

壳聚糖纳米颗粒包裹猪白细胞介素 2 和融合白细胞介素 4/6 基因 对猪圆环疫苗免疫的强化

陈祎^{1#}, 宋婷玉^{1#}, 李金海^{2#}, 肖永乐¹, 曾光志², 万小平¹, 杨璐一¹, 方鹏飞^{2*}, 王泽洲^{3*}, 高荣^{1*}

(1. 四川大学生命科学学院, 生物资源与环境重点实验室, 动物疾病防控和食品安全四川省重点实验室, 成都 610064;
2. 四川省华派生物制药有限公司, 成都 610026; 3. 四川省动物疫病预防控制中心, 成都 610035)

摘要: 目的 探讨猪融合白细胞介素 4/6 和猪白细胞介素 2 基因的共表达对仔猪免疫应答的影响, 为进一步研制新型免疫调节剂来加强猪抵御断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)奠定基础。**方法** 将猪融合白细胞介素 4/6 和猪白细胞介素 2 基因的共表达重组质粒, 用壳聚糖材料包裹制成纳米颗粒, 记作 VRIL4/6-2-CS。将仔猪分为 2 组, 分别肌肉注射 VPIL4/6-2-CS 和生理盐水, 2 组均同时接种 PCV-2 疫苗, 在接种后的第 0、7、14、28 天采集血样并分析免疫变化。**结果** 接种 VPIL4/6-2-CS 的仔猪血清中的 IgG2a 抗体数量和血液中 CD4⁺, CD8⁺ T 淋巴细胞数量均显著高于对照组($P<0.05$); 同时, VPIL4/6-2-CS 接种组仔猪的 IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , TLRs(TLR-2, 7)基因表达水平也显著高于对照组($P<0.05$)。尽管 2 组之间 PCV-2 特异性抗体的含量并无显著差别, 但是实验组仔猪的生长速率显著高于对照组($P<0.05$)。**结论** VPIL4/6-2 能促进仔猪对 PCV-2 疫苗的免疫应答, 是一种安全有效的免疫佐剂。

关键词: 猪; 基因共表达; 白细胞介素 2; 融合白细胞介素 4/6; 免疫; PCV-2 疫苗

中图分类号: Q78

文献标志码: A

Enhancement of Immune Responses to PCV-2 Vaccine by Porcine IL-2 and Fusion IL-4/6 Gene Entrapped in Chitosan Nanoparticles

CHEN Yi^{1#}, SONG Tingyu^{1#}, LI Jinhai^{2#}, XIAO Yongle¹, ZENG Guangzhi², WAN Xiaoping¹, YANG Luyi¹, FANG Pengfei^{2*}, WANG Zezhou^{3*}, GAO Rong^{1*}

(1. Key Laboratory for Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry Education, Key Laboratory for Animal Disease Prevention and Food Safety of Sichuan Province, Life Sciences College, Sichuan University, Chengdu 610064, China.
2. Sichuan Huapai Biopharmaceutical company, Chengdu 610026, China; 3. Center for Animal Disease Control of Sichuan Province, Chengdu 610035, China)

Abstract: Objective In order to develop a novel effective immunomodulator to enhance pig resistance against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), we used the recombinant plasmid co-expressing the pig interleukin-2 (IL-2) and fusion interleukin-4/6 (IL-4/6) proteins which we constructed before, and studied its effect on immune response of piglets. **Methods** The recombinant plasmid was first encapsulated in chitosan (CS) nanoparticles by the ionotropic gelation method, and generated VRIL4/6-2-CS. Then piglets were divided into two groups and intramuscularly injected with VPIL4/6-2-CS or saline followed by the injection of PCV-2 (pig circovirus-2) vaccine, respectively. The blood was collected from each piglet on days 0, 7, 14 and 28 to assay the immunological changes. **Results** The number of IgG2a, CD4⁺, CD8⁺ T cells increased significantly in the sera or blood of piglets that treated with VPIL4/6-2-CS ($P<0.05$). Furthermore, the expression levels of IL-2, IL-4, IL-6, TLRs (TLR-2, 7), STATs (STAT1, 2, 3) and TNF- α genes elevated significantly in the piglets that treated with VPIL4/6-2-CS for over 28 days ($P<0.05$). Although no significant differences were observed in the levels of PCV-2-specific antibody, the growth performance of VPIL4/6-2-CS treated piglets was remarkably improved in comparison with that of control ($P<0.05$). **Conclusion** VRIL-4/6-2 entrapped in CS is a promising effective adjuvant to promote the immune responses of pig vaccinated with PCV-2.

Keywords: piglet; gene co-expression; IL-2; fusion IL-4/6; immunity; PCV-2 vaccine

猪圆环病毒 2 型(PCV-2)是一种小的无包膜单链 DNA 病毒, 属于圆环病毒科(Gillespie *et al.*, 2009)。PCV-2 是猪圆环病毒相关疾病(PCVAD)的主要病原菌, 其中包括断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)、猪皮炎与肾病综合征(PDNS), 和猪呼吸道疾病综合征(PRDC)(Allan *et al.*, 2004; Chae, 2005; Segalés *et al.*, 2005)等。PCV-2 感染存在

收稿日期: 2017-03-30

接受日期: 2017-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871855); 科技部国际合作项目(2011DFA10101103)

作者简介: 陈祎(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子遗传与基因工程, E-mail:chenyizoe@163.com; 宋婷玉(1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子遗传与基因工程, E-mail:styitiki@163.com; 李金海(1976—), 男, 博士, 研究方向: 动物生物技术, E-mail: ljh76429@sina.com; #共同第一作者

*通信作者 Corresponding author, E-mail: gaorong96@163.com

于大多数养猪国家,给全球养猪业造成严重的经济损失(Ge *et al.*, 2012)。理想的疫苗是一次接种即可终身免疫。目前有许多商业疫苗来阻止 PCV-2 感染;然而,这些疫苗并不能有效地防止 PCV-2 感染和传播(Beach & Meng, 2012)。因此,提高 PCV-2 疫苗的疗效很重要。

以前的研究表明,细胞因子因其安全性和高效力是一种理想的免疫佐剂,例如 γ -干扰素(IFN- γ)(Wang *et al.*, 2013)、白细胞介素-2(IL-2)(Yang *et al.*, 2010)、白细胞介素 4(IL-4)(Zhang *et al.*, 2007)、白细胞介素 6(IL-6)(Li *et al.*, 2011)。IL-2、IL-4 和 IL-6 在细胞和体液免疫反应中起重要作用。IL-2 具有多种生物学功能,包括促进 T 细胞增殖和增强 NK 细胞的细胞毒性,刺激活化的 B 淋巴细胞增殖,并诱导免疫球蛋白分泌等(Collins & Oldham, 1993)。IL-4 可影响体液免疫和细胞免疫应答,如免疫球蛋白的产生、类别转换和分泌(Pasquini *et al.*, 1997)。IL-6 具有促进白细胞介素基因表达, B 细胞分化、T 细胞活化作用(Kishimoto, 2010)。

我们先前研究已经表明,猪 IL-2 或 IL-6 与 CpG 免疫刺激序列的混合基因能有效地提高动物对病原菌感染的抵抗力(Yang *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2013);此外,猪 IL-4/6 融合基因与单独的 IL-4 和 IL-6 相比,能诱导机体产生更强的免疫应答;猪 IL-4/6 融合基因能加强大肠杆菌疫苗、猪肺炎支原体疫苗、PRRS 疫苗对机体的体液和细胞免疫,提高接种动物的免疫保护性(Zhang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013);猪 IL-2、IL-4、IL-6 的融合基因(IL-4/6-2)相比于 IL-4/6 和 IL-2 在小鼠上可产生更强的免疫协同调节作用(杨璐一等, 2014)。

因此,本实验在前期研究的基础上,为研制新型高性价比的猪 PCV-2 疫苗免疫调节剂,评估了共表达猪 IL-2 和融合 IL-4/6 基因纳米粒子对仔猪生长和对猪圆环病毒 2 型免疫应答的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒:真核表达载体 VR1020-猪融合白介素 4/6-2(VRIL-4/6-2),由本实验室构建并保存;壳聚糖:15KD,脱乙酰度 95%以上,购自 Sigma Aldrich 公司;多聚磷酸钠(TPP):购自 Sigma(USA)公司;鲎试剂:购自湛江 A & C 公司;疫苗:猪圆环病毒 2 型灭活疫苗(ZJ/C 株)(圆环康),由四川省华派生物制药有限公司提供;实验动物:健康 21 日龄长白、约克夏和杜洛克杂交仔猪,由四川省华派生物制药有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 VRIL4/6-2 真核表达质粒的大量制备及内毒素检测 参照《分子克隆指南》(Joseph *et al.*, 2002)制备质粒,溶解于 TE 缓冲液(Tri-EDTA buffer solution),质粒浓度和纯度使用紫外分光光度计检测;质粒内毒素含量用鲎试剂进行检测。

1.2.2 VRIL4/6-2 质粒壳聚糖纳米颗粒的制备 离子交联法(Bodmeier *et al.*, 1989)制备 VRIL4/6-2 质粒壳聚糖纳米颗粒。将壳聚糖(CS)溶解于 1%的冰醋酸溶液(pH5.5),配制为 2.4 mg·mL⁻¹的壳聚糖溶液;ddH₂O 配制 10 mg·mL⁻¹的 TPP 溶液;以上配制溶液均用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌。将 VRIL4/6-2 质粒与适量 TPP 溶液混匀,55 °C 孵育 20 min;将壳聚糖与质粒按照质量比为 30:1,在 50~55 °C 水浴磁力搅拌下将质粒与 TPP 的预混液缓慢滴加至壳聚糖溶液中,混合均匀,恒温孵育 10 min 备用,记做 VRIL4/6-2-CS。用 Zetasizer3000HS/IHPL 粒度仪检测纳米颗粒粒径和电位。

1.2.3 动物实验 10 头 21 日龄长白、约克夏和杜洛克杂交仔猪,经 ELISA 和 RT-PCR 检测 PCV-2、PRRSV、CSFV 和支原体均为阴性。随机分成 2 组(实验组 A 和对照组 B),每组 5 头仔猪。A 组颈部肌肉注射 2.5 mL VRIL-4/6-2-CS(0.5 mg·mL⁻¹),B 组注射相同剂量生理盐水;2 组均颈部肌肉注射 2.5 mL PCV-2 疫苗。猪免疫接种前记为第 0 天,接种后第 7,14,28 天定时采集前腔静脉血用于检测免疫反应。接种前及实验结束第 28 天时分别测量 2 组仔猪的体质量,用于评价实验质粒对仔猪生长的影响。

1.2.4 PCV-2 特异性抗体的测定 取 500 μ L 抗凝血低速离心后收集血清,参照 ELISA 试剂盒说明书操作,在酶标仪上测定 OD₆₃₀ 值,检测血清中 PCV-Ab 的含量,试剂盒购自武汉科前生物公司。

1.2.5 IgG1 和 IgG2a 的测定 取 500 μ L 抗凝血低速离心后收集血清,参照 ELISA 试剂盒说明书操作,在酶标仪上测定 OD₄₅₀ 值,检测血清中 IgG1 和 IgG2a 的含量,试剂盒购自成都敏鑫科生物科技公司。

1.2.6 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞的测定 取 100 μ L 新鲜抗凝血,摇匀血样,加入 2 μ L anti-porcine CD3-SPRD, 2 μ L anti-porcine CD4-FITC, 2 μ L anti-porcine CD8-PE,震荡混匀避光孵育 30 min;加入 600 μ L 红细胞裂解液,避光裂解 10 min,500 g 离心 5 min,去上清;加入 1 mL 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS),轻轻悬浮细胞,500 g 离心 5 min,去上清;重复洗涤 1 次,细胞沉淀加入 300 μ L PBS 混匀,悬浮细胞,上机检测。

1.2.7 荧光定量检测基因表达水平 100 μ L 抗凝血加入 1 mL 的 RNAiso plus,充分裂解后提取细胞总 RNA,用 TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for Qpcr (One-Step gDNA Removal)反转录试剂盒反转录合成 cDNA。根据 GenBank 中的猪 PPIA、TLR2、TLR7、IL-2、IL-4、IL-6、TNF- α 、STAT1、STAT2、STAT3 基因的 cDNA 序列,分别设计合成其特异性扩增引物(表 1)。

以仔猪不同时期血液 cDNA 为模板,表 1 中设计的引物进行扩增。用 Bio-Rad IQ5 荧光定量 PCR 仪来检测不同

基因相对表达的情况，15 μ L 体系，用 SsoAdvance™ Universal SYBR Green Supermix 进行荧光定量分析。扩增参数为：95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s，95 $^{\circ}$ C 变性 5 s，最佳退火温度退火 30 s，40 个循环。熔解曲线参数：65~95 $^{\circ}$ C，每 6 s 上升 0.5 $^{\circ}$ C。PPIA 为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析实时荧光 PCR 数据，比较同一目的基因不同时期的相对表达水平差异。

表 1 荧光定量 PCR 特异性引物

Table 1 The primers for qRT-PCR

基因	引物(5'-3')	退火温度/ $^{\circ}$ C
PPIA-F	AGACAGCAGAAAACCTTCCGTG	52.0
PPIA-R	ACTTGCCACCAGTGCCATTA	
TNF- α -F	CCCACGTTGTAGCCAATGTC	60.0
TNF- α -R	GAGGTACAGCCCATCTGTGC	
IL-2-F	AGCTCTGGAGGGAGTGCTAA	60.0
IL-2-R	TGTTTCAGATCCCTTTAGTTCCA	
IL-4-F	GCTGCCCCAGAGAACACGAC	60.0
IL-4-R	AGGTTCTGTCAAGTCCGCTC	
IL-6-F	ATAAGGGAAATGTCGAGGCTG	60.0
IL-6-R	GTGGCTTTGTCTGGATTCTTTC	
TLR2-F	TGCTGCAAGGTCAACTCTCT	61.0
TLR2-R	CAGCAGGGTCACAAGACAGA	
TLR-7-F	ATAGCGAGCATCACTCCAGCC	60.0
TLR-7-R	TAATCTGCTGCCTTCTGGTGC	
STAT-1-F	TCTGGCACAGTGGCTAGAAAATC	56.3
STAT-1-R	GAAAACGGATGGTGGCAAAC	
STAT-2-F	AACATTCCTGAGAACCCACTG	54.0
STAT-2-R	CTGTTAGAGACCACGATGAGC	
STAT-3-F	AGGACATCAGCGGTAAGA	60.0
STAT-3-R	GGTAGACCAGCGGAGACA	

1.2.8 数据分析 以上各种数据用 GraphPad Prism 6 中方差分析进行显著性差异比较，当 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 仔猪体质量变化

实验开始及结束时分别称取每只仔猪的体质量，分别计算每组仔猪体质量的平均值和方差，仔猪体质量变化如下表(表 2)。结果显示实验组仔猪体质量增加显著高于对照组($P < 0.05$)。

表 2 实验 28 天仔猪体质量变化

Table 2 Pig weights during 28 days' observation

组别	初始体质量/kg	终体质量/kg	净增长/kg	日增长/kg
A	8.10 \pm 0.98	17.63 \pm 2.03	9.525 \pm 1.135*	0.340*
B	7.35 \pm 0.25	14.60 \pm 0.51	7.25 \pm 0.52	0.259

注：* $P < 0.05$ 表示实验组和对照组之间的差异有统计学意义。

Note: * $P < 0.05$ means there is a significant difference between control and experiment.

2.2 仔猪血清特异性抗体含量测定

ELISA 检测接种后仔猪血清中 PCV-2 抗体含量(图 1)。在免疫接种第 7 天后，实验组和对照组均可以检测到 PCV-2 抗体，但是实验组与对照组之间 PCV-2 抗体和含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。

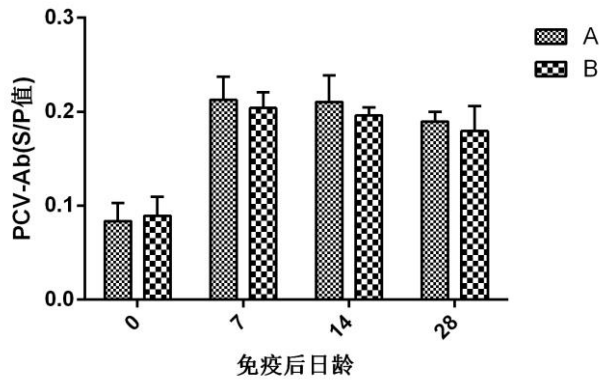


图1 仔猪血清中 PCV-2 抗体含量的变化

Fig. 1 Anti-PCV-2 antibody titers in the sera of the experimental pigs

$S/P = (S - N) / (P - N)$ = (样品 OD 值 - 阴性对照 OD 值) / (阳性对照 OD 值 - 阴性对照 OD 值), 当 $S/P \geq 0.16$ 时认为 PCV-2 抗体检测为阳性。
Criteria standard: $S/P = (S - N) / (P - N)$ = (sample OD - negative control OD) / (positive control OD - negative control OD), titer of PCV-2 antibody was considered positive when the $S/P \geq 0.16$.

2.3 仔猪血清 IgG1 和 IgG2a 含量测定

实验组仔猪血清中 IgG1 的含量低于对照组 ($P < 0.05$), 而实验组的 IgG2a 的含量显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 2)。

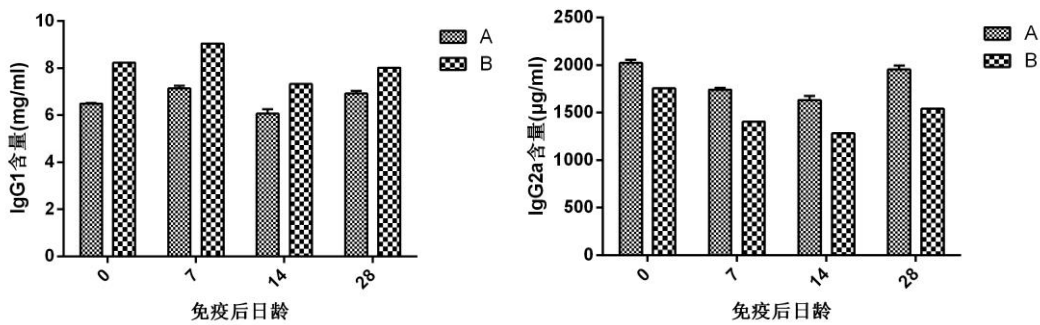


图2 仔猪血清 IgG1 和 IgG2a 含量变化

Fig. 2 The change of the levels of IgG1 and IgG2a in the sera of piglets

2.4 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞亚群的检测

流式细胞术检测仔猪血液中 CD4⁺T 和 CD8⁺T 淋巴细胞亚群的数量变化(图 3)。结果显示, 28 天时实验组仔猪血液中的 CD4⁺T 和 CD8⁺T 淋巴细胞的数量与对照组相比均显著增加 ($P < 0.05$)。

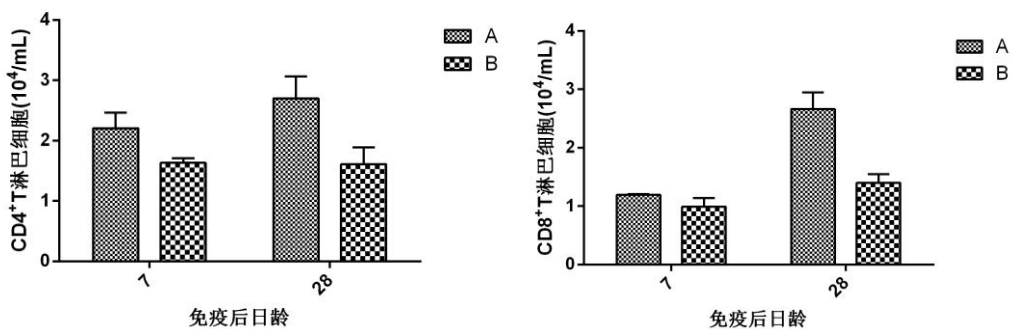


图3 仔猪血液中 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞数的变化

Fig. 3 Th and Tc cell numbers in peripheral blood of experimental piglets

2.5 免疫相关基因表达量分析

2.5.1 Toll-like 受体基因表达定量分析 图 4 的结果表明实验组 TLR-2 基因的表达水平只在免疫后第 14 天显著高于

对照组($P<0.05$), 而实验组 TLR-7 基因的表达水平在免疫后第 28 天显著高于对照组($P<0.05$)。

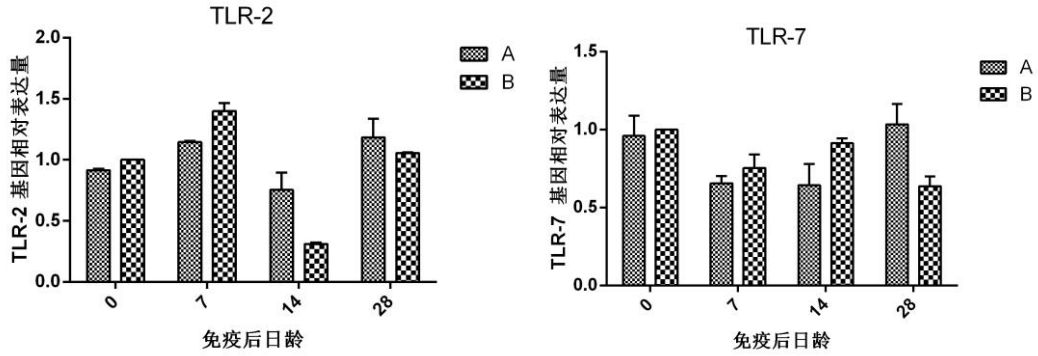


图 4 仔猪 TLR 基因的表达水平变化

Fig. 4 The change of expression levels of TLR genes in the blood of experimental piglets

2.5.2 细胞因子基因表达定量分析 图 5 的结果显示, 实验组仔猪血液的 IL-2、IL-4、IL-6 和 TNF- α 基因表达水平在免疫后第 28 天均显著高于对照组($P<0.05$), 其中 IL-4 和 IL-6 基因表达水平分别在第 7 天和第 14 天也显著高于对照组($P<0.05$)。

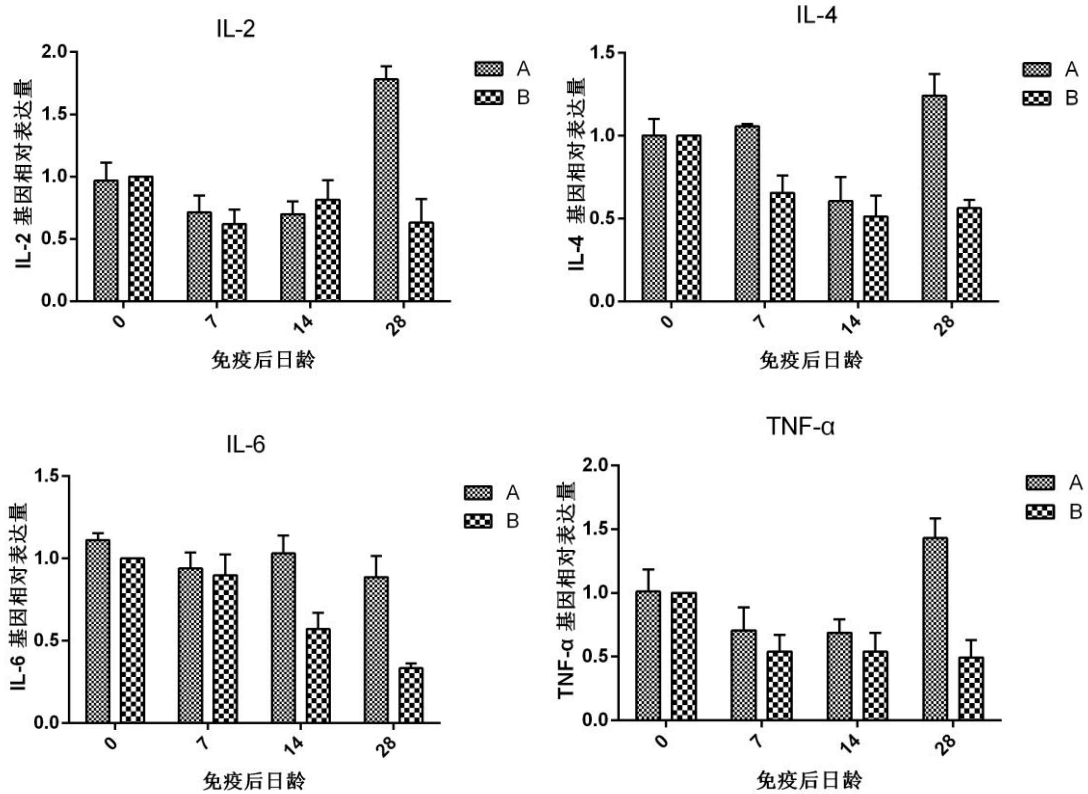


图 5 仔猪细胞因子基因表达水平变化

Fig. 5 The change of cytokine gene expression in the blood of experimental piglets

2.5.3 免疫信号传导分子基因表达定量分析 由图 6 可知, STAT1 基因表达水平在免疫后第 7~14 天均显著高于对照组($P<0.05$), STAT2 基因表达水平在免疫后第 14~28 天显著高于对照组($P<0.05$), STAT3 基因表达水平在免疫后第 7、28 天显著高于对照组($P<0.05$)。

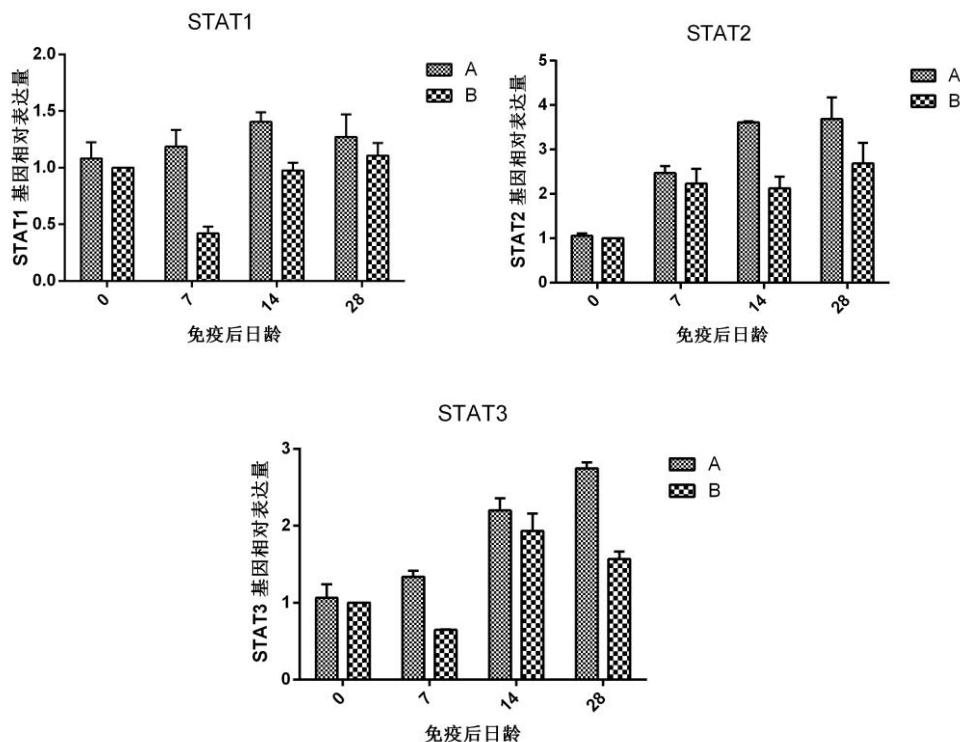


图 6 仔猪免疫信号传导分子基因表达水平变化

Fig. 6 The change of the immune signal transduction molecules related genes in the blood of experimental piglets

3 讨论

细胞因子是调节动物免疫功能的关键分子。许多细胞因子被证实作为佐剂对体液或细胞免疫有增强作用 (Pasquini *et al.*, 1997; Kayamuro *et al.*, 2010)。白细胞介素 2 不仅支持 T 细胞和 NK 细胞的活化和增殖, 还可以刺激互活化 B 淋巴细胞增殖和诱导免疫球蛋白的分泌 (Smith, 1988; Collins & Oldham, 1993)。白细胞介素 4 可促进体液免疫, 增加特异性和非特异性杀伤功能 (Erb *et al.*, 1997; Paul, 2015)。白细胞介素 6 可调节 B 细胞活化、抗体产生和 Th1 型免疫反应 (Paul & Seder, 1994; Kishimoto, 2006)。我们有研究表明猪 IL-4/6、IL-2 和 IL-4/6-2 融合基因均可安全增强动物系统和全面的免疫 (Yang *et al.*, 2010, 2013; 杨璐一等, 2014)。基于以前的研究, 我们第一次将猪融合 IL-4/6-2 基因应用到本体动物猪身上, 来加强对 PCV-2 疫苗的免疫效果。

本实验用壳聚糖将重组质粒 VPIL4/6-2 包裹起来, 制备壳聚糖纳米颗粒, 与 PCV-2 疫苗同时对实验仔猪进行肌肉注射免疫接种。实验所用重组质粒通过 2A 短肽连接 3 种白细胞介素基因, 从而构建的共表达质粒。2A 短肽具有的自剪切机制使得连接前后的基因表达量相同 (de Felipe & Ryan, 2004; Szymczak & Vignali, 2005)。裸露的基因不稳定并且半衰期很短, 转染效率低; 而壳聚糖包裹质粒可形成小的带正电荷的纳米颗粒, 相对于裸露的质粒, 它可以更有效的携带目的基因进入细胞中, 还可以抑制其在生物体内降解, 被证实是一种有潜力的缓释材料, 并且还具有生物相容性 (Chew *et al.*, 2003; Cui & Mumper, 2003); 因此壳聚糖作为基因载体的研究发展迅速 (Buschmann *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2016); Huang 等 (2005) 通过荧光标记研究壳聚糖-DNA 复合粒子进入细胞的过程, 证实了壳聚糖-DNA 复合粒子可以被细胞内吞, 继而进行后续基因转染。我们之前的研究也表明, 壳聚糖纳米粒子在动物身上用于基因传递几乎没有毒性和影响 (Yang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012), 并且空白载体质粒组与空白组没有差异 (Yang *et al.*, 2010)。因此, 本次实验由于阴性动物难于筛选获得, 数量有限, 并未进行空白载体质粒组的实验。

在实验期间, 实验组和对照组仔猪注射局部均未出现病变、损伤或其他系统性症状。实验开始和结束时分别记录了每只仔猪的体质量, 结果显示实验组仔猪的生长速率显著高于对照组 ($P < 0.05$)。有研究显示 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 等细胞因子可在猪小肠中持续表达, 并且细胞因子除了直接的免疫调节作用, 还可影响上皮细胞的生长、内环境稳态和免疫细胞的运输 (Oswald, 2006; Devriendt *et al.*, 2010)。我们推测质粒 VPIL4/6-2 对调节仔猪内分泌、促进物质代谢有积极作用。

PCV-2 特异性抗体和 PCV-2 中和抗体是体液免疫反应的重要检测指标 (Meerts *et al.*, 2006; Fort *et al.*, 2007)。研究结果表明: 实验组和对照组仔猪血清中 PCV-2 抗体的含量差异不显著 ($P > 0.05$), 而且实验组仔猪血清中 IgG1 的含量显著低于对照组 ($P < 0.05$), 这表明 PIL-4/6-2 可能没有明显增强仔猪对 PCV-2 疫苗的体液免疫。此外, 有研究

显示诱导细胞免疫对于 PCV-2 的防控很有必要(Fort *et al.*, 2009)。我们的研究表明: VPIL-4/6-2-CS 组的 CD⁴⁺ 和 CD⁸⁺ T 淋巴细胞数量显著高于对照组($P<0.05$), 并且 VPIL-4/6-2-CS 组的 Th1 型细胞因子 IL-2、TNF- α 基因表达水平在 28 天显著高于对照组($P<0.05$)。IL-2, IFN- γ 和 TNF- α 均由 Th1 细胞产生, Th1 细胞可诱导巨噬细胞活化、迟发性超敏反应和 IgG2a 的产生(Mosmann & Coffman, 1989; Abbas *et al.*, 1996)。同时本次实验我们发现接种质粒的实验组比对照组产生了更多的 IgG2a 抗体($P<0.05$), 表明实验组仔猪产生了更强的 Th1 型免疫应答, 相比对照组, VRPIL-4/6-2-CS 提高了仔猪对 PCV-2 疫苗的细胞免疫应答。

另外, 实验组仔猪血液中 IL-4、IL-6、TLR-2、TLR7、STAT1、STAT2、STAT3 基因的表达水平在不同的时间段内也显著高于对照组。TLRs 是先天免疫系统的重要组成部分, Toll 样受体在先天免疫中识别不同病原菌的保守分子模式, 并参与对病原体的特异性体液和细胞免疫反应的激活(Kawai & Akira, 2010)。STAT1、STAT2 参与 IFNs 应答反应, 并在干扰素抗病毒应答调节中起重要作用(Mitchell & John, 2005; Steen & Gamero, 2013); STAT3 可由多种细胞因子激活, 例如 IL-6、IL-12, 具有有效的抗炎作用, 可调节细胞生长、凋亡、炎性基因的转录等重要细胞过程(Egwuagu, 2009); JAK 激酶和 STAT 蛋白的参与了许多细胞因子的信号转导, 它在细胞因子介导的免疫反应和调控中具有重要作用(Shuai & Liu, 2003)。综上, 这些基因表达水平的提高表明 VPIL-4/6-2-CS 诱导了更加全面的免疫应答, 增强了仔猪的先天性和适应性免疫应答。

总之, 我们的研究结果首次证实 VRIL4/6-2 可有效协同增强仔猪对 PCV-2 疫苗的免疫应答。VRIL4/6-2 是一种新型高性价比佐剂, 可提高猪对抗 PCV-2 感染的免疫预防能力, 具有重要应用前景。

参考文献:

- Joseph S, David W, 黄培堂, 等. 2002. 分子克隆实验指南[M]. 第三版. 北京: 科学出版社: 32-36.
- 杨璐一, 肖永乐, 万小平, 等. 2014. 猪白细胞介素 2 与融合白细胞介素 4/6 基因共表达的免疫效应研究[J]. 四川动物, 33(2): 167-173.
- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes[J]. Nature, 383(6603): 787.
- Allan G, McNeilly F, Ellis J, *et al.* 2004. PMWS: experimental model and co-infections[J]. Veterinary Microbiology, 98(2): 165-168.
- Beach NM, Meng XJ. 2012. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2)[J]. Virus Research, 164(1): 33-42.
- Bodmeier R, Chen H, Paeratakul O. 1989. A novel approach to the oral delivery of micro-or nanoparticles[J]. Pharmaceutical Research, 6(5): 413-417.
- Buschmann MD, Merzouki A, Lavertu M, *et al.* 2013. Chitosans for delivery of nucleic acids[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 65(9): 1234-1270.
- Chae C. 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases[J]. The Veterinary Journal, 169(3): 326-336.
- Chew JL, Wolfowicz CB, Mao HQ, *et al.* 2003. Chitosan nanoparticles containing plasmid DNA encoding house dust mite allergen, Der p 1 for oral vaccination in mice[J]. Vaccine, 21(21): 2720-2729.
- Collins R, Oldham G. 1993. Recombinant human interleukin 2 induces proliferation and immunoglobulin secretion by bovine B-cells: tissue differences and preferential enhancement of immunoglobulin A[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 36(1): 31-43.
- Cui Z, Mumper RJ. 2003. Microparticles and nanoparticles as delivery systems for DNA vaccines[J]. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 20(2-3):103-137.
- de Felipe P, Ryan MD. 2004. Targeting of proteins derived from self-processing polyproteins containing multiple signal sequences[J]. Traffic, 5(8): 616-626.
- Devriendt B, Stuyven E, Verdonck F, *et al.* 2010. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) induce proinflammatory responses in porcine intestinal epithelial cells[J]. Developmental & Comparative Immunology, 34(11): 1175-1182.
- Egwuagu CE. 2009. STAT3 in CD4+ T helper cell differentiation and inflammatory diseases[J]. Cytokine, 47(3): 149-156.
- Erb KJ, Ruger B, Von Brevern M, *et al.* 1997. Constitutive expression of interleukin (IL)-4 *in vivo* causes autoimmune-type disorders in mice[J]. Journal of Experimental Medicine, 185(2): 329-340.
- Fernandez EF, Santos-Carballal B, Weber WM, *et al.* 2016. Chitosan as a non-viral co-transfection system in a cystic fibrosis cell line[J]. International Journal of Pharmaceutics, 502(1): 1-9.
- Fort M, Fernandes LT, Nofrarias M, *et al.* 2009. Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 129(1): 101-107.
- Fort M, Olvera A, Sibila M, *et al.* 2007. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs[J]. Veterinary Microbiology, 125(3): 244-255.
- Ge X, Wang F, Guo X, *et al.* 2012. Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in China[J]. Virus Research, 164(1): 100-106.

- Gillespie J, Opriessnig T, Meng X, *et al.* 2009. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease[J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(6): 1151-1163.
- Huang J, Chen JL, Wang Y, *et al.* 2013. Enhancement of the immunity of piglets to pseudorabies vaccine with plasmids containing interleukin-6 gene and CpG motifs encapsulated in chitosan nanoparticles[J]. *Procedia in Vaccinology*, 7: 8-14.
- Huang M, Fong CW, Khor E, *et al.* 2005. Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation[J]. *Journal of Controlled Release*, 106(3): 391-406.
- Kawai T, Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors[J]. *Nature Immunology*, 11(5): 373-384.
- Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, *et al.* 2010. Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus[J]. *Journal of Virology*, 84(24): 12703-12712.
- Kishimoto T. 2006. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 8(2): S2.
- Kishimoto T. 2010. IL-6: from its discovery to clinical applications[J]. *International Immunology*, 22(5): 347-352.
- Li D, Chen J-L, Zhang H, *et al.* 2011. Improvement of the immunity of pig to hog cholera vaccine by recombinant plasmid with porcine interleukin-6 gene and CpG motifs[J]. *Vaccine*, 29(22): 3888-3894.
- Meerts P, Misinzo G, Lefebvre D, *et al.* 2006. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease[J]. *BMC Veterinary Research*, 2(1): 6.
- Mitchell TJ, John S. 2005. Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas[J]. *Immunology*, 114(3): 301-312.
- Mosmann TR, Coffman RL. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells[J]. *Advances in Immunology*, 46: 111-147.
- Oswald IP. 2006. Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine[J]. *Veterinary Research*, 37(3): 359-368.
- Pasquini S, Xiang Z, Wang Y, *et al.* 1997. Cytokines and costimulatory molecules as genetic adjuvants[J]. *Immunology & Cell Biology*, 75(4).
- Paul WE, Seder RA. 1994. Lymphocyte responses and cytokines[J]. *Cell*, 76(2): 241-251.
- Paul WE. 2015. History of interleukin-4[J]. *Cytokine*, 75(1): 3-7.
- Segalés J, Allan GM, Domingo M. 2005. Porcine circovirus diseases[J]. *Animal Health Research Reviews*, 6(02): 119-142.
- Shuai K, Liu B. 2003. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system[J]. *Nature Reviews Immunology*, 3(11): 900-911.
- Smith KA. 1988. Interleukin-2: inception, impact, and implications[J]. *Science*, 240(4856): 1169.
- Steen HC, Gamero AM. 2013. STAT2 phosphorylation and signaling[J]. *Jak-Stat*, 2(4): e25790. DOI: 10.4161/jkst.25790.
- Szymczak AL, Vignali DA. 2005. Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors[J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5(5): 627-638.
- Wang YP, Liu D, Guo LJ, *et al.* 2013. Enhanced protective immune response to PCV2 subunit vaccine by co-administration of recombinant porcine IFN- γ in mice[J]. *Vaccine*, 31(5): 833-838.
- Yang X, Sun WK, Chen WL, *et al.* 2010. Promotion of the immunity of piglets to hog cholera vaccine induced by shuffled pig interleukin-2 gene and CpG immunostimulatory sequences encapsulated in chitosan nanoparticles[J]. *Procedia in Vaccinology*, 2(1): 51-59.
- Yang X, Xiao YL, Chen JL, *et al.* 2013. Potentiation of immunity of piglets to mycoplasma hyopneumoniae vaccine with fused gene for pig IL-4 and IL-6 embodied in chitosan nanoparticles[J]. *Procedia in Vaccinology*, 7: 15-22.
- Zhang H, Cheng C, Zheng M, *et al.* 2007. Enhancement of immunity to an *Escherichia coli* vaccine in mice orally inoculated with a fusion gene encoding porcine interleukin 4 and 6[J]. *Vaccine*, 25(41): 7094-7101.
- Zhang HB, Wan XP, Bai GM, *et al.* 2012. Improvement of the immunity of piglets to PRRS vaccine by A porcine IL-4 and IL-6 fusion gene encapsulated in chitosan nanoparticles[J]. *Procedia in Vaccinology*, 6: 113-124.