

白细胞介素 2 对固始鸡空肠中 SIgA 分泌的影响

刘诗柱^{1,2}, 赵 峰³, 肖传斌³

(1. 吉林大学, 吉林 长春 130062; 2. 商丘职业技术学院, 河南 商丘 476000;

3. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 应用免疫组织化学技术及 Qwin 图像处理系统, 对空肠分泌型免疫球蛋白 A (SIgA) 的定位进行统计分析, 研究其在免疫志贺氏菌灭活油乳苗的同时注射不同剂量的 IL-2 (白细胞介素 2) 对固始鸡免疫后不同时期空肠 SIgA 阳性细胞的影响。结果表明, IL-2 对空肠 SIgA 细胞的产生有显著影响, 可明显提高黏膜免疫应答能力, 提高疫苗的免疫原性。

关键词: 白细胞介素 2; SIgA; 免疫组化; 黏膜免疫; 固始鸡

中图分类号: S831 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)12-0112-04

白细胞介素 2 (IL-2) 是一种最早发现的具有广泛生物活性的细胞因子, 1979 年在第二届国际淋巴因子会议上正式命名。IL-2 必须和其受体结合

才能发挥生物学效应。1981 年 Bobb 等^[1] 发现了 T 细胞表面存在 IL-2 受体。IL-2 不仅是 T 细胞增殖、分化的关键性因子, 还广泛参与 B 淋巴细胞、

收稿日期: 2007-08-20

作者简介: 刘诗柱 (1968-), 男, 河南商丘人, 讲师, 硕士, 主要从事畜牧兽医教学和研究工作。

纯油乳苗免疫组, 尤其是 T 淋巴细胞增殖情况在接种第 14 天后均表现为差异极显著 ($P < 0.01$); 而且联合免疫组的 HI 抗体效价水平也持续性高于单纯油乳苗免疫鸡群, 并在免疫接种 35d 后表现为差异显著 ($P < 0.05$)。由此说明, 本试验所用六邻体基因核酸疫苗和灭活油乳苗联合免疫, 可显著提高机体的体液免疫和细胞免疫水平; 特别是可明显提高 T 淋巴细胞的增殖活化能力, 可较好地弥补单纯灭活疫苗的不足, 这对减蛋综合征的防制具有十分重要的意义。

EDSV 六邻体蛋白是 EDSV 有效保护性抗原成分之一。本试验结果显示, 六邻体蛋白基因核酸疫苗和灭活油乳苗联合免疫与单纯灭活苗免疫相比, 不仅显著促进了免疫器官中 T、B 淋巴细胞的增殖, 而且联合免疫组雏鸡外周血液的 HI 抗体效价也明显升高。其原因一方面可能是由于核酸疫苗和灭活疫苗的免疫协同作用, 使机体的整体免疫水平得到了提高的结果; 同时核酸的质粒载体不仅只是用来编码特异性的抗原, 本身还发挥一定的免疫佐剂作用。Snato 等^[7] 发现, 质粒 DNA 中的氨苄青霉素抗性基因, 能增强疫苗的免疫效应。进一步研究证明, 氨苄青霉素抗性选择基因中含有未甲基化的 CpG 核心的回纹结构 5'-AACGTT-3', 该结构可

诱导机体单核细胞产生 IL-12, 从而刺激 Th1 等细胞分泌 IFN- γ , IFN- α , IFN- β 等, 并可增强自然杀伤细胞活力。而在本研究中, 所应用构建核酸疫苗的 pcDNA3 质粒, 即含有氨苄青霉素抗性基因, 不仅仅用来编码 EDSV 六邻体蛋白, 而且本身还具有免疫佐剂的作用。这些都说明本试验中六邻体蛋白基因核酸疫苗对灭活油乳苗的协同免疫作用机制十分复杂, 很多问题尚需进行更深层的探讨。

参考文献:

- [1] 卡尔尼克 BW. 禽病学 [M]. 9 版. 北京: 中国农业大学出版社, 1999.
- [2] 杨永华. 鸡减蛋综合征病毒的分子生物学研究概况 [J]. 中国兽医科技, 2002, 32(5): 18-20.
- [3] 汪铭书, 程安春, 郭万柱, 等. 减蛋综合征病毒六邻体重组蛋白的表达和初步应用 [J]. 病毒, 2006, 22(1): 58-61.
- [4] 吴志明, 张春杰, 李银聚, 等. 减蛋综合征病毒六邻体蛋白基因的克隆与真核表达载体的构建 [J]. 河南农业大学学报, 2006, 40(1): 7-10.
- [5] 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆试验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 19-22.
- [6] 李建荣, 于涟, 黄耀伟, 等. ISCOM 介导的传染性法氏囊病毒多聚蛋白基因免疫的研究 [J]. 病毒学报, 2001, 17(4): 341-348.
- [7] Snato Y, Mark R, Helen T, *et al.* Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization [J]. Science, 1996, 273: 352.

NK 细胞及 LAK 细胞的激活、增殖及分化,诱导 IFN 等细胞因子的产生;对多种抗原均有增强作用,维持免疫自身稳定,在抗肿瘤、抗毒素及感染性疾病的治疗中具有重要的作用^[2-3]。SIgA 是黏膜免疫应答过程中的主要效应因子,具有多种生物学功能,不仅可以中和病原体,防止细菌、病毒与黏膜结合,还可以促进消化道、呼吸道和生殖道等黏膜分泌液中天然抗菌因子的作用^[4,5]。哺乳动物的 IL-2 作为佐剂能提高免疫应答的水平。本试验在注射志贺氏菌灭活油乳苗的同时,注射不同剂量的 IL-2 免疫鸡群,观察 IL-2 对鸡黏膜免疫功能的影响,旨在为 IL-2 作为家禽疫苗佐剂及免疫增强剂提供试验依据。

1 材料和方法

1.1 试验分组

试验于 2007 年 3 月至 6 月在河南农业大学牧医工程学院基础实验室进行。试验选择 5 日龄健康固始鸡 125 只,正常饲养程序饲养,随机分成 5 组,每组 25 只:即鸡志贺氏菌苗组,鸡志贺氏菌苗+IL-2(10 μ g)组(白 1 组),鸡志贺氏菌苗+IL-2(50 μ g)组(白 2 组),鸡志贺氏菌苗+IL-2(250 μ g)组(白 3 组),以及空白对照组。所有免疫组均于 21 日龄进行志贺氏菌灭活油乳苗免疫,每只鸡注射鸡志贺氏菌灭活油乳苗 0.5 mL,采取颈部皮下注射,同时颈部注射 IL-2。空白对照组注射同量 0.9% 的生理盐水。

1.2 主要仪器、设备、药品、试剂

鼠抗鸡 IgA 抗体(美国 SouthernBiotech 公司产品),稀释度为 1:200;抗小鼠免疫组化试剂盒(晶美生物工程有限公司产品)。试剂盒组成为:封闭液(10%山羊血清)、抗小鼠生物素化二抗、HRP 标记链亲和素、DAB 显色液;胃蛋白酶溶液为:0.4 g 胃蛋白酶溶于 100 mL 0.01 mol/L 盐酸溶液;Delafield 氏苏木素为:苏木素 4 g,100% 酒精 25 mL,溶化后加 10% 铵矾水溶液 400 mL,放有光处 3~4 d,滤过后加甘油及甲醇各 100 mL;防脱片剂 APES、鸡痢疾志贺氏菌灭活苗、固始鸡重组白细胞介素 2,由河南农业大学惠赠;0.1 mol/L PBS (pH7.4),北京中杉金桥生物技术有限公司产品;leicaQwin 图像分析系统;leicaDM2000 显微镜;3% 双氧水甲醇溶液,100%,95%,90%,80%,70% 的梯度酒精,以及盐酸、二甲苯等、常规仪器等。

1.3 试验程序和方法

1.3.1 样本采集与组织切片制备 每组鸡在免疫后第 1,2,3,4,5 周各宰杀 5 只,剖开腹腔将消化道取出放在解剖盘中,找出空肠,取长约 0.5 cm 的空

肠用生理盐水冲洗放入 Carnoy's 液中固定 30 min。用 95% 酒精冲洗 2 遍后,依次进入 90%,95%,100% 酒精脱水,二甲苯透明后在 56 $^{\circ}$ C 石蜡中浸 4 h 并包埋,连续切片;片厚 5 μ m,于表片经 1% APES 的丙酮溶液预处理的载玻片上制得 2 套切片;37 $^{\circ}$ C 恒温箱烤片,备染。1 套用于亲和免疫组织化学染色;另一套用于阴性对照染色,以确定试验免疫组织化学反应的特异性。

1.3.2 亲和免疫组织化学 LAB 染色程序^[6] 石蜡切片用二甲苯脱蜡 25 min,经 100%,95%,90%,80%,70% 酒精分别脱水 3~5 min;蒸馏水冲洗 3~5 min;PBS 冲洗 3 次,每次 3~5 min。切片置于 3% 的双氧水 10 min, PBS 冲洗 3 次,每次 3~5 min。组织抗原修复:每张切片滴加约 50 μ L 的胃蛋白酶溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次,每次 3~5 min;滴加约 50 μ L 的封闭液,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min;甩去血清;滴加约 50 μ L 鼠抗鸡抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,用 PBS 冲洗 3 次,每次 2~3 min。再滴加约 50 μ L 抗小鼠生物素化二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,用 PBS 冲洗 3 次,每次 2~3 min;然后滴加约 50 μ L HRP 标记链亲和素,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,用 PBS 冲洗 3 次,每次 2~3 min;滴加约 50 μ L 新鲜配置的 DAB 溶液,室温显色 3 min,自来水冲洗。用 2 倍稀释的苏木精复染 3 min,自来水冲洗;1% 盐酸酒精分化 5 s,之后梯度酒精脱水干燥、二甲苯透明各 2 min 后,中性树胶封片。阴性对照组与试验组同时按上述步骤处理,只是用 PBS 代替鼠抗鸡抗体,其余步骤完全相同。

1.3.3 照相、采集数据 切片用 leicaDM2000 显微镜观察、照相,组织内出现的棕黄色颗粒为阳性表达。采用 leicaQwin 图像分析系统,对采集的照片进行数据分析和处理。测量 SIgA 细胞阳性面积,每张切片各选 10 个视野,进行统计,并记录数据。

2 结果与分析

2.1 空肠中 SIgA 的分布情况

切片经亲和免疫组织化学 LAB 染色后,显微镜下可见被染成棕黄色的 SIgA 阳性细胞及其分泌物。在空肠中主要分布于肠腺腔内、肠腺之间以及肠绒毛固有层中,细胞多呈圆形和椭圆形(图 1~6)。

2.2 SIgA 在空肠中同一时期不同组的阳性表达

免疫后第 1 周,空肠中志贺氏菌免疫组阳性细胞表达略高于其他几组,白 2 组仅低于志贺氏菌苗免疫组。在免疫后第 2 周时,白 2 组和志贺氏菌免疫组的 SIgA 细胞表达明显高于其他 3 组,白 2 组的 SIgA 阳性细胞最多。在免疫后第 3 周,白 1 组的阳性细胞表达数量最多,白 2 组紧随其后,其他 3 组的阳性表达数量相当。在免疫后第 4 周,5 个

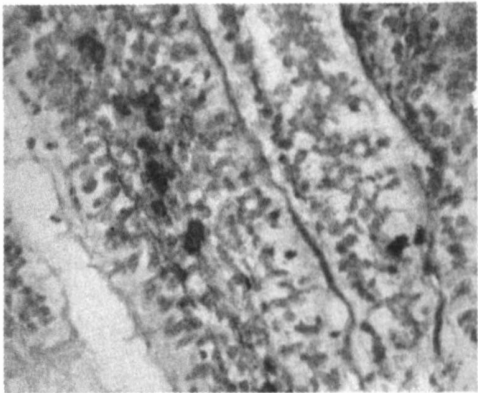
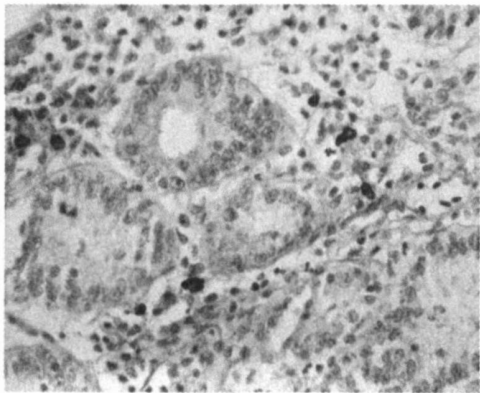


图 1 免疫后第 1 周对照组空肠肠腺之间 SIgA(400×)

图 5 免疫第 4 周白 3 组空肠肠绒毛固有层 SIgA(400×)

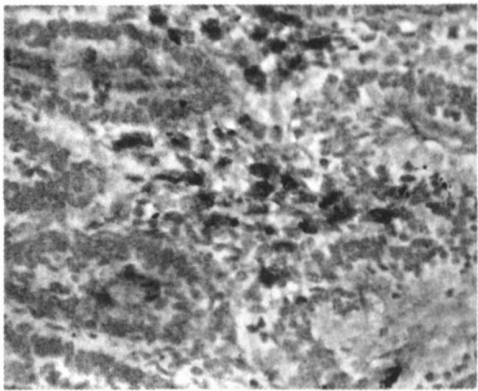
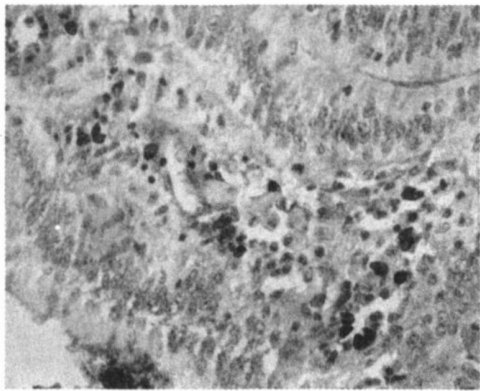


图 2 免疫后第 1 周对照组空肠肠绒毛固有层 SIgA(400×)

图 6 免疫第 4 周白 1 组空肠肠腺之间及腺腔 SIgA(400×)

不同处理组的阳性细胞表达数量整体都高于其他几周,且白 2 组的阳性表达最多,空白对照组最少,白 1 组和白 3 组阳性表达量相当。在免疫后第 5 周,白 2 组 SIgA 细胞的量显著高于其他 4 组,其中空白对照组最少;且与第 4 周比较,每组均有不同程度的下降。整体来说,在免疫后的各周,SIgA 阳性细胞表达量最高的为白 2 组(图 7)。

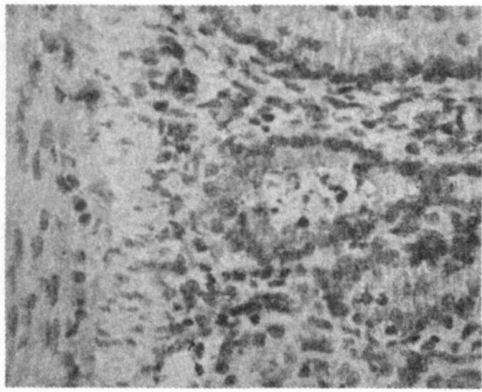


图 3 免疫后第 1 周白 1 组空肠肠腺腺腔 SIgA(400×)

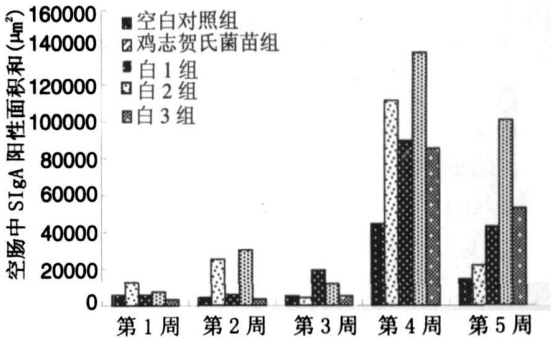


图 7 SIgA 在空肠中同一时期不同组的阳性表达

2.3 SIgA 在空肠中同一组不同时期的阳性表达

空肠在空白对照组的阳性表达是第 1 周稍微高于第 2 周,之后开始逐渐上升,直至免疫后第 4 周时达到最高峰;第 5 周开始下降。在志贺氏菌免疫组免疫后,第 2 周阳性水平高于第 1 周,第 3 周最低;

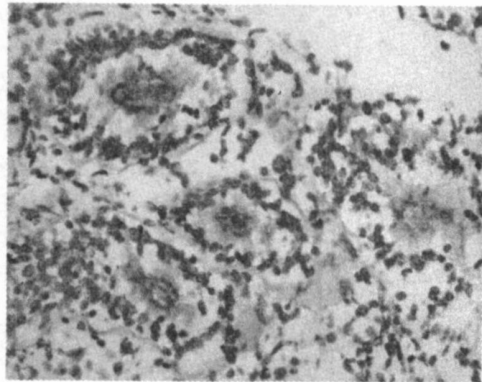


图 4 免疫后第 2 周志贺氏菌苗免疫组空肠肠腺腺腔 SIgA(400×)

在免疫后第 4 周达到最高峰。白 1 组的阳性表达数量直线上升,第 4 周时达到最大值;从第 5 周开始下降。白 2 组的阳性细胞表达数量增减趋势与志贺氏菌免疫组相似,只是数量都比之增加。白 3 组与白 1 组的阳性细胞增减趋势相同,但是其第 1 周、第 2 周、第 3 周阳性细胞的表达都特别少,为 5 组中最少的(图 7)。总之,整体来看,在空肠中 SIgA 从第 1 周开始上升,到免疫后第 4 周时达到最高峰,然后在第 5 周开始下降。

3 结论与讨论

IL-2 又称为 T 细胞生长因子,是由辅助性 T 细胞在抗原和有丝分裂的刺激下及 IL-1 的诱导下所分泌的一种糖蛋白^[8]。国内外对鸡 IL-2 的初步研究表明,作为 T 淋巴细胞的生长因子,鸡 IL-2 可直接增强由 T 细胞介导的细胞免疫功能。激活的 T 细胞由于亚群不同可分泌不同的细胞因子,其中 IL-4 等可促进 B 细胞的增殖、分化及抗体的产生。B 细胞同样有 IL-2 受体,IL-2 也可直接活化 B 细胞,使其生长和刺激抗体产生,故也是一种 B 细胞生长因子,从而促进 B 细胞介导的体液免疫^[9]。因此,IL-2 可直接增强肠道局部的免疫调节功能。

肠道黏膜固有层淋巴细胞由混合的淋巴细胞所组成,主要是 IgA 浆细胞和 CD4⁺T 辅助细胞(Th1)。前者能产生大量 SIgA;后者能分泌 IL-5, IL-6,促进 IgA⁺B 细胞向 IgA 浆细胞分化和成熟,在免疫应答时可产生大量 SIgA^[10]。已发现在黏膜部位的免疫应答以 Th2 型为主,定居在固有层的 CD4⁺Th2 细胞可分泌多种 Th2 型细胞因子,如转化生长因子-β(TGF-β),IL-4,IL-5,IL-6 及 IL-10。IL-4,IL-5,IL-6,IL-10 及 TGF-β 可协同诱导 SIgA 阳性 B 细胞分化成为 IgA 阳性浆细胞。而在肠黏膜局部中 CD4⁺T 细胞的 Th1 细胞,能分泌 IL-2,IFN-γ;其对于 IgA 的类别转换起调控作用,可提高 IgA 的分泌量。有关资料表明,IFN-γ 和 TNF 能增强 SIgA 的转运,从而增加

SIgA 的分泌量,说明 T 细胞影响 SIgA 的合成和分泌。从本次试验免疫后的时间来看,白 1 组和白 3 组的 SIgA 的阳性表达随着免疫后时间的增加而变化,到免疫后第 4 周时达到最大值,随后开始下降。空白对照组和志贺氏菌免疫组以及白 2 组的 SIgA 的变化,主要是先上升再下降再上升,到免疫后第 4 周达到最大值,从免疫后第 5 周开始下降。从整个试验过程来看,免疫后第 4 周 SIgA 的分泌量比较大,证明随着免疫时间的增加,IL-2 对空肠黏膜的刺激是逐渐增强的,只有当其达到一定值的时候才开始下降。由此说明,IL-2 与疫苗共同应用,能增强机体黏膜免疫应答能力。另外,IL-2 作为一种天然的功能细胞因子,不会造成机体残留,可以作为一种免疫增强剂,其应用前景较为广阔。

参考文献:

- [1] 李宏梅,李祥瑞,郭慧君.白介素 II 的研究进展及应用[J].山东畜牧兽医,2002(1):38-39.
- [2] 张小飞,杨倩.黏膜免疫佐剂的研究进展[J].免疫学杂志,2004,20(3):62-65.
- [3] 曾常茜.分泌型 IgA 在黏膜抗感染中的作用[J].北华大学学报(自然科学版),2005,6(1):33-35.
- [4] 张晓文,杨倩.禽流感灭活抗原与佐剂配合鼻腔免疫对鸡呼吸道抗体分泌细胞的影响[J].南京农业大学学报,2007,30(1):94-98.
- [5] Mestecky J, Me Ghee A J. Immunoglobulin A (IgA) molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and response[J]. Advances in Immunology, 1987, 40:153-245.
- [6] 倪灿荣,马大烈.免疫组织化学实验技术及应用[M].北京:化学工业出版社,2006:134-136.
- [7] 陆承平.兽医微生物学[M].北京:中国农业出版社,2001:113-126.
- [8] 杨发龙,岳华,贾文祥.鸡白细胞介素 2(IL-2)对鸡免疫功能的影响[J].中国家禽,2005,27(19):17-20.
- [9] 罗治彬.肠道黏膜 SIgA 免疫系统的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,1997,13(2):38-41.
- [10] 崔治中,崔保安.兽医免疫学[M].北京:中国农业出版社,2004:145-146.

(上接第 104 页)

3 化学防治

发现黄瓜霜霉病发病中心后,可选用 45%百菌清烟剂,或 5%百菌清粉尘剂,或 10%防霉灵粉尘剂,或 58%雷多米尔粉剂 500 倍液,或 50%甲霜铜粉剂 600 倍液,或 72%克露粉剂 1000 倍液等,烟熏或粉尘剂与喷雾交替进行,7~10 d 喷药 1 次,连续

3 次。也可在发病前喷施阿米西达悬浮剂 1000 倍液;发病初期每公顷用 72.2%普力克 9000~12000 倍液,间隔 7~10 d 喷药 1 次,为了防止产生抗药性,在每个生长季节使用该产品次数不宜超过 3 次,可与其他不同类型杀菌剂,如 66.8%霉多克可湿性粉剂 800 倍液,或 50%氟吗·锰锌可湿性粉剂 600~900 倍液轮换使用。