

· 动物及兽医生物技术 ·

鸡 GM-CSF 和 IL-2 增强表达新城疫病毒 F 蛋白的重组杆状病毒疫苗的免疫效果

于航, 高冬妮, 申燕, 刘颖, 平文祥, 葛菁萍

黑龙江大学 生命科学学院 微生物省高校重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080

于航, 高冬妮, 申燕, 等. 鸡 GM-CSF 和 IL-2 增强表达新城疫病毒 F 蛋白的重组杆状病毒疫苗的免疫效果. 生物工程学报, 2018, 34(9): 1442–1452.

Yu H, Gao DN, Shen Y, et al. Efficacy enhancement of a Baculovirus-vectored Newcastle Disease Virus F protein vaccine by chicken GM-CSF and IL-2. Chin J Biotech, 2018, 34(9): 1442–1452.

摘 要: 为比较鸡粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (Granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 及鸡白细胞介素 2 (Interleukin 2, IL-2) 对杆状病毒疫苗的免疫增强效果, 通过基因工程手段构建重组杆状病毒疫苗 (Recombinant Baculovirus, BV) rBV-LMI-F, 并联合 GM-CSF 及 IL-2 进行鸡体免疫。对中和抗体水平及细胞因子含量比较 GM-CSF 和 IL-2 的免疫增强效果进行对比。结果显示, 在第一次免疫 28 d 或 42 d 后, GM-CSF 联合免疫组可诱导鸡体产生更高的抗体和细胞因子水平 ($P < 0.01$)。表明鸡 GM-CSF 能更有效地刺激机体产生较强的抗体和细胞因子反应, 提高重组杆状病毒疫苗的免疫效果。

关键词: 新城疫, GM-CSF, IL-2, 联合免疫, 免疫效果

Efficacy enhancement of a Baculovirus-vectored Newcastle Disease Virus F protein vaccine by chicken GM-CSF and IL-2

Hang Yu, Dongni Gao, Yan Shen, Ying Liu, Wenxiang Ping, and Jingping Ge

Key Laboratory of Microbiology, College of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, Heilongjiang, China

Abstract: To compare with the effects of the GM-CSF and IL-2 used as adjuvants in the baculovirus vaccine, we used genetic engineering to construct the recombinant baculovirus rBV-LMI-F and with GM-CSF and IL-2 to immunized chickens. Then, we compared the concentration of the neutralizing antibody and cytokines to determine the immunostimulatory effects of GM-CSF and IL-2. GM-CSF induced higher levels of antibodies and cytokines in chickens at 28 d and 42 d post-vaccination. In conclusion, GM-CSF could elicit higher serum antibody and cytokines responses and improved the effects of Baculovirus vaccine.

Keywords: Newcastle disease, GM-CSF, IL-2, co-immunization, immune effect

Received: December 21, 2017; **Accepted:** May 28, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31270143), Colleges and Universities Science and Technology Innovation Team of Heilongjiang Province “Technology of Agricultural Microbial Fermentation” (No. 2012td009).

Corresponding author: Jingping Ge. Tel: +86-451-86609016; E-mail: gejingping@126.com

国家自然科学基金 (No. 31270143), 黑龙江省高等学校科技创新团队“农业微生物发酵技术” (No. 2012td009) 资助。

网络出版时间: 2018-06-21

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180620.1617.002.html>

新城疫 (Newcastle disease, ND) 是由新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 引起的高度接触性传染病, 由于该病的暴发及抗原变异等情况相继出现, 使得传统疫苗免疫效果日趋下降而濒临于历史舞台“边缘”^[1]。针对这种情况, 开发基因工程亚单位疫苗成为解决该疫病的方法之一。杆状病毒表达系统是一种操作简便、收益高、表达产物稳定的高效的真核表达载体系统, 可用于制备新型疫苗以对抗禽类传染病的暴发^[2-3]。并且各类疫苗在添加免疫佐剂后其免疫效果得到提高^[4-5]。研究表明, F 蛋白是 NDV 感染所必需的蛋白, 其在病毒颗粒与宿主细胞融合过程中发挥重要作用^[6]。本课题组前期采用 DNAMAN、DNASar 和 ABCpred 等预测软件对 NDV-F 蛋白抗原表位指数、亲水性、疏水性和二级结构进行了综合预测, 我们根据预测结果选取第 1-196 位氨基酸与第 331-554 位氨基酸片段作为抗原片段来研究 F 基因的抗原性并分别构建重组杆状病毒疫苗。鸡体免疫结果显示, 含有 F 全基因的杆状病毒疫苗可获得最佳的免疫保护效果^[7], 因此本研究以 F 全基因为目的基因构建重组杆状病毒疫苗, 以保护鸡体免受病毒攻击。

但基因工程亚单位疫苗通常因分子量小等因素而不能完全发挥其免疫效果, 因此需要通过添加一定的免疫佐剂提高其免疫效果^[8]。在众多类型免疫佐剂中, GM-CSF 和 IL-2 对各类免疫细胞具有较强的免疫刺激作用。且具有较为广泛的应用前景而逐渐进入研究者的视线。其中, GM-CSF 是一种重要的造血生长因子和免疫调节因子^[9], 不仅能够促进粒细胞和单核/巨噬细胞形成集落, 还可诱导抗原呈递细胞到达抗原入侵部位对抗原进行呈递, 同时也在树突状细胞前体细胞分化中起关键作用^[10]。IL-2 作为细胞因子可增强单核细胞及 NK 细胞的杀伤活性^[11], 同时促进 T、B 淋巴细胞的增殖和分化, 从而发挥抗病毒作

用^[12]。并且研究者们已经证实重组 IL-2 具有较强的免疫刺激作用和免疫协同作用^[13]。

此外, 人们为增强杆状病毒疫苗的保护效率, 筛选高效的免疫佐剂亦为重中之重。因此, 人们将研究重点逐渐转向对免疫佐剂的研究。本文自主构建重组杆状病毒疫苗 (rBV-LMI-F), 并联合免疫刺激剂 CSF 及 IL-2 进行鸡体免疫。通过对比各组鸡只的抗体水平及细胞因子含量, 从 GM-CSF 和 IL-2 中筛选出最佳免疫刺激剂, 为 NDV 疫苗免疫刺激剂的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

SPF 鸡: 80 只 1 日龄白来航鸡均由哈尔滨兽医研究所提供, 饲养于隔离器中用于鸡体免疫试验; 国家标准速发型 NDV 强毒株 F48E9 购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心, 用于攻毒试验; Sf9 昆虫细胞由本实验室冻存, 用于重组杆状病毒滴度测定。

1.2 供试质粒

本研究所用的杆状病毒骨架质粒 pLMI 及携带目的基因的原始质粒 pT-F 和 pT-IL-2 由本实验室前期自主构建, pUC-GM-CSF 购自哈尔滨金凯瑞公司, 上述质粒用于构建重组杆状病毒 rBV-LMI-F、rBV-LMI-GM-CSF 与 rBV-LMI-IL-2。

1.3 试剂盒

CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay 购自 Promega 公司; 鸡新城疫病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒、IFN- γ ELISA 检测试剂盒、IL-2 ELISA 检测试剂盒和鸡 IL-4 ELISA 检测试剂盒购自 Abcam 公司。

1.4 方法

1.4.1 引物设计

根据 F、GM-CSF 及 IL-2 基因序列设计 PCR 引物, 引物见表 1。

表 1 本研究所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)	Cleavage site (Underlined)
F-up	ATCCTCGAGATGGGCTCCAGACCTTCTACC	30	<i>Xho</i> I
F-down	GGCGTCGACTCAATGATGATGATGATGCATTTTTGTAG TGGCTCTCATC	52	<i>Sal</i> I
GM-CSF-up	ATCCTCGAGATGCTGGCCCAGCTCACTATT	29	<i>Xho</i> I
GM-CSF-down	AATGAATTCTTAATGATGATGATGATGATGGATGCAGTCTT TCTCCTCTGGG	52	<i>Eco</i> R I
IL-2-up	CGGAATTC TGGGACACTGCCATGATG	26	<i>Eco</i> R I
IL-2-down	CGCGTCGACAATATGATGATGATGATGATGTTATTAAATGT CATCTAGAAG	51	<i>Sal</i> I
M13-47	CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC	24	—

Enzyme restriction sites are underlined.

1.4.2 杆状病毒载体的构建

将载体 pLMI 与 pT-F/pUC-GM-CSF/pT-IL-2 分别进行 *Xho* I /*Sal* I、*Xho* I /*Eco*R I 和 *Eco*R I /*Sal* I 双酶切, 并与 pLMI 载体相连接, 构建重组转移质粒 pLMI-F、pLMI-GM-CSF 与 pLMI-IL-2。将获得的重组质粒转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 挑取白色单菌落, 提取质粒 DNA, 并对其进行双酶切验证。验证正确后将重组转移质粒转入 *E. coli* DH10 Bac 感受态细胞中, 筛选阳性重组子提取 Bacmid DNA, 并命名为 rBac-LMI-F、rBac-LMI-GM-CSF 与 rBac-LMI-IL-2。最后分别以 rBac-LMI-F、rBac-LMI-GM-CSF 与 rBac-LMI-IL-2 为模板, 以 F-up/F-down、GM-CSF-up/GM-CSF-down、IL-2-up/IL-2-down 和 M13-47 为上下游引物进行 PCR, 鉴定杆状病毒转移载体是否构建成功。

1.4.3 重组杆状病毒的制备

本研究通过脂质体培养法制备重组杆状病毒, 首先将上述 3 种杆状病毒转移载体 rBac-LMI-F、rBac-LMI-GM-CSF 与 rBac-LMI-IL-2 转染 Sf9 昆虫细胞, 当 80% 细胞病变时收集共转染上清液, 如此重复 3 次, 以获得高效价 P3 代重组杆状病毒, 并分别命名为 rBV-LMI-F、rBV-LMI-GM-CSF 和

rBV-LMI-IL-2。最后以构建完成的杆状病毒为模板, 以 F-up/F-down、GM-CSF-up/GM-CSF-down、IL-2-up/IL-2-down 为上下游引物进行 PCR, 验证目的基因是否整合至重组杆状病毒中。

1.4.4 重组杆状病毒的滴度测定

本研究通过测定重组杆状病毒滴度确定免疫剂量, 将 Sf9 昆虫细胞接种至 6 孔板中, 并向其分别加入经 10 倍连续稀释的 rBV-LMI-GM-CSF 和 rBV-LMI-IL-2 病毒液, 1 h 后弃去病毒液, 加入含 0.9% 低熔点琼脂的 Sf900 II SFM 培养液 27 $^{\circ}$ C 孵育 8 d, 最后使用中性红染色, 通过试验所得蚀斑数量测定重组杆状病毒 rBV-LMI-GM-CSF 和 rBV-LMI-IL-2 滴度, 并以此滴度进行鸡体免疫。

1.4.5 免疫及攻毒程序

将 14 日龄 SPF 鸡随机分为 4 组, 每组 20 只, 免疫分组、剂量、接种途径见表 2。当免疫鸡只日龄为 14 日龄时, 对各免疫组鸡只进行第一次免疫; 隔 7 d 进行第二次免疫 (0.2 mL/只); 42 日龄时采用 NDV 标准强毒株 F48E9 以皮下注射方式对各免疫组鸡只攻毒, 攻毒剂量为 200 μ L/只。攻毒后观察鸡采食量、饮水量、粪便和精神状况等生理变化。

表 2 鸡体免疫分组

Table 2 The chicken immune plan

Group	Vaccine	Antigen gene	Inoculation dose	Inoculation route
A	PBS	—	200 μ L	Intramuscular injection
B	rBV-LMI-F	<i>F</i>	200 μ L	Intramuscular injection
C	rBV-LMI-F+rBV-LMI-GM-CSF	<i>GM-CSF</i>	200 μ L each	Intramuscular injection
D	rBV-LMI-F+rBV-LMI-IL-2	<i>IL-2</i>	200 μ L each	Intramuscular injection

1.4.6 组织收集及病理组织切片分析

攻毒后 7 d, 各免疫组随机选取一只 SPF 鸡进行麻醉并断头处死, 提取免疫鸡只心脏及十二指肠组织, 混于多聚甲醛溶液过夜, 然后使用 EDTA 脱钙液体脱钙 1 周。包埋后通过切片机将组织切成 8 μ m 厚的截面, 用于病理组织切片分析。

1.4.7 免疫鸡血清中和试验

分离免疫鸡血清, 梯度稀释 NDV 强毒株及血清, 然后使病毒与血清中和反应 1 h, 接种至鸡胚成纤维细胞, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 96 h, 每 12 h 记录细胞病变情况, 按 Reed-Muench 法计算出每个血清样品的中和保护价 (Protective dose, PD₅₀), 用 SSPS 软件计算每组血清 PD₅₀ 的几何平均数, 即为该日龄血清的中和抗体效价 (Geometric mean titer, GMT)。

1.4.8 免疫鸡血清 IgG 抗体水平的检测

在免疫 0、14、28、42、56 d 后每组随机选取 6 只采取翅静脉血, 每只 0.5–1.0 mL, 4 000 r/min 离心 15 min 分离血清, 应用新城疫 IgG 抗体 ELISA 试剂盒检测免疫后各组血清样本中 IgG 抗体滴度, 具体方法按照 ELISA 检测试剂盒说明书进行。

1.4.9 免疫鸡血清细胞因子的检测

所有免疫鸡在免疫后 0、14、28、42、56 d 后随机翅静脉采血 6 只, 每只 0.5–1.0 mL, 离心分离血清, 应用 IFN- γ 、IL-2 和 IL-4 ELISA 试剂盒检测各免疫组鸡只血清样本中 IFN- γ 、IL-2 和 IL-4 浓度, 具体方法按照 ELISA 检测试剂盒说明

书进行。

1.4.10 统计学分析

运用 SPSS Statistics19 软件对有样本重复的试验数据进行统计学分析, 试验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数间的比较采用差异显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 重组转移载体 pLMI-F、pLMI-GM-CSF 和 pLMI-IL-2 的构建与鉴定

将载体 pLMI、pT-F、pUC-GM-CSF 和 pT-IL-2 分别进行酶切后, 将载体片段与目的片段连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 提取质粒进行酶切验证, 凝胶电泳检测结果表明重组转移载体 pLMI-F、pLMI-GM-CSF 和 pLMI-IL-2 构建成功。

2.2 重组穿梭转移载体 rBac-LMI-F、rBac-LMI-GM-CSF 和 rBac-LMI-IL-2 的鉴定

将构建成功的重组转移载体转化 *E. coli* DH10 Bac 感受态细胞, 提取 Bacmid DNA, 进行 PCR 验证, 凝胶电泳结果显示在预期处均有明显条带 (4 000、2 800、2 800 bp), 表明重组穿梭转移载体 rBac-LMI-F、rBac-LMI-GM-CSF 和 rBac-LMI-IL-2 构建成功。

2.3 重组杆状病毒 rBV-LMI-F、rBV-LMI-GM-CSF 和 rBV-LMI-IL-2 的 PCR 鉴定

将构建完成的重组穿梭载体 rBac-LMI-F、rBac-LMI-GM-CSF 和 rBac-LMI-IL-2 转染 Sf9 昆虫细胞, 收集上清液制备 P1 代重组杆状病毒, 并

进行 PCR 鉴定,电泳结果显示在预期处均有明显条带 (1 662、435、430 bp),表明目的基因已成功整合到重组杆状病毒基因组中,重组杆状病毒 rBV-LMI-F、rBV-LMI-GM-CSF 和 rBV-LMI-IL-2 构建成功。

2.4 重组杆状病毒滴度测定

利用空斑分析法测定 P3 代重组杆状病毒滴度,观察至空斑数不变后计数,计数前用中性红溶液染色 2 h,观察空斑形态并计数,得到 rBV-X P3 代的重组病毒滴度 (表 3 和图 1)。

2.5 免疫鸡只攻毒保护率

各免疫组鸡只在初次免疫和加强免疫后均表现正常。在攻毒 2 d 后开始出现死亡,空白对照组鸡只发病率为 71.4%,同时本课题组在剖检鸡只后发现各免疫组鸡只的心脏及十二指肠均有不

同程度的出血和充血现象,说明 NDV 对免疫鸡只具有较强的毒性,并可致其死亡。而 rBV-LMI-F 单独免疫组和 rBV-LMI-F+rBV-LMI-IL-2 联合免疫组在攻毒 4 d 后才陆续有少量鸡只死亡,而 rBV-LMI-F+rBV-LMI-GM-CSF 联合免疫组的免疫鸡只则全部存活。同时在攻毒后第 8 天剖检 GM-CSF 和 IL-2 联合免疫组鸡只,未发现其心脏与十二指肠出现大规模出血与充血现象。并且在 GM-CSF 和 IL-2 的免疫协同作用下,rBV-LMI-F+rBV-LMI-GM-CSF/IL-2 联合免疫组攻毒保护率分别达到 100%和 85.7%,与 rBV-LMI-F 单独免疫组 (80%) 相比,差异显著 ($P<0.05$),同时 rBV-LMI-F+rBV-LMI-GM-CSF 联合免疫组攻毒保护率较 rBV-LMI-F+rBV-LMI-IL-2 联合免疫组提高了 14.3%,且差异显著 ($P<0.05$)。表明 GM-CSF 与 IL-2 虽均具有较强的免疫协同作用,但相比于 IL-2 来说,GM-CSF 具有更强的免疫刺激效果 (图 1)。同时排毒情况显示,PBS 对照组病毒分离为阳性,而 rBV-LMI-F 单独免疫组和 rBV-LMI-F+rBV-LMI-GM-CSF/IL-2 联合免疫组病毒分离均为阴性,且盲传 1 代后亦为阴性。

2.6 病理学分析

2.6.1 免疫鸡只病理组织定性分析

根据病理组织切片结果显示,GM-CSF 联合免疫组鸡只的十二指肠则无明显病理变化;且 IL-2 联合免疫组鸡只的十二指肠的肠黏膜部分有少量脱落,而 PBS 及 rBV-LMI-F 对照组免疫鸡只的十二指肠的肠粘膜表面上皮脱落且多处呈枣核状紫红色出血点,大部分组织结构被破坏。另外在心肌纤维方面,GM-CSF 联合免疫组鸡只的心肌纤维完好无损,无明显病理变化;同时 IL-2 联合免疫组鸡只的心肌纤维局部有轻微的小灶状出血,而 PBS 及 rBV-LMI-F 对照组免疫鸡只的心肌纤维明显断裂,存在大量出血点及出血斑 (图 2、图 3)。表明相对于 IL-2 来说,GM-CSF 具

表 3 P3 代重组杆状病毒 rBV-X 滴度测定

Table 3 P3 Titer determination of rBV-X viral stock

Group-P3	Titer (PFU/mL)	Dilution factor	Number of plaques
rBV-LMI-F	1.00×10^9	10^{-7}	100
rBV-LMI-GM-CSF	5.30×10^8	10^{-7}	32
rBV-LMI-IL-2	1.00×10^9	10^{-7}	100

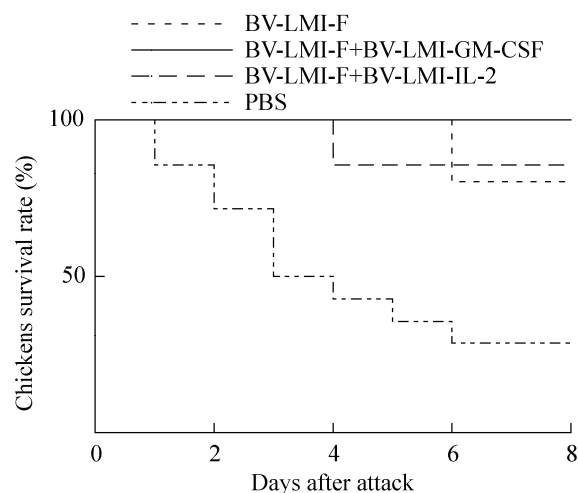


图 1 免疫鸡只攻毒保护结果

Fig. 1 Results of chicken challenge experiments.

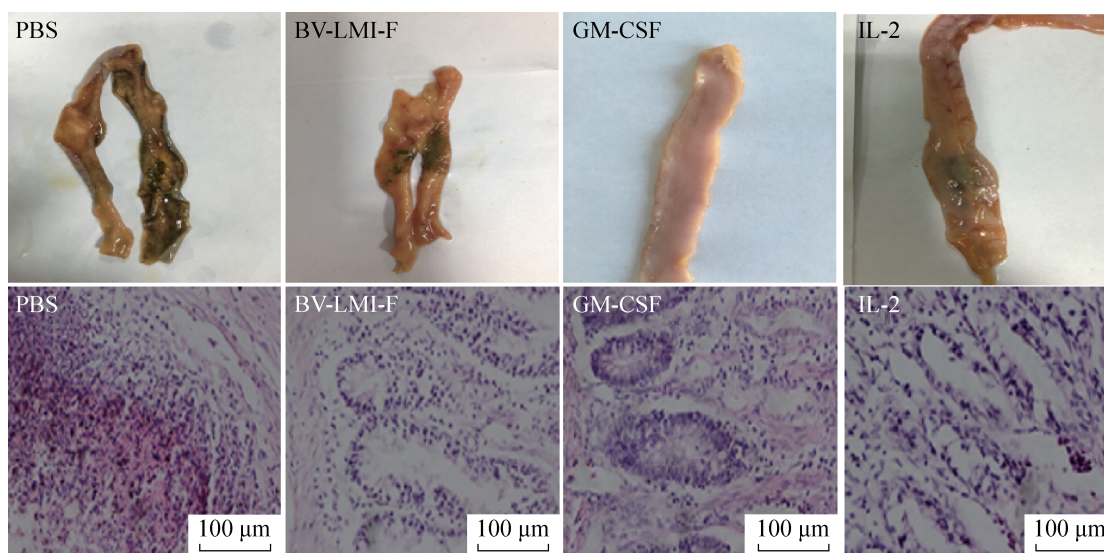


图 2 各免疫组鸡只的十二指肠病变情况 (200×)

Fig. 2 Duodenum lesions in the immunized chickens of each group (200×).

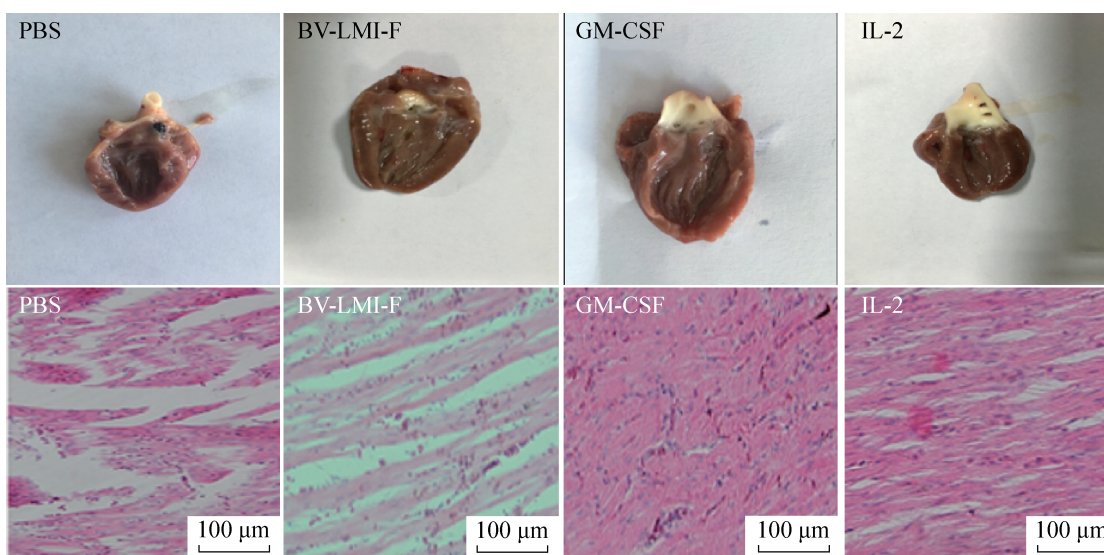


图 3 各免疫组鸡只的心肌病变情况 (200×)

Fig. 3 Myocardial lesions in the immunized chickens of each group (200×).

有较强的免疫协同作用，可有效增强重组杆状病毒对鸡体的保护能力。

2.6.2 免疫鸡只病理组织定量分析

为深入分析 GM-CSF 与 IL-2 在协助重组杆状病毒疫苗对鸡体器官组织保护方面的能力强弱，

本研究通过 Image J 软件测定免疫鸡组织内肠上皮脱落与心肌纤维断裂部分面积的大小，对病理组织切片进行定量分析，以评价 GM-CSF 与 IL-2 的免疫协同作用。

结果表明，PBS 空白对照组、rBV-LMI-F、

GM-CSF 共免疫组及 IL-2 共免疫组免疫鸡十二指肠内肠上皮脱落面积分别为 25 830、11 541、2 079、5 086 μm^2 , 其中 GM-CSF 共免疫组十二指肠内肠上皮脱落面积最小, 且与其余各免疫组相比均差异显著 ($P<0.05$)。同时, PBS 空白对照组、rBV-LMI-F、GM-CSF 共免疫组及 IL-2 共免疫组免疫鸡只心肌纤维断裂部分面积分别为 13 227、9 248、1 058、2 865 μm^2 , 其中 GM-CSF 共免疫组十二指肠内肠上皮脱落面积最小, 且与其余各免疫组相比均差异显著 ($P<0.05$), 表明相对于 IL-2, GM-CSF 可协助重组杆状病毒疫苗对鸡体组织提供更好的保护。

2.7 免疫鸡血清中和抗体效价测定

各免疫组鸡只免疫血清中中和抗体效价均呈现先升高后降低的趋势, 且在第一次免疫后 28 d 达到最高 (图 4), rBV-LMI-F+rBV-LMI-GM-CSF 及 rBV-LMI-F+rBV-LMI-IL-2 联合免疫组免疫鸡血清中中和抗体效价分别为 1 575.84 及 1 457.83, 与 rBV-LMI-F 单独免疫组 (1 329.78) 相比, 差异极显著 ($P<0.01$), 表明 GM-CSF 与 IL-2 均能对重组杆状病毒疫苗起到免疫增强的协同作用。同时, rBV-LMI-F+rBV-LMI-GM-CSF 联合免疫组免

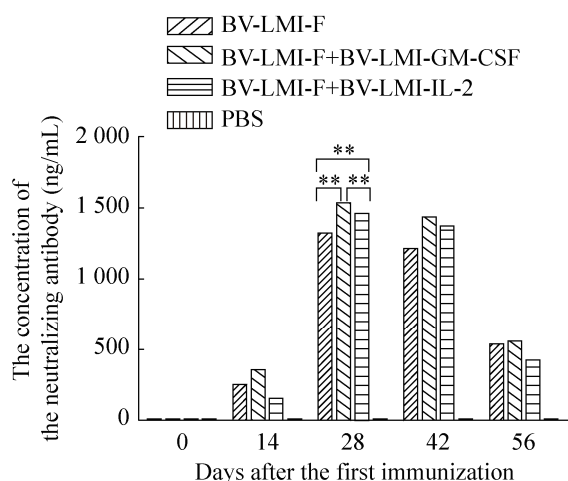


图 4 各免疫组鸡血清中中和抗体效价

Fig. 4 The titer of serum neutralizing antibody in each group. * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

疫鸡血清中中和抗体效价较 rBV-LMI-F+rBV-LMI-IL-2 联合免疫组高 8.1%, 且差异极显著 ($P<0.01$), 表明与 IL-2 相比, GM-CSF 能够对重组杆状病毒疫苗起到更强的免疫增强的协同作用。

2.8 免疫鸡血清中特异性 IgG 抗体水平

自首免后, 各免疫组鸡血清中 IgG 水平均呈现先升高后降低的趋势, 且于第一次免疫后 42 d 达到最高, 其中 rBV-LMI-F+rBV-LMI-GM-CSF 联合免疫组鸡血清中 IgG 抗体水平较 BV-LMI-F 单独免疫组提高了 25.7%, 差异显著 ($P<0.05$), 而 rBV-LMI-F+rBV-LMI-IL-2 联合免疫组较 rBV-LMI-F 单独免疫组仅提高了 13.8%。同时 GM-CSF 联合免疫组鸡血清中 IgG 抗体水平较 IL-2 联合免疫组提高了 10.49%, 且差异显著 ($P<0.05$), 表明相对于 IL-2 而言, GM-CSF 能够刺激鸡体产生较高水平体液免疫应答, 此结果与攻毒保护率相符 (图 5)。

2.9 免疫鸡血清中 IFN- γ 含量

首免后, 各免疫组鸡只血清中 IFN- γ 含量随时间延长而逐渐升高, 至第一次免疫后 42 d, 各组 IFN- γ 含量达到最大 (图 6)。其中 rBV-LMI-F+

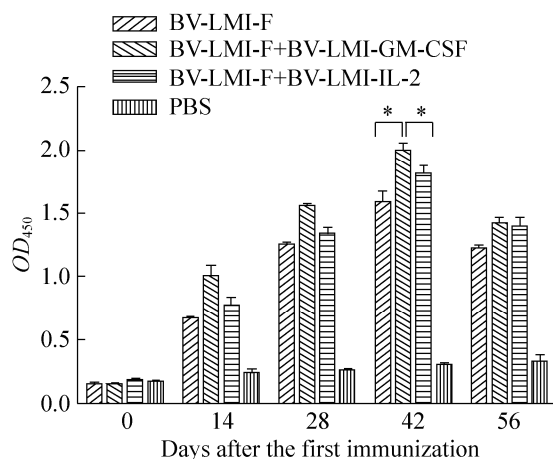


图 5 各免疫组鸡血清中特异性 IgG 抗体水平

Fig. 5 The titer of serum specific IgG in each group. * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

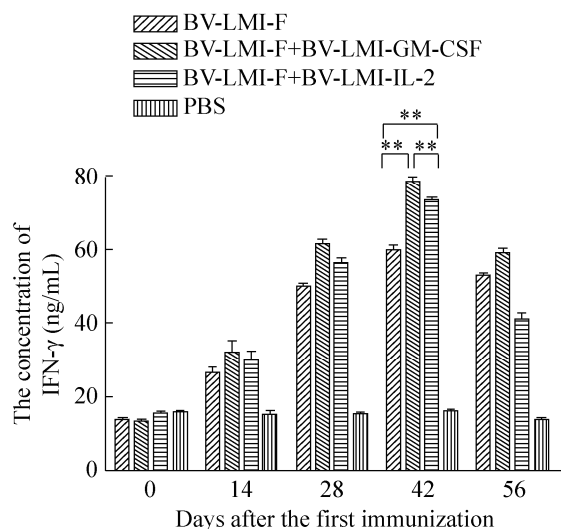


图 6 各免疫组鸡血清中 IFN- γ 含量

Fig. 6 The serum concentration of IFN- γ in each group. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

rBV-LMI-GM-CSF/IL-2 联合免疫组鸡只血清中 IFN- γ 含量 (78.10、73.01 ng/mL) 与 rBV-LMI-F 单独免疫组 (59.53 ng/mL) 相比差异极显著 ($P < 0.01$)。而 rBV-LMI-F+rBV-LMI-GM-CSF 联合免疫组鸡只血清中 IFN- γ 含量较 rBV-LMI-F+rBV-LMI-IL-2 联合免疫组提高了 7.0%, 且差异极显著 ($P < 0.01$), 表明 GM-CSF 与 IL-2 均能刺激鸡体产生较强的细胞免疫应答。

2.10 免疫鸡血清中 IL-2 及 IL-4 含量

各免疫组鸡只血清中 IL-2 及 IL-4 含量均呈现先升高后降低的趋势, 至第一次免疫后 56 d 时达到最高, 且 rBV-LMI-F+rBV-LMI-GM-CSF/IL-2 联合免疫组与 rBV-LMI-F 单独免疫组相比, 差异极显著 ($P < 0.01$)。其中, rBV-LMI-F+rBV-LMI-GM-CSF 联合免疫组血清中 IL-2 及 IL-4 含量较 rBV-LMI-F+rBV-LMI-IL-2 联合免疫组分别提高了 10.74% 和 21.4%, 且均差异极显著 ($P < 0.01$)。结果表明, 相对于 IL-2 来说, GM-CSF 能够诱导鸡体产生更强的系统性免疫应答, 对鸡体提供更好的保护 (图 7、图 8)。

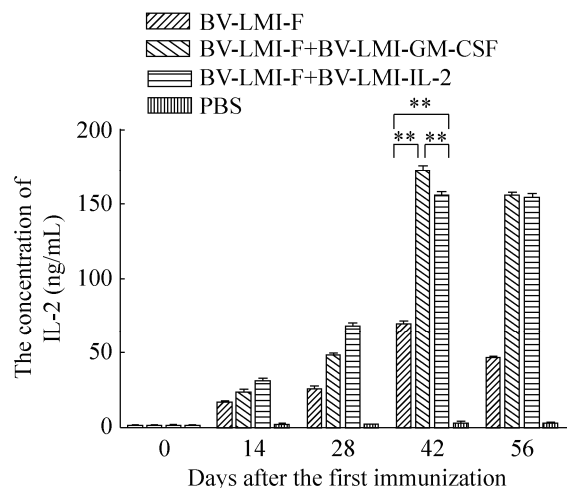


图 7 各免疫组鸡血清中 IL-2 含量

Fig. 7 The serum concentration of IL-2 in each group. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

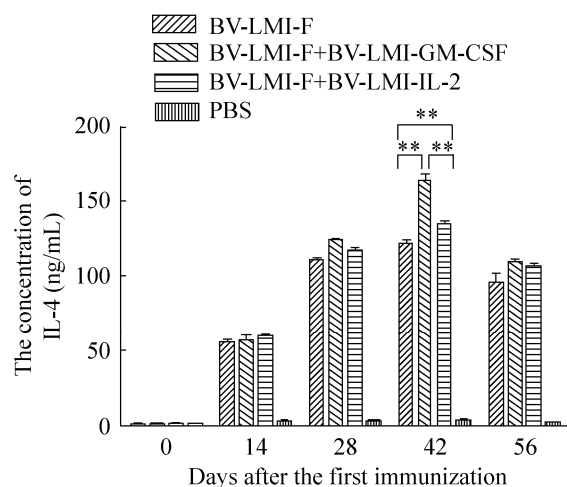


图 8 各免疫组鸡血清中 IL-4 含量

Fig. 8 The serum concentration of IL-4 in each group. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

3 讨论

目前人们对于 NDV 的防控主要以传统疫苗为主, 虽然也开始利用基因工程亚单位疫苗进行尝试, 但是也或多或少出现了一些弊病, 例如重组杆状病毒疫苗的免疫效果会受外源基因表达时间的限制^[14-15], 并且变异株的出现使疫苗免疫

效果下降^[16-18],而单一使用疫苗也很难将病毒根除^[19-20]。因此,联合免疫刺激剂来增强重组杆状病毒疫苗的免疫效果成为有益的选择^[21-22]。

目前,在众多免疫刺激剂中,GM-CSF 和 IL-2 对各类免疫细胞具有较强的免疫刺激作用。王兴龙等^[23]在探究 GM-CSF 作用效果时发现,其可刺激鸡骨髓细胞快速形成集落。姜永厚等^[24]在构建重组质粒并联合 F 基因疫苗进行鸡体免疫研究 IL-2 的免疫效果作用时亦得到相似结论。

虽然鸡 GM-CSF 和 IL-2 具有作为免疫刺激剂的应用前景,但对于两者免疫增强效果的比较方面的研究还鲜有报道,且两者对于 NDV 的响应水平及对杆状病毒疫苗的免疫协同效果还不为人所知^[25]。因此本研究以此为切入点,以 GM-CSF 和 IL-2 为免疫刺激剂进行鸡体免疫,对比分析两者的免疫增强效果。

免疫鸡只攻毒保护率结果表明,rBV-LMI-F+rBV-LMI-GM-CSF 联合免疫组攻毒保护率和中和抗体含量较 IL-2 联合免疫组提高了 14.3%,差异显著 ($P<0.05$),且 Sedegah 等^[26]在探究 GM-CSF 与 pPyCSP 免疫协同作用时得出相似结果,即两者混合免疫后机体内 pPyCSP 特异性抗体水平提高了 8 倍,表明 GM-CSF 可提高多类基因工程疫苗的免疫效果,且不仅局限于禽类疫苗中,其可突破种属限制并发挥较强的免疫刺激作用,同时本研究也为 GM-CSF 在其余病例中的应用提供新思路。

此外,rBV-LMI-F+rBV-LMI-GM-CSF 联合免疫组鸡只器官并无明显病变,而 rBV-LMI-F+rBV-LMI-IL-2 联合免疫组鸡只器官有明显出血点和血斑出现,表明 GM-CSF 可增强杆状病毒疫苗对鸡体的保护效果,GM-CSF 可能通过激活某种信号转导通路以修复受损组织避免鸡体死亡,从侧面提高疫苗的免疫保护效率。另一方面,本研究发现 GM-CSF 联合免疫组鸡只免疫血清中中和抗体及特异性 IgG 抗体水平较 IL-2 联合免疫组分别提

高了 5.5%和 11.8%,且均差异显著 ($P<0.05$),表明 GM-CSF 能够刺激鸡体产生较强的体液免疫应答,进而协助重组杆状病毒疫苗提高对鸡体的保护效率。同时,GM-CSF 联合免疫鸡血清中 IFN- γ 、IL-2 及 IL-4 含量均高于 IL-2 联合免疫组,且均差异显著 ($P<0.05$)。Du 等^[27]在探究 GM-CSF 的免疫协同作用时亦发现,GM-CSF 可协助重组疫苗提高机体内 IL-2、IL-4 和 IFN- γ 等细胞因子的含量,另外谭兵等^[28]亦得到相似结果,表明 GM-CSF 不仅对免疫细胞具有较强刺激作用,对机体的体液及细胞免疫亦具有较强的刺激作用,至于其是否可激活某种信号转导通路还需进一步探究。

综上所述,本研究在尝试构建杆状病毒载体疫苗并进行鸡体免疫后,明确了 GM-CSF 作为免疫刺激剂的免疫协同效果,发现 GM-CSF 可不受种属限制,GM-CSF 亦可协助疫苗突破机体组织屏障,保护机体组织不受病毒侵害以发挥其较强的免疫协同作用。本研究不仅为 NVD 的制备奠定基础,同时也为 GM-CSF 的应用领域及免疫增强机制方面的探究提供新的研究思路。

REFERENCES

- [1] Cuadrado-Castano S, Sanchez-Aparicio MT, García-Sastre A, et al. The therapeutic effect of death: newcastle disease virus and its antitumor potential. *Virus Res*, 2015, 209: 56–66.
- [2] Li BQ, Ye JX, Lin Y, et al. Selection and characterization of single-chain recombinant antibodies against phosphoprotein of newcastle disease virus. *Biologicals*, 2014, 42(5): 285–289.
- [3] Shittu I, Zhu ZY, Lu YQ, et al. Development, characterization and optimization of a new suspension chicken-induced pluripotent cell line for the production of Newcastle disease vaccine. *Biologicals*, 2016, 44(1): 24–32.
- [4] Loudon PT, Yager EJ, Lynch DT, et al. GM-CSF increases mucosal and systemic immunogenicity of an H1N1 influenza DNA vaccine administered into the epidermis of

- non-human primates. PLoS ONE, 2010, 5(6): e11021.
- [5] Panousis C, Dhagat U, Edwards KM, et al. CSL311, a novel, potent, therapeutic monoclonal antibody for the treatment of diseases mediated by the common β chain of the IL-3, GM-CSF and IL-5 receptors. MAbs, 2016, 8(3): 436–453.
- [6] Jiang NY, Tian ZQ, Tang J, et al. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) downregulates the expression of protumor factors cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in a GM-CSF receptor-independent manner in cervical cancer cells. Mediat Inflamm, 2015, 2015(5): 601–604.
- [7] Tan B, Wang HN, Shang LQ, et al. Coadministration of chicken GM-CSF with a DNA vaccine expressing infectious bronchitis virus (IBV) S1 glycoprotein enhances the specific immune response and protects against IBV infection. Arch Virol, 2009, 154(7): 1117–1124.
- [8] Lawson DH, Lee S, Zhao FM, et al. Randomized, placebo-controlled, phase III trial of yeast-derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) versus peptide vaccination versus gm-csf plus peptide vaccination versus placebo in patients with no evidence of disease after complete surgical resection of locally advanced and/or stage IV melanoma: a trial of the eastern cooperative oncology group-American College of Radiology Imaging Network Cancer Research Group (E4697). J Clin Oncol, 2015, 33(34): 4066–4076.
- [9] Cheng H, Wang AD, Meng J, et al. Enhanced metastasis in RNF13 knockout mice is mediated by a reduction in GM-CSF levels. Protein Cell, 2015, 6(10): 746–756.
- [10] Zhang HW, Qian P, Peng B, et al. A novel subunit vaccine co-expressing GM-CSF and PCV2b Cap protein enhances protective immunity against porcine circovirus type 2 in piglets. Vaccine, 2015, 33(21): 2449–2456.
- [11] Martinović KMM, Vuletić AM, Lj Babović N, et al. Attenuated *in vitro* effects of IFN- α , IL-2 and IL-12 on functional and receptor characteristics of peripheral blood lymphocytes in metastatic melanoma patients. Cytokine, 2017, 96: 30–40.
- [12] Li XG, Lu P, Li B, et al. Interleukin 2 and interleukin 10 function synergistically to promote CD8⁺ T cell cytotoxicity, which is suppressed by regulatory T cells in breast cancer. Int J Biochem Cell Biol, 2017, 87: 1–7.
- [13] Wu YG, Ding GY, Song CP, et al. The epidemic characteristics and control strategy of Newcastle disease. Chin Poultry, 2012, 34(5): 5–7 (in Chinese).
- 吴延功, 丁国义, 宋翠平, 等. 新城疫的流行特点与防控措施. 中国家禽, 2012, 34(5): 5–7.
- [14] Kitagawa Y, Tani H, Limn CK, et al. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. J Virol, 2005, 79(6): 3639–3652.
- [15] Qin ZF, He DS, Liu FA. Immunogenicity of three subunit vaccine of ND. Chin J Vet Sci, 2003, 23(1): 22–25 (in Chinese).
- 秦智锋, 贺东生, 刘福安. 新城疫 3 组基因亚单位疫苗的免疫原性试验. 中国兽医学报, 2003, 23(1): 22–25.
- [16] Ding Z, Yin RF, Xue C, et al. The new epidemiological features of Newcastle disease and the control strategy of Newcastle Disease. Chin J Vet Sci, 2015, 35(1): 159–168 (in Chinese).
- 丁壮, 尹仁福, 薛聪, 等. 新城疫流行病学新特点及鹅新城疫防控策略. 中国兽医学报, 2015, 35(1): 159–168.
- [17] Li N, Sun YM, Zhao BH. Cloning of F gene of Newcastle disease virus HeB02 isolate and the study of its DNA vaccine. Chin J Biotech, 2006, 22(3): 445–450 (in Chinese).
- 李楠, 孙一敏, 赵宝华. 鸡新城疫病毒 HeB02 分离株 F 基因的克隆及其 DNA 疫苗的研究. 生物工程学报, 2006, 22(3): 445–450.
- [18] Xu HY, Qin ZM, Qi LH, et al. Evolution of non-coding nucleotide sequences in Newcastle disease virus genomes. Acta Microbiol Sin, 2014, 54(9): 1073–1081 (in Chinese).
- 徐怀英, 秦卓明, 齐丽红, 等. 新城疫病毒非编码序列的遗传演化趋势. 微生物学报, 2014, 54(9): 1073–1081.
- [19] Zhang JH. The production, application and development of chicken Newcastle disease vaccines. Chin Poultry, 2000, 22(2): 41–42 (in Chinese).
- 张俊红. 鸡新城疫疫苗的产生、应用及发展. 中国家禽, 2000, 22(2): 41–42.
- [20] Yang BL, Lü HQ. The detection of hiantibodies to Newcastle disease of serum from chickens inoculated with different strains of vaccine. Chin Anim Husb Vet Med, 2006, 33(5): 53–55 (in Chinese).
- 杨百亮, 吕慧强. 不同鸡新城疫疫苗免疫鸡血清 HI 抗体的测定. 中国畜牧兽医, 2006, 33(5): 53–55.
- [21] Duan L, Li XZ, Tian QH. Screening of immunostimulants for Newcastle disease vaccine. Chin Poultry, 2015, 37(14): 65–66 (in Chinese).
- 段龙, 李学钊, 田启会. 常用新城疫疫苗免疫佐剂的筛

- 选. 中国家禽, 2015, 37(14): 65-66.
- [22] Tang C, Huang X, Yang FL, et al. Effects of aluminum hydroxide nanoparticles on chicken Newcastle disease antimicrobial agents. *Vet Sci Chin*, 2008, 38(12): 1060-1064 (in Chinese).
- 汤承, 黄兴, 杨发龙, 等. 氢氧化铝纳米颗粒对鸡新城疫抗原的免疫佐剂效应. *中国兽医科学*, 2008, 38(12): 1060-1064.
- [23] Wang XL, Hao HF, Du EQ, et al. Adenovirus expression and activity test of chicken GM-CSF. *Chin J Vet Sci*, 2012, 32(4): 509-512 (in Chinese).
- 王兴龙, 郝华芳, 杜恩岐, 等. 腺病毒表达鸡 GM-CSF 及其对鸡骨髓细胞增殖活性的检测. *中国兽医学报*, 2012, 32(4): 509-512.
- [24] Jiang YH, Chen JL, Song XL, et al. Construction of the recombinant plasmid coexpressing NDV F gene and chicken IL-2. *Chin J Prev Vet Med*, 2001, 23(2): 81-84 (in Chinese).
- 姜永厚, 陈奖励, 宋秀龙, 等. 鸡新城疫病毒 F 基因和鸡 IL-2 重组 DNA 疫苗的构建. *中国预防兽医学报*, 2001, 23(2): 81-84.
- [25] Jiang YH, Liu ZG, Chen JL, et al. Effect of chicken IL-2 on Newcastle disease virus F gene vaccination. *Chin J Vet Sci*, 2002, 22(1): 22-24 (in Chinese).
- 姜永厚, 刘忠贵, 陈奖励, 等. 鸡 IL-2 在新城疫病毒 F 基因疫苗免疫中的作用. *中国兽医学报*, 2002, 22(1): 22-24.
- [26] Sedegah M, Weiss W, Sacchi JB Jr, et al. Improving protective immunity induced by DNA-based immunization: priming with antigen and GM-CSF-encoding plasmid DNA and boosting with antigen-expressing recombinant poxvirus. *J Immunol*, 2000, 164(11): 5905-5912.
- [27] Du YJ, Jiang P, Li YF, et al. Immune responses of two recombinant adenoviruses expressing VP1 antigens of FMDV fused with porcine granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Vaccine*, 2007, 25(49): 8209-8219.
- [28] Tan B, Wang HN, Zhang Y, et al. Cloning and eukaryotic expression of chicken granulocyte macrophage colony stimulating factor gene. *J Zhejiang Univ: Agric Life Sci*, 2009, 35(5): 516-522 (in Chinese).
- 谭兵, 王红宁, 张毅, 等. 鸡粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的克隆与真核表达. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2009, 35(5): 516-522.

(本文责编 陈宏宇)