

重组鸡 IL-18 对新城疫疫苗 免疫增强作用的研究

赵敏^{1,2} 张春杰^{1*} 程相朝¹ 李银聚¹ 吴庭才¹ 杨涛²

(1. 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003; 2. 河南农业职业学院 动物科学系, 河南 中牟 451450)

摘要: 将 200 只 1 日龄鸡随机分为 4 组, 每组 50 只鸡, 分别为空白对照组, 新城疫疫苗组, 新城疫疫苗 + 重组 IL-18 组, 新城疫疫苗 + 空载体对照组。所有免疫组鸡均于 8 日龄免疫接种相应疫苗, 并分别于免疫后的第 3, 7, 14, 21, 28 天和第 35 天对每组鸡随即抽取 4 只, 对其血清的抗体效价、外周血的 T 淋巴细胞转化水平和 γ 干扰素含量进行测定。免疫 18 d 后每组鸡随机取 20 只进行动物攻毒保护试验。结果表明重组鸡 IL-18 蛋白不仅能够显著增强新城疫疫苗所诱导的细胞免疫和体液免疫反应, 而且还可以明显提高疫苗的保护率

关键词: 鸡 IL-18; 新城疫疫苗; 免疫增强作用

中图分类号: S831.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)04-0761-04

Effect of Recombinant Chicken IL-18 on NDV Vaccine as Immunopotentiator

ZHAO Min^{1,2} ZHANG Chun-jie^{1*} CHENG Xiang-chao¹,
LI Yin-ju¹, WU Ting-cai¹, YANG Tao²

(1. Animal Science and Technology College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 2. Animal Science Department, Henan Vocational College of Agriculture, Zhongmu 451450, China)

Abstract: In the experiment, 200 chickens were randomly divided into 4 groups (50 chickens each group): the control group, the NDV vaccine group, the NDV vaccine + recombinant IL-18 group, the NDV vaccine + vector control group. All the groups were immunized by its vaccine respectively on the eighth day. Then respectively at the third day, 7th day, 14th day, 21st day, 28th day and 35th day after immunization, from each group 4 chickens were taken randomly to detect their antibody level and IFN- γ concentration in serum, and T cell activity ratio. Twenty chickens of each group were used for challenge and protection test on the eighteenth day after immunization. The results indicated that rIL-18 could improve the protective rate of ND vaccine. It had obvious immunoenhancement effect on Newcastle disease vaccine. It could not only enhance the cell-mediated immune response obviously, but also enhance the humoral response.

Key words: Chicken IL-18; Newcastle disease vaccine; immunoenhancement

白细胞介素 18 是一种重要的细胞因子, 在宿主防御^[1]、抑瘤抗癌^[2]、抗变态反应^[3]等方面具有重要作用。2005 年, 程相朝教授等^[4]研究了鸡 IL-18 真核表达质粒 (pcDNA3IL18) 对新城疫疫苗的免疫

收稿日期: 2010-11-02 修回日期: 2011-04-19

基金项目: 河南省自然科学基金项目资助 (0511032300)

作者简介: 赵敏 (1983-) 女, 讲师, 硕士, 主要从事分子免疫及病原学研究, E-mail: minminzha@126.com; * 通讯作者: 张春杰, 教授, 博士, E-mail: cjzhang@sina.com。

增强作用。发现重组鸡 IL-18 真核表达质粒能在鸡体内得到表达,表达产物不仅能够显著增强新城疫疫苗所诱导的细胞免疫和体液免疫反应,而且还可以明显提高疫苗的保护率,有效地发挥 IL-18 的免疫佐剂作用。此后曹素芳^[5]、余夏萌^[6]和唐梦君^[7]等又分别探索了鸡 IL-18 在禽多杀性巴氏杆菌 H 基因 DNA 疫苗、IBDV 多聚蛋白 DNA 疫苗和禽传染性支气管炎病毒 (IBV) 的 M 基因与 IL-18 基因共表达的 DNA 疫苗中免疫佐剂作用,但这些研究都局限于核酸疫苗,而对鸡白介素 18 蛋白作为疫苗佐剂的研究则很少。本试验将通过生物工程技术制备,并经纯化处理的大肠杆菌表达的鸡白细胞介素 18 蛋白,与新城疫疫苗联合应用,首次探索了其对新城疫疫苗的免疫增强作用。

1 材料和方法

1.1 材料

新城疫 LaSota 活疫苗购自辽宁益康生物制品厂。新城疫病毒标准强毒株 F48 株购自中国兽医药品监察所。效价为 10 Log₂ 的新城疫 HA 抗原,新城疫油乳灭活苗,由本试验室自行制备。鸡白细胞介素 18 重组蛋白,由本试验室通过基因工程技术制备,并纯化所得^[8]。300 羽一日龄雏鸡,试验前未作任何疫苗免疫,由洛阳宫华种鸡场提供。PRMI-1640 培养液、胎牛血清 (FBS)、肝素钠、淋巴细胞分离液、ConA (Sigma)、MTT (Sigma)、INF- γ ELISA (ADL) 购自大连宝生物有限公司。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 试验鸡的分组与免疫 1 日龄试验鸡群随机分为 4 组,每组 50 只,按正常饲养程序饲养。其中第 1 组为空白对照组,第 2 组为新城疫疫苗免疫组,第 3 组为新城疫疫苗 + 重组 ChIL-18 组 (简称 rChIL-18 组),第 4 组为新城疫疫苗 + 空载体表达的产物组 (简称 r 对照组)。所有鸡只在 8 日龄进行免疫。首先用稀释好的 LaSota 疫苗通过滴鼻点眼途径对 2、3、4 组鸡进行免疫,2 头份/只,同时颈部皮下注射新城疫油乳苗 0.2 mL/只,第 1 组用灭菌 PBS 代替 LaSota 疫苗和新城疫油乳苗。4~6 h 后,对第 3 组鸡皮下多点注射重组鸡 IL-18 蛋白,第 4 组鸡用带有空载体的表达菌的表达产物代替,第 1 组和第 2 组用灭菌 PBS 代替。免疫后各组相互隔离,按正常饲养管理程序饲养。

1.2.2 血清中抗体效价的测定 各组鸡分别于免疫后的第 3、7、14、21、28、35 天,随机取 4 只采翅静脉血,分离血清,用微量法^[9]检测抗体效价,并按生物学中的方差分析法,用 SPSS 软件对其数据进行处理。

1.2.3 外周血 T 淋巴细胞增值试验 各组鸡分别在免疫后的第 3、7、14、21、28、35 天随机取 4 只鸡,无菌心脏采血,按文献 [10] 介绍的方法进行外周血 T 淋巴细胞增值试验。

1.2.4 血清中 γ 干扰素含量的测定 各组鸡分别在免疫后的第 3、7、14、21、28、35 天,随机取 4 只采翅静脉血,分离血清,用鸡的 γ 干扰素 ELISA 试剂盒检测血清中 γ 干扰素的含量。

1.2.5 攻毒试验 各试验组鸡在免疫后的第 18 天,每组随机取 20 只,进行攻毒试验。首先,用灭菌生理盐水将新城疫标准毒株 F48 的毒价稀释为 1 000 LD₅₀/mL,每只鸡攻毒的总剂量为 1 mL,分别滴鼻 2 滴、点眼 2 滴,剩下的腿部肌肉注射。攻毒后观察并记录各组鸡的发病症状、死亡情况及肉眼剖检病变。10 d 后,将剩余鸡只全部人工扑杀,剖检并记录病变情况。免疫保护的判断以外观无临床症状同时剖检无典型肉眼可见病变为标准。

2 结果与分析

2.1 血清中抗体效价的测定

各试验组鸡在免疫后不同时期抗体效价见图 1。从图 1 可以

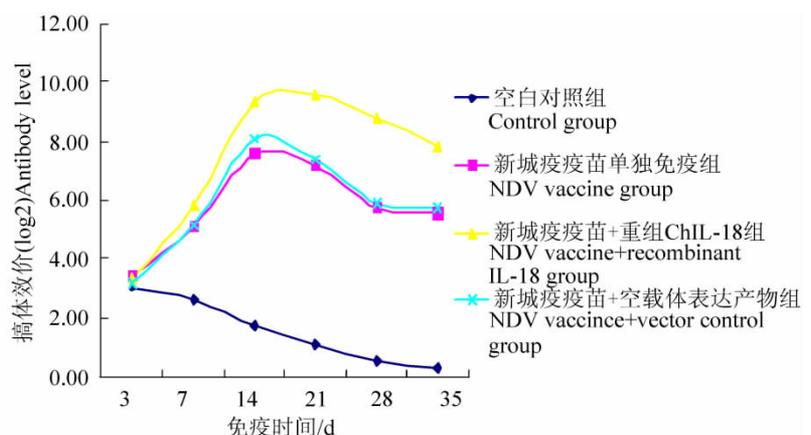


图 1 各组鸡免疫后不同时间的血清抗体效价

Fig. 1 The serum antibody titer of chickens in each group at different times after immunization

看出,免疫后 3 d 各组鸡抗体效价无显著差异,之后空白对照组的抗体水平呈逐渐降低趋势,从免疫后第 7 天开始极显著 ($P < 0.01$) 低于其它各个免疫组;各免疫组抗体效价趋势线相似,先直线上升,达到高峰后慢慢下降。其中 rChIL-18 组各个时间点的抗体水平均高于其它各对照组,个别时间点差异达到极显著水平 ($P < 0.01$); r 对照组在个别时间点抗体水平显著高于新城疫单独免疫组 ($0.01 < P < 0.05$),可能与菌体蛋白对免疫鸡的刺激有关。

2.2 外周血 T 淋巴细胞增值试验

各试验组鸡在不同时间点的淋巴细胞刺激指数见图 2。从图 2 可以看出,空白对照组的鸡淋巴细胞刺激指数显著 ($0.01 < P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 低于其它各试验组; rChIL-18 组的鸡淋巴细胞刺激指数先呈上升趋势,在免疫后 21 d 达到最高水平,然后逐渐下降。其刺激指数在各个时间点均高于其它各试验组,个别时间点差异达到极显著水平 ($P < 0.01$); r 对照组和新城疫单独免疫组的淋巴细胞刺激指数趋势线相似,增长很缓慢,分别于 21 d 达到最高水平,之后开始下降。其刺激指数总体上高于空白对照组,在一些时间点显著高于空白对照组 ($0.01 < P < 0.05$)。

2.3 血清中 γ 干扰素含量的测定

各试验组鸡免疫后不同时间血清中 γ 干扰素含量的动态变化见图 3。从图 3 可以看出,空白对照组鸡血清中 γ 干扰素的含量一直呈水平趋势,极显著低于其它各试验组 ($P < 0.01$); rChIL-18 组在各个时间点均极显著高于其它各试验组 ($P < 0.01$),并在免疫后 21 d 达到最高水平,之后开始下降; r 对照组和新城疫单独免疫组 γ 干扰素的含量总体上相似,虽然个别时间点 r 对照组 γ 干扰素的含量略高于新城疫组,但无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 攻毒试验

免疫后 18 d,各试验组鸡每组随机取 20 只鸡,用 F48 强毒对攻击。结果空白对照组鸡只全部发病死亡,剖检后临床症状明显; rChIL-18 组有 2 只发病,2 d 后耐过,保护率 90%; r 对照组有 4 只鸡发病,其中 3 只死亡,疫苗保护率为 80%;新城疫疫苗单独免疫组有 5 只发病,疫苗保护率为 75%。

3 讨论

新城疫作为禽类烈性传染病之一,可引起多种禽类发病,常造成重大经济损失,在世界上曾有过 3 次大流行^[1]。我国经过多年的综合防制,虽已基本控制了该病的流行,但是部分地区在免疫鸡群中仍不断有新城疫的发生,而且近几年非典型新城疫病例日益增多,给该病的预防带来了困难。虽然我国广泛使用疫苗进行免疫,但新城疫仍是威胁养鸡业发展较为严重的疫病之一。IL-18 作为天然的免疫调节剂和疫苗免疫增强剂,其本身无免疫原性,不会引起自身免疫疾病,而且克服了使用传统药物成本高,

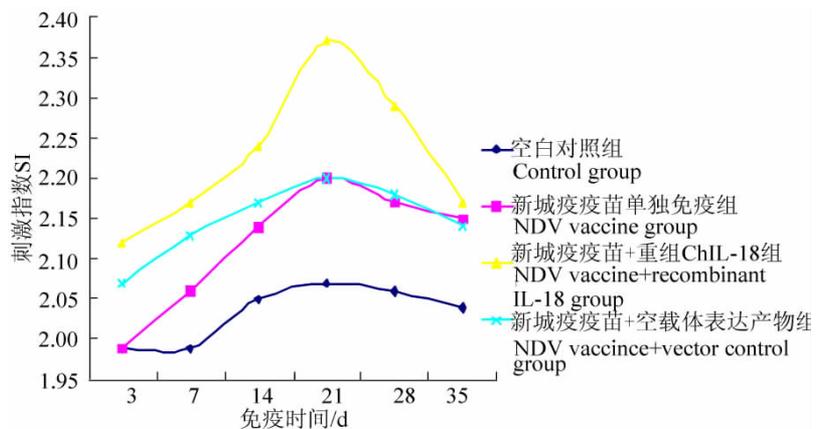


图 2 各组鸡免疫后各个时间点淋巴细胞刺激指数

Fig. 2 The stimulation index of lymphocytes in various time points after immune

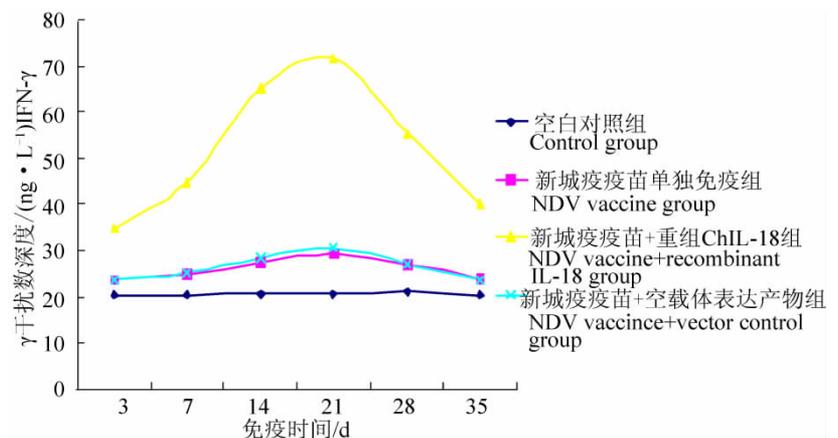


图 3 各组鸡免疫后不同时间血清中 γ 干扰素含量

Fig. 3 The serum concentration of IFN- γ of chickens in each group at different times after immunization

副作用大等缺点,是一种可以替代传统疗法的新型免疫调节剂,在畜禽养殖业中,具有巨大的应用前景。

目前,哺乳动物 IL-18 的研究已经十分广泛深入,人和鼠的 IL-18 已有产品,但禽 IL-18 与哺乳动物 IL-18 的序列同源性普遍较低(约 30%~50%)^[12],系统进化树分析表明鸡 IL-18 和火鸡 IL-18 与哺乳动物分成明显两个不同的组^[13]。又由于鸡 IL-18 的研究起步较晚,并且大部分局限于体外试验,其基因作为免疫佐剂在鸡体内的研究虽有报道,但对鸡白介素 18 蛋白直接作为免疫佐剂的研究很少。为此,本试验将通过生物工程技术制备,并经体外试验证明具有生物活性的由大肠杆菌表达的鸡白介素 18 蛋白,与新城疫疫苗联合应用,首次观察了其对新城疫疫苗的免疫增强作用。

抗体是由活化的 B 淋巴细胞分泌产生的,血清中抗体水平反映了机体的体液免疫功能。本实验结果表明注射 rIL-18 的组鸡的血清中新城疫抗体效价比其它各组均高,一些时间点达到极显著水平($P < 0.01$),说明重组鸡 IL-18 蛋白提高了新城疫疫苗诱导 B 淋巴细胞分泌抗体的能力。血液中 T 淋巴细胞的转化水平间接反映了机体细胞免疫的状态。活化的 T 淋巴细胞能分泌多种具有免疫活性的细胞因子,介导细胞毒杀伤作用,抵御和清除细胞内的病原,并协助和参与机体的免疫调节,刺激 B 淋巴细胞活化、增殖和产生特异性抗体。本试验结果表明,注射 rIL-18 组鸡的外周血 T 淋巴细胞转化水平最高,与其它各组相比差异显著($P < 0.05$),表明它的应用提高了鸡的细胞免疫功能。诱导 Th1 细胞和 NK 细胞产生 IFN- γ ,作为 IL-18 最主要的一个生物学功能,也是检测白介素 18 活性的一个重要指标。本试验中 rChIL-18 组各个时间点血清中 γ 干扰素的含量,均极显著高于其它各试验组($P < 0.01$),也说明了 rChIL-18 具有增强了新城疫疫苗免疫的功能。虽然大量的资料表明,无论是哺乳动物还是禽类的 IL-18 前体蛋白,均是无生物活性的多肽,只有鸡 IL-18 成熟肽,才具有生物学活性,并且在哺乳动物 IL-18 的体外研究中已得到了证实^[14]。但本试验结果表明,大肠杆菌表达的鸡 IL-18 蛋白具有增强新城疫疫苗免疫效果的作用。这一方面说明对大肠杆菌表达的鸡白介素 18 蛋白的复性效果良好,另一方面因为白介素 18 是微量作用的细胞因子,很少量就可以发挥作用,而试验中没对其最适剂量进行检测。此外,也可能与鸡体内对重组蛋白的识别与剪切有关。

参考文献:

- [1] Tanaka H, Narita M, Teramoto S, et al. Role of interleukin-18 and T-helper type 1 cytokines in the development of Mycoplasma pneumoniae pneumonia in adults [J]. Chest 2002, 121(5): 1493-1497.
- [2] Marshall D J, Rudnick K A, McCarthy S G, et al. Interleukin-18 enhances Th1 immunity and tumor protection of a DNA vaccine [J]. Vaccine 2006, 24(3): 244-253.
- [3] Alfred D, Eaton D, Amox U, et al. Administration of exogenous interleukin-18 and interleukin-12 prevents the induction of oral tolerance [J]. Immunology. 2003, 108(2): 196-203.
- [4] 程相朝, 赵德明, 吴庭才, 等. 鸡 IL-18 真核表达载体的构建及其对新城疫疫苗增强作用的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(5): 476-481.
- [5] 曹素芳, 黄青云. 鸡 IL-18 对禽多杀性巴氏杆菌 DNA 疫苗的免疫佐剂作用 [J]. 中国兽医科学 2007, 37(12): 1058-1061.
- [6] 余夏萌, 寿春波, 章晓栋, 等. 鸡 IL-18 对 IBDV 多聚蛋白 DNA 疫苗的免疫增强作用研究 [J]. 浙江大学学报 2008, 34(1): 13-18.
- [7] 唐梦君, 王红宁, 周生, 等. IBV M 基因与 IL-18 基因共表达 DNA 疫苗的免疫原性 [J]. 中国兽医学报 2008, 28(7): 757-167.
- [8] 赵敏, 张春杰, 李银聚, 等. 鸡 IL-18 原核表达工程菌遗传稳定性与表达产物生物学活性检测 [J]. 河南农业科学, 2011, 40(2): 138-141.
- [9] 许连珍. HA、HI 微量法检测鸡群抗体的影响因素 [J]. 中国家禽, 2006, 28(18): 31-32.
- [10] 赵敏, 张春杰, 李银聚, 等. 鸡 IL-18 在毕赤酵母中的表达与活性分析 [J]. 细胞与分子免疫学杂志 2009, 25(12): 1088-1091.
- [11] 刘文斌, 崔尚金, 赵玉军. 新城疫的分子流行病学 [J]. 中国家禽学报 2003, 7(1): 131-134.
- [12] Schneider K, Puchler F, Jacubrl D, et al. cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18 [J]. J Interferon cytokine Res 2000, 20(10): 879-883.
- [13] Kaiser P. Turkey and chicken interleukin-18 (IL-18) share high sequence identity, but have different polyadenylation sites in their 3' UTR [J]. Developmental & Comparative Immunology 2002, 26(8): 681-687.
- [14] Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, et al. Activation of interferon- γ , inducing factor mediated by interleukin-1 β converting enzyme [J]. Science, 1997, 275(5297): 206-209.