

卢宇, 吕芳, 张娣, 等. TLR3 激动剂对鸡 IBDV 活疫苗免疫的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 205–206.

TLR3 激动剂对鸡 IBDV 活疫苗免疫的影响

卢宇, 吕芳, 张娣, 邓碧华, 张金秋, 侯继波

(江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014)

摘要: 为了进一步研究 TLR3 激动剂 (polyI:C) 对鸡免疫功能的影响, 首先体外用 polyI:C 直接作用鸡外周血淋巴细胞, 测定 chTLR3 mRNA 的表达量, 结果显示 polyI:C 也是 chTLR3 特异性配体, 并且能够刺激 chTLR3 mRNA 表达, 作用 3 h 效果最好。再将 polyI:C 配合鸡法氏囊活疫苗免疫进行体内试验, 测定血清抗体效价和攻毒保护效率, 结果显示 500 $\mu\text{g}/\text{羽}$ 的 polyI:C 对法氏囊活疫苗的免疫效果无明显增强作用。

关键词: 鸡法氏囊病; 聚肌胞; Toll 样受体

中图分类号: S851.34⁺7.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)07–0205–02

聚肌胞 (polvriboinsine – polyribocyaidylic acid, polyI:C) 是由肌苷酸和胞苷酸聚合的双链 RNA, 它能够诱导人类细胞和动物细胞产生干扰素, 并且通过干扰素活化和协调免疫细胞的功能, 对于小鼠、人等哺乳动物, polyI:C 是 TLR3 受体的配基^[1]。鸡传染性法氏囊病是对养禽业造成巨大经济损失的高度接触性传染病, 没有特效药物可以治疗, 主要应用疫苗进行预防, 由于母源抗体和毒株变异等因素, 导致疫苗应用的毒力也逐渐增强, 但免疫效力却不见增加。大量研究表明, 通过添加免疫增强剂可以显著提高疫苗的免疫效果, polyI:C 对禽用疫苗也有显著效果^[2–4]。本研究选用 TLR3 的激动剂 polyI:C, 以鸡法氏囊活疫苗为模式抗原, 以期探索 polyI:C 鸡作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 14 日龄海兰褐蛋鸡, 体重为 180 ~ 200 g, 30 羽 (购自山东省农业科学院 SPF 鸡实验种鸡场), 每组 10 羽, 隔离器饲养, 自由采食饮水。

1.1.2 主要试剂 人用淋巴细胞分离液 (中国医学科学院生物工程研究所), polyI:C (南京奥多福尼生物科技有限公

司), IBDV 抗体检测试剂盒 (IDEXX 公司), 1640 培养基、小牛血清 (Invitrogen 公司), Premix Ex Taq™ (宝生物工程(上海)有限公司)。

1.1.3 疫苗与毒株 IBDV 中强毒株活疫苗 (南京天邦生物科技有限公司), IBDV BC6/85 株 (江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心实验室保存)。

1.1.4 主要仪器 水平离心机 (TDZ5 – WS), Lightcycler480 实时荧光定量 PCR 仪 (罗氏公司), PCR 仪 (Biometra), 生物安全柜 (Tanon EPS – 100 型), 电泳凝胶成像系统 (UVP Bio-imaging Systems), Stat Fax – 2100 酶联检测仪、Stat Fax – 2600 洗板机 (Awareness 公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 chTLR3 mRNA 表达量的检测 按常规方法^[5]分离鸡外周血淋巴细胞, 将所分离的淋巴细胞稀释为 $10^6/\text{mL}$, 加 6 mL/孔于 6 孔细胞培养板。将 polyI:C 添加到细胞培养液, 使其终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 各浓度设置 2 个重复孔, 同时设置不添加佐剂的对照组 2 个孔, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h。在佐剂添加前和添加后 3、6、9、12、24 h 收集淋巴细胞, 保存于 –70 $^{\circ}\text{C}$ 。提取各组淋巴细胞的总 RNA, 进行 RT 反应。用实时荧光定量检测方法检测 TLR3 与 β – actin 的 mRNA 丰度, 并进行分析。

1.2.2 试验动物分组 将 30 羽 14 d 的海兰褐蛋鸡随机分成 3 组, 每组 10 羽。A 组为佐剂试验组, 传染性法氏囊疫苗按 1 羽份/羽免疫鸡的同时, 注射 polyI:C 500 $\mu\text{g}/\text{羽}$; B 组为免疫对照组, 1 羽份/羽免疫鸡传染性法氏囊疫苗的同时, 注射生理盐水; C 组为非免疫对照组, 只注射生理盐水。

1.2.3 血清中 IBDV 抗体的检测 免疫后每周采血 1 次, 共

收稿日期: 2013–01–07

作者简介: 卢宇 (1978—), 男, 江苏睢宁人, 博士, 副研究员, 从事兽用生物制品工程技术的研究。Tel: (025) 84392078; E – mail: fishmanluyu@yahoo.com.cn。

通信作者: 侯继波, 博士, 研究员, 从事兽用生物制品工程技术的研究。E – mail: luyu@jaas.ac.cn。

用而形成的。这种产物还可通过生物体内有机物反应的链式或链式支链放大活性氧的破坏作用, 引起细胞代谢与功能障碍甚至死亡。因此 MDA 含量可反映机体脂质过氧化程度, 间接反映细胞受损伤程度^[3]。本研究表明, 给雏鸡饲喂“囊速治”能使其 MDA 含量显著下降。

关于“囊速治”对雏鸡免疫功能的调节机制, 及其是否对雏鸡其他病毒性或细菌性传染病产生防治效果, 还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 蔡宝祥. 家畜传染病学 [M]. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [2] 甘辉群, 刘明生, 管远红. 一例鸡传染性法氏囊病毒强毒株的分离与鉴定 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40(1): 184–185.
- [3] 刘明生, 甘辉群, 谭菊, 等. 不同硒源对肉鸡血清中与自由基有关酶活力的影响研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2007(4): 50–51.

采血 5 次,分离血清,按照 IBDV 抗体检测试剂盒说明书,对所采样本进行 IBDV 抗体检测。

1.2.4 攻毒保护试验 于免疫后 5 周,对各组试验动物用 IBDV 强毒 BC6/85 株进行攻毒,攻毒量为 100 BID_{50} /羽,攻毒后每天观察鸡采食等临床状态和死亡情况,第 4 天全部处死,解剖观察病变。参照《兽用生物制品质量标准汇编》(2006—2008)鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗质量标准:以出现胸肌腿肌条状或刷状出血,法氏囊出血肿胀、萎缩、发黄或内有胶冻样分泌物等 1 种以上病变者,判定为病变,最后统计疫苗的保护效果。

2 结果与分析

2.1 chTLR3 mRNA 检测结果

由图 1 可见,polyI:C 能显著刺激鸡外周血刺激淋巴细胞 chTLR3 mRNA 表达,并且有一定的时效性。polyI:C 3 h 以内起效,3 h 到达最高峰,后效应显著减退,24 h 后基本消失。

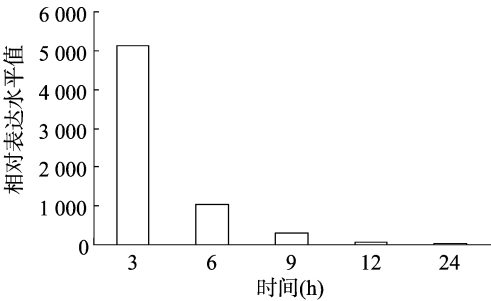


图1 polyI:C刺激淋巴细胞chTLR3 mRNA表达变化

2.2 抗体水平检测结果

每组采集 5 周的血清样本,均作 500 倍稀释后,采用 IDEXX 公司生产的 IBDV 抗体检测试剂盒进行抗体检测,S/P 值 ≥ 0.2 即判为阳性。从表 1 可见,添加 PolyI:C 后,2、4、5 周的抗体值高于疫苗对照组,但是差异不显著($P > 0.05$)。

表 1 鸡传染性法氏囊抗体 ELISA 检测结果

组别	S/P 值				
	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周
A	1.40a	1.97a	2.01a	2.74a	3.60a
B	1.85a	1.86a	2.05a	2.65a	2.65ab
C	0.03b	0.07b	0.22b	0.17b	0.15c

注:同列数据后不同小写字母者表示差异显著($P < 0.05$)。表 2 同。

2.3 攻毒保护结果

攻毒后,2 个免疫组均无死亡,非免疫组死亡 7 羽。于攻毒后第 4 天未死亡鸡全部处死剖检,结果见表 2,A 组有 2 羽鸡出现胸腿肌出血病变,其中 1 羽出现法氏囊病变;B 组有 1 羽鸡同时出现胸腿肌和法氏囊病变,各有 1 羽鸡出现胸腿肌出血和法氏囊病变。A 组和 B 组的保护率分别为 80% 和 70%,无显著差异($P > 0.05$)。

3 讨论

TLR3 是 TLRs 家族成员之一,能特异性地识别病毒的双

表 2 攻毒保护效果

组别	数量 (羽)	法氏囊 病变数	胸腿肌 病变数	正常数(以 组织病变计)	保护率(以组织 病变计)(%)
A 组	10	1	2	8	80a
B 组	10	2	2	7	70a
C 组	10	9	8	0	0b

链 RNA(dsRNA)及其类似物 poly I:C。研究表明,poly I:C 作为 LTR3 的激动剂,能够促进 B 细胞的增殖^[6];能够诱导 DC 较高表达共刺激分子 CD40、CD80、CD86、MHC II 类分子,能够有效提高 DC 的抗原递呈功能^[7-8]。poly I:C 在促进 B 细胞增殖的同时,促进 IL-6 和 TNF- α 的分泌,诱导 B 细胞产生 IgG1 κ 抗体^[9]。本研究通过鸡外周血淋巴细胞中添加 poly I:C,提取 RNA,经所 real-time RT-PCR 方法检测 chTLR3 mRNA 表达变化,证实了 poly I:C 同样也是海兰褐蛋鸡 TLR3 特异性配体。

李茂光等用 polyI:C 佐剂狂犬病疫苗免疫小鼠 1 针组免疫后第 7 天即可诱导较高水平的 IFN SFC,2 针组初免后第 14 天的 IFN SFC 水平有显著提高,可达到 1 针免疫后的 2 倍以上,且均高于其他 2 组疫苗。从抗体应答水平看,1 针免疫后出现不规则的现象而难于判定,但 2 针免疫后 PHKCV + P 组明显高于 PHKCV 组;从保护效果看,无论是 1 针免疫还是 2 针免疫后,PHKCV + P 组均明显高于 PHKCV 组(约提高 2 IU 剂)^[2]。本研究中 poly I:C 与 IBDV 活疫苗同时免疫鸡群,发现 IBDV 抗体上升水平与纯 IBDV 疫苗组水平相当,佐剂增强疫苗免疫效果并不显著。

参考文献:

[1] Ranjith - Kumar C T, Miller W, Xiong J, et al. Biochemical and functional analyses of the human Toll-like receptor 3 ectodomain[J]. J Bio Chem, 2007, 282(10): 7668 - 7678.

[2] 李茂光, 俞永新, 李 加, 等. Poly I:C 佐剂狂犬病疫苗诱导小鼠的免疫应答[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(8): 852 - 856.

[3] 卢 宇, 张金秋, 邓碧华, 等. CpG 寡核苷酸增强鸡新城疫疫苗免疫效力的研究[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(6): 27 - 32.

[4] 宗玉霞, 卢 宇, 郑其升, 等. 不同结构对囊素样肽的免疫活性影响[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(11): 1689 - 1693.

[5] 卢 宇, 王凯民, 郭振环, 等. 硫酸化淫羊藿多糖对鸡外周血淋巴细胞 IL-2 和 IFN 的 mRNA 表达的影响[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(5): 1073 - 1077.

[6] Gururajan M, Jacob J, Pulendran B. Toll - like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B - cell subsets[J]. PLoS One, 2007, 2(9): 863.

[7] Marshall - Clarke S, Downes J E, Haga I R, et al. Polyinosinic acid is a ligand for toll - like receptor 3[J]. J Biol Chem, 2007, 282(34): 24759 - 24766.

[8] Cella M, Salio M, Sakakibara Y, et al. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double - stranded RNA[J]. J Exp Med, 1999, 189(5): 821 - 829.

[9] 钱 莉, 傅 奕, 潘兴元, 等. TLR3 激动剂对 B 细胞功能的影响[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(10): 833 - 836.