

禽 IL-2 与传染性法氏囊 VP2 融合蛋白免疫学特性

王臣^{1,2}, 赵战勤¹, 张春杰¹, 刘一尘¹, 丁轲¹, 李银聚¹, 程相朝¹, 陈溥言²

1 河南科技大学 动物传染病与微生物实验室, 洛阳 471003

2 南京农业大学 农业部动物疫病与诊断重点实验室, 南京 210095

摘要: 为研究禽细胞因子 IL-2 与 IBDV 主要保护性抗原 VP2 基因融合蛋白的免疫学特性, 将重组的 rVP2-IL-2 融合蛋白免疫鸡, 通过 IBDV-VP2 ELISA 抗体效价、抗体亚型 (IgG1 和 IgG2a)、淋巴细胞增殖、INF- γ 和 IL-4 细胞因子的分泌水平、中和抗体以及动物攻毒试验检测评价其对鸡体免疫水平的影响。抗体滴度测定和淋巴细胞增殖试验结果显示, rVP2-IL-2 融合蛋白免疫鸡体的体液和细胞免疫应答水平均明显高于单独的 VP2 蛋白免疫组。抗体亚型测定结果显示, rVP2-IL-2 融合蛋白免疫组鸡体产生一个平衡的 IgG1 和 IgG2a 抗体反应。细胞因子 ELISA 试验结果表明 rVP2-IL-2 融合蛋白能有效平衡 Th1(γ -IFN) 和 Th2(IL-4) 类型的细胞免疫反应。动物攻毒试验 rVP2-IL-2 融合蛋白免疫组鸡体获得了 85% 的保护率, 表明构建的 rVP2-IL-2 融合蛋白对 IBDV 的攻击具有较好的免疫保护作用。本研究为进一步研制 IBD 高效的基因工程疫苗奠定了基础。

关键词: 传染性法氏囊, VP2 基因, IL-2, 融合蛋白

Influence of fusion protein of IBDV VP2 and chicken Interleukin-2 on immune response in chicken

Chen Wang^{1,2}, Zhanqin Zhao¹, Chunjie Zhang¹, Yichen Liu¹, Ke Ding¹, Yinju Li¹, Xiangchao Cheng¹, and Puyan Chen²

1 College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

2 Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: In order to research immunogenicity of the recombinant rVP2-IL-2 fusion protein, we obtained the rVP2-IL-2 fusion protein using *Pichia pastoris* expression system, and then evaluated its potential to induce immune responses in chicken. The effect was determined in the form of protective anti-IBDV VP2 titers, antibodies (IgG1 and IgG2a), lymphocyte proliferation, the levels of interferon- γ and interleukin-4 cytokines, and challenge experiment. Antibody titers and proliferation lymphocyte level suggested that the fusion protein could elicit specific humoral immune and cellular immune responses. antibody sub-type results indicated that the rVP2-IL-2 fusion protein induced secretion both of IgG1 and IgG2a. The seem result elicited from cytokines ELISA test, secretion of both of Th1 (γ -IFN) and Th2 (IL-4) were induced by the rVP2-IL-2 fusion protein. Challenge experiment result shown that chicken immunized the rVP2-IL-2 fusion protein obtained 85% protection. These results confirm that the fusion protein enhances the protection against IBDV through both humoral and cell-mediated immunity, and thus could serve as a candidate for the development

Received: October 10, 2009; **Accepted:** March 15, 2010

Supported by: Scientific and Technological Project of Henan Province (No. 0424050010), Doctor Foundation of Henan University of Science and Technology (No. 09001397).

Corresponding author: Chunjie Zhang. Tel/Fax: +86-379-64282905; E-mail: cjzhang@sina.com

河南省科技攻关项目 (No. 0424050010), 河南科技大学博士基金项目 (No. 09001397) 资助。

of IBDV subunit vaccine.

Keywords: infectious bursal disease virus (IBDV), VP2 gene, IL-2, fusion protein

传染性法氏囊病 (Infectious bursal disease, IBD) 是由传染性法氏囊病病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 引起的幼鸡和青年鸡的一种急性、高度接触性传染病, 发病率高, 病程短。临床上主要表现为间歇性腹泻、厌食、高度虚弱、体重减轻和电解质平衡紊乱。病变特征主要为脱水、肌肉出血、肾脏尿酸盐沉积和法氏囊肿大。尤其是 IBDV 主要侵害鸡的体液免疫中枢——法氏囊, 从而导致免疫抑制, 降低机体对其他传染病的免疫反应, 使机体对其他病毒病和细菌性疾病的易感性增高^[1]。该病的复杂性和潜在的威胁引起了兽医界的广泛关注, 并逐渐成为各国兽医科技工作者研究的焦点之一。对于传染性疫病控制, 目前普遍认为免疫接种是简单而又有效地途径。但是实际生产过程中, 免疫失败时常发生。分析其原因, 除了有关疫苗接种因素外, 强毒株、超强毒株和变异株的存在, 使疫苗不能提供有效地免疫保护。或者在接种的同时, 环境中存在数量较大的野毒株, 在机体还未产生高水平抗体之前, 就被野毒株感染, 这样势必也导致免疫失败。IBDV 属于双链双节段 RNA 病毒, A 节段包括两个部分重叠的开放阅读框架 (ORF1 和 ORF2)。ORF1 编码的多聚蛋白前体经加工剪切形成 3 个成熟的蛋白 VP2、VP4 和 VP3, VP2 不仅是病毒的主要结构蛋白, 还是病毒的主要宿主保护性抗原, 与病毒的抗原漂移、毒力变异、中和抗体的诱导和细胞凋亡有关^[2-3]。

应用细胞因子作为免疫佐剂能提高各种免疫反应的强度和速度。IL-2 是一种糖蛋白, 能诱导 T 淋巴细胞的克隆增殖和活化, 伴随抗原刺激后产生记忆效应, 而且还能和其他淋巴因子协同作用, 诱导 B 淋巴细胞的克隆和增殖, 诱导产生抗体的浆细胞和记忆细胞分化。所有这些特点, 都是 IL-2 作为疫苗佐剂的理论依据。

本研究以酵母为载体融合表达 IBDV 主要保护抗原 VP2 基因和禽细胞因子 IL-2, 用重组的 rVP2-IL-2 靶向融合蛋白免疫鸡, 通过对其免疫学特

性的检测。评价其对鸡体的特异性细胞免疫和体液免疫水平的影响, 为进一步提高 IBDV 基因疫苗的免疫效果, 开发新型 IBDV 疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及试验动物

酵母表达的重组蛋白 rVP2、rIL-2、rVP2-IL-2 为本课题组制备^[4-5]。辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG 购自中山公司。HRP 标记的羊抗鸡 IgG1 和 IgG2a 购自 Caltag Laboratories 公司。四甲基偶氮唑盐 (MTT)、淋巴细胞分离液为上海生物工程公司产品。细胞因子含量测定 ELISA 试剂盒购自武汉中美生物工程公司。RPMI-1640 培养基、刀豆蛋白 A (ConA)、乙酸豆蔻佛波醇 (PMA)、ConA、PMA 以 RPMI-1640 培养液配制成 1 g/L 的溶液, MTT 以 RPMI1640 培养液配制成 5 g/L 的溶液, 过滤除菌, -20℃ 保存备用。IBDV 标准强毒株 BC6/85 购自中国兽药监察所, 毒价为 $10^{-5.88}$ ELD₅₀/0.2 mL。血清中和试验用毒株、IBDV-L017 株为本室由 L017 鸡胚适应株于鸡胚成纤维细胞上反复传代、驯化而成的细胞适应毒, 其毒价为 $10^{-6.86}$ /TCID₅₀/0.1 mL。IBD 抗原由本室应用多株地方野毒株的法氏囊组织悬液所制备, AGP 效价为 1:64。中等毒力的活疫苗为 B87 毒株冻干活疫苗。1 日龄非免疫罗曼雏公鸡由洛阳市新安县现代化鸡场提供, 免疫试验 20 日龄前经琼扩试验和抗体中和试验检测证实无 IBDV 母源抗体。其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 动物的分组与免疫

将 200 只 20 日龄的非免疫罗曼雏公鸡随机分成 5 组, 40 只/组, 各组均隔离饲养。第 1 组为阴性对照, 免疫 200 μL PBS; 第 2 组、第 3 组、第 4 组分别免疫 200 pmol 的 rIL-2、rVP2、rVP2-IL-2 重组蛋白 (用 200 μL PBS 稀释)。采用胸部肌肉注射方式进行免疫; 第 5 组为 B87 毒株冻干活疫苗对照, 采用

滴鼻、点眼的途径免疫 200 μL ; 所有组间隔 2 周免疫 1 次, 共免疫 3 次。并分别于免疫接种后第 0、7、14、21、28、35、42 天时各随机抽取 5 只心脏采血, 分离血清。

1.2.2 抗 IBDV 血清 ELISA 抗体效价的测定

抗 IBDV 血清 ELISA 抗体效价的测定采用间接 ELISA 法。以 IBDV 标准抗原包被酶标板, 依次加入不同稀释度的各试验组免疫鸡血清, 温育、洗涤, 然后加入 HRP 标记的兔抗鸡 IgG, 温育、洗涤同上。最后用 TMB 底物显色, 在酶标仪上读取 OD_{450} 值。

1.2.3 IBDV 抗体亚型检测

首免后 7 d、21 d、35 d 分离的血清检测 IBDV-VP2 抗体, 用 0.05 mol/L carbonate buffer pH 9.6 (CBS) 稀释重组 IBDV-VP2 蛋白至 10 mg/L, 加入 96 孔酶标板中, 每孔 100 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被, 后用 PBST 洗涤 3 次。用 1% BSA 于室温下封闭 3 h, PBST 洗涤 3 次。加入 1:10~1:10⁵ 稀释的鸡血清 (每孔 100 μL) 作用 1 h, 再次以 PBST 洗涤 3 次。加入 1:2000 稀释的过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgG1、IgG2a (每孔 100 μL) 作用 1 h, PBST 洗涤 3 次, 拍干, 加入现配的 TMB 显色液 (每孔 100 μL), 室温避光反应 20 min 后, 以 2 mol/L H_2SO_4 终止反应。在酶标仪上读取 OD_{450} 。每个血清稀释度对应一个 ELISA OD 值, 绘制血清稀释度(log scale)对应 OD 值曲线。通过拟合曲线回归分析 half maximal OD 时的血清稀释度。计算该血清稀释度的 \log_{arithm} 值来作为实验结果。每个血清滴定重复 3 次。

1.2.4 中和抗体的测定

常规方法制备鸡胚成纤维细胞, 然后按照文献[6]的介绍, 采用固定病毒稀释血清的方法, 测定中和抗体效价, 将 IBDV-L017 细胞适应毒株应用 Hank's 液稀释成含 100 TCID₅₀ 的病毒悬液。将血清应用 Hank's 液在 96 孔细胞培养板上作倍比系列稀释 (1:10~1:10 240), 按需要分别取不同的稀释度与病毒液进行中和。取每个血清样品的不同稀释度 100 μL 与等量病毒悬液于 96 孔反应板各反应孔中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中和 1 h。弃去已长满单层细胞的 96 孔板上的营养液, 分别取每个稀释度的病毒血清中和物接种于单层细胞上, 20 μL /孔。每个稀释度接 5 孔,

置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 培养箱中吸附 1 h。吸附后的细胞单上层上加维持液, 180 μL /孔, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 培养箱中继续培养, 每天观察 2 次, 至 96 h, 记录细胞病变情况, 按 Reed-Muench 法计算出每个血清样品的中和保护效价, 然后计算 5 个血清样品中和保护效价的平均数, 即为该采血日龄血清的中和抗体效价 (GMT 值)。

1.2.5 法氏囊 B 淋巴细胞增殖试验

参照文献[7]的方法, 在 96 孔微量培养板上, 每孔加入 50 μL 含 600 ng/mL PMA 的 RPMI-1640 培养液 (对照孔只加 RPMI-1640 培养液), 再取 50 μL 各法氏囊淋巴细胞悬液于每个孔内 (PMA 终浓度为 300 ng/mL), 每个样品加 2 孔, 5% CO_2 培养箱 40 $^{\circ}\text{C}$ 培养 21 h 后, 加入 10 μL MTT (5 g/L) 继续培养 3 h, 再加入 10% SDS-0.01 mol/L HCl 溶液 100 μL , 吹打混匀, 继续培养 2 h 后, 以对照孔调零, 在酶标仪上测定 570 nm 时各孔的 OD_{570} 值。

1.2.6 胸腺 T 淋巴细胞增殖试验

参照文献[8]和[9]的方法, 在 96 孔微量培养板上, 每孔加入 50 μL 含 40 mg/L ConA 的 RPMI-1640 培养液 (对照孔只加 RPMI1640 培养液), 再取各胸腺淋巴细胞悬液 50 μL 于每个孔内 (ConA 终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 每个样品加 2 孔, 5% CO_2 培养箱 40 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后, 加入 10 μL MTT (5 g/L) 继续培养 3 h, 再加入 10% SDS-0.01 mol/L HCl 溶液 100 μL , 吹打混匀, 继续培养 2 h 后, 以对照孔调零, 在酶标仪上测定 570 nm 时各孔的 OD_{570} 值。

1.2.7 血清中 IL-4 和 IFN- γ 的测定

二次加强免疫后 1 周分离血清检测免疫后鸡血清中 IL-4 和 IFN- γ 的含量, 应用商品化的鸡细胞因子试剂盒检测。按试剂盒说明书进行操作。每次分析时, 使用对照的重组细胞因子标准品绘制标准曲线, 通过标准曲线来计算血清样品中细胞因子的含量。

1.2.8 动物攻毒保护试验

最后一次免疫后 1 周, 试验组鸡各取 20 只, 分别攻击中国标准强毒株 BC6/85 株 (100 ELD₅₀/只), 同时设置空白对照组隔离饲养, 攻毒后连续观察 7 d, 分别记录各毒株接种鸡 7 d 内的死亡数, 并对 7 d 后

存活鸡进行剖检, 称取各法氏囊、脾脏及总体重, 计算法氏囊/体重、脾脏/体重, 并观察病理剖检变化。

1.2.9 法氏囊病理组织学观察

取 10% 甲醛固定后的试验鸡法氏囊, 常规法石蜡包埋、切片, 苏木精-伊红染色, 镜检, 观察法氏囊的病理组织学变化。

1.2.10 数据分析

采用 SPSS 11.5 统计软件对实验数据进行分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较应用单因素方差分析 (One way-ANOVA), 组间两两比较应用最小显著差 (LSD) t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IBDV VP2 抗体和抗体亚型检测

各免疫组血清抗体效价动态规律如图 1 所示。首免后 7 d 内各试验组所诱导产生的抗 IBDV 血清 ELISA 抗体效价较低, 且相互之间并无明显差别。各试验组在首免后 3 周内抗 IBDV 血清 ELISA 抗体效价均呈现上升趋势, 第 5 周抗体水平达到最高, 但 rVP2 免疫组抗 IBDV 血清 ELISA 抗体效价明显低于其他各试验组 ($P < 0.05$)。rVP2-IL-2 组诱导产生的抗 IBDV 血清 ELISA 抗体效价在第 1 周到第 5 周内均高于 rVP2 组。且 rVP2-IL-2 融合蛋白免疫效果接近于疫苗对照组。在整个实验过程中, 正常 PBS 和 IL-2 对照组未检测到抗 IBDV 特异性抗体。

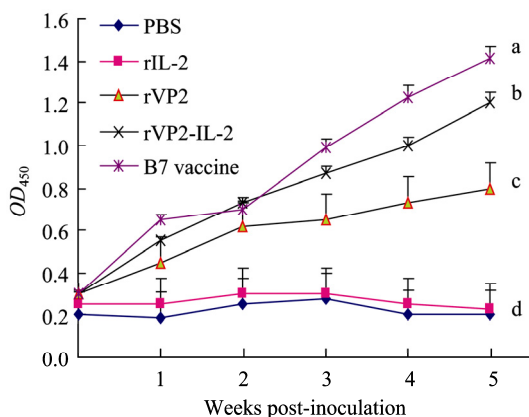


图 1 各免疫组外周血抗 IBDV 血清 ELISA 抗体效价动态规律观察

Fig. 1 Peripheral blood anti-IBDV ELISA antibody levels of chickens immunized with different vaccines. Data were expressed as the mean \pm standard error (S.E.). Statistically significant differences ($P < 0.05$) are indicated with different letters.

相对于 IgG1 水平和 IgG2a 抗体反应 (图 2A、2B), IgG1 抗体是 rVP2 免疫组鸡的主要的抗体亚型, 然而, 使用 rVP2-IL-2 融合蛋白免疫组鸡能产生一个平衡的 IgG1 和 IgG2a 抗体反应。特别是在第 2 次加强免疫后。观察到占优势的 IgG1 和 IgG2a 抗体的水平, 表明 IL-2 能有助于 rVP2-IL-2 融合蛋白免疫组鸡体产生一个平衡的 IgG1 和 IgG2a 抗体反应。

2.2 MTT 分析

从第一次免疫后第 1、3、5 周无菌采取各试验鸡的胸腺、法氏囊, 检测淋巴细胞的增殖情况。结果显示 (图 3A), 免疫 rVP2-IL-2 融合蛋白组诱导法氏囊 B 淋巴细胞增殖能力最强; 图 3B 显示 rVP2-IL-2 免疫组诱导胸腺 T 淋巴细胞增殖能力最强, 其他组依次为 rIL-2 免疫组、Vaccine 免疫组、rVP2 免疫组和 PBS 对照组。

2.3 病毒中和试验

各试验组免疫后的中和抗体动态变化规律见图 4。各试验组的血清中和抗体效价均随着时间的推移而稳定上升, 并在免疫后 21 d 迅速爬升, 至 42 d 达

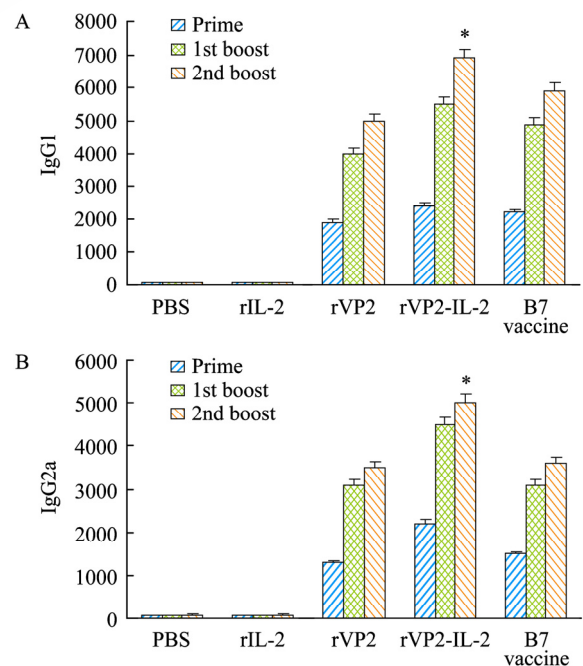


图 2 IBDV 抗体亚型分析

Fig. 2 Analysis of IBDV IgG isotypes. Prime-boost-boost vaccinations (day 0, day 14 and day 28) were carried out. On day 7 (prime), day 21 (first boost) and day 35 (second boost) sera were taken and VP2-specific immunoglobulin isotypes were analyzed by ELISA. IgG1 and IgG2a titers (Half-Max titer) \pm standard deviation assayed in triplicates are given. Data shown are representative of two separate experiments.

到峰值。rVP2-IL-2 免疫组在 28 d 后抗体效价显著高于 rVP2 组 ($P < 0.05$), 在整个试验的检测过程中, 疫苗组抗体效价显著高于其他各试验组 ($P < 0.05$), 但 rVP2-IL-2 免疫组在免疫后 42 d 抗体效价略低于疫苗组, 但仍有明显差异 ($P < 0.05$)。

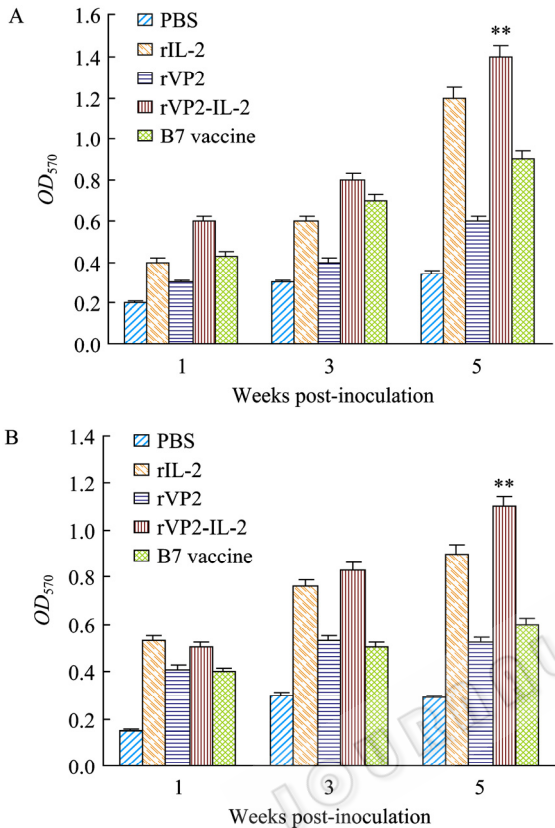


图3 免疫重组蛋白后的淋巴细胞增殖情况
Fig. 3 Lymphocyte proliferation response of chicken after vaccination with vaccines. Data were expressed as the mean \pm standard error (S.E.). Standard group is rVP2, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

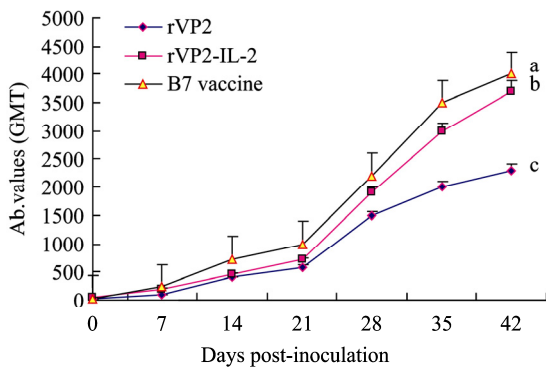


图4 各免疫组诱导的中和抗体动态变化规律
Fig. 4 Neutralization antibody responses of chickens immunized with vaccines. Data were expressed as the mean \pm standard error (SE). Statistically significant differences ($P < 0.05$) are indicated with different letters.

2.4 血清中 IL-4 和 IFN- γ 的测定

应用定量 ELISA 对血清中的 IL-4 和 IFN- γ 进行定量分析显示, rVP2-IL-2 融合蛋白免疫组诱导 IL-4 和 IFN- γ 的分泌在各免疫组最强, 差异极显著 ($P < 0.01$)。其次是 rIL-2 免疫组, B7 Vaccine 免疫组和 rVP2 免疫组诱导两种细胞因子的分泌水平明显低于 rIL-2 免疫组, 差异显著 ($P < 0.05$) (图 5)。表明 rVP2-IL-2 融合蛋白能有效平衡 Th1(γ -IFN) 和 Th2(IL-4) 类型的细胞免疫反应。

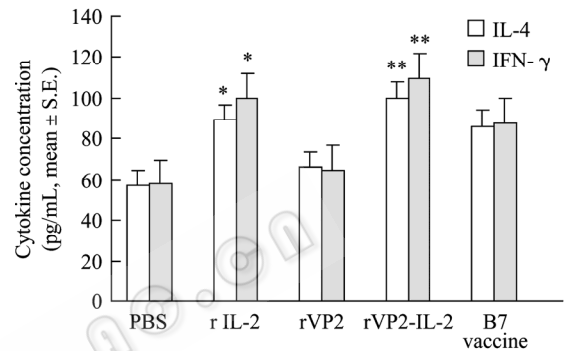


图5 细胞因子检测
Fig. 5 Cytokine responses to vaccination. Th1 type Cytokine IFN- γ (pg/mL) and Th2 type Cytokine IL-4 (pg/mL) expressed as the mean \pm standard error. Data shown are representative of four separate experiments. Standard group is rVP2, ** significant as $P < 0.01$, * significant as $P < 0.05$.

2.5 攻毒试验结果

各免疫组于最后一次免疫后 1 周, 分别攻击中国标准强毒株 BC6/85 株 (100 ELD₅₀/只), 结果如表 1 所示, rVP2 组的攻毒保护率仅为 60%, 而 rVP2-IL-2 组为 85%, 说明 rVP2-IL-2 融合蛋白的免疫保护效果优于单独的 VP2 蛋白免疫组。攻毒对照组 (PBS 组、rIL-2 组) 均出现 IBD 典型的临床症状、病理变化和组织学病变。

3 讨论

传统的 IBDV 疫苗主要是以刺激机体产生持久的中和抗体为特点。灭活苗或亚单位疫苗主要诱导机体的体液免疫而不是细胞免疫。本实验通过抗体滴度测定和淋巴细胞增殖试验结果显示, rVP2-IL-2 组诱导产生的抗 IBDV 血清 ELISA 抗体效价在第 1 周到第 5 周内均高于 rVP2 组。且 rVP2-IL-2 融合蛋白免疫效果接近于疫苗对照组。这说明 ChIL-2 能与

表1 各免疫组对强毒株BC6/85的攻击保护效果比较

Table 1 Comparison of protective immune responses of different vaccine immunized chickens challenged by virulent strain BC6/85

Groups	Average organ/ total body weight ^A		Bursal lesion scores ^B				Dead	Protective Ratio (%)
	Bursal/BW	Spleen/BW	0	1	2	3		
PBS	3.82 ^c	1.22 ^c	0	0	3	17	5	0
rIL-2	4.01 ^c	1.32 ^c	0	0	9	11	4	0
rVP2	4.32 ^b	1.70 ^b	12	4	1	1	2	60 ^c
rVP2-IL-2	4.87 ^{a,b}	2.08 ^{a,b}	17	2	1	0	1	85 ^b
B7 vaccine	5.02 ^a	2.23 ^a	18	2	0	0	0	90 ^a
Control group	5.14 ^a	2.32 ^a	20	0	0	0		/

A: Values show averages for 20 chickens. Average organ/BW= average organ in grams/total body weight in grams. B: Bursal lesion scores: 0=no lesion; 1=mild cell depletion in a few follicles; 2=moderate atrophy or cell depletion in 1/3 to 1/2 of the follicles; 3=severe necrosis and atrophy in all follicles. Statistically significant differences ($P < 0.05$) are indicated with different letters.

IBDV VP2 蛋白发挥相互协同作用, 提高 VP2 诱导的抗 IBDV 血清 ELISA 抗体效价。同时, MTT 法检测试验鸡 T、B 淋巴细胞对 ConA、PMA 的反应均强于单独的 VP2 蛋白免疫组, 从接种后第 7 天开始即与单独的 VP2 蛋白接种组差异明显 ($P < 0.05$)。rVP2-IL-2 融合蛋白免疫鸡体的体液免疫应答和细胞免疫应答水平均明显高于单独的 VP2 蛋白免疫组, 表明细胞因子发挥了明显的免疫佐剂效应。

抗体亚型测定结果显示, 相对于 IgG1 水平和 IgG2a 抗体反应, IgG1 抗体是 rVP2 免疫组鸡的主要的抗体亚型, 然而, 使用 rVP2-IL-2 融合蛋白免疫组鸡能产生一个占优势的 IgG1 和 IgG2a 抗体的水平。IgG2a 是 Th1 类免疫反应代表的抗体分子, 其类别转换主要由 IFN- γ 来实现的, IgG2a 与巨噬细胞表面高亲和力的 Fc γ R I 受体结合, 参与巨噬细胞介导的宿主防御反应, 巨噬细胞可以直接消除各种异物, 杀伤细胞内的病原体 and 肿瘤细胞。而 IgG1 抗体主要介导吞噬细胞 (如肥大细胞和嗜酸性粒细胞) 的防御作用。细胞因子 ELISA 试验结果表明 rVP2-IL-2 融合蛋白能有效诱导 IFN- γ 的分泌。提示 rVP2-IL-2 融合蛋白有可能是通过 IFN- γ 水平的升高来平衡 IgG1 和 IgG2a 的分泌水平。细胞因子多为辅助性 T 细胞分泌。辅助性 T 细胞 (Th 细胞) 是根据功能分类的一个 T 细胞亚群, 按分泌的细胞因子不同分为 Th0、Th1、Th2 三个亚型, Th0 细胞是未成熟的前体细胞, 既可分泌 Th1 类细胞因子又可分泌 Th2 类细

胞因子。Th1 细胞偏向于分泌 IL-2、IFN- γ 、TNF α/β , 介导细胞免疫反应和 CTL 应答, 清除细胞内细菌和病毒; Th2 细胞偏向于分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10, 协助 B 细胞产生 IgE, 在体液免疫中起重要作用。Th1、Th2 细胞分泌的细胞因子可互相调控生长分化。Th1 细胞分泌的 IFN- γ 可抑制 Th2 细胞增殖; Th2 细胞分泌的 IL-4、IL-10 均可下调 Th1 细胞的活性^[10-11], Th1 类细胞因子与 Th2 类细胞因子构成了一个相互影响相互制约的免疫网络^[12]。实验中用 VP2 抗原单独免疫诱导两种细胞因子的分泌水平较低, 而 rVP2-IL-2 融合蛋白能明显提高 VP2 抗原免疫后两种类型细胞因子的分泌水平, 表明 VP2-IL-2 融合蛋白能有效平衡 Th1 和 Th2 类型的细胞免疫反应。

有研究表明, IBDV-VP2 特异性抗体水平往往和保护率呈直接的相关关系^[13-14]。本研究中, 免疫 rVP2-IL-2 融合蛋白的鸡群在攻毒前其中和抗体水平比 IBDV 活疫苗对照组低, 在整个实验过程中, 抗 IBDV 血清 ELISA 抗体效价也明显低于 IBDV 活疫苗。但其保护效果却相当。这些结果提示细胞免疫在 IBDV 疫苗的保护中也起到了关键作用。

本试验构建的 rVP2-IL-2 融合蛋白能有效激发鸡体免疫系统产生抵抗 IBDV 强毒攻击的反应, 鸡体获得了 85% 的保护率, 表明构建的 rVP2-IL-2 融合蛋白对 IBDV 的攻击具有较好的免疫保护作用。本研究为进一步研制高效的基因工程疫苗用于 IBD 的防制奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Cao YC, Yeung WS, Law M, *et al.* Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. *Avian Dis*, 1998, **42**(2): 340–351.
- [2] Yehuda H, Pitcovski J, Michael A, *et al.* Viral protein 1 sequence analysis of three infectious bursal disease virus strains: a very virulent virus, its attenuated form, and an attenuated vaccine. *Avian Dis*, 1999, **43**(1): 55–64.
- [3] Mundt E. Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus determined by distinct amino acids in VP2. *J Gen Virol*, 1999, **80**(8): 2067–2076.
- [4] Zhang CJ, Wu TC, Li YJ, *et al.* Cloning and characterization of the VP2 gene of variable IBDV strain. *Chin J Vet Sci*, 2004, **24**(9): 433–435.
张春杰, 吴庭才, 李银聚, 等. IBDV 地方变异株 VP2 基因的克隆与特性鉴定. 中国兽医学报, 2004, **24**(9): 433–435.
- [5] Gong T. Study on eukaryotic and prokaryotic the expression of the whole gene and the gene without signal peptide of the chicken interleukin-2. Gansu Agricultural University, 2008.
龚婷. 鸡 IL-2cDNA 及其去信号肽 cDNA 的原核和酵母表达研究. 甘肃农业大学, 2008.
- [6] Zhang CJ, Cheng XC, Li YJ, *et al.* Construction of eukaryotic expression plasmids encoding IL-18 and study on its immunoenhancement on infectious bursal disease vaccine. *Chin J Immunol*, 2004, **20**(9): 617–621.
张春杰, 程相朝, 李银聚, 等. 鸡 IL-18 真核表达载体的构建及其对 IBD 灭活疫苗免疫增强作用的研究. 中国免疫学杂志, 2004, **20**(9): 617–621.
- [7] McNeilly F, Walker I, Allan GM, *et al.* Bursal lymphocyte proliferation in the presence of phorbol myristate acetate: effect of IBDV strains on the proliferation response. *Avian Pathol*, 1999, **28**(3): 301–303.
- [8] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, **65**(1/2): 55–63.
- [9] Li JR, Yu L, Huang YW, *et al.* Study on immunogenicity of plasmid DNA encoding polyprotein (VP2/VP4/VP3) of infectious bursal disease virus formulated with ISCOM. *Chin J Virol*, 2001, **17**(4): 341–348.
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. 病毒学报, 2001, **17**(4): 341–348.
- [10] Ferrara JL. Cytokines and the regulation of tolerance. *J Clin Invest*, 2000, **105**(8): 1043–1044.
- [11] Roncarolo MG, Levings MK. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 2000, **12**(6): 676–683.
- [12] Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, *et al.* Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol*, 2003, **171**(10): 4984–4989.
- [13] Liu Y, Wei Y, Wu X, *et al.* Preparation of ChIL-2 and IBDV VP2 fusion protein by baculovirus expression system. *Cell Mol Immunol*, 2005, **2**(3): 231–235.
- [14] Nakamura T, Otaki Y, Lin Z, *et al.* Direct correlation between the titer of infectious bursal disease virus VP2 specific antibody and protection. *Avian Dis*, 1994, **38**(2): 251–255.