

蟾酥注射液对马立克氏病疫苗的保护作用

于洋,唐雨顺,张玉科,李明,田莉莉,李敬双
(辽宁医学院,辽宁锦州 121001)

摘要:为了观察蟾酥注射液对鸡马立克氏病疫苗的调节作用,采用中药免疫药理学方法,选择不同浓度的蟾酥注射液与马立克氏病疫苗联合使用,作为试验组,免疫前及免疫后7日、14日和21日龄,通过静脉采集血液,采用MTT法,检测外周血T、B淋巴细胞增值率;采用显微镜计数法,计算血液中白细胞总数;采用鸡腹腔注射红细胞悬液,检测巨噬细胞吞噬力;采用黄嘌呤氧化酶法,测定血清中总的SOD活力;采用腹腔计数200个巨噬细胞所吞噬的红细胞数,计算吞噬百分率和吞噬指数的方法,检测巨噬细胞吞噬力;采用ELISA法,检测血清总抗体效价;采用胸腺、脾脏和法氏囊称重法,检测免疫器官指数。结果显示所有试验组中,蟾酥注射液均能够显著提高外周血T淋巴细胞的增值率;试验组中的高剂量组(0.25 mg/mL)和中剂量组(0.1 mg/mL),蟾酥注射液均能够显著提高血液中的白细胞总数;所有试验组中,蟾酥注射液均能够显著提高巨噬细胞的吞噬率和吞噬指数;试验组中的高剂量组和中剂量组,蟾酥注射液均能够显著提高SOD含量;所有试验组中,蟾酥注射液对马立克氏病疫苗抗体的产生均有不同程度的促进作用;所有试验组中,蟾酥注射液能够显著促进机体免疫器官的发育。说明蟾酥注射液能从特异性免疫、非特异性免疫、免疫细胞和免疫分子等方面增强免疫活性,研究结果显示蟾酥注射液是马立克氏病疫苗有效的免疫增强剂。

关键词:蟾酥注射液;马立克氏病;疫苗;保护;作用

中图分类号:S859.3

文献标志码:A

论文编号:2011-0318

The Protective Action of Venenum Bufonis Injection on Marek's Disease Virus Vaccine

Yu Yang, Tang Yushun, Zhang Yuke, Li Ming, Tian Lili, Li Jingshuang

(Liaoning Medical University, Jinzhou Liaoning 121001)

Abstract: In the present study, researchers observed the regulating action of Venenum Bufonis injection solution on chicken Marek's disease virus vaccine. Methods: Researchers choose the traditional Chinese immunopharmacology method and combined different concentration Venenum Bufonis injection and Marek's disease virus vaccine as test groups. Before immunization and on the 7th, 14th and 21st day after immunization, researchers took blood samples through vein and choose the MTT method to test the proliferation rate of peripheral blood T cells and B cells. Researchers took microscope count method to calculate the total number of leukocytes in blood; injected CRCs to chicken enterocoelia to test the macrophages' phagocytosis; took xanthine oxidase method to test the SOD vitality in blood serum; took the method that count the red blood cell number of 200 phagocyte has phagocytosed and calculate devouring percentage and index of macrophage cell to test the macrophages' phagocytosis; took ELISA method to test the total antibodytiter in blood serum; took thymus, spleen and bursa weight method to test immune organ index. The results showed that in all test groups,

基金项目:辽宁省教育厅科学技术研究项目“中药蟾酥抗鸡马立克氏病肿瘤机制的研究”(L2010336)。

第一作者简介:于洋,男,1962年出生,辽宁瓦房店人,教授,博士,研究方向为临床兽医药理学。通信地址:121001 辽宁省锦州市古塔区人民街五段48号(辽宁医学院畜牧兽医学院),Tel:0416-4673636, E-mail: mxyy@tom.com。

通讯作者:李敬双,女,1963年出生,辽宁锦州人,副教授,硕士,研究方向为动物疾病发病机制及防控。通信地址:121001 辽宁省锦州市古塔区人民街五段48号(辽宁医学院畜牧兽医学院),Tel:0416-4673636, E-mail: xmsyljs00@tom.com。

收稿日期:2011-01-31,修回日期:2011-03-11。

Venenum Bufonis injection could observably increase proliferation rate of peripheral blood T cells. In the high dosage group (0.25 mg/mL) and the medium one (0.1 mg/mL), Venenum Bufonis injection could significantly increase the total number of leukocytes in the blood. In all test groups, Venenum Bufonis injection could significantly increase devouring percentage and index of macrophage cell. In the high dosage group and the medium one of all the groups, Venenum Bufonis injection could significantly increase SOD content. In all of groups, Venenum Bufonis injection had different levels effects on promotion of Marek's disease virus vaccine making antibodies. In all of groups, Venenum Bufonis injection had significant effects on promotion of immune organ growth. The research indicated that Venenum Bufonis injection could enhance the immunity activity from nonspecific immunity, specific immunity, immunocyte and immune molecules. The results showed Venenum Bufonis injection was the effective immunoenhancement of Marek's disease virus vaccine.

Key words: Venenum Bufonis injection; Marek's disease; vaccine; protection; effect

0 引言

蟾酥注射液作为中国的传统中药,对各种疾病的治疗作用已经得到国内外的认可。它的抗肿瘤和增强免疫功效的作用是世界公认的。前人对蟾酥大多是从增强免疫功效方面进行研究,研究结果表明蟾酥具有免疫调节、抗肿瘤、抗炎、局部麻醉、升压等作用^[1-6];有一些学者从抗人类肿瘤方面对蟾酥进行研究,研究结果表明蟾酥可作为抗肿瘤、抗放射的辅助药物,具有改善全身状况,恢复细胞免疫功能,增加白细胞数量,明显缓解癌性疼痛等作用^[7-12];还有一些学者对蟾酥还从抗人类肿瘤作用机制方面进行研究,研究结果表明蟾酥注射液能激活巨噬细胞和杀伤细胞的活性以及诱导干扰素和白细胞介素-2的产生,提高机体自身免疫功能,减少瘤细胞的有丝分裂和淋巴器官中MDV诱发的早期溶细胞感染,降低活化T细胞及转化为肿瘤细胞,阻止肿瘤的发生^[13-19]。在动物医学上的研究很少,姜峰等^[20]对蟾酥不同溶剂萃取物对小鼠免疫细胞功能的影响方面进行研究,表明蟾酥不同溶剂萃取物在体外可促进脾淋巴细胞和腹腔巨噬细胞的免疫功能;于洋等^[21]对蟾酥从增强机体非特异性免疫方面进行研究,研究结果表明蟾酥注射液在一定剂量范围内单独或者协同非特异性丝裂原(ConA或LPS)作用能够显著增强小鼠脾淋巴细胞的增殖能力,蟾酥注射液单独作用可以显著提高巨噬细胞吞噬中性红的能力,蟾酥注射液能够显著提高小鼠NK细胞对靶细胞的杀伤活性,能显著增强小鼠脾淋巴细胞分泌Th1型细胞因子。程相朝等^[22]对中药免疫增强剂对鸡马立克氏病(MD)外周血液ANAE+T淋巴细胞增殖方面进行研究,研究结果表明中药免疫增强剂不但可促进外周血液ANAE+T淋巴细胞总数的增值,而且能明显提高辅助型T淋巴细胞的数量,较好地增强火鸡疱疹病毒苗(HVT)对鸡马立克氏病的免疫效果。王福传等^[23]对复

方中药蟾酥免疫增强剂对鸡免疫器官组织形态学影响方面进行研究,表明中药免疫增强剂不但可促进外周血液ANAE和T淋巴细胞总数的增值,而且能明显提高辅助型T淋巴细胞的数量。但是全世界对蟾酥注射液的研究从未涉及抗病毒以及病毒引发的肿瘤方向上,这为今后对蟾酥注射液的开发和利用遗留了很多空白。无法让蟾酥注射液这一宝贵的中药资源为人类抗击各种疾病发挥作用。

笔者选择不同浓度的蟾酥注射液与鸡马立克氏病疫苗联合使用,从特异性免疫因素、非特异性免疫因素、免疫细胞和免疫分子等方面研究了蟾酥注射液的免疫活性,为进一步研究蟾酥注射液对雏鸡感染马立克氏病毒和有效的接种马立克氏病疫苗,以及作为马立克氏病疫苗的免疫佐剂研究具有指导意义,并为科学的组方和使用蟾酥免疫增强剂,更好的发挥免疫调节作用,提供了科学的试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

试验于2010年在辽宁医学院实验动物中心进行。

1.2 试验材料

1.2.1 试验动物 1日龄雏鸡购自辽宁医学院种鸡孵化场。

1.2.2 仪器 二氧化碳细胞培养箱:北京昊诺斯科技有限公司生产的BB15型;酶标仪:Tecan奥地利生产的genus plus型;酸度计:上海精密仪器仪表有限公司生产的PHS-3B型;超净工作台:北京亚泰科隆实验科技开发中心生产的BCL-1360A/B型;微量移液器:上海仕博生物技术有限公司生产的NPX型;微量震荡器:北京谷美特生物有限公司的Mx4型;离心机:上海安亭科学仪器厂生产的TDL-5-A型。

1.2.3 试剂 肝素钠:购自北京双鹤药业股份有限公司;植物凝集素(PHA-P)、台盼蓝、细菌脂多糖(LPS)、

四甲基偶氮唑盐(MTT)和NBT均购自美国Sigma公司;RPMI-1640细胞培养液:购自美国GIBCO公司;新生牛血清(NBS):购自杭州四季青生物工程材料有限公司;人淋巴细胞分离液:由中国医学科学院生物工程研究所研制;马立克血凝抗原试剂盒:购自中国农科院兰州兽医研究所;超氧化物歧化酶(SOD)测试盒:购自南京建成生物工程研究所。

1.2.4 疫苗 鸡马立克病冻干疫苗由北京海淀中海动物保健科技公司生产。

1.2.5 药品 蟾酥注射液由广西北斗星动物保健品有限公司生产,批号:20090501,20 mg/mL。

1.3 试验方法

1.3.1 给药方法及免疫接种 将1日龄雏鸡200羽,分组及处理见表1,连续用药7天。2~5组雏鸡,1日龄分别注射马立克氏病疫苗,每羽鸡颈背部皮下注射3000 PFU/0.25 mL。5个组在隔离器中分别隔离饲养21天。

1.3.2 样品的采集 免疫前及免疫后7日、14日和21日

表1 分组及处理

序号	组别	免疫数	生理盐水/mL	蟾酥注射液/(mg/mL)	疫苗免疫
1	生理盐水组	40	0.5	/	/
2	实验组(低剂量组)	40	/	0.05	0.25
3	实验组(中剂量组)	40	/	0.1	0.25
4	实验组(高剂量组)	40	/	0.25	0.25
5	疫苗对照组	40	/	/	0.25

龄,通过静脉采集无抗凝血及抗凝血,其中无抗凝血取血清用于抗体及SOD检测,抗凝血用于T、B淋巴细胞增殖及活性试验、白细胞计数和免疫器官指数的比较。

1.3.3 外周血T、B淋巴细胞增殖率的测定

(1)淋巴细胞的分离。短中管中加入适量淋巴细胞分离液。取肝素抗凝静脉血与等量Hank's液或RPMI-1640充分混匀,用滴管沿管壁缓慢叠加于分层液面上,注意保持清楚的界面。水平离心2000 r/min×20 min。离心后管内分为3层,上层为血浆和Hank's液,下层主要为红细胞和粒细胞。中层为淋巴细胞分离液,上、中层界面处有一以单个核细胞为主的白色云雾层狭窄带,用毛细吸管插到云雾层,吸取单个核细胞,置入另一短中管中,加入5倍以上体积的Hank's液或RPMI-1640,5000 r/min×10 min,用PBS洗涤细胞两次,末次离心后,弃上清,加入含有10%小牛血清的RPMI-1640,重悬细胞。

取1滴细胞悬液与1滴0.2%台盼兰染液混合,于血球计数板上,计数4个大方格内的细胞总数。细胞活力检测:死的细胞可被染成蓝色,活细胞不着色。计数200个淋巴细胞。计算出活细胞百分率。

(2)采用MTT法检测外周血T、B淋巴细胞增殖率。将细胞悬液加入96孔细胞培养板,每孔100 μL,每组均设4复孔。然后每孔分别加入100 μL RPMI-1640细胞培养液,置于37℃、5% CO₂培养箱中连续培养44 h;取出培养板,每孔加入20 μL MTT液,继续培养4 h;于1800×g离心10 min弃上清,每孔加入150 μL DMSO,振荡10 min至形成的紫色结晶完全溶解;酶标仪在570 nm波长处测OD值。

1.3.4 白细胞计数 显微镜计数法计算鸡血中白细胞总数。

1.3.5 巨噬细胞吞噬力的测定 取不同日龄试验组和对照组鸡各5羽。检测前1天每羽鸡腹腔注射质量分数为0.5%的淀粉生理盐水1.0 mL,检测时每羽鸡腹腔注射体积分数为5%的鸡红细胞悬液1.0 mL;30 min后颈静脉放血致死鸡只。经腹膜注入生理盐水3.0 mL,轻揉腹部,然后吸出腹腔洗液1.0 mL,平均滴于2片载玻片上,37℃温育,PBS漂洗,除去未贴片细胞,晾干,丙酮-甲醇(1:1)固定,姬姆萨染色,每片油镜下计数200个巨噬细胞所吞噬的鸡红细胞数。计算吞噬百分率和吞噬指数。计算吞噬百分率和吞噬指数其公式为:

$$\text{吞噬百分率} = \frac{200\text{个巨噬细胞中吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{200\text{个巨噬细胞数}} \times 100\% ;$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{200\text{个巨噬细胞吞噬鸡红细胞的总数}}{200\text{个巨噬细胞数}} \times 100\% 。$$

1.3.6 血清总SOD的测定 采用黄嘌呤氧化酶法测定血清中总的SOD活力。对不同日龄的雏鸡静脉采血,

留取血清,并按测试盒说明操作余下步骤,于550 nm处测吸光度。血清总SOD活力定义为每毫升反应液

中SOD抑制率达50%时所对应的SOD量为一个SOD活力单位(U/mL), 通过以下公式计算可求出被测样品

$$\text{总SOD活力(U/mL)} = \frac{(1 - \frac{\text{测定管吸光度}}{\text{对照管吸光度}})}{50\%} \times \text{反应体系稀释倍数} \times \text{样本测试前稀释倍数}$$

1.3.8 免疫器官指数的测定和计算 在7日、14日和21日龄, 试验组和对照组各随机抽取5羽试验鸡, 称重后迅速处死并完整剥离每羽鸡的胸腺、脾脏和法氏囊, 称重。按照下述公式计算每只鸡的胸腺、脾脏和法氏囊指数。

$$\text{免疫器官指数} = \frac{\text{免疫器官重(mg)}}{\text{体重(g)}}$$

表2 各组鸡外周血T淋巴细胞增殖率测定OD值

序号	组别	试验前	7日龄	14日龄	21日龄
1	生理盐水组	0.32±0.07	0.48±0.03	0.74±0.05	1.10±0.05
2	实验组(低剂量组)	0.33±0.05	0.51±0.04 [#]	0.86±0.06 [#]	1.37±0.05 [#]
3	实验组(中剂量组)	0.36±0.04	0.53±0.06 [#]	0.87±0.07 [#]	1.42±0.05 [#]
4	实验组(高剂量组)	0.31±0.08	0.55±0.04 [#]	0.84±0.06 [#]	1.56±0.08 [#]
5	疫苗对照组	0.33±0.05	0.50±0.06	0.82±0.08	1.27±0.06

注: *与疫苗对照组相比差异显著; #与生理盐水组相比差异显著。

表3 各组雏鸡外周血B淋巴细胞增殖率测定OD值

序号	组别	试验前	7日龄	14日龄	21日龄
1	生理盐水组	0.43±0.03	0.51±0.02	0.69±0.04	1.00±0.05
2	实验组(低剂量组)	0.47±0.04	0.56±0.04 [#]	0.89±0.07 [#]	1.18±0.05 [#]
3	实验组(中剂量组)	0.42±0.05	0.53±0.07	0.78±0.08 [#]	1.23±0.05 [#]
4	实验组(高剂量组)	0.48±0.03	0.52±0.03	0.89±0.07 [#]	1.32±0.08 [#]
5	疫苗对照组	0.45±0.05	0.52±0.05	0.84±0.09	1.31±0.06

注: *与疫苗对照组相比差异显著; #与生理盐水组相比差异显著。

强鸡外周血T淋巴细胞的增殖率。并且与生理盐水对照组相比所有试验组的淋巴细胞增殖率均有显著的上升趋势。

各组雏鸡外周血B淋巴细胞增殖率测定OD值见表3, 马立克氏病疫苗和蟾酥注射液对外周血B淋巴细胞增殖率作用不明显。尽管试验组的高剂量组(0.25 mg/mL)与生理盐水对照组和疫苗对照组相比均有明显的升高($P < 0.05$), 但是在第3周时, 所有试验组与疫苗对照组相比均无显著上升的趋势。

2.2 白细胞总数变化情况

各试验组白细胞总数变化情况见表4, 在试验开始的第一周试验组与生理盐水对照组相比均有明显增高($P < 0.05$)的趋势, 中剂量组(0.1 mg/mL)与对照组相比有显著的增高趋势($P < 0.05$)。在第2周和第3周

中的总SOD活力。

1.3.7 血清总抗体效价测定 ELISA法检测。

SPSS13.0软件进行平均数运算和方差计算, 分析各试验组各个指标之间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 各组雏鸡外周血T、B淋巴细胞增殖率变化情况

各组鸡外周血T淋巴细胞增殖率测定OD值见表2, 各组之间的增殖率无显著性差异。从试验进行的第一周开始, 所有试验组中的蟾酥注射液均能够显著增

时, 试验组的中、高剂量组均能够显著增高血液中的白细胞总数($P < 0.05$), 但是试验组中的低剂量组(0.05 mg/mL)($P < 0.05$)在整个试验中对疫苗免疫的增强作用不明显。

2.3 巨噬细胞吞噬力测定结果

各试验组巨噬细胞吞噬百分率见表5, 各试验组巨噬细胞吞噬指数见表6, 所有试验组中的蟾酥注射液均能够显著升高雏鸡巨噬细胞的吞噬率和吞噬指数, 与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$), 表明其具有增加巨噬细胞吞噬能力的作用。

2.4 血清总SOD检测

不同试验组间血清总SOD见表7, 雏鸡血清中的SOD总量在试验后的第1周迅速升高, 在试验后的第3周升至最高。试验的第1周仅有试验组的中、高剂量

表4 各试验组白细胞总数变化情况比较

序号	组别	试验前	7日龄	14日龄	21日龄
1	生理盐水组	20.33±2.43	23.82±3.79	25.61±4.03	26.46±4.99
2	实验组(低剂量组)	23.57±3.67	27.41±4.01 [#]	26.95±3.09	25.97±4.02
3	实验组(中剂量组)	22.09±2.70	28.90±3.17 [#]	29.06±4.67 [#]	27.89±3.87 [#]
4	实验组(高剂量组)	23.02±3.32	27.92±4.39 [#]	29.70±2.99 [#]	29.09±4.87 [#]
5	疫苗对照组	22.56±2.71	25.78±5.01	27.37±5.98	24.30±3.33

注:[#]与疫苗对照组相比差异显著;^{*}与生理盐水组相比差异显著。

表5 各试验组巨噬细胞吞噬百分率

%

序号	组别	7日龄	14日龄	21日龄
1	生理盐水组	61.38±1.38	62.76±0.94	60.53±1.11
2	实验组(低剂量组)	67.77±1.38 [#]	69.12±0.66 [#]	71.45±1.03 [#]
3	实验组(中剂量组)	70.16±1.38 [#]	74.58±0.88 [#]	78.32±1.09 [#]
4	实验组(高剂量组)	75.33±1.38 [#]	80.33±0.97 [#]	82.63±1.23
5	疫苗对照组	63.77±1.38	64.00±1.22	68.70±1.21

注:[#]与疫苗对照组相比差异显著;^{*}与生理盐水组相比差异显著。

表6 各试验组巨噬细胞吞噬指数

%

序号	组别	7日龄	14日龄	21日龄
1	生理盐水组	1.05±0.049	1.06±0.94	1.03±1.11
2	实验组(低剂量组)	1.24±0.049 [#]	1.44±0.66 [#]	1.71±1.03 [#]
3	实验组(中剂量组)	1.69±0.049 [#]	2.17±0.88 [#]	2.32±1.09 [#]
4	实验组(高剂量组)	1.98±0.54 [#]	2.78±0.97 [#]	2.98±0.21
5	疫苗对照组	1.18±0.049	1.22±1.22	1.70±1.21

注:[#]与疫苗对照组相比差异显著;^{*}与生理盐水组相比差异显著。

表7 不同试验组间血清总SOD比较

序号	组别	试验前	7日龄	14日龄	21日龄
1	生理盐水组	67.33±3.21	77.03±4.56	80.06±2.09	81.160±6.31
2	实验组(低剂量组)	65.40±4.02	78.51±10.15	87.87±3.38 [#]	90.091±8.94 [#]
3	实验组(中剂量组)	63.22±4.11	85.81±3.56 [#]	89.73±8.47 [#]	96.831±15.34 [#]
4	实验组(高剂量组)	70.13±3.76	86.02±6.22 [#]	90.67±3.64 [#]	98.834±11.55 [#]
5	疫苗对照组	69.59±3.21	79.77±10.01	79.43±4.27	85.889±5.85

注:[#]与疫苗对照组相比差异显著;^{*}与生理盐水组相比差异显著。

组的SOD含量升高($P<0.05$)。试验的第2周,3个试验组的SOD含量均高于2个对照组,而且与对照组相比均有显著的升高($P<0.05$)。于此同时,疫苗对照组也有显著的升高。

2.5 抗体效价检测结果

各组间抗体效价检测见表8,在试验开始之前,全部的雏鸡血清抗体水平均维持在较低的水平,在试验的第1周,除了生理盐水组外,注射过疫苗的雏鸡血清

中抗体的含量均有所增高($P<0.05$),在接下来的第2周和第3周,抗体增高的幅度更加明显,在第3周时达到最高。同时在几组注射了蟾酥注射液的试验组中,高剂量组抗体增高的幅度最为明显($P<0.05$)。

2.6 蟾酥注射液对免疫器官指数的影响

蟾酥注射液对免疫器官指数的影响见表9~11,注射蟾酥注射液之后(7日龄开始),与对照组相比较,试验组鸡各免疫器官指数均有所增高。到14日龄和21

表8 各组间抗体效价检测

序号	组别	试验前	7日龄	14日龄	21日龄
1	生理盐水组	1.02±0.46	1.37±0.46	2.76±0.94	3.53±1.11
2	实验组(低剂量组)	1.07±0.78	2.09±0.78 [#]	3.17±0.88 [#]	7.30±1.23
3	实验组(中剂量组)	1.39±0.47	2.43±0.47 [#]	3.26±0.97 [#]	8.02±1.09 [#]
4	实验组(高剂量组)	1.70±0.56	2.90±0.56 [#]	3.44±0.66 [#]	9.71±1.03 [#]
5	疫苗对照组	1.23±0.72	2.21±0.727	3.00±1.22	8.70±1.21

注: *与疫苗对照组相比差异显著; #与生理盐水组相比差异显著。

表9 各试验组脾脏指数变化

序号	组别	7日龄	14日龄	21日龄
1	生理盐水组	1.02±0.10	1.20±0.09	1.42±0.06
2	实验组(低剂量组)	1.11±0.07	1.38±0.07	1.59±0.09 [#]
3	实验组(中剂量组)	1.32±0.08 [#]	1.49±0.11 [#]	1.97±0.10 [#]
4	实验组(高剂量组)	1.47±0.12 [#]	1.55±0.10 [#]	2.15±0.07 [#]
5	疫苗对照组	1.28±0.09	1.39±0.11	1.54±0.10

注: *与疫苗对照组相比差异显著; #与生理盐水组相比差异显著。

表10 各试验组间胸腺指数变化

序号	组别	7日龄	14日龄	21日龄
1	生理盐水组	7.72±0.07	8.09±0.09	9.21±0.06
2	实验组(低剂量组)	7.53±0.08	8.87±0.07 [#]	9.63±0.09 [#]
3	实验组(中剂量组)	8.32±0.10 [#]	8.90±0.11 [#]	9.70±0.10 [#]
4	实验组(高剂量组)	8.44±0.12 [#]	8.93±0.10 [#]	9.91±0.07 [#]
5	疫苗对照组	7.66±0.09	7.79±0.11	9.37±0.10

注: *与疫苗对照组相比差异显著; #与生理盐水组相比差异显著。

表11 各试验组间法氏囊指数变化比较

序号	组别	7日龄	14日龄	21日龄
1	生理盐水组	3.37±0.09	4.07±0.10	3.07±0.10
2	实验组(低剂量组)	3.35±0.12	4.11±0.14	3.18±0.08
3	实验组(中剂量组)	3.51±0.08	4.21±0.09	3.22±0.09
4	实验组(高剂量组)	3.62±0.04 [#]	4.32±0.13	3.32±0.11
5	疫苗对照组	3.41±0.09	4.10±0.07	3.05±0.12

注: *与疫苗对照组相比差异显著; #与生理盐水组相比差异显著。

日龄的时候, 试验组鸡胸腺指数显著高于对照组 ($P < 0.05$)。蟾酥注射液对脾脏指数, 各个试验组也表现出很好的促进其升高的作用 ($P < 0.05$), 说明蟾酥注射液可以促进免疫器官的发育。

蟾酥注射液对胸腺、脾的发育有一定的促进作用。蟾酥注射液对动物免疫器官的影响主要体现在其对胸腺、脾脏、法氏囊重量及其体内淋巴细胞的影响上。蟾酥注射液还具有促进受损免疫器官恢复的功效。蟾酥注射液是免疫增强剂, 也是免疫调节剂。

3 讨论

(1) T细胞接触抗原后转化为T淋巴母细胞, 并进一步分化增殖为致敏T淋巴细胞, 执行细胞免疫的功能, 不仅有直接的免疫效应功能, 还能通过产生多种细胞因子以及表达黏附分子, 与其他免疫细胞直接或间接接触, 发挥广泛的免疫调节作用。T淋巴细胞增殖反应的程度可反映T淋巴细胞的免疫功能状态。试验组中高剂量组在21天时T淋巴细胞增殖率达到最大值, 明显高于其他各组, 且在整个试验阶段都显著高于其他组。说明在T淋巴细胞增殖率方面, 蟾酥注射液高剂量组的效果好。说明马立克氏病弱毒疫苗配合不同浓度的蟾酥注射液, 在细胞免疫方面, 均有较好的增强其免疫功能的效果, 以高剂量组的效果最为明显。

(2) B细胞由骨髓多能干细胞在骨髓分化为前B淋巴细胞(pre-B lymphocyte), 然后, 前B淋巴细胞在法氏囊或骨髓和肠集合淋巴组织中, 诱导分化成B淋巴细胞。B淋巴细胞受抗原刺激被激活后, 先转化为浆母细胞, 进而增殖分化为浆细胞, 产生抗体, 参与体液免疫。各试验组对B淋巴细胞增殖率的作用不明显, 仅在第一周时, 中、高剂量组的效果经比较后显著高于疫苗对照组, 而其他两组效果不好。说明马立克氏病弱毒疫苗配合不同浓度蟾酥注射液, 在体液免疫方面作用很微弱。

(3) 白细胞按胞浆中是否有嗜色颗粒分为两大类: 一类是无颗粒白细胞, 包括淋巴细胞与单核细胞; 另一类为有颗粒白细胞(简称粒细胞), 粒细胞中含有特殊染色颗粒, 用瑞氏染料染色可分辨出3种颗粒白细胞即嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。白细胞的数目变动范围较大, 同种动物的白细胞数常随生理状态和个体特点而有一定差异。白细胞数目虽然有一定的变动范围, 但在正常情况下, 各类白细胞所占的比例均保持相对恒定。各试验组白细胞总数变化在试验开始的第一周试验组与生理盐水对照组相比均有明显增高的趋势, 中剂量组与对照组相比有显著的增高趋势。在第二周和第三周时, 中、高剂量组均能够显著

增高血液中的白细胞总数,但是低剂量组在整个试验中对疫苗免疫的增强作用不明显。说明马立克氏病弱毒疫苗配合不同浓度的蟾酥注射液,在非特异性免疫方面,高剂量组效果最为明显,其他试验组也有一定效果。

(4)动物外周血中的单核细胞是一类多能干细胞,在特异性免疫与非特异性免疫中发挥着重要作用,既具有吞噬、消化与消灭侵入机体的病原体,又具有将特异性抗原呈递给T细胞引发体液免疫的双重功能。从巨噬细胞吞噬力测定结果可以看出,所有试验组均能够显著升高雏鸡巨噬细胞的吞噬率和吞噬指数,以高剂量组的效果最为明显。说明蟾酥注射液能增强巨噬细胞吞噬能力,从而增强机体的特异性免疫与非特异性免疫作用。

(5)淋巴细胞活化的早期信号是自由基,化学发光研究结果表明,这一早期信号包括氧自由基。大量研究表明,活性氧自由基水平决定着细胞生命周期中静止、分化增殖和凋亡3种状态,其机理为 O_2 可能作为一种信号分子触发细胞分裂,并通过参与细胞内蛋白磷酸化修饰影响基因表达。然而过多的自由基会对生物膜产生损伤,破坏膜的完整性而影响细胞的正常增殖。应用不同剂量组蟾酥注射液后,高剂量组能增加淋巴细胞的数目,提高机体的抗体水平。提示疫苗激活淋巴细胞,一方面,产生自由基作为信号分子,通过“自身分泌网络”介导淋巴细胞增殖;另一方面,药物提高自由基清除酶活性,使自由基保持在一定水平,以此维持细胞的良性增殖,减少和避免自由基的连锁反应和最终引发脂质过氧化作用。研究表明高剂量组,作为调节剂与马立克氏病疫苗联合使用,具有抗氧化作用或提高超氧化。

(6)采用ELISA方法检测雏鸡抗体效价,所有试验组对雏鸡马立克氏病疫苗抗体产生均有不同程度的促进作用,以高剂量组的效果最为明显,并且试验结果在第三周升至最高。说明各剂量组蟾酥注射液对马立克氏病疫苗抗体增强效果都好,但高剂量组较其他各剂量组更好。说明高剂量组在体液免疫水平上效果好于其他两组。

(7)胸腺、法氏囊和脾脏是禽类最重要的免疫器官。其中胸腺是细胞免疫的中枢器官;法氏囊是禽类特有的体液免疫器官;脾脏则是禽类最大的外周免疫器官,参与全身的细胞免疫和体液免疫。免疫器官的发育状态及机能强弱直接决定着禽类的免疫水平。免疫器官相对重量增加,说明机体细胞的免疫和体液免疫机能增强。蟾酥注射液对免疫器官指数有一定的影响,说明蟾酥注射液作为一种良好的免疫调节剂,对雏鸡几种主要的免疫器官,有显著的刺激其成熟的作用。

参考文献

- [1] 徐立然. 蟾酥的生物毒疗作用[J]. 中国民间疗法, 2000, 8(2): 23-24.
- [2] 程国华. 蟾酥质量研究及其药理临床应用进展[J]. 中草药, 2001, 32(2): 184-186.
- [3] 谢麟, 长青. 蟾酥产品的医药价值及其资源的开发利用[J]. 四川畜牧兽医, 2002, 29(12): 32-34.
- [4] 王锋, 张薇, 董红兵. 蟾酥的药理研究及其临床应用概况[J]. 国医论坛, 2003, 18(5): 50-52.
- [5] 韩鸿彬, 陈嘉勇. 华蟾素抗肿瘤作用及其机制的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2005, 12(2): 160-162.
- [6] 王学勇. 蟾酥中含有免疫调节剂[J]. 国际中医中药杂志, 2006, 28(3): 150.
- [7] 顿爱社, 王凡. 蟾酥制剂治疗恶性肿瘤的研究进展[J]. 四川解剖学杂志, 2004, 12(2): 131-132.
- [8] 曹杰, 王嫒, 葛信国, 等. 蟾酥注射联合化疗治疗晚期液恶性肿瘤疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2005(1): 38-39.
- [9] 尹立华. 蟾酥注射液联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2007, (4): 440-441.
- [10] 金军, 张铭熙, 符路娣, 等. 蟾酥注射液对H22腹水型肝癌的抑制作用及对荷瘤小鼠生存周期的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(7): 46-47.
- [11] 戴彦迪, 王玉姝, 周晓棉, 等. 蟾酥脂质体注射液的抗肿瘤作用[J]. 沈阳药科大学学报, 2007(9): 568-572.
- [12] 刘俊珊, 张冬梅, 栗原博, 等. 蟾酥及其活性成分抗肿瘤作用的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(2): 115-120.
- [13] 李贵新, 徐功立, 姜夕锋, 等. 蟾酥注射液抑制白血病HL-60细胞增殖及诱导其凋亡实验研究[J]. 山东中医杂志, 2002(7): 40-42.
- [14] 薛志科. 蟾蜍制剂诱导细胞凋亡的研究进展[J]. 广西中医学院学报, 2003(3): 75-76.
- [15] 朱大诚, 尹小明. 蟾酥诱导白血病细胞凋亡的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2004, 19(4): 447.
- [16] 徐康, 范钰, 周革, 等. 蟾蜍灵诱导结肠癌SW620细胞凋亡过程中的信号传导[J]. 医药世界, 2005(12): 58.
- [17] 黄应申, 肖建军, 孟书聪, 等. 脂蟾毒配基通过线粒体途径诱导人肝癌Bel7402细胞凋亡的研究[J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33(20): 1141.
- [18] 张莉, 李军民, 钱樱. 华蟾素诱导U937细胞凋亡及其作用机制[J]. 肿瘤 2007(5): 13-16.
- [19] 田昕, 王萍萍, 刘云鹏. 蟾蜍灵在诱导HL-60细胞凋亡过程中对Bcl-2和PKC的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2007(1): 76-79.
- [20] 姜峰, 邓旭明, 韩小虎, 等. 蟾酥不同溶剂萃取物对小鼠免疫细胞功能的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2008, 22(1): 63-69.
- [21] 于洋, 安娜, 王小亮, 等. 蟾酥注射液对小鼠免疫细胞影响的实验研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(22): 1-6.
- [22] 程相朝, 陈树兴, 郭曹彰, 等. 中药蟾酥免疫增强剂对MD鸡外周血液ANAE T淋巴细胞动态的影响[J]. 河南农业科学, 1998(1): 34-36.
- [23] 王福传, 韩一超, 赵洪恩, 等. 复方中药蟾酥免疫增强剂对鸡免疫器官组织形态学影响的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23(6): 419-421.