

补体 C3 对大肠杆菌疫苗的免疫增强作用

马雪云¹, 高淑霞¹, 韩建秋², 牛钟相^{1*}

(¹ 山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

(² 枣庄市园林管理处 枣庄 77102)

摘 要 :从 SPF 鸡血清中分离纯化 C3 ,用戊二醛将其与大肠杆菌抗原连接 ,免疫注射 SPF 鸡 ;对照组鸡免疫注射弗氏完全佐剂大肠杆菌疫苗。分别在免疫后的第 2、3、4、5、6、7、8、9 周采血 ,用 ELISA 方法测定血清中的抗体含量 ,同时测定血清中总补体活性。结果表明 ,免疫后 3 周 ,弗氏佐剂大肠杆菌疫苗诱导鸡体产生的抗体效价高于 C3 佐剂疫苗组 ,但至第 4 周 ,弗氏佐剂疫苗组的抗体水平达到高峰 (OD 值 = 0.270 ± 0.004) ,然后迅速下降 ,到第 9 周降至 0.200 ± 0.005 ,而 C3 疫苗组鸡免疫后的抗体水平持续上升 ,从免疫后第 2 周的 0.098 ± 0.003 上升到第 8 周的 0.275 ± 0.002 。证明 C3 能够促进免疫记忆细胞的产生 ,并能够使细菌抗原给予免疫细胞持续稳定的刺激 ,从而使鸡体维持高水平抗体的时间延长。研究结果为研制有效的家禽细菌性疫苗提供了理论依据。

关键词 :补体 ;免疫增强 ;C3 ;佐剂 ;细菌疫苗

中图分类号 :Q93 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2006)05-0812-04

补体 C3 处于补体两条激活途径的汇合点 ,在补体系统活化过程中起着枢纽作用 ,并为旁路途径激活的关键分子。当 C3 转化酶从 C3 分子 α 链 N 端精氨酸-丝氨酸键(第 77 ~ 78 位)处将 C3 裂解后 ,可产生一个 9kDa 的小片段 C3a 和一个 175kDa 的大片段 C3b ,自 Lay^[1] 和 Nussenzweig (*Progress in Immunology Academic , New York , 1971*) 在研究小鼠淋巴细胞补体受体的基础上提出 C3 参与动物获得性免疫应答的理论后 ,人们对补体 C3 在细菌免疫中的作用愈来愈重视 ,Villiers 等^[2] 发现 ,所有的免疫细胞都表达补体受体 ,首次提出补体 C3 的免疫功能是由 C3 裂解片段与特异性受体相互作用的结果 ,后来 Van Rossum AM 等^[3] 证实 ,在小鼠体内 ,补体 C3 裂解片段与相应受体的结合是有效清除感染肺炎链球菌的重要途径。Mitsuyoshi 等^[4] 明确指出 ,C3 的免疫佐剂作用 ,是由于 C3d 与 CR2 相互作用的结果 ,而非内源性补体激活的结果。Dempsey 等^[5,6] 分别将抗原与 C3 和 C3d 连接免疫小鼠 ,都得到了较高的血清 IgG 抗体滴度。这充分说明 ,补体 C3 可以作为免疫佐剂。但以上结果 ,都是以哺乳动物为研究对象获得的 ,对于家禽 C3 在细菌疫苗免疫过程中是否具有免疫佐剂作用 ,尚未见报道。

以 SPF 鸡为研究对象 ,从成年 SPF 鸡血清中分离纯化 C3 ,用戊二醛将其与大肠杆菌抗原连接 ,初次免疫 11 日龄 SPF 鸡 ,通过血清中抗体水平的变化规律 ,观察鸡补体 C3 是否对细菌性疫苗具有免疫佐剂的增强作用 ,结果证明增强作用显著。实验结果为开发利用 C3 作为免疫增强佐剂 ,以提高鸡对细菌性疫苗的免疫效果提供了重要的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 抗 C3 21 肽抗体 :由本研究室制备(依照鸡 C3 α 链氨基端第 741-761 的氨基酸序列 SEVDDAFLSDEEDITSRSLFPE^[8] ,合成色普纯度 90% 的 C3 21 肽 ,由北京中科亚光生物工程公司完成。再按参考文献 [9] 制备成功兔抗 C3 21 肽抗体)。

1.1.2 SPF 鸡血清及 SPF 鸡 :由山东家禽研究所 SPF 实验鸡场提供。

1.1.3 菌株 :大肠杆菌(*Escherichia coli*) O78 由本实验室保存。

1.1.4 新西兰白兔 :由山东米歇尔生物制品有限公司实验动物中心提供。

1.1.5 1% 致敏绵羊红细胞 :自制备(无菌采取绵羊

基金项目 :山东省财政支持项目(SDGP2004-54-0)

* 通讯作者。Tel 86-538-8241496 ;Fax :86-538-8241419 ;E-mail :zxniu@sda.u.edu.cn

作者简介 :马雪云(1969 -) ,女 ,山东兖州人 ,副教授 ,博士 ,主要从事兽医微生物学与免疫学的研究。E-mail :xueyunma@yahoo.com.cn

收稿日期 :2005-11-14 ;接受日期 :2006-02-20 ;修回日期 :2006-03-05

红细胞,用 pH7.4 灭菌 PBS 液洗涤 4 次,配成 2% 红细胞悬液,与等量的 4IU 的溶血素充分混合,于 37℃ 水浴 30min,即为 1% 致敏绵羊红细胞。

1.1.6 主要试剂:辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡 IgG:购自联星生物工程公司;牛血清白蛋白:购自上海伯奥生物科技有限公司;亮肽素(leupeptin):购自 AMIRESCO Services L. P. 公司;溶血素:购自农业部成都药械厂;DEAE-Sephacel, Phebyl-Sepharose:购自北京卓冠科技有限公司(Pharmacia)。弗氏佐剂:购自联星生物工程公司(Sigma 产品)。

1.2 C3 佐剂大肠杆菌疫苗的制备

1.2.1 C3 的分离纯化:按参考文献 [7] 进行。首先制备 DEAE-Sephacel 层析柱,用 pH7.0 PBS 平衡过夜后,注入 SPF 鸡血清,pH7.0 的 PBS 洗脱;将洗脱液再通过 Phebyl-Sepharose 层析柱,用 0.1~0.5mol/L 的 NaCl 梯度洗脱,收集洗脱液。采用兔抗鸡 C3 21 肽抗体和兔抗鸡酶标抗体,以间接 ELISA [6] 检测 C3 的纯度。

1.2.2 大肠杆菌抗原的制备:将 O₇₈ 大肠杆菌肉汤培养物于 4℃ 条件下 4000r/min 离心 10min,弃上清,用灭菌生理盐水反复洗涤菌泥,直至上清液清澈透明,将菌泥悬浮于 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 缓冲溶液中,配成菌液浓度为 2 × 10⁹ CFU/mL。用超声波粉碎仪充分裂解菌体,然后 8000r/min 离心 15min,弃沉淀,取上清浓缩至蛋白含量为 0.5mg/L。

1.2.3 C3 与大肠杆菌抗原的连接:将大肠杆菌抗原用 0.3% 的甲醛 4℃ 灭活 48h,经无菌检验后,用新蒸戊二醛与 C3 连接 [8],即为 C3 佐剂大肠杆菌疫苗。

1.3 C3 佐剂疫苗的作用效果实验

1.3.1 动物免疫注射及检样采取:将 11 日龄 SPF 雏鸡随机分为 3 组,同时心脏采血取血清,测定补体总活性;A 组鸡用 C3 佐剂大肠杆菌疫苗注射,1.0mL/每只;B 组鸡用弗氏完全佐剂大肠杆菌疫苗

注射,1.0mL/每只;C 组为非免疫组。18 日龄时,对 A、B 组鸡分别进行再次免疫,1.5mL/每只。分别在首次免疫后的第 2、3、4、5、6、7、8、9 周对 3 组鸡采血,分别用 ELISA 方法检测血清中的抗体含量,同时测定血清的总补体活性。

1.3.2 抗体效价的检测(间接 ELISA 方法 [9]):用 1.3.1 制备的大肠杆菌抗原包被 96 孔酶标板,每孔 50μL,4℃ 条件下过夜,洗涤后每孔加入 1.3.2 中采集的血清 50μL,每个样品做 3 个重复;37℃ 条件下反应 60min,甩干洗涤后,加入 1000 单位的酶标兔抗鸡 IgG,37℃ 条件下反应 60min,OPD 显色,450nm 条件下比色测 OD 值。

1.3.3 总补体活性测定(微量板溶血法):用微量移液管取灭菌生理盐水 50μL,分别加入微量反应板的第一排孔中,然后向第 1 孔中加入鸡血清 50μL,进行倍比稀释至 11 孔,第 12 孔为对照,稀释完毕后,向各孔中分别加入致敏的 1% 绵羊红细胞 50μL,于 37℃ 孵育 30min,观察结果。若从第一孔至第 n 孔完全溶血,第 n+1 孔不完全溶血,则补体的效价为 2ⁿ。

2 结果

2.1 不同佐剂疫苗的效果比较

应用不同佐剂的疫苗免疫鸡后,观察体内血清中抗体水平的变化情况。从表 1 可以看出,A 组(C3 佐剂疫苗)鸡免疫后,产生的抗体水平的增长速度在第二周到第四周期间低于 B 组(弗氏完全佐剂)鸡,第三周、第四周两组鸡的抗体水平相比较,差异显著 (p < 0.05);但 B 组鸡的抗体水平从第四周达到最高水平后迅速下降,到第九周下降到较低的水平 (OD = 0.200 ± 0.005),而 A 组鸡的抗体水平始终处于缓慢的上升趋势,在第七周、第八周和第九周仍然维持在较高的水平 (OD = 0.272 ± 0.004、0.273 ± 0.004、0.275 ± 0.002);未免疫组鸡无抗体产生。

表 1 不同佐剂疫苗免疫后鸡产生的抗体水平的比较 (OD 值)

Table 1 The anti-*Escherichia coli* antibody level after immunized by different adjuvant vaccine (OD value)

Group	The 2nd week	The 3rd week	The 4th week	The 5th week	The 6th week	The 7th week	The 8th week	The 9th week
A	0.098 ± 0.003a	0.15 ± 0.002b	0.188 ± 0.005b	0.225 ± 0.001b	0.248 ± 0.003a	0.272 ± 0.004b	0.273 ± 0.004b	0.275 ± 0.002b
B	0.110 ± 0.003a	0.245 ± 0.001a	0.270 ± 0.004a	0.250 ± 0.003a	0.239 ± 0.003a	0.223 ± 0.004a	0.220 ± 0.004a	0.200 ± 0.005a
C	0.032 ± 0.005a	0.041 ± 0.002c	0.031 ± 0.005c	0.052 ± 0.002c	0.040 ± 0.005b	0.027 ± 0.004c	0.034 ± 0.003c	0.043 ± 0.005c

Note: In the same vertical row the groups with same lowercase which discrepancy arenot distinct (p > 0.05), the groups with different lowercase which discrepancy are distinct (p < 0.05); The subsequent are the same.

2.2 疫苗注射对补体总活性的影响

不同佐剂的疫苗免疫后,鸡体内补体水平的变

化情况见表 2。

从表 2 可看出,免疫后第一周,B 组鸡血清补体

总活性迅速下降(OD 值为 $2^{1.09 \pm 0.11}$) ,而 A 组鸡受到的影响则较小,其补体总活性仍然上升到 $2^{2.38 \pm 0.33}$,二者相比较,差异显著;在免疫后第二周、第三周和第四周,B 组鸡的血清补体总活性仍然维持在较低

的水平,到第五周迅速上升到 $2^{4.00 \pm 0.18}$,而 A 组鸡的补体总活性在试验过程中始终维持在缓慢的持续上升趋势,与 C 组鸡相比较,差异不显著($p > 0.05$) ,似乎没有受到疫苗免疫的影响。

表 2 不同佐剂的疫苗免疫后鸡体补体水平的变化 (nLg2)

Table 2 The change of chicken's complement level after immunized by different adjuvant vaccine

Group	Before immunization	The 1st week	The 2nd week	The 3rd week	The 4th week	The 5th week	The 6th week	The 7th week
A	2.15 ± 0.32a	2.38 ± 0.33b	3.11 ± 0.19b	3.37 ± 0.35b	3.45 ± 0.22b	4.00 ± 0.27a	4.47 ± 0.26a	5.05 ± 0.31a
B	2.17 ± 0.33a	1.09 ± 0.11a	2.00 ± 0.23a	2.18 ± 0.36a	2.97 ± 0.27a	4.00 ± 0.18a	4.50 ± 0.26a	4.89 ± 0.24a
C	2.15 ± 0.15a	2.25 ± 0.35b	3.05 ± 0.31b	3.40 ± 0.33b	3.45 ± 0.28b	3.99 ± 0.24a	44.53 ± 0.33a	5.11 ± 0.31a

3 讨论

Green TD 等曾经利用 C3 分子作为佐剂,对疫苗的免疫增强效果进行过探讨,结果证明 C3 佐剂不仅增强亚单位苗在鼠体内表达的抗体滴度,同时也使抗体的亲和性得到加强^[10]。试验通过对鸡进行 C3 佐剂和弗氏佐剂大肠杆菌疫苗免疫注射,以探讨 C3 佐剂疫苗对鸡体产生抗体的免疫增强效能及规律,结果发现使用 C3 作为免疫佐剂能够使鸡体内产生的抗细菌抗体水平维持的时间较长,发挥的效应久。探究产生这种免疫效果的原因可能与免疫细胞上存在 C3 裂解片段的受体有关。CD19/CD21/CD81 在 B 细胞上以信号复合体的形式存在,当 CD21 与 C3 结合后,使 CD19 与 BCR 交联,促进抗原刺激 BCR 的信号转导,加强 B 细胞应答使血清中抗体水平能够维持在高水平^[12]。Mongini PK 等发现,当 C3-抗原复合物在 B 细胞上使得 BCR 通过 C3 与 CD21/CD19/CD81 交联后,可阻断 B 细胞凋亡,增强 B 细胞对凋亡的逃避^[12]。应用 C3 作为佐剂制成细菌疫苗免疫注射鸡,使其能够产生效价高、维持时间较长的抗体就充分证明了这一点。

试验测定了免疫注射不同佐剂的细菌性疫苗前后鸡血清中补体水平的变化,发现鸡被免疫注射疫苗后,鸡体内大量的补体成分由于对疫苗的应激而被激活消耗,引起补体水平的迅速下降^[13],但如果在免疫注射细菌疫苗同时,补充外来同种动物的补体成分,可抵御鸡体内补体总活性的下降,从而增强鸡体对细菌性疫苗的免疫应答能力。

在养殖生产中发现,鸡对细菌性疫苗的免疫保护力较哺乳动物的效果差,即目前在临床上无有效的细菌性疫苗预防诸如大肠杆菌病、鸡白痢等鸡细菌性疫病的发生,给养鸡业造成了巨大的损失和威胁。造成鸡体对细菌性疫苗免疫应答能力低下的原

因,可能与鸡体内补体含量较哺乳动物低(鸡血清中 C3 含量为 $0.34 \pm 0.005\text{mg/mL}$ 、猪 $1.47 \pm 0.008\text{mg/mL}$ 、山羊 $1.70 \pm 0.005\text{mg/mL}$ 、牛 $1.78 \pm 0.007\text{mg/mL}$ 、豚鼠 $4.18 \pm 0.008\text{mg/mL}$)有关。试验研究结果为研制鸡的有效细菌性疫苗开辟了一条新途径。

参 考 文 献

- [1] Lay WH, Nussenzweig V. Receptors for complement on leukocytes. *J Exp Med*, 1968, **128**(5):991-1009.
- [2] Villiers CL, Villiers MB, Marche PN. Role of complement C3 protein in the control of the specific immune response. *Ann Biol Clin*, 1999, **57**(2):127-135.
- [3] van Rossum AM, Lysenko ES, Weiser JN. Host and bacterial factors contributing to the clearance of colonization by *Streptococcus pneumoniae* in a murine model. *Infect Immun*, 2005, **73**(11):7718-7726.
- [4] Mitsuyoshi JK, Hu Y, Test ST. Role of complement receptor type 2 and endogenous complement in the humoral immune response to conjugates of complement C3d and pneumococcal serotype 14 capsular polysaccharide. *Infect Immun*, 2005, **73**(11):7311-7316.
- [5] Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, et al. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science*, 1996, **271**(5247):348-350.
- [6] Villiers MB, Villiers CL, Laharie AM, et al. Different stimulating effects of complement C3b and complete Freund's adjuvant on antibody response. *Immunopharmacology*, 1999, **42**:151-157.
- [7] Mavroidis M, Sunyer JO, Lambris JD. Isolation, primary structure and evolution of the third component of chicken complement and evidence for a new member of the α_2 -Macroglobulin family. *J Immunology*, 1995, **22**:2164-2174.
- [8] 孙惠兰, 牛钟相, 朱瑞良. 抗赭曲霉毒素 A 抗体的研制与鉴定. *畜牧兽医学报*, 1991, **22**(1):235-237.
- [9] 朱立平, 陈学青. 免疫学常用试验方法. 北京:人民军医出版社, 2000.
- [10] Aursen LI, Koch C. Purification of chicken C3 and structural and functional characterization. *Scand J Immunol*, 1989, **30**:529.
- [11] Green TD, Montefiori DC, Ross TM. Enhancement of antibodies to the human immunodeficiency virus type 1 envelope by using the molecular adjuvant C3d. *J Virol*, 2003, **77**(3):2046-2055.

- [12] 金伯泉. 细胞和分子免疫学. 北京 :科学技术出版社 ,2001.
- [13] 邹 雄, 张利宁. 分子免疫学与临床. 济南 :山东科学技术出版社 ,2003.

The immune enhancement of the C3 to the *Escherichia coli* vaccine

MA Xue-yun¹ , GAO Shu-xia¹ , HAN Jian-qi² , NIU Zhong-xiang^{1*}

(¹ Animal Science and Veterinary Medicine College of Shandong Agricultural University , Tai 'an 271018 , China)

(² Zaozhuang Gardern Bureau of Shandong Province , Zaozhuang 277102 , China)

Abstract :C3b was separated and purified from the SPF chicken serum. It was linked with *E. coli* antigen by the glutaral. 11 days aged SPF chicken were immunized by the complex antigen and the chickens of control group were immunised by the FCA-*E. coli* antigen .They were boosted at the age of 18 day. The immune response was monitored by an enzyme-linked immunosorbent assa(ELISA) for anti-*E. coli* anitbody. The ELISA results indicated that during the early several weeks , IgG titers elicited by FCA (FCA-*E. coli*)were higher than those elicited by C3(C3b-*E. coli*) ,but decreased rapidly after a peak around the end of 4th week from being immunized. Chickens immunized with C3b always gave increased response , and the IgG titers were equal to that of FCA at the end of 5th week from being immunized and then higher and higher than that of FCA. Thus the adjuvant effect of C3b is different from that of FCA , it could induce production of memory cell and make the antigens stimulate immune cells consistently and stably.

Keywords : Complement ; Enhanced immune response ; C3 ; Adjuvant ; *Escherichia coli* vaccine

Foundation item :The item sustained by Shandong province finance(SDGP2004-54-0)

* Corresponding author. Tel 86-538-8241496 ;Fax : 86-538-8241419 ;E-mail :zxnium@sdau.edu.cn

Received : 14 November 2005 / Accepted : 20 February 2006 / Revised : 5 March 2006