doi:10.11751/ISSN.1002－1280.2020.02.10

# CpG ODN 重组质粒对猪外周血淋巴细胞免疫刺激作用的研究

张进进[1],佴 婷[1],夏 辉[1],盛陈艳[2],麻宝艺[2],马青霞[1],
刘雅馨[1],高沙沙[1],杜 锐[1],冷 雪[1*],周 宇[3*]

(1. 吉林农业大学中药材学院,长春 130118; 2. 吉林农业大学动物科学技术学院,长春 130118,
3. 惠州海关,广东惠州 516006)

[收稿日期] 2019－10－24　[文献标识码] A　[文章编号] 1002－1280 (2020) 02－0059－06　[中图分类号] S852.4

[摘　要]　为获得对猪具有免疫刺激活性的含 CpG 序列的重组质粒,设计合成了 11 条 CpG 序列,应用 MTS 比色法测定合成 CpG ODNs 刺激猪 PBMC 增殖的能力,结果有 10 条 CpG ODN 对猪 PBMC 具有刺激活性(SI>2);以对猪 PBMC 具有较高刺激活性的 CpG06 和 CpG08 为核心,分别合成含 6 次重复序列的重组质粒 pCpG06 和 pCpG08,并检测其对猪 PBMC 的刺激活性,结果重组质粒 pCpG06 和 pCpG08 对猪 PBMC 的刺激指数分别可达 4.97 和 5.32,并可刺激猪 PBMC 产生较高水平的 IL－4。研究获得的重组质粒 pCpG06 和 pCpG08 对猪 PBMC 具有较好的刺激活性,可为猪用 CpG 佐剂的研究提供参考。

[关键词]　CpG ODN;重组质粒;佐剂

# Immunostimulatory Effect of CpG ODN Recombinant Plasmid on Peripheral Blood Lymphocytes of Pigs

ZHANG Jin－jin[1], XUAN Ting[1], XIA Hui[1], SHENG Chen－yan[2], MA Bao－yi[2],
MA Qing－xia[1], LIU Ya－xin[1], GAO Sha－sha[1], DU Rui[1], LENG Xue[1*], ZHOU Yu[3*]

(1. *College of Chinese Medicine Materials, Jilin Agricultural University, Changchun* 130118, *China*;
2. *College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun* 130118, *China*;
3. *Huizhou Customs, Huizhou, Guangdong* 516006, *China*)

*Corresponding author*: *LENG Xue*, *E－mail*: *lengxue_79@163.com*; *ZHOU Yu*, *E－mail*: *zhouyu7890@163.com*

**Abstract**: In order to obtain the CpG recombinant plasmid with immunostimulatory activity against pig, eleven DNA sequences containing different CpG motifs were designed and synthesized, and MTS colorimetric assay was

**基金项目**:广东省省级科技计划项目(2017A020208035);国家重点研发计划项目(2018YFC1706600);吉林省教育厅项目(JJKH20190941KJ)

**作者简介**:张进进,本科,从事动物传染病研究。

**通讯作者**:冷 雪, E－mail: lengxue_79@163.com; 周 宇, E－mail: zhouyu7890@163.com

used to determine the ability of CpG ODNs to stimulate the proliferation of porcine PBMC. The result showed that ten CpG ODNs has the stimulating activity to the PBMC of porcine(SI > 2). Recombinant plasmids pCpG06 and pCpG08 containing 6 repeats of CpG06 or CpG08 were synthesized, and tested for stimulating activity on porcine PBMC. The results showed that the SI value of recombinant plasmids pCpG06 and pCpG08 was 4.97 and 5.32, respectively, and the recombinant plasmids stimulated higher levels of IL - 4 in porcine PBMC. The recombinant plasmids pCpG06 and pCpG08 obtained in this study have good immunostimulatory activity on porcine PBMC, which can provide a reference for the study of CpG adjuvants for pigs.

**Key words**: CpG ODN; recombinant plasmids; adjuvants

近年来发现的宿主细胞受体和先天免疫反应激活中的“危险信号”(存在于细菌、病毒和真菌中)的作用改变了我们对免疫学的理解[1],在已知的激活机体先天免疫反应的 Toll 样受体(TLR)中,Toll 样受体 9(TLR9)能够识别细菌和病毒 DNA 中的非甲基化寡聚核苷酸(CpG ODN)基序,并通过诱导炎性细胞因子和 I 型干扰素(IFN)产生以 Th1 型为主的免疫应答和 $CD8^+$ 细胞毒性 T 淋巴细胞应答[2]。与细菌或病毒 DNA 相似,人们发现合成的 CpG ODN 能够模拟天然 CpG ODN 的免疫刺激活性,诱导 B 细胞和浆细胞样树突状细胞的增殖,分泌多种细胞因子、趋化因子和 IgM[3-4],从而激活人类、灵长类动物和其他动物的先天性免疫系统[5]。不同种类动物的 TLR 9 不同,与 CpG ODN(A、B、C、P 型 CpG ODN)作用后诱导的信号通路有所差异,因此,CpG ODN 发挥免疫活性具有种属特异性。Kamstrup 等研究表明,使用同样的 CpG ODN 可以诱导猪外周血单个核细胞(PBMC)中 IL - 6 和 IL - 12 的表达和增殖[6],但在小鼠实验中未观察到这种刺激作用[7]。诸多研究表明,CpG ODN 在猪传染性疾病的预防和治疗方面具有潜力[8]。本研究对筛选构建的 CpG 重组质粒对猪 PBMC 的免疫刺激活性进行研究,为新型猪用疫苗分子佐剂的研制提供参考。

## 1 材料与方法

1.1 试验材料 IMDM 细胞培养液购自 Gibco 公司(批号:1967339);胎牛血清(批号:TBD31HB)和猪外周血淋巴细胞分离液 KIT(批号:LDS1108)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(批号:122H035);MTS 购自 Promega 公司(批号:313575);质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司(批号:16018KA1);猪 IL - 4 ELISA 检测试剂盒(批号:20190716)和猪 IFN - γ ELISA 检测试剂盒(批号:20190716)均购自北京索莱宝科技有限公司;限制性内切酶 *Eoc*R Ⅰ(批号:K2602AA)和 *Hin*d Ⅲ(批号:AH50858A)均购自 TaKaRa 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 CpG ODN 的设计与合成 根据对猪和人具有较好刺激活性的 CpG 基序 ATCGAT、GTCGTT 和 GACGTT,设计并合成 11 条包含 CpG 单元的序列,其中,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(表 1)。

**表 1 CpG ODNs 序列**

**Tab 1 CpG ODNs sequence in this study**

| CpG ODN | 序列 | 长度/bp |
|---|---|---|
| GC - ODN | TGCTGCTTTGTGCTTTTGTG | 20 |
| CpG01 | TCATCGATATCGATTTATCGAT | 22 |
| CpG02 | ATCGATGGTCGTTGTCGTTTC | 21 |
| CpG03 | TCATCGATTTGTCGTTTTGACGTT | 24 |
| CpG04 | TCGTCGATTTATCGATTTGTCGTT | 24 |
| CpG05 | AACGTTCATCGATATCGATGT | 21 |
| CpG06 | TCGTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT | 24 |
| CpG07 | TCAACGTTTTGACGTTTTGTCGTT | 24 |
| CpG08 | ATCGATTTGTCGTTATCGAT | 20 |
| CpG09 | TCATCGATTTGTCGTTATCGAT | 22 |
| CpG10 | TCTACGTTTTCAGCTTTTGTCGTT | 24 |
| CpG11 | TCTACGTTTTGTCGTTTTGTCGTT | 24 |

1.2.2　猪 PBMC 的分离和培养　用 75% 酒精消毒 4 ~ 6 周龄健康未接种疫苗猪颈部皮肤，固定后从前腔静脉无菌采血，用含肝素的无菌真空采血管收集血液。按照猪外周血单个核细胞分离液试剂盒使用说明，分离获得猪 PBMC。以 1 mL 的含 10% 胎牛血清 IMDM 营养液重悬细胞，取 90 μL 重悬所得的细胞并加入 10 μL 台盼蓝染色液，轻轻混匀，染色 3 min；吸取少量经过染色的细胞，在倒置显微镜下观察并计算细胞数待用。

1.2.3　不同序列的 CpG ODN 刺激猪 PBMC 增殖能力检测　使用含 10% 胎牛血清的 IMDM 营养液将猪 PBMC 浓度调至 $1 \times 10^6$/mL，接种于 96 孔细胞培养板，每孔 100 μL。分别加入阴性对照 GC - ODN和设计合成的 11 条 CpG ODN 序列，CpG ODN 的终浓度为 5 μg/mL；阳性对照孔加入 ConA 溶液，加入终浓度为 5 μg/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 ℃、5% $CO_2$ 培养箱中培养 32 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在 490 nm 波长的 OD 值，并计算刺激指数（SI 值），SI 值计算公式如下：$SI = (OD_{样品} - OD_{空白})/(OD_{阴性} - OD_{空白})$。

1.2.4　含 CpG 基序重组质粒的合成和鉴定　以 1.2.3 项中筛选出的对猪 PBMC 具有较好刺激活性的 CpG 序列为核心，设计含 6 次重复的 CpG 序列，并在其两侧分别加入 *Hind*Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ酶切位点，两端含有酶切位点的双链 CpG ODN 由宝生物（大连）有限公司合成并克隆入 pUC19 载体中，对获得的重组质粒进行酶切鉴定和测序鉴定。

1.2.5　重组质粒刺激猪 PBMC 增殖能力检测　将提取的CpG ODN 重组质粒接种于含猪 PBMC 的 96 孔板，PBMC 浓度为 $1 \times 10^6$/mL，每孔 100 μL。质粒终浓度分别为 1、2.5、5 和 10 μg/mL，同时设阴性对照和空白对照，阳性对照孔加入 5 μg/mL ConA 溶液。按照 1.2.3 项中方法测定各孔在 490 nm 波长的 OD 值，并计算 SI 值。

1.2.6　细胞因子 IL - 4 和 IFN - γ 检测　将猪 PBMC浓度调至 $1 \times 10^6$/mL，接种于 96 孔细胞培养板，每孔 100 μL。将 CpG ODN 重组质粒分别加入 96 孔细胞培养板，质粒终浓度为 5 μg/mL，空白组加入 PBS，同时设不含 CpG 基序的质粒作为对照，每个样品设 3 个重复孔，置于 37 ℃、5% $CO_2$ 培养箱中培养 24 h。每孔收集上清 100 μL，按照猪 IL - 4 和 IFN - γ ELISA 检测试剂盒说明书的操作步骤进行，根据标准曲线确定所测细胞因子的浓度。

1.2.7　统计学分析　应用 SPSS11.0 软件进行统计学分析，实验结果以平均值 ± 标准差表示，组间均数比较采用完全随机试验方差分析的方法，检验水准 $\alpha = 0.05$。

## 2　结果与分析

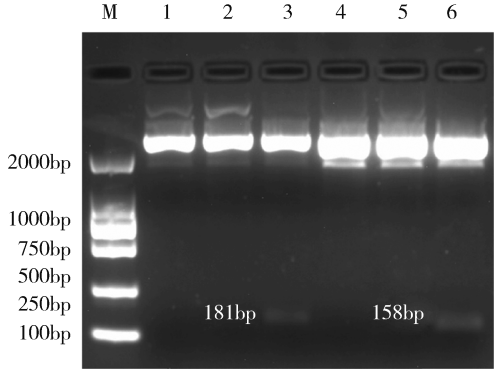
2.1　不同序列 CpG ODN 刺激猪 PBMC 增殖能力检测　结果见表 2。使用不同序列 CpG ODN 刺激猪 PBMC，除 CpG04 外，其他 CpG ODN 的 SI 值均大于 2，其中 CpG06、CpG07 和 CpG08 的 SI 值分别为5.82、5.27 和 5.58，对猪 PBMC 具有较好的刺激活性。

**表 2　不同序列 CpG ODN 对猪 PBMC 刺激效果**

**Tab 2　CpG ODN sequence with stimulatory activity to pig PBMC**

| 组别 | OD 值 | SI 值 | 组别 | OD 值 | SI 值 |
|---|---|---|---|---|---|
| ConA | 0.471 ± 0.025 | 5.92 | CpG05 | 0.458 ± 0.040 | 4.89 |
| GC - ODN | 0.345 ± 0.037 | 1.00 | CpG06 | 0.485 ± 0.030 | 5.82 |
| 空白对照 | 0.319 ± 0.04 | - | CpG07 | 0.469 ± 0.034 | 5.27 |
| CpG01 | 0.412 ± 0.091 | 3.31 | CpG08 | 0.478 ± 0.020 | 5.58 |
| CpG02 | 0.395 ± 0.009 | 2.72 | CpG09 | 0.378 ± 0.083 | 2.13 |
| CpG03 | 0.412 ± 0.075 | 3.62 | CpG10 | 0.413 ± 0.042 | 3.34 |
| CpG04 | 0.357 ± 0.057 | 1.41 | CpG11 | 0.421 ± 0.054 | 3.62 |

2.2　CpG ODN 重组质粒酶切鉴定　以对猪 PBMC 具有较好刺激活性的 CpG06 和 CpG08 为核心，经 6 次重复，两端分别加入 *Hind*Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ酶切位点，合成并构建获得重组质粒 pCpG06 和 pCpG08。对获得的重组质粒经酶切鉴定（图 1），结果分别获得约 181 bp 和 158 bp 的目的片段，与预期大小相符，构建的重组质粒经进一步测序鉴定证明构建正确。




M. Marker DL2000；1. pCpG06 *Hind* Ⅲ单酶切；
2. pCpG06 *Eco*RI 单酶切；3. pCpG06 *Hind* Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ双酶切；
4. pCpG08 *Hind* Ⅲ单酶切；5. pCpG08 *Eco*R Ⅰ单酶切；
6. pCpG08 *Hind* Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ双酶切

M. Marker DL2000；1. Enzyme digestion of pCpG06 by *Hind* Ⅲ；
2. Enzyme digestion of pCpG06 by *Eco*R Ⅰ；
3. Enzyme digestion of pCpG06 by *Hind* Ⅲ and *Eco*R Ⅰ；
4. Enzyme digestion of pCpG08 by *Hind* Ⅲ；
5. Enzyme digestion of pCpG08 by *Eco*R Ⅰ；
6. Enzyme digestion of pCpG08 by *Hind* Ⅲ and *Eco*R Ⅰ

**图 1　重组质粒 pCpG06 和 pCpG08 酶切鉴定电泳图**

**Fig 1　Enzyme digestion identification of recombinant plasmids pCpG06 and pCpG08**

2.3　CpG ODN 重组质粒刺激猪 PBMC 增殖能力检测　结果见表 3。重组质粒 pCpG06 和 pCpG08 接种猪 PBMC 后测得其 SI 值均大于 2，且 SI 值随质粒浓度的增加而升高。当质粒浓度为 5 μg/mL 以上时，重组质粒 pCpG06 和 pCpG08 的 SI 值分别大于 4 和 5，表明构建的重组质粒 pCpG06 和 pCpG08 对猪 PBMC 具有较好的刺激活性。

**表 3　不同浓度 CpG 重组质粒对猪 PBMC 刺激效果**

**Tab 3　Stimulatory activity of recombinant plasmid containing CpG motif to pig PBMC**

| 组别 | 浓度/(μg·mL$^{-1}$) | OD 值 | SI 值 |
|---|---|---|---|
| pCpG06 | 1 | 0.384 ± 0.017 | 2.81 |
| | 2.5 | 0.402 ± 0.012 | 3.52 |
| | 5 | 0.408 ± 0.005 | 4.35 |
| | 10 | 0.427 ± 0.011 | 4.97 |
| pCpG08 | 1 | 0.385 ± 0.011 | 2.86 |
| | 2.5 | 0.404 ± 0.023 | 3.64 |
| | 5 | 0.424 ± 0.035 | 5.14 |
| | 10 | 0.434 ± 0.019 | 5.32 |
| GC－ODN | 1 | 0.346 ± 0.016 | 1 |
| | 2.5 | 0.346 ± 0.006 | 1 |
| | 5 | 0.344 ± 0.025 | 1 |
| | 10 | 0.345 ± 0.023 | 1 |
| ConA | 5 | 0.425 ± 0.017 | 5.22 |
| 空白对照 | PBS | 0.324 ± 0.023 | － |

“－”：Blank control without SI value

2.4　细胞因子 IL－4 和 IFN－γ 检测　用 pCpG06 和 pCpG08 重组质粒分别刺激猪 PBMC 24 h 后，收集上清，检测上清中 IL－4 和 IFN－γ 含量。图 2 结果表明，pCpG06 和 pCpG08 重组质粒能够促进猪 PBMC 高分泌细胞因子 IL－4，而对 IFN－γ 的分泌没有明显影响。

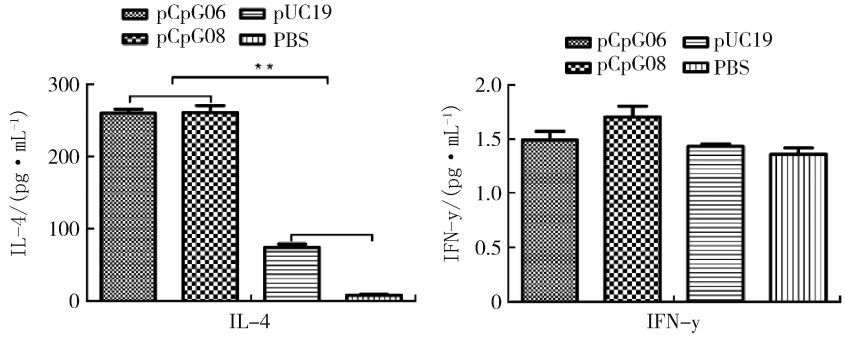



**图 2　CpG 重组质粒刺激猪 PBMC 后 IL－4 和 IFN－γ 分泌水平**

**Fig 2　The effect of recombinant plasmid containing CpG motif on IL－4 and IFN－γ secretion of PBMC cells**

## 3　讨论和结论

在佐剂的研究中,人们逐渐认识到固有免疫对获得性免疫的促进作用。CpG ODN 是 TLR9 的激动剂,能刺激人及哺乳动物的天然免疫应答,在作为疫苗佐剂、抗病毒及抗肿瘤方面显示出应用前景。小鼠体内研究中已证实,CpG ODN 能通过激活免疫反应抵抗广泛的病毒和其他微生物,如 HBV、HIV、HSV、李斯特菌等的感染。Coley 公司开发的 C 型 CpG ODN 10101 具有剂量依赖性地降低 HCV 感染者血中病毒 RNA 水平的作用,患者耐受性良好[9]。CpG ODN 7909 用作乙肝疫苗佐剂的临床试验显示,接种疫苗和 7909 混合物的受试者血清中抗原特异性的抗体出现更早,滴度更高[10]。我国朱鸿飞等将设计合成的 CpG 序列与 pUC18 载体链接,获得的重组质粒与猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)活疫苗联合使用,能够有效提高 PRRS 特异性抗体和细胞因子水平,提高疫苗的免疫保护效果[8]。

CpG ODN 能以 TLR9 依赖的方式刺激机体的固有免疫应答,通常用于 TLR9 应答研究[11]。已有报道表明,用不同 CpG ODNs 体外刺激 3 种猪源细胞,都能够使猪源细胞 TLR9 相关信号通路分子的转录水平升高,分别可作为潜在的猪 Th1/Th2、Th1 和 Th2 型免疫反应特异性诱生剂促进不同类型细胞因子的表达[12]。本研究根据对猪和人具有较好刺激活性的 CpG 基序 ATCGAT、GTCGTT 和 GACGTT,设计并合成 11 条 CpG 序列,除 CpG04 外,其他 CpG ODN 的 SI 值均大于 2。其中 CpG06 和 CpG08 的 SI 值最高,分别为 5.82 和 5.58,对猪 PBMC 具有较好的刺激活性。以 CpG06 和 CpG08 为核心基序,分别合成 6 次重复序列,并连接入 pUC19 载体,获得的重组质粒 pCpG06 和 pCpG08 对猪 PBMC 均具有较好的刺激活性,SI 值分别可达 4.97 和 5.32。同时能够刺激猪 PBMC 产生较高水平的 IL-4,而对 IFN-γ 的产生无明显刺激活性,这与部分 CpG 对免疫活性细胞的刺激作用研究结果一致[13],而针对于其他细胞因子的促进作用仍有待于进一步研究,进而确定其所适用的疫苗类型。

总之,本研究获得的含 CpG 基序重组质粒 pCpG06 和 pCpG08 对猪 PBMC 具有较好的刺激活性,并可刺激猪 PBMC 产生较高水平的 IL-4,为 CpG 重组质粒作为疫苗佐剂的研究奠定了试验基础。

## 参考文献:


[1] Dar A, Nichani A, Lai K, *et al*. All three classes of CpG ODNs up-regulate IP-10 gene in pigs[J]. Research in Veterinary Science, 2010, 88(2):242-250.

[2] Coban C, Ishii K J, Kawai T, *et al*. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin[J]. Journal of Experimental Medicine, 2005, 201(1):19-25.

[3] Grassia G, MacRitchie N, Platt A M, *et al*. Plasmacytoid dendritic cells: biomarkers or potential therapeutic targets in atherosclerosis? [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2013, 137(2):172-182.

[4] Okuda K, Wada Y, Shimada M. Recent developments in pre-clinical DNA vaccination[J]. Vaccines, 2014, 2(1):89-106.

[5] Mutwiri G K, Nichani A K, Babiuk S, *et al*. Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides[J]. Journal of Controlled Release, 2004, 97(1):1-17.

[6] Kamstrup S, Verthelyi D, Klinman D M, *et al*. Response of porcine peripheral blood mononuclear cells to CpG-containing oligodeoxynucleotides[J]. Veterinary Microbiology, 2001, 78(4):353-362.

[7] Stede Y, Verdonck F, Verfaillie T, *et al*. Porcine-specific CpG-oligodeoxynucleotide activates B-cells and increases the expression of MHC-II molecules on lymphocytes[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2005, 105(1/2):115-124.

[8] Guo X Y, Zhang Q, Hou S H, *et al*. Plasmid containing CpG motifs enhances the efficacy of porcine reproductive and respiratory syndrome live attenuated vaccine[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2011, 144(3/4): 405-409.

[9] McHutchison J G, Bacon B R, Gordon S C, *et al*. Phase 1B,

randomized, double – blind, dose – escalation trial of CPG 10101 in patients with chronic hepatitis C virus[J]. Hepatology, 2007, 46(5):1341 – 1349.

[10] Cooper C L, Davis H L, Morris M L, *et al*. CPG7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxyncleotide, as adjuvant to Engerix B HBV vaccine in healthy adults: a double blind phase I/II study[J]. Journal of Clinical Immunology, 2004, 24(6): 693 – 701.

[11] Blasius A L, Beutler B. Intracellular toll – like receptors[J]. Immunity, 2010, 32(3):305 – 315.

[12] 邓 慧,张丽琳,黎瑞巧,等. 不同 CpG ONDs 对猪源细胞免疫分子转录水平的影响[J]. 动物医学进展,2018,39(1): 22 – 30.
Deng H, Zhang L L, Li R Q, *et al*. Effects of different CpG oligodeoxynucleotides on transcriptions of immune related molecules in porcine cells[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2018, 39(1):22 – 30.

[13] 秦宏超, 芮程磊, 陈文艳, 等. TLR9 激动剂 CpG ODN 对 B 细胞分泌细胞因子的影响[J]. 扬州大学学报, 2016, 37(2): 17 – 21.
Qin H C, Rui C L, Chen W Y, *et al*. Effects of TLR9 agonist CpG ODN on the production of cytokines in B cells[J]. Journal of Yangzhou University, 2016, 37(2):17 – 21.

(编 辑:李文平)