河南农业科学,2016,45(8):125-130
Journal of Henan Agricultural Sciences
doi:10.15933/j.cnki.1004-3268.2016.08.024

水溶性酵母葡聚糖对猪细小病毒灭活疫苗免疫效果的影响

靳晓慧[1,2],王瑞宁[1],徐卫松[1],耿静微[1],何潇湘[1],郑兰兰[2],张　建[3],魏战勇[1,2*]
(1.河南农业大学 牧医工程学院,河南 郑州 450002;2.河南省动物性食品安全重点实验室,河南 郑州 455000;3.河南省信阳市平桥区动物卫生监督所,河南 信阳 464100)

摘要:为研究水溶性酵母葡聚糖作为免疫佐剂对猪细小病毒(PPV)灭活疫苗免疫效果的影响,将水溶性酵母葡聚糖与 PPV 灭活疫苗联合免疫小鼠,采用 ELISA 方法检测免疫后不同时间小鼠血清中的抗体水平及 IL-4、IL-6、IFN-γ 的分泌水平,应用流式细胞仪检测免疫小鼠 $CD3^+$、$CD3^+CD4^+$、$CD3^+CD8^+$ T 淋巴细胞百分比值的动态变化。结果显示,与疫苗单独免疫组相比,酵母葡聚糖对抗体水平无明显影响,$CD3^+$、$CD3^+CD4^+$、$CD3^+CD8^+$ 细胞数量增加,且均能不同程度诱导IL-4、IL-6、IFN-γ 分泌。表明,水溶性酵母葡聚糖联合 PPV 灭活疫苗能够有效增强机体的免疫功能,水溶性酵母葡聚糖可以作为 PPV 的免疫佐剂。

关键词:猪细小病毒;灭活疫苗;水溶性酵母葡聚糖;T 淋巴细胞亚群;细胞免疫;体液免疫
中图分类号:S852.4　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1004-3268(2016)08-0125-06

Influence of Water-soluble Yeast Glucan on Immune Effects of Porcine Parvovirus Inactivated Vaccines

JIN Xiaohui[1,2], WANG Ruining[1], XU Weisong[1], GENG Jingwei[1], HE Xiaoxiang[1], ZHENG Lanlan[2], ZHANG Jian[3], WEI Zhanyong[1,2*]
(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;
2. Key Laboratory for Animal-derived Food Safety of Henan Province, Zhengzhou 455000, China;
3. Animal Health Supervision Institute of Pingqiao Distrit, Xinyang 464100, China)

Abstract: In order to research the effect of water-soluble yeast glucan as immune adjuvant on immune effects of PPV inactivated vaccines, the mice were injected with PPV inactivated vaccine with the water-soluble yeast glucan, blood samples were taken weekly after vaccination. The antibody titers and sera secreting IL-6, IL-4, IFN-γand CD^{3+}, $CD^{3+}CD^{4+}$, $CD^{3+}CD^{8+}$ T lymphocytes percentage were measured by ELISA and FCA. Compared with the vaccine immunization group alone, yeast glucan could enhance the number of CD^{3+}, $CD^{3+}CD^{4+}$, $CD^{3+}CD^{8+}$ T-lymphocytes subpopulations, as well as IL-6, IL-4 and IFN-γ secretion of serum. However, there was unexpectedly little difference on antibody titers. It demonstrated that water-soluble yeast glucan injected with PPV inactivated vaccines could effectively enhance the body's immune function, and water-soluble yeast glucan could serve as PPV immune adjuvant.

Key words: porcine parvovirus; inactivated vaccine; water-soluble yeast glucan; T-lymphocyte subsets; cellular immunity; humoral immunity

---

收稿日期:2016-01-10
基金项目:河南省科技开放合作项目(142106000042);河南省重大科技攻关项目(132102110034)
作者简介:靳晓慧(1991-),女,河南开封人,在读硕士研究生,研究方向:动物分子病毒学、分子免疫学。
E-mail:1114780675@qq.com
*__通讯作者__:魏战勇(1975-),男,河南安阳人,教授,博士,主要从事动物分子病毒学、分子免疫学研究。
E-mail:weizhanyong@henau.edu.com

猪细小病毒病是由猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV)感染引起的一种猪的繁殖障碍病,主要引起初产母猪不孕、流产、死产、产木乃伊胎及弱胎等[1-2]。近年来,PPV 病的广泛流行给养猪业造成了巨大的经济损失[3]。对该病目前尚无有效的治疗方法,临床上主要使用 PPV 疫苗进行免疫预防。PPV 弱毒苗免疫效果较好,但其本身存在散毒的危险。PPV 灭活疫苗作为预防 PPV 的常用疫苗,安全性较高,但由于其主要引起体液免疫应答,引起的细胞免疫应答水平较低甚至没有,从而导致免疫保护率不高,且其易导致机体长期处于持续性感染状态。因此,如何提高疫苗刺激的保护性抗体水平和细胞免疫应答效应是防制 PPV 感染的关键。

佐剂的选择对灭活疫苗免疫效果起着至关重要的作用[4-7]。酵母葡聚糖是存在于酵母细胞壁中的一种多糖,对细菌有很明显的抑制作用,同时具有抗癌、抗病毒的功能,可以增强哺乳动物的免疫力,具有降低血脂、促进伤口愈合等功能,是一种良好的生物效应调节剂。酵母葡聚糖被广泛应用到动物饲料、食品添加剂等各个领域[8-10]。目前,酵母葡聚糖作为免疫增强剂在水产养殖中使用最广泛[11],然而,在畜禽养殖业中,有关葡聚糖的应用报道较少。李军等[12]在断奶仔猪日粮中添加适量的啤酒酵母葡聚糖发现,啤酒酵母葡聚糖可以提高断奶仔猪的生产性能以及细胞免疫功能。但有关酵母葡聚糖作为免疫佐剂在畜禽疾病防制方面的研究尚未见报道。为此,本研究采用水溶性酵母葡聚糖联合 PPV 油乳剂灭活疫苗免疫小鼠,分析水溶性酵母葡聚糖对 PPV 灭活疫苗免疫效果的影响,以期为猪 PPV 灭活疫苗新型佐剂的开发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 疫苗

猪 PPV 油乳剂灭活疫苗购于中牧实业股份有限公司(批号 1009006-2);自制猪 PPV 油乳剂灭活疫苗。

1.2 供试动物

60 只体质量 20 g 左右的 Balb/C 小鼠,购自郑州大学医学院实验动物中心。

1.3 主要试剂

猪细小病毒抗体检测 ELISA 试剂盒购自 BioXL 公司;酵母细胞壁粗提物,购于安琪酵母股份有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠 IgG,购于北京鼎国生物技术发展公司;小鼠 IL-4、IL-6 及 IFN-γ ELISA 检测试剂盒,购自武汉华美生物工程有限公司;大鼠抗小鼠 $CD3^+$、$CD4^+$ 和 $CD8^+$ 分子单克隆抗体以及 FITC、PE 标记的兔抗大鼠 IgG,购自北京邦定泰克生物技术有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.4 水溶性酵母葡聚糖的制备

取干燥的酵母细胞壁粗提物 20 g,悬浮于 120 mL 6% NaOH 溶液中,60 ℃条件下剧烈搅拌 4 h,冷却至室温后 3 000 r/min 离心 15 min,弃上清液后,用 80 mL 3% NaOH 溶液重新悬浮,加热至 90 ℃并不断搅拌 2 h,3 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,加入 50 mL 4% HCl 充分搅拌,室温下静置 2 h。3 000 r/min离心 15 min,弃上清液,用蒸馏水充分洗涤 3 次,再用 50 mL 95% 乙醇于 75 ℃搅拌 3 h,脱水 2 次,37 ℃干燥 12 h,得到淡黄色的酵母碱不溶性葡聚糖粉末。将其放入水解管中,加入 27 mL 2.7 mol/L的 H_2SO_4 后封管,置于 100 ℃的水浴中水解 3 h。水解液转入 100 mL 容量瓶中,定容备用。将经酸处理后的样品溶液稀释到质量浓度为 0.04 mg/mL后,取 1.0 mL 加入蒽酮试剂,按照硫酸-蒽酮法测定含量[13]。

酵母碱不溶性葡聚糖按 1∶10(*m/v*)添加 90% 甲酸,85 ℃降解 1 h,加热,除去甲酸,调节 pH 值至 11,过滤,将过滤浓缩液的 pH 值调节至中性,加热到 70 ℃处理 30 min,真空冷冻干燥即获得水溶性酵母葡聚糖,最后将其用 pH 值 8.0 的磷酸缓冲液配制成 8 mg/mL 的水溶性酵母葡聚糖供试液,备用[14]。

1.5 试验设计

60 只 Balb/C 小鼠随机分为 6 组,每组 10 只,雌雄各半,猪 PPV 抗体检测 ELISA 试剂盒检测 PPV 抗体均为阴性。皮下分点注射,隔周进行二免,每组免疫剂量与首次免疫剂量相同。免疫后不同时间每组分别随机抽取 3 只小鼠进行摘眼球采血并分离血清。具体分组及免疫方案见表 1。

表 1 试验分组及免疫情况

组别	免疫种类	剂量
Ⅰ	自制 PPV 油乳剂疫苗	0.2 mL/只
Ⅱ	自制 PPV 油乳剂疫苗+水溶性酵母葡聚糖	0.2 mL/只+0.2 mL/只
Ⅲ	商品 PPV 油乳剂疫苗	0.2 mL/只
Ⅳ	商品 PPV 油乳剂疫苗+水溶性酵母葡聚糖	0.2 mL/只+0.2 mL/只
Ⅴ	水溶性酵母葡聚糖	0.2 mL/只
Ⅵ	生理盐水	0.2 mL/只

1.6 抗体水平的测定

免疫 0、1、2、3、4、5、6 周后,对分离到的血清在 56 ℃水浴灭活 30 min。按照 PPV ELISA 诊断试剂盒(试剂盒中酶标羊抗猪 IgG 更换为辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG)使用说明书操作,应用间接 ELISA 方法检测小鼠血清中 PPV 的抗体水平。

1.7 小鼠 T 淋巴细胞亚群的测定

免疫 0、1、2、3、4 周后,对采集的血液使用柠檬酸钠抗凝,取抗凝血 0.2 mL,加 2 mL 红细胞裂解液,充分混匀,室温作用 10 min,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加 5 mL PBS 洗涤,2 000 r/min 离心 10 min,重复 2 次。将每份血清样品分装 2 管,

一管加入鼠抗 CD3－FITC、CD4－PE 单克隆抗体各 10 μL，另一管加入鼠抗 CD3－FITC、CD8－PE 单克隆抗体各 10 μL，每管取细胞悬液 500 μL，4 ℃冰箱中避光反应 1 h，再加 PBS 缓冲液 1 mL，混匀，2 000 r/min离心 5 min，弃上清，将管底细胞用 1 mL PBS 悬浮，用 FACsort 流式细胞仪检测，每个样本计数 3 000 个细胞，结果用 Mod Fit LT 软件分析[15]。

1.8　细胞因子 IL－4、IL－6 和 IFN－γ 含量的测定

按照 ELISA 检测试剂盒使用说明书，检测小鼠免疫 7、14、21、28 d 后血清中 IL－4、IL－6 和 IFN－γ 的含量。以标准品的质量浓度为横坐标、OD 值为纵坐标，绘制标准曲线。根据样品的 OD 值计算小鼠血清中 IL－4、IL－6 和 IFN－γ 的含量。

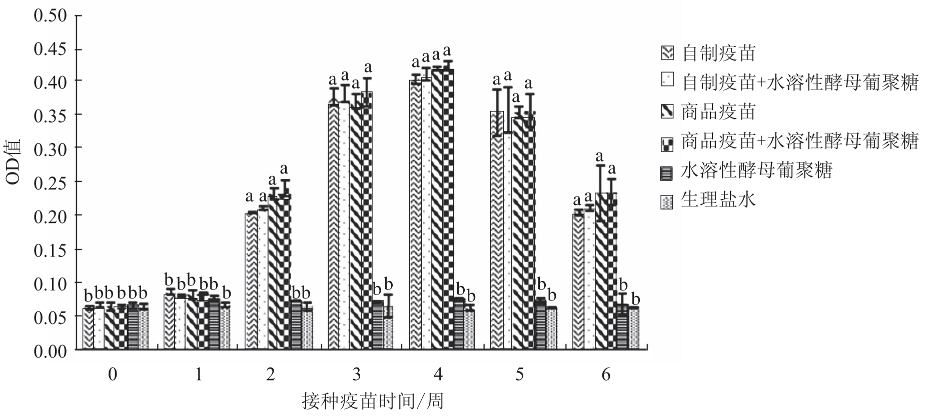
1.9　数据处理

用 SPSS 11.5 及 Excel 2000 将所得数据进行统计处理，计算其平均值，试验数据以平均值 ± 标准差表示，并用 SPSS 11.5 软件进行 Duncan's 多重分析。

2　结果与分析

2.1　水溶性酵母葡聚糖对 PPV 抗体水平的影响

用 ELISA 方法对每周收集的血清进行抗体水平的检测，得到抗体水平消长曲线（图 1）。统计分析结果表明，从第 2 周开始，除了水溶性酵母葡聚糖组，自制疫苗组、自制疫苗＋水溶性葡聚糖组、商品疫苗组、商品疫苗＋水溶性葡聚糖组抗体水平均显著高于生理盐水组，自制疫苗免疫组与商品疫苗免疫组差异不显著，水溶性酵母葡聚糖联合 PPV 灭活疫苗组的抗体效价与相应的灭活疫苗单独免疫组差异均不显著。整体上，水溶性酵母葡聚糖联合 PPV 灭活疫苗组的抗体水平高于相应的灭活疫苗单独免疫组。



图中不同字母表示差异显著(*P*<0.05)

图 1　小鼠血清抗体水平的检测结果

2.2　水溶性酵母葡聚糖对外周血中 T 淋巴细胞亚群的影响

2.2.1　$CD3^+$ T 淋巴细胞　各组 $CD3^+$ T 淋巴细胞百分率均比生理盐水组高（图 2）。自制疫苗免疫组与商品疫苗免疫组差异不显著，水溶性酵母葡聚糖联合 PPV 灭活疫苗免疫组均比相应的灭活疫苗组的 $CD3^+$ 百分率高，但差异不显著。

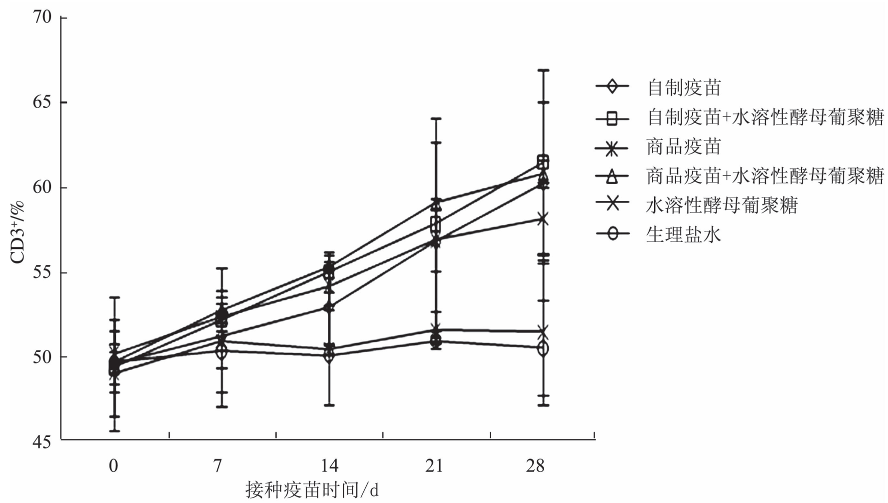


图 2　免疫小鼠后外周血 $CD3^+$ 细胞百分率

2.2.2 CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ T 淋巴细胞 各组的 CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ T 淋巴细胞百分率均高于生理盐水组，各疫苗免疫组 CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ T 淋巴细胞百分率均高于水溶性酵母葡聚糖组（图 3）。在免疫后 14 d 自制疫苗免疫组显著高于商品疫苗免疫组，在免疫后 21 d 水溶性酵母葡聚糖联合 PPV 灭活疫苗免疫组趋于下降，但仍高于相应的灭活疫苗免疫组。整体上，水溶性酵母葡聚糖联合 PPV 灭活疫苗免疫组均比相应的灭活疫苗组的 CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ T 淋巴细胞百分率高，但差异不显著。

2.2.3 CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T 淋巴细胞 在免疫后 14～28 d，除水溶性酵母葡聚糖单独免疫组外，各试验组的 CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T 淋巴细胞百分率均显著高于生理盐水组（图 4）。商品疫苗免疫组 CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T 淋巴细胞显著高于自制疫苗免疫组。在免疫后 21 d，水溶性酵母葡聚糖联合 PPV 灭活疫苗免疫组显著高于相应的灭活疫苗组。

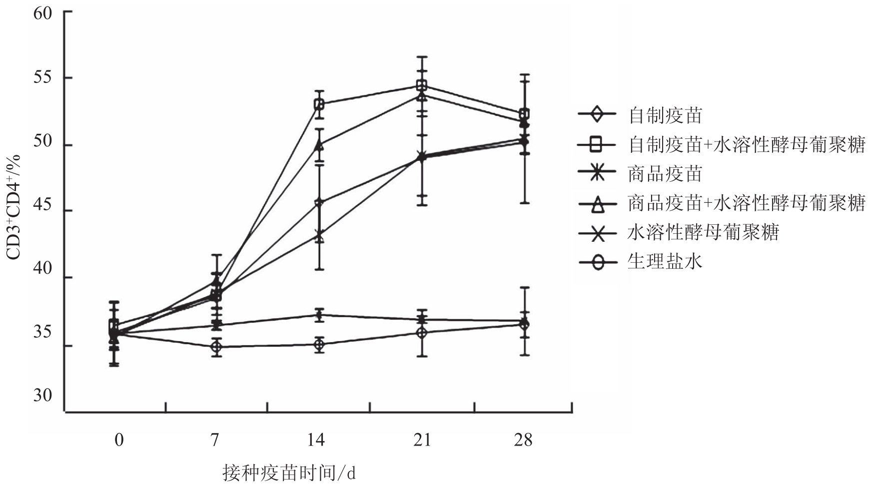


图 3 免疫小鼠后外周血 CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ 细胞百分率

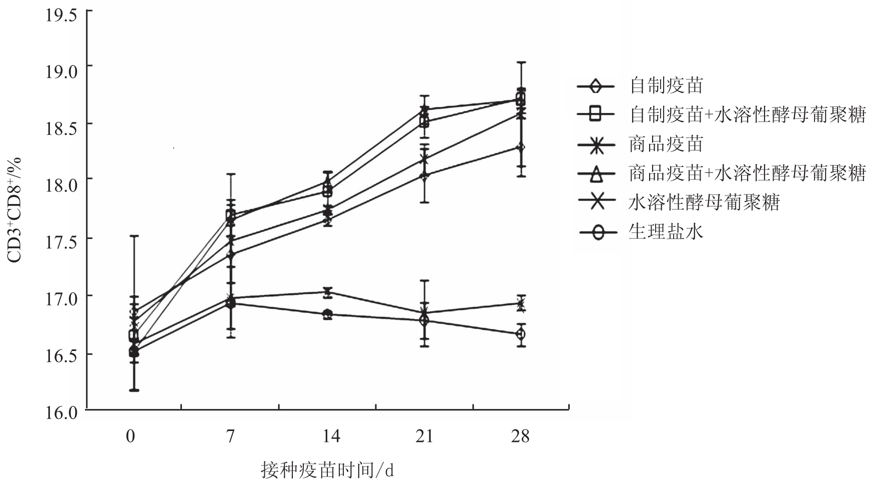


图 4 免疫小鼠后外周血 CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ 细胞百分率

2.3 水溶性酵母葡聚糖对细胞因子的影响

2.3.1 IL－4 从图 5 可以看出，免疫小鼠后，各组的 IL－4 水平呈上升趋势。免疫后 7～28 d，水溶性酵母葡聚糖联合 PPV 灭活疫苗组的 IL－4 水平显著高于相应的疫苗组，各试验组的 IL－4 水平均极显著高于生理盐水组。

2.3.2 IL－6 由图 6 可知，免疫小鼠后，各个试验组的 IL－6 水平均显著高于生理盐水组。免疫后 14～28 d 时，水溶性酵母葡聚糖联合 PPV 灭活疫苗组的 IL－6 水平显著高于相应的 PPV 灭活疫苗组。

2.3.3 IFN－γ 由图 7 可知，水溶性酵母葡聚糖联合自制疫苗组与自制疫苗单独免疫组的 IFN－γ 水平均在免疫后 14 d 达到峰值，且水溶性酵母葡聚糖联合灭活疫苗组的 IFN－γ 水平均显著高于相应的灭活疫苗组。免疫后 7～28 d，除水溶性酵母葡聚糖组外，其余试验组的 IFN－γ 水平均极显著高于生理盐水组（图 7）。

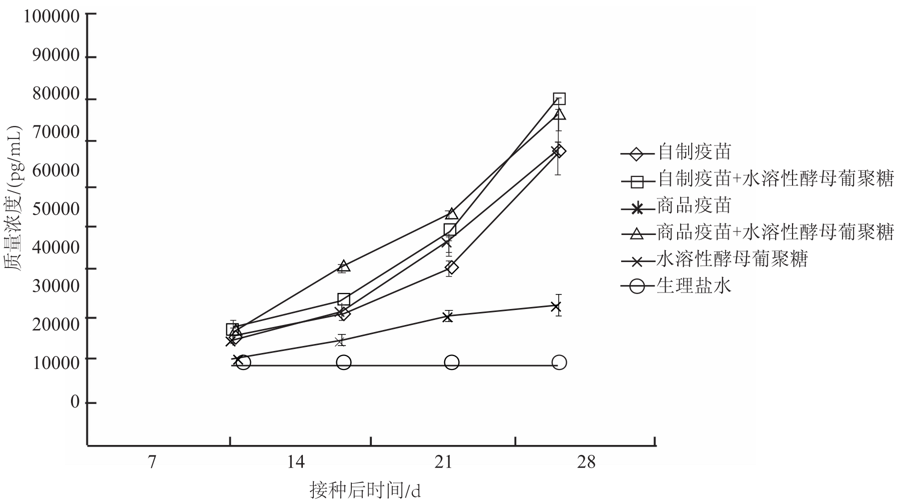


图 5　免疫后小鼠血清中 IL－4 水平

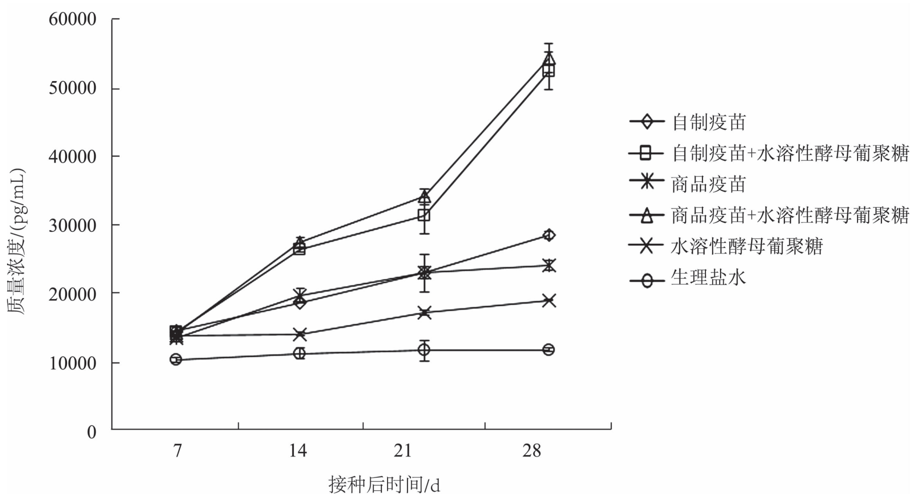


图 6　免疫后小鼠血清中 IL－6 水平

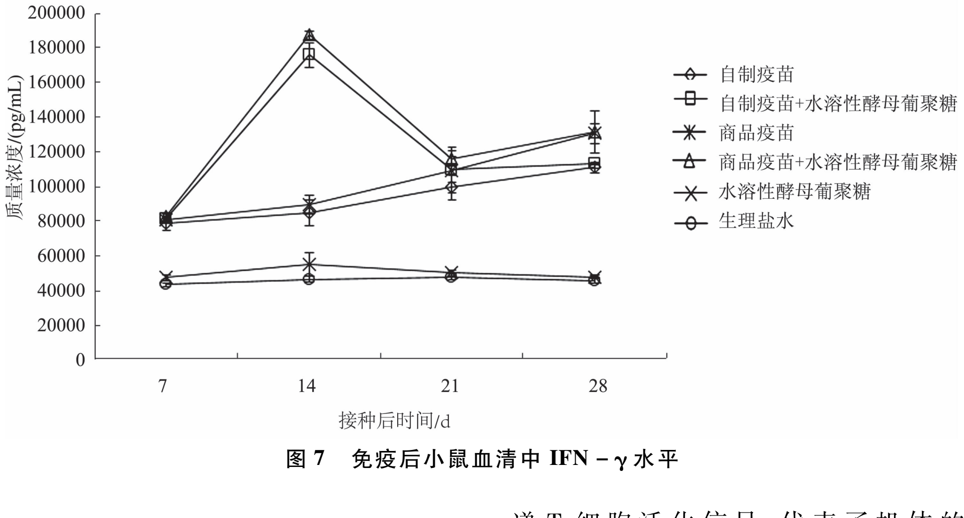


图 7　免疫后小鼠血清中 IFN－γ 水平

3　讨论

本研究结果表明，整体上，水溶性酵母葡聚糖组的抗体水平高于相应的灭活疫苗单独免疫组，但差异不显著。水溶性酵母葡聚糖作为免疫佐剂有利于抗体产生。

CD3 是 T 细胞膜上的重要分化抗原，$CD3^+$ 是成熟 T 细胞的特征性标志，$CD3^+$ 分子的主要功能是传递 T 细胞活化信号，代表了机体的细胞免疫水平[16]。$CD4^+$ 和 $CD8^+$ 分子是 T 淋巴细胞的 2 个重要表面标志，其中 $CD4^+$ T 淋巴细胞的作用是辅助和诱导增强免疫应答，其主要功能是分泌细胞因子，如 IFN－γ、IL－2、TNF 和淋巴毒素（LT）等[17-18]，$CD8^+$ T 淋巴细胞主要是抑制、介导细胞毒性杀伤作用[19-21]。本试验利用流式细胞仪检测小鼠免疫后 $CD3^+$、$CD3^+CD4^+$、$CD3^+CD8^+$ T 淋巴细胞百分率

的变化,评价水溶性酵母葡聚糖联合 PPV 灭活疫苗组的细胞免疫水平。结果显示,水溶性酵母葡聚糖组的 $CD3^+CD4^+$、$CD3^+CD8^+$ T 淋巴细胞百分率均比相应的灭活疫苗单独免疫组高,表明水溶性酵母葡聚糖佐剂可增强小鼠的细胞免疫应答。

Th1 和 Th2 效应细胞是由 $CD3^+CD4^+$ T 淋巴细胞亚群激活后增殖分化得到的,通过分泌不同的细胞因子介导各自的免疫功能[22]。IL－4、IL－6 是 Th2 型细胞产生的具有抗病毒作用的细胞因子,在免疫调节中具有非常重要的作用;IL－4 还可以调节 Th1 型细胞分化,间接介导细胞免疫[23-24]。IFN－γ是由 Th1 细胞分泌的,不仅具有抗病毒作用,而且具有较强的免疫调节作用。本试验结果表明,水溶性酵母葡聚糖能刺激淋巴细胞分泌 IL－4、IL－6,能促进小鼠外周血淋巴细胞诱生 IFN－γ,这可能是水溶性酵母葡聚糖增强免疫的分子机制之一。IFN－γ、IL－4、IL－6 作为重要的 Thl、Th2 型免疫相关因子,相互制约、彼此调节,维持着机体正常的细胞免疫和体液免疫功能。

目前,PPV 感染尚无有效的治疗药物,有效预防 PPV 病的主要手段是使用 PPV 疫苗进行免疫预防,但各种 PPV 疫苗均不能 100% 预防该病。本研究结果表明,水溶性酵母葡聚糖能够增强 PPV 灭活疫苗的免疫应答,为水溶性酵母葡聚糖作为免疫增强剂的应用提供了理论依据。

参考文献:

[1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997:1148-1150.

[2] 樊振华,王娟萍,孟帆,等. 猪细小病毒和猪圆环病毒 2 型多重 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 山西农业科学,2012,40(10):1102-1106.

[3] Zhou Y,Zhou T,Zhou R,*et al*. Chemiluminescence immunoassay for the rapid and sensitive detection of antibody against porcine parvovirus by using horseradish peroxidase/detection antibody-coated gold nanoparticles as nanoprobes[J]. Luminescence,2014,29(4):338-343.

[4] Chen H Y,Zhao L,Wei Z Y,*et al*. Enhancement of the immunogenicity of an infectious laryngotracheitis virus DNA vaccine by a bicistronic plasmid encoding glycoprotein B and interleukin-18[J]. Antiviral Research,2010,87(2):235-241.

[5] Reed S G,Bertholet S,Coler R N,*et al*. New horizons in adjuvants for vaccine development[J]. Trends in Immunology,2009,30(1):23-32.

[6] 张红英,王学兵,崔保安,等. 山药多糖对 PRRSV 灭活苗免疫猪抗体和 T 细胞亚群的影响[J]. 华北农学报,2010,25(2):236-238.

[7] 杜立中,马霞,刘永录,等. 黄芪多糖对猪瘟活疫苗免疫应答的佐剂作用[J]. 河南农业科学,2014,43(9):156-159.

[8] 刘丽,郑全辉,张庆波,等. 酵母多糖对机体免疫功能的影响[J]. 河北医药,2013,35(15):2257-2259.

[9] 王元秀,张桂香,李峰,等. 酵母多糖的提取及其对雏鸡免疫器官发育的影响[J]. 食品科学,2011,32(2):256-259.

[10] 李桂峰,康裕财,孙际佳,等. 酵母多糖对赤眼鳟非特异性免疫机能的影响[J]. 中山大学学报(自然科学版),2003,42(4):55-58.

[11] 李家政,魏泽能. β－葡聚糖预防鲫鱼疾病的生产性应用研究[J]. 现代农业科技,2014(18):248-253.

[12] 李军,邢建军,李德发,等. 啤酒酵母葡聚糖对断奶仔猪生产性能及淋巴细胞转化率的影响[J]. 中国畜牧杂志,2006,42(1):17-21.

[13] 祁业明,杜丽平,肖冬光,等. 酵母不溶性葡聚糖测定方法的研究[J]. 酿酒科技,2007,159(9):92-94,97.

[14] 祁业明. 酵母葡聚糖的研制[D]. 天津:天津科技大学,2007.

[15] 邱妍,胡元亮,崔保安,等. 怀牛膝多糖对雏鸡疫苗免疫效果的影响[J]. 畜牧兽医学报,2007,38(7):723-727.

[16] 郭敏,郎广平,梁志选,等. PRRSV 特异性肽对 CSFV、PRRSV 疫苗免疫猪后 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 中国兽医学报,2014,34(3):361-365.

[17] Yu D P,Han Y,Zhao Q Y,*et al*. $CD3^+CD4^+$ and $CD3^+CD8^+$ lymphocyte subgroups and their surface receptors NKG2D and NKG2A in patients with non-small cell lung cancer[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention,2014,15(6):2685-2688.

[18] Yao S,Huang D,Chen C Y,*et al*. $CD4^+$ T cells contain early extrapulmonary tuberculosis (TB) dissemination and rapid TB progression and sustain multieffector functions of $CD8^+$ T and $CD3^+$ lymphocytes:Mechanisms of $CD4^+$ T cell immunity[J]. Journal of Immunology,2014,192(5):2120-2132.

[19] 孙庆申,蔡雪晖,童光志. CD4 和 CD8 分子在细胞免疫中的作用及其与 PRRSV 感染的关系[J]. 中国预防兽医学报,2002,24(2):151-152.

[20] 严健,原永明,张舒,等. $CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞亚群在肿瘤患者外周血中检测的临床意义[J]. 检验医学,2013,28(10):901-903.

[21] 魏育蕾,程祥,杨藩,等. 牛白介素 32 基因可变剪接体(IL－32γ)的分子克隆及功能验证[J]. 农业生物技术学报,2013,21(1):38-46.

[22] Kawamoto K,Nakamura S,Iwashita A,*et al*. Clinicopathological characteristics of primary gastric T-cell lymphoma[J]. Histopathology,2009,55(6):641-653.

[23] 冯志华,王全楚. 新概念疫苗[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:208-222.

[24] 王越,杨洁,高燕,等. IL－6、IL－8 上调卵巢癌细胞雄激素受体表达的作用分别依赖 MAPK 途径和 Src 活化[J]. 免疫学杂志,2008,24(4):424-429.