

胚胎发育早期接种人血清白蛋白诱导鸡的免疫耐受*

赵晨 王晓萍 宋迟 李哲 王雪岭 李赞东**

中国农业大学生物学院, 北京 100094

摘要 外源基因的引入及表达常会引发宿主动物强烈的免疫应答, 导致蛋白产量的下降或引起炎症反应。本研究试图通过在胚胎发育早期接种异源抗原诱导动物产生免疫耐受来解决这些问题。为了诱导鸡产生免疫耐受, 将人血清白蛋白 (Human serum albumin, HSA) 通过胚胎血管微注射的方式接种到发育 65-67 h 的鸡胚血管中, 接种剂量为 50 μg ; 通过卵黄注射的方式接种到发育 3-7 d 的鸡胚卵黄中, 接种剂量为 100 μg 。孵出的小鸡在 3 周龄时按照常规免疫方法再次接种同种抗原, 收集不同时期的血清样本, 用酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血清中抗-HSA 抗体水平。结果表明, 两种接种方式均能诱导小鸡产生免疫耐受: 在 65-67 h 的胚胎中通过血管微注射法接种抗原诱导小鸡产生免疫耐受的比率为 64.52%; 通过卵黄注射接种抗原诱导小鸡产生免疫耐受的最佳接种时间为发育的第 6 d, 第 5、7 d 接种对后期血清中抗-HSA 抗体形成也有一定抑制作用, 但是维持耐受的时间较短, 第 3、4 d 接种抗原对诱导小鸡免疫耐受的效果不明显 [动物学报 51 (5): 845-851, 2005]。

关键词 鸡 人血清白蛋白 免疫耐受

Induction of immunological tolerance by inoculating human serum albumin during early stages of chicken embryonic development*

ZHAO Chen, WANG Xiao-Ping, SONG Chi, LI Zhe, WANG Xue-Ling, LI Zan-Dong**

College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China

Abstract Transgene expression may trigger intensive immune responses against heterologous protein resulting in shortening of gene expression and inflammation. This problem can be resolved by inoculating foreign protein antigen into embryos at an early development stage to induce immune tolerance. To induce immunological tolerance in laboratory chickens, human serum albumin (HSA) was inoculated into embryos by blood vessel microinjection (50 μg) at embryonation hours 65-67 or by yolk sac injection (100 μg) at embryonation days 3-7. All hatched chicks at 3-week-old were challenged with the same antigen four times at 10-day intervals, and serum samples were collected to determine anti-HSA antibody levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Chickens exposed to HSA at embryonation hours 65-67 by microinjection had 64.52% incidence of tolerance. Immunological tolerance could be induced and maintained till 60-day-old by in ovo inoculation at embryonation day 6, and the formation of anti-HSA antibody could also be suppressed by inoculation at embryonation day 5 and 7 despite the shorter duration of tolerance. There was no significant effect of inoculating at embryonation day 3 and 4 on tolerance induction [Acta Zoologica Sinica 51 (5): 845-851, 2005].

Key words Chicken, Human serum albumin, Immunological tolerance

利用转基因动物生产药用蛋白具有较高的附加价值。然而, 经过基因改造后的细胞所表达的蛋白通常是异种蛋白, 有可能触发宿主动物强烈的免疫

应答, 造成基因产物表达被抑制甚至引起炎症反应。Mohammed et al. (1998) 将人免疫球蛋白基因转入鸡法氏囊淋巴细胞系 (DT40) 后再将后者

2005-01-21 收稿, 2005-05-17 接受

* 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (No. 2004AA213080) [This research was funded by the grant from the State 863 High-technology R&D Project of China 408 (No. 2004AA213080)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: lzdcrc@cau.edu.cn

© 2005 动物学报 Acta Zoologica Sinica

静脉注射到成年母鸡体内, 在注射 6 d 后的蛋中即可通过酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测到重组的人免疫球蛋白 (rhIgG3), 注射 12 d 后所产蛋中, 该蛋白含量达到最高峰, 但之后骤然下降, 这可能是由于机体产生了对 rhIgG3 的免疫应答的结果。

早在 20 世纪中期, 科学家们就致力于诱导免疫耐受动物的研究。Wolfe et al. (1957) 通过向出生不久的小鸡体内注射大量的牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 诱导耐受。Stevens et al. (1958) 向鸡胚卵黄囊中注射人血清白蛋白 (Human serum albumin, HSA), Hraba and Ivanyi (1963) 给新孵化的小鸡注射同种抗原也获得了相似的结果。手术摘除鸡的主要淋巴器官——法氏囊, 可以提高对抗外源蛋白 BSA (Peterson et al., 1971) 或 HSA (Ivanyi and Salerno, 1972; Hraba et al., 1977) 抗体产生的抑制作用并延长耐受的时间。这些研究表明, 可以通过对胎儿或新生儿接种抗原诱导产生免疫耐受。

与哺乳动物不同的是, 禽类的胚胎发育在母体外完成, 这为胚胎期接种抗原提供了更为方便的条件, 因此我们的实验选择鸡作为研究对象, 通过对不同发育时期的胚胎接种抗原, 诱导其产生免疫耐受, 探索诱导免疫耐受产生的最佳接种时期和耐受可以维持的最长时间。

1 材料与方法

1.1 种蛋的孵化和实验鸡的饲养

所有实验用白莱航鸡种蛋购自中国农业大学种鸡场。种蛋经 0.1% 新洁尔灭溶液清洗消毒后放于孵化器中, 在 38.5℃, 70% 相对湿度, 转蛋角度为 90°/2 h 的条件下孵育。新生小鸡加翅号标记, 饲养于动物房中。第一周温度控制在 30℃, 随后保持为 20℃, 小鸡自由饮水采食。

1.2 抗原的制备

人血清白蛋白 (Human serum albumin, HSA) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) 溶解于 0.9% 生理盐水中, 终浓度为 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (用于血管微注射实验) 和 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (用于卵黄注射实验), 存放于 4℃ 冰箱中备用。

1.3 抗原在胚胎期的初次接种

1.3.1 胚胎血管微注射 孵化 65–67 h 的种蛋用酒精棉擦拭表面消毒后, 通过显微光源 (Nikon, Japan) 照蛋确定胚胎所在位置, 然后在其附近打

开一个小孔。在实体显微镜 (Nikon, SMZ-10, Japan) 下用外径为 30–40 μm 的显微注射针将 50 μg 的 HSA 注射到鸡胚背侧动脉血管中, 然后用 parafilm 封口, 放回孵化器中, 保持钝端向上继养孵化至出雏。

1.3.2 卵黄注射 孵化 3–7 d 的种蛋用酒精棉擦拭表面消毒, 用解剖针在气室处扎一个小眼, 然后用一次性注射器吸取 100 μg 的 HSA 溶液, 从气室处垂直向下扎入卵黄中, 缓慢推入液体, 保持角度不变抽出注射针。用石蜡封闭种蛋气室部小孔, 放回孵化器中, 保持钝端向上继续孵化至出雏。卵黄注射根据不同的孵育天数分为 5 组, 每组接种 30 枚种蛋。

1.4 雏鸡孵化后再次免疫

所有孵化的雏鸡 (包括胚胎期预接种抗原及胚胎期未做任何处理的小鸡), 在 3 周龄时均用 HSA 再次进行常规免疫, 以了解在正常的免疫接种刺激下, 经过胚胎期预处理的小鸡是否能产生免疫耐受。共进行了 4 次免疫, 方法如下: 第一次将抗原溶液与弗氏完全佐剂 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) 等体积混合, 充分乳化后采用皮下注射的方式接种; 第二次免疫距第一次免疫时间间隔约为 10 d, 用弗氏不完全佐剂 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) 与抗原溶液等体积混合, 充分乳化后同样采用皮下注射方式接种; 再次间隔 10 d 后进行第三次免疫, 过程与第二次免疫完全相同; 最后一次免疫直接采用腿部肌肉注射抗原溶液的方法接种。每一次的免疫剂量均为 200 $\mu\text{g}/\text{只}$ 。

1.5 血清样本的制备

翅下静脉采血收集每只小鸡的血液样本, 4℃ 冰箱放置过夜, 隔天 10 000 g 离心 5 min, 收集血清, 贮存于 -20℃ 冰箱中以备检测。

1.6 抗-HSA 抗体的检测

使用 ELISA 试验检测血清样本中抗-HSA 抗体水平。每一次 ELISA 检测均设置阳性对照和阴性对照, 分别是未经胚胎期接种正常孵化并在 20 日龄时与实验组小鸡一起接受常规免疫的小鸡血清及无特定病原体 (Special pathogen free, SPF) 小鸡血清。待测血清样本的稀释度是通过将阳性血清和阴性血清的系列稀释检测试验预先测定的。以阳性血清在 450 nm 处的吸光度 (Optical density, OD) 达到 1 左右时的血清稀释度作为待测血清的标准稀释度, 此时的抗原包被浓度作为检测实验样本时的

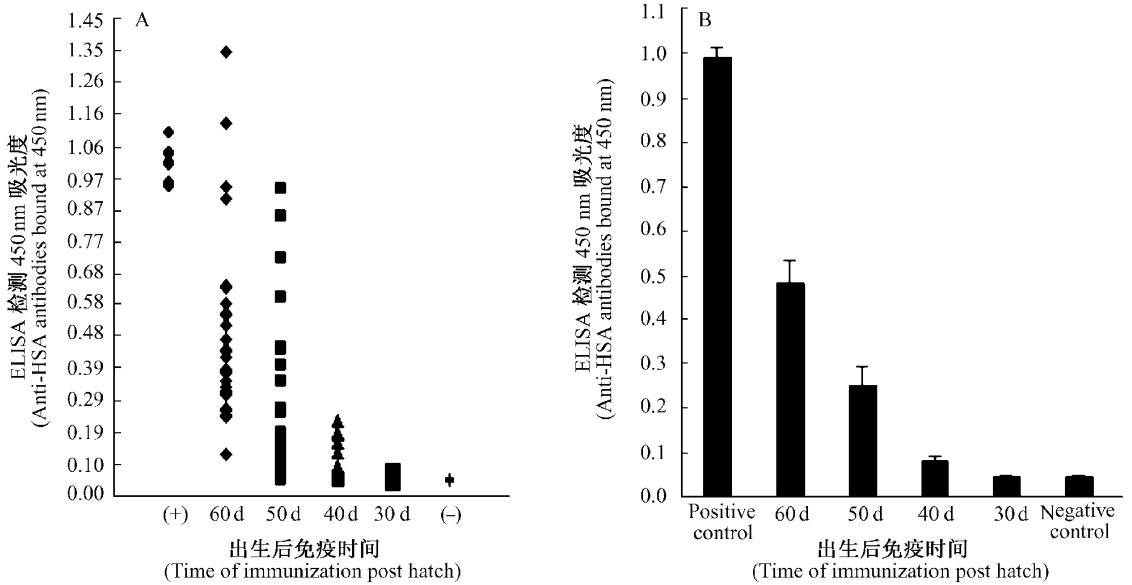


图 1 ELISA 法分析血清中抗-HSA 抗体

每枚种蛋孵育到 65–67 h, 通过胚胎血管微注射法接种 50 μg 的 HSA。血清样本为小鸡在 30–60 日龄进行免疫期间收集并用 ELISA 法检测血清中的抗体水平。图 1A: 图中每点代表一个样本的 ELISA 检测的 OD 值。y 轴上第一个数值 (0.10) 为阴性样本的 2.1 倍, 高于此数值的样本视为阳性样本, 反之则为阴性样本。图 1B 中所示为阳性对照, 阴性对照和 30–60 日龄血清样本的平均 OD 值, 柱上方表示其标准误。

Fig.1 Serum anti-HSA antibodies analysis by ELISA

Chicken embryos were inoculated with 50 μg of HSA by blood vessel microinjection at 65–67 h of embryogenesis, and serum samples were collected during post hatch immunization and detected by ELISA. A. Each dot represented the OD value of one serum sample at 450 nm. The first number at y-axis (0.10) means 2.1 times the average OD value of negative controls, above which was considered as positive sample, otherwise negative. B. The mean \pm SE of positive controls, negative controls and serum samples collected at 30–60 days old are shown in Fig.1B.

标准包被浓度。

ELISA 方法简单描述如下: HSA 以包被液 (碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液, pH 9.6) 稀释至终浓度为 60 ng/100 μl , 包被平底 96 孔酶标板 (Lab-systems, USA), 100 μl /孔, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置过夜。用洗涤液 (PBS/0.05% 吐温-20, pH 7.2) 洗涤三次, 加 1% 明胶封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1–1.5 h。弃去封闭液, 洗涤 3 次后加稀释好的血清样本 (1:16 000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h。再次洗涤 3 次, 加入用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗鸡 IgG (1:400 稀释) (由中国农业大学实验动物研究所赵继勋教授惠赠), 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h。洗板后加入底物溶液 (3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺, TMB) (AMRESCO Inc. Ohio, USA), 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min, 加终止液 (2 mol 硫酸) 终止反应。通过酶联检测仪 (Reader OT 230, Anhos Labtee Instruments GmbH, Austria) 读取 450 nm 下每孔的吸光度。待测血清 OD 值大于阴性血清 OD 值的 2.1 倍时视为阳性值, 反之则为阴性值。

1.7 实验数据分析

所有实验数据采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计分析。数据用平均值 \pm 标准误表示。采用独立样本 *t* 检验 (双尾), Fisher 精确概率检验 (Fisher's Exact Test) 和非参数检验 (Mann-Whitney Test 和 Two-Sample Kolmogorov-Smirnov Test) 3 种方法分析数据, 除特别说明外均使用第一种方法。

2 结果

2.1 血管微注射接种 HSA 诱导鸡免疫耐受

共有 63 枚种蛋在孵化到 65–67 h 通过胚胎血管微注射的方式接种了 HSA, 注射剂量为 50 μg /枚。41 只小鸡孵化出雏, 孵化率为 65.08% (41/63)。31 只小鸡 (其中 10 只在饲养早期死亡) 在 20 日龄后用 HSA 再次免疫, 收集 30、40、50 和 60 日龄小鸡的血清样本进行 ELISA 检测, 结果如图 1。

如图所示, 小鸡在 30 日龄 (第 2 次免疫前) 时, 血液中未产生可检测得到的抗-HSA 抗体, 平

均 OD 值为 0.048 ± 0.001 ，全部样本均表现为阴性；40 日龄（第 3 次免疫前）时，平均 OD 值为 0.083 ± 0.009 ，其中 5 个样本表现为阳性，但大部分仍为阴性，比率为 83.87% (26/31)；50 日龄（第 4 次免疫前）时，平均 OD 值升高至 0.253 ± 0.042 ，阳性样本数量增加至 26 个，但大部分样本的 OD 值仍然很低，非常接近阴性标准值 (0.1)；60 日龄（第 4 次免疫后）时，没有发现阴性样本，平均 OD 值为 0.487 ± 0.049 ，但多数血清样本的 OD 值在 0.7 以下，只有 4 个样本的 OD 值较高，甚至超过阳性对照。

图 1 结果显示，血清中的抗体水平随着免疫次数的增加而升高，但在第 4 次免疫之后，阳性对照样本的 OD 值已达到 1 左右，而经过胚胎期接种抗原的小鸡的整体抗体应答水平仍然较低。最后一次血清样本的检测结果中（图 2），有 20 个样本的 OD 值在 0.5 以下，平均抗体应答为 0.337 ± 0.02 ，与阳性对照相比差异极其显著 ($P < 0.001$)，11 个样本的 OD 值在 0.5 以上，平均抗体应答为 0.759 ± 0.08 ，二者相比差异极显著 ($P < 0.001$ ，Mann-Whitney Test 和 Two-Sample Kolmogorov-Smirnov Test)，说明小鸡对抗原是部分耐受的，耐受率为 64.52% (20/31)。

表 1 接种方法对鸡胚孵化率的影响

Table 1 Effects of different inoculation methods on hatchability of eggs

接种方式	接种时间	孵化率% (出生数/死亡数)
Method of inoculation	Time of inoculation	Hatchability% (Number of survival/ number of death)
血管微注射		
Embryonic blood vessel microinjection	65–67 h	65.08 (41/63)
	3 d	83.33 (25/30)
	4 d	60 (18/30)
卵黄注射		
In ovo injection	5 d	73.33 (22/30)
	6 d	96.67 (29/30)
	7 d	93.33 (28/30)

2.2 卵黄注射接种 HSA 诱导鸡免疫耐受

卵黄注射实验在孵育的 3–7 d 根据不同的发育天数分五组进行，每组接种 30 枚种蛋，接种剂量为 $100 \mu\text{g}/\text{枚}$ 。除一组因抗原未处理好，只有 60% 的孵化率外，其余各组孵化率均在 70% 以上，

甚至高达 96.67%。血管微注射与卵黄注射各组小鸡孵化率统计于表 1。与血管微注射法相比，卵黄注射的平均孵化率显著提高 ($P = 0.013$ ，Fisher's Exact Test)。60、50 和 40 日龄小鸡血清中抗-HSA 抗体水平检测结果显示于图 3、图 4 和图 5。

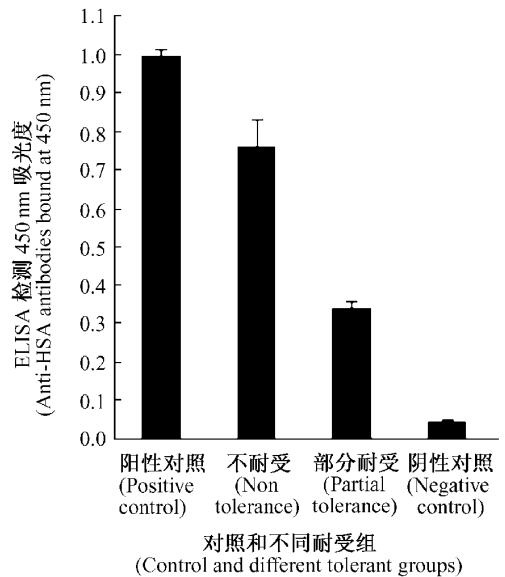


图 2 60 日龄血清 ELISA 检测结果分析 (平均值 ± 标准差)

实验过程与图 1 所述相同。小鸡血清样本 OD 值高于 0.5 时视为不耐受，低于 0.5 视为部分耐受。二者之间差异显著 ($P < 0.001$ ，Mann-Whitney Test 和 Two-Sample Kolmogorov-Smirnov Test)。

Fig. 2 Analysis of serum samples collected from 60-day-old chickens by ELISA (mean ± SE)

Experiments were performed as described in Fig. 1. All analyzed samples were classified according to OD values. Non tolerance: OD values > 0.5 , partial tolerance: OD values between 0.18–0.5. There was a significant difference between non-tolerant chickens and partially tolerant chickens ($P < 0.001$ ，Mann-Whitney Test and Two-Sample Kolmogorov-Smirnov Test)。

对 60 日龄（第 4 次免疫后）采集的血清样本的检测（图 3）发现，发育第 6 d 卵黄囊接种 HSA，平均抗体应答为 0.38 ± 0.027 ，与阳性对照相比差异显著 ($P < 0.001$)。第 5 d 接种组 (0.589 ± 0.064) 与阳性对照也有极显著的差异 ($P < 0.001$)，但与第 6 d 接种组也存在极显著差异 ($P = 0.002$)。应用 t-检验分析各组数据，在发育的第 3、4 和第 7 d 时，通过卵黄注射接种 HSA，对后期抑制应答的作用没有显著差异 ($P > 0.05$)，但与 5 d 和 6 d 组之间差异显著 ($P < 0.05$)。

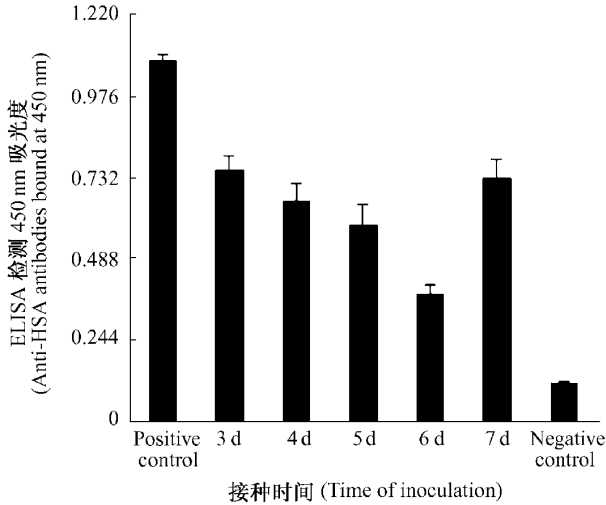


图 3 60 日龄血清 ELISA 检测结果分析 (平均值 \pm 标准差) 在胚胎发育到 3-7 d 时通过卵黄注射接种 HSA, 接种剂量为 100 μ g/枚。所检测样本为孵出的小鸡在 60 日龄时收集的血清样本。y 轴上第一个数值 (0.244) 为阴性样本的 2.1 倍, 高于此数值的样本视为阳性样本, 反之则为阴性样本。在孵育的第 6 d 接种抗原对抑制抗-HSA 抗体产生的效果最明显, 与其他组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig.3 Analysis of serum samples collected from 60-day-old chickens by ELISA (mean \pm SE)

Each embryo received 100 μ g of HSA by in ovo inoculation at 3-7 d of embryogenesis. Serum samples were collected at 60-d-old post hatch and detected by ELISA. The first number at y-axis (0.244) meant 2.1 times of average OD value of negative controls, above which was considered as positive sample, otherwise negative sample. Chickens inoculated with HSA at embryonation day 6 had significantly lower average antibody responses than those of inoculated during embryonation day 3, 4, 5, 7 ($P < 0.05$).

对 50 日龄血清样本的检测结果 (图 4) 表明, 7 d 接种组血清样本中抗体水平 (0.438 ± 0.05) 与 5 d 接种组相似 (0.411 ± 0.062), 而和 60 日龄的结果相比差异极显著 ($P = 0.001$), 其余各组 60 日龄与 50 日龄的检测结果则没有显著差异 ($P > 0.05$)。6 d 接种组小鸡在 50 日龄时的平均抗体应答为 0.189 ± 0.016 , 已低于阴性对照平均值的 2.1 倍 (0.244), 对抗原刺激表现为完全耐受。

40 日龄血清样本的检测结果 (图 5) 显示, 除 3 d 接种组仍表现为弱阳性外 (0.407 ± 0.047), 其余 4 组小鸡血清中的抗体水平基本呈现阴性, 平均抗体应答与阴性标准值相似。

总结以上结果, 卵黄注射接种抗原, 在第 6 d 时对抑制血清中抗-HSA 抗体产生的效果最为明显, 而在第 5 d 与第 7 d 接种虽然也能起到部分抑制抗体生成的作用, 但维持耐受的时间相对较短。

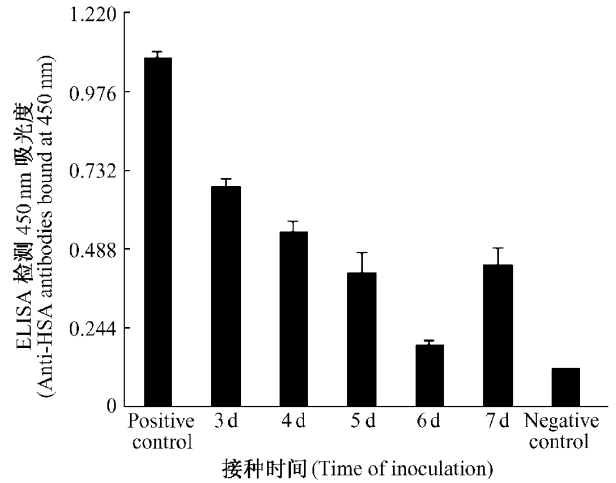


图 4 50 日龄血清样本 ELISA 检测结果分析 (平均值 \pm 标准差)

实验过程如图 3 所述。50 日龄各组小鸡血清中抗体水平整体低于 60 日龄, 7 d 接种组抗体水平显著降低 ($P < 0.001$), 而 6 d 组平均应答低于阴性对照的 2.1 倍, 整体表现为阴性。

Fig.4 Analysis of serum samples collected from 50-day-old chickens by ELISA (mean \pm SE)

Experiments were performed the same as in Fig.3. The average antibody responses of the five groups at 50-d-old were lower than those of at 60-d-old, and the chickens inoculated at embryonation day 7 had a significantly lower antibody response at 50-d-old than at 60-d-old ($P < 0.001$). The average antibody responses of chickens inoculated at embryonation day 6 was under 2.1 times the negative control, and thus were considered as complete tolerance to HSA.

3 讨论

Burnet (1959) 提出了抗体产生克隆选择学说, 认为免疫耐受可以通过将抗原引入新生发育期动物体内而诱导产生, 许多学者尝试将不同的蛋白抗原引入动物体内诱导免疫耐受的形成。抗原的引入是会引起应答还是诱导耐受取决于引入时个体的发育时期 (Bretscher and Cohn, 1970), 如果异源成分在早期引入处于发育中的免疫系统将诱导为耐受而不是应答。

在鸡免疫系统的发育过程中, 淋巴细胞前体可能起源于孵化 3 d 时主动脉附近的造血岛间充质细胞 (Dieterlen-Lièvre and Martin, 1981), 在第 7 d 的卵黄囊中也可发现这种前体细胞 (Moore and Owen, 1967)。通过对不同免疫球蛋白基因重排 (DJ_H , V_HDJ_H , $V_\lambda J_\lambda$) 的分子监控, 可以了解 B 淋巴细胞限定性前体的形成。在胚胎期的第 1-2 d

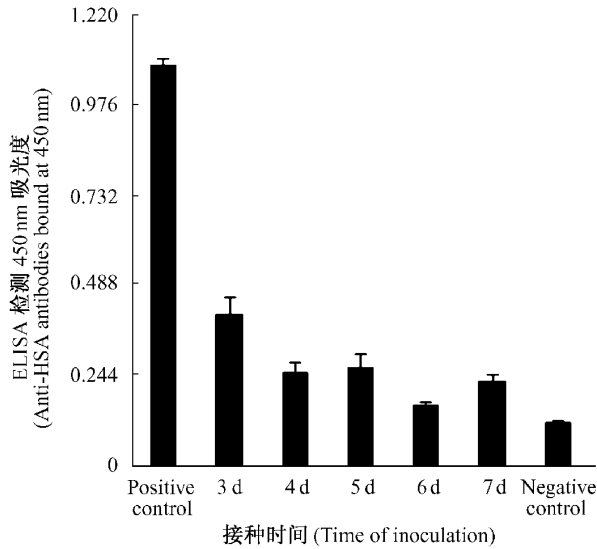


图5 40日龄血清样本ELISA检测结果分析(平均值±标准差)

实验过程如图3所述。除3d接种组外,其余4组平均OD值基本低于阴性对照的2.1倍(0.244),整体表现为阴性。

Fig.5 Analysis of serum samples collected from 40-day-old chickens by ELISA (mean ± SE)

Experiments were performed the same as described in Fig.3. The average antibody responses of chickens inoculated at embryonation day 4, 5, 6 and 7 were under or close to 2.1 times the negative control (0.244). Basically, there were no detectable anti-HSA antibodies in these chickens, and they were tolerant to HSA at 40-d-old.

或更晚些,胚胎循环中可以发现第一个有 V_HDJ_H 重排重链基因座的细胞(Reynaud et al., 1991, 1992)。采用PCR技术,分析鸡B细胞发育过程中的重链和轻链基因座的分布格局,结果显示 DJ_H 重排细胞出现在发育到5-6d的胚胎卵黄囊中(Reynaud et al., 1992)。因此,在B细胞前体的发育阶段引入外源蛋白,就有可能通过蛋白与正在进行基因重排的前体细胞的相互作用,进而影响这些细胞的发育分化方向,最终导致鸡对异源蛋白产生免疫耐受。

根据免疫细胞的发育和分布特点,在本研究中,采用血管微注射的方法,将HSA引入孵化65-67h的鸡胚中,并得到了免疫耐受鸡。在以前的研究中,还曾尝试在孵化到65-70h之间以同样的方式向鸡胚中接种牛乳酪蛋白(Casein)和牛血清白蛋白(BSA),同样得到了耐受鸡(未发表资料)。但是发现在65-67h阶段对耐受的诱导效果似乎更加明显,因此在本实验中我们直接选择65-67h作为抗原接种时间,结果64.52%的小鸡

表现出对HSA部分耐受,其体内抗-HSA抗体产生被明显抑制。我们也曾探索在发育到70-114h阶段用血管微注射的方法接种Casein诱导耐受,但是未能成功(Zhao et al., 2004)。在卵黄注射实验中,我们在孵化3-7d时向鸡胚卵黄囊中接种抗原,但是在第3、4d接种抗原,对诱导小鸡耐受的作用不明显,而在第5、6d接种,小鸡产生相应抗体的能力显著降低($P < 0.05$),表明在这个阶段向鸡胚卵黄囊接种抗原对后期抑制抗-HSA抗体的形成有明显的作用。在第7d接种组,血清中的抗体水平在50日龄时显著低于60日龄($P = 0.001$),这与以前向鸡胚卵黄囊中接种BSA诱导耐受的结果基本相符(未发表资料)。这些结果说明胚胎发育的特定时期对免疫耐受的诱导是十分关键的,与前面描述的鸡免疫细胞的发育和分布规律是一致的。

耐受的诱导并非局限于未成熟动物中,耐受或应答取决于抗原的剂量及其表现形式(Dresser and Mitchison, 1968; Weigle, 1973)。对生长期及成熟动物诱导免疫耐受需要大量的抗原并反复接种才能建立,而在出生后早期诱导耐受只需少量的抗原就可以产生免疫不应答(Burnet, 1977)。本实验在抗原剂量的选择上参考了Hraba et al. (1984)的实验结果,他将HSA通过静脉注射接种于新生小鸡,并发现100 μg的HSA接种于新生小鸡能够诱导免疫耐受。因此我们选择了50 μg的剂量以微注射的方式接种到鸡胚血管中,100 μg的剂量以卵黄注射的方式接种到鸡胚卵黄囊中。实验结果也证明了以上选择的抗原剂量能够诱导免疫耐受的产生。抗原的物理状态对于成年鸡的免疫作用是重要的,在溶液状态下具有更好的免疫原性(Klipper et al., 2001)。为了在后期二次免疫时对照组小鸡能够产生正常的免疫反应,蛋白抗原是以溶液状态接种的。

并非所有在胚胎期接种抗原的小鸡都能特异性的对抗原耐受,也有部分小鸡仍能达到和阳性对照鸡相似的抗体水平,出现这样的结果可能与个体差异有关。虽然每一次接种都是在同一孵育阶段进行的,但同一批种蛋即使在同样的孵化条件下发育状态也存在差异,因此对某些个体的注射时间与诱导耐受的最佳时期可能存在一定的偏差。但是目前还无法找到可以诱导耐受形成的最佳时期及最显著特征,也无法保证所有在胚胎期接种过的小鸡都可以产生耐受,因此今后的研究将集中在确定诱导耐受

形成的最显著特征上, 这个特征可能并不单纯以孵育的时间为标准, 还需辅以其他胚胎发育特征综合判定诱导耐受的的最佳发育时期。

研究表明, 免疫耐受的维持需要抗原持续性地刺激, 已经形成的耐受也可能被消除 (Weigle, 1973; Smith, 1961; Mitchison, 1964)。小鸡在出生 20 d 后, 母源抗体会逐渐消失 (阴天榜、刘兴友, 1999), 此时用同种抗原再次接种, 经过 4 次免疫后收集血清样本时, 小鸡已生长到 2 月龄左右。结果显示, 无论胚胎期采取何种接种方式, 出生后的小鸡再次接触抗原时仍能产生耐受。对前几次免疫间期收集的的血清样本的检测也表明, 小鸡抗-HSA 抗体水平是随着不断加强免疫而升高的, 且非耐受鸡抗体水平较耐受鸡的增加更快。对比前人的研究结果 (一般只检测到一月龄左右) (Klipper et al., 2001; Zhang and Sharma, 2003; Hraba et al., 1984), 这是迄今为止的相关报道中跟踪检测耐受期最长的结果。

综上所述, 我们的研究结果表明特异性的免疫耐受是可以通过在胚胎发育早期接种异源抗原诱导的。采用胚胎血管微注射的方法, 在胚胎发育到 65~67 h 接种 HSA, 孵化的小鸡再次接触抗原时, 有 64.52% 的耐受率, 其血清中抗-HSA 抗体的产生显著低于阳性对照组, 但是微注射对胚胎的损伤较大, 成活率相对降低。采用卵黄注射的方式诱导耐受的的最佳接种时间为胚胎发育的第 6 d, 孵化的小鸡对抗原刺激表现出较好的耐受性, 使用卵黄注射接种抗原, 对胚胎的损伤小, 成活率高, 操作难度小, 有望应用于生产。

在今后的研究中, 我们将会进一步确定诱导耐受形成的最显著生物学特征, 并尝试将这种在胚胎发育早期接种抗原诱导耐受的方法应用于基因修饰细胞的移植研究中。

参考文献 (References)

Bretscher P, Cohn M, 1970. A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 169: 1 042-1 049.
 Burnet FM, 1977. *Immunology*. I. Antibody and lymphocyte. Nikkei Science: 1-224.
 Burnet FM, 1959. *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. Cambridge: The Cambridge University Press.

Dieterlen-Lièvre F, Martin C, 1981. Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Dev. Biol.* 88: 180-191.
 Dresser DW, Mitchison NA, 1968. The mechanism of immunological paralysis. *Adv. Immunol.* 8: 129-182.
 Hraba T, Karakoz I, Madar J, Blaszczyk B, Gieldanowski J, 1984. Induction of tolerance in chickens by low doses of human serum albumin administered after hatching. *Folia Biol. (Praha)* 30: 276-280.
 Hraba T, Karakoz I, Madar J, 1977. Attempts to characterize cellular mechanisms of immunologic tolerance to HSA in chickens. *Folia Biol. (Prague)* 23: 336-346.
 Hraba T, Ivanyi J, 1963. A contribution to the study of immunological tolerance to protein antigen in the chickens. *Folia Biol. (Prague)* 9: 354-363.
 Ivanyi J, Salerno A, 1972. Cellular mechanisms of escape from immunological tolerance. *Immunology* 22: 247-257.
 Klipper E, Sklan D, Friedman A, 2001. Response, tolerance and ignorance following oral exposure to a single dietary protein antigen in *Gallus domesticus*. *Vaccine* 19: 2 890-2 897.
 Mitchison NA, 1964. Induction of immunological paralysis in two zones of dosage. *Proc. R. Soc. Med.* 161: 275-292.
 Mohammed SM, Morrison S, Wims L, Trinh KR, Wildeman AG, Bonselaar J, Etches RJ, 1998. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology* 4: 115-125.
 Moore MAS, Owen JJT, 1967. Chromosome marker studies in the irradiated chick embryo. *Nature* 215: 1 081-1 082.
 Peterson RDA, Alm GV, Michalek S, 1971. The effect of bursectomy on the recovery from immunologic tolerance. *J. Immunol.* 106: 1 609-1 614.
 Reynaud CA, Imhof BA, Anquez V, Weill JC, 1992. Emergence of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo. *EMBO J.* 12: 4 349-4 358.
 Reynaud CA, Anquez V, Weill JC, 1991. The chicken D locus and its contribution to the immunoglobulin heavy chain repertoire. *Eur. J. Immunol.* 21: 2 661-2 670.
 Smith RT, 1961. Immunological tolerance of nonliving antigens. *Adv. Immunol.* 1: 67-129.
 Stevens KM, Pietryk HC, Ciminera JK, 1958. Acquired immunological tolerance to protein antigen in chickens. *Brit. J. Exp. Pathol.* 39: 1-7.
 Weigle WO, 1973. Immunological unresponsiveness. *Adv. Immunol.* 16: 61-123.
 Wolfe HR, Tempelis C, Mueller A, Reibel S, 1957. Precipitin production in chickens. X VII. The effect of massive injections of bovine serum albumin at hatching on subsequent antibody production. *J. Immunol.* 79: 147-153.
 Yin TB, Liu XY, 1999. *Poultry Immunology*. Beijing: China Agricultural Scientific and Technological Press, 3 (In Chinese).
 Zhang Y, Sharma JM, 2003. Immunological tolerance in chickens hatching from eggs injected with cell-associated herpesvirus of Turkey (HVT). *Dev. Comp. Immunol.* 27: 431-438.
 Zhao C, Li Z, Song C, Wang XP, Sha J, Han HT, Li ZD, 2004. Induction of immune-tolerance in chickens by injecting exogenous antigen into embryonic blood vessel during embryogenesis. X XII World's Poultry Congress, 178.
 阴天榜, 刘兴友, 1999. 家禽免疫学. 北京: 中国农业科技出版社, 3.