

生长抑素 DNA 疫苗对湖羊羔羊生长和相关激素的作用——佐剂效应

薛春林^{1,3}, 茆达干¹, 杨利国^{1,2*}, 王勇⁴

(1. 南京农业大学动物繁育研究所, 江苏 南京 210095; 2. 华中农业大学动物科技学院, 湖北 武汉 430070;
3. 盐城市畜牧兽医站, 江苏 盐城 224002; 4. 江苏省畜牧兽医总站, 江苏 南京 210080)

摘要: 选择 60 只断奶湖羊母羔羊, 分为 6 组, 1~5 组为免疫组, 分别用 pES/2SS + pE-CpG、pES/2SS + 细菌 DNA、pES/2SS-GMCSF、pES/2SS 脂质体和 pES/2SS 免疫, 第 6 组为对照组。结果显示, 首次免疫 4 周和加强免疫 2 周后, 细菌 DNA 佐剂组的抗生长抑素抗体水平显著高于 pES/2SS 单独免疫组 ($P < 0.05$), 其抗体阳性率也最高, 达 50%。比较全期 14 周免疫羊的体质量增加情况, 最优为 pE-CpG 佐剂组, 其次为细菌 DNA 佐剂组, 分别比对照组高 33.0% 和 31.6% ($P < 0.01$), 且显著高于 pES/2SS 单独免疫组 ($P < 0.05$)。加强免疫 2 周后, 免疫组 GH 和 IGF-I 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 抗体阳性羊的 GH 和 IGF-I 水平极显著高于抗体阴性羊 ($P < 0.01$)。结果表明: 几种佐剂配合 pES/2SS 免疫, 产生了免疫佐剂效应, 能增强生长抑素 DNA 疫苗的免疫效果。

关键词: 生长抑素; 基因疫苗; 佐剂; 湖羊; 生长; 相关激素

中图分类号: S811.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2007) 02-0089-05

Effect of the somatostatin DNA vaccine on growth and relative hormones in Hu lambs: adjuvant effect

XUE Chun-lin^{1,3}, MAO Da-gan¹, YANG Li-guo^{1,2*}, WANG Yong⁴

(1. Research Institute of Animal Breeding and Reproduction, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2. College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
3. Institute of Yancheng Animal Husbandry and Veterinary, Yancheng 224002, China;
4. Institute of Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary, Nanjing 210080, China)

Abstract: Sixty female Hu lambs were divided into six groups to immunized with different adjuvant such as the pE-CpG plasmid, *E. coli* DH5 α , the crude liposome were combined with pES/2SS, pES/2SS-GMCSF, pES/2SS and the control group. The results showed that the level of antibody of immunized group was remarkably increased compared with the control ($P < 0.05$). The antibody against SS in the *E. coli* DH5 α group was remarkably higher than that in the pES/2SS alone at week 4 after primary immunization and week 2 after booster. The sheep immunized with the *E. coli* DH5 α group got the highest rate of positive antibody (50%). During the whole experimental period (14 weeks), body weight gains in the pE-CpG and the *E. coli* DH5 α groups were 33.0% and 31.6%, respectively, which were higher than that of the control ($P < 0.01$) and pES/2SS alone ($P < 0.05$). Two weeks after the booster, the level of serum GH and IGF-I in the immunized group were remarkably higher than those in the control ($P < 0.05$), and those with positive antibody higher than negative antibody ($P < 0.01$). These results suggest that different adjuvant are combined with pES/2SS, can produce immunity adjuvant affect, have an enhancement effect on the SS DNA vaccine.

Key words: somatostatin; DNA vaccine; adjuvant; Hu Sheep; growth; relative hormones

探索安全、高效的促生长新技术, 是当前畜牧生产的主要目标。某些外源激素虽具有促生长作用^[1], 但存在安全隐患。利用免疫学原理开发促进动物生长的新方法, 可以有效消除和减轻有毒、有害物质残留问题。应用生长抑素 (somatostatin, SS) 抗血清被动免疫或用化学合成 SS 主动免疫动物, 均能取得显著的增加体质量效果^[2-3]。由痘苗病毒表达的 SS 基因工程苗免疫中国美利奴羊体质量

收稿日期: 2006-01-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270959); 上海市科技兴农重点攻关项目 (农科攻字 (2002) 第 1-3-6 号)

作者简介: 薛春林, 研究员, 博士, 主要从事动物生物技术研究, E-mail: xuechunlin_1965@yahoo.com.cn。* 通讯作者: 杨利国, E-mail: ylg@mail.hzau.edu.cn。

增加 23.5%^[4]，但重组痘苗病毒作为活载体苗，初次免疫后动物体内产生抗病毒抗体，导致再次免疫时病毒不能大量复制而影响免疫效果；并且还存在着减毒病毒毒力回升的风险^[5-6]。生长抑素基因免疫，是生长抑素主动、被动免疫及其基因工程苗研究的新发展。生长抑素融合表达质粒 pES/2SS 等在试验鼠体内能够表达并产生抗生长抑素抗体，且荧光质粒 pEGS/2SS 显示在其试验动物体内表达、分布方面具有较好的安全性^[7]。

在生长抑素常规主动免疫中，免疫效果会因不同受试动物而不同^[8]，而基因免疫在不同遗传背景动物体内的免疫效果差异很大^[9]。生长抑素 DNA 疫苗免疫对大动物生产性能的影响还未见报道。本研究以绵羊作为试验对象，旨在比较 CpG、细菌 DNA 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GMCSF）等佐剂对生长抑素基因免疫湖羊的免疫增强和促生长及内分泌调节作用，为生长抑素基因免疫奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

生长抑素真核表达质粒 pES/2SS 由曹少先博士等^[7]构建：即生长抑素（SS）与乙肝表面抗原（S）基因融合，然后亚克隆进载体 pEGFP-N₁ 中；pE-CpG 和 pES/2SS - GMCSF 质粒由笔者构建；*E. coli* DH5 α 为本研究所保存；生长抑素标准抗原为驴抗羊酶标二抗，Sigma 公司产品。

1.2 DNA 疫苗及 CpG 制备

按文献 [10] 方法制备 pES/2SS、pE-CpG 和 pES/2SS - GMCSF；常规方法提取 *E. coli* DH5 α DNA，反复冻融数次，纯化并定量。

1.3 试验动物分组及免疫

60 只 73 ~ 90 日龄纯种母湖羊，空腹称体质量，根据质量均衡的原则编号后随机分为 6 组，每组 10 只。第 1、2、3、4 和 5 组为免疫组（T1 ~ T5），分别经股四头肌采用 3 点法注射：pES/2SS + pE-CpG（T1）、pES/2SS + 细菌 DNA（T2）、pES/2SS - GMCSF（T3）、pES/2SS + 脂质体（T4）、pES/2SS（T5），每只 4 mL，含免疫原和佐剂均 0.4 mg；第 6 组为对照组（C）仅注射 4 mL 生理盐水。初次免疫 4 周后以相同剂量加强免疫 1 次。每次免疫前 24 h 于相同部位注射 0.25% 盐酸利多卡因 4 mL 进行预处理。分别在免疫后 0、2、4、6、10 和 14 周同一时段，颈静脉采血，分离血清，-20 °C 保存待测。

1.4 测定项目

1.4.1 抗体检测 采用本研究所建立的 ELISA 方法，即以人工合成的生长抑素为包被抗原，羊血清稀释 50 倍，检测血中抗生长抑素抗体水平。以 P/N 值大于 2 为阳性^[11]，其中 P 为待测血样的吸光值 (A_{450})， N 为阴性对照血样吸光值。

1.4.2 激素检测 应用放射免疫双抗测定法测定血清中生长激素（GH）和胰岛素样生长因子（IGF -I）含量。GH 检测试剂盒为北京福瑞生物工程公司产品，灵敏度小于 $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，变异系数小于 9%；IGF -I 检测试剂盒为天津九鼎医学生物工程有限公司产品，灵敏度小于 $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，变异系数小于 8%。

1.5 数据分析

用 SPSS 进行统计分析，所有数据均以 $\bar{x} \pm SD$ 表示。用方差分析法分析组间差异后进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 湖羊血中生长抑素抗体水平

生长抑素重组质粒配合各种基因佐剂免疫湖羊，首次免疫后第 2 周开始，血清中均能检出抗生长抑素抗体，且随着时间的延长，抗体水平升高；到免疫后第 6 周，抗生长抑素抗体达最高水平，其中加细菌 DNA 的 T2 组显著高于不加佐剂的 T5 疫苗组，然后各组抗体水平开始下降。各免疫组都有类似规律，但以 T2、T3 和 T1 组的免疫反应最强烈（图 1）。

分析各组湖羊基因免疫处理后不同时期的抗体阳性率和最大免疫反应（ P/N 值），发现以 T2 组最好，T1 和 T3 居次，T4 和 T5 较差。特别是 T2 和 T1 组，在免疫后第 6 周，血清中抗生长抑素抗体阳性个体比例分别达 50% 和 40%，阳性个体最大 P/N 值分别达 4.68 和 3.02（表 1）。

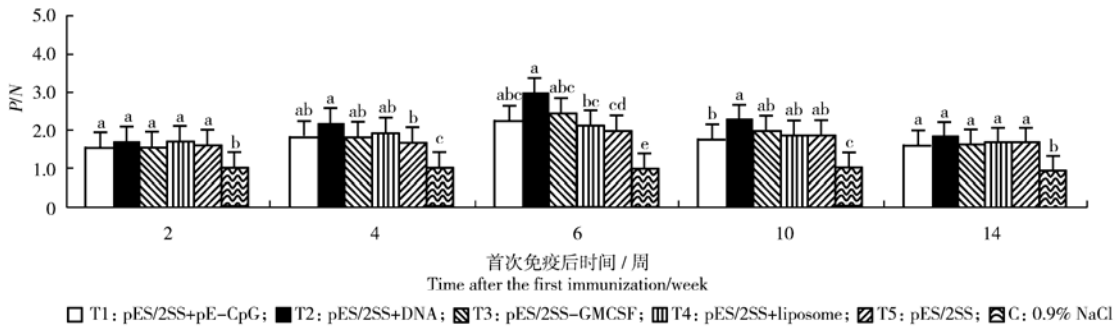


图1 血浆中抗生长抑素抗体 P/N 值

Fig. 1 P/N value of antibody against SS in serum

小写字母不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)。Values with different letters indicate $P < 0.05$. The same as below.

表1 免疫各组的抗体阳性湖羊比较

Table 1 Comparison of Hu Sheep with positive antibody against SS in different groups

组别 Group	首次免疫后时间/周 Time after the first immunization									
	2		4		6		8		10	
	R/%	M	R/%	M	R/%	M	R/%	M	R/%	M
T1	10.0 ^a	2.26	20.0 ^{ab}	2.47	40.0 ^{ab}	3.02	30.0 ^a	2.28	20.0 ^{ab}	2.11
T2	20.0 ^a	2.45	30.0 ^a	3.13	50.0 ^a	4.68	30.0 ^a	4.45	30.0 ^a	2.25
T3	10.0 ^a	2.07	20.0 ^{ab}	2.65	30.0 ^{ab}	4.82	20.0 ^a	2.72	10.0 ^b	2.04
T4	10.0 ^a	2.22	20.0 ^{ab}	3.61	30.0 ^{ab}	3.08	20.0 ^a	2.96	10.0 ^b	2.06
T5	10.0 ^a	2.06	10.0 ^b	2.58	30.0 ^{ab}	2.57	20.0 ^a	2.39	10.0 ^b	2.24

注：R 表示阳性率，M 表示抗体最大 P/N 值。R indicates the ratio of positive immune response, M indicates the maximum of P/N value.

2.2 生长抑素基因免疫对湖羊 GH 的影响

分析生长抑素基因免疫湖羊后血清中 GH 水平，发现初次免疫后第 2 周，T2、T4 和 T5 组显著高于 T1、T3 和对照组 ($P < 0.05$)。免疫后第 6 周，各试验组的 GH 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$)，佐剂组与不加佐剂的疫苗组间差异不显著 ($P > 0.05$)。T1、T3 组的 GH 含量都显著高于免疫前水平 ($P < 0.05$)。免疫后第 10 周，GH 的含量与加强免疫后第 6 周差异不显著 ($P > 0.05$)，图 2)。

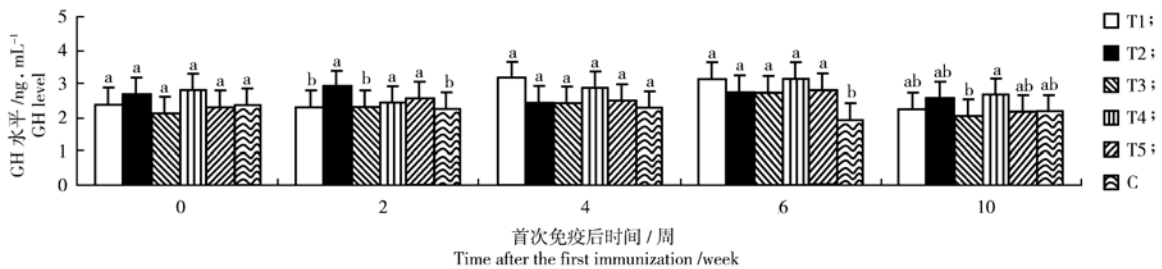


图2 生长抑素基因免疫前后羔羊血清 GH 水平

Fig. 2 GH level in serum of lambs before and after SS gene immunization

分析各免疫组抗 SS 抗体阳性羊与抗体阴性羊血清 GH 水平，发现首次免疫后，抗体阳性羊和抗体阴性羊的 GH 含量均有微量上升，但两者差异不显著 ($P > 0.05$)。免疫后第 6 周，抗体阳性羊的 GH 含量极显著高于抗体阴性羊 ($P < 0.01$)，而抗体阴性羊又高于对照 ($P < 0.05$)。免疫后第 10 周 GH 含量开始下降，两者 GH 水平差异不显著 ($P > 0.05$)，图 3)。

2.3 生长抑素基因免疫对湖羊 IGF - I 的影响

初次免疫后第 2 周，免疫组的 IGF - I 与对照组比略高 ($P > 0.05$)。免疫后第 6 周，IGF - I 含量达到峰值，免疫组 (除 T4 组外) 血浆中 IGF - I 含量与对照组相比，差异显著 ($P < 0.05$)。佐剂组与不加佐剂的疫苗组之间比较，差异不显著 ($P > 0.05$)。免疫后 10 周，免疫组血浆中 IGF - I 含量有所下降，但

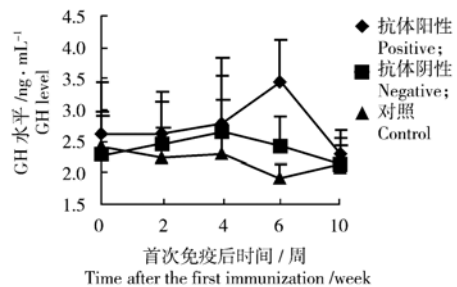


图3 抗体阳性羊与抗体阴性羊血清 GH 水平

Fig. 3 GH level in serum of lambs with positive and negative antibody against SS after SS immunization

T2、T3 组仍显著高于对照组 ($P < 0.05$, 图4)。

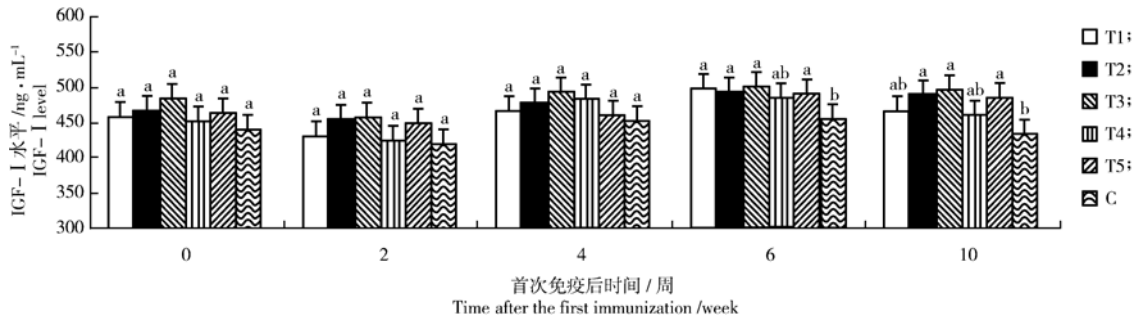


图4 生长抑素基因免疫前后羔羊血清 IGF-I 水平

Fig. 4 IGF-I level in serum of lambs before and after SS gene immunization

分析抗体阳性羊与抗体阴性羊血清中 IGF-I 水平, 发现首次免疫后第 6 周, 抗体阳性羊血清中 IGF-I 含量极显著高于阴性羊 ($P < 0.01$), 而抗体阴性羊与对照相比, 差异不显著 ($P > 0.05$); 至免疫后第 10 周, IGF-I 水平逐步下降, 两者差异不显著 ($P > 0.05$, 图5)。

2.4 生长抑素基因免疫对湖羊羔羊生长的影响

首次免疫后 2 周, 免疫各群体质量增加最多的是 T3 组, 其次为 T1 组, 分别比对照组提高 67.0% ($P < 0.01$) 和 53.4% ($P < 0.01$)。在初次免疫后 6 周, 增长速度最快的是 T2 组, 其次为 T3 组, 比对照组提高 43.7% 和 41.7%。全期即初次免疫后 14 周, 加佐剂的疫苗组显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其中体质量增加最多的是 T1 和 T2 组, 分别比对照组提高 33.0% 和 31.6% ($P < 0.01$), 且显著高于不加佐剂的 T5 组 ($P < 0.05$, 表2)。

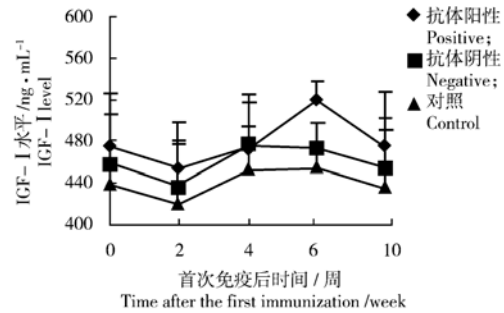


图5 抗体阳性羊与抗体阴性羊血清 IGF-I 水平
Fig. 5 IGF-I level in serum of lambs with positive and negative antibody against SS after immunization

表2 生长抑素基因免疫对羔羊性能的影响

Table 2 Body weight gain of lambs after SS gene immunization

组别 Group	首次免疫后时间/周 Time after the first immunization					
	2		6		14	
	体质量增加/kg Weight gain	增加率/% Gain percent	体质量增加/kg Weight gain	增加率/% Gain percent	体质量增加/kg Weight gain	增加率/% Gain percent
T1	1.35 ± 0.43 ^{ab}	153.4	4.40 ± 0.59 ^{ac}	126.4	11.88 ± 1.15 ^a	133.0
T2	1.25 ± 0.62 ^{ab}	142.0	5.00 ± 0.83 ^a	143.7	11.75 ± 1.66 ^a	131.6
T3	1.47 ± 0.58 ^a	167.0	4.93 ± 2.10 ^a	141.7	10.83 ± 1.27 ^{ac}	121.7
T4	1.06 ± 0.45 ^{ab}	120.5	3.86 ± 0.87 ^{bc}	110.9	10.88 ± 1.27 ^{ac}	121.8
T5	1.15 ± 0.64 ^{ab}	130.7	4.08 ± 0.78 ^{bc}	117.2	9.05 ± 1.67 ^{bc}	101.3
C	0.88 ± 0.48 ^b	100.0	3.48 ± 1.01 ^b	100.0	8.93 ± 1.46 ^b	100.0

3 讨论

3.1 佐剂对生长抑素基因免疫湖羊免疫应答的影响

乙肝表面抗原基因作为一种载体蛋白基因, 已使许多目的基因表达产物获得了很好的免疫原性^[12]。用该融合表达质粒免疫绵羊, 成功地检测到抗生长抑素抗体, 表明融合到乙肝表面抗原上的生长抑素基因能够在绵羊体内表达, 且表达产物具有生长抑素免疫学活性。CpG DNA 和 GMCSF 佐剂能够增强 DNA 疫苗的免疫应答^[13-14]。茆达干等^[15]应用细菌 DNA 和 *gm-csf* 编码载体协同抑制素基因免疫小鼠, 结果两种佐剂都能增强抑制素基因的免疫效果。本试验中, 加 CpG DNA 佐剂组及 GMCSF 佐剂组, 均产生了高于单独疫苗组的免疫应答, 显示出增强 SS 基因疫苗的免疫佐剂效应。比较而言, 所提取的 *E. coli* DH5 α 细菌 DNA 为较佳的疫苗佐剂。

脂质体有利于外源基因导入细胞, 但脂质体价格昂贵, 本试验用脂质体粗品, 价格低廉, 在生产应用中有一定的推广价值。Pi 盐酸普鲁卡因处理后, 给小鼠肌肉注射 HBsAg 质粒, 获得了高滴度的抗体,

其效果比基因枪的效果还好^[16]。因为大动物的结缔组织比较丰富,本试验中,每次免疫前 24 h 于疫苗注射相同部位注射盐酸利多卡因进行预处理,以提高疫苗的转染效率。

3.2 佐剂对生长抑素基因免疫湖羊生长的影响

SS 主动免疫能够促进动物生长^[2]。SS 免疫对生长缓慢、非培育品种和雌性动物影响显著^[17]。同时,除了适宜的免疫原外,采用适当的免疫程序对维持有效的免疫应答是必要的,而这也可能是影响质量增加效果的重要因素^[18]。本研究选择我国地方优良品种湖羊母羔羊作为受试动物,用生长抑素基因疫苗免疫,各佐剂组通过增强抗体反应,提高体质量增加效果。

3.3 佐剂对生长抑素基因免疫湖羊外周血中 GH 和 IGF-I 的影响

Varner 等^[19]在对羔羊 SS 的免疫时发现 GH 基线和总体水平较对照有显著的增加, GH 分泌的峰强度也有一定程度的提高 ($P > 0.05$)。SS 免疫动物也可增加 IGF-I 和甲状腺素水平^[20]。一般而言, SS 免疫对激素水平的影响往往变化较大。本试验中加强免疫后 2 周, SS 抗体 P/N 值在达到峰值后, GH 和 IGF-I 上升较快,提示 SS 基因免疫产生的 SS 抗体,有效中和了内源性 SS,影响了相关激素的分泌。比较各佐剂组与不加佐剂的疫苗组的 GH 和 IGF-I 水平,差异均不显著。抗体阳性羊与抗体阴性羊 GH 和 IGF-I 水平之间差异显著。

参考文献:

- [1] Campbell R G, Steele N C, Caperna T J, et al. Interrelationships between energy intake and endogenous porcine growth hormone administration on the performance body composition and protein and energy metabolism of growing pigs weighing 25 to 55 kilograms live weight [J]. *J Anim Sci*, 1988, 66: 1643-1655
- [2] Spencer G S G, Williamson E D. Increased growth in lambs following immunization against somatostatin: preliminary observations [J]. *Animal Production*, 1981, 2: 376-378
- [3] Maccacchini M-L. Promoting animal growth using antibody against somatostatin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 76(1): 343-347
- [4] 蔡云珠,周建斌,邵长发,等. 激生 I 号免疫中国美利奴羊的增重试验 [J]. *畜牧与兽医*, 2000, 32(3): 25-26
- [5] 曾义祥,杜念兴. 生长抑制激素基因在大肠杆菌中的表达 [J]. *遗传学报*, 1991, 18(3): 282-288
- [6] 徐文忠,杜念兴,李光地,等. 促进动物生长的新型基因工程疫苗研究 [J]. *中国科学 B 辑*, 1993, 23(12): 1272-1278
- [7] 曹少先,杨利国,茆达干,等. 生长抑素 DNA 疫苗 pEGS/2SS 在大鼠体内的表达与分布 [J]. *南京农业大学学报*, 2005, 28(2): 137-139
- [8] Holder A T, Aston R, Flint D J. Potential of immunization for increasing animal production [J]. *J Agric Sci*, 1991, 116: 175-181
- [9] Uter M, Lew A M, Grob P, et al. BAC-AC, a novel generation of DNA vaccines: bacterial artificial chromosome (BAC) containing a replication-competent, pack-aging-defective virus genome induces protective immunity against herpes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(22): 12697-12702
- [10] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,2002
- [11] 杨利国,胡少昶,魏平华,等. 酶免疫测定技术 [M]. 南京:南京大学出版社,1998
- [12] 茆达干,杨利国,曹少先,等. 卵泡抑制素与乙肝表面抗原融合基因表达质粒的构建及表达 [J]. *中国免疫学杂志*, 2003, 19(11): 775-778
- [13] Sato Y, Roman M, Tighe H, et al. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization [J]. *Science*, 1996, 273: 352-354
- [14] Mellstedt H, Fagerberg J, Frodin J E, et al. Augmentation of the immune response with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other hematopoietic growth factors [J]. *Curr Opin Hematol*, 1999, 6(3): 169-175
- [15] 茆达干,吴结革,杨利国,等. 细菌 DNA 和 *gm-csf* 基因对抑制素基因免疫的作用 [J]. *南京农业大学学报*, 2006, 29(4): 139-142
- [16] 张晓梅,周玲,刘海鹰. HBsAg 基因免疫条件优化的比较 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1997, 11(3): 293-296
- [17] Deligeorgis S G, Rogdakis E, Mentzios A, et al. A note on the effect of active immunization against somatostatin on milk production and growth in sheep [J]. *Anim Prod*, 1988, 46: 304-308
- [18] Spencer G S G, Garssen G J, Hart I C. A novel approach to growth promotion using autoimmunization against somatostatin. I. Effects on growth and hormone levels in lambs [J]. *Liverst Prod Sci*, 1983, 10: 25-37
- [19] Varner M A, Davis L, Reeves J J. Temporal serum concentrations of growth hormone, thyrotropin, insulin glucagon in sheep immunized against somatostatin [J]. *Endocrinology*, 1980, 106: 1027-1032
- [20] Dubreuil P, Petitclerc D, Gaudreau P, et al. Effect of growth hormone-releasing factor infusion on somatotropin, prolactin, ghrelin, insulin, insulin-like growth factor I and blood metabolites in control and somatostatin-immunized growing pigs [J]. *Anim Endocrinol*, 1991, 8: 307-321