

三种猪病疫苗不同免疫组合 对猪血清中部分细胞因子表达水平的影响

马长宾¹, 崔蕾¹, 胡圣伟², 倪伟²

(1. 新疆建设兵团第六师五家渠市畜牧兽医工作站, 新疆五家渠 831300;

2. 石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 831000)

摘要: [目的] 探讨猪瘟 (CSF)、高致病性猪蓝耳病 (HP-PRRS)、口蹄疫 (FMD) 3种疫苗不同免疫组合, 对猪免疫机能及其相关细胞因子表达量的影响。[方法] 采用 ELISA 方法, 检测猪血清中 IL-1、IL-2、IFN- γ 表达量的动态变化, 分析免疫后 3 种细胞因子动态变化规律。[结果] 免疫后猪血清中的 IL-1、IL-2、IFN- γ 含量变化不一致。其中: IL-1 表达量出现“波浪线”变化, 且各试验组之间差异不显著; CSF、HP-PRRS、FMD 3 种疫苗同步联合免疫组与对照组 (C 组) 相比, 二免后 60 d 和 90 d 的 IL-2 表达量差异显著; IFN- γ 表达量呈现上升状态, 3 种疫苗同步联合免疫组与对照组 (C 组) 相比, 各时间点的 IFN- γ 表达量差异均显著 ($P < 0.05$), 且维持在较高水平。[结论] CSF、HP-PRRS、FMD 3 种疫苗不同免疫组合可引起猪免疫机能的变化, 且对免疫机能的影响较为复杂; 整个免疫过程中各细胞因子的变化不是单纯的上升和下降, 而是一个动态的变化过程。

关键词: 猪瘟; 高致病性猪蓝耳病; 口蹄疫; 免疫组合; 细胞因子

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X (2017) 09-0083-04

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2017.09.023

Influence on Different Vaccine Combination of CSF, HP-PRRS and FMD on Some Cytokines Expression in Swine Serum

Ma Changbin¹, Cui Lei¹, Hu Shengwei², Ni Wei²

(1. Wujiaqu Animal husbandry and Veterinary Workstations of Sixth Divisions of Xinjiang Construction Corps, Wujiaqu, Xinjiang 831300; 2. The Life Science College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 831000)

Abstract: [Objective] To investigate the influence of three vaccine combinations of CSF, HP-PRRS and FMD on immune response and expression of some cytokines in swine serum. [Methods] The dynamic change of IL-1, IL-2 and IFN- γ expression in swine serum were tested by ELISA. The dynamic change rule of the three kinds of cytokines after immunization were analyzed. [Results] The change trends of IL-1, IL-2 and IFN- γ content in swine serum after immunization were not the same. A “wave” trend was appeared in the expression of IL-1, and there was no significant difference between different groups. IL-2 change trend was not consistent with different groups, combined with the group immunized by CSF, HP-PRRS and FMD vaccine, compared with the control group (group C). The expression of IL-2 was significantly different at 60 d and 90 d after second immunization; Compared with group C, the expression of IFN- γ in the group immunized by CSF, HP-PRRS and FMD vaccine was increasing. Expressions of IFN- γ were significantly different at each time point ($P < 0.05$), and was always at a high level. [Conclusion] Different immune combinations of CSF, HP-PRRS and FMD vaccine may cause different immune responses to swine, and the changes of cytokines throughout the immune process were not simply rising and falling, but a relatively complex dynamic change process.

Key words: CSF; HP-PRRS; FMD; immune combination; cytokines

基金项目: 新疆建设兵团农六师五家渠市科技计划和重大科技专项 (2012 年 1214 号)

细胞因子在机体免疫中发挥着重要作用^[1]。白细胞介素1 (IL-1) 是单核细胞-巨噬细胞产生的细胞因子, 促进多种免疫分子的表达, 增强单核-巨噬细胞功能。IL-1可介导天然性免疫和获得性免疫, 既能刺激T、B淋巴细胞增殖, 又能调节免疫反应^[2]。白细胞介素2 (IL-2) 是由活化的Th1细胞和部分B细胞产生的, 是体内最主要、最强的T细胞生长因子, 是机体免疫调节网络中的核心物质。IL-2可提高辅助性T细胞的数量和活性, 增强整体的免疫功能, 诱导和增强自然杀伤细胞 (Natural killer cell, NK) 和细胞毒性T淋巴细胞 (Cytotoxic lymphocyte, CTL) 的效应, 并可促进细胞的增殖和分化, 促进多种细胞因子及其受体的表达, 因此IL-2在细胞及体液免疫中均有重要调节作用^[3]。干扰素- γ (IFN- γ) 为II型干扰素的一种, 是在免疫应答中由活化的T淋巴细胞和NK细胞产生的促炎性细胞因子, 其与机体抗病毒感染有关。IFN- γ 通过调节参与抗原加工和递呈的重要辅助分子, 如抗原肽转运蛋白、蛋白酶体和刺激T细胞和识别细胞毒性T淋巴细胞必需的主要组织相容性复合物 (MHC) 的表达, 从而调节宿主免疫应答^[4]。

本实验选择以上3种细胞因子, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法, 采集CSF、PRRS、FMD 3种疫苗不同组合免疫试验猪血清进行检测, 以掌握IL-1、IL-2、IFN- γ 表达量的动态变化, 从细胞因子的角度, 探讨不同疫苗联合免疫对猪免疫应答的影响, 从而了解主要相关细胞因子的动态变化规律, 为科学评价免疫效果提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 试验动物。选择品种一致 (杜洛克、长白、大约克夏三元杂交), 体重、日龄相近 (30日龄左右) 的仔猪作为试验猪, 由某规模化养殖场提供。

1.1.2 疫苗。FMD、CSF 和 HP-PRRS (弱毒苗) 疫苗均为第六师五家渠市政府采购疫苗。

1.1.3 检测试剂。IL-1、IL-2、IFN- γ 酶联免疫分析检测试剂盒。其他试剂和设备, 由第六师五家渠市畜牧兽医工作站兽医实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 试验分组与处理。本研究以30日龄仔猪为研究对象, 随机选择雌雄不限, 体重基本一致的仔猪30头, 随机分成3组: A组, 先免HP-PRRS, 7d后“FMD+CSF”同时分点免疫组; B组, “FMD+CSF+HP-PRRS”同步联合免疫组; C组 (对照组), FMD、CSF、HP-PRRS分别单独免疫, 每次间隔7d。每组10次重复, 每次重复1头猪。

表1 各组免疫程序、免疫剂量

分组	编号	免疫程序	免疫剂量
A	A1~A10	先免HP-PRRS, 7d后“FMD+CSF”同时分点注射	首免CSF弱毒苗、FMD灭活苗、HP-PRRS弱毒苗剂量分别为2头份、1mL、1头份; 每组均在30d后进行加强免疫, 剂量加倍。
B	B1~B10	“FMD+CSF+HP-PRRS”同时分点注射	均在30d后进行加强免疫, 剂量加倍。
C	C1~C10	FMD、CSF、HP-PRRS分别单独注射, 每次间隔7d	均在30d后进行加强免疫, 剂量加倍。

1.2.2 动物免疫。记录经检查保存完好的FMD、CSF和HP-PRRS疫苗的批次、批号, 充分摇匀后备用。免疫猪保定后, 在耳根后颈部和腿部内侧严格消毒后, 注射疫苗, 且每头更换针头。

1.2.3 样品采集。首免30d后第1次采血, 同时进行加强免疫。在加强免疫后30d、60d、90d分别采血。采用常规方法分离血清, 记录编号后, 将其置-20℃冰柜保存备用。

1.2.4 试验指标测定。对各细胞因子指标的检测, 严格按照试剂盒说明书操作, 基本操作如下: 在试剂恢复到室温后, 打开包装, 旋转混匀; 取出酶标板, 按要求进行标准品的稀释和加样; 按要求加入稀释液和待测样品; 用封板膜封板后, 置37℃温育30min, 洗涤; 在所有孔 (空白孔除外) 中加入酶标试剂, 按要求在恒温箱中37℃温育30min; 洗板后, 每孔加入底物A、B液, 避光孵育后, 加入终止液, 终止反应。15min内于波长450nm的酶标仪上读取各孔的OD值。每个样品按要求做2~3个重复。细胞因子结果计算: 以标准品浓度为横坐标, 对应OD值为纵坐标, 绘制标准品线性回归曲线, 按曲线方程计算各样本浓度值。

1.2.5 数据分析。将试验数据经Excel 2003初步整理后, 对检测结果以平均数±标准差 ($X \pm SD$)

表示, 采用 SPSS17.0 软件统计分析; 两组间比较采用配对样本 T 检验, 多组之间比较采用单样本方差分析。显著性差异水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果及分析

2.1 不同时间点的 IL-1、IL-2、IFN- γ 表达量

IL-1、IL-2、IFN- γ 试剂盒检测范围分别为 18~800 ng/L、13~300 ng/L、30~1 000 pg/mL, 检测结果有效 (表 2、表 3、表 4)。

表 2 各组免疫后不同时间点 IL-1 表达量检测结果 (单位: ng/L)

免疫后时间 (d)	组别 (n=3)		
	A	B	C
30 ^{1st}	53.01±4.76	47.34±4.58	45.23±3.14
30 ^{2nd}	43.44±5.45	41.16±1.89	39.56±4.21
60 ^{2nd}	72.11±3.42	76.5±3.58	74.38±2.56
90 ^{2nd}	46.67±2.49	42.39±2.68	43.42±1.48

注: 1st 代表首免; 2nd 代表二免

表 3 各组免疫后不同时间段 IL-2 表达量 (单位: ng/L)

免疫后时间 (d)	组别 (n=3)		
	A	B	C
30 ^{1st}	13.92±3.88	21.67±7.34	15.23±5.31
30 ^{2nd}	13.89±2.99	23±9.28	18.01±4.56
60 ^{2nd}	15.89±4.76**	36.28±3.91*	21.34±3.21
90 ^{2nd}	16.82±4.48**	31.99±2.92*	19.56±3.36

注: 1st 代表首免; 2nd 代表二免; * 号表示与对照 C 组相比差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示 A 组与 B 组相比差异显著 ($P < 0.05$)

表 4 各组免疫后不同时间段 IFN- γ 表达量 (单位: pg/ml)

免疫后时间 (d)	组别 (n=3)		
	A	B	C
30 ^{1st}	119.72±14.67**	238.67±13.42*	121.31±12.56
30 ^{2nd}	190.86±13.62	235.85±20.43*	136.52±17.89
60 ^{2nd}	222.92±12.23	303.44±20.09*	145.68±20.13
90 ^{2nd}	251.67±15.33	316.7±12.77*	151.24±13.45

注: 1st 代表首免; 2nd 代表二免; * 号表示与对照 C 组相比差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示 A 组与 B 组相比差异显著 ($P < 0.05$)

免疫后, 各试验组之间的 IL-1 表达量差异不显著。与对照组相比, B 组的 IL-2 的表达量在二免后 60 d ($P < 0.05$)、90 d ($P < 0.05$) 显著提高, 显著高于 A 组。与对照组相比, A 组的 IFN- γ 表达量在二免后 60 d ($P < 0.05$)、90 d ($P < 0.05$) 显著提高; B 组的 IFN- γ 的表达量在首免后 30 d ($P < 0.05$), 二免后 30 d ($P < 0.05$)、60 d ($P < 0.05$)、90 d ($P < 0.05$) 显著上升, 并维持在较高水平; 首免后 30 d, B 组的 IFN- γ 表达量显著高于 A 组。

2.2 相关细胞因子表达量动态变化规律

疫苗免疫后, 各组 IL-1 浓度的变化趋势一致, 均在二免后 60 d 达到峰值, 二免后 30 d 和 90 d 出现下降 (图 1)。

从变化趋势看, B 组的 IL-2 浓度与对照组 (C 组) 一致, 即首免后 30 d 至二免后 60 d, 浓度含量一直呈上升趋势, 二免后 60 d 开始下降; A 组在整个试验期一直呈上升趋势, 但上升幅度较小。从浓度含量看, B 组 > C 组 > A 组 (图 2)。

各组的 γ -干扰素浓度变化趋势一致, 在整个试验期均呈上升趋势, 但 C 组上升幅度平缓 (图 3)。

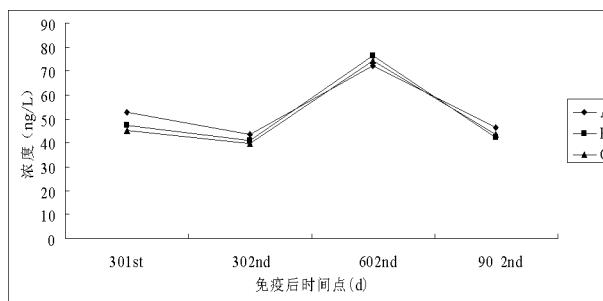


图 1 各试验组猪血清中 IL-1 浓度变化曲线

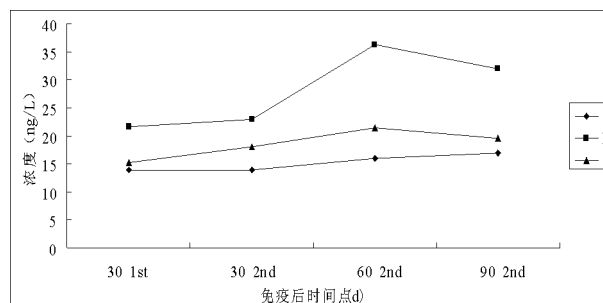


图 2 各试验组猪血清中 IL-2 浓度变化曲线

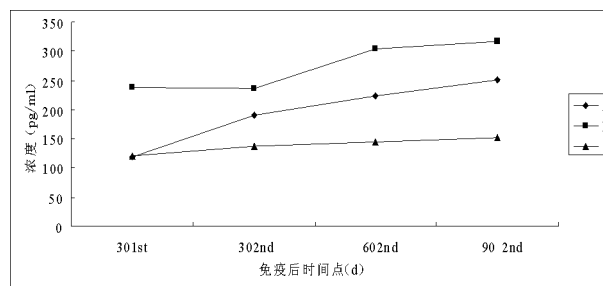


图 3 各试验组猪血清中 IL-3 浓度变化曲线

3 讨论

IL-1 是机体免疫系统中起中心作用的细胞因子, 可以明显促进淋巴细胞增殖与分化, 促进 NK 细胞的增殖分化。本试验中各试验组仔猪在疫苗接

种后 IL-1 表达量均出现“波浪线”变化趋势，在二免后 60 d 达到峰值，并且各组之间差异不显著，说明不同免疫组合不影响 IL-1 的表达量，这间接反映了不同疫苗联合注射是可行的。

IL-2 为 Th1 类细胞因子中的一种，主要由活化的 T 淋巴细胞产生，是引起 T 细胞增殖的主要细胞因子。T 细胞在胸腺中发育时，IL-2 参与 T-reg 细胞的成熟过程^[5-6]。本试验中各试验组仔猪在疫苗接种后，免疫 B 组和对照组（C 组）的 IL-2 表达量在首免后 30 d 开始上升，至二免后 60 d 达到峰值，以后开始下降，而免疫 A 组的 IL-2 表达量一直呈缓慢上升趋势，说明各试验组之间的变化趋势并不一致。本试验结果显示，免疫 B 组与对照组（C 组）相比，二免后 60 d 和 90 d 的 IL-2 表达量差异显著；免疫 A 组与免疫 B 组相比，二免后 60 d 和 90 d 的 IL-2 表达量差异显著，说明各试验组之间的 IL-2 表达量存在差异，这间接反映了不同疫苗联合注射既可以促进，也可以抑制 IL-2 的表达。

IFN- γ 主要由抗原和有丝分裂原刺激的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞产生。CD4⁺ 和 CD8⁺ 是记忆性辅助性 T 细胞，能够针对记忆性抗原或多克隆 T 细胞刺激产生高水平的 IFN- γ ^[7-8]。IFN- γ 作为免疫活性细胞分泌的细胞因子，具有广谱抗病毒、抗肿瘤和双向免疫调节作用。疫苗免疫后机体产生 IFN- γ 水平实际上反映了辅助性 T 细胞的活性，因此检测 IFN- γ 的水平就是间接检测辅助性 T 细胞的活性。本试验中各试验组仔猪在疫苗接种后的 IFN- γ 表达量持续上升，说明疫苗能够激发淋巴细胞的免疫活性而引起 IFN- γ 水平的升高，这间接反映了疫苗能够诱导机体增强细胞的免疫应答。本试验结果显示：免疫 B 组与对照组（C 组）相比，各时间点的 IFN- γ 表达量差异均显著，且维持在较高水平；免疫 A 组与对照组（C 组）相比，二免后 60 d 和 90 d 的 IFN- γ 表达量差异显著；免疫 A 组与免疫 B 组相比，首免后 30 d 的 IFN- γ 表达量差异显著，说明各试验组之间的 IFN- γ 表达量存在差异，从而间接反映了不同疫苗联合注射可以促进 IFN- γ 的表

达。

4 结论

以上试验结果表明：不同疫苗联合免疫对仔猪免疫细胞因子表达水平有影响；免疫应激过程中，各细胞因子的变化不是单纯的上升和下降，而是一个动态的过程，在相互作用的过程中影响了动物机体的健康状态，间接反映了不同疫苗联合免疫对免疫应答的影响；虽然关系复杂，但先免 HP-PRRS，7 d 后“FMD+ CSF”同时分点免疫和“FMD+ CSF+HP-PRRS”同步联合免疫是可行的。

参考文献：

- [1] 马玉媛, 郭逸, 颜奇坡, 等. 猪 IL-2, IL-4, IL-10 和 IFN- γ 的 TaqMan 实时定量 RT-PCR 检测体系的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33 (4): 285-288.
- [2] NIETO J, MACDONALD M, BRAIM A E P, et al. Effect of lipopolysaccharide infusion on gene expression of inflammatory cytokines in normal horses in vivo [J]. Equine veterinary journal, 2009, 41 (7): 717-719
- [3] 赵倩, 边爱平, 许雅娟. 腹腔镜全子宫切除术对血清 IL-2/IL-10 的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2011, 26: 4018-4020.
- [4] BOEHM U, KLAMP T, GROOT M. Cellular responses to interferon- γ [J]. Annu Rev Immunol, 1997, 15: 749-795
- [5] THORNTON A M, SHEVACH E M. CD4⁺ CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production [J]. J Exp Med, 1998, 188 (2): 287-296.
- [6] THORNTON A M, DONOVAN E E, PICCIRILLO C A, et al. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4⁺ CD25⁺ T cell suppressor function [J]. J Immunol, 2004, 172 (11): 6519-6523.
- [7] SURADHAT S, INTRAKAMHAENG M, DAMRONGWATANAPOKIN S. The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection [J]. Veterinary immunology and immunopathology, 2001, 83 (3/4): 177-189.
- [8] RODRIGUEZ-CARRENO M P, LOPEZ-FUERTE L, REVILLA C, et al. Phenotypic characterization of porcine IFN-gamma-producing lymphocytes by flow cytometry [J]. Journal of immunological, 2002, 259 (1/2): 171-179.

(责任编辑: 朱迪国)