

埋植抗原缓释剂 ARD 后牛乳特异性抗体效价评价

刘光磊¹ 王加启¹ 卜登攀¹ 张春刚^{1,2} 程金波¹ 魏宏阳¹ 周凌云¹ 丁庆³ 张成波³

(1. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所/动物营养学国家重点实验室, 北京 100094;

2. 扬州大学 动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009; 3. 北京君阳爱玛科技有限公司, 北京 100086)

摘要 对奶牛埋植抗原缓释剂 ARD (antigen release device) 生产免疫乳的高效性进行评价, 随机选择 40 头成年健康荷斯坦奶牛, 试验组 20 头奶牛于右侧髂内淋巴结处埋植 3 种释放时间不同的 ARD, 分别在埋植当天、14 d 和 28 d 释放抗原, 通过 ELISA 检测血清和乳清中特异性抗体的效价及消长规律。研究表明: 埋植 ARD 免疫后, 奶牛血清中特异性抗体滴定效价均明显升高, ELISA 滴定效价平均为 2×10^6 。埋植后 9 d 便可检测到乳清中特异性抗体, 其应答规律与 3 种 ARD 的释放一致, ELISA 滴定效价平均可以达到 4.1×10^4 , 可以达到 2~3 d 初乳的水平。试验结果说明了 ARD 生产免疫乳的高效性; 通过比较血清和乳清中特异性抗体含量变化, 发现在血清效价相同的情况下, 奶牛个体对 IgG 的转运存在差异; ARD 的缓释技术较为精确, 缓释误差仅为 2~3 d。

关键词 奶牛; 埋植; 抗原缓释剂; 免疫乳; 高效性

中图分类号 S835

文章编号 1007-4333(2007)06-0057-05

文献标识码 A

Efficiency of Implanted antigen release device to produce immune milk in cows

Liu Guanglei¹, Wang Jiaqi¹, Bu Dengpan¹, Zhang Chungang^{1,2}, Cheng Jinbo¹,
Wei Hongyang¹, Zhou Lingyun¹, Ding Qing³, Zhang Chengbo³

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition/Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2. College of Animal Science and Technology of Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

3. Beijing Kingsun-aima Technology Co., Ltd., Beijing 100086, China)

Abstract Studied immune milk production by implanting an Antigen Release Device (ARD) and evaluated the efficiency of implantation in 40 adult and healthy Holstein cows. Twenty cows were assigned to a test group and implanted with 3 types of ARDs, which released antigens in different days, from the right lymph node. The specific Ig serum and whey was assayed with ELISA. The level of specific antibody in serum increased significantly after implantation, and the average ELISA titer was 2×10^6 . The specific antibody in whey was measurable after 9 d, and the response patterns were consistent with release of the 3 ARDs. The average ELISA titer was 4.1×10^4 , up to the level of 2 and 3 d colostrums, thereby confirming the efficiency of immune milk production by implanting ARD. The difference in Ig transport capability was ascertained though comparison of specific antibody between serum and whey. The release of ARD was very accurate with an error of 2 to 3 d.

Key words cow; implantation; antigen release device; immune milk; efficiency

人们从牛奶中获得免疫球蛋白的主要来源是初乳和免疫乳^[1]。免疫乳 (immune milk) 是指给牛等哺

乳动物选择性地接种某些能够引起人类疾病的细菌、病毒或其他外来抗原, 刺激其机体产生免疫应答

收稿日期: 2007-07-04

基金项目: 国家“十一五”科技攻关奶业重大专项 (2006BAD04A03); 国际合作项目 (2006DFB32160); 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所青年基金资助项目

作者简介: 刘光磊, 博士研究生, E-mail: guanglei1979@126.com; 王加启, 研究员, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事反刍动物营养和牛奶质量改良研究, E-mail: wang-jia-qi@263.net

后分泌的含有特异性抗体的乳^[2]。免疫乳能预防某些人类胃肠道传染病,如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、志贺氏菌(*Shigella*)、幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)等^[3-5]。免疫乳天然、健康、安全,是新型功能性食品,具有广阔的市场前景和研究价值。

国内外对免疫乳已有较多研究。张和平等将24株人肠道病原菌培养,以全菌培养液制作了乳剂疫苗^[6];第四军医大学将肝炎病毒HBV表面抗原与HCV核心抗原基因重组于原核高效表达载体,利用基因工程苗生产出抗肝炎病毒的多价特异性免疫乳^[7],均取得显著效果。免疫乳生产所用的疫苗主要为针对多种胃肠道病原菌的常规疫苗,免疫方式主要为肌肉注射、腹腔注射、乳腺免疫或这些方法的组合,疫苗佐剂主要有脂质体(liposome)、微囊(microspheres)、蜂胶(propolis)等,可以有效地增强免疫效果。常规免疫方式存在的缺点是半衰期短,需要长期频繁注射免疫。为此,许多学者从埋植剂和缓释剂2方面研究疫苗制剂。这2种制剂的骨架均采用聚乳酸、聚乳酸羟乙酸(PLGA)、聚丙交酯乙交酯(PLCG)等生物可降解聚合物,这些聚合物在体内可逐渐降解为乳酸、羟乙酸等物质,后者经三羧酸循环转化为水和二氧化碳;因此这些剂型除具有良好的生物相容性(biocomparability),无免疫反应,安全

性较高外,还可以通过改变单体比例及聚合条件来调节聚合物在体内的降解速度,达到抗原控制释放(antigen control release)的目的^[8-11]。对奶牛进行埋植生长激素等蛋白类缓释剂已有研究报道,但目前尚未见采用埋植缓释疫苗进行免疫乳生产的研究报道。本研究旨在研究奶牛埋植抗原缓释剂后血清和乳清中特异性抗体含量变化规律,为含高水平特异性抗体的免疫乳生产提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 抗原缓释剂ARD(antigen release devise)

以脂肪酶抗原(lipase antigen)和佐剂皂苷(Quil A)按特定比例制成免疫刺激复合物(ISCOMs)疫苗,再以聚乳酸交酯胶囊包被制成棒状抗原缓释剂ARD。ARD1不采用缓释剂包被,在埋植当天释放抗原;ARD2和ARD3以不同浓度的聚乳酸交酯胶囊包被ISCOM,分别在埋植后的第14和28天释放抗原。3种ARD均委托澳大利亚Agri-BIOTECH公司进行制作,其抗原组成及性状见表1。

ARD采用埋植枪(Synovex implanter,澳大利亚)进行埋植,手术前对埋植枪的注射针头进行灭菌,将3种ARD依次放入注射针头,在奶牛右侧乳镜处将ARD埋植在髂内淋巴结内。

表1 3种供试抗原缓释剂(ARD)的抗原组成及性状

Table 1 Antigen components and characters of ARD

抗原缓释剂	ISCOMs 组成(质量比)	Lipase 含量/(mg/剂)	抗原释放时间	ARD 长度/mm	ARD 直径/mm
ARD1	P6 Lipase Quil A = 96 3 1	0.76	埋植当天	6.2	2.3
ARD2	Lipase Quil A = 3 1	0.76	埋植后 14 d	10.0	5.0
ARD3	Lipase :Quil A = 3 1	0.76	埋植后 28 d	10.0	5.0

1.2 试验奶牛、地点及时间

在北京市大兴区沧达福奶牛场选择40头泌乳前期的成年健康(以隐性乳房炎诊断液进行乳房炎检测剔除隐性乳房炎病牛)荷斯坦奶牛,根据产奶量、胎次、泌乳阶段分为免疫组和对照组(各20头),参试奶牛状况见表2。于2006-11-16以埋植枪对

表2 供试奶牛状况

Table 2 Status of cows

组别	胎次	泌乳时间/d	日平均产奶量/kg
试验组	2.65 ±0.67	114.6 ±31.64	25.3 ±3.3
对照组	2.65 ±0.59	112.6 ±35.60	26.6 ±3.7

注:n=40。

免疫组的20头牛埋植3种不同ARD,分别在埋植后的当天、14和28d释放抗原刺激奶牛产生免疫应答,试验期为3个月。

1.3 试验奶牛饲养管理及样品采集

奶牛日粮配合参照《中国奶牛饲养标准》(NY/t 34-2004),满足日产25kg产奶需要。奶牛采用TMR饲喂,自由采食。每日分别于07:00、13:00和19:00饲喂,饲喂30min后采用Delaval鱼骨式挤奶台进行机械挤奶,挤奶时进行“二次药浴,一次纸巾擦干”。

试验期前30d每周收集奶样2次,后60d每5d采集奶样1次。每头牛按早中晚产奶量取样后按体积比4:3:3制成混合乳样。每组随机选择10

头牛,每10 d采集血液1次,以真空促凝采血管(BD Vacutainer™,美国)于尾根动/静脉采血,分离血清,-80℃保存待用。同时随机采集沧达福牛场14头分娩奶牛的初乳样品,每头奶牛每24 h采集1次奶样,连续采集7 d,用以分析比较免疫乳清和初乳乳清中特异性抗体含量。

1.4 乳清分离及抗体含量检测

取10 mL牛奶于离心管中,4℃ 1500 r/min离心30 min,弃去乳脂加入5 μL凝乳酶(Rennet, Sigma, 200 mg/mL),充分混匀,37℃培养1~2 h,将凝固牛奶剧烈振动混匀,5000 r/min离心30 min,收集上清液,-80℃保存待用。

间接ELISA方法测定特异性抗体含量,以脂肪酶Lipase(Type from *Pseudomonas* sp., Sigma)包被酶标板捕获待检样品中的特异性抗体,FCS(胎牛血清)为阴性对照,澳大利亚 Agri-BIOTECH 公司提供的2个阳性乳清为阳性对照,采用AP酶标抗牛IgG作为二抗,p-NPP显色,405 nm测定OD,待检样品OD/阴性对照OD=2时判定为阳性。以2个阳性对照样品和本实验免疫乳12个样品进行ELISA滴定效价测定,建立OD与ELISA滴定效价的函数关系。待检免疫乳清稀释200倍检测其OD,利用函数关系计算其效价。

1.5 数据统计

以Excel初步整理数据,SAS V9进行统计分析。统计模型为MIXED,固定效应有试验处理、试验期及二者之间的交互作用,显著性水平为 $P < 0.05$ 。采用Duncan方法对不同天数的初乳及免疫乳进行多重比较,显著性水平为 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 ARD 埋植对奶牛健康状况及生产性能的影响

埋植枪通过奶牛乳镜在髻内淋巴结处埋植ARD,因此对奶牛健康状况的影响是人们较为关心的问题。结果表明,埋植后奶牛食欲正常,埋植伤口愈合较好,没有发炎症状。试验组和对照组奶牛体细胞数(SCC)差异不显著($P > 0.05$),分别为 (14.0 ± 7.8) 和 (14.1 ± 8.4) 万/mL。从SCC和乳房炎的发病率来看埋植手术不会引发乳房炎。此外,埋植ARD后奶牛产奶量及乳脂率、乳蛋白、乳糖和总固型物等乳成分均差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 样品光密度(OD)与ELISA 滴定效价的关系

试验样品ELISA效价与OD的函数关系见图1。

由图可见,ELISA 滴定效价与OD呈线性关系,当OD为1.0时,其ELISA 滴定效价约为 1×10^5 。

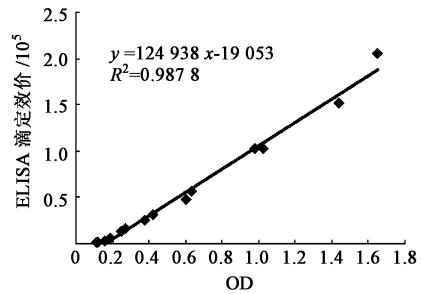


图1 ELISA 滴定效价与光密度(OD)的函数关系

Fig. 1 Functional relationship of ELISA titer and OD value

2.3 血清中特异性抗体含量变化规律

埋植ARD后,免疫组20头牛血清中特异性抗体水平均明显升高,埋植后9 d可检测到高水平的抗体($P < 0.01$),一直持续到40 d才开始缓慢下降。血清中ELISA 滴定效价平均为 2×10^6 (图2)。

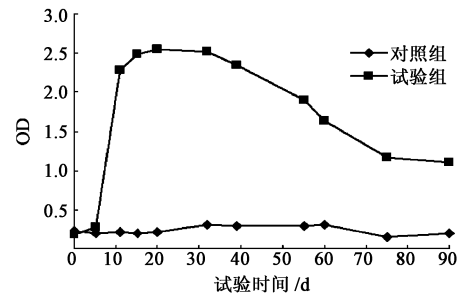


图2 血清中特异性抗体变化曲线

Fig. 2 Curve of specific antibody in serum

2.4 乳清中特异性抗体含量分析

2.4.1 乳清中特异性抗体含量变化规律 埋植ARD会使牛奶中特异性抗体含量增加,埋植后9 d便可检测到乳清中特异性抗体(图3),17~40 d水平较高,此后特异性抗体水平一直下降,至75 d时与对照组差异不显著。其应答规律与3种ARD的释放一致。埋植后3种ARD先后刺激,应答规律变化

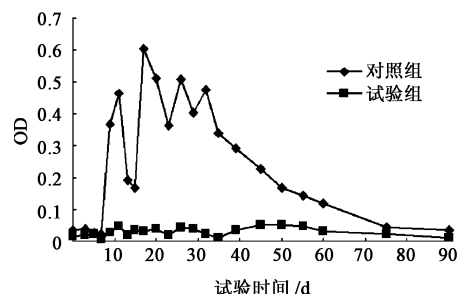
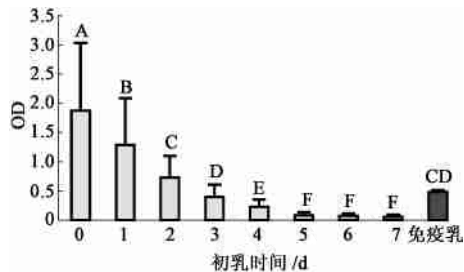


图3 乳清中特异性抗体变化曲线

Fig. 3 Curve of specific antibody in whey

明显,ARD1埋植后当天释放,抗体维持时间短,迅速下降;14d时ARD2释放,引起2次免疫应答,抗体迅速上升,再缓慢下降;28d时ARD3释放,引起第3次免疫应答,抗体持续时间长,下降速度缓慢。

2.4.2 初乳中特异性抗体变化规律 检测初乳清中特异性抗体含量,并与此次试验免疫乳混合样(17~35d)比较,结果(图4)表明:随着分娩日龄的增加,初乳中特异性抗体含量迅速下降($P < 0.01$),第5~7天与常乳差异不显著($P > 0.05$)。本试验的免疫乳可以达到2~3d初乳的水平。

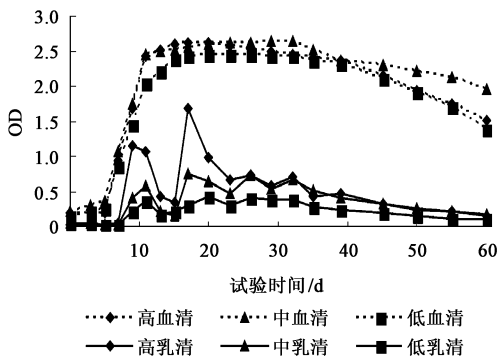


条柱上字母不同表示数据间差异极显著($P < 0.01$)。

图4 奶牛初乳与免疫乳中特异性抗体含量比较

Fig. 4 Comparison of specific antibody between colostrums and immune milk

2.4.3 奶牛个体差异分析 分析免疫组每头奶牛乳清中特异性抗体消长规律,以OD 0.1~0.4为低,0.4~0.8为中,>0.8为较高将20头奶牛的免疫乳生产效果分为高中低3组,奶牛头数分别为4、9和7头,但3组牛血清中均有高水平的特异抗体,差异较小(图5)。



高、中、低为根据牛奶中免疫球蛋白含量划分的组别

图5 血清和乳清中特异性抗体含量比较

Fig. 5 Comparison of specific antibody between serum and whey

2.4.4 ARD释放时间精确度分析 根据乳清特异性抗体消长规律,以ARD2和ARD3分别在第17和32天使抗体达到新的高峰为准时,评价2种ARD的缓释精确度(表3)。可以看到,ARD的缓释技术较

为精确,缓释误差仅为2~3d,达到生产水平要求。

表3 抗原缓释剂释放时间分析

Table 3 Analysis of ARD release time

试验奶牛	ARD2			ARD3		
	提前 1~2 d	准时	延迟 1~2 d	提前 1~2 d	准时	延迟 2~3 d
数量/头	1	9	10	10	8	2
占总头数 比值/%	5	45	50	50	40	10

3 讨论

1) 抗原缓释剂(ARD)其抗原为精致纯化抗原,可以根据不同目的使用不同抗原,此次试验使用抗原模型为脂肪酶蛋白(Lipase)。埋植后特定时间释放出ISCOMs,经淋巴循环进入淋巴结或经血液进入脾脏,被抗原递呈细胞APC捕获,经加工处理形成抗原肽-MHC分子复合物,递呈给CD4+TH细胞。TH细胞通过对抗原的识别、活化、增殖,分化为CD4+TH2细胞,产生细胞因子作用于B细胞,促使B细胞活化。活化的B细胞可表达多种细胞因子受体,在不同细胞因子作用下发生类别转换,增殖分化为能合成分泌不同类别Ig的浆细胞,合成并分泌抗体,发挥特异性免疫效应^[12]。产生的抗体经淋巴液和血液输送到全身,在乳腺组织由腺泡上皮FcRn(neonatal Fc receptor, FcRn)受体结合,选择性地将IgG转运进牛奶中^[13]。3种ARD的设计及不同释放时间代表了奶牛的免疫程序,ARD₁埋植当天释放抗原代表初次免疫,ARD₂和ARD₃分别在14和28d释放抗原代表再次免疫和加强免疫。因此,在牛奶中可检测到特异性抗体,其含量变化规律与3种ARD的释放时间一致,充分说明了ARD生产免疫乳的可行性。

2) 免疫刺激复合物(ISCOM)是一种全面的抗原递呈系统,对机体具有免疫增强和抗原递呈双重功能,能同时刺激体液免疫及细胞免疫^[12,14]。ISCOM疫苗能显著增强T细胞增殖、分化,诱导多种亚型(IgG、IgG_{2a}、IgG_{2b}及IgG)的特异性抗体产生,引起多种动物对多种抗原产生高滴度的抗体应答,且引起的应答通常出现时间早,持续时间长,抗体水平高,所需抗原量少,并且不受已存在抗体或母源抗体的影响。Quil A是ISCOM中的关键成分和构成复合物立体结构的基质,大量研究表明Quil A为唯一能使

外源性抗原既能刺激机体 Th_1 免疫应答,又能诱导细胞毒性淋巴细胞应答 (CTL) 的佐剂^[15~17],因此,ARD 免疫乳 ELISA 滴定效价平均可高达 4.1×10^4 。

3) 试验组每头奶牛血清中均有高水平的特异抗体,且差异较小,表明 3 种埋植剂均起到了较好的效果,但牛奶中特异性抗体水平含量个体间相差较大,说明奶牛个体对 Ig 的转运存在差异。血液中的 Ig 流经乳腺上皮细胞过程中,在腺泡上皮细胞的基底侧与酸性环境中的 FcRn 受体结合,以“转运泡”的形式释放到腺腔中。FcRn 受体是牛奶中 Ig 富集的原因,在 Ig 的运输中起了很关键的作用^[18~20]。牛奶中抗体含量的高低与 FcRn 的结构及基因多态性的关系还需要进一步研究。

4 结论

埋植 3 种抗原缓释剂 ARD 后,奶牛血清和乳清中特异性抗体水平均明显升高,其应答规律与 3 种 ARD 的释放时间一致;乳清中特异性抗体 ELISA 滴定效价平均为 4.1×10^4 ,可以达到 2~3 d 初乳的水平;ARD 缓释精确度较高,缓释误差仅 2~3 d。因此认为,ARD 是一种高效的新型免疫乳生产技术。

参 考 文 献

- [1] 王加启. 21 世纪国际奶业发展新动向[J]. 中国畜牧兽医, 2007(4): 5~6
- [2] Raj Mehra, Pertti Marnila, Hannu Korhonen. Milk immunoglobulins for health promotion[J]. International Dairy Journal, 2006, 16:1262~1271
- [3] Marnila P, Rokka S, Rehnberg-Laiho L, et al. Prevention and suppression of *Helicobacter felis* infection in mice using colostrum preparation with specific antibodies [J]. *Helicobacter*, 2003(8): 192~201
- [4] Tawfeek H I, Najim N H, Al-Mashikhi S. Efficacy of an infant formula containing anti-*E. coli* colostrum antibodies from hyperimmunized cows in preventing diarrhea in infants and children: A field trial [J]. International Journal of Infectious Diseases, 2003(7): 120~128
- [5] Ashraf H, Mahalanabis D, Mitra A K, et al. Hyperimmune bovine colostrum in the treatment of shigellosis in children: A double blind, randomized, controlled trial [J]. Acta Paediatrica, 2001, 90: 1373~1378
- [6] 张和平, 杜文, 郭军, 等. 含 24 种乳抗体免疫乳的制备[J]. 中国乳品工业, 2004(4): 3~7
- [7] 尹文, 雷迎峰, 杨敬, 等. 抗 HBV 与 HCV 免疫乳的试验免疫研究[J]. 生物技术通讯, 2005, 16: 632~634
- [8] Beck L R, Stolle R J. Antihypertensive hyperimmune milk, production, composition, and use [P/OL]. US:5194255, 1993-03-16 [2007-04]. <http://www.freepatent-online.com/5194255.html>
- [9] Hodgkinson A J, Hodgkinson S C. Processes for production of immunoglobulin A in milk [P/OL]. NZ:6616927, 2003-09-09 [2007-04]. <http://www.freepatentonline.com/6616927.html>
- [10] Stolle R J. Use of honey as vaccine [P/OL]. US:5130128, 1992-07-14 [2007-04]. <http://www.freepatent-online.com/5130128.html>
- [11] Beck L R, Ishida A, Yoshikai Y, et al. Use of hyperimmune milk to prevent suppression of T lymphocyte production [DB/OL]: US, 6056978. 2000-05-02 [2007-04]. <http://www.freepatentonline.com/6056978.html>
- [12] 杨汉春. 动物免疫学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 111~139
- [13] Clark L, Anderson C C, Jonghan K, et al. Perspective- FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine [J]. TRENDS in Immunology, 2006(7): 343~348
- [14] Anders S, John C C, Ian G. B. ISCOMs: an adjuvant with multiple functions [J]. Journal of Leukocyte Biology. 1998, 12: 713~723
- [15] Gdeon F A K, Anne-Mary V D P, Tom T, et al. Immunogenicity of liposomes and ISCOMs containing the major outer membrane protein of neisseria gonorrhoeae: influence of protein content and liposomal bilayer composition [J]. Infection and Immunity, 1988(6): 1661~1664
- [16] Morein B, Bengtsson K L. Immunomodulation by ISCOMs, immune stimulating complexes [J]. Methods, 1999, 1: 94~102
- [17] Pearse M J, Drane D. ISCOMATRIX™ adjuvant: a potent inducer of humoral and cellular immune responses [J]. Vaccine, 2004, 19: 2391~2395
- [18] Laegreid W W, Heaton M P, Keen J E, et al. Association of bovine neonatal Fc receptor α -chain gene (FCGR1) haplotypes with serum IgG concentration in newborn calves [J]. Mammalian Genome, 2002, 13: 704~710
- [19] Kolb A F. Engineering Immunity in the Mammary Gland [J]. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2002(7) 2: 123~134
- [20] Vaccaro C, Zhou Jinchun, Ober R J, et al. Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate *in vivo* antibody levels [J]. Nature Biotechnology, 2005(23) 10: 1283~1288