

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.5.02

CpG ODN 对水貂免疫增强效果的研究

冷 雪,董 鹏,胡桂学,李建明,刘 艺,孙志博,张姗姗,杜 锐*

(吉林农业大学中药材学院,长春 130118)

[收稿日期] 2016-11-29 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280 (2017) 05-0007-05 [中图分类号]S858.92

[摘 要] 为获得对水貂具有免疫刺激活性的 CpG ODN 序列,设计合成了 45 种含不同 CpG 基序的 DNA 序列,应用 MTS 比色法测定合成 CpG ODNs 刺激水貂 PBMC 增殖的能力,结果有 11 条 CpG ODN 对水貂 PBMC 有刺激活性($SI>2$);应用 SI 值大于 5 的 6 种 CpG ODN 分别与水貂伪狂犬灭活疫苗联合免疫水貂,免疫后经水貂血清抗伪狂犬中和抗体效价测定和水貂 PBMC 非特异性增殖效应检测,结果有 3 个 CpG ODN 序列对水貂具有较好免疫增强作用,分别是 CpG-21 (ATCGATTTGTCGTTATCGAT)、CpG-23 (ATCGATGAACGTTAACGTTTC) 和 CpG-24 (AACGTTTCATCGATATCGATGT)。本研究获得 3 条对水貂具有较好免疫刺激活性的 CpG ODN 序列,可为水貂新型 CpG 佐剂的研究提供参考。

[关键词] CpG ODN;佐剂;水貂;细胞增殖

Study on Immune Enhancement Effect of CpG ODN on Mink

LENG Xue, DONG Peng, HU Gui-xue, LI Jian-ming, LIU Yi, SUN Zhi-bo, ZHANG Shan-shan, DU Rui*

(College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Corresponding author: DU Rui, E-mail: durui71@126.com

Abstract: Forty-five DNA sequences containing different CpG motifs were designed and synthesized to obtain the CpG ODN sequence with immunostimulatory activity against mink. MTS colorimetric assay was used to determine the ability of CpG ODNs to stimulate the proliferation of mink PBMC. The result showed that eleven CpG ODN has the stimulation activity to the PBMC of mink ($SI>2$). Six CpG ODNs with SI values more than 5 were used to immunize minks with mink pseudorabies inactivated vaccine respectively. Post immunization, the neutralizing antibody titer of anti-pseudorabies antibodies in mink serum was determined and the non-specific proliferation of mink PBMC was tested. The result showed that the CpG-21 (ATCGATTTGTCGTTATCGAT), CpG-23 (ATCGATGAACGTTAACGTTTC), and CpG-24 (AACGTTTCATCGATATCGATGT), respectively, which showed a good immunopotentiating effect on mink. In this study, three CpG ODN sequences with good immunostimulatory activity against mink were obtained, which can be used as a reference for the study of new CpG adjuvants in mink.

Key words: CpG ODN; adjuvants; mink; proliferation

基金项目: 吉林省科技发展规划项目(20140307008NY,20140412009XH)

作者简介: 冷 雪,博士,从事动物病毒学与生物制品学方向研究。

通讯作者: 杜 锐。E-mail: durui71@126.com

含非甲基化 CpG 基序的寡聚脱氧核苷酸(CpG ODN)通过与细胞中的 TLR9 结合,能刺激人及哺乳动物的天然免疫系统,诱导产生以 Th1 型为主的天然免疫应答^[1-2],在作为佐剂方面显示出巨大的应用潜力。根据 CpG ODN 的结构和对人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)作用的不同,可将其分为 3 种类型:A 型(或 D 型)、B 型(或 K 型)和 C 型。A 型 CpG ODN 能够直接刺激 pDC 分泌高水平 IFN- α/β 。同时,通过 I 型 IFN 的作用,A 型 CpG ODN 还能够促进单核细胞向 DC 发展,促进其 CD80、CD86、MHCII 分子表达的上调;间接活化 NK 细胞,刺激 IFN- γ 诱导蛋白(IFN- γ inducible protein-10, IP-10)的产生,进而诱导 IFN- γ 的产生。B 型 CpG ODN 能刺激 B 细胞增殖和活化,刺激 IgM 和 IL-6 的分泌增加;C 型 CpG ODN 兼有 A 型和 B 型 CpG ODN 的免疫刺激活性,既能诱导 pDC 分泌高水平的 IFN- α ,又能刺激 B 细胞活化增殖^[3-5]。3 种类型的 CpG ODN 中,由于 B 型具有强大的促进体液免疫和细胞免疫应答的作用,因此,近年来已被作为新型佐剂用于多种疫苗的研究^[6-8]。

目前,针对于动物用新型佐剂 CpG ODN 的研究主要集中于牛、猪、鸡和犬等,而对水貂具有免疫刺激活性的 CpG ODN 序列的研究尚未报道,因此,本研究以对不同种类动物具有免疫刺激活性的 CpG 基序为核心,设计合成多条 CpG ODN 序列,分析其对水貂的免疫刺激活性,获得了 3 条对水貂具有较好免疫刺激活性的 CpG ODN 序列,为水貂用新型 CpG 佐剂的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 IMDM 细胞培养液和 MEM 细胞培养液均购自 Gibco 公司;胎牛血清、外周血单个核细胞分离试剂盒均购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;ConA 购自上海研生实业有限公司;MTS 购自 Promega 公司。

1.1.2 细胞和病毒 猪睾丸细胞由本实验室保存。伪狂犬病毒 JL1 株,由本实验室分离鉴定。

1.1.3 疫苗和实验动物 伪狂犬灭活疫苗由实验室应用分离的伪狂犬病毒 JL1 株经灭活后与 ISA206 佐剂混合制备,每毫升病毒含量为 $10^{7.0}$ TCID₅₀。新生 2 月龄健康水貂,体重约 600 g,均为雌性水貂,未进行疫苗接种,购自黑龙江帽儿山水貂养殖场。

1.2 方法

1.2.1 CpG ODN 的设计合成 根据文献报道的分别对人、猪、犬和猫有效的 CpG 基序,包括 GTCGTT、GACGTT、GACGAT、ATCGAT、AACGTT,设计合成 45 条 CpG ODN 序列;GC-ODN 为不含 CpG 基序的阴性序列;全部 CpG ODN 的核酸骨架进行硫代修饰,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 水貂外周血 PBMC 的分离和培养 水貂心脏采血,用含肝素的无菌真空采血管收集血液,将血液于室温以 250 r/min 离心 10 min,弃去血浆。按照外周血单个核细胞分离试剂盒使用说明,加入弃去血浆体积 1.5 倍的稀释液,轻轻混匀。将经稀释处理的血液缓慢加入等量的分离液液面上,400 r/min 室温离心 20 min。吸弃分离液上层 0.5 cm 以上的上清液,吸取剩余分离液层及单个核细胞层,加入 10 mL 细胞洗涤液,混匀。250 r/min 室温离心 10 min,弃上清,加入 5 mL 细胞洗涤液重悬细胞,250 r/min 室温离心 10 min,弃上清。重复洗涤一次,加入 5 mL 含 10% 胎牛血清的 IMDM 营养液重悬细胞,吹打均匀,取出部分细胞计数待用。

1.2.3 CpG ODN 刺激水貂 PBMC 增殖能力检测

将水貂 PBMC 浓度调至 4.0×10^6 个/mL,接种于 96 孔细胞培养板,每孔 100 μ L。分别加入阴性对照 GC-ODN 和设计合成的 45 条 CpG ODN,CpG ODN 的终浓度为 10 μ g/mL;阳性对照孔加入 ConA 溶液,终浓度为 10 μ g/mL;空白组加入与 CpG ODN 等体积的 PBS,每组 3 个复孔。将 96 孔细胞培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。培养结束前 4 h 每孔加入 20 μ L MTS 溶液,培养结束后立即用酶标仪检测各孔波长 490 nm 的 OD 值,计算刺激指数:SI=(OD 样品-OD 空白)/(OD 阴性-OD 空白)。

1.2.4 动物分组及免疫 将试验水貂随机分成

8 组,每组 5 只。疫苗组,每只注射伪狂犬灭活疫苗 1 mL;疫苗+CpG ODNs 组,每只注射 1 mL 伪狂犬灭活疫苗和 80 μg CpG ODNs,所使用 CpG ODNs 为对水貂 PBMC 具有刺激活性,且 SI 值大于 5 的 CpG-2、CpG-7、CpG-10、CpG-21、CpG-23 和 CpG-24,分别与疫苗联合免疫;对照组,每只注射 1 mL 灭菌 PBS 液;注射部位均为后腿部肌肉。各组水貂均于初次免疫后 2 周加强免疫 1 次,注射部位及剂量与初次免疫相同。首次免疫当日,免疫后 7、14、21 和 28 d 分别采血,分离血清,使用 Spearman-Kärber 法计算中和抗体效价,中和抗体效价大于 1 : 2 为阳性,中和试验中使用伪狂犬病毒滴度范围为 500~3000 TCID₅₀/mL。

1.2.5 免疫后水貂 PBMC 非特异性增殖效应

1.2.4 中水貂二次免疫后 14 d,心脏采血,用含肝素的无菌真空采血管收集血液,按照 1.2.2 中方法分离水貂 PBMC,按照 1.2.3 中方法将水貂 PBMC 接种于 96 孔细胞培养板,每个样品设 3 个重复,每孔加入终浓度为 10 μg/mL 的 ConA,同时每个样品设不加 ConA 的自然增殖孔作为对照。将 96 孔细胞

培养板置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。培养结束前 4 h 每孔加入 20 μL MTS 溶液,培养结束后立即用酶标仪检测各孔波长 490 nm 的 OD 值。

1.2.6 统计学分析 应用 SPSS11.0 软件进行统计学分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用完全随机试验方差分析 (LSD/Tamhane) 的方法,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 CpG ODN 刺激水貂 PBMC 增殖能力检测

由表 1 可知,淋巴细胞转化方法测定 45 条 CpG ODN 刺激水貂 PBMC 增殖能力,有 11 个 CpG ODN 序列对水貂 PBMC 具有刺激活性 (SI>2) (表 1),其所含 CpG 基序分别为 ATCGAT、AACGTT、GTCGTT,其中 CpG-2 (TCAACGTTGAACGTTTAACGTTA)、CpG-7 (ATCGATATCGATATCGAT)、CpG-10 (TCAACGTTCCAACGTTT) 和 CpG-21 (ATCGATTTGTCGTTATCGAT) 四条序列的 SI 值均大于 5,CpG-23 (ATCGATGAACGTTAACGTTTC) 和 CpG-24 (AACGTTTCATCGATATCGATGT) 二条序列的 SI 值均大于 10。

表 1 对水貂 PBMC 具有刺激活性的 CpG ODN 序列

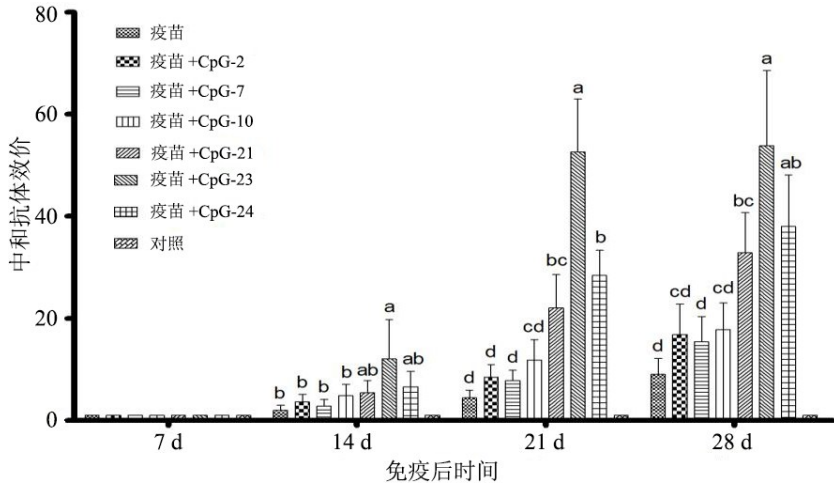
Tab 1 CpG ODN sequence with stimulatory activity to mink PBMC					
组别	OD 值	SI 值	组别	OD 值	SI 值
ConA	0.519±0.015	16.43	CpG-10	0.453±0.006	8.78
GC-ODN	0.385±0.004	1.00	CpG-14	0.408±0.017	3.72
空白对照	0.376±0.003	—	CpG-15	0.400±0.006	2.69
CpG-2	0.427±0.016	5.793	CpG-17	0.400±0.032	2.62
CpG-5	0.396±0.015	2.25	CpG-21	0.451±0.016	8.58
CpG-7	0.421±0.012	5.13	CpG-23	0.505±0.012	14.87
CpG-9	0.394±0.025	2.09	CpG-24	0.500±0.011	14.26

2.2 CpG ODN 序列对水貂伪狂犬灭活疫苗中和抗体效价的影响 由图 1 可知,将伪狂犬灭活疫苗分别与 CpG-2、CpG-7、CpG-10、CpG-21、CpG-23 和 CpG-24 联合免疫水貂,免疫前各组水貂抗伪狂犬病毒中和抗体水平均小于 1 : 2,初次免疫后第 14 d,疫苗组和疫苗+CpG ODNs 组水貂血清中开始产生抗伪狂犬病毒中和抗体,初次免疫后第 21 d

和 28 d 各免疫组中和抗体水平均明显高于对应组第 14 d 的中和抗体水平 (图 1)。其中疫苗+CpG-23 组血清中和抗体效价高于疫苗单独接种组和其他疫苗+CpG ODNs 组,且差异显著 ($P < 0.05$);疫苗+CpG-24 组血清中和抗体效价高于疫苗单独接种组和疫苗+CpG-2 组、疫苗+CpG-7 组和疫苗+CpG-10 组;疫苗+CpG-21 组与疫苗+CpG-10 组

血清中和抗体效价无明显差异,但明显高于疫苗组和疫苗+CpG-2组、疫苗+CpG-7;疫苗组、疫苗+CpG-2组、疫苗+CpG-7组和疫苗+CpG-10组间血

清中和抗体效价无明显差异($P>0.05$)。试验期内,空白对照组水貂血清始终未检测到抗伪狂犬病毒中和抗体。



同一时间点各组抗体水平标注不相同字母者为差异显著($P<0.05$);免疫0 d 各组水貂抗伪狂犬病毒中和抗体均为阴性,因此未在图中显示
At the same time point, each group of antibody levels are marked with different letters show the difference was significant ($P<0.05$) .
Immunization 0 d each group of mink anti-pseudorabies virus neutralizing antibody were negative, so not shown in the figure

图1 不同 CpG ODN 序列与疫苗联合免疫后水貂血清中和抗体水平

Fig 1 Neutralizing antibody level of mink serum after immunization with different CpG ODN sequences and vaccine

2.3 水貂 PBMC 非特异性增殖效应 由表 2 可知,与对照组相比,疫苗组、疫苗+CpG ODNs 组水貂 PBMC 经 ConA 诱导的增殖反应均明显增强,且差异显著($P<0.05$);疫苗+CpG-23 组、疫苗+CpG-24 组水貂 PBMC 经 ConA 诱导的增殖反应高于疫苗组和其它疫苗+CpG ODNs 组,且差异显著($P<0.05$);疫苗+CpG-10 组和疫苗+CpG-21 组间无显著差异,高于疫苗组、疫苗+CpG-2 组和疫苗+CpG-7,且差异显著($P<0.05$);疫苗+CpG-2 组、疫苗+CpG-7 和疫苗组间无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

CpG ODN 作为新型佐剂,其作用机理主要通过通过与细胞中的 TLR9 结合,激活机体的天然免疫应答,促进抗病毒细胞因子及抗体的产生,从而增强疫苗的免疫保护效果。CpG ODN 作为疫苗佐剂在人用乙肝疫苗已进入临床阶段。在与动物疫苗,如鸡新城疫疫苗、猪繁殖障碍与呼吸道综合征疫苗和犬瘟热疫苗等联合使用中也表现出较好的增强作用^[9-11]。不同类型 CpG ODN 佐剂效应存在很大差异,在影响 CpG ODN 免疫刺激活性的各种因素中起到最关键作用的是以 CpG 为核心的六

表2 各组水貂 PBMC 非特异性增殖效应
Tab 2 Non-specific proliferation of mink PBMC in various groups

组别	自然增殖孔	ConA 刺激孔
对照组	0.376±0.002	0.511±0.010 ^e
疫苗组	0.428±0.011	0.798±0.022 ^d
疫苗+CpG-2 组	0.454±0.014	0.831±0.010 ^d
疫苗+CpG-7 组	0.475±0.012	0.858±0.015 ^d
疫苗+CpG-10 组	0.539±0.010	0.980±0.015 ^e
疫苗+CpG-21 组	0.582±0.010	0.977±0.016 ^e
疫苗+CpG-23 组	0.638±0.011	1.277±0.013 ^a
疫苗+CpG-24 组	0.589±0.006	1.056±0.018 ^b

同一行中含有不相同字母者为差异显著($P<0.05$)
The same column contains different letters show the difference was significant ($P<0.05$)

核苷酸基序,研究表明 CpG 基序 GTCGTT 对人及多种哺乳动物敏感,CpG 基序 GACGTT 对鼠敏感,CpG 基序 GTCGTT 和 ATCGAT 对猪敏感,CpG 基序 AACGTT 对犬敏感^[12-14]。由于目前还没有水貂敏感基序方面的报道,本研究参考多种 CpG 六核苷酸基序设计合成 CpG ODN 序列,经体外淋巴细胞转

化试验和动物免疫试验,结果表明,CpG-21、CpG-23 和 CpG-24 对水貂具有较好的免疫刺激活性,其所含 CpG 基序分别为 GTCGTT、ATCGAT 和 AACGTT,其中 CpG-21 所含 CpG 基序为 ATCGAT 和 GTCGTT,CpG-23 和 CpG-24 所含 CpG 基序均为 AACGTT 和 ATCGAT,而 CpG-23 和 CpG-24 对水貂的免疫增强作用更为明显,说明 AACGTT 基序和 ATCGAT 基序组合可能对水貂具有更好的刺激活性。对于 CpG 基序的研究多集中于单个 CpG 六核苷酸基序的重复,本研究将不同 CpG 基序进行组合,并取得了较好的刺激效果,为 CpG ODN 的设计提供参考。近年来,水貂感染伪狂犬病毒的病例不断增加,而目前尚无用于水貂伪狂犬病防控的疫苗,因此,本研究选择伪狂犬病毒作为试验毒株,为进一步水貂伪狂犬病疫苗的研究奠定基础。

综上所述,本研究获得 3 条对水貂具有较好免疫刺激活性的 CpG ODN 序列,为进一步开发适用于水貂的新型 CpG ODN 佐剂提供重要依据。

参考文献:

- [1] Lahoud M H, Ahmet F, Zhang J G, *et al.* DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(3): 16270-16275.
- [2] Jassiesvan der L A, Rutten V, Spiering R, *et al.* The immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides on peripheral blood mononuclear cells of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis [J]. *Vet J*, 2014, 200(1): 103-108.
- [3] Verthelyi D, Ishii, K J, Gursel M, *et al.* Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CpG motifs[J]. *J Immunol*, 2001, 166(4): 2372-2377.
- [4] Marshall J D, Fearon K, Abbate C, *et al.* Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions[J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 73(6): 781-792.
- [5] Hartmann G, Battiany J, Poeck H, *et al.* Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- α induction in plasmacytoid dendritic cells[J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(6): 1633-1641.
- [6] Angel J B, Cooper C L, Clinch J, *et al.* CpG increases vaccine

- antigen-specific cell-mediated immunity when administered with hepatitis B vaccine in HIV infection[J]. *J Immune Based Ther Vaccines*, 2008, 6(1): 1-7.
- [7] Mutwiri G, Benjamin P, Soita H, *et al.* Co-administration of polyphosphazenes with CpG oligodeoxynucleotides strongly enhances immune responses in mice immunized with Hepatitis B virus surface antigen[J]. *Vaccine*, 2008, 26(22): 2680-2688.
- [8] Moura-Costa L F, Bahia R C, Carminati R, *et al.* Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Caninde goats and their potential protection against caseous lymphadenitis [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 126(1/2): 131-141.
- [9] 李杰,杨汉春,郭鑫,等. CpG ODN 对鸡新城疫 LaSota 活疫苗的免疫增强效应[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(1): 44-49.
Li J, Yang H C, Guo X, *et al.* Immune enhancement of CpG ODN on LaSota lived vaccine against Newcastle disease in chickens [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2006, 37(1): 44-49.
- [10] 徐文,程尧,温建新,等. CpG-ODN 免疫增强序列的筛选[J]. *青岛农业大学学报*, 2008, 25(2): 105-108.
Xu W, Cheng R, Wen J X, *et al.* Screening of the Immuno-potetiation sequence of CpG - ODN [J]. *Journal of Qingdao Agricultural University*, 2008, 25(2): 105-108.
- [11] 张玲华,郭勇,田兴山,等. CpG ODN 对猪繁殖障碍与呼吸道综合征疫苗免疫影响的研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2005, 32(8): 47-49.
Zhang L H, Guo Y, Tian X S, *et al.* Effect of CpG ODN on vaccine immunity of porcine reproductive disorders and respiratory syndrome[J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2005, 32(8): 47-49.
- [12] 郭爱珍,唐泰山,陆承平. 细菌 CpG-DNA 对犬免疫增强效果的研究[J]. *中国兽医科学*, 2001, 31(12): 6-8.
Guo A Z, Tang T S, Lu C P. Adjuvanticity of bacterial CpG-DNA as a novel immune enhancer in dogs[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2001, 31(12): 6-8.
- [13] Krieg A M, Hartmann G, Yi A K. Mechanism of action of CpG DNA[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000, 247: 1-21.
- [14] Kamstrup S, Verthelyi D, Klinman D M. Response of porcine peripheral blood mononuclear cells to CpG-containing oligodeoxynucleotides[J]. *Vet Microbiol*, 2001, 78(4): 353-362.

(编辑:李文平)