

生长抑素基因免疫对湖羊羔羊生长及 GH 和 IGF- 的影响

薛春林^{1,3} 茆达干¹ 程瑞禾¹ 方永飞⁴ 杨利国^{1,2}

(1. 南京农业大学 动物繁育研究所, 南京 210095; 2. 华中农业大学 动物科技学院, 武汉 430070;
3. 江苏盐城市 畜牧兽医站, 江苏 盐城 224002; 4. 上海永辉羊场, 上海 201804)

摘要 为探讨生长抑素 DNA 疫苗免疫湖羊的效果, 将生长抑素(SS)与乙肝表面抗原(S)基因融合构建真核表达质粒 pES/2SS, 分别与 pE-CpG 质粒、细菌 DNA、脂质体粗品配合及重新构建的 pES/2SS-GMCSF 免疫断奶母羔羊, 4 周后以相同剂量加强免疫 1 次。结果显示, 免疫组的抗体水平高于对照组 ($P < 0.05$), 首次免疫 4 周和加强免疫 2 周后, 细菌 DNA 佐剂组的抗体水平高于生长抑素单独免疫组 ($P < 0.05$), 其抗体阳性率也为各免疫组最高。全期免疫组抗生长抑素抗体阳性率达 36.0%; 免疫羊的增重比对照组高 18.82% ($P < 0.01$)。加强免疫后 2 周, 免疫组的 GH 和 IGF- 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 抗体阳性羊的 GH 和 IGF- 水平显著高于抗体阴性羊 ($P < 0.01$)。分析第 2、4、6 和 10 周所检测的各免疫组湖羊生长抑素抗体 P/N 值、GH、IGF- 及周增重之间的相关性, 发现生长抑素抗体与 GH、IGF-、周增重显著相关 ($P < 0.01$), 周增重与生长抑素抗体 ($P < 0.01$)、GH ($P < 0.01$)、IGF- ($P < 0.05$) 显著相关。结果表明: SS 基因免疫产生 SS 抗体, 有效中和了内源性 SS, 影响了相关激素的分泌, 促进羔羊生长。

关键词 湖羊; 生长抑素; 基因免疫; GH; IGF-

中图分类号 S 811

文章编号 1007-4333(2006)04-0016-07

文献标识码 A

Influence of somatostatin gene immunization on growth and GH and IGF- of Hu lamb

Xue Chunlin^{1,3}, Mao Dagan¹, Cheng Ruihe¹, Fang Yongfei⁴, Yang Ligu^{1,2}

(1. Research Institute of Animal Breeding & 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 & Veterinary, Yancheng 224002, China;
4. YongHui Sheep Breeding Center of Shanghai, Shanghai 201804, China)

Abstract To investigate the immune effect of DNA vaccine against somatostatin (SS) in sheep, the fusion expression plasmid harboring SS and HBsAg S (pES/2SS) was used to immunize the female Hu lambs with different adjuvants, such as the pE-CpG plasmid, E. coli DNA, the crude liposome and immunized with reconstructed plasmid pES/2SS-GMCSF. A booster was administrated four weeks later. The results showed that the level of antibody of immunized group was remarkably higher than in the control ($P < 0.05$). The antibody against SS in the E. coli DNA group was remarkably higher than that in the pES/2SS alone at week 4 after primary immunization and week 2 after booster. The rate of sheep with positive antibody of the E. coli DNA group was the highest in the immunized groups. The rate of sheep with positive antibody of immunized group was 36.0%. Body weight gain of the immunized group was 18.82% higher than that of the control ($P < 0.01$). At two weeks after booster application, GH and IGF- content of the immunized group was remarkably higher compared to the control ($P < 0.05$), that of positive antibody higher than that of negative antibody ($P < 0.01$). Significant correlations between the Ab P/N value and GH ($P < 0.01$), IGF-I ($P < 0.01$) and

收稿日期: 2006-01-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(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, 博士研究生, E-mail: xue-712@sina.com; 杨利国, 教授, 通讯作者, 主要从事动物生物技术研究, E-mail: ylg@mail.hzau.edu.cn

weekly weight gain ($P < 0.01$), also between the weekly body weight gain and the Ab P/N value ($P < 0.01$), GH ($P < 0.01$) and IGF- β ($P < 0.05$) were observed in the groups after SS gene immunization based on the data from the 2nd, 4th, 6th and 10th weeks. These results suggest that the recombinant somatostatin expression plasmid can stimulate Hu Sheep to produce antibody against SS, neutralize endogenous SS and correspondingly result in a change of GH and IGF- β , increase of animal growth.

Key words Hu lamb; somatostatin; gene immunization; GH; IGF-

生长抑素(somatostatin, SS)是下丘脑释放的 14 肽激素,在动物体内具有广泛的抑制作用,特别是对生长及免疫反应具有明显的影响。通过耗竭或免疫中和体内的 SS 水平相应提高生长激素(GH)等水平可促进动物生长^[1],但化学合成 SS 成本高,基因工程生产重组蛋白^[2]纯化繁杂,不利于推广应用;重组痘苗病毒疫苗^[3]免疫动物后,体内产生抗病毒体,影响再次免疫效果。DNA 疫苗制备简单,不需要蛋白质合成、提取与纯化,免疫效果维持时间长,疫苗稳定性好,易保存,是一种很有开发前景的疫苗^[4]。湖羊产于我国太湖流域,性成熟早、四季发情、多胎多产及生长发育快,是我国珍贵的羔皮绵羊品种和肉用品种,但与国外专业肉用绵羊品种产肉性能相比,还有较大的差距。据统计资料,绵羊胴体重世界平均水平为 15 kg,美国 30 kg,而我国只有 12 kg^[5]。为了加快优质肉用湖羊规模化养殖实施进程,一方面要通过本品种选育来提高湖羊的生长速度,另一方面要研究开发基因免疫手段改善其生产性能。应用抑制素重组质粒(PCIS)免疫单胎绵羊,免疫羊的双羔率已达 39.2%^[6];应用生长抑素重组质粒免疫大鼠,成功诱导机体产生抗生长抑素抗体^[7]。基因免疫在不同遗传背景动物体内的免疫效果差异很大^[8],且生长抑素重组质粒能否成功免疫绵羊需实验证明。笔者旨在研究生长抑素基因免疫母羔羊的效果及其内分泌的影响,为应用生长抑素基因免疫技术,促进动物生长奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

pES/2SS 重组质粒由南京农业大学动物繁育研究所曹少先博士等构建^[9];pE-CpG 和 pES/2SS-GMCSF 质粒由笔者构建; *E. coli* DH5 为本室保存;生长抑素标准抗原驴抗羊酶标二抗为 Sigma 公司产品。

1.2 实验动物

60 只 73~90 日龄纯种母湖羊空腹称重,根据

体重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),第 6 组为对照组(C)。

1.3 实验动物免疫、采血

1.3.1 DNA 疫苗及 CpGDNA 制备 按分子克隆方法^[10]抽提和纯化 pES/2SS、pE-CpG 和 pES/2SS-GMCSF 质粒,按文献[11]常规方法提取 *E. coli* DH5 细菌 DNA,反复冻融数次,纯化并定量,用分光光度计测其 OD₂₆₀和 OD₂₈₀,计算其浓度和纯度。

1.3.2 免疫接种 按如下分组进行免疫:T1 组 pES/2SS + pE-CpG; T2 组 pES/2SS + 细菌 DNA; T3 组 pES/2SS-GMCSF; T4 组 pES/2SS + 脂质体; T5 组 pES/2SS; C 组用生理盐水。

采用股四头肌 3 点注射,将疫苗用生理盐水稀释后接种,T1~T5 组每只肌肉接种 4 mL 含免疫原量为 0.4 mg 的稀释液。C 组每只注射 4 mL 生理盐水。佐剂按等量与之混合。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% (质量分数)盐酸利多卡因 4 mL 进行预处理。分别在免疫 0、2、4、6、10 和 14 周同一时段,颈静脉采血,分离血清,-20℃ 保存。

1.4 抗体检测

采用本室建立的 ELISA,即以人工合成的生长抑素为标准抗原,羊血清稀释 50 倍,检测血中抗生长抑素抗体水平。以 $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值 > 2 判为阳性^[12],其中 $A_{450,P}$ 为待测血样的吸光值(OD₄₅₀), $A_{450,N}$ 为阴性对照血样吸光值。

1.5 激素检测

应用放射免疫双抗测定法测定生长激素(GH)和胰岛素样生长因子(IGF- β)含量。GH 检测试剂盒为北京市福瑞生物工程公司产品,IGF- β 检测试剂盒为天津九鼎医学生物工程有限公司产品。

1.6 数据分析

采用 SPSS 进行统计学分析,所有数据均以 $M \pm S$ 表示。组间差异用方差分析法。

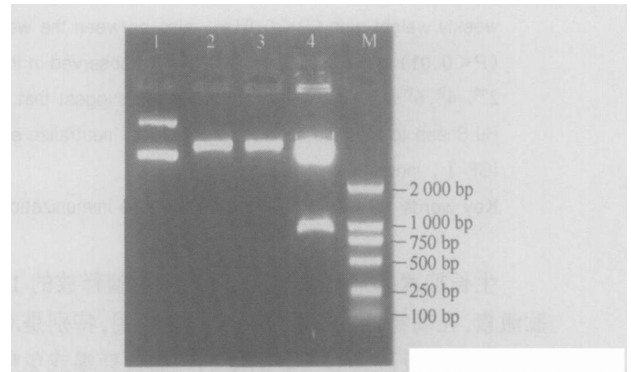
2 结果与分析

2.1 质粒目的基因鉴定和插入 CpG 和 GM-CSF 序列鉴定

用 *EcoR*、*Sal* 分别单酶切和双酶切 pES/2SS。电泳观察,双酶切后产生一条片段在 750~1 000 bp,与设计片段 0.79 kb 大小一致(图 1,泳道 4),说明 pES/2SS 质粒中含有目的基因。在此基础上,插入 GMCSF 序列(该序列由实验室保存的 pCDNA-GMCSF 质粒经 *EcoR*、*Xho* 酶切而得),构建 pES/2SS-GMCSF 质粒。pE-CpG 由空质粒 pEGFP 切下 EGFP 片段,插入 CpG 免疫刺激序列构建而成。

2.2 湖羊血中生长抑素抗体水平

生长抑素重组质粒首次免疫后 4 周,免疫组抗体 $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值均呈上升趋势,各组 $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$) (表 1),T2 与 T5 组 $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值差异显著 ($P < 0.05$)。加强免疫 2 周后,免疫组的 $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值进一步提高,与对照组相比有极显著差异 ($P < 0.01$);T2 与 T5 组 $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值差异显著 ($P <$



1. pES/2SS; 2. pES/2SS/*EcoR* I; 3. pES/2SS/*Sal* I; 4. pES/2SS(*EcoR* I+*Sal* I); M: DL2 000

图 1 pES/2SS 酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pES/2SS by restriction endonucleases digestion

0.05)。在首次免疫和加强免疫后 T2 与 T5 组 $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值均有显著差异,说明 *E. coli* DH5 细菌 DNA 具有明显的免疫增强作用。加强免疫 6 周后各免疫组的 $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值呈下降的趋势,加强免疫 10 周后免疫组的 $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值下降显著,抗体阳性率降为 16.0%。两次免疫湖羊后,有 36% (18/50) 的个体产生了生长抑素抗体(表 2)。

表 1 生长抑素基因免疫湖羊血清抗生长抑素抗体 $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值

Table 1 $A_{450,P}/A_{450,N}$ value of serum antibody against ss in Hu sheep after SS gene immunization

组别	样本数	PW2 w	PM4 w	BM2 w	BM6 w	BM10 w
T1	10	1.69 ±0.35 Aa	1.80 ±0.35 Aa	2.21 ±0.53 Bacd	1.73 ±0.37 Ac	1.56 ±0.39 Aa
T2	10	1.69 ±0.40 Aa	2.14 ±0.53 Aa	2.94 ±1.20 Ba	2.27 ±1.08 ABa	1.85 ±0.39 Aa
T3	10	1.51 ±0.31 Aa	1.79 ±0.42 Aac	2.44 ±1.21 Bcd	1.94 ±0.49 ABac	1.67 ±0.43 Aa
T4	10	1.68 ±0.32 Aa	1.87 ±0.77 Aac	2.12 ±0.60 Ace	1.86 ±0.54 Aac	1.67 ±0.48 Aa
T5	10	1.56 ±0.27 Aa	1.63 ±0.41 ABc	1.97 ±0.39 Bde	1.87 ±0.33 ABac	1.71 ±0.26 ABa
TT	50	1.59 ±0.33 a**	1.85 ±0.52 ac**	2.32 ±0.91 acd**	1.93 ±0.62 ac**	1.70 ±0.37 a**
CK	10	1.05 ±0.15 Ab	1.04 ±0.31 Ab	0.95 ±0.12 Ab	1.04 ±0.16 Ab	0.96 ±0.07 Ab

注: TT=T1+T2+T3+T4+T5,CK为对照组。PM2w 为首次免疫后第 2 周;PM4w 为首次免疫后第 4 周;BM2w 为加强免疫第 2 周;BM6w 为加强免疫第 6 周;BM10w 为加强免疫第 10 周。同一行中大写字母有相同者为差异不显著,大写字母完全不同者为差异显著;同一列中小写字母相同者表示差异不显著,不同者表示差异显著。*表示与对照组相比, $P < 0.05$; **表示与对照组相比, $P < 0.01$ 。下同。

2.3 生长抑素基因免疫对湖羊 GH 的影响

生长抑素基因首次免疫后,免疫组的 GH 水平有所上升,但与免疫前以及对照组同期相比,差异不显著 ($P > 0.05$)。免疫后第 6 周(加强免疫后第 2

周),免疫组的 GH 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$),且各免疫组的 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 ($P > 0.05$) (表 3)。

表 2 免疫各组的抗体阳性湖羊比较

Table 2 Comparison of sheep with positive antibody SS in different groups

组别	PM2w		PM4w		PM2w		PM6w		PM10w	
	R/ %	Max	R/ %	Max	R/ %	Max	R/ %	Max	R/ %	Max
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 ab	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 ab	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 ab	2.24
TT	12.0 a	2.45	20.0 ab	3.61	36.0 ab	4.82	22.0 a	4.45	16.0 ab	2.25

注：R 表示阳性率，Max 表示抗体最大 $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值

首次免疫后，抗体阳性和抗体阴性羊的 GH 含量均有微量上升，但两者差异不显著 ($P > 0.05$)。加强免疫后第 2 周，抗体阳性羊的 GH 含量高于抗

体阴性羊 ($P < 0.01$)。加强免疫后第 6 周 GH 含量开始下降，抗体阳性羊与抗体阴性羊的 GH 值差异不显著 ($P > 0.05$) (图 2)。

表 3 生长抑素基因免疫前后血清 GH 水平

Table 3 GH level in blood sera of ewes before and after SS gene immunization

ng/L

组别	样本数	PM0	PM2w	PM4W	BM2w	BM6w
T1	10	2.39 ±0.55 Aab	2.32 ±0.55 Ab	3.18 ±0.84 Ba	3.11 ±0.45 Ba	2.24 ±0.46 Aab
T2	10	2.67 ±0.95 ab	2.96 ±0.42 Aa	2.46 ±0.70 Aa	2.78 ±1.17 Aa	2.55 ±0.91 Aa
T3	10	2.12 ±0.63 Ab	2.29 ±0.49 ABb	2.41 ±1.26 ABa	2.78 ±0.32 Ba	2.02 ±0.61 Ab
T4	10	2.84 ±1.06 Aa	2.42 ±0.57 Aab	2.89 ±0.89 Aa	3.13 ±0.57 Aa	2.71 ±1.01 Aa
T5	10	2.31 ±0.48 Aab	2.55 ±0.97 Aab	2.51 ±1.04 Aa	2.85 ±1.32 Aa	2.21 ±0.46 Aab
TT	50	2.43 ±0.73 ab	2.47 ±0.65 ab	2.64 ±0.94 a	2.75 ±0.86 a**	2.30 ±0.67 ab
CK	10	2.40 ±0.50 Aab	2.22 ±0.50 Ab	2.29 ±0.88 Aa	1.92 ±0.22 Ab	2.15 ±0.29 Aab

注：PM0 为免疫前 0 天。

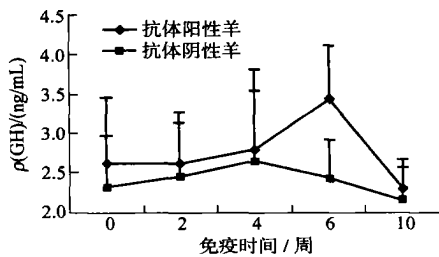


图 2 生长抑素基因免疫抗体阳性羊与抗体阴性羊血清 GH 水平

Fig. 2 Level of GH in blood sera of ewes with positive and negative antibodies against SS after immunization

The content of GH positive antibody was remarkably higher than that of negative antibody at week 6 after primary immunization ($P < 0.01$).

2.4 生长抑素基因免疫对湖羊 IGF- 的影响

生长抑素基因首次免疫后，免疫组的 IGF- 与对照组比略高，但差异不显著 ($P > 0.05$)。加强免疫后 2 周，IGF- 含量达到峰值，免疫组血浆中

IGF- 含量与对照组同期相比，差异显著 ($P < 0.05$) (表 4)。加强免疫后 6 周，免疫组血浆中 IGF- 含量有所下降，但 T2、T3 组仍显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

首次免疫后，抗体阳性羊与阴性羊血中 IGF- 含量变化不明显，两者相比较差异不显著 ($P > 0.05$)。加强免疫后 2 周，抗体阳性羊血中 IGF- 含量高于阴性羊，且差异显著 ($P < 0.01$) (图 3)。至免疫后 10 周，IGF- 值逐步下降，两者差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.5 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，免疫各组 (除 T3 组外) 的增重与对照组相比，差异不显著 ($P > 0.05$) (表 5)。加强免疫后 2 周 (首免 6 周)，T1、T2、T3 组增重高于同期对照组 ($P < 0.05$)。从试验全期 14 周来看，免疫各佐剂组，其增重均明显高于对照组 ($P < 0.01$)。

此结果与上述生长抑素抗体以及 GH、IGF⁻ 变化趋势一致,提示 SS 基因免疫产生 SS 抗体,有效中

和了内源性 SS,影响了相关激素的分泌,促进羔羊生长。各因素间相关程度见表 6。

表 4 生长抑素基因免疫前后血清 IGF⁻ 水平

Table 4 IGF⁻ level in blood sera of ewes before and after SS gene immunization

组别	PM0	PM2w	PM4w	BM2w	BM6w
T1	456.91 ±63.55 ABa	431.17 ±51.65 Aa	466.46 ±49.14 ABa	499.02 ±19.53 Ba	465.67 ±55.78 ABab
T2	467.44 ±31.89 ABa	454.19 ±30.84 Aa	476.95 ±41.22 ABa	492.16 ±26.24 Ba	490.52 ±33.30 Ba
T3	485.39 ±66.30 Aa	458.77 ±50.88 Aa	491.84 ±33.32 Aa	499.72 ±39.61 Aa	495.46 ±54.95 Aa
T4	450.95 ±44.95 ABa	424.97 ±49.00 Aa	485.42 ±56.58 Ba	484.62 ±27.12 Ba	458.97 ±52.92 ABab
T5	462.67 ±33.33 ABa	447.10 ±23.69 Aa	459.99 ±42.11 ABa	490.82 ±44.67 Ba	482.87 ±25.60 Ba
TT	456.80 ±43.68 a	439.41 ±46.87 a	472.12 ±44.93 a	486.96 ±36.52 a	478.96 ±46.31 a
CK	439.40 ±33.38 Aa	419.41 ±61.78 Aa	452.03 ±41.65 Aa	453.34 ±44.30 Ab	434.05 ±56.131 Ab

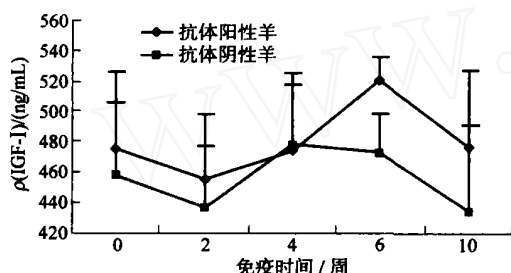


图 3 生长抑素基因免疫抗体阳性羊与抗体阴性羊血清 IGF⁻ 水平

Fig. 3 Level of IGF⁻ Level of IGF⁻ in blood sera of ewes with positive and negative antibody against SS after immunization

The content of IGF⁻ of positive antibody was remarkably higher than that of negative antibody in six week after primary immunization.

表 5 生长抑素基因免疫母羔羊增重

Table 5 Gain of female female Hu Sheep after SS gene immunization kg

组别	样本数	免疫后时间/周		
		2	6	14
T1	10	1.35 ±0.43 ab	4.40 ±0.59 ac	11.88 ±1.15 a
T2	10	1.25 ±0.62 ab	5.0 ±0.83 a	11.75 ±1.66 a
T3	10	1.47 ±0.58 a	4.93 ±2.10 a	10.83 ±1.27 ac
T4	10	1.06 ±0.45 ab	3.86 ±0.87 bc	10.88 ±1.27 ac
T5	10	1.15 ±0.64 ab	4.08 ±0.78 bc	9.05 ±1.67 bc
TT	50	1.26 ±0.54	4.30 ±1.0	10.61 ±1.96
CK	10	0.88 ±0.48	3.48 ±1.01 b	8.93 ±1.46 b

表 6 免疫组生长抑素抗体(Ab)与 GH、IGF⁻、周增重之间的相关系数

Table 6 Correlation coefficients among SS Ab, GH, IGF⁻ and body weight gain per week

	Ab	GH	IGF ⁻	BW
Ab	1	0.811**	0.685**	0.706**
GH	0.811**	1	0.378	0.747**
IGF ⁻	0.685**	0.378	1	0.533*
BW	0.706**	0.747**	0.533*	1

注:BW 为周增重。

3 讨论

3.1 母羔羊对生长抑素基因疫苗的免疫反应性

1) 生长抑素疫苗的免疫原性。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^[14]。本实验将生长抑素基因分别融合到 HBsAgS 区的第 112 与 113 氨基酸密码之间、S 区的 3 末端,并与真核表达质粒 pEGFP-N₁ 重组,构建的基因疫苗在动物体内表达的是 SS 与乙肝表面抗原的融合蛋白。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,且表达具有生长抑素免疫学活性。

2) 免疫佐剂的选择。本试验中采用 Cp GDNA、GMCSF、脂质体粗品作为免疫佐剂,生长抑素基因首次免疫 4 周内的生长抑素抗体水平呈上升趋势,但抗体的 OD 值均较低,加强免疫 2 周后产生的生长抑素抗体水平继续上升,首免后 4 周和加强免疫

后2周,均显著高于对照组($P < 0.01$)。在首次免疫和加强免疫T2与T5组 $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值均有显著差异,表明所提取的*E. coli* DH5 细菌DNA具有强烈的免疫刺激作用。Sato证实含CpG免疫增强序列的质粒DNA与不含CpG的对照组相比,免疫应答显著增强^[15];GM-CSF作为免疫佐剂,可以克服DNA疫苗免疫原性差的缺陷^[16]。脂质体可以与细胞膜融合,从而将包于其中的外源基因导入细胞内,而且对细胞无毒害作用,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。张晓梅等对小鼠的股四头肌进行盐酸普鲁卡因处理20 min后肌肉注射HBsAg质粒100 μ g,获得了高滴度的抗体,其效果比基因枪的效果还好^[17]。因为大动物的结缔组织比较丰富,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) 免疫剂量的确定。用15、25和40 μ g抑制素基因免疫大鼠,剂量的增加并没有增加阳性大鼠的比率,3种基因免疫剂量产生的抑制素抗体水平无显著差异^[17];用抑制素基因免疫绵羊的效果并没有完全随着剂量的增加而提高,分析抗体 $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值、抗体阳性率及其相关性,发现在所设置的0.2、0.4和0.8 mg/只试验剂量中0.4 mg/只为最佳免疫剂量^[8]。本试验参考抑制素基因免疫研究结果,采用每只肌肉注射接种免疫原量为0.4 mg的稀释液,佐剂按等量与之混合,实验结果证明, $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值与阳性率、生长速度、激素水平呈强正相关。

3.2 生长抑素基因免疫对GH和IGF-1的影响

Varner等在对于羔羊SS的免疫时发现基线和总生长激素的水平较对照有显著的增加($P < 0.05$),生长激素分泌的峰强度也有一定程度的提高($P > 0.05$)^[19]。SS免疫动物后,在抗体滴度较低的情况下,免疫动物生长激素基础水平和生长激素分泌的面积仍然较高^[20]。在随后的研究中表明,SS的免疫也可增加IGF-1和甲状腺素水平,而对于泌乳素和胰岛素水平没有影响^[21]。一般而言SS的免疫对于激素水平的影响往往变化较大。本试验中生长抑素基因免疫,首次免疫后4周和加强免疫2周内,免疫组抗体 $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值均呈上升趋势,各组 $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值与对照组相比差异极显著($P < 0.01$),加强免疫各相关值升高显著,SS抗体 $A_{450,P}/A_{450,N}$ 值在达到峰值后,GH和IGF-1上升

较快。提示SS基因免疫产生SS抗体,有效中和了内源性SS,影响了相关激素的分泌。本实验在首次免疫后到加强免疫的2周内,对照组IGF-1水平从439.40 ng/mL上升为453.34 ng/mL,而实验组则从456.80 ng/mL上升为486.96 ng/mL,试验前期即初免后,动物生长激素水平变化不明显,加强免疫2周内,变化明显,且疫苗组(除T4组外)与生理盐水对照组相比,增幅明显,两者比较差异显著($P < 0.05$)。生长抑素多肽疫苗免疫对动物血浆中GH和IGF-1的影响研究结果很不一致。用生长抑素主动免疫绵羊,GH的基础水平和脉冲分泌均未改变,IGF-1水平下降^[22],因此认为SS免疫中和的效果似乎表现出物种和时间的依赖性,生长抑素免疫对GH和IGF-1影响的机制还有待阐明。

3.3 生长抑素基因免疫对湖羊生长的影响

SS主动免疫能够促进动物生长^[1]。这主要与受试动物和选用的抗原有关,不同动物免疫反应的强弱不同,同种类甚至同群动物中,抗体产生强度和速度也有明显变化,弱的抗体反应可能是有的报道中增重效果不明显的原因所在^[23]。SS免疫对生长缓慢、非培育品种和雌性动物影响显著。不同的抗原产生的免疫反应强弱不同,这可能是某些实验中抗体滴度太低的原因之一^[24]。因此,除了适宜的免疫原外,采用适当的免疫程序对于有效的免疫应答的维持是必要的,而这也可能是影响增重效果的重要因素^[23]。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。本研究中,选择我国地方优良品种湖羊母羔作为受试动物,用生长抑素基因疫苗免疫,免疫各佐剂组,其增重均明显高于对照组($P < 0.01$),而同期的不加佐剂的疫苗组,增重与对照组无明显差异($P > 0.05$)。说明各佐剂组通过增强抗体反应,提高增重效果。

参 考 文 献

- [1] Spencer G S G, Williamson E D. Increased growth in lambs following immunization against somatostatin: Preliminary observations[J]. *Animal Production*, 1981, 2: 376-378
- [2] 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
- [3] 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

- [4] 孙树汉,戴建新,张平武,等. 核酸疫苗[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2000
- [5] Yang L G. Hu Sheep[M]. CAB International, 2002
- [6] 张德坤,杨利国,张红琳,等. 抑制素基因免疫诱导单胎绵羊孪生的研究[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(4): 40~45
- [7] 曹少先,张文伟,茆达干,等. 生长抑素基因疫苗质粒 pcS/2SS 的构建、表达及免疫[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(4): 477~481
- [8] 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, packaging-defective virus genome induces protective immunity against herpes[J]. Proc Natl Acad Sci, 1999, 96(22): 12697~12702
- [9] 曹少先,杨利国,张文伟,等. 生长抑素基因疫苗质粒 pEGS/2SS 的构建及表达[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(5): 499~501
- [10] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2002
- [11] 奥斯伯 E, 金斯顿 R E, 布伦特 R, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖译. 北京: 科技出版社, 1999: 39~40
- [12] 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
- [13] 茆达干, 杨利国, 曹少先, 等. 影响基因疫苗免疫效果的因素[J]. 中国免疫学杂志, 2004, 20(5): 360~363
- [14] 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
- [15] Sato Y, Roman M, Tighe H, et al. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization[J]. Science, 1996, 273: 352~354
- [16] 李光金, 李颖杰, 严维耀, 等. CpG DNA 增强口蹄疫病毒 DNA 疫苗诱发豚鼠产生的免疫应答[J]. 科学通报, 2001, 46(6): 477~480
- [17] 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. Review
- [18] 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
- [19] 茆达干, 杨利国, 叶荣, 等. 抑制素 (1~32) 基因免疫对大鼠卵泡发育和生殖激素的影响[J]. 中国农业科学, 2003, 36(12): 1554~1559
- [20] 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
- [21] Dubreuil P, Pelletier G, Petitclerc D, et al. Effects of active immunization against somatostatin on serum growth hormone concentration in growing pigs: influence of fasting and repetitive somatostatin injections Endocrinology[J]. Endocrinology, 1989, 125: 1378~1384
- [22] 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
- [23] Magnan E, Mazzocchi L, Cataldi M, et al. Effect of actively immunizing sheep against growth hormone-releasing hormone or somatostatin on spontaneous pulsatile and neostigmine-induced growth hormone secretion [J]. J Endocrinol, 1995, 144(1): 83~90
- [24] Hoskinson R M, Djura P, Welch R J, et al. J Potential of immunization for increasing animal production [J]. J of Agri Sci, 1991, 116: 175~181
- [25] Deligeorgis S G, Rogdakis E, Mentzios A, et al. Anote on the effect of active immunization against somatostatin on milk production and growth in sheep [J]. Anim Prod, 1988, 46: 304~308