

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.06.035

藏猪白细胞介素-12 基因表达对猪圆环病毒 2 疫苗的免疫增强效应

宋婷玉¹, 肖永乐¹, 曾光志², 陈 祎¹, 李金海²,
万小平¹, 王泽洲³, 方鹏飞², 高 荣¹

(1. 四川大学生命科学学院生物资源与环境教育部重点实验室, 动物疾病防控和食品安全四川省重点实验室, 成都 610064;
2. 四川省华派生物制药有限公司, 成都 610026; 3. 四川省动物疫病预防控制中心, 成都 610035)

摘 要: 为研究 *IL-12* 基因在猪体内表达对 PCV2 疫苗免疫应答的调控作用, 本研究将藏猪 *IL-12* 基因克隆至 VR1020 载体, 壳聚糖包裹重组质粒制备成壳聚糖纳米颗粒 (VRIL-12-CNP) 并与 PCV2 疫苗共同接种 21 日龄断奶仔猪。接种后第 0d、7d、14d 和 28d 采集猪前腔静脉血进行血细胞分析、PCV2 抗体检测和相关免疫基因表达量检测, 并记录体重。结果显示: 接种 VRIL-12-CNP 和 PCV2 疫苗的实验组猪的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 细胞和 PCV2 抗体显著增长 ($P < 0.05$), *TLR2/7*、*IL-12/4/6/15*、*STAT 1/3* 和 *Bcl-2* 基因的表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$); 试验期间实验组体重净增长也明显高于对照组 ($P < 0.05$)。结果表明: VRIL12-CNP 能增强 PCV2 疫苗的先天性和获得性体液、细胞免疫应答, 是安全、有效的 PCV2 疫苗佐剂。

关键词: 猪; *IL-12* 基因; 免疫; 圆环病毒 2 型疫苗; 壳聚糖纳米颗粒

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)06-1345-06

Elevation of immune response to PCV2 vaccination by co-inoculation with interleukin-12 gene of Tibetan pig

SONG Ting-Yu¹, XIAO Yong-Le¹, ZENG Guang-Zhi², CHEN Yi¹, WAN Xiao-Ping¹,
LI Jin-Hai², WANG Ze-Zhou³, FANG Peng-Fei², GAO Rong¹

(1. Key Laboratory for Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry Education, Key Laboratory for Animal Disease Prevention and Food Safety of Sichuan Province, College of Life Sciences, Sichuan University, 610064, Chengdu, China;
2. Sichuan Huapai Biopharmaceutical company, Chengdu, 610026, China;
3. Center for Animal Disease Control of Sichuan Province, Chengdu, 610035, China)

Abstract: To study the regulation effect on vaccination of PCV2 by co-delivering *IL-12* gene. *IL-12* gene of Tibetan pig was cloned into VR1020, the recombinant plasmids were packaged into chitosan nanoparticles (VRIL-12-CNP) and then used to inoculate the 21-day-old piglets together with PCV2 vaccine. Blood samples were taken at 0d, 7d, 14d and 28d post vaccination for analysis. The CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T cells and PCV2 antibody were increased significantly in the experiment group post vaccination ($P < 0.05$), the expression levels of *TLR2/7*, *IL-12/4/6/15*, *STAT1/3* and *Bcl-2* were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$), moreover, the net weight gain was significantly increased

收稿日期: 2017-04-19

基金项目: 国家自然科学基金(30871855); 科技部国际合作项目(2011DFA10101103)

作者简介: 宋婷玉(1992-), 女, 汉族, 硕士研究生, 研究方向为医学遗传与分子生物学. E-mail: stytyki@163.com

通讯作者: 高荣. E-mail: gaorong96@163.com

in the 28 days post inoculation ($P < 0.05$). Co-inoculation of VRIL-12-CNP with PCV2 vaccine elevated swine innate immune response and both humoral and cellular immune response to PCV2, and VRIL-12-CNP as an adjuvant is safe and effective to PCV2 vaccination.

Keywords: Pigs; *IL-12* gene; Immunity; Porcine circovirus type 2 vaccine; Chitosan nanoparticle

1 引言

猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus 2, PCV2)是一种具有致病性的圆环病毒属成员, PCV2 感染是导致断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)、繁殖障碍综合征、猪皮炎与肾病综合征、先天性震颤等多种圆环病毒病的主要因素, 从 1991 年 PMWS 首次在加拿大^[1]出现到现在, PCV2 给全球多个国家和地区的养猪业都造成了严重的经济损失^[2-6]. 目前已发现的 PCV2 有五种基因型, 分别是 PCV2a、PCV2b^[7]、PCV2c、PCV2d^[6]和 PCV2e^[8]. PCV2a 是发现最早也是被研究最多的一种; PCV2b 则是目前全球流转的 PCV2 中最流行的一种; PCV2c 仅在丹麦和巴西被发现且有推测认为该基因型已经灭绝^[6]; PCV2d 具有最强的毒力, 且呈现出逐步替代 PCV2b 的趋势^[9]; 而 PCV2e 是 2016 年确认的新基因型. 目前市面上的 PCV2 疫苗多为基于 PCV2a 研制的灭活疫苗或亚单位疫苗, 这种疫苗对 PCV2a 和 PCV2b 有一定的防治效果, 能在一定程度上抑制病毒复制和减弱临床症状, 但并不能完全阻止病毒感染和传播, 而开发安全高效的免疫佐剂可增强现有商品疫苗的免疫保护作用.

重组细胞因子质粒可使细胞因子在动物体内持续表达, 相比细胞因子的分子佐剂而言, 具有成本低、生物活性持久以及表达稳定等特点, 正被逐渐用于免疫佐剂研究. 本实验室早期的研究表明, 壳聚糖包裹的 *IL-2*^[10]、*IL-4*、*IL-6* 重组质粒和 CpG 岛在动物体内表达能够显著提高猪蓝耳病疫苗^[11]、猪口蹄疫疫苗^[12]、猪霍乱疫苗^[13, 14]、肺炎支原体疫苗^[15]和伪狂犬疫苗^[16]的免疫应答. 但细胞因子 *IL-12* 作为 PCV2 疫苗佐剂的研究却未见报道. 本研究开展了壳聚糖包裹的藏猪 *IL-12* 重组质粒对猪 PCV2 疫苗免疫应答的研究, 为开发新型安全高效的 PCV2 疫苗佐剂进行了探索.

2 材料及方法

2.1 材料

VR1020 由 Vical 公司提供; pEASY-T1、*Trans5 α* 购自全式金; 壳聚糖: 分子量 150kDa, 购

自 Sigma; PCV2 疫苗(圆环康)、实验动物(10 头 21 日龄的健康三元杂交商品猪(杜大长))由华派生物制药有限公司提供. 通过 RT-PCR 和 ELISA 检测鉴定, 所有供试仔猪都是 PCV-2、PRRSV、CS-FV 和肺炎支原体抗原阴性.

2.2 方法

2.2.1 *IL-12* 重组质粒构建与质粒检测 分离四川甘孜高原藏猪的外周血单核细胞, 用 ConA 刺激培养 48h 后提取细胞总 RNA 并反转录, 根据 GeneBank 中 *IL-12* 基因的 P40 和 P35 序列设计引物, 将 P40 和 P35 分别克隆至 pEASY-T1 载体, 进行 PCR、酶切和测序验证. 藏猪 *IL-12* 基因 P40 和 P35 测序结果登记在 GeneBank 中(p40 序列号: KF246515.1; p35 序列号: KF246517.1). 以构建的 T 载体为模板, 通过 2A 自剪接和 In-fusion 技术将 P40、P35 和线性化的 VR1020 质粒进行连接, 构建含有完整 *IL-12* 基因的重组质粒(记为 VRIL-12), 2A 短肽序列为 5'-GGA GAG GGC AGG GGA AGT CTT CTA ACA TGC GGG GAC GTG GAG GAA AAT CCC GGG CCA-3'. 用 VRIL-12 转染 HEK293 细胞, 设置空白细胞对照、空载质粒对照和 *IL-23* 重组质粒对照(VRIL-23), 于转染后 48h 收集细胞并提取总 RNA 进行 RT-PCR 扩增, 检测细胞中 *IL-12* 和 *IL-23* 基因表达情况. *IL-12* 引物为: *IL12-P40-F* 和 *IL12-P35-R*, 引物序列见表 1.

用 VRIL-12 转化大肠杆菌, 筛选阳性克隆子并进行扩大培养, 用 OMEGA 试剂盒大提质粒. 凝胶法检测质粒的内毒素含量, 方法参考《中华人民共和国药典》和鳌试剂说明书.

2.2.2 壳聚糖纳米颗粒制备 采用离子交联法^[14]制备壳聚糖包裹的 *IL-12* 重组质粒, 记为 VRIL-12-CNP. 用马尔文粒度仪对 VRIL-12-CNP 进行检测.

2.2.3 实验动物分组及接种 将 10 头仔猪随机均分为实验组(A 组)和对照组(B 组), 每组 5 头. A 组接种 2.5 mL VRIL-12-CNP 和等量圆环康, B 组接种 2.5 mL 生理盐水和等量圆环康, 接种方式为肌肉注射, 接种前将疫苗分别与 VRIL-12-CNP

和生理盐水按 1 : 1 混合. 于接种后第 0 d、7 d、14 d 和 28 d 收集猪前腔静脉血 5 mL, 并记录猪第 0 d 和第 28 d 体重.

2.2.4 血细胞和 T 细胞数量变化检测 取新鲜血液 0.5 mL, 采用深圳迈瑞 BC-5000 进行血常规分析. 取新鲜血液 100 μ L, 用 Southern Biothech 单抗 CD3 ϵ -SPRD, CD4-FITC 和 CD8R-PE 避光染色 30 min; 经 Sigma 红细胞裂解液裂解后, 用 PBS 缓冲液洗涤直至无明显红色杂质, 染色后的样品用流式细胞仪 BD FACS Calibur 检测 T 细胞数量, 检测结果用 Flowing 软件分析.

2.2.5 血清抗体检测 采用 ELISA 试剂盒检测血清中 PCV2 抗体, 试剂盒购自武汉科前.

2.2.6 荧光定量检测相关免疫基因表达量 取 100 μ L 血样提取总 RNA, 用全式金反转录试剂盒进行反转录. 依据 GeneBank 中猪免疫相关基因序列设计 RT-PCR 引物, 其中 PPIA 为内参基因, 引物序列见表 1.

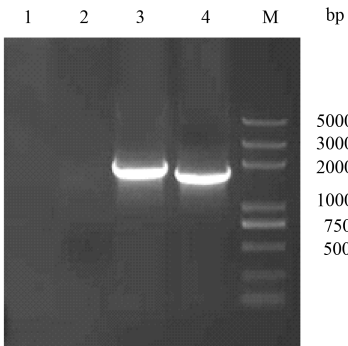


图 1 IL-12 在 HEK293 细胞中的表达情况
泳道 M: Trans 5K; 泳道 1: 空白对照; 泳道 2: VR1020 对照; 泳道 3: VRIL-12; 泳道 4: VRIL-23 对照; 泳道 1-3 以 IL12-P40-F 和 IL-12-P35-R 为引物; 泳道 4 以 IL-23-F 和 IL-23-R 为引物.

Fig. 1 Expression of IL-12 in HEK293 cells

3 结果

3.1 质粒验证和壳聚糖纳米颗粒检测

HEK293 细胞总 RNA 的 RT-PCR 扩增结果如图 1, 空白对照和 VR1020 空载质粒对照无条带, 表明两组细胞中无 IL-12 基因表达; VRIL-12 转染细胞 (Lane 3) PCR 产物可见明亮条带, 大小约为 1700bp, 与 IL-12 (长度为 1743bp) 基因大小相符, 表明 VRIL-12 在细胞中能成功表达. VRIL-12-CNP 平均粒径大小为 120.75 ± 11.12 nm, 电荷大小为 $+29.4 \pm 3.9$ mV, 分散度为 0.185 ± 0.021 .

3.2 实验动物体重变化

从表 2 可以看出, 接种前 (第 0 天) A 组和 B 组实验动物的体重差异不显著 ($P > 0.05$), A 组实验动物在接种 VRIL-12-CNP 和 PCV2 疫苗后的 28d 里体重增长显著高于只接种 PCV2 疫苗的 B 组 ($P < 0.05$).

表 1 荧光定量 PCR 引物序列及退火温度

Tab. 1 Primer sequence and annealing temperature

基因	序列 (5'→3')	退火温度/°C
IL12-P40-F1	ATGCACCTTCAGCAGCTGGTTGTC	60
IL12-P35-R2	TTAGGAAGAATTCAGATAGCTC	
IL-23-F	ATGCACCTTCAGCAGCTGGTTGTC	60
IL-23-R	TTACTGGCTCAGAGTTGCTGCTC	
PPIA-F	AGACAGCAGAAAACCTCCGTG	52
PPIA-F	AGACAGCAGAAAACCTCCGTG	52
PPIA-R	ACTTGCCACCAGTGCCATTA	
IL-4-F	GCTGCCCCAGAGAACACGAC	60
IL-4-R	AGGTTCTGTCAAGTCCGCTC	
IL-6-F	ATAAGGGAAATGTCGAGGCTG	60
IL-6-R	GTGGCTTTGTCTGGATTCTTTC	
IL-12(p40)-F	ATGCACCTTCAGCAGCTGGTTGTC	59
IL-12(p40)-R	CTAATTGCAGGACACAGATGCCAT	
IL-15-F	GCGATGAAGTGCTTTCTCCTG	60
IL-15-R	ACTCAATGGACGATAAACTGCTG	
TLR2-F	TGCTGCAAGGTCAACTCTCT	61
TLR2-R	CAGCAGGGTCACAAGACAGA	
TLR7-F	TTCTAAAACCTCTGCCCTGTG	60
TLR7-R	TTAATGGTGAGGGTGAGGTTG	
Be1-2-F	GAAACCCCTAGTGCCATCAA	60
Be1-2-R	GGGACGTCAGGTCACTGAAT	
STAT1-F	TCTGGCACAGTGGCTAGAAAAATC	56.3
STAT1-R	GAAAACGGATGGTGGCAAAC	
STAT3-F	AGGACATCAGCGGTAAGA	60
STAT3-R	GGTAGACCAGCGGAGACA	

表 2 实验猪体重变化表

Tab. 2 Effect on the weight of piglets post inoculation (n = 5)

分组	第 0d 体重 (kg)	第 28d 体重 (kg)	净增重 (kg)	平均增重 (kg)
A	8 \pm 1.15	17.96 \pm 2.31	9.96 \pm 1.25 ^a	0.36 \pm 0.04 ^a
B	7.35 \pm 0.25	14.6 \pm 0.51	7.25 \pm 0.52 ^b	0.26 \pm 0.02 ^b

注: 同一栏标记不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$).

3.3 外周血中血细胞变化

由图 2 可知, 与对照组相比, VRIL-12-CNP 接种猪在接种后第 7d 和 14d 红细胞数量增长显著 ($P < 0.05$). 实验组血红蛋白水平也在第 7d 时显著高于对照组 ($P < 0.05$).

3.4 外周血中 T 淋巴细胞变化

由图 3 可知,在接种前(第 0d),CD3⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞以及 CD8⁺ 和 CD4⁺ 之间的比率都无显著差异,接种后第 28d,实验组与对照组之间差异明显,接种了 VRIL-12-CNP 和 PCV2 疫苗的实验组 CD3⁺T 细胞,CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞数量都显著高于对照组($P<0.05$).

3.5 体液免疫变化

体液免疫中血清抗体水平变化如图 4 所示,第 0d 时,实验组和对照组血清中特异性抗 PCV2 抗体都呈阴性(S/P 值 <0.16),接种后特异性抗体水平开始增长,在第 7d 和第 28d 时实验组增长水平显著高于对照组($P<0.05$).

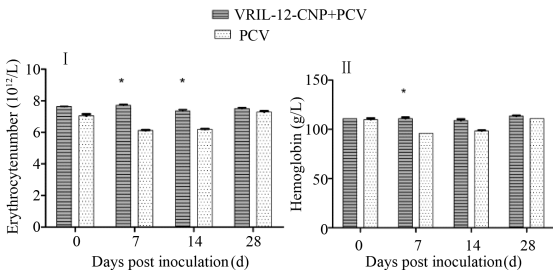


图 2 实验猪血细胞变化
I:红细胞 II:血红蛋白

Fig. 2 Changes of blood cells of the experimental pigs
I: Erythrocyte II: Hemoglobin

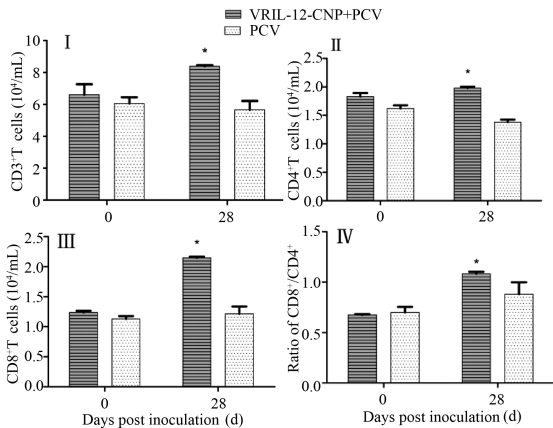


图 3 实验猪外周血中 T 细胞变化
I:CD3⁺T 细胞 II:CD4⁺T 细胞
III:CD8⁺T 细胞 IV:CD8⁺/CD4⁺比例

Fig. 3 Changes of T lymphocytes in the peripheral blood of the experimental pigs

I: CD3⁺T cells II: CD4⁺T cells
III: CD8⁺T cells IV: Ratio of CD8⁺/CD4⁺

3.6 免疫相关基因表达量变化

3.6.1 Toll 样受体基因表达量变化 从图 5 可知,TLR2 和 TLR7 在 VRIL-12-CNP 和 PCV2 疫苗的刺刺激下均显著增长,实验组的 TLR2 的表达量在第 28 天时显著高于对照组($P<0.05$). 而

TLR7 基因表达量在第 7d 和第 28d 时均显著高于对照组($P<0.05$).

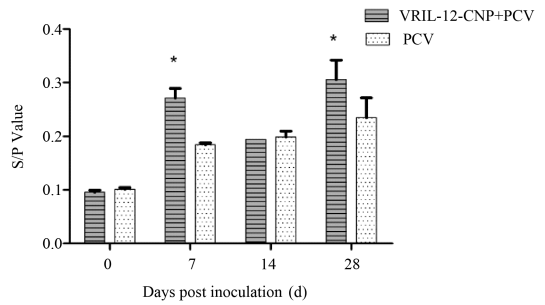


图 4 实验猪血清中 PCV2 抗体的变化
S/P 值 >0.16 表示 PCV2 抗体阳性

Fig. 4 Change of PCV2 antibody in the sera of the experimental pigs
S/P value >0.16 means positive

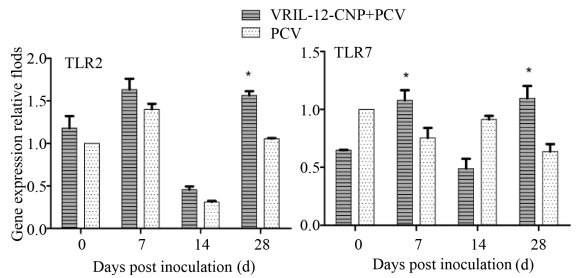


图 5 实验猪 TLR2 和 TLR7 基因表达量变化

Fig. 5 Changes of the gene expression of Toll-like receptors of the experimental pigs

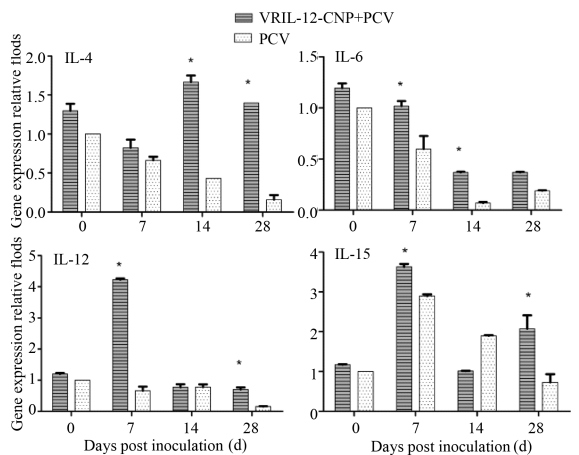


图 6 实验猪细胞因子基因表达量变化

Fig. 6 Changes of the gene expression of cytokines of the experimental pigs

3.6.2 细胞因子基因表达量变化 由图 6 可知,实验组细胞因子基因表达量在接种 VRIL-12-CNP 和 PCV2 疫苗后均显著高于对照组.实验组的 IL-4 基因在第 14d 和第 28d 表达量都显著高于对照组($P<0.05$);IL-6 基因从第 7d 开始均显著增长($P<0.05$);IL-12 基因在第 7d 和 28d 时表达量都显著增长($P<0.05$);IL-15 基因在第 7d 和 28d 时

表达量均显著高于对照组($P<0.05$).

3.6.3 免疫信号转导分子表达量变化 由图7可知,免疫信号转导分子基因 *STAT1*、*STAT3* 和 *Bcl-2* 的表达量在接种后都显著增长. 实验组的

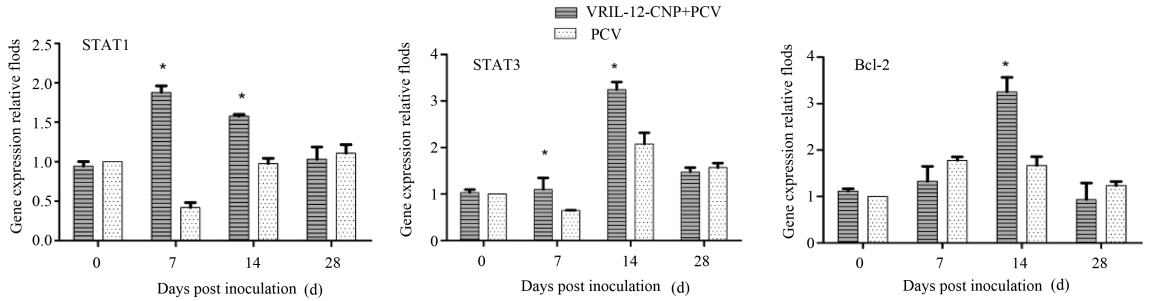


图7 实验猪免疫信号转导分子基因的表达量变化

Fig. 7 Changes of gene expression of immune signal transduction molecules of the experimental pigs

4 讨论

藏猪具有抗病力强的特点,与其他品种猪相比,其 *IL-12* 基因的 P40 序列含有 975bp 的开放性阅读框,编码 324 个氨基酸(AA),有七个碱基突变和三个碱基缺失,导致了三个 AA 替换和一个 AA 缺失. 这些差异可能使藏猪和其他品种猪在抗病方面产生差异.

Toll 样受体 (TLR) 能激活先天性免疫系统^[17],诱导骨髓细胞分泌炎症因子. *IL-15* 可刺激先天性免疫细胞如 NK 细胞、NKT 细胞和上皮内淋巴细胞等的分化^[18]. 本研究中实验组 *TLR2*、*TLR7* 和 *IL-15* 基因表达量在接种 VRIL12-CNP 和 PCV2 疫苗后的 7d、28d 显著增长($P<0.05$),提示 *IL-12* 可能会提高先天免疫反应中机体对病原微生物的识别和吞噬作用,刺激先天性免疫细胞的分化.

体液免疫是机体对抗 PCV2 感染最重要的机制,实验组在接种前 PCV2 抗体呈阴性,但在接种后的 7~28d PCV2 抗体均呈阳性,增长显著高于对照组($P<0.05$). 表明 VRIL-12-CNP 能够显著增强猪对 PCV2 疫苗的体液免疫应答.

研究表明,PCV2 感染会减少 B 细胞、Th 细胞和记忆细胞的数量,损害机体的细胞免疫. Th 细胞不仅参与细胞免疫,还能刺激 B 细胞产生抗体. 流式分析结果表明,接种后实验组猪的 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞数量都呈现明显的增长趋势($P<0.05$),表明接种后实验组猪的细胞免疫反应比对照组更为活跃,VRIL-12-CNP 能显著增强猪对 PCV2 疫苗的细胞免疫应答,间接增强体液免疫

STAT1 和 *STAT3* 基因表达量在接种 VRIL-12-CNP 和 PCV2 疫苗后的第 7d 和 14d 显著高于对照组($P<0.05$); *Bcl-2* 基因表达量在第 14d 时显著高于对照组($P<0.05$).

应答.

IL-12 可以刺激 Th 细胞的增值分化,Th1 细胞主要参与细胞毒和炎症相关免疫反应,Th2 型细胞因子可诱导 B 细胞分化和抗体分泌^[19]. 本研究发现,实验组在接种后 *IL-4/6/12/15* 基因的表达量都显著高于对照组($P<0.05$),表明 VRIL-12-CNP 能够通过促进 Th1 和 Th2 型细胞因子表达来增强体液免疫和细胞免疫反应.

STATs 可调控细胞因子和干扰素的信号传递,在各组织中广泛表达^[20]. *Bcl-2* 在对抗病原体上起着关键作用^[21]. 本研究中实验组猪 *STAT1*、*STAT3* 和 *Bcl-2* 基因的表达量均显著增长($P<0.05$),这一结果与 *IL-4/6/12/15* 基因表达量的增加有密切关联. 表明 VRIL12-CNP 能够促进免疫活性细胞的增殖分化,由此可以增强相关免疫反应.

值得注意的是,在试验期间(0d~28d),实验组体重增长明显,净增重显著高于对照组($P<0.05$),红细胞和血红蛋白水平也显著增长,所有动物都未出现发烧、局部病变、发炎等不良反应,也无死亡. 表明 VRIL12-CNP 对于接种猪的生长性能有促进作用,是一种安全有益的制剂,没有其他明显的抑制或副作用也与之之前的研究结果相符合^[14, 15]. 实验组动物体重的显著增长可能是由于先天性免疫和获得性免疫相关基因 (*TLR2/TLR7* 和 *IL-4/6/12/15*) 在复杂的内分泌和细胞因子网络调控下表达量上升,使得动物内脏器官的消化、合成代谢都得到正向调控^[22],但具体的调控机制还有待进一步的研究.

总之,本研究结果表明,VRIL12-CNP 不仅能

通过提高 TLRs 基因的表达来增强 PCV2 疫苗的先天气免疫,也能通过提高 PCV2 抗体水平、T 细胞数量、细胞因子以及免疫信号转导分子的表达水平,来增强获得性体液免疫和细胞免疫.初步证明 VRIL12-CNP 是一种安全有效的提高猪免疫力和生长性能的疫苗佐剂,也为进一步研究利用 IL-12 奠定了基础.

参考文献:

- [1] Hamel A L, Lin L L, Nayar G P S. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs[J]. *J Virol*, 1998, 72: 5262.
- [2] Cheung A K. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2[J]. *Virology*, 2003, 305: 168.
- [3] Shang S B, Jin Y L, Jiang X T, *et al.* Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus Type 2[J]. *Mol Immunol*, 2009, 46: 327.
- [4] Cheung A K. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2[J]. *Virology*, 2003, 313: 452.
- [5] Mahé D, Blanchard P, Truong C, *et al.* Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1815.
- [6] Xiao C T, Halbur P G, Opriessnig T. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96: 1830.
- [7] Cheung A K, Lager K M, Kohutyuk O I, *et al.* Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds[J]. *Arch Virol*, 2007, 152: 1035.
- [8] Davies B, Wang X, Dvorak C M, *et al.* Diagnostic phylogenetics reveals a new Porcine circovirus 2 cluster[J]. *Virus Res*, 2016, 217: 32.
- [9] Li W L, Wang X W, Tao M, *et al.* Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains isolated between 2001 and 2009: genotype PCV2b predominate in postweaning multisystemic wasting syndrome occurrences in eastern China [J]. *Virus Genes*, 2010, 40: 244.
- [10] 杨璐一,肖永乐,万小平,等.猪白细胞介素 2 与融合白细胞介素 4/6 基因共表达的免疫效应研究[J]. *四川动物*, 2014, 33: 167.
- [11] 陈建林,杨肖,章欢,等.猪白细胞介素 4,6 融合基因和 CpG 基序对猪蓝耳病疫苗免疫的强化效应[J]. *四川动物*, 2008, 27: 1012.
- [12] 郑敏,陈文龙,杨肖,等.改组猪 IL-2 和重组 IL-6C 基因增强猪口蹄疫疫苗的免疫应答[J]. *四川动物*, 2009, 28: 670.
- [13] Li D, Chen J L, Zhang H, *et al.* Improvement of the immunity of pig to Hog cholera vaccine by recombinant plasmid with porcine interleukin-6 gene and CpG motifs[J]. *Vaccine*, 2011, 29: 3888.
- [14] Yang X, Sun W K, Chen W L, *et al.* Promotion of the immunity of piglets to Hog cholera vaccine induced by shuffled pig interleukin-2 gene and CpG immunostimulatory sequences encapsulated in chitosan nanoparticles [J]. *Procedia Vaccinol*, 2010, 2: 51.
- [15] Yang X, Xiao Y-L, Chen J-L, *et al.* Potentiation of immunity of piglets to mycoplasma hypopneumoniae vaccine with fused gene for pig IL-4 and IL-6 embodied in chitosan nanoparticles[J]. *Procedia Vaccinol*, 2013, 7: 15.
- [16] Huang J, Chen J-L, Wang Y, *et al.* Enhancement of the immunity of piglets to pseudorabies vaccine with plasmids containing interleukin-6 gene and CpG motifs encapsulated in chitosan nanoparticles [J]. *Procedia Vaccinol*, 2013, 7: 8.
- [17] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4: 499.
- [18] Lodolce J P, Boone D L, Chai S, *et al.* IL-15 Receptor Maintains Lymphoid Homeostasis by Supporting Lymphocyte Homing and Proliferation[J]. *Immunity*, 1998, 9(5): 669.
- [19] Ansel K M, Djuretic I, Tanasa B, *et al.* Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility[J]. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 607.
- [20] 付浩,孟凤艳,李芳莲,等.家猪 STAT1 的基因克隆、剪接变体鉴定及组织表达研究[J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2015, 52: 1157.
- [21] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival[J]. *Science*, 1998, 281: 1322.
- [22] Oswald I P. Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine[J]. *Vet Res*, 2006, 37: 359.