

非抗性筛选抑制素基因疫苗免疫对奶牛产后子宫复旧的影响

王水莲^{1,2}, 冯建忠², 李文平¹, 夏迪¹, 卢向阳^{1*}, 杨利国^{3*}

(1.湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128; 2.天津市中意畜牧科技有限公司, 天津 300457; 3.华中农业大学动物科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 将 24 头产后 7 d 的荷斯坦奶牛随机分为 4 组, 高、中、低剂量免疫组(记为 T₁、T₂、T₃)分别注射 10¹⁰、10⁹、10⁸ CFU/mL 无抗性基因的抑制素真核表达质粒基因疫苗(重组菌 C500(pXAIS))各 3 mL, 对照组(CK)注射 10%生理盐水 3 mL。初次免疫 28 d 后进行加强免疫。用 B 超诊断仪检测产后奶牛子宫恢复情况。结果表明: 加强免疫能提高抗抑制素抗体 P/N 值, 各免疫组 P/N 值均高于对照组, 其中 T₁ 和 T₂ 组均与对照组差异显著(P<0.05), 加强免疫 7 d 后, T₁ 组抗体阳性率最高, 达 83.33%; 抑制素基因疫苗免疫 30 d 内, 前 21 d 子宫颈和子宫孕角恢复较快, 后 7 d 恢复较慢, 各免疫组奶牛产后子宫颈恢复时间短于对照组, 但差异不显著(P>0.05); 各免疫组产后子宫孕角恢复时间比对照组短, 且 T₁ 组的恢复时间(28.75±1.92) d 与对照组((33.75±1.09) d)差异显著(P<0.05)。以上结果表明, 在本试验条件下, 非抗性筛选的抑制素真核表达质粒基因疫苗免疫产后奶牛, 加强免疫后能引起较好的免疫应答, 且能促进奶牛产后子宫复旧。

关 键 词: 奶牛; 抑制素; 基因免疫; 子宫

中图分类号: S852.5; S823.9⁺1 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2014)04-0395-04

Effect of inhibin DNA vaccine without antibiotic resistance gene on uterine involution in postpartum dairy cows

WANG Shui-lian^{1,2}, FENG Jian-zhong¹, LI Wen-ping¹, XIA Di¹, LU Xiang-yang^{2*}, YANG Li-guo^{3*}

(1. Collge of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Tianjin Zhongyi Animal and Science Technology Limited Company, Tianjin 300457, China; 3. College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Twenty four dairy cows at 7 d after calving were randomly assigned to four groups (three immunized group and one control group), the three immunized group of cows were primarily immunized (injection day as 0 d) with 3 mL (per cattle cow) of recombinant bacterium C500(pXAIS) delivering the inhibin gene vaccine (a kind of DNA vaccine without antibiotic resistance gene) in a high (10¹⁰ CFU/mL), middle (10⁹ CFU/mL) or low (10⁸ CFU/mL) dosage, the control group of cows were intramuscularly immunized with physiological saline (3 mL per cattle cow). The booster immunization (the same dosage as the primary immunization) was performed 28 d after primary immunization. The B ultrasonography was used to investigate the effect of inhibin gene vaccine on antibody level, involution of uterine cervix and uterine gravid horn of the postpartum dairy cows. The result showed that the booster immunization could raise antibody level against inhibin, which in T₁ and T₂ group was higher than that in CK (P<0.05). Furthermore, positive antibody percentage 7 d after booster immunization in T₃ group was the highest, which was 83.33%. Diameters of both postpartum uterine cervix and postpartum gravid uterine horn in all groups decreased sharply during the first 21 d and then decreased gradually during the final 7 d within 30 d after inhibin gene vaccine immunization. Days of the uterine cervix involution were shorter (P>0.05) in the three immunized groups than those in control group, the same as

收稿日期: 2014-02-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101774); 中国博士后科学基金特别资助项目(2012T50220); 现代农业产业技术体系项目(CARS-37-04B)

作者简介: 王水莲(1973—), 女, 湖南湘阴人, 博士, 教授, 主要从事动物生殖生理与生殖调控研究, wangshuilian1234@126.com; *通信作者, xiangyangen@163.com, liquoyang2006@aliyun.com

those of the gravid uterine horn involution except for the remarkable difference ($P<0.05$) between T_1 group (28.75 ± 1.92) d) and the CK group (33.75 ± 1.09) d). These findings demonstrate that inhibin gene vaccine C500(pXAIS) can enhance the immune response, stimulate restoration of uterus of the postpartum dairy cows.

Key words: dairy cow; inhibin; gene immunization; uterus

抑制素(INH)是由卵巢分泌的糖蛋白质激素,能抑制垂体促卵泡素(FSH)的分泌。用 INH 免疫奶牛能进一步提高超排效果,且能增加胚胎数,提高胚胎质量^[1-2]。抑制素基因疫苗因其制备简单、构建成本低、纯度高而受到关注。研究表明,单拷贝抑制素基因疫苗^[3-6]和双拷贝抑制素基因疫苗^[7-8]均可诱导小鼠^[3]、大鼠^[4-8]、绵羊^[9-10]、黄牛^[11-12]产生抗抑制素抗体,同时提高 FSH 分泌水平,促进卵泡发育。但是目前尚缺少抑制素基因疫苗对子宫发育状况方面的研究。

以上提到的单拷贝、双拷贝抑制素基因疫苗,其抑制素基因均构建在含抗性标记的质粒 PGISI 上,而有抗性标记的疫苗在实际生产中无法推广应用。韩丽等^[13]利用“*asd*-减毒沙门氏菌-宿主平衡致死系统”构建了无抗生素筛选的抑制素重组菌 C500(PXAIS)基因疫苗,该疫苗以猪霍乱沙门氏菌弱毒株 C500 为载体传递抑制素基因疫苗。将 C500(pXAIS)重组菌以 10^{10} CFU/mL 的剂量免疫小鼠后,可显著提高抗小鼠抑制素抗体水平,明显增强小鼠的免疫效果^[13]。本研究用 C500(PXAIS)免疫产后奶牛,以探讨抑制素基因疫苗对奶牛产后子宫复旧的影响,为抑制素基因疫苗应用于奶牛生产提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

C500(pXAIS)重组菌^[13]由华中农业大学杨利国教授赠送。

1.1.2 供试奶牛

从湖南省畜牧兽医研究所奶牛场选择胎次为 2~4 胎、健康无疾病的 24 头中国荷斯坦奶牛用于试验。

1.2 方法

1.2.1 疫苗的制备

将重组菌 C500(pXAIS)接种于 LB 液体培养基, 37°C 振荡培养至菌液 $OD_{600\text{nm}}=0.3\sim0.4$, $1\,500\times g$ 离心 10 min 收集细菌,用灭菌 PBS 调整细菌浓度至

10^{10} 、 10^9 、 10^8 CFU/mL。

1.2.2 试验分组及免疫

依据年龄、胎次、产奶量、体重、膘情,将供试奶牛随机分为 4 组:高剂量免疫组(T_1)、中剂量免疫组(T_2)、低剂量免疫组(T_3)和对照组(CK),每组 6 头奶牛。高、中、低剂量免疫组奶牛在产后第 7 天按 3 种剂量进行初次免疫,即分别肌肉注射 10^{10} 、 10^9 、 10^8 CFU/mL 重组菌 C500(pXAIS),每头注射 3 mL;对照组奶牛分别注射 3 mL 10%生理盐水。初次免疫后间隔 28 d,用同等剂量疫苗对各组加强免疫 1 次。

1.2.3 血样检测

分别在初次免疫后 14、28 d,加强免疫后 14、28 d,用真空采血管采集奶牛尾中动脉血样约 5 mL, $3\,500\times g$ 离心 10 min,分离血清, -20°C 保存。用 ELISA 方法检测奶牛血清中抗抑制素抗体效价,以人工合成的抑制素融合蛋白作为标准包被抗原进行包被,血样稀释 80 倍,以 P/N 值 >2 判为阳性(其中 P 为待测血样的吸光值, N 为阴性对照血样吸光值)^[14]。

1.2.4 子宫观察

从产后第 7 天开始,用 B 型兽用超声扫描仪(DP-3300vet 全数字便携式超声诊断机, Mindary 公司)检测产后奶牛子宫孕角和子宫颈的复旧情况,每 3 d 检测 1 次,直到子宫完全恢复(产后子宫颈和子宫孕角直径恢复到与未孕子宫相似时可认为子宫完全恢复)^[15]。

1.2.5 统计分析

抗体 P/N 值、子宫颈和子宫孕角直径用“平均数 \pm 标准差”表示,用 SPSS18.0 统计软件对各项数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 非抗性筛选抑制素基因疫苗免疫对奶牛抗抑制素抗体水平的影响

由表 1 可知,各免疫组奶牛的抗抑制素抗体的

P/N 值均高于对照组,且高、中剂量免疫组奶牛的抗体 P/N 值显著高于对照组奶牛的抗体 P/N 值 ($P<0.05$);高剂量免疫组(T_1)奶牛的抗抑制素抗体 P/N 在初次免疫和加强免疫后均为最高,而低剂量免疫组(T_3)奶牛的抗体 P/N 在初次免疫和加强免疫后均为最低;且 T_1 组与 T_3 组差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。与初次免疫期相比较,各免疫组在加强免疫后第 14 d 的抗体 P/N 值均提高,且 P/N 值的变化规律一致,即在第一次免疫后不断上升,在加强免疫第 14 天达高峰。加强免疫后,各免疫组抗抑制素抗体阳性率均上升,其中加强免疫第 14 天时 T_1 组达 83.33%(表 2)。以上结果说明,在本试验条

表 1 抑制素基因疫苗(C500(pXAIS))免疫对奶牛抗抑制素抗体 P/N 值的影响

Table 1 Effect of inhibin gene vaccine (C500(pXAIS)) immunization on P/N value of inhibin antibody of the dairy cows

组别	P/N			
	初次免疫后 14 d	初次免疫后 28 d	加强免疫后 14 d	加强免疫后 28 d
T_1	(1.53±0.11)a	(1.83±0.24)a	(2.27±0.37)a	(1.75±0.26)a
T_2	(1.36±0.10)b	(1.62±0.13)a	(1.72±0.18)b	(1.52±0.22)ab
T_3	(1.18±0.05)c	(1.22±0.05)b	(1.36±0.12)bc	(1.21±0.06)bc
CK	(1.09±0.07)c	(1.07±0.05)b	(1.09±0.07)c	(1.01±0.04)c

同列两组间小写字母不同者,表示差异显著($P<0.05$);小写字母相同者表示差异不显著($P>0.05$),下表同。

表 2 双拷贝抑制素基因疫苗(C500(pXAIS))免疫对奶牛抗体阳性率的影响

Table 2 Percentage of dairy cows with positive anti-inhibin antibody at different days after immunization of (C500(pXAIS))

组别	阳性率/%			
	初次免疫后 14 d	初次免疫后 28 d	加强免疫后 14 d	加强免疫后 28 d
T_1	16.67a	33.33a	83.33a	50.00a
T_2	0a	16.67a	50.00b	16.67b
T_3	0a	16.67a	33.33b	16.67b

阳性率为抗体阳性奶牛在各组的比率;抗体阳性奶牛指抑制素抗体 P/N 值大于 2 的产后奶牛。下同。



A 为产后第 7 天子宫孕角;B 为产后第 18 天子宫孕角(恢复中的子宫孕角);C 为产后第 28 天子宫孕角(复旧的子宫孕角);子宫孕角的最大直径用白线标示。

图 2 B 超显示的子宫孕角变化

Fig.2 Uterine gravid horns by type-B ultrasonic examination

件下,抑制素基因疫苗(C500(pXAIS))免疫奶牛可诱导产生抗抑制素抗体,且高剂量免疫组的免疫效果最佳。

2.2 非抗性筛选抑制素基因疫苗免疫对奶牛产后子宫复旧的影响

B 超检测结果表明,高、中、低剂量免疫组奶牛产后至子宫颈恢复的间隔时间均短于对照组,但差异没有统计学意义($P>0.05$);产后至子宫孕角恢复的间隔时间均短于对照组,且高剂量免疫组与对照组之间的差异有统计学意义($P<0.05$) (表 3)。奶牛免疫抑制素基因疫苗后 30 d 内,子宫颈直径逐渐变短,趋向于恢复正常大小,在前 21 d 子宫颈恢复快,后 7 d 恢复减弱(图 1);子宫孕角直径逐渐变短,趋向于恢复正常大小(图 2),在前 21 d 产后子宫孕角恢复较快,后 7 d 恢复较慢(图 3)。

表 3 不同剂量免疫组奶牛产后子宫颈及子宫孕角恢复间隔时间

Table 3 Interval days of uterine cervix and uterine gravid horn recovery in postpartum dairy cows immunized with different doses of vaccine

组别	子宫颈恢复时间/d	子宫孕角恢复时间/d
T_1	30.50±1.12	(28.75±1.92)a
T_2	30.75±1.09	(32.25±1.48)b
T_3	31.25±0.83	(33.25±0.83)b
C	31.50±0.35	(33.75±1.09)b

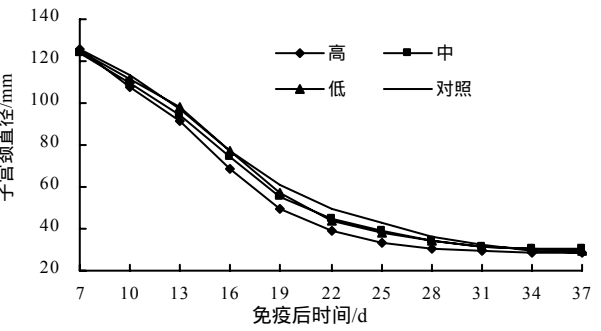


图 1 不同剂量组奶牛产后子宫颈的变化

Fig.1 Diameter changes of uterine cervix in different dosage groups of postpartum dairy cows

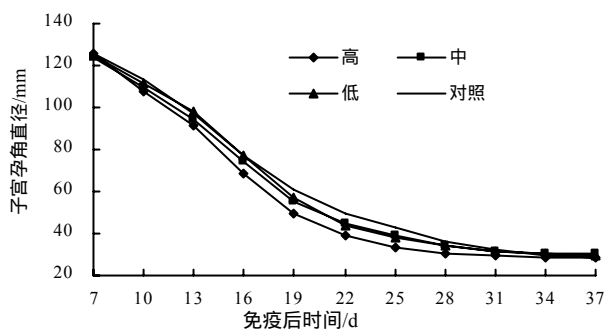


图3 不同剂量免疫组奶牛产后子宫孕角直径的变化

Fig. 3 Diameter changes of uterine gravid horn in different dosage groups of the postpartum dairy cows

3 讨论

本试验结果中,按3个不同剂量(10^{10} 、 10^9 、 10^8 CFU/mL)分别对产后奶牛肌肉注射C500(pXAIS)重组菌3 mL后,3个免疫组奶牛抗抑制素抗体水平平均上升,加强免疫后高剂量免疫组(10^{10} CFU/mL)的抗抑制素抗体阳性牛比例达83.33%(5/6)表明C500(pXAIS)抑制素基因疫苗对奶牛有很好的免疫原性。随着免疫剂量的增加,奶牛免疫应答效果增强,呈现剂量依赖关系。Liang等^[16]用低、中和高剂量生长抑制素基因疫苗免疫动物,中剂量基因疫苗的免疫应答效果最好,这可能是由于核酸疫苗的免疫剂量不仅受免疫途径和方法、质粒的大小的影响,还受局部细胞摄取DNA能力、质粒转染效率和抗原提呈效率等因素的影响^[17]。本研究结果表明,抑制素基因疫苗免疫能诱导产后奶牛产生免疫应答,但影响其免疫效果的因素(免疫剂量、免疫方式及加强免疫次数等)还需进一步分析。

延长奶牛产后开放期将会导致奶牛场巨大经济损失,因此,奶牛产后子宫复旧和卵巢功能恢复对确保产后奶牛再次受孕及缩短产犊间隔时间非常重要。本研究结果显示,高剂量(10^{10} CFU/mL)重组菌(C500-pXAIS)基因免疫可显著减少奶牛产后子宫孕角的恢复时间,这可能是高剂量基因疫苗免疫引起的较高免疫应答促进机体子宫组织结构恢复的结果。

参考文献:

[1] Li C, Zhu Y L, Xue J H, et al. Immunization against inhibin enhances both embryo quantity and quality in Holstein heifers after superovulation and insemination with sex-sorted semen[J]. *Theriogenology*, 2009, 71(6): 1011-1017.

[2] Mei C, Li M Y, Zhong S Q, et al. Enhancing embryo yield in superovulated holstein heifers by immunization against inhibin[J]. *Reprod Domest Anim*, 2009, 44(5): 735-739.

[3] 姜勋平, 杨利国, 刘桂琼, 等. 抑制素基因免疫对小鼠生殖的影响[J]. *中国兽医学报*, 2002, 22(4): 368-370.

[4] 茆达干, 杨利国, 叶荣, 等. 抑制素 $\alpha(1 \sim 32)$ 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.

[5] 茆达干, 杨利国, 曹少先, 等. 抑制素 $\alpha(1-32)$ 与乙肝表面抗原融合基因表达质粒的构建与表达[J]. *中国免疫学杂志*, 2003, 19(11): 775-778.

[6] 茆达干, 杨利国, 何晓红, 等. 抑制素与乙肝表面抗原融合基因免疫对大鼠生殖能力的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(11): 1160-1166.

[7] Wang S L, Han L, Ahmad S, et al. Effect of a DNA vaccine harboring two copies of inhibin (1-32) fragments on immune response, hormone concentrations and reproductive performance in rats[J]. *Theriogenology*, 2012, 78: 393-401.

[8] 王水莲, 薛立群, 邢朝芳, 等. 双拷贝抑制素基因免疫对大鼠卵泡发育、产仔及生殖激素的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(1): 57-64.

[9] 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.

[10] 张德坤, 杨利国, 曹少先, 等. 抑制素基因免疫对母羊生殖内分泌的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2005, 28(4): 76-79.

[11] 王水莲, 薛立群, 邓立新, 等. 双拷贝抑制素基因免疫对肉牛卵泡和黄体的影响[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(2): 404-410.

[12] 姜卫星, 刘友生, 薛立群, 等. 抑制素基因免疫黄牛的黄体发育与免疫纯度及剂量的关系[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2012, 38(3): 300-304.

[13] 韩丽. 新型抑制素基因工程疫苗的构建及其免疫效果研究[D]. 武汉: 华中农业大学动物科技与动物医学院, 2009.

[14] 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: 385-390.

[15] Zhang J, Deng L X, Zhang H L, et al. Effects of parity on uterine involution and resumption of ovarian activities in postpartum Chinese Holstein dairy cows[J]. *J Dairy Science*, 2010, 93: 1979-1986.

[16] Liang A X, Ca S X, Han L, et al. Construction and evaluation of an eukaryotic expression plasmid encoding two copies of somatostatin gene fused with hepatitis B surface antigen gene S[J]. *Vaccine*, 2008, 26: 2935-2941.

[17] 周永兴, 冯志华, 贾战生. 丙型肝炎病毒核心基因免疫研究[J]. *华人消化杂志*, 1998, 6(11): 966-968.

责任编辑: 罗维

英文编辑: 罗维