

GM-CSF 与生长抑素融合表达质粒对小鼠肌肉组织 GHR 和 IGF-I mRNA 表达的影响

舒邓群¹, 朱晓华², 吴红翔¹, 王开云¹, 曾检华¹, 魏金刚¹, 胡豆¹

(1. 江西农业大学 动物科技学院 江西 南昌 330045; 2. 江西科技师范学院 江西 南昌 330013)

摘要: 选择 70 只小白鼠, 随机分为 7 组, 每组 10 只, 雌雄各半。其中第 1 组为对照组, 第 2-4 组分别肌肉注射 pcS/2SS、pGM-CSF/SS 和 pGM-CSF+pcS/2SS DNA 疫苗; 第 5-7 组分别口服以减毒沙门氏菌为载体的 pcS/2SS、pGM-CSF/SS 和 pGM-CSF+pcS/2SS DNA 疫苗, 以 β -actin 作为内参, 利用相对半定量 RT-PCR 检测小鼠肌肉组织 GHR 和 IGF-I mRNA 的表达。结果表明: 第 3、5 和 6 组的 GHR mRNA 表达显著高于 1 组和 7 组 ($P < 0.05$), 第 5 和 6 组的 IGF-I mRNA 表达显著高于 1 组、2 组、4 组和 7 组 ($P < 0.05$)。GM-CSF 与 SS 的融合表达质粒 (pGM-CSF/SS) 的 GHR 和 IGF-I mRNA 表达高于 pGM-CSF+pcS/2SS 共同免疫, 同种 DNA 疫苗, 口服免疫组的 GHR 和 IGF-I mRNA 表达总体上比肌肉注射组要高。这些结果证明 GM-CSF 可促进 SS DNA 疫苗的免疫效果, 提高肌肉组织中 GHR 和 IGF-I mRNA 的表达; pGM-CSF/SS 效果优于 pGM-CSF+pcS/2SS, 口服免疫组要优于肌肉注射免疫组。

关键词: 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子; 生长抑素 (SS); DNA 疫苗; 生长激素受体; 胰岛素样生长因子-1; mRNA 表达
中图分类号: Q782 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)02-0339-06

GHR and IGF-I mRNA Expression in Muscle Tissue of Mice after Immunization with Fusion-Expression Plasmid Contained GM-CSF and SS

SHU Deng-qun¹, ZHU Xiao-hua², WU Hong-xiang¹, WANG Kai-yun¹,
ZHEN Jian-hua¹, WEI Jin-gang¹, HU Duo¹

(1. College of Animal Science and Technology, JAU, Nanchang 330045, China; 2. Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China)

Abstract: A total of 70 mice at 22 days age were randomized to 7 groups to detect GHR and IGF-I mRNA expression in muscle tissues by semi-quantitative RT-PCR, and β -actin was served as the control. All mice of 7 groups were given twice immunizations at intervals of 2 weeks. Group 1 as the control was immunized with 0.85% salt solution. Group 2-4 were given muscular injections (i.m.) with pcS/2SS (Group 2), pGM-CSF/SS (Group 3) and pGM-CSF+pcS/2SS (Group 4), respectively, while Group 5-7 by oral administration with pcS/2SS (Group 5), pGM-CSF/SS (Group 6) and pGM-CSF+pcS/2SS (Group 7) delivered by attenuated *Salmonella*. The results were as follows: GHR mRNA expression levels of Group 3, 5 and 6 were higher than that of Group 1 and 7 ($P < 0.05$). IGF-I mRNA expression levels of Group 5 and 6 were higher than that of Group 1, 2, 4 and 7 ($P < 0.05$). GHR and IGF-I mRNA expression levels of pGM-CSF/SS were higher than that of co-immunization of pGM-CSF+pcS/2SS. The results also showed that

收稿日期: 2011-09-06 修回日期: 2012-01-12

基金项目: 江西省教育厅科技项目 (GJJ08187) 和江西农业大学博士启动基金

作者简介: 舒邓群 (1963—), 男, 教授, 博士, 主要从事基因免疫与分子生物学研究, E-mail: sudengq@163.com。

GHR and IGF - I mRNA expression levels by the oral administration were largely higher than that of the muscular injection with the same DNA vaccine. These results suggest that GM - CSF can enhance immune effect of SS DNA vaccine and increase GHR and IGF - I mRNA expression in muscle tissue of mice. The immune effect of pGM - CSF/SS is superior to that of pGM - CSF + pcS/2SS. The immune response of oral administration is higher than that of the muscular injection.

Key words: granulocyte - macrophage colony - stimulating factor (GM-CSF); somatostatin (SS); DNA Vaccine; growth hormone receptor (GHR); insulin-like growth factor-I (IGF-I); mRNA Expression

动物生长主要受下丘脑 - 垂体 - 靶器官生长轴调节,其生长离不开神经内分泌调节。GH 是调节生长的重要激素。GH 可直接作用于靶组织,与 GHR 结合促进组织的生长发育^[1];GH 也可通过与肝等组织中 GHR 结合,介导产生 IGF - I,IGF - I 以内分泌、旁分泌或自分泌的形式促进组织器官的发育。IGF - I 对肌肉有很强的合成代谢效应,能抑制蛋白质分解,增加氨基酸的摄取和细胞增生。

粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子(GM - CSF) 是一种具有多项潜能的造血生长因子,GM - CSF 作为 DNA 疫苗的免疫佐剂,能增强 DNA 疫苗的免疫效果。采用 SS DNA 疫苗以及 GM - CSF 和 SS 的融合表达质粒免疫小鼠,结果发现均能产生了特异性的生长抑素抗体^[2],GH 和 IGF - I 的分泌水平也都高于对照组^[3],用于免疫断奶仔猪,可以提高断奶仔猪某些代谢物浓度^[4],本研究利用 SS DNA 疫苗(pcS/2SS)、GM - CSF 与 SS 融合表达质粒(pGM - CSF/SS) 以及 pGM - CSF + pcS/2SS 同时免疫小鼠,采用肌肉注射和口服两种途径免疫小鼠,检测不同质粒、不同免疫途径小鼠肌肉组织 GHR 和 IGF - I mRNA 表达的差异,旨在揭示生长抑素基因疫苗对小鼠生长发育的作用机理,探讨基因佐剂 GM - CSF 对生长抑素基因疫苗的免疫增强作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 生长抑素基因疫苗 pcS/2SS 由曹少先博士构建^[5]、pGM - CSF^[6]、pGM - CSF/SS^[7] 作者自行构建。*E. coli* DH_{5α}、减毒沙门氏菌 CS022 由江西农业大学动物生产实验室保存。

1.1.2 试剂、仪器及试验动物 质粒抽提纯化试剂盒为 Omega 公司产品;总 RNA 小量提取试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;RT - PCR 试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司;其它常规试剂均购自南京生兴生物技术有限公司。主要仪器有 PCR 仪(Thermo Hybaid Px E - 02);Kodak ID 图像分析系统为 Kodak 公司产品(Photo Film Co. USA)。22 日龄 10 ~ 15 g ICI 小白鼠购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场。

1.2 方法

1.2.1 质粒的大量抽提纯化 挑选单个菌落,接种至 3 mL LB 中,37 °C、240 r/min 培养过夜,按 1:500 的比例稀释到适当体积 LB 培养基中,继续培养 12 h,离心收集菌体,按试剂盒说明书抽提纯化 pcS/2SS、pGM - CSF 和 pGM - CSF/SS 质粒。用分光光度计测其 OD₂₆₀和 OD₂₈₀,计算其浓度和纯度。

1.2.2 质粒的浓缩与稀释 按文献[8]对质粒进行浓缩后,用灭菌的生理盐水稀释至终浓度为 1 μg/μL,备用。

1.2.3 重组减毒沙门氏菌的制备 参照文献[9]方法制备感受态沙门氏菌 CS022,采用 CaCl₂ 法将上述质粒转化感受态沙门氏菌,分别制备以减毒沙门氏菌为载体的口服 pcS/2SS、pGM - CSF 和 pGM - CSF/SS 重组菌。取 pcS/2SS、pGM - CSF 和 pGM - CSF/SS 分别接种相应的选择性 LB,37 °C,150 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀0.3 ~ 0.4,4 °C、200 r/min 离心 10 min,弃上清,用灭菌的 PBS 调整细菌浓度至 10¹⁰ CFU/mL,备用。

1.3 试验

1.3.1 小鼠的免疫 选择 70 只 22 日龄小白鼠,随机分为 7 组,每组 10 只,雌雄各半,其中第 1 组为对照组,第 2 - 4 组为质粒肌肉注射组,第 2 组免疫 pcS/2SS,第 3 组免疫 pGM - CSF/SS,第 4 组在同部位注射 pGM - CSF + pcS/2SS,采用股四头肌三点注射法,免疫前 24 h 注射体积分数为 0.25% 盐酸利多卡因 20 μL 进行预处理,然后在同一部位注射 DNA 疫苗,免疫剂量为 50 μg/只。第 5 - 7 组免疫方式为口

服重组减毒沙门氏菌,口服的方式采用口腔滴喂,第 5 组口服 pcS/2SS,第 6 组口服 pGM - CSF/SS,第 7 组同时口服 pGM - CSF + pcS/2SS。口服免疫前 12 h 禁食禁水,免疫前 30 min,预先口服 100 μL/只质量分数为 7.5% 的 NaHCO₃ 以中和胃酸,免疫剂量为 10⁹ CFU/只。初次免疫后 2 周以相同剂量和免疫途径加强免疫 1 次,试验期为 9 周。

1.3.2 样品采集 试验结束后,每组随机选择 3 只雌性小白鼠宰杀,取大腿肌肉组织在最短时间(5 ~ 10 min) 装入冻存管,放入液氮中保存备用。

1.3.3 样品总 RNA 提取和 RNA 电泳 按 RNA 小量提取试剂盒提取总 RNA,紫外比色法测定总 RNA 浓度和纯度。取 6 ~ 8 μg 总 RNA,用质量分数为 1.4% 变性琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色后用凝胶成像系统照相观察 RNA 条带。如果条带清晰,无拖尾现象,且 28S 与 18S 条带灰度之比大约为 2.0,表明 RNA 无降解,质量可靠,否则该 RNA 样品不能用,必须重新提取。

1.3.4 反转录(RT) 按 RT - PCR 试剂盒操作如下:取 1 μg 总 RNA 进行反转录,反应总体积 10 μL,其中: MgCl₂ 2 μL、Oligo(dT) 18 引物(2.5 pmol/μL) 0.5 μL、dNTP Mixture(各 10 mmol/L) 1 μL、RNA 酶抑制剂(40 U/μL) 0.25 μL、反转录酶(5 U/μL) 0.5 μL、10 × RT Buffer 1 μL、RNase Free dH₂O 至总体积 10 μL。按以下条件进行反转录反应: 30 °C 10 min, 42 °C 30 min, 99 °C 5 min, 5 °C 5 min, 反应 1 个循环。RT 产物 - 20 °C 保存,备用。

1.3.5 PCR 引物设计 小鼠的 GHR、IGF - I 和 Beta - actin cDNA 序列来源于 GenBank,PCR 引物序列采用 Primer 5.0 软件自行设计,由上海英骏生物技术有限公司合成。引物序列和参数见表 1。

表 1 目的基因引物参数

Tab.1 Parameter of oligo - nucleotide primer pairs for the target genes

目的基因 Target Gene	cDNA 参考序列 cDNA Sequence	引物序列 Primer Sequence	PCR 产物 PCR Product
GHR	GenBank	Forward 5' - AGC CAA CGA CAA GCT GCA AGA - 3	217 bp
	NM_010284	Reverse 5' - ATG CCA ATG GGT GGA TCA GGT - 3	(271 - 488)
IGF - I	GenBank	Forward 5' - GGT GGA TGC TCT TCA GTT CG - 3'	203 bp
	NM_184052	Reverse 5' - TAT CGC TGG GCA CGG ATA GA - 3'	(126 - 329)
β - actin	GenBank	Forward 5' - ATG GTG GGA ATG GGT CAG A - 3'	311 bp
	X03765	Reverse 5' - ACG ACC AGA GGC ATA CAG G - 3'	(1 - 312)

1.3.6 PCR 条件的优化 将肌肉样品的反转录产物等量混合成一 RT 样品,用此混合样作为模板,优化 PCR 条件。反应体系如下: 5 × PCR Buffer 10 μL、RT 产物 1 - 2 μL、上、下游引物(20 pmol/μL) 各 0.5 μL、Ex Taq 酶(5 U/μL) 0.25 μL、灭菌蒸馏水加至总体积 50 μL。反应条件为 94 °C 预变性 2 min,循环条件:

94 °C 变性 30 s, 50 ~ 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min。循环后再 72 °C 延伸 10 min。以此条件为基础,改变复性温度、目的基因与 β - actin 引物比例、循环圈数等以确定最佳反应条件。GHR、IGF - I mRNA 的 RT - PCR 条件见表 2。

表 2 GHR 和 IGF - I mRNA 的 RT - PCR 条件

Tab.2 RT - PCR condition for GHR and IGF - I mRNA

项目 Item	GHR	IGF - I
PCR 条件	94 °C 30 s	94 °C 30 s
	53 °C 30 s	55 °C 30 s
	72 °C 60 s	72 °C 60 s
	31 cycle	30 cycle
目的基因/β - actin 引物比例	9:1	12:1

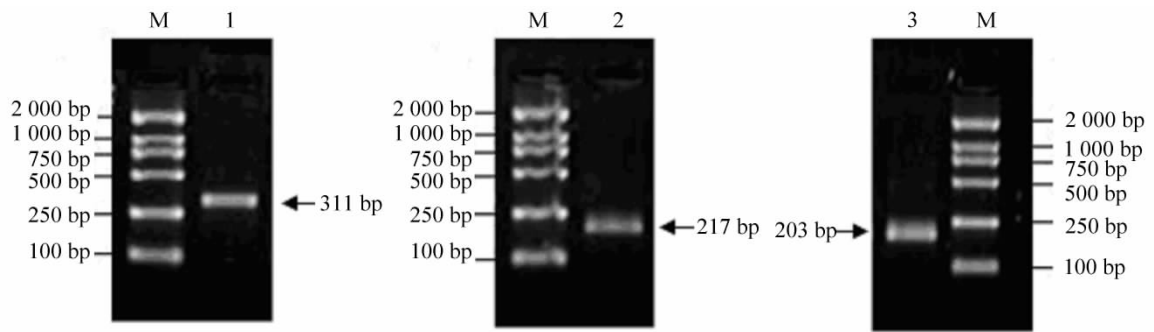
1.3.7 PCR 扩增与电泳及灰度分析

按以上优化的 RT - PCR 条件扩增所要测定的样品,PCR 产物保存在

4 °C。取 10 μL PCR 产物在质量分数为 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳,用 Kodak ID 图像分析系统分析条带灰度,结果用目的基因条带灰度与 β - actin 条带灰度比值的平均数(Mean ± SE) 来表示,每个样品重复 3 次操作,同时用 ddH₂O 和 RNA 混合样作对照,以检验是否有外源 DNA 和基因组 DNA 污染。同时,将 GHR、IGF - I 和 β - actin 的 PCR 产物送上海英骏生物技术有限公司测序,以确认目的基因。

1.4 数据处理

数据以 Mean ± SD 表示, SPSS13.0 软件进行统计分析, 采用 LSD Test 进行差异显著性检验。



1. β -actin; 2. GHR; 3. IGF-I; M. DL-2000。

图 1 目的基因 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 1 RT-PCR products of target genes fragment

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增结果

提取小鼠肌肉组织的总 RNA, 经 RT-PCR 分别扩增出产物 GHR、IGF-I、 β -actin 基因, 大小分别为 311 bp、217 bp 和 203 bp, 与预期的基因片段大小相一致 (图 1), 将 GHR、IGF-I 和 β -actin 的 PCR 产物送基因公司测序, 结果表明 3 个基因片段均为目的基因。

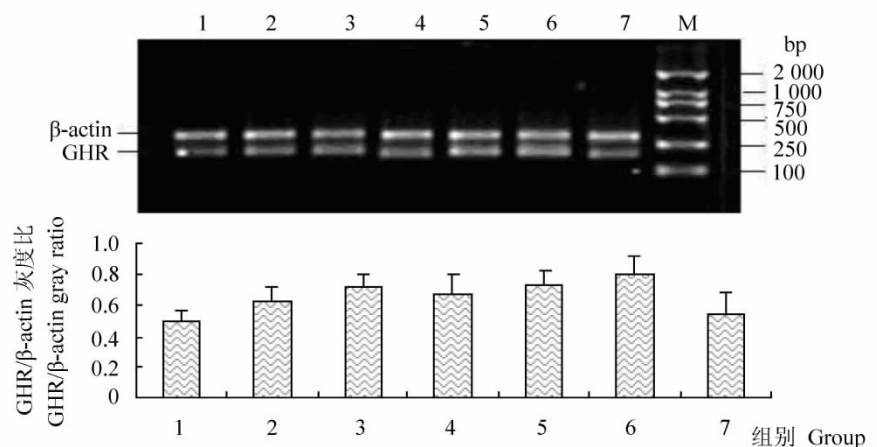
2.2 对肌肉 GHR mRNA 表达的影响

按照实验方法中优化

好的 RT-PCR 条件扩增各试验组和对照组 GHR 和 β -actin 基因, 结果见图 2。由图中可以看出, GHR mRNA 的 RT-PCR 产物灰度总体上 3 组、5 组和 6 组高于 1 组、2 组、4 组和 7 组。相对半定量分析结果表明: 3 组 (0.72 ± 0.07)、5 组 (0.73 ± 0.09) 和 6 组 (0.80 ± 0.12) GHR mRNA 相对含量显著高于 1 组 (0.50 ± 0.07) 和 7 组 (0.55 ± 0.14) ($P < 0.05$), 但与 2 组 (0.63 ± 0.09) 和 4 组 (0.67 ± 0.13) 相比, 差异不显著 ($P > 0.05$); GM-CSF 与 SS 的融合表达质粒 (3 组和 6 组) 高于 pGM-CSF + pcS/2SS 共同免疫 (4 组和 7 组)。3 组和 4 组相比, 差异不显著 ($P > 0.05$), 6 组与 7 组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。从同种质粒不同免疫途径来看, 口服免疫的效果要强于肌肉注射 ($P > 0.05$)。提示基因佐剂 GM-CSF 可以提高小鼠肌肉 GHR 的表达, pGM-CSF/SS 效果优于 pGM-CSF + pcS/2SS。

2.3 对肌肉 IGF-I mRNA 表达的影响

按照实验方法中优化好的 RT-PCR 条件扩增各试验组和对照组 IGF-I 和 β -actin 基因, 结果见图 3。由图中可以看出, IGF-I mRNA 的 RT-PCR 产物灰度总体上 3 组、5 组和 6 组高于 1 组、2 组、4 组和 7 组。相对半定量分析结果表明: 5 组 (0.72 ± 0.09) 和 6 组 (0.66 ± 0.18) IGF-I mRNA 相对含量显著高于 1 组 (0.41 ± 0.13)、2 组 (0.36 ± 0.06)、4 组 (0.32 ± 0.12) 和 7 组 (0.45 ± 0.06) ($P < 0.05$); 2 组、3 组 (0.57 ± 0.12)、4 组和 7 组与 1 组相比, 差异不显著 ($P > 0.05$); 2 组和 4 组低于 1 组 ($P > 0.05$)。



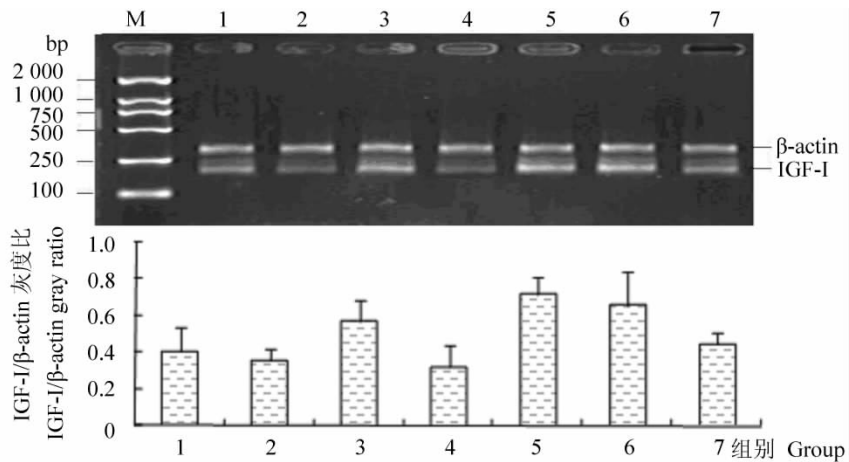
M: DL-2000; 1 为对照组; 2-4 为肌肉注射组; 5-7 为口服组。

M: DL-2000; Lane 1: control group; Lane 2-4: intramuscular groups; Lane 5-7: oral administration groups.

图 2 小鼠肌肉 GHR 的基因表达 ($n = 3$)

Fig. 2 Gel electrophoretogram of muscular GHR IGF-I expression in mice

GM - CSF 与 SS 的融合表达质粒 (3 组和 6 组) 高于 pGM - CSF + pcS/2SS 共同免疫 (4 组和 7 组) ($P < 0.05$)。从同种质粒不同免疫途径来看,口服免疫的效果总体上要强于肌肉注射 ($P > 0.05$),pcS/2SS 口服组显著高于肌肉注射组 ($P < 0.05$)。提示基因佐剂 GM - CSF 可以提高小鼠肌肉 IGF - I mRNA 的表达,pGM - CSF/SS 效果优于 pGM - CSF + pcS/2SS。



M: DL - 2000; 1 为对照组; 2 - 4 为肌肉注射组; 5 - 7 为口服组。
M: DL - 2000; Lane 1: control group; Lane 2 - 4: intramuscular groups; Lane 5 - 7: oral administration groups.

图 3 小鼠肌肉 IGF - I 的基因表达 (n = 3)

Fig. 3 Gel electrophoretogram of muscular IGF - I expression in mice

3 讨论

动物生长主要受下丘

脑 - 垂体 - 靶器官生长轴调节,其生长离不开神经内分泌调节^[10]。激素作为体内的一种化学信息,对机体的生长、发育、繁殖等起着调控作用,但是激素必须与特定的受体结合后才能发挥作用,生长激素是生长轴中关键的一类激素,是动物生长不可缺少的物质,GH 发挥作用必须首先与其受体结合,产生 IGF - I 通过 IGF - I 对细胞作用,促进动物生长。GH - IGF - I 轴在动物生长和体组成以及细胞分化和增殖过程起着非常重要的作用^[11]。本次试验通过对小白鼠肌肉注射和口服不同的 DNA 疫苗,检测肌肉组织 GHR 和 IGF - I 基因 mRNA 表达的变化,结果表明,无论是肌肉注射进行免疫还是经口服途径免疫动物,GHR 和 IGF - I 基因 mRNA 表达比对照组都有所提高,甚至有的组达到显著水平,但肌肉注射 pcS/2SS 和 pGM - CSF + pcS/2SS 后肌肉 IGF - I mRNA 的表达低于对照组 ($P > 0.05$); GM - CSF 与 SS 的融合表达质粒 pGM - CSF/SS 的 GHR 和 IGF - I mRNA 表达水平总体来说都要高于 pGM - CSF + pcS/2SS 的共同免疫,这可能与 pGM - CSF 的免疫时间和注射部位有关,据报道,基因佐剂与抗原基因之间存在着免疫时间和位置的关系。GM - CSF 必须注射在 DNA 疫苗的同一点,以便于传递。将 pGM - CSF 及抗原质粒注入同一点,则可增强免疫反应,且免疫反应与 CD11c + 的存在有关,如将抗原质粒及 pGM - CSF 分别注入不同的位点不仅不能增强免疫反应,反而使 T 细胞反应降低,可能是由于 GM - CSF 注射后,将循环 APCs 吸引到注射部位,从而使疫苗注射位点的 APCs 减少所致。Burger 等^[12]在注射基因疫苗前 5 天在同一部位预先注射基因佐剂 pGM - CSF,结果表明预先注射 pGM - CSF 可提高特异性抗体 IgG 的免疫应答。据报道,分别构建的 DNA 疫苗与 GM - CSF 编码质粒混合注射,会对基因免疫产生干扰作用^[13]。GM - CSF 与抗原共表达质粒效果更好。

生长抑素多肽疫苗免疫对动物血浆中 GH 和 IGF - I 的影响研究结果很不一致。Varner 等发现生长抑素主动免疫绵羊显著提高了 GH 的基线水平和平均水平,但未改变 GH 的脉冲频率和振幅^[14]。Magnan 等^[15]用生长抑素主动免疫绵羊,GH 的基础水平和脉冲分泌均未改变,IGF - I 水平下降。而 Dawson 等^[16]报道,青年阉肉牛主动免疫 SS 后,虽然能提高生长速度,但血液中 GH 和 IGF - I 的浓度均未发生改变。Chihara 等研究表明,生长抑素被动免疫大鼠 3 周后增加了 GH 的脉冲频率,降低了脉冲峰值,GH 平均水平显著下降,垂体 GH mRNA 水平也显著降低^[17]。而 Van Kessel 等 3 次注射 SS 抗血清的整个 12 d 内未发现 GH 分泌与对照组有任何不同^[18]。SS 免疫在肌肉 IGF - I mRNA 水平都低于对照组,甚至 pGM - CSF + pcS/2SS 的共同免疫的肌肉注射组 GHR mRNA 水平也较低。舒邓群等^[3]研究证实 GM - CSF 对生长抑素 DNA 疫苗有一定的免疫增强作用,可促进生长抑素 DNA 疫苗的免疫反应,提高血浆 GH 和 IGF - 1 的分泌水平。

减毒沙门氏是一种胞内菌,研究表明,利用它作为 DNA 疫苗的载体表达外源性抗原已得到广泛的

研究并取得了良好的免疫效果^[19]。研究已经证实,采用 SS DNA 疫苗以及 GM - CSF 和 SS 的融合表达质粒免疫小鼠,GH 和 IGF - 1 的分泌水平、生长抑素抗体 P/N 值等,口服组的免疫效果要优于肌肉注射组^[5]。梁雪芽^[20]比较减毒沙门氏菌为载体的新城疫病毒 DNA 疫苗与裸质粒 DNA 疫苗和弱毒疫苗的免疫效果时,发现口服免疫组对强毒株的攻击保护率为 66.7%,高于裸质粒肌肉注射组(50%)。本研究结果显示,同种 DNA 疫苗分别以肌肉注射和经口服免疫小鼠,口服免疫组肌肉组织 GHR 和 IGF - 1 mRNA 的表达水平均高于肌肉注射免疫组。

本研究应用比较或相对半定量 RT - PCR 方法对不同的 DNA 疫苗以不同的途径免疫小鼠对其肌肉组织中 GHR 和 IGF - 1 的 mRNA 表达进行定量,结果表明,SS DNA 疫苗可以提高小鼠肌肉的 GHR 和 IGF - 1 mRNA 的表达,基因佐剂 GM - CSF 对 SS DNA 疫苗具有免疫增强作用,可促进小鼠肌肉中 GHR 和 IGF - 1 mRNA 的表达,但有些表达不明显,甚至出现抑制作用。总体上来看,GM - CSF 与 SS 的融合表达质粒的增强作用要优于 pGM - CSF + pcS/2SS 共同免疫。

参考文献:

- [1] Lupu F, Terwilliger J D, Lee K, et al. Roles of growth hormone and insulin - like growth factor 1 in mouse postnatal growth [J]. *Dev Biol*, 2001, 229(1): 141-62.
- [2] 舒邓群, 茆达干, 杨利国, 等. GM - CSF 与生长抑素融合表达质粒对小鼠生长抑素抗体及 IgG 亚型的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2008, 28(1): 63-67, 83.
- [3] 舒邓群, 茆达干, 杨利国, 等. GM - CSF 与 SS 融合表达质粒对小鼠淋巴细胞增殖及 GH 和 IGF - 1 分泌的影响 [J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2008, 29(1): 11-15.
- [4] 舒邓群, 陈荣达, 茆达干, 等. 粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子与生长抑素融合表达基因疫苗的免疫对断奶仔猪某些代谢物浓度的影响 [J]. *江西农业大学学报*, 2008, 30(4): 693-696.
- [5] 曹少先, 张文伟, 茆达干, 等. 生长抑素基因疫苗质粒 pcS/2SS 的构建、表达及免疫 [J]. *农业生物技术学报*, 2005, 13(4): 477 - 481.
- [6] 舒邓群, 茆达干, 曹少先, 等. 猪粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子(GM - CSF)基因的克隆和序列分析及其基因表达 [J]. *江西农业大学学报*, 2007, 29(2): 234-240.
- [7] 舒邓群, 茆达干, 曹少先, 等. 粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子(GM - CSF)与生长抑素(SS)融合表达质粒的构建及其对小鼠的免疫效果 [J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(1): 41-46.
- [8] 孙树汉, 戴建新, 张平武, 等. 核酸疫苗 [M]. 第 1 版, 上海: 第二军医大学出版社, 2000: 92-93.
- [9] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 96-99.
- [10] 秦宜德, 徐从贞, 罗欣, 等. β - 酪啡肽 - 7 对大鼠生长、相关激素及生长素受体 mRNA 表达的影响 [J]. *营养学报*, 2004, 26(2): 112-115.
- [11] te Pas M F, Visscher A H, de Greef K H. Molecular genetic and physiologic background of the growth hormone - IGF - 1 axis in relation to breeding for growth rate and leanness in pigs [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2004, 27(3): 287-301.
- [12] Burger J A, Mendoza R B, Kipps T J. Plasmids encoding granulocyte - macrophage colony - stimulating factor and CD154 enhance the immune response to genetic vaccines [J]. *Vaccine*, 2001, 19(15 - 16): 2181-2189.
- [13] 廖国阳, 姜述德, 孙明波, 等. 双表达载体研究 GM - CSF 对 HCV C 基因免疫应答的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2001, 17(4): 289-292.
- [14] Varner M A, Davis S L, Reeves J J. Temporal serum concentrations of growth hormone, thyrotropin, insulin, and glucagon in sheep immunized against somatostatin [J]. *Endocrinology*, 1980, 106(3): 1027-1032.
- [15] Magnan E, Mazzocchi L, Cataldi M, et al. Effect of actively immunizing sheep against growth hormone - releasing hormone or somatostatin on spontaneous pulsatile and neostigmine - induced growth hormone secretion [J]. *J Endocrinol*, 1995, 144(1): 83-90.
- [16] Dawson J M, Soar J B, BATTERY P J, et al. The effect of immunization against somatostatin and β - agonist administration alone and in combination on growth and carcass composition in young steers [J]. *Anim Sci*, 1997, 64: 37-51.
- [17] Chihara K, Sato M, Kita T, et al. Physiological role of short loop - feedback GH autoregulation in producing a 3hr - pulsatile GH secretory pattern in conscious male rats [A]. In *Neuroendocrine Control of the Hypothalamo - Pituitary System* [C]. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1988: 137-149.
- [18] Van Kessel AG, Laarveld B. Acute or chronic immunoneutralization of somatostatin does not affect growth hormone or thyroid hormone secretion in sheep [J]. *J Endocrinol*, 1993, 136(2): 261-269.
- [19] Bauer H, Darji A, Chakraborty T, et al. Salmonella - mediated oral DNA vaccination using stabilized eukaryotic expression plasmids [J]. *Gene Ther*, 2005, 12(4): 364-372.
- [20] 梁雪芽, 方维焕, 江玲丽. 鸡新城疫口服 DNA 疫苗的安全性、稳定性与免疫效力 [J]. *生物工程学报*, 2003, 19(1): 24-29.