

表达鸡传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白的干酪乳杆菌免疫保护效力

林红丽¹, 侯申达², 王嵩¹, 王宇鹏¹, 栾云艳¹, 侯喜林¹

1 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江 大庆 163319

2 中山大学医学院, 广东 广州 510000

林红丽, 侯申达, 王嵩, 等. 表达鸡传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白的干酪乳杆菌免疫保护效力的研究. 生物工程学报, 2014, 30(11): 1679-1690.

Lin HL, Hou SD, Wang S, et al. Immunogenicity of recombinant *Lactobacillus casei* expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus in chickens. Chin J Biotech, 2014, 30(11): 1679-1690.

摘要: 利用干酪乳杆菌作为传染性法氏囊病毒 (IBDV)VP2 抗原传递系统, 探讨口服雏鸡的免疫次数、免疫剂量、免疫途径和攻毒保护效果。用 pLA-VP2 重组干酪乳杆菌对 5 日龄雏鸡进行二次和三次免疫, 并设 10^8 、 10^9 、 10^{10} CFU/mL 的重组干酪乳杆菌组, 间接 ELISA 检测血清 IgG 和小肠洗液 sIgA, 末免后 7 d 攻毒, 计算保护效果。根据确定的 2 次免疫和 10^9 CFU/mL 免疫剂量免疫 5 日龄雏鸡, 分别口服、滴鼻/点眼 pLA-VP2/*L. casei*, 口服、肌注商品活苗及口服 pLA/*L. casei* 和 PBS 为对照, 监测 IgG 和 sIgA 抗体水平; 末免后 7 d 检测脾淋巴细胞增殖情况并攻毒, 7 d 后剖检, 观察法氏囊损伤程度并记录病变得分和保护率。结果表明各组的特异性 sIgA、IgG 抗体水平显著高于对照组 ($P < 0.01$); 口服 pLA-VP2/*L. casei* 组的淋巴细胞刺激指数显著高于其他组 ($P < 0.01$), 保护率高达 83.3%, 免疫保护效果优于滴鼻/点眼组。因此, 构建的重组干酪乳杆菌的安全性优于商品活苗, 可以作为 IBDV 候选疫苗。

关键词: 传染性法氏囊病毒 (IBDV), VP2 蛋白, 重组干酪乳杆菌, 黏膜免疫, 免疫次数, 免疫剂量, 免疫途径, 保护率

Received: January 10, 2014; **Accepted:** April 18, 2014

Supported by: Heilongjiang Postgraduates' Innovation Project (No. YJSCX2013-11BYND).

Corresponding author: Xilin Hou. Tel/Fax: +86-459-6819292; E-mail: xly_hou@163.com

黑龙江省研究生创新科研项目(No. YJSCX2013-11BYND)资助。

网络出版时间: 2014-10-10

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140021.html>

Immunogenicity of recombinant *Lactobacillus casei* expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus in chickens

Hongli Lin¹, Shenda Hou², Song Wang¹, Yupeng Wang¹, Yunyan Luan¹, and Xilin Hou¹

¹ College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

² Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, Guangdong, China

Abstract: In order to determine immunogenicity and protective effect in chickens, we used the IBDV (Infectious bursal disease virus)-Vp2/*Lactobacillus casei* as antigen transfer system. First, the immunized and control chickens were challenged by IBDV/DQ at lethal dose to determine the protective ratio. Second, chickens were orally and intranasally vaccinated twice with 10⁹ CFU/mL pLA-VP2/*L. casei*, pLA/*L. casei* and PBS as negative control and commercial vaccine as positive control. The bursa injury and the lesion score were recorded post challenge. The level of specific IgG and sIgA in pLA-VP2/*L. casei* and positive control groups was significantly higher than that in negative control groups. The protection efficacy in pLA-VP2/*L. casei* oral group was higher than that in intranasal group. The SI of pLA-VP2/*L. casei* oral group was significantly higher than other groups. The lesion score indicated the pLA-VP2/*L. casei* was safer than commercial vaccine for bursa. Collectively, the pLA-VP2/*L. casei* could be a vaccine candidate for IBDV.

Keywords: infectious bursal disease virus, VP2 protein, recombinant *Lactobacillus casei*, mucosal immunity, immunization times, immunization dosage, immunization ways, protective ratio

鸡传染性法氏囊病 (Infectious bursal disease, IBD) 是由鸡传染性法氏囊病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 引起的雏鸡高度接触性传染性疾病, 是影响世界养禽业的重要疾病之一^[1]。在易感的鸡体中, 病毒主要侵害鸡的免疫器官, 致使机体发生免疫抑制。鉴于市场上抗 IBDV 商品疫苗在免疫过程中易对法氏囊造成损伤, 近十几年, 国内外学者正致力于抗 IBDV 基因工程亚单位疫苗的研制。1996 年, 以色列的 Pitcovski 等^[2]利用昆虫细胞表达 VP2 蛋白, 并通过免疫攻毒试验检验对鸡的保护效果。重组 VP2 蛋白免疫组攻毒保护率达 100%。1998 年, 澳大利亚的 Sheppard 等^[3]利用禽腺病毒表达 VP2 蛋白, 证明皮下注射方式可以诱导机体产生较高的抗体水平。1999 年, 日本的 Tsukamoto 等^[4]利用重组的马立克氏病病毒

(MDV) 表达 IBDV VP2 蛋白, 该重组疫苗对 IBDV 和 MDV 均可以提供较好的保护。2007 年, 浙江大学的 Wu 等^[5]利用转基因稻米种子表达 VP2 蛋白, 可以有效地保护机体抵抗 IBDV 的感染。

乳酸菌除了可以在胃肠道内定植, 抑制病菌之外^[6], 它还可以作为外源基因表达递送的载体。近十几年里, 国内外研究人员已在乳酸杆菌中表达多种蛋白。2003 年, 美国的 Dieye 等^[7]利用乳酸菌表达的 IBDV VP2 和 VP3 蛋白, 具有较好的反应原性。2005 年, Raha 等^[8]应用乳酸菌表达大肠杆菌自溶酶 AcmA, 获得约 15 kDa 的目的蛋白条带, 且具有较好的反应原性, 自溶酶 AcmA 蛋白成功展示在乳酸菌表面。2010 年, 温丽娟等^[9]用乳酸菌表达大肠杆菌 K88、K99 基因, 成功构建了 pLA-K88-K99 重组干酪乳杆菌。通过口服和滴鼻/点眼途径免疫 6-8 周龄 SPF 级

小鼠, 诱导机体产生较高水平的特异性抗体。攻毒保护性试验检测其保护效率达到 75% 以上, 而对照组死亡率达 100%。本研究利用实验室构建的抗 IBDV 重组干酪乳杆菌分别经口服和滴鼻/点眼途径免疫雏鸡, 并通过攻毒试验检测其免疫保护效力, 为鸡传染性法氏囊病的基因工程黏膜疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株、病毒、质粒和培养基

干酪乳杆菌 pHCE1LB-pgsA (pLA) 由本实验室保存; 干酪乳杆菌阳性重组菌株 pLA-VP2/*L. casei* 由本实验室构建保存; IBDV 毒株由本实验室分离鉴定, 命名为 DQ 株; IBDV B87 株商品疫苗购自哈尔滨维科生物技术有限公司; 所用培养基为 MRS 培养基, 试验用鸡为商品蛋鸡。

1.1.2 主要试剂

R & D IBDV IgG ELISA 检测试剂盒、sIgA ELISA 检测试剂盒购自北京奇松生物科技有限公司; HyClone 1640 细胞培养液; 美国 Gibco 公司胎牛血清, Solarbio 谷氨酰胺; MERCK 胰蛋白酶; 天津灏样生物制品有限责任公司的鸡淋巴细胞分离液。

1.2 方 法

1.2.1 重组干酪乳杆菌的表达

重组干酪乳杆菌的培养参照温丽娟等^[9]发

表的方法。取保存的重组菌按 2% 接种在 6 mL 含 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 MRS 液体培养基中, 厌氧条件下静止培养过夜。次日, 取过夜培养活化的菌液按 2% 接种于 100 mL 含 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素 MRS 培养基中进行培养。表达 6 h 后, 5 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体沉淀, 用 PBS 洗涤 3 次, 用显微镜进行菌体计数, 将菌液稀释成 5×10^9 CFU/mL 乳酸菌悬液, 用于接种免疫。

1.2.2 IBDV 超强毒半数感染量 (ID₅₀)测定

21 日龄商品鸡随机分成 7 组, 每组 7 只 (0.1 mL/只), 每组攻毒剂量分别为 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} , 攻毒后观察并记录鸡的死亡数量及法氏囊病变数量, 应用 Reed-Muench 法^[10]计算 ID₅₀。

1.2.3 免疫剂量及免疫次数试验

5 日龄鸡随机分成 A、B 两组, 每组 40 只, 设 A 组免疫程序为两次免疫组 (5 日龄-9 日龄一免, 13-17 日龄二免), B 组为 3 次免疫组 (5 日龄-9 日龄一免, 13-17 日龄二免, 21-25 日龄三免), 每次免疫均连续免疫 5 d。A₁、A₂、A₃ 组和 B₁、B₂、B₃ 组, 每组 10 只, 分别口服免疫 10^8 、 10^9 、 10^{10} CFU/mL 的重组干酪乳杆菌 (0.1 mL/只), 对照组 A_c、B_c 每组 10 只 (表 1), 口服免疫同等剂量的 PBS, 每次免疫后采血, 收集血清并收集胃肠道冲洗液, 应用间接 ELISA 检测血清 IgG 和胃肠道冲洗液 sIgA 效价。

表 1 免疫剂量和免疫次数试验分组

Table 1 Grouping of immunization dosages and times experiment

Group	A				B			
	A ₁	A ₂	A ₃	A _c	B ₁	B ₂	B ₃	B _c
Immunization dosages (CFU/mL)	10^8	10^9	10^{10}	PBS	10^8	10^9	10^{10}	PBS
Number of chickens	10	10	10	10	10	10	10	10

A、B 两组分别在未免后 7 d 攻毒 DQ 株，剂量为 10^3 ID₅₀(0.1 mL/只)，并设攻毒 PBS 对照组 A_{c1}、B_{c1}，和未攻毒 PBS 对照组 A_{c2}、B_{c2}，每组 5 只。在攻毒后 7 d 安乐死，记录每只鸡体重和法氏囊重，计算法氏囊重/体重，比率用 BBWR (Bursa-to-body weight ratio) 表示。剖检法氏囊，记录法氏囊眼观病变。攻毒保护标准参照 Huang 等发表的方法^[11]，并在此基础上加以改进，保护效果判定标准：1) 临床上没有出现发病和死亡；2) 法氏囊眼观病变得分^[12]，记录得分为 0 的鸡的数量；3) 计算 BBWR，与阴性对照组平均值+2 倍标准差相比，小于该值即判定为阴性，记录各组鸡阴性数量 (表 2)。

1.2.4 免疫途径试验

5 日龄鸡随机分成 A、B、C、D、E、F，共计 6 组，每组 24 只。A 组为口服 pLA-VP2/*L. casei* 重组菌，B 组为滴鼻/点眼 pLA-VP2/*L. casei*，C 组为口服 pLA/*L. casei*，D 组为口服 IBDV 活疫苗，E 组为肌肉注射 IBDV 活疫苗，F 组为口服 PBS 空白对照组，每只剂量为 100 μ L，A、B、C、F 免疫程序及接种菌量按 3.2.2 最优选择 (免疫次数为两次免疫，免疫剂量为 10^9 CFU/mL，

表 2 法氏囊眼观病变得分

Table 2 Criteria forevaluation of gross lesion in the bursa

Gross lesion score	Gross lesions in the bursa
0	Normal
1	Slight edema
2	Severe edema without bleeding and exudate
3	Slight bleeding without cheesy exudate
4	Severe bleeding without cheesy exudate
5	Severe bleeding with cheesy exudate

0.1 mL/只)，C、D 组按商品化疫苗免疫程序。分别取免疫前、免疫后不同免疫时间的血清，检测特异性 IgG 抗体水平，取眼结膜、鼻腔、肺泡、胃、小肠冲洗液，检测特异性 sIgA。每组取 4 只在未免后 7 d 取脾脏，用于淋巴细胞增殖试验。

1.2.5 血清采集

各组分别于免疫前和免疫后 5、10、15、20、25、30 和 35 d 对鸡通过心脏采集抗凝血，将采好的血置于 37 $^{\circ}$ C 温箱，1 h 后取出，4 $^{\circ}$ C 过夜静置，次日 3 000 r/min 离心 15 min，此时上清黄色液体即为血清，收集血清，-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.6 小肠、支气管肺泡、眼结膜及鼻腔冲洗液采集

对鸡安乐死后打开腹腔和胸腔，暴露鸡小肠、支气管和肺脏，用注射器吸取 PBS 冲洗，反复 3 次，每次 200 μ L，收集洗液，用注射器取 200 μ L PBS 反复冲洗眼结膜和鼻腔，收集眼部和鼻腔冲洗液，3 000 r/min 离心 10 min，收集上清，-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.7 间接 ELISA 检测血清 IgG 和冲洗液 sIgA

利用 ELISA 试剂盒检测血清 IgG 和小肠冲洗液、肺泡冲洗液、眼结膜鼻腔冲洗液 sIgA 抗体水平，检测过程严格按照 ELISA 检测试剂盒说明书进行，以试剂盒带有的阴性对照标准品为参照，OD₄₅₀ 高于阴性对照的均判定为阳性。

1.2.8 脾脏 T 淋巴细胞的增殖试验

脾脏 T 淋巴细胞增殖试验参照 Pradhan 等^[13]发表的方法。试验各组在未免后 7 d 每组取 4 只鸡，安乐死，取出脾脏；研磨脾脏，制成脾细胞悬液；将单细胞悬液用 1640 培养液稀释，细胞数为 2×10^6 个/mL，然后加入 96 孔板中，设 4

个重复,同时设阴性对照组。试验组用 ConA 刺激,阴性对照组应用培养液刺激,同时设不加脾细胞,只加培养液和只加 ConA 作为空白对照,然后置于 5% CO₂ 培养箱 (37 °C) 中培养 72 h。应用 MTT 比色法^[14]检测脾细胞增殖情况。用分光光度计检测 OD₄₉₀ 吸光度。用刺激指数 (Stimulation index, S.I.) 反映增殖情况。

刺激指数 (S.I.)=受到刺激的细胞 OD₄₉₀ 吸光度/阴性对照的细胞 OD₄₉₀ 吸光度。

1.2.9 攻毒试验

口服 pLA-VP2/*L. casei* 组、滴鼻/点眼 pLA-VP2/*L. casei* 组、口服 pLA/*L. casei* 组、口服 IBDV 活疫苗组、肌肉注射 IBDV 活疫苗组中每组 20 只,在未免后 7 d 对每组进行攻毒,剂量为 10³ ID₅₀,每只 100 μL;F 组 (PBS 组) 随机分成两组,分别为 F1 和 F2 组,F1 组为攻毒 PBS 对照组,F2 组为未攻毒 PBS 对照组。攻毒后观察每组鸡,检测保护效果。保护效果评价标准参照 1.2.3,取法氏囊做病例组织切片。

1.2.10 病理切片的制作

采用常规切片制作方法,攻毒后 7 d 的鸡安乐死,取法氏囊,将法氏囊切成 1 cm×1 cm 的组织块,经固定、脱水、透明、包埋、切片、染色、脱蜡复水、苏木精染色、伊红染色、脱水、透明、封固后便可在显微镜下用 40×视野下观察。

2 结果

2.1 半数感染量 (ID₅₀) 的测定

应用 Reed-Muench 法测半数感染量 (ID₅₀),测得传染性法氏囊病毒 (IBDV) 的 ID₅₀ 为

10^{-3.2}/100 μL。

2.2 免疫次数及免疫剂量试验结果

2.2.1 间接 ELISA 检测血清 IgG 结果

通过间接 ELISA 检测每组血清中 IgG 水平,结果显示,二次免疫和三次免疫组 IgG 水平显著高于一次免疫组 ($P<0.01$),二次免疫和三次免疫差异不显著 ($P>0.05$)。在二次免疫组中,10⁹ CFU/mL 和 10¹⁰ CFU/mL 组抗体水平均显著高于 10⁸ CFU/mL 和 PBS ($P<0.01$),10⁹ CFU/mL 和 10¹⁰ CFU/mL 组抗体水平差异不显著 ($P>0.05$) (图 1)。

2.2.2 间接 ELISA 检测小肠冲洗液 sIgA 结果

通过间接 ELISA 检测每组小肠冲洗液 sIgA 水平,结果显示,三次免疫组和二次免疫组 sIgA 水平显著高于一次免疫组 ($P<0.01$),二次免疫组和三次免疫组差异不显著 ($P>0.05$);在二次免疫组和三次免疫组中,10⁹ CFU/mL 和 10¹⁰ CFU/mL 组抗体水平均显著高于 10⁸ CFU/mL 和对照组 ($P<0.01$),而 10⁹ CFU/mL 和 10¹⁰ CFU/mL 组无显著差异 ($P>0.05$) (图 2)。

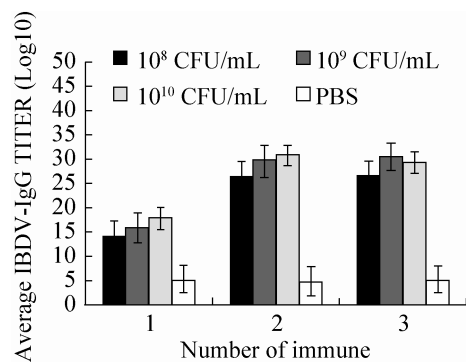


图 1 间接 ELISA 检测血清 IgG 抗体水平

Fig. 1 Serum IgG antibody titres in OD₄₅₀ detected by indirect ELISA.

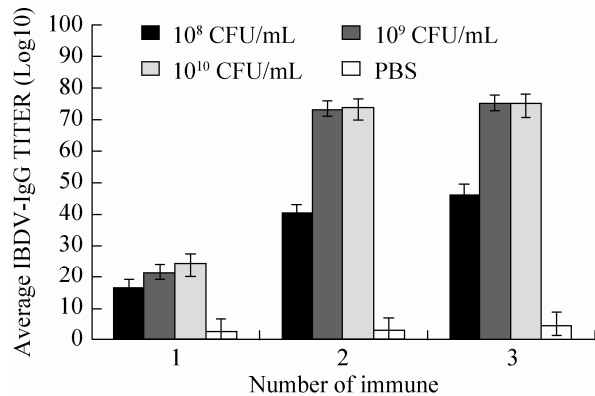


图2 间接 ELISA 检测小肠洗液 sIgA 水平

Fig. 2 sIgA antibody titres in *OD*₄₅₀ detected by indirect ELISA.

2.2.3 攻毒保护试验结果

二次免疫组和三次免疫组攻毒对照组鸡均表现出 20% 的死亡率和 100% 发病率, 未攻毒对照组均无死亡和发病情况; 二次免疫组免疫剂量为 10⁸ CFU/mL 组无死亡情况, 但发病率为 40%, 10⁹ CFU/mL、10¹⁰ CFU/mL 组无死亡, 发病率为 20%; 三次免疫组 10⁸ CFU/mL 无死亡情

况, 发病率为 30%, 10⁹ CFU/mL、10¹⁰ CFU/mL 组无死亡率, 发病率为 20%。

法氏囊眼观病理变化试验 A 组为二次免疫组, B 组为三次免疫组; A₁、A₂、A₃ 为 A 组不同免疫剂量试验组 (10 CFU/mL、10⁹ CFU/mL、10¹⁰ CFU/mL), A_{C1} 为阳性对照组, A_{C2} 为阴性对照组; B₁、B₂、B₃ 为 B 组不同免疫剂量试验组, B_{C1} 为阳性对照组, B_{C2} 为阴性对照组 (表 3)。

攻毒后对鸡安乐死, 记录各组鸡体重与法氏囊重, 计算比率 BBWR。BBWR=法氏囊重×1 000/体重。每组计算 BBWR 平均值, 并应用统计软件进行统计学分析。记录法氏囊病变得分为 0 的鸡数量, 计算干酪乳杆菌口服疫苗保护率。最终保护率计算以 1.2.9 中的 3 个标准分别计算保护率, 最终取平均值。结果显示, 二次免疫 10⁹ CFU/mL 和 10¹⁰ CFU/mL 组保护率均为 80%, 10⁸ CFU/mL 组保护率为 60%; 三次免疫 10⁹ CFU/mL 和 10¹⁰ CFU/mL 组保护率为 80%, 10⁸ CFU/mL 组保护率为 70% (表 4)。

表 3 法氏囊眼观病理变化得分

Table 3 Score of gross lesions in the bursa

Score	Gross lesion scores in the bursa						Total	Average
	0	1	2	3	4	5		
A ₁	6	0	4	0	0	0	10	0.8
A ₂	8	1	1	0	0	0	10	0.3
A ₃	8	2	0	0	0	0	10	0.2
A _{C1}	0	0	0	3	2	0	5	3.4
A _{C2}	5	0	0	0	0	0	5	0
B ₁	7	2	0	1	0	0	10	0.5
B ₂	8	1	1	0	0	0	10	0.3
B ₃	8	2	0	0	0	0	10	0.2
B _{C1}	0	0	1	3	1	0	5	3.0
B _{C2}	5	0	0	0	0	0	5	0

表 4 口服重组干酪乳杆菌保护率

Table 4 Protectiveratio of orally vaccinating the recombination *L. casei*

Group	Negative ratio	BBWR		Scores 0 ratios	Average protection (%)
		$\bar{x} \pm s$	Protective ratios		
A ₁	6/10	4.01±0.64	6/10	6/10	60
A ₂	8/10	4.47±0.68	8/10	8/10	80
A ₃	8/10	4.53±0.63	8/10	8/10	80
A _{c1}	0/5	1.97±0.54	0/5	0/5	0
A _{c2}	5/5	4.75±0.69	5/5	5/5	100
B ₁	7/10	4.24±0.61	7/10	7/10	70
B ₂	8/10	4.51±0.69	8/10	8/10	80
B ₃	8/10	4.56±0.66	8/10	8/10	80
B _{c1}	0/5	2.02±0.57	0/5	0/5	0
B _{c2}	5/5	4.78±0.64	5/5	5/5	100

2.3 免疫途径试验结果

2.3.1 间接 ELISA 检测血清 IgG 结果

对免疫前和免疫后各组的鸡采血，在不同时间心脏采血，收集血清，进行间接 ELISA 检测，并绘制生长曲线，观察 IgG 抗体消长规律。结果显示，免疫前雏鸡在母源抗体存在条件下，抗体效价均较高，但在 5 日龄（一免）时开始呈现下降趋势（检测结果略），PBS 对照组显示抗体水平在免疫后 10 d 到达最低值，并趋于稳定；而口服 pLA-VP2/*L. casei* 和肌注商品活苗组血清 IgG 抗体效价显著高于其他组；滴鼻/点眼 pLA-VP2/*L. casei* 稍低于上述两组，但显著高于其他 3 组；然而，肌注商品活苗组在免疫后 25 d 时抗体效价呈现下降趋势，口服 pLA-VP2/*L. casei* 组抗体效价呈现稳定趋势；各组在一免后抗体效价均呈现缓慢增长，二免后呈明显上升趋势，而对照组抗体效价变化不明显（图 3）。

2.3.2 间接 ELISA 检测小肠、肺泡、眼结膜鼻腔冲洗液 sIgA 结果

间接 ELISA 检测结果显示，口服 pLA-

VP2/*L. casei* 和口服商品活苗组 sIgA 抗体效价显著高于其他组 ($P < 0.01$)；但口服商品活苗组在免疫后 25 d 时抗体效价开始呈现下降趋势，口服 pLA-VP2/*L. casei* 组可以维持较稳定的抗体水平；滴鼻/点眼 pLA-VP2/*L. casei* 组低于上述两组 ($P < 0.05$)；对照组抗体效价变化不显著 ($P > 0.05$) (图 4)。

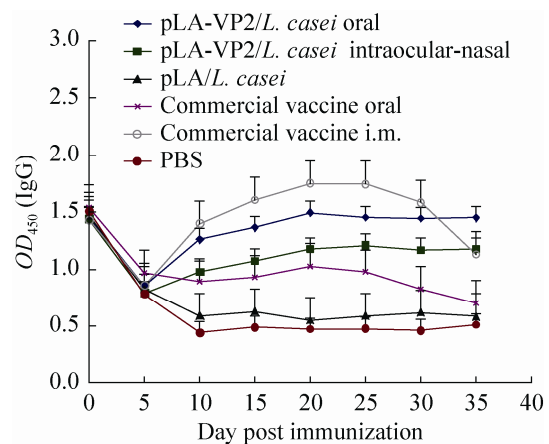


图 3 间接 ELISA 检测不同免疫期血清 IgG 抗体效价
Fig. 3 Serum IgG antibody titres in OD_{450} detected by indirect ELISA in the different immunity period.

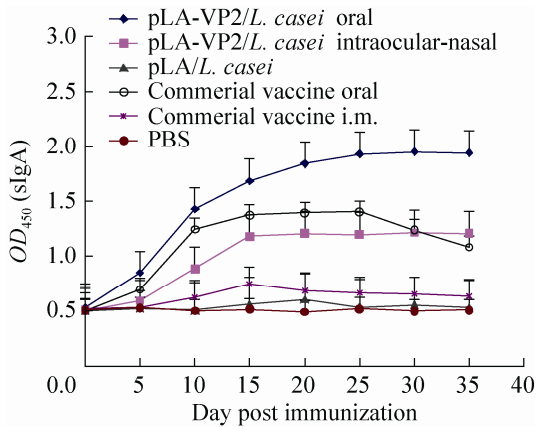


图 4 间接 ELISA 检测小肠冲洗液 sIgA 抗体效价
Fig. 4 sIgA antibody titres in OD_{450} detected by indirect ELISA in small intestine washing fluid.

肺泡冲洗液检测结果显示，滴鼻/点眼 pLA-VP2/*L. casei* 组抗体效价显著高于其他 5 组 ($P < 0.01$)，并且可以在免疫后 20 d 开始维持较稳定的抗体水平，但该组肺泡冲洗液中 sIgA 抗体效价 ($OD_{450} < 1.5$)，显著低于口服 pLA-VP2/*L. casei* 组小肠液 sIgA 抗体效价 ($OD_{450} > 1.5$)。肺泡液中 sIgA 抗体效价口服组显著低于滴鼻点眼 pLA-VP2/*L. casei* 组 ($P < 0.01$)，对照组抗体水平变化不显著 ($P > 0.05$) (图 5)。

眼结膜、鼻腔冲洗液检测结果显示，滴鼻/点眼 pLA-VP2/*L. casei* 组抗体效价显著高于其他 5 组 ($P < 0.01$)，且在免疫后 20 d 达到最大值，并且开始趋于稳定，对照组抗体水平变化不大 (图 6)。

2.3.3 脾细胞增殖试验结果

脾细胞增殖试验结果显示，ConA 刺激组刺激指数显著高于 1640 对照组 ($P < 0.01$)；两组中口服 pLA-VP2/*L. casei* 组的刺激指数均显著高于口服活苗组、肌注活苗组、口服 pLA/*L. casei* 组和 PBS 组 ($P < 0.01$)，显著高于滴鼻/点眼 pLA-VP2/*L. casei* 组 ($P < 0.05$) (图 7)。

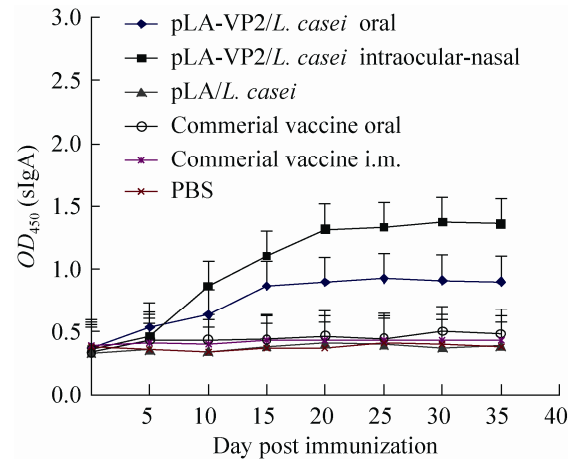


图 5 间接 ELISA 检测肺泡冲洗液 sIgA 抗体效价
Fig. 5 sIgA antibody titres in OD_{450} detected by indirect ELISA in pulmonary alveoli washing fluid.

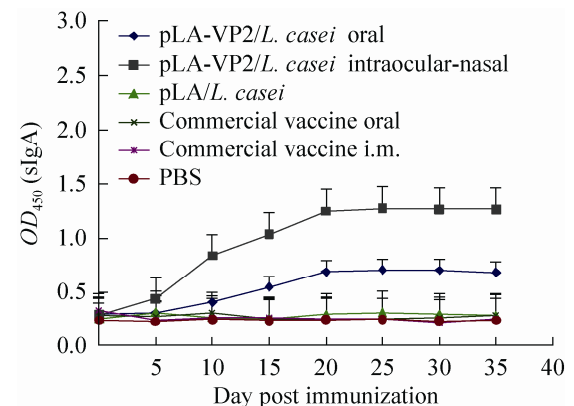


图 6 间接 ELISA 检测眼结膜/鼻腔冲洗液 sIgA 抗体效价
Fig. 6 sIgA antibody titres in OD_{450} detected by indirect ELISA in eye conjunctiva/nasal cavity washing fluid.

2.3.4 剖检法氏囊病变和保护率结果

攻毒 PBS 对照组和 pLA/*L. casei* 对照组鸡均表现出 10% 的死亡率和 100% 发病率，未攻毒 PBS 对照组无死亡和发病情况；口服 pLA-VP2/*L. casei* 组和滴鼻/点眼 pLA-VP2/*L. casei* 组无死亡情况，发病率分别为 15% 和 20%，口服商品活苗组无死亡率，发病率为 40%；肌注商品活苗组无死亡率，发病率为 35%。

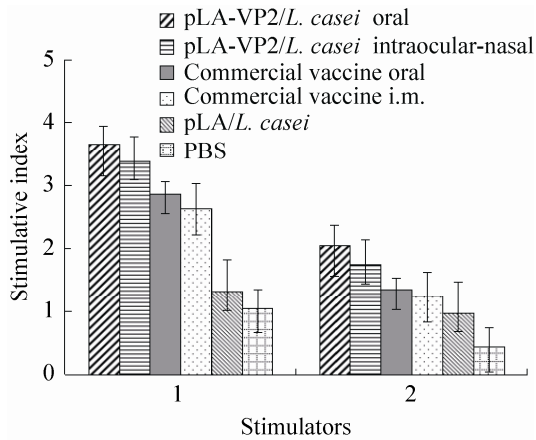


图7 脾脏 T 淋巴细胞增殖试验

Fig. 7 Spleen T lymphocyte proliferation test. 1: ConA stimulator group; 2: 1640 culture fluid stimulator group.

表5 法氏囊眼观病理变化得分

Table 5 Score of gross lesions in the bursa

Group	Gross lesion scores in the bursa						Total	Average
	0	1	2	3	4	5		
pLA-VP2/ <i>L. casei</i> oral	17	2	1	0	0	0	20	0.2
pLA-VP2/ <i>L. casei</i> intraocular-nasal	15	2	2	1	0	0	20	0.45
pLA/ <i>L. casei</i>	0	1	6	10	3	0	20	2.75
Commercial vaccine oral	3	10	4	3	0	0	20	1.35
Commercial vaccine i.m.	5	8	5	2	0	0	20	1.2
Challenge PBS control	0	0	0	5	4	1	10	3.6
Unchallenge PBS control	10	0	0	0	0	0	10	0

表6 pLA-VP2 重组干酪乳杆菌保护率

Table 6 Protective ratio of recombinant *Lactobacillus casei*

Group	Negative ratio	BBWR		Scores 0 ratios	Average protection (%)
		$\bar{x} \pm s$	Protective ratio		
pLA-VP2/ <i>L. casei</i> oral	17/20	4.91±0.73	16/20	17/20	83.3
pLA-VP2/ <i>L. casei</i> intraocular-nasal	16/20	4.80±0.76	14/20	15/20	75
pLA/ <i>L. casei</i>	0/10	2.13±0.57	0/20	0/20	0
Commercial vaccine oral	12/20	3.97±0.68	5/20	3/20	33.3
Commercial vaccine i.m.	13/20	4.05±0.64	6/20	5/20	40
Challenge PBS control	0/10	2.24±0.59	0/10	0/10	0
Unchallenge PBS control	10/10	5.14±0.63	10/10	10/10	100

法氏囊眼观病变综合得分结果显示,口服 pLA-VP2/*L. casei* 组和滴鼻点眼 pLA-VP2/*L. casei* 组得分低于其他组,口服 pLA-VP2/*L. casei* 比滴鼻/点眼 pLA-VP2/*L. casei* 分数略低(表5)。

攻毒 7 d 后鸡安乐死,记录各组鸡体重与法氏囊重,计算比率 BBWR。计算方法参照 2.2.3。结果显示,口服 pLA-VP2/*L. casei* 组保护率达 80%以上,滴鼻/点眼 pLA-VP2/*L. casei* 组保护率为 75%,其他组保护率均在 50%以下(表6)。

2.3.5 法氏囊组织病理学检查结果

法氏囊病理切片结果显示,未攻毒 PBS 对照组髓质滤泡饱满,泡间组织正常;肌肉注射商品活苗组和口服 pLA/*L. casei* 髓质形成空泡,

淋巴滤泡退化, 如箭头所示; 口服 pLA-VP2/*L. casei* 组滤泡正常, 无明显的病变; 滴鼻点眼 pLA-VP2/*L. casei* 组淋巴滤泡正常, 在法氏囊黏膜下有少量红细胞, 法氏囊轻微损伤; 攻毒 PBS 对照组髓质形成空泡, 淋巴细胞损伤, 淋巴滤泡退化, 法氏囊呈现严重病灶, 如箭头所示 (图 8)。

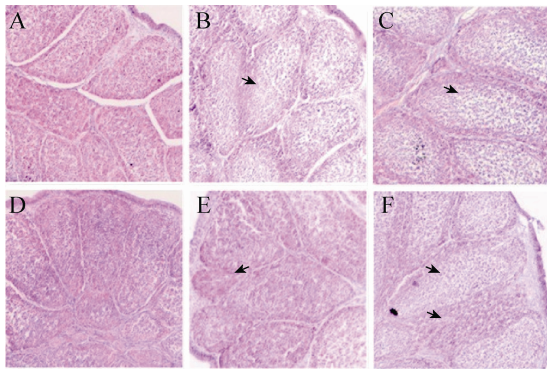


图 8 法氏囊病理学变化 (显微镜 40×视野)

Fig. 8 Histological pathological changes in the bursa. (A) Unchallenge PBS control. (B) Commercial vaccine i.m.. (C) pLA/*L. casei* oral. (D) pLA-VP2/*L. casei* oral. (E) pLA-VP2/*L. casei* intraocular-nasal. (F) Challenge PBS control.

3 讨论

目前现场常常使用中等毒力的弱毒活苗来预防 IBDV 感染, 但是当有高水平母源抗体存在的情况下实施免疫常常会造成免疫失败, 母源抗体低又会造成鸡法氏囊的损伤, 如果免疫期不正确这种损伤会更加严重^[13]。因此, 许多学者致力于寻找新的免疫策略, 在母源抗体存在的情况下仍然能够诱导局部和系统免疫的黏膜疫苗研究引起了广泛关注。本实验采用乳杆菌作为 IBDV 抗原的载体系统, 初步探讨了免疫途径和免疫剂量对雏鸡的免疫效果。乳酸菌作为外源抗原递送载体经口服进入机体后在机体胃肠道定植, 首先接触小肠黏膜, 诱导小肠

黏膜免疫产生 sIgA^[15]。乳酸菌表面携带有 VP2 外源蛋白, 通过胃肠道在小肠定植后, 小肠黏膜表面的免疫细胞快速识别特异性抗原, 然后将抗原直接呈递到小肠黏膜, 被肠黏膜的浆细胞识别后, 产生 sIgA, 发生局部的黏膜免疫^[16]。而乳酸菌处于对数生长期时, 外源蛋白的表达量随菌体繁殖逐渐提高, 但当菌体繁殖处于稳定期时, 即使继续增加表达时间, 蛋白表达量也不再提高, 这可能就是二次免疫诱导的 sIgA 抗体水平与三次免疫差异不显著的原因。本研究中间接 ELISA 检测 IgG, 三次免疫和二次免疫免疫抗体水平差异不显著, 这可能也是由于乳酸菌处于稳定期, 蛋白表达量已经达到最大值, 诱导机体体液免疫水平已处于最高峰, 因此即使提高菌体数量, 增加免疫次数也不会对免疫效果产生影响。

在攻毒保护试验中, 从各组法氏囊眼观病变计算的平均得分结果可以看出二次免疫组和三次免疫组得分均低于攻毒 PBS 对照组, 而二次免疫组得分与三次免疫组相同; 10^9 CFU/mL 和 10^{10} CFU/mL 法氏囊病变得分低于阳性对照组, 10^9 CFU/mL 和 10^{10} CFU/mL 法氏囊病变得分差别较小。这也证明了二次免疫, 免疫剂量为 10^9 CFU/mL 即可保护鸡抵抗 IBDV 感染, 这一结果与间接 ELISA 检测结果相符。因此, 确定的免疫次数为二次免疫, 免疫菌体数量为 10^9 CFU/mL。

乳酸菌疫苗抵抗 IBDV 感染的免疫应答是通过 Th2 及其产物 IgG1 实现的。然而通过黏膜途径递送表达的 VP2 外源蛋白既可以诱导 IgG1, 也可以诱导 IgG2, 原因可能是 Th1 型细胞因子促进了其向 IgG2a 类别转换, 而抑制了与 Th2 型免疫应答有关的 IgG1 的抗体水平^[17]。由此推断乳酸菌疫苗促进了辅助型 T 细胞的免

疫应答。具有 Th1 和 Th2 型细胞因子的特异性的 IBDV VP2 辅助型 T 细胞在胃内免疫途径中常常被发现,尤其是肠内和脾脏中^[16]。因此通过口服方式免疫应该是较好的免疫途径,这与本研究中间接 ELISA 检测特异性抗体试验结果相符。

间接 ELISA 检测血清 IgG 结果显示口服重组菌组血清抗体水平和肌注商品活苗组抗体水平显著高于对照组 ($P<0.01$),且这两组抗体水平差异不显著 ($P>0.05$)。然而,间接 ELISA 检测血清中 IgG 抗体时,在免疫后 25 d 内,肌注商品活苗血清 IgG 抗体水平略高于口服重组菌组,但在 25 d 后肌注商品活苗组抗体水平开始呈现下降趋势,且于免疫后 30 d 开始低于口服重组菌组,而口服重组菌组在免疫后 20 d 抗体水平最高,而且呈现稳定趋势。2009 年,齐炳理等^[18]利用乳酸菌表达 IBDV VP2 蛋白免疫保护效果研究中证实,SPF 鸡免疫后 21 d 试验组与对照组相比抗体水平有显著差异,免疫后 36 d 抗体水平达到最大值,这一结果的不同可能与本研究用商品蛋鸡有关。

在攻毒保护试验中,肌注活苗组的鸡法氏囊具有显著的眼观病理变化,组织病理切片中也有体现,口服重组菌组法氏囊没有明显的病变。由此可见,商品苗在免疫初期抗体水平较高,但抗体水平不稳定,而本研究构建的重组乳酸菌虽然诱导的抗体水平低于商品苗,但免疫后诱导机体抗体水平稳定,且安全性明显优于商品活疫苗;ELISA 检测小肠、肺泡和眼结膜鼻腔冲洗液 sIgA 结果显示,口服重组菌组小肠中 sIgA 水平显著高于其他组 ($P<0.01$),滴鼻点眼组肺泡和眼结膜鼻腔冲洗液中 sIgA 水平显著高于其他组 ($P<0.01$),但 sIgA 抗体水平明显低于口服组小肠冲洗液 ($P<0.01$)。综上,确定

重组干酪乳杆菌免疫途径是口服免疫。分析本试验研究结果,发现虽然商品弱毒活疫苗的免疫诱导了高水平的特异性 IgG 抗体,但是免疫保护效果却很低,原因可能是保护效果的评价指标不同,评价角度不同,没有使用单一的攻毒死亡率来评价保护效果^[19-20],而是参考了 Huang 等^[11]的评价标准。商品疫苗的保护率一般是以没有发病症状为标准来计算的,本试验除了这个指标外,还增加了法氏囊病理损伤和 BBWR 指标,因此试验中商品疫苗的保护率低。

本研究通过免疫后检测血清 IgG 和胃肠道、肺泡和眼结膜鼻腔冲洗液 sIgA 抗体水平及攻毒后的病理指标,确定了 pLA-VP2 重组干酪乳杆菌的免疫次数、免疫剂量及免疫途径。pLA-VP2 重组干酪乳杆菌可能会成为未来预防鸡传染性法氏囊病的有效的疫苗产品,同时将会为禽类其他疾病口服基因工程黏膜疫苗研制提供可借鉴的参考。

REFERENCES

- [1] Hou XL. Practical Animal Infectious Disease. Harbin: Harbin Engineering University Press, 2005: 221-222 (in Chinese).
侯喜林主编. 实用畜禽传染病学. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2005: 221-222.
- [2] Pitcovski J, Di-Castro D, Shaaltiel Y, et al. Insect cell-derived VP2 of infectious bursal disease virus confers protection against the disease in chickens. Avian Dis, 1996, 40(4): 753-761.
- [3] Sheppard M, Werner W, Tsatas E, et al. Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease. Arch Virol, 1998, 143(5): 915-930.
- [4] Tsukamoto K, Kojima C, Komori Y, et al. Protection of chickens against very virulent

- infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek's disease virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2. *Virology*, 1999, 257(2): 352–362.
- [5] Wu J, Yu L, Li L, et al. Oral immunization with transgenic rice seeds expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus induces protective immune responses in chickens. *Plant Biotechnol J*, 2007, 5(5): 570–578.
- [6] Ren DY, Li C, Qin YQ, et al. Development review on healthy function and potential mechanisms of Lactic Acid Bacteria. *Chin J Vet Drug*, 2011, 45(2): 47–50 (in Chinese).
任大勇, 李昌, 秦艳青, 等. 乳酸菌益生功能及作用机制研究进展. *中国兽药杂志*, 2011, 45(2): 47–50.
- [7] Dieye Y, Arjan JW Hoekman, Clier F, et al. Ability of *Lactococcus lactis* export viral capsid antigens: a crucial step for development of live vaccines. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 7281–7288.
- [8] Raha AR, Varma NR, Yusoff K, et al. Cell surface display system for *Lactococcus lactis*: a novel development for oral vaccine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(1): 75–81.
- [9] Wen LJ, Hou XL, Wang GH, et al. Immunization with recombinant *Lactobacillus casei* strains producing K99, K88 fimbriae proteins mice against enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vaccine*, 2012, 30(22): 3339–3349.
- [10] Zhang XS. The new method of calculating median lethal dose. *China Poultry*, 1994, 16(6): 19 (in Chinese).
张学松. 计算半数致死量的新方法. *中国家禽*, 1994, 16(6): 19.
- [11] Huang Z, Elankumaran S, Yunus AS, et al. A recombinant newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. *J Virol*, 2004, 78(18): 10054–10063.
- [12] Tippenhauer M, Heller DE, Weigend S, et al. The host genotype influences infectious bursal disease virus pathogenesis in chickens by modulation of T cells responses and cytokine gene expression. *Dev Comp Immunol*, 2013, 40(1): 1–10.
- [13] Pradhan SN, Prince PR, Madhumathi J, et al. Protective immune responses of recombinant VP2 subunit antigen of infectious bursal disease virus in chickens. *Vet Immunol Immunopathol*, 2012, 148(3/4): 293–301.
- [14] Wang C, Zhao ZQ, Zhang CJ, et al. Influence of fusion protein of IBDV VP2 and chicken Interleukin-2 on immune response in chicken. *Chin J Biotech*, 2010, 26(4): 476–482 (in Chinese).
王臣, 赵战勤, 张春杰, 等. 禽 IL-2 与传染性法氏囊 VP2 融合蛋白免疫学特性. *生物工程学报*, 2010, 26(4): 476–482.
- [15] Li L, Oral immunity and oral vaccine: mechanism, progress and prospects. *J Med Mol Biol*, 2004, 1(5): 316–319 (in Chinese).
李理. 口服免疫机制及口服疫苗的研究进展. *医学分子生物学杂志*, 2004, 1(5): 316–319.
- [16] Wells JM, Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6: 349–362.
- [17] Mahgoub HA, Bailey M, Kaiser P. An overview of infectious bursal disease. *Arch Virol*, 2012, 157(11): 2047–2057.
- [18] Qi BL, Ge JW, Qiao XY, et al. Construction and immunoprotective effect of recombinant *Lactobacilli* expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus. *Chin Vet Sci*, 2009, 39(11): 978–983 (in Chinese).
齐炳理, 葛俊伟, 乔薪瑗, 等. 表达传染性腔上囊病毒 VP2 蛋白重组乳酸菌的构建及其免疫保护效果. *中国兽医科学*, 2009, 39(11): 978–983.
- [19] Kajikawa A, Nordone SK, Zhang L, et al. Dissimilar properties of two recombinant *Lactobacillus acidophilus* strains displaying *Salmonella* FliC with different anchoring motifs. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(18): 6587–6596.
- [20] Liu JK, Hou XL, Wei CH, et al. Induction of immune responses in mice after oral immunization with recombinant *Lactobacillus casei* strains expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* F41 fimbrial protein. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(13): 4491–4497.

(本文责编 陈宏宇)