

新鱼腥草素钠对雏鸡免疫应答的影响

朱善元, 王健, 蒋春茂

(江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏 泰州 225300)

摘要: 试验 I: 将 180 羽 11 日龄非免疫健康三黄鸡随机分为 5 组。第 I ~ III 组分别注射高、中、低剂量 (4 、 2 、 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的新鱼腥草素钠 (sodium new houtluyfonate, SNH) 注射液; IV 组和 V 组分别为白细胞介素 2 (IL-2) 和生理盐水对照。所有动物于 14 日龄以新城疫病毒 (NDV) LaSota 株弱毒活疫苗滴鼻进行第 1 次免疫, 2 周后加强免疫 1 次。于第 1 次免疫后的 7、14、21、28、35 和 42 d 测定各组动物的抗 NDV 血凝抑制抗体水平以及外周血 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 淋巴细胞比值。结果表明, SNH 能显著提高鸡体抗 NDV 抗体水平和外周血 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 淋巴细胞比值 ($P < 0.05$), 并以中等剂量 ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 效果最为明显。试验 II: 将 72 羽 7 日龄非免疫健康三黄鸡随机分成 3 组, 第 I 组口服氟苯尼考 (Florfenicol, $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 并配合肌肉注射 SNH ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); 同时设氟苯尼考 (II 组) 和生理盐水 (III 组) 对照。各组于 14 日龄以 NDV LaSota 株弱毒活疫苗进行第 1 次免疫, 2 周后进行第 2 次免疫; 于首免后 7、14、21 和 28 d 测定各组动物的抗 NDV 血凝抑制抗体水平。结果表明, 中剂量的 SNH 对氟苯尼考引起的雏鸡免疫抑制具有一定的拮抗作用。结论: SNH 注射液对雏鸡体液免疫和细胞免疫具有明显的增强功能, 并能拮抗某些药物引致的免疫抑制作用。

关键词: 新鱼腥草素钠; 雏鸡; 免疫应答; 拮抗

中图分类号: S853.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2008) 03-0121-04

Effects of sodium new houtluyfonate on chicken immune response

ZHU Shan-yuan, WANG Jian, JIANG Chun-mao

(Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary College, Taizhou 225300, China)

Abstract: Experiment I: One hundred and eighty healthy eleven-day-old Sanhuang chickens were assigned to five groups. The 1st to 3rd three groups were tested with different doses (4 , 2 and $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) of sodium new houtluyfonate (SNH) respectively and the 4th group was treated with interleukin 2 (IL-2), with the 5th group only injected with normal saline water as control. All the animals were then immunized with the LaSota live vaccine against Newcastle disease virus (NDV) for two times with 14 days interval. On the 7th, 14th, 21st, 28th, 35th and 42nd day after the first immunization, the antibody specific to NDV and the ratio of $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ peripheral lymphocyte was determined, and the data showed that SNH could induce a better antibody response to NDV and increase the ratio of $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ peripheral lymphocyte. In addition, the effects of different levels of SNH were dissimilar on improving immune response, while the optimistic level was $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Experiment II: To determine the effects of SNH on chicken humoral immune response in immunosuppression, 72 healthy seven-day-old Sanhuang chicks were assigned to 3 groups. Florfenicol and middle dose ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) of SNH were treated in the 1st group, while the 2nd group was orally administered with Florfenicol and the 3rd group was only injected with normal saline water as control. All the animals were vaccinated with the LaSota live vaccine against NDV for two times with 14 days interval. On the 7th, 14th, 21st and 28th day after the first treatment, the antibody specific to NDV was determined. The data revealed that SNH could antagonise the immunosuppression of Florfenicol on chicken.

Key words: sodium new houtluyfonate (SNH); chicken; immune response; antagonism

新鱼腥草素钠 (SNH) 注射液是用现代化学工艺合成的鱼腥草素类似物制成的水溶性针剂, 主要成分为亚硫酸氢钠十二酰乙醛, 它去除了鱼腥草无用及有不良反应的成分, 性能更稳定。大量研究表明, SNH 对多种细菌有明显的杀菌和抑菌作用, 同时还能提高血清备解素水平, 增强白细胞和单核巨噬细胞的吞噬功能, 提高脾内 T、B 细胞密度及增强 NK 细胞活性和促进免疫球蛋白形成^[1-3]。该药在增强机体免疫功能方面有良好的作用, 但目前关于 SNH 对家禽免疫功能影响及在养禽业中的应用尚未

见详细报道。本试验以鸡新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) LaSota 株弱毒活疫苗接种前注射 SNH 为例, 通过对雏鸡 2 次免疫后抗体效价以及外周血 CD_4^+ / CD_8^+ 淋巴细胞比值的动态变化, 探讨了 SNH 注射液对雏鸡体液免疫和细胞免疫的影响。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂与仪器

1.1.1 药物 新鱼腥草素钠注射液由江苏动物药品工程技术研究中心制备, 规格 10 mL (20 mg)。

1.1.2 试验动物 1 日龄非免疫健康三黄肉雏鸡, 购自江苏省家禽科学研究所。

1.1.3 疫苗及标准抗原 NDV LaSota 株弱毒活疫苗, 乾元浩生股份有限公司南京生物药厂生产 (批号 0701269)。NDV 标准抗原为中国科学院哈尔滨兽医研究所研制。

1.1.4 主要仪器及试剂 流式细胞仪为美国 FACS Aria 公司产品。禽用白细胞介素 2 (IL-2) 为大连三仪动物药品有限公司产品 (批号 079017); 氟苯尼考 (Florfenicol) 为上海同仁药业有限公司产品 (批号 070501); 生物素 (Biotin) 标记的鸡 CD_3^+ 分子单克隆抗体, 藻红蛋白 (PE) 标记的鸡 CD_8^+ 分子单克隆抗体, 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的鸡 CD_4^+ 分子单克隆抗体, 均为美国 Southern Biotech 公司生产; 别藻蓝蛋白 (APC), 为美国 BD 公司生产。

1.2 SNH 对雏鸡免疫应答的影响

1.2.1 试验分组 180 羽 1 日龄非免疫健康三黄鸡于清洁环境饲养至 11 日龄, 随机分成 5 组。试验 I ~ III 组分别肌肉注射高、中、低剂量 (4 、 2 、 1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的 SNH, 每天 1 次, 连续 3 d; 第 IV 组为 IL-2 对照, 于第 14 和 28 天以厂家规定用量配合疫苗饮水免疫, 饮水时间为 50 min; 第 V 组以注射等量生理盐水 (8.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NaCl) 作为对照。所有各组动物均于 14 日龄以 NDV LaSota 株弱毒活疫苗通过滴鼻进行第 1 次免疫, 2 周后以同样方法加强免疫 1 次。

1.2.2 样品采集与处理 分别于 LaSota 株弱毒活疫苗第 1 次免疫后的 7、14、21、28、35、42 d 从各组动物翅静脉采血, 分离血清, 用于测定抗体效价; 同时, 随机抽取 6 只动物采抗凝血, 按常规方法分离淋巴细胞, 并用 PBS (pH 7.2) 漂洗 3 次, 最后调整细胞含量为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ [4]。

1.2.3 抗 NDV 血凝抑制抗体的测定 用 NDV 标准抗原以微量血凝抑制试验 (HI) 检测血清样品中的抗 NDV 血凝抑制抗体效价 [5]。

1.2.4 外周血 T 细胞亚群检测 取淋巴细胞悬液 50 μL , 同时加入标记的 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 单克隆抗体 20 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 30 min 后用 PBS 漂洗 3 次; 加入 APC 20 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 30 min; 用 PBS 漂洗 3 次后置流式细胞仪检测, 计算外周血 CD_4^+ / CD_8^+ 淋巴细胞的比值。

1.3 SNH 对氟苯尼考引致免疫抑制的拮抗试验

72 羽 1 日龄非免疫健康三黄肉鸡饲养于清洁环境至 7 日龄, 随机分成 3 组, 每组 24 羽, I 组口服 1.2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氟苯尼考, 同时配合肌肉注射 2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SNH, 每天 1 次, 连续 21 d; 第 II 组为口服氟苯尼考 (1.2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 对照, 每天 1 次, 连续 21 d; 第 III 组注射等量生理盐水作为对照。所有动物于 14 日龄以 NDV LaSota 株弱毒活疫苗进行第 1 次免疫, 2 周后进行第 2 次免疫。于第 1 次免疫后的 7、14、21 和 28 d, 经翅静脉采血分离血清, 用 NDV 标准抗原以微量血凝抑制试验 (HI) 检测血清样品中的抗 NDV 血凝抑制抗体效价。

1.4 数据统计分析

数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示, 用 SPSS (13.0) 软件进行方差分析和邓肯式多重比较。

2 结果与分析

2.1 SNH 对体液免疫的影响

第 1 次疫苗免疫后 7 d, SNH 试验组的抗体效价均高于生理盐水对照, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 第 1 次疫苗免疫后 14 d, 中剂量 (2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) SNH 组的 NDV 抗体效价显著高于生理盐水对照 ($P < 0.05$), 但略低于 IL-2 对照组; 第 2 次免疫后 14 d (即首次免疫后 28 d), 低、高剂量 SNH 组的 NDV 抗体水平均达到高峰, 并高于生理盐水对照, 但低于中剂量 SNH 组和 IL-2 对照组。在第 2 次疫苗免疫后 21 d (即首次免疫后 35 d), 中剂量 SNH 组的 NDV 抗体水平仍在升高并显著高于低、高剂量 SNH

组和生理盐水对照组, 而与 IL-2 对照组的 NDV 抗体水平相当。分析发现, SNH 提高鸡抗 NDV 血凝抑制抗体效价的作用并非与剂量成正比关系, 以中等剂量 ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 效果最为明显 (表 1)。

表 1 新鱼腥草素钠对新城疫病毒免疫雏鸡抗体效价的影响

Table 1 The effect of sodium new houtluyfonate (SNH) on antibody titer to Newcastle disease virus vaccine (\log_2)

组别 Group	首次免疫后时间/d Time after the first immunization					
	7	14	21	28	35	42
$4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SNH	5.3 ± 0.25^a	6.0 ± 0.45^b	6.8 ± 0.27^b	7.6 ± 0.33^a	7.0 ± 0.41^{ab}	6.5 ± 0.28^b
$2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SNH	5.7 ± 0.19^a	6.8 ± 0.33^a	7.4 ± 0.49^a	8.7 ± 0.11^a	8.8 ± 0.52^{ba}	8.1 ± 0.19^a
$1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SNH	5.1 ± 0.32^a	6.2 ± 0.42^b	6.7 ± 0.32^b	8.0 ± 0.29^a	7.4 ± 0.54^{ab}	6.9 ± 0.16^b
IL-2	5.9 ± 0.31^a	6.9 ± 0.51^a	7.7 ± 0.21^a	8.9 ± 0.26^a	8.8 ± 0.19^a	8.3 ± 0.17^a
$8.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NaCl (control)	4.7 ± 0.37^a	5.1 ± 0.39^b	5.5 ± 0.37^b	6.0 ± 0.24^b	6.1 ± 0.21^c	5.8 ± 0.31^c

注: 同一列数据不同上标字母者表示在 0.05 水平差异显著。

Note: Different superscript letters indicate the data in same column are significantly different at 0.05 level. The same as follows.

2.2 SNH 对外周血 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 淋巴细胞比值的影响

第 1 次疫苗免疫后 21 d, SNH 试验组 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 淋巴细胞比值均高于生理盐水对照 ($P < 0.05$), 但低于 IL-2 对照组; 第 2 次疫苗免疫后 14 d (首次免疫后 28 d), 各 SNH 剂量组的 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 淋巴细胞比值均达到最大, 且中剂量 SNH 组显著高于低、高剂量 SNH 试验组和生理盐水对照组, 而与 IL-2 对照组水平相当; 至第 2 次疫苗免疫后 21 d (首次免疫后 35 d), 各 SNH 试验组的 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 淋巴细胞比值均表现下降趋势, 但仍高于生理盐水对照组 ($P < 0.05$) (表 2)。表明 SNH 具有提高外周血 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 淋巴细胞比值的作用, 其中以 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组效果最为理想。

表 2 新鱼腥草素钠对外周血 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 淋巴细胞比值的影响

Table 2 The effect of SNH on the ratio of $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ peripheral lymphocyte

组别 Group	首次免疫后时间/d Time after the first immunization					
	7	14	21	28	35	42
$4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SNH	2.15 ± 0.22^a	2.31 ± 0.25^a	2.48 ± 0.22^b	3.29 ± 0.27^a	2.94 ± 0.21^b	2.66 ± 0.21^b
$2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SNH	2.21 ± 0.28^a	2.49 ± 0.23^a	2.80 ± 0.17^a	3.57 ± 0.31^a	3.50 ± 0.19^a	3.21 ± 0.24^a
$1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SNH	2.13 ± 0.16^a	2.24 ± 0.22^a	2.45 ± 0.25^b	3.41 ± 0.19^a	3.10 ± 0.14^b	2.77 ± 0.22^b
IL-2	2.31 ± 0.21^a	2.57 ± 0.19^a	2.82 ± 0.25^a	3.56 ± 0.16^a	3.67 ± 0.29^a	3.37 ± 0.26^a
$8.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NaCl (control)	2.10 ± 0.23^a	2.16 ± 0.29^a	2.19 ± 0.11^b	2.30 ± 0.23^b	2.25 ± 0.25^c	2.11 ± 0.32^c

2.3 SNH 对氟苯尼考引致雏鸡免疫抑制的拮抗作用

统计结果显示, 在第 1 次免疫后 7、14、21 和 28 d, 氟苯尼考模型组鸡体抗 NDV 血凝抑制抗体效价均显著低于生理盐水对照组 ($P < 0.05$), 说明氟苯尼考具有抑制鸡体产生抗 NDV 血凝抑制抗体效价的作用; 而使用了 SNH 后鸡体的抗 NDV 血凝抑制抗体效价显著高于氟苯尼考模型组 ($P < 0.05$), 但与生理盐水对照组差异不显著 ($P > 0.05$) (表 3)。表明 SNH 具有拮抗氟苯尼考引起的鸡体免疫抑制作用。

表 3 新鱼腥草素钠对氟苯尼考引致免疫抑制雏鸡 NDV 抗体的影响

Table 3 The effect of SNH on antibody titer of chicken in immunosuppression by Florfenicol (\log_2)

组别 Group	首次免疫后时间/d Time after the first immunization			
	7	14	21	28
$2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SNH + $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Florfenicol	4.8 ± 0.29^a	5.0 ± 0.19^a	5.4 ± 0.24^a	6.2 ± 0.19^a
$1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Florfenicol	3.0 ± 0.21^b	3.4 ± 0.13^b	3.8 ± 0.28^b	4.0 ± 0.33^b
$8.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NaCl (control)	4.7 ± 0.37^a	5.1 ± 0.39^a	5.5 ± 0.51^a	6.0 ± 0.54^a

3 讨论

新鱼腥草素钠注射液经常用于医学临床, 具有较好的抗菌、抗病毒、抗炎镇痛作用。相关研究报道显示, 其还具有促进白细胞的吞噬和提高机体免疫等功效^[6-8]。

抗体效价的变化直接反映了机体的体液免疫状态。本试验证实, 新鱼腥草素钠注射液具有提高鸡体抗 NDV 血凝抑制抗体效价和外周血 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 淋巴细胞比值的作用, 其中, 中剂量的新鱼腥草素钠与白细胞介素的免疫增强效果相当, 并且这种影响作用呈现出一定的量效关系。因此, 选择合适的剂量对提高机体的最佳免疫力有重要的影响。杜爱芳等^[9]在合成鱼腥草素对小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能影响

的试验结果也证实,随着药液浓度的升高,合成鱼腥草素促进作用反而减弱。关于新鱼腥草素钠高浓度作用力下降的原因,有文献报道可能是由于高浓度鱼腥草素具有抑制溶菌酶的活力^[10]。另外,进一步分析本试验结果还发现,新鱼腥草素钠注射液的免疫促进作用,主要表现在提高鸡体抗体水平和外周血 CD₄⁺/CD₈⁺淋巴细胞比值方面。

某些治疗传染病的药物有免疫抑制作用,如氟苯尼考有一定的血液系统毒性,虽然不会引起不可逆的骨髓再生障碍性贫血,但其引起的可逆性红细胞生成抑制却比氯霉素更常见^[11]。操继跃等^[12]研究发现,较高剂量的氟苯尼考对正常鸡体液免疫具有抑制作用。本试验结果表明 SNH 不仅是一种有效的免疫增强剂,并能够拮抗氟苯尼考导致的免疫抑制作用。因此,SNH 的研发对预防和控制由氟苯尼考等药物引起的家禽免疫抑制具有重要作用。

参考文献:

- [1] Wang D, Yu Q, Eikstadt P, et al. Studies on adjuvanticity of sodium houttuynonate and its mechanism [J]. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2(10): 1411-1418
- [2] 梁玲. 新鱼腥草素钠治疗小儿急性上呼吸道感染的疗效观察 [J]. *深圳中西医结合杂志*, 2006, 16(1): 36-38
- [3] 吕文清,董质冰,罗华堂,等. 鱼腥草注射液治疗急性水样腹泻疗效分析 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2004, 19(3): 235-236
- [4] 汪谦. 现代医学实验方法 [M]. 北京:人民卫生出版社,1997:887-899
- [5] 姚火春. 兽医微生物学实验指导 [M]. 北京:中国农业出版社,2002:105-107
- [6] 蒋春茂,俞吉杰,余祖功,等. 新鱼腥草素钠的急性毒性研究 [J]. *畜牧与兽医*, 2006, 38(12): 54-55
- [7] Wang D, Noda Y, Zhou Y, et al. Effects of sodium houttuynonate on phosphorylation of CaMK II, CREB and ERK 1/2 and expression of c-Fos in macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4(8): 1083-1088
- [8] 刘卫. 新鱼腥草素钠注射液治疗小儿病毒性肺炎 58 例疗效观察 [J]. *湖南中医药导报*, 2003, 9(9): 27-28
- [9] 杜爱芳,胡松华,鲍伟华,等. 合成鱼腥草素对单核-巨噬细胞吞噬功能的影响 [J]. *中国兽医医药杂志*, 1998, 17(3): 7-9
- [10] 袁吕江,李学刚,何红梅,等. 鱼腥草素同系物对小鼠免疫影响的研究 [J]. *中医药学报*, 2004, 32(5): 25-29
- [11] 李秀波,石波,梁萍,等. 新型广谱抗菌药——氟苯尼考 [J]. *国外畜牧科技*, 1999, 26(3): 50-52
- [12] 操继跃,周洪波,卢笑丛,等. 氟苯尼考和中草药黄芪淫羊藿合剂对鸡体液免疫反应的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2003, 34(4): 412-416

责任编辑:周广礼