

陆吉虎, 吴培培, 张雪花, 等. 免疫增强剂提高 H9 亚型禽流感灭活疫苗在 SPF 鸡体中细胞因子的免疫应答[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 408-413.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.02.026

## 免疫增强剂提高 H9 亚型禽流感灭活疫苗在 SPF 鸡体中细胞因子的免疫应答

陆吉虎<sup>1,2,3</sup>, 吴培培<sup>1,3</sup>, 张雪花<sup>1,2,3</sup>, 侯继波<sup>1,3</sup>, 唐应华<sup>1,3</sup>

(1.江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室, 江苏 南京 210014; 2.南京天邦生物科技有限公司, 江苏 南京 211102; 3.江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009)

**摘要:** 为探讨免疫增强剂(VA5)提高 SPF 鸡免疫功能的机理, 将 SPF 鸡分别免疫 H9 亚型禽流感灭活疫苗、含 VA5 的 H9 灭活疫苗、含 IL-4 和/或 IFN- $\gamma$  真核质粒的 H9 亚型禽流感灭活疫苗, 另设空白对照。检测免疫鸡外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群数目及 IL-4 和 IFN- $\gamma$  细胞因子含量的变化及血清抗体效价。结果显示, 在 14 日龄、17 日龄和 21 日龄和 28 日龄, 免疫 IL-4 和 H9、IL-4 与 IFN- $\gamma$  和 H9 以及 VA5 佐剂与 H9 组的 CD4<sup>+</sup>淋巴细胞亚群上升快且比例高于其他组, 免疫 IFN- $\gamma$  和 H9、IL-4 与 IFN- $\gamma$  和 H9 以及 VA5 增强剂与 H9 组的 CD8<sup>+</sup>淋巴细胞亚群上升快且比例高于其他组, IL-4 的上升趋势与 CD4<sup>+</sup>细胞类似, IFN- $\gamma$  的上升趋势与 CD8<sup>+</sup>类似。免疫含 VA5 的禽流感(H9 亚型)灭活疫苗组在免疫后第 2 周、3 周和 4 周血清 HI 效价达到 7lg2 以上, 高于其他各免疫组。说明, 与直接添加 IL-4 和 IFN- $\gamma$  的细胞因子质粒组相比, VA5 免疫增强剂能够促进 SPF 鸡外周血淋巴细胞增值, 提高 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的比例, 并诱导 IL-4 和 IFN- $\gamma$  细胞因子分泌。

**关键词:** 免疫增强剂; CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞; CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞; 细胞因子; 血凝抑制抗体

**中图分类号:** S831.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)02-0408-06

## Immunopotentiators improving the cytokine immune response to inactivated H9 subtype avian influenza vaccine in SPF chickens

LU Ji-hu<sup>1,2,3</sup>, WU Pei-pe<sup>1,3</sup>, ZHANG Xue-hua<sup>1,2,3</sup>, HOU Ji-bo<sup>1,3</sup>, TANG Ying-hua<sup>1,3</sup>

(1.National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals/Key Laboratory of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals, Ministry of Agriculture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2.Nanjing Tianbang Bio-industry Co., Ltd., Nanjing 211102, China; 3. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** The aim of this study is to explore the immunological mechanism of immunopotentiator VA5 in improving

收稿日期: 2015-11-24

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31201904); 农业部公益性行业(农业)科研专项(201303046); 中央财政农业技术推广资金项目[TG(14)067]; 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(14)5045]

**作者简介:** 陆吉虎(1972-), 男, 江苏赣榆人, 硕士, 助理研究员, 主要从事兽医微生物与免疫学研究。(E-mail) lujihu@163.com

**通讯作者:** 唐应华, (E-mail) tyinhua@yahoo.com

the immune response of specific pathogen-free (SPF) chickens. SPF chickens were challenged with the inactivated H9 subtype vaccine, VA5+H9 vaccine, IL-4+H9 vaccine, IFN- $\gamma$ +H9 vaccine, IL-4+IFN- $\gamma$ +H9 vaccine, and blank control, respectively. The number of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> subgroup lymphocytes from peripheral blood mononuclear cells, the contents of IL-4 and IFN- $\gamma$  from sera and the antibody levels of hemagglutinin inhibition (HI) were detected. The number of CD4<sup>+</sup> subgroup lym-

phocytes from chickens in groups of IL-4+H9, IL-4+IFN- $\gamma$ +H9, and VA5+H9 climbed faster and the percentage was higher than those in other groups at the 14-, 17-, 21- and 28-day ages. The number of CD8<sup>+</sup> subgroup lymphocytes from chickens in groups of IFN- $\gamma$ +H9, IL-4 and IFN- $\gamma$ +H9 vaccine and VA5+H9 vaccine climbed faster and the percentage was higher than those in other groups. IL4 showed similar rising trend to the CD4<sup>+</sup> subgroup lymphocytes and IFN- $\gamma$  presented similar rising trend to the CD8<sup>+</sup> subgroup lymphocytes. The HI antibody levels of chickens in group of VA5+H9 were 7lg2 at 2-, 3-and 4-week postvaccination, higher than those in other groups. In summary, the immunopotentiator VA5 increased the percentages of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subgroup lymphocytes and induced high secretions of IL-4 and IFN- $\gamma$ .

**Key words:** immunopotentiators; CD4<sup>+</sup> T lymphocytes; CD8<sup>+</sup> T lymphocytes; cytokine; antibody of hemagglutinin inhibition

免疫增强剂主要包括人工合成化学药物(如左旋咪唑<sup>[1-2]</sup>、咪喹莫特、维生素 E、PolyI:C<sup>[3]</sup>等)、生物来源制剂(如 CpG<sup>[4]</sup>、LPS<sup>[5]</sup>、干扰素、胸腺素<sup>[6]</sup>、囊素五肽(BP5)<sup>[7]</sup>等)、微量元素(如锌、硒等)和中草药(如黄芪多糖、淫羊藿多糖、蜈蚣藻多糖<sup>[8]</sup>等)等种类,具有改善机体免疫系统功能,提高细胞免疫和体液免疫水平,增强抵抗疾病的能力等特点。如在免疫乙肝表面抗原 DNA 疫苗同时添加西咪替丁(CIM)和左旋咪唑(LMS)可以促进小鼠树突状细胞(DC)活性及诱导免疫细胞产生高水平的 IgG2a、IL-2 和 IFN- $\gamma$  等<sup>[1]</sup>,并且两者间具有明显的协同和叠加效应。CpG 添加至疫苗中可以引起免疫鸡的特异性脾细胞增值和 IFN- $\gamma$  的大量表达,并诱导产生高滴度的血清 IgG 和 IgA 抗体<sup>[4]</sup>。含囊素五肽(BP5)的禽流感 H9N2 灭活疫苗能明显提高免疫鸡血清中 HA 抗原特异性抗体 IgG 水平,促进外周血淋巴细胞增值,提高 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 细胞的数量,并诱导 Th1 型(IL-2 和 IFN- $\gamma$ )和 Th2 型(IL-4)细胞因子表达<sup>[7]</sup>。

本实验室筛选获得的 VA5 复方免疫增强剂,含有多模式识别受体激动剂成分,能够明显提高禽流感(H5 或 H9 亚型)灭活疫苗对鸡的免疫效力,产生高滴度的 HI 血清抗体,延长疫苗的免疫保护持续期<sup>[9-11]</sup>。本研究通过免疫含 VA5 免疫增强剂的禽流感灭活疫苗和 IL-4(和/或 IFN- $\gamma$ )的 DNA 疫苗,检测免疫鸡外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群数目及 IL-4 和 IFN- $\gamma$  细胞因子含量的变化来探讨 VA5 免疫增强剂提高 SPF 鸡免疫功能的机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

禽流感(H9 亚型)油乳剂灭活疫苗(简称 H9 灭

活苗)为市售商品化疫苗。表达鸡 IL-4 和 IFN- $\gamma$  的 pVAX1-IL-4 和 pVAX1-IFN- $\gamma$  真核表达质粒(简称 pV-IL-4 和 pV-IFN- $\gamma$ )为本实验室构建并验证表达相应蛋白。SPF 鸡胚(鸡)为购自北京梅里亚维实验动物技术有限公司的 SPF 种蛋,自行孵化至使用日龄胚或孵化后饲养于 SPF 鸡隔离器内。H9 亚型禽流感检测抗原购自哈尔滨维科生物技术开发公司。禽流感(H9 亚型)SD01 株由本实验室保存。淋巴细胞分离液购自天津 TBD 公司,鼠抗鸡 CD3-PE、鼠抗鸡 CD4-FITC、鼠抗鸡 CD8 $\alpha$ -R-PE、鼠抗鸡 IgG(H+L)-FITC 抗体均为 Southern Biotech 产品,鸡 IL-4 ELISA 检测试剂盒、鸡 IFN- $\gamma$  ELISA 检测试剂盒分别购自武汉华美生物工程有限公司和上海古朵生物科技有限公司。

### 1.2 含免疫增强剂疫苗的配制

VA5 免疫增强剂(简称 VA5)为本实验室配制<sup>[9-10]</sup>。先将 VA5 与白油等共同乳化配制成疫苗伴侣形式,使用时将该伴侣与禽流感(H9 亚型)灭活苗按体积比 1:9 混合即成为含 VA5 免疫增强剂的疫苗。

### 1.3 SPF 鸡免疫试验

7 日龄 SPF 鸡分为 7 组,每组 20 只,7 日龄首次免疫,14 日龄第二次免疫。分别为免疫 pV-IL-4 和禽流感(H9 亚型)灭活疫苗组、pV-IFN- $\gamma$  和禽流感(H9 亚型)灭活疫苗组、pV-IL-4+pV-IFN- $\gamma$  和禽流感(H9 亚型)灭活疫苗组、pVAX1 质粒和禽流感(H9 亚型)灭活疫苗组、禽流感(H9 亚型)灭活疫苗组、含免疫增强剂的禽流感(H9 亚型)灭活疫苗组以及生理盐水对照组(表 1)。pV-IL-4(或 pV-IFN- $\gamma$ )为腿部肌肉注射,每只 20  $\mu$ g;H9 灭活疫苗为颈背部皮下注射,每只 0.3 ml。

表 1 实验 SPF 鸡分组及免疫

Table 1 The grouping and immunization of SPF chickens

组别	免疫原	免疫鸡数量 (只)	7 日龄首次免疫	14 日龄二次免疫
A	pV-IL-4 和 H9 灭活苗	20	pV-IL-4	H9
B	pV-IFN- $\gamma$ 和 H9 灭活苗	20	pV-IFN- $\gamma$	H9
C	pV-IL-4+pV-IFN- $\gamma$ 和 H9 灭活苗	20	pV-IL-4+ pV-IFN- $\gamma$	H9
D	H9 灭活苗	20	/	H9
E	含 VA5 的 H9 灭活苗	20	/	H9+VA5
F	pVAX1 和 H9 灭活苗	20	pVAX1	H9
G	生理盐水	10	/	/

#### 1.4 外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞动态变化检测

分别于 14 日龄、17 日龄、21 日龄、28 日龄每组随机抽取 5 只鸡,经翅静脉采血 1 ml (枸橼酸钠抗凝),用鸡淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,台盼蓝染色计数并调整细胞悬液中活细胞密度为 1 ml  $1 \times 10^7$  个细胞。加入稀释的 FITC 标记的 CD4<sup>+</sup>,RPE 标记的 CD3<sup>+</sup>,CY5.5 标记的 CD8<sup>+</sup> 荧光抗体,4 ℃ 避光孵育 30 min。用预冷的 PBS 缓冲液洗 2 次,最后加入 1 ml PBS (含 1% BSA) 重悬,用流式细胞仪获取样品中 10 000 个细胞,测定 CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞阳性百分数,利用 Cell Quest 软件对数据进行分析。

#### 1.5 免疫后血清中 IL-4、IFN- $\gamma$ 的含量及 HI 抗体效价检测

分别于 14 日龄、17 日龄、21 日龄、28 日龄、35 日龄、42 日龄采集翅静脉血,1 000 g 离心 20 min 收集血清。按 ELISA 试剂盒说明检测 14 日龄、17 日龄、21 日龄、28 日龄血清中 IL-4 和 IFN- $\gamma$  的含量;用微量血凝抑制 (Hemagglutination inhibition HI) 试验方法检测 21 日龄、28 日龄、35 日龄、42 日龄血清禽流感 (H9 亚型) HI 抗体效价,统计各组 HI 效价的几何平均滴度值 (Geometric mean titer, GMT)。

#### 1.6 免疫后攻毒试验

二次免疫后第 4 周 (42 日龄),以禽流感 (H9 亚型) SD01 株 ( $1.0 \times 10^{7.0}$  EID<sub>50</sub>) 病毒液滴鼻 (每只 100  $\mu$ l),分别于攻毒后 1 d、3 d、5 d 和 7 d 采集鸡喉气管、泄殖腔棉拭子,每只鸡的两个拭子浸出液混合后离心收集上清液。取 0.1 ml 浸出液上清液接种 10

日龄 SPF 鸡胚 5 只。36 ℃ 孵育观察,去除 24 h 内死亡胚,120 h 后所有鸡胚于 4 ℃ 冷冻处死,然后检测各鸡胚尿囊液的血凝效价,以 5 个鸡胚中有 1 个以上血凝效价大于 2lg2 者为阳性 (排毒鸡)。首次分离阴性的样品,继续在 10 日龄 SPF 鸡胚进行盲传 2 次后再行判定。统计每组的排毒鸡数量和排毒鸡数/鸡总数。

## 2 结果与分析

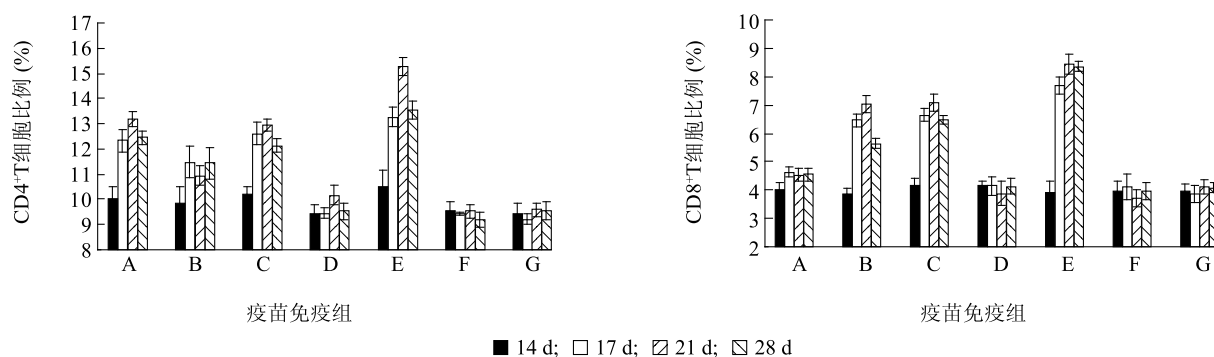
### 2.1 VA5 对 SPF 鸡外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群数量的影响

CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群数量变化。14 日龄二次免疫后,A 组、B 组、C 组、E 组 (pV-IL-4 和 H9 灭活苗组、pV-IFN- $\gamma$  和 H9 灭活苗组、pV-IL4+pV-IFN $\gamma$  和 H9 灭活苗组、含免疫增强剂的 H9 灭活苗组) 的 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群比例均明显呈上升趋势,D 组、F 组和 G 组 (H9 灭活苗、pVAX1 和 H9 灭活苗、生理盐水) 细胞亚群比例则保持平稳状态。至 17 日龄,A 组、B 组、C 组、E 组的 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群数量均显著高于 D、F 和 G 组 ( $P < 0.05$ ),而 A 组、B 组、C 组相互间差异不明显。含 VA5 免疫增强剂组 (E 组) 的 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群数量上升幅度明显高于其他各组,至 21 日龄,极显著高于 A、B、C 免疫组 ( $P < 0.01$ ) (图 1 左)。

CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群数量变化。14 日龄二次免疫后,B 组、C 组、E 组 (pV-IFN- $\gamma$  和 H9 灭活苗组、pV-IL4+pV-IFN $\gamma$  和 H9 灭活苗组、含免疫增强剂的 H9 灭活苗组) 的 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群数量均呈明显上升趋势,在 21 日龄达到峰值后逐渐下降,A 组、D

组、F 组和 G 组(pV-IL-4 和 H9 灭活苗组、H9 灭活苗、pVAX1 和 H9 灭活苗、生理盐水)组细胞亚群数量则保持平稳状态。在 17 日龄,B 组、C 组、E 组的 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群数量均极显著高于 A 组、D 组、F

组和 G 组( $P<0.01$ )。含 VA5 免疫增强剂组(E 组)的 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群数量上升幅度明显高于其他各组,在 17 日龄,显著高于 B、C 免疫组( $P<0.05$ ),而 B、C 两个免疫组之间无显著差异(图 1 右)。



A:pV-IL-4 和 H9 灭活苗免疫组;B:pV-IFN- $\gamma$  和 H9 灭活苗免疫组;C:pV-IL-4+pV-IFN- $\gamma$  和 H9 灭活苗免疫组;D:H9 灭活苗免疫组;E:含 VA5 的 H9 灭活苗免疫组;F:pVAX1 和 H9 灭活苗免疫组;G:生理盐水对照组。

图 1 免疫后鸡外周血 CD4<sup>+</sup>T(左)、CD8<sup>+</sup>T(右)淋巴细胞变化

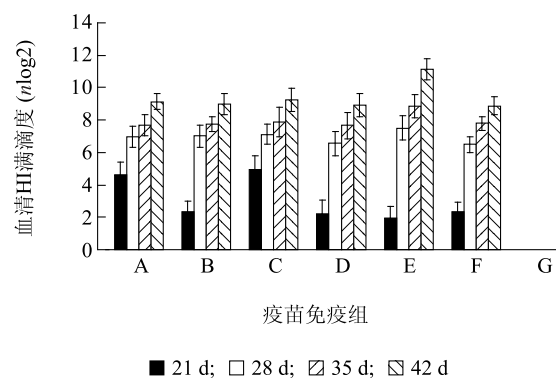
Fig.1 The dynamic changes of chicken peripheral blood CD4<sup>+</sup>(left) and CD8<sup>+</sup>(right) T lymphocyte

## 2.2 VA5 提高 SPF 鸡免疫后血清的 HI 抗体效价

用微量血凝抑制试验检测 SPF 鸡 21 日龄、28 日龄、35 日龄、42 日龄血清的禽流感(H9 亚型)HI 抗体效价,统计各组 HI 效价的几何平均滴度值和样本标准差。结果显示 A 组、C 组(pV-IL-4 和 H9 灭活苗组、pV-IL4+pV-IFN $\gamma$  和 H9 灭活苗组)血清 HI 效价在 21 日龄(二免后第 1 周)显著高于 B 组、D 组、E 组和 F 组(pV-IFN- $\gamma$  和 H9 灭活苗组、H9 灭活苗、含免疫增强剂的 H9 灭活苗组、pVAX1 和 H9 灭活苗组)( $P<0.05$ );A 组、B 组、C 组与 D 组、F 组相比,28 日龄、35 日龄、42 日龄(二免后第 2、3、4 周)的血清 HI 效价无显著差异;免疫含 VA5 的禽流感(H9 亚型)灭活苗组(E 组)28 日龄血清 HI 效价达到 7lg2 以上,35 日龄、42 日龄血清 HI 效价均显著或极显著高于其他各免疫组(图 2)。

## 2.3 VA5 对 SPF 鸡血清中的 IL-4 和 IFN- $\gamma$ 含量的影响

14 日龄免疫 H9 灭活苗后,各疫苗免疫组 IL-4 含量均持续上升,在 28 日龄以后各免疫组 IL-4 含量均显著高于对照组(G 组)( $P<0.05$ );在 21 日龄免疫含 VA5 免疫增强剂 H9 灭活苗组的 IL-4 含量上升幅度明显高于其他各免疫组,在 28 日龄与其他各免疫组相比差异均极显著( $P<0.01$ )(图 3



A:pV-IL-4 和 H9 灭活苗免疫组;B:pV-IFN- $\gamma$  和 H9 灭活苗免疫组;C:pV-IL-4+pV-IFN- $\gamma$  和 H9 灭活苗免疫组;D:H9 灭活苗免疫组;E:含 VA5 的 H9 灭活苗免疫组;F:pVAX1 和 H9 灭活苗免疫组;G:生理盐水对照组。

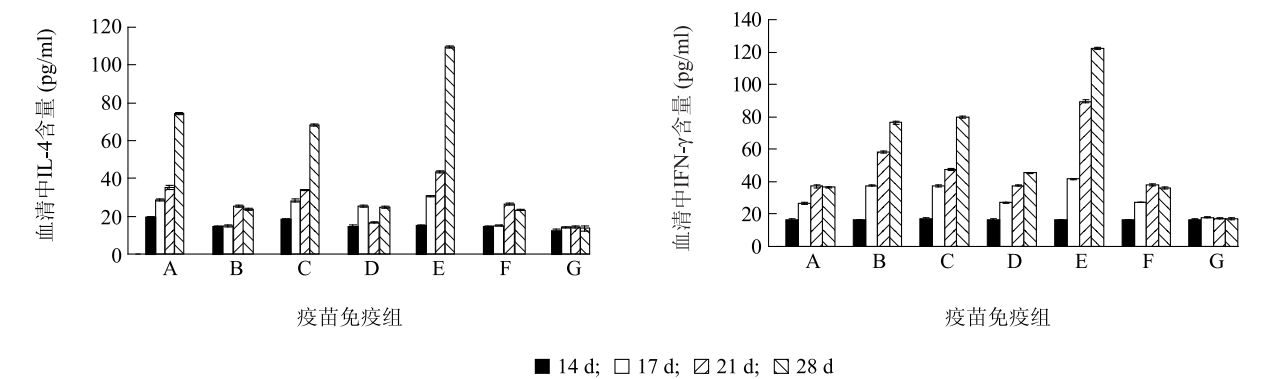
图 2 SPF 鸡免疫后血清的 HI 效价

Fig.2 HI titers of serum antibody following immunization in SPF chickens

左)。

14 日龄免疫 H9 灭活苗以后,各疫苗免疫组血清中 IFN- $\gamma$  含量持续上升,在 28 日龄各组 IFN- $\gamma$  含量均显著高于对照组(G 组)( $P<0.05$ );其中含 VA5 免疫增强剂组的 IFN- $\gamma$  含量与其他各免疫组相比差异均极显著( $P<0.01$ )(图 3 右)。





A: pV-IL-4 和 H9 灭活苗免疫组; B: pV-IFN- $\gamma$  和 H9 灭活苗免疫组; C: pV-IL-4+pV-IFN- $\gamma$  和 H9 灭活苗免疫组; D: H9 灭活苗免疫组; E: 含 VA5 的 H9 灭活苗免疫组; F: pVAX1 和 H9 灭活苗免疫组; G: 生理盐水对照组。

图 3 SPF 鸡免疫后血清中 IL-4(左)和 IFN- $\gamma$ (右)含量变化  
Fig.3 The contents of IL-4(left) and IFN- $\gamma$ (right) following immunization in SPF chickens

2.4 VA5 免疫增强剂提高疫苗对 H9 的攻毒保护率

二次免疫后以禽流感(H9 亚型)SD01 株进行滴鼻攻毒,用鸡喉气管和泄殖腔棉拭子样品浸出液

接种 SPF 鸡胚。含 VA5 免疫增强剂的试验组未检测到病毒,其他各免疫组在攻毒后第 5 d 仍有不同数量的鸡检测到病毒,生理盐水对照组在第 7 d 仍有 8 只鸡可以检测到病毒(8/20)(表 2)。

表 2 鸡免疫后对 H9 的攻毒保护率

Table 4 Protection against AIV challenge after injection with inactivated H9 vaccine in SPF chickens

组别	免疫原	H9 攻毒后排毒鸡数(排毒数/总数)			
		攻毒后 1 d	攻毒后 3 d	攻毒后 5 d	攻毒后 7 d
A	pV-IL-4 和 H9 灭活苗	6/20	3/20	3/20	0/20
B	pV-IFN- $\gamma$ 和 H9 灭活苗	7/20	3/20	3/20	0/20
C	pV-IL-4+pV-IFN- $\gamma$ 和 H9 灭活苗	8/20	4/20	2/20	0/20
D	H9 灭活苗	8/20	5/20	3/20	0/20
E	含 VA5 的 H9 灭活苗	0/20	0/20	0/20	0/20
F	pVAX1 和 H9 灭活苗	7/20	5/20	2/20	0/20
G	生理盐水	18/20	16/20	12/20	8/20

3 讨论

CD4<sup>+</sup>T 细胞可与 MHCII 类(Major histocompatibility complex class II,MHCII)分子递呈的多肽抗原反应被激活而发生免疫反应,CD8<sup>+</sup>T 细胞可以识别 MHCI 类(Major histocompatibility complex class I,MHCI)分子递呈的抗原,并直接杀死感染或变异细胞。CD4<sup>+</sup>T 细胞与 CD8<sup>+</sup>T 细胞的数量及状态直接反映了机体免疫力的高低<sup>[12-13]</sup>,因此可测定分析外周血液中 CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>和 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群的数值和比例以及产生细胞因子的能力来评估机

体细胞的免疫状态<sup>[14-15]</sup>。虽然模式识别受体在不同类型的免疫细胞上的丰度和位置均有差异,且不同信号通路最终所激活的免疫刺激因子也有所不同,但是都能够提高机体的细胞免疫水平<sup>[16]</sup>。二次免疫后,A、B、C、E 免疫组的 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群比例均持续上升,其中含 VA5 免疫增强剂组在 21 日龄时 T 淋巴细胞亚群的数值均高于其他免疫组。该结果说明 VA5 免疫增强剂能够激活 SPF 鸡免疫细胞,促进 T 淋巴细胞增殖分化,提高外周血中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的数量,从而提高机体的细胞免疫水平。

IL-4 具有活化、促进 T 细胞增殖的作用,对机体的免疫应答有广泛的上调作用。Sawant 等把鸡 IL-4 基因插入 pVIVO2 真核表达载体与新城疫二价 DNA 疫苗共同免疫可以诱导高水平的 IgY 抗体并提高 30% 攻毒保护率<sup>[17]</sup>,这说明肌注细胞因子表达质粒可以调节机体的免疫应答。本试验中,在免疫 pV-IL-4 疫苗 3 d 后可以检测到血清中 IL-4 含量以及外周血中的 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群数量开始逐步上升,21 日龄(第 2 次免疫后第 1 周)A 组和 C 组的血清 HI 效价显著高于 B 组、D 组、C 组和 E 组( $P < 0.05$ ),也说明肌注 pV-IL-4 疫苗有免疫调节作用。但是在 28 日龄、35 日龄和 42 日龄(第 2 次免疫后第 2、3、4 周)A 组和 C 组的血清 HI 效价与其他各疫苗免疫组相比无显著差异,该结果与攻毒试验中 pV-IL-4 疫苗配伍禽流感(H9 亚型)灭活疫苗免疫鸡(A 组和 C 组)与单独禽流感(H9 亚型)灭活疫苗组相比没有明显提升效果有一定相关性;而免疫 pV-IFN- $\gamma$  疫苗后也可以检测到血清中 IFN- $\gamma$  含量逐渐增高,但是对 T 细胞亚群数量和血清 HI 效价几乎没有影响。免疫含 VA5 免疫增强剂 H9 灭活疫苗组在 21 日龄以后均检测到 IL-4 和 IFN- $\gamma$  含量高于其他各疫苗免疫组,该结果表明 VA5 可以调高 SPF 鸡 IFN- $\gamma$ 、IL-4 细胞因子表达水平,从而提高机体的免疫力。

使用免疫增强剂是增强现有疫苗免疫效果的有效途径之一。本研究主要从免疫后机体外周血 T 淋巴细胞亚群数量变化,IL-4 和 IFN- $\gamma$  含量变化来验证 VA5 免疫增强剂的免疫增强机理。我们正在进行的后续研究包括 VA5 免疫增强剂对禽用联苗的免疫增强效果、免疫效力持续期等。

#### 参考文献:

- [1] NIU X, YANG Y, WANG J. Synergistic and additive effects of cimetidine and levamisole on cellular immune responses to hepatitis B virus DNA vaccine in mice[J]. Scand J Immunol, 2013, 77(2): 84-91.
- [2] ZHANG Y, CHEN H, ZENG X, et al. Levamisole enhances immunity in ducklings vaccinated against *Riemerella anatipestifer* [J]. Microbiol Immunol, 2014, 58(8): 456-462.
- [3] LUNDBERG A M, DREXLER S K, MONACO C, et al. Key differences in TLR3/Poly I: C signaling and cytokine induction by human primary cells: a phenomenon absent from murine cell systems[J]. Blood, 2007, 110(9): 3245-3252.
- [4] MALLICK A I, PARVIZI P, READ L R, et al. Enhancement of immunogenicity of a virosome-based avian influenza vaccine in chickens by incorporating CpG-ODN[J]. Vaccine, 2011, 29(8): 1657-1665.
- [5] LATZ E, VISINTIN A, LIEN E, et al. The LPS receptor generates inflammatory signals from the cell surface[J]. J Endotoxin Res, 2003, 9(6): 375-380.
- [6] YANG X, QIAN F, HE H Y, et al. Effect of thymosin alpha-1 on subpopulation of Th1, Th2, Th17, and regulatory T cells(Tregs) *in vitro*[J]. Braz J Med Biol Res, 2012, 45(1): 25-32.
- [7] LI D Y, XUE M Y, WANG C, et al. Bursopentine as a Novel immunoadjuvant enhances both humoral and cell-mediated immune responses to inactivated H9N2 avian influenza virus in chickens [J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(9): 1497-1502.
- [8] 雷爱莹,江林源. 蜈蚣藻多糖对凡纳滨对虾免疫相关基因表达的影响[J]. 南方农业学报, 2014, 45(4): 682-686.
- [9] 唐应华,陆吉虎,吴培培,等. 免疫增强剂提高禽流感疫苗效力的研究[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(2): 344-348.
- [10] 唐应华,陆吉虎,吴培培,等. 免疫增强剂对禽流感疫苗免疫持续期、安全性和鸡淋巴细胞转化的影响[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(4): 821-825.
- [11] TANG Y H, LU J H, WU P P, et al. Inactivated vaccine with adjuvants consisting of pattern recognition receptor agonists confers protection against avian influenza viruses in chickens[J]. Vet Microbiol, 2014, 172(1-2): 120-128.
- [12] PHARES T W, STOHLMAN S A, HWANG M. CD4 T cells promote CD8 T cell immunity at the priming and effector site during viral encephalitis[J]. J Virol, 2012, 86(5): 2416-2427.
- [13] KAMALAVENKATESH P, VAIRAMUTHU S, BALACHANDRAN C. Immunopathological effect of the mycotoxins cyclopiazonic acid and T-2 toxin on broiler chicken[J]. Mycopathologia, 2005, 159(2): 273-279.
- [14] DIAZ-ROMERO J, VOGT G, WECKBECKER G. Coexpression of CD4 and CD8alpha on rat T-cells in whole blood: a sensitive marker for monitoring T-cell immunosuppressive drugs[J]. J Immunol Methods, 2001, 254(1-2): 1-12.
- [15] AHMED M, VENKATARAMAN R, LOGAR A J, et al. Quantitation of immunosuppression by tacrolimus using flow cytometric analysis of interleukin-2 and interferon- gamma inhibition in CD8- and CD8<sup>+</sup> peripheral blood T cells[J]. Ther Drug Monit, 2001, 23(4): 354-362.
- [16] IWASAKI A, MEDZHITOV R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system [J]. Science, 2010, 327(5963): 291-295.
- [17] SAWANT P M, VERMA P C, SUBUDHI P K, et al. Immunomodulation of bivalent Newcastle disease DNA vaccine induced immune response by co-delivery of chicken IFN- $\gamma$  and IL-4 genes [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2011, 144(1-2): 36-44.

(责任编辑:陈海霞)