

几种黏膜免疫佐剂对鸡小肠 IgA 分泌细胞的影响

张小飞, 杨倩*

(南京农业大学农业部动物生理生化重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 分别在新城疫IV系弱毒苗中添加黏膜免疫佐剂乳酸杆菌、CpG DNA、重组 IL-2、氟化钠和大豆黄酮, 经口免疫鸡后, 研究十二指肠、空肠、Peyer's 斑单位面积 IgA 分泌细胞的变化。首先提纯鸡 IgA 和制备兔抗鸡 IgA 血清, 然后应用免疫组化技术显示鸡小肠 IgA 分泌细胞。结果表明, 在免疫后第 3 周、第 5 周乳酸杆菌组比新城疫组 (ND) 极显著增加各段小肠 IgA 分泌细胞的数量 ($P < 0.01$); CpG DNA、重组 IL-2 和大豆黄酮在整个免疫期内均明显增加鸡小肠黏膜局部 IgA 分泌细胞数量; NaF 对鸡体黏膜局部 IgA 分泌细胞数量无明显增加。结果表明乳酸杆菌、CpG DNA、重组 IL-2 和大豆黄酮是有效的口服黏膜免疫佐剂。

关键词: 黏膜免疫佐剂; 鸡; 小肠; IgA 分泌细胞

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)01-0096-05

Effects of Several Mucosal Immune Adjuvants on IgA Secreting Cells of Chicken Small Intestine

ZHANG Xiao-fei, YANG Qian*

(Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry of Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this paper we investigated effects of five kinds of mucosal immune adjuvant such as lactic acid bacillus (LAB), CpG DNA, recombinant IL-2 (rIL-2), sodium fluoride (NaF) and daidzein, on IgA secreting cells of chicken small intestine (duodenum, jejunum and Peyer's patch). Chickens of five groups were immunized orally with NDV strain LaSota vaccine containing different mucosal immune adjuvant mentioned above respectively. And other two groups were given normal saline and LoSota vaccine as control. The results showed that the areas of IgA secreting cells of the Group LAB were increased significantly than that of Group ND ($P < 0.01$) at 3rd and 5th week after vaccination in small intestine. The areas of Group CpG DNA, rIL-2 and daidzein were increased during the whole immune period. No significant changes were found in Group NaF. The results demonstrated that LAB, CpG DNA, rIL-2 and daidzein were effective mucosal immune adjuvants.

Key words: mucosal immune adjuvant; chicken; small intestine; IgA secreting cells

动物传染病的传播大多以消化道和呼吸道为主要途径。消化道黏膜是机体抵抗外来病原体入侵的第一道防线, 研究与实践证明消化道黏膜免疫不仅在黏膜局部和其它黏膜组织产生免疫应答, 还可引

起全身性的体液免疫应答^[1], 因此黏膜免疫受到国内外免疫学家的关注。但是, 由于疫苗经过消化道时常受到消化液的降解, 在应用中不得不增加抗原的用量, 使其在生产推广中受到一定的限制^[2]。因

收稿日期: 2006-05-19

基金项目: 国家自然科学基金(30070564); 江苏省自然科学基金(BK2002111)

作者简介: 张小飞 (1979-), 山西大同人, 博士生, 主要从事动物黏膜免疫的研究, E-mail: wangyizxf@163.com

* 通讯作者: 杨倩

此如何使用少量的抗原有效地诱导黏膜免疫反应,提高黏膜免疫力成为目前急需解决的问题。近几年来国外一些学者致力于黏膜免疫佐剂的研究^[3],试图提高机体局部对抗原的黏膜免疫力和系统免疫反应。

分泌型 IgA(SIgA)是黏膜免疫的主要效应因子,它不仅具有中和病毒、抑制微生物吸附的作用,还具有免疫排斥和促天然抗菌因子的功能。SIgA 主要由黏膜固有层中 IgA 分泌细胞先合成 IgA,然后 IgA 在通过黏膜上皮的过程中再与上皮细胞的分泌片段形成 SIgA^[4]。本实验室以前的研究发现,口服弱毒苗可增加鸡小肠中 IgA 分泌细胞的数量^[5],提高了局部的黏膜免疫力,然而目前尚未见有将黏膜免疫佐剂和鸡新城疫弱毒苗一起进行消化道免疫进一步提高局部黏膜免疫力的报道。因此,本研究选取乳酸杆菌、氟化钠(NaF)、重组 IL-2、CpG DNA 和大豆黄酮 5 种黏膜免疫佐剂,分别与鸡新城疫弱毒苗配合,研究黏膜免疫佐剂对鸡小肠中 IgA 分泌细胞数量的影响,为进一步提高局部黏膜免疫力提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验动物及处理

147 只 1 日龄雏鸡(来航蛋公鸡,购自南京迈皋桥鸡场)分为 7 组,每组 21 只,常规饲养管理。7 日龄时进行首次免疫。第 1 组为对照组,每只鸡经口腔注入生理盐水 0.4 mL;第 2 组为仅用鸡新城疫疫苗免疫组(ND 组),每只鸡经口腔注入鸡新城疫弱毒苗 [IV 系苗,JAAS 牧(2000)第 003 号]0.4 mL;第 3 组为大豆黄酮组,每只鸡在新城疫弱毒苗中添加 0.4 mg 大豆黄酮(动物医学院生理组提供);第 4 组为 CpG 核酸疫苗组(CpG 组),每只鸡在新城疫弱毒苗中添加 50 μ g CpG(大肠杆菌牦牛株中提取,动物医学院微生物组提供);第 5 组为重组 IL-2 组(IL-2 组),每只鸡在新城疫弱毒苗中添加 50 μ g IL-2(动物医学院寄生虫组提供);第 6 组为氟化钠组(NaF 组),每只鸡在新城疫弱毒苗中添加 5 mg NaF(南京农业大学化学试剂科提供);第 7 组为鸡源德氏乳酸杆菌组(LAB 组),每只鸡在新城疫弱毒苗中添加 10^7 CFU 乳酸杆菌(动物科技学院提供)。首免 3 d 后加强免疫,方法与剂量同首免。

各组分别于首免后第 3、5、7 周各宰杀 7 只,取十二指肠、空肠、Peyer's 斑于 Bouin 氏液中固定,常

规石蜡切片,厚度为 4 μ m。

1.2 鸡 IgA 的提取

从刚宰杀的 50 只鸡的胆囊中收集胆汁 70 mL, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。收集的胆汁在 4 $^{\circ}$ C 10 000 \times g 离心 30 min,上清液加等体积的 2.5 mol/L 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,搅拌后于 4 $^{\circ}$ C 过夜;次日于 4 $^{\circ}$ C 10 000 \times g 离心 30 min,保留上清,加入等体积的 5.82 mol/L 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 搅拌,4 $^{\circ}$ C 过夜;次日于 4 $^{\circ}$ C 15 000 \times g 离心 10 min,沉淀以 5 mL pH7.4 0.01 mol/L 磷酸缓冲液溶解,透析 48 h 得到粗提的 SIgA。然后将上述粗提的 SIgA 经 Sephadex G-200 凝胶层析^[6],再经 DEAE-Sephadex A-50 处理,得到纯化的 IgA。平衡液:0.015 mol/L Tris-HCl (NaCl 0.06 mol/L pH7.4),洗脱液:0.015 mol/L Tris-HCl (NaCl 0.3 mol/L pH7.4)。

1.3 兔抗鸡 IgA 血清的制备

按常规方法,以纯化的 IgA 免疫家兔。琼脂扩散试验效价达 1:16 时采血,分离血清,即为兔抗鸡 IgA 高免血清。

1.4 SPA-HRP 间接染色法检测 IgA 分泌细胞

石蜡切片脱蜡后置入 0.6% H_2O_2 处理 30 min,用 0.4% Triton PBS(pH7.6)洗涤 3 次,每次 5 min;经 5% 正常羊血清封闭 20 min,弃羊血清后直接加入 1:40 稀释的兔抗鸡 sIgA 高免血清,4 $^{\circ}$ C 过夜;同上洗涤,加入适当稀释的 SPA-HRP(1:40) 37 $^{\circ}$ C 作用 50 min;Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH7.6)洗涤 3 次,每次 5 min,DAB(Sigma 公司) H_2O_2 显色;脱水;透明;封固。Olympus 显微镜观察、拍照。对照组用 PBS 替代兔抗鸡 SIgA。

1.5 组织学观察与统计

用 Olympus BH-2 显微镜观察并拍照。利用图像分析系统测量十二指肠、空肠、Peyer's 斑处肠绒毛 IgA 分泌细胞的面积,每组选取 7 张切片,每张切片选取 10 个视野统计。

1.6 数据统计

数据采用 Microsoft Excel 和 SPSS11.5 软件分析。

2 结果与分析

2.1 十二指肠、空肠、Peyer's 斑 IgA 分泌细胞分布规律

从图 1~3 可以看出,十二指肠、空肠、Peyer's 斑都分布有 IgA 分泌细胞,细胞多为圆形和椭圆

形,呈棕色。这些分泌细胞主要分布在肠绒毛黏膜固有层,肠腺周围也有少量分布。十二指肠、空肠的IgA分泌细胞数量相似,Peyer's斑的IgA分泌细胞数明显多于十二指肠和空肠。

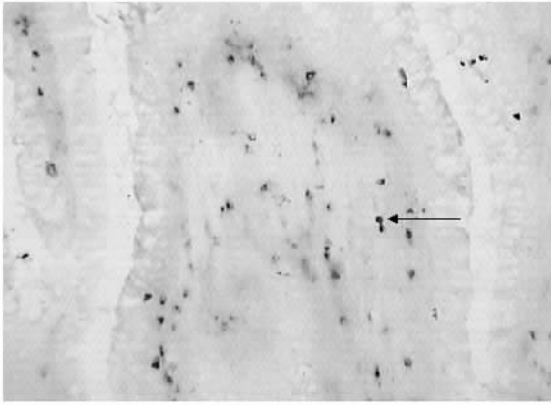


图1 十二指肠 IgA 分泌细胞 10×10
Fig. 1 IgA secreting cells in duodenum 10×10

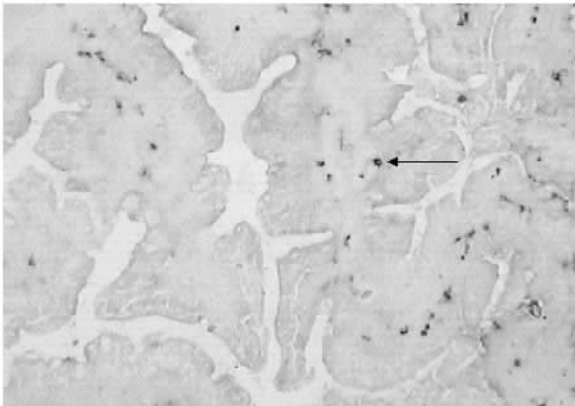


图2 空肠 IgA 分泌细胞 10×10
Fig. 2 IgA secreting cells in jejunum 10×10

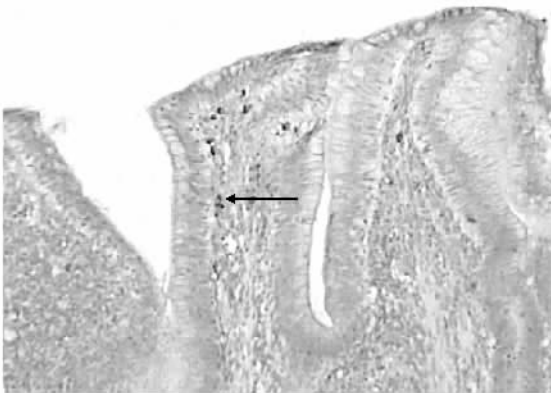


图3 Peyer's斑 IgA 分泌细胞 10×10
Fig. 3 IgA secreting cells in Peyer's Patch 10×10

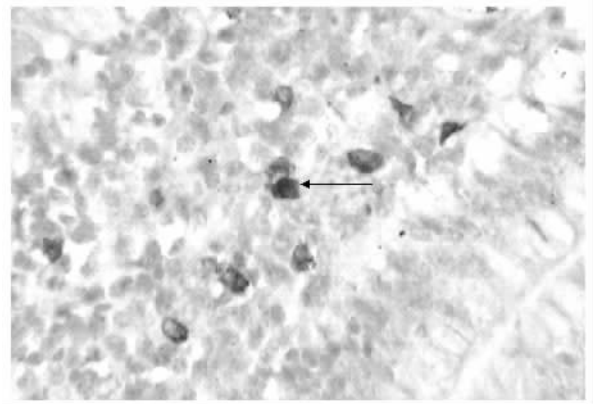


图4 Peyer's斑 IgA 分泌细胞 10×40
Fig. 4 IgA secreting cells in Peyer's Patch 10×40

2.2 不同佐剂对 IgA 分泌细胞的影响

2.2.1 十二指肠 IgA 分泌细胞数量的变化 从表1中可以看出十二指肠中第3周时大豆黄酮、CpG DNA、重组 IL-2 和 LAB 4 组 IgA 分泌细胞数量比 ND 组多,差异极显著($P < 0.01$),其中 IL-2 组数量最多,与 CpG DNA 和 大豆黄酮组差异极显著($P < 0.01$),CpG DNA 组 IgA 分泌细胞数量又比大豆黄酮组极显著增加($P < 0.01$);第5周时大豆黄酮、IL-2、LAB 3 组 IgA 分泌细胞数量比 ND 组极显著增加($P < 0.01$),大豆黄酮组和 LAB 组之间差异不显著;第7周时大豆黄酮组数量最多,与 CpG DNA 和 ND 组差异显著($P < 0.01$),IL-2、NaF、LAB 3 组比 ND 组极显著降低($P < 0.01$)

2.2.2 空肠 IgA 分泌细胞数量的变化 从表2可以看出第3周时 LAB 组 IgA 分泌细胞数量比 ND 组和其他佐剂组高,差异极显著($P < 0.01$);第5周时大豆黄酮、CpG DNA、IL-2 和 LAB 4 组 IgA 分泌细胞数量比 ND 组极显著增加($P < 0.01$),其中 CpG DNA 组最高,与大豆黄酮和 IL-2 组差异极显著($P < 0.01$),大豆黄酮组又比 IL-2 组极显著增加($P < 0.01$);第7周时大豆黄酮、CpG DNA 和 IL-2 3 组 IgA 分泌细胞数量比 ND 组极显著增加($P < 0.01$),大豆黄酮组数量组多,比 CpG DNA 组显著增加($P < 0.05$),LAB 组与 ND 组差异不显著,NaF 组比 ND 组极显著降低($P < 0.01$)。

2.2.3 Peyer's 斑 IgA 分泌细胞数量的变化 从表3中可以看出第3周时 CpG DNA、IL-2 和 LAB 组 IgA 分泌细胞数量比 ND 组多,差异极显著($P < 0.01$),大豆黄酮和 NaF 组与 ND 组差异不显著;第5周时大豆黄酮、CpG DNA、IL-2 和 LAB 4 组 IgA

分泌细胞数量比 ND 组极显著增加 ($P < 0.01$), 其中 IL-2 组数量最多, 比大豆黄酮组极显著增加 ($P < 0.01$), 大豆黄酮与 LAB 组差异不显著; 第 7 周时

大豆黄酮、CpG DNA 和 IL-2 组 IgA 分泌细胞数量比 ND 组极显著增加 ($P < 0.01$), NaF 组比 ND 组极显著降低 ($P < 0.01$)。

表 1 免疫后十二指肠的 IgA 分泌细胞面积

Table 1 The area of IgA secreting cells in duodenum after first vaccination

μm^2

| | 对照组 Normal saline | ND 组 ND vaccine | 大豆黄酮组 ND+Daidzen | CPG DNA 组 ND+CPG DNA | IL-2 组 ND+IL-2 | NaF 组 ND+NaF | LAB 组 ND+LAB |
|-------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 第 3 周 | 247.3±37.6 ^{Db} | 271.7±29.9 ^{Dab} | 360.7±26.7 ^{Ca} | 488.9±53.6 ^{Ba} | 717.6±41.3 ^{Aa} | 311.4±39.6 ^{CDa} | 669.7±45.5 ^{Aa} |
| 第 5 周 | 520.6±32.9 ^{BCb} | 535.8±74.5 ^{CDcd} | 768.5±66.7 ^{Aa} | 554.6±66.2 ^{CDbc} | 674.7±24.3 ^{ABb} | 466.3±66.5 ^{Dd} | 712.6±50.2 ^{ABb} |
| 第 7 周 | 924.6±40.2 ^{Ca} | 1 031.2±70.8 ^{Ba} | 1 141.7±34.8 ^{Aa} | 1 015.9±45.6 ^{Ba} | 858.0±39.9 ^{Cb} | 637.9±42.0 ^{Db} | 689.2±43.6 ^{Db} |

两数据后大写字母不同表示差异极显著 $P < 0.01$; 大写字母相同而小写字母不同表示差异显著 $P < 0.05$; 大小写字母相同表示差异不显著, 下表同

In the same row, different capital letters mean the data differ very significantly ($P < 0.01$); Different small letters with identical capital letters mean the data differ significantly ($P < 0.05$); The same letter mean no significant difference between the data. The same as below

表 2 免疫后空肠的 IgA 分泌细胞面积

Table 2 The area of IgA secreting cells in jejunum after vaccination

μm^2

| | 对照组 Normal saline | ND 组 ND vaccine | 大豆黄酮组 ND+Daidzen | CPG DNA 组 ND+CPG DNA | IL-2 组 ND+IL-2 | NaF 组 ND+NaF | LAB 组 ND+LAB |
|-------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 第 3 周 | 319.2±61.4 ^{Cb} | 361.3±41.9 ^{BCb} | 294.3±69.4 ^{Cb} | 349.9±58.6 ^{BCb} | 441.0±39.6 ^{Ba} | 422.7±31.4 ^{Ba} | 898.1±55.6 ^{Aa} |
| 第 5 周 | 458.8±73.1 ^{DEc} | 462.7±78.3 ^{Ed} | 713.3±50.3 ^{CDb} | 936.8±67.6 ^{Aa} | 804.2±40.6 ^{BCb} | 529.6±64.3 ^{Ecd} | 917.6±51.3 ^{ABa} |
| 第 7 周 | 687.6±55.8 ^{Db} | 781.2±59.4 ^{Cb} | 1 194.7±60.8 ^{Aa} | 1 104.3±57.3 ^{Ab} | 929.6±33.3 ^{Bb} | 535.6±43.4 ^{Eb} | 797.4±49.9 ^{Cb} |

表 3 免疫后 Peyer's 斑的 IgA 分泌细胞面积

Table 3 The area of IgA secreting cells in Peyer's Patch after vaccination

μm^2

| | 对照组 Normal saline | ND 组 ND vaccine | 大豆黄酮组 ND+Daidzen | CPG DNA 组 ND+CPG DNA | IL-2 组 ND+IL-2 | NaF 组 ND+NaF | LAB 组 ND+LAB |
|-------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 第 3 周 | 450.8±32.5 ^D | 564.2±75.1 ^C | 607.4±36.2 ^{BC} | 1 041.4±64.5 ^A | 674.9±52.3 ^B | 566.0±68.2 ^C | 1 043.4±52.2 ^A |
| 第 5 周 | 655.3±44.1 ^{Db} | 681.1±70.1 ^{Dbc} | 885.0±44.5 ^{BCb} | 989.1±77.9 ^{Ba} | 1 167.5±64.1 ^{Aa} | 612.6±54.2 ^{De} | 841.7±39.2 ^{Cb} |
| 第 7 周 | 697.2±50.8 ^E | 896.8±49.9 ^D | 1 223.2±75.4 ^B | 1 377.8±83.8 ^A | 1 093.1±69.0 ^C | 633.2±29.8 ^E | 944.6±50.8 ^D |

3 讨论

SIgA 是消化道黏膜免疫的主要效应因子, 目前, 小肠中 IgA 分泌细胞数量的变化已成为评价小肠局部黏膜免疫力的标准之一。例如巴氏杆菌弱毒苗和鸡新城疫弱毒苗经消化道接种后小肠 IgA 分泌细胞数量增加, 显著增加动物对病原微生物的抵抗力, 降低动物的死亡率。

应用黏膜免疫佐剂提高黏膜局部免疫力亦有少量报道。应用甲醛化的革兰氏阳性杆菌作为流感病毒的黏膜免疫佐剂鼻腔免疫小鼠可显著提高系统和黏膜局部的抗体水平^[7]; LT 的 A 亚单位 63 位 S 由 K 代替的突变体 LTK63 安全、无毒性, 可作为细菌、滤过性病毒、寄生性抗原等的黏膜免疫佐剂, 能

显著增加黏膜局部抗体水平^[8]等。本研究用乳酸杆菌、CpG DNA、重组 IL-2、氟化钠和大豆黄酮作为新城疫 IV 系弱毒苗的消化道黏膜免疫佐剂, 结果表明, 乳酸杆菌、CpG DNA、大豆黄酮和重组 IL-2 在整个免疫期内均可显著增加各段小肠中 IgA 分泌细胞数量, 其中乳酸杆菌可以极显著增加各段小肠 IgA 分泌细胞的数量, 但是维持时间较短, 免疫后第 7 周时 IgA 分泌细胞数量有所降低, 提示乳酸杆菌只能短时提高小肠局部细胞免疫水平; 大豆黄酮和 CpG DNA 组在整个免疫期内 IgA 分泌细胞数量都保持上升趋势, 而且免疫后期作用明显, 表明大豆黄酮和 CpG DNA 对机体具有长时间刺激局部免疫反应的作用。由此可见, 这几种黏膜免疫佐剂对小肠局部免疫反应均有促进作用, 只是发挥作用的时间有所

不同。免疫初期,乳酸杆菌和重组 IL-2 组 IgA 分泌细胞数量最多;免疫后期,大豆黄酮和 CpG DNA 组 IgA 分泌细胞数量最多。

氟化钠 (NaF) 作为黏膜免疫佐剂首先是由 Hoshi 等发现的。他们的研究表明 NaF 能够消除口服耐受,引起抗体反应增加^[9],Hoshi 等发现鸡同时口服抗原与 NaF 后,血清 IgG 抗体水平明显增加。尽管鸡群有个体差异,并且抗体滴度较低,但在胆汁和泪液中均检测到 IgA 抗体^[10]。但是,在本试验结果表明,添加 NaF 后对鸡体黏膜局部 IgA 分泌细胞数量没有明显作用。氟是人畜所必需的元素之一,适量氟有助于钙磷的利用,促进动物的生长发育和繁殖等作用。但由于其化学性质活泼,安全范围窄,因此氟化物的使用量非常关键,稍过量的氟就会引起动物氟中毒。黎晓敏等研究了氟化钠对雏鸡半数致死量的测定,发现急性 LD₅₀ 及其 95% 可信限分别为 960.48 mg/kg,594.72~1 326.24 mg/kg^[11]。本试验使用的氟化钠远低于此量,为安全剂量。试验结果发现小肠 IgA 分泌细胞数量降低可能由于 NaF 与小肠直接接触,对组织有一定的损伤,从而引起抑制作用。因此,提示 NaF 作为黏膜免疫佐剂使用时应当慎用。

通过试验发现,本试验应用的 5 种黏膜免疫佐剂中,以大豆黄酮和 CpG DNA 效果最好,能在整个免疫期内显著增加 IgA 分泌细胞的数量,而且在免疫后期 IgA 分泌细胞数量最多。同时,乳酸杆菌和重组 IL-2 能在免疫初期极显著增加 IgA 分泌细胞的数量。因此提示在佐剂应用中可搭配使用,制成复合型黏膜免疫佐剂,在免疫的不同时期内发挥作用,解决黏膜免疫保护力低、时间短的问题,发挥其使用方便、减少动物应激的优点,提高机体的免疫力,更好地为家禽传染病的预防服务。

参考文献:

[1] Holmgren J, Czerkinsky C, lyceke N, *et al.* Mucosal

immunity; Implication for vaccine development[J]. *Immunobiology*, 1992, 184: 157~179.

- [2] 马兴元. 动物口服疫苗研究进展[J]. *动物医学进展*, 1998, 19(2): 1~4.
- [3] 张小飞, 杨倩. 黏膜免疫佐剂的研究进展[J]. *免疫学杂志*, 2004, 20(3): 62~65.
- [4] Mestecky J, Mcghee A J. Immunoglobulin A (IgA): Molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and response [J]. *Advances in Immunology*, 1987, 40: 153~245.
- [5] 杨倩, 练高建, 黄国庆, 等. 半胱胺对鸡小肠黏膜中分泌型 IgA 细胞和上皮内淋巴细胞的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2002, 25(2): 89~92.
- [6] 杨倩, 毛卫华. 鸡和猪分泌型免疫球蛋白 A 结构蛋白的比较[J]. *畜牧与兽医*, 2003, 35(10): 5~7.
- [7] Zanvit P, Havlickova M, Tacner J, *et al.* Immune response after adjuvant mucosal immunization of mice with inactivated influenza virus [J]. *Immunology Letters*, 2005, 97: 251~259.
- [8] Baudner B C, Morandi M, Giuliani M, *et al.* Modulation of immune response to group C meningococcal conjugate vaccine given intranasally to mice together with the LTK63 mucosal adjuvant and the trimethyl chitosan delivery system [J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2004, 189(3): 828~832.
- [9] Hoshi S, Saito N, Kusanaqi K, *et al.* Adjuvant effects of fluoride on oral immunization of chickens [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1998, 63(3): 253~263.
- [10] Hoshi S, Uchino A, Saito N, *et al.* Comparison of adjuvants with respect to serum IgG antibody response in orally immunized chickens [J]. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 1999, 22: 63~69.
- [11] 黎晓敏, 李兴霞. 氟化钠对雏鸡半数致死量的测定 [J]. *西南农业大学学报(自然科学版)* 2003, 25(6): 539~541.