDP 组小鼠血清中 IL-4 含量提升速度较慢, 而 IL-2 含量提升速度较快, 这可能与 Th1 和 Th2 细胞分泌的细胞因子的相互调节有关^[3]。

表 2 添加了免疫增强剂的猪伪狂犬灭活疫苗的攻毒保护率
Table 2 The attack protective rates of pseudorabies virus inactivated vaccines containing immunopotentiators

组别	小鼠死亡数量/只				发病 率/%	存活 率/%
	48 h	72 h	96 h	120 h		
对照组	4	1			100	0
白油组		2	2	1	100	0
盐酸左旋咪唑组		1	1	2	80	20
刀豆素组		1	1	2	100	20
胞壁酰二肽组			1	1	40	60

攻毒保护率可以最直观地评价免疫增强剂和疫苗的免疫效果。本研究 3 种免疫增强剂均能在一定程度上提高疫苗的攻毒保护率, 其中 MDP 组效果最优, 显著降低发病率和死亡率, 这可能与免疫增强剂组小鼠相应细胞因子及抗体水平的提升相关。LH 组和 ConA 组攻毒保护效果较差, 可能与后期特异性抗体水平下降有关, 推测 LH 和 ConA 可能会影响油乳疫苗的稳定性, 从而导致疫苗抗体水平下降较快, 其中机理有待探讨。

总体来说, 所选 3 种免疫增强剂在各自最佳使用剂量与猪伪狂犬灭活疫苗联用的效果明显优于常规免疫, 其中 MDP 的免疫增强效果最好, 且本试验使用剂量在小鼠上未出现相关毒副作用, 证明 3 种免疫增强剂具有应用前景。本研究为后续复合免疫增强剂筛选打下了基础。

参考文献:

- [1] AKIRA S, TAKEDA K, KAISHO T. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity[J]. Nat Immunol, 2001, 2(8): 675-680.
- [2] KRISTENSEN C S, ANDREASEN M, ERSBØLL A K, et al. Antibody response in sows and piglets following vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae*, toxigenic *Pasteurella multocida*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. Can J Vet Res, 2004, 68(1): 66-70.
- [3] FISCHER T, BÜTTNER M, RZIHA H J. T helper 1-type cytokine transcription in peripheral blood mononuclear cells of pseudorabies virus (*Suid herpesvirus 1*)-primed swine indicates efficient immunization[J]. Immunology, 2000, 101(3): 378-387.
- [4] 李向东, 王莹, 苏培, 等. 盐酸左旋咪唑栓免疫调节作用的临床观察[J]. 天津药学, 2000, 12(2): 44-45.
- [5] 牛华星, 李淑花, 张传津, 等. 盐酸左旋咪唑-维生素 E 可溶性粉对鸡免疫功能增强作用研究[J]. 山东畜牧兽医, 2009, 30(8): 3-5.
- [6] 陈华良. 一种动物复合免疫增强剂的研制[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [7] 翁梅悦, 银少华, 欧盛绘, 等. 猪场常见重要病毒性疫病临床诊断与防控概要[J]. 畜牧兽医, 2017, 326(2): 90-92.
- [8] YOO Y C, YOSHIMATSU K, KOIKE Y, et al. Adjuvant activity of muramyl dipeptide derivatives to enhance immunogenicity of a hantavirus-inactivated vaccine[J]. Vaccine, 1998, 16(2/3): 216-224.
- [9] 田世昭. 分枝杆菌的佐剂活性与菌株[J]. 国外医学(生物制品学分册), 1982(1): 23.
- [10] 陈华良, 王和兴, 李小鹏, 等. 广东地区猪伪狂犬病流行病学调查与 gE、TK 基因遗传进化分析[J]. 广东畜牧兽医科技, 2016, 41(2): 5-9.
- [11] 裴春生, 何玉友, 李群, 等. 油乳剂疫苗中硬脂酸铝含量与油相水相比比例关系研究[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(2): 21-23.
- [12] TANG Y, LU J, WU P, et al. Inactivated vaccine with adjuvants consisting of pattern recognition receptor agonists confers protection against avian influenza viruses in chickens[J]. Vet Microbiol, 2014, 172(1/2): 120-128.
- [13] 司兴奎, 郭鑫, 杨汉春. 猪圆环病毒 2 型感染后猪外周血淋巴细胞 IL-2、IL-4、IL-10、IL-12p40、IFN- γ 和 TNF- α mRNA 转录的变化[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(1): 78-82.

【责任编辑 李庆玲】