

黄芪对肉鸡免疫力的影响

马 飞^{1,2} 李玉保^{2*} 裴兰英² 路建彪²

(1 山东师范大学生命科学院, 山东济南 250014; 2 聊城大学农学院, 山东聊城 252095)

摘 要:将 120 只 1 日龄 AA 肉鸡均分 A、B、C、D 四组, 饲养至 8 日龄时, 在饲料中添加黄芪, 剂量分别为: 60 g/kg(A)、40 g/kg(B)、20 g/kg(C), 持续 7 d, D 组为对照组。各组试验鸡于 15、22、29 日龄时 3 次扑杀, 采取血液样品, 分别检测鸡外周血淋巴细胞转化率、新城疫抗体滴度。结果表明: 黄芪试验组均能提高鸡体的体液免疫和细胞免疫功能, 添加黄芪各组鸡外周血淋巴细胞转化率与 D 组对照比较, A 组差异极显著, B 组差异显著, C 组差异不显著。

关键词:黄芪; 淋巴细胞转化率; NDV 抗体效价; 肉鸡

中图分类号 S816 **文献标识码** A **文章编号** 1007 - 7731 (2007) 05 - 81 - 02

Effect of Milkvetch on Broiler Immunity

Ma Fei^{1,2} Li Yubao^{2*} Pei Lanying² Lu Jianbiao² (1 College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan, 250014, China; 2 College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng, 252059, China)

Abstract: 120 chickens were randomly divided into four groups (A, B, C, D) and 30 chickens per group. Besides one group (D) as control, the other groups were given 60 g (A), 40 g (B) and 20 g (C) per kilogram feed containing milkvetch when 8 days old, respectively. All chickens were killed at 15, 22 and 29 days old. Lymphocyte transformation rate and antibody level of NDV were detected. Chicken's specific and non-specific immunity were enhanced in all astragalus groups and without significant difference between A and B group.

Key words: Astragalus; Lymphocyte transformation rate; NDV antibody titer; Broiler

随着我国加入 WTO, 国内畜禽养殖业将面临更大的挑战。然而, 畜禽疫病造成的严重损失已成为制约养殖业健康发展的主要障碍和瓶颈。我国近 20 年来新出现的 20 余种畜禽传染病, 加上原有的疫病, 给我国畜禽业造成了巨大的经济损失^[1]。特别是随着国内养殖业集约化程度越来越高, 畜禽机体的免疫抑制已经成为引发疾病甚至重症或传染病的重要因素之一^[2]。近年来, 免疫调节剂的研究领域不断拓宽, 涌现出许多新成员、新剂型, 随着免疫增强剂机理研究的不断深入, 其临床应用范围也越来越广^[3]。寻找特性确定、高效、稳定、无毒等特点的理想免疫调节剂已成为国内、外学者的努力方向^[4]。黄芪是一味常用中药, 药物化学研究表明, 黄芪中含有黄芪甲苷、胆碱、甜菜碱、氨基酸、蔗糖、葡萄糖醛酸、微量的叶酸以及硒、锌、铜、铁等 14 种微量元素^[5], 作为畜禽饲料添加剂具有促进生长、提高饲料报酬、预防和治疗畜禽疾病等功效^[6]。但未见黄芪对肉鸡的细胞免疫和体液免疫调节作用的综合报道。本试验以黄芪作为免疫调节剂, 采用临床上使用较为方便的口服给药方式, 探讨黄芪对鸡体外周血液淋巴细胞转化率和 NDV 抗体效价的影响, 为免疫调节剂黄芪诱导鸡体免疫活性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 黄芪的制备 将黄芪用小型粉碎机磨成粉末状, 过 2000 目筛, 保存备用。

1.2 实验动物及实验设计 1 日龄 AA 肉鸡, 购于聊城某

养鸡场。运至本实验室禽舍内笼养, 常规管理, 喂给全价饲料至 6 日龄。将 120 只鸡随机分为 A 组 (黄芪高剂量组, 60 g/kg 饲料)、B 组 (黄芪中剂量组, 40 g/kg 饲料)、C 组 (黄芪低剂量组, 20 g/kg 饲料)、D 组 (对照组) 四组, 每组 30 只。各试验组于 8 日龄时开始给药, 持续 7 d, 各试验组于 8 日龄给药同时进行新城疫第 1 次免疫。各试验组于 14 日龄时第 1 次注射免疫鸡传染性法式囊病疫苗。将试验鸡于 15、22 和 29 日龄时分 3 批进行剖杀, 采取相应血液样品进行检查。

1.3 主要试验材料 淋巴细胞分离液购自上海华精生物药厂; 植物血凝素 (PHA) 购自上海伊华医学科技有限公司; 3 - (4, 5) - 基 - 2 - 噻唑 - (2, 5) - 二苯基溴化四氮唑蓝 (MTT) 为 Sigma 公司产品; 新城疫检测抗原, 由中国动物卫生与流行病学中心提供; DG - 5031 型酶联免疫检测仪由华东电子管厂生产。

1.4 外周血淋巴细胞转化率检测 鸡心脏无菌采血 4 mL, 肝素抗凝, 小心叠加于 4 mL 的淋巴细胞分离液上。2000 r/min 水平离心 20 min。吸取第 2 层云雾状的低密度细胞, 转移入另一离心管中, 用 Hank's 液重悬, 1500 r/min 离心 10 min。Hank's 液洗涤 2 次。用 RPMI 1640 培养液调整细胞数至 2.0×10^6 个/mL。将上述分离的外周血液淋巴细胞 100 μ L 接种于 96 孔平底细胞培养板, 其中三孔加入 20 μ L PHA, 另外三孔不加 PHA, 每孔总体积 120 mL, 并将设有无细胞的 RPMI 1640 调零。37 $^{\circ}$ C, 44 h 培养后, 加

作者简介: 马飞 (1976 -), 男, 山东阳谷人, 助教, 山东师范大学生命科学院高校教师在读硕士研究生, 现工作于聊城大学农学院。* 通讯作者。 **收稿日期:** 2007 - 02 - 05

入 MTT,继续培养 4 h 后,用酶联免疫检测仪检测 OD 值 (570 nm)。

1.5 血凝抑制试验 采用血凝抑制试验检测样品的抗体效价。在 96 孔微量血凝板上,从左到右每孔各加 50μL PBS 液,再向每排的第 1 个孔加入 50μL 待检血清,依次向后倍比稀释直至第 12 孔,然后向每孔加入 50μL 4 单位抗原,在微量振荡器上振荡混匀后,置于温箱中作用 20 min。取出向每孔加入 50μL 1% 鸡红细胞悬液,同时设阳性血清、阴性血清及空白对照孔。振荡混匀后置于 37℃ 温箱中作用 30 min,待对照孔红细胞已经沉淀时观察结果。

1.6 数据处理 试验数据利用 SPSS 软件进行 t 检验,比较分析差异显著性。

2 结果

2.1 外周血淋巴细胞转化率 饲喂不同剂量的黄芪粉末后,受试鸡外周血液淋巴细胞转化率的变化如表 1 所示。

表 1 各试验组鸡外周血淋巴细胞转化率 (OD₅₇₀)

分组	剂量	15 日龄	22 日龄	29 日龄
A	60 g/kg	0.468 ±0.038Aa	0.529 ±0.040Aa	0.607 ±0.042Aa
B	40 g/kg	0.447 ±0.040Aa	0.512 ±0.056Aa	0.593 ±0.025Aa
C	20 g/kg	0.362 ±0.033Bb	0.461 ±0.037Aab	0.521 ±0.033Ab
D	0 g/kg	0.350 ±0.043Bb	0.429 ±0.041Ab	0.439 ±0.045Bc

小写字母不同表示差异显著 (P < 0.05),大写字母不同表示差异极显著 (P < 0.01)

由表 1 可见,从 15 日龄开始,A 组和 B 组试验鸡的外周血液淋巴细胞转化率一直极显著高于对照组 (P < 0.01);第 29 日龄时,C 组试验鸡的外周血液淋巴细胞转化率与对照组差异极显著 (P < 0.01)。在整个试验过程中,A 组和 B 组的试验鸡外周血液淋巴细胞转化率差异不显著;在 15 日龄时,A 组和 B 组鸡的外周血液淋巴细胞转化率极显著高于 C 组 (P < 0.01);在 29 日龄时,A 组和 B 组鸡的外周血液淋巴细胞转化率显著高于 C 组 (P < 0.05)。

2.2 NDV 抗体效价

各试验组鸡外周血新城疫 (ND) 血凝抑制效价 (HI) 的检测结果如表 2 所示。

由表 2 可见,从 15 日龄开始,A 组鸡外周血液 ND 血凝抑制价一直极显著高于对照组 (P < 0.01),B 组鸡外周血液 ND 血凝抑制价显著高于对照组 (P < 0.05),而 C 组和对照组鸡外周血液 ND 血凝抑制价差异不显著;A 组和 B 组鸡外周血液 ND 血凝抑制价一直无显著性差异。

表 2 各试验组鸡外周血液 ND 血凝抑制价 (log₂)

分组	剂量	15 日龄	22 日龄	29 日龄
A	60 g/kg	5.80 ±0.789Bb	7.30 ±1.059Bb	7.20 ±0.919Bb
B	40 g/kg	5.70 ±0.823Bb	7.10 ±0.994Bb	6.80 ±0.789Bb
C	20 g/kg	4.80 ±0.422Aa	6.10 ±0.568ABa	5.90 ±0.568ABa
D	0 g/kg	4.40 ±0.516Aa	5.80 ±0.623Aa	5.40 ±0.699Aa

小写字母不同表示差异显著 (P < 0.05),大写字母不同表示差异极显著 (P < 0.01)

3 讨论

现代药理学证明黄芪增强机体免疫功能的主要生物

活性因子是多糖类,能激活免疫器官的免疫功能,增强体液免疫,增强单核吞噬细胞系统的吞噬功能,刺激 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的功能^[7]。

新城疫是家禽生产中危害最大的疾病之一,本试验通过检测新城疫的抗体滴度,来衡量黄芪对受试鸡体液免疫功能的影响。体液免疫反应是抗体介导的免疫反应,由 B 细胞识别抗原后活化、增殖,最后分化成浆细胞,并产生特异性抗体来完成^[8]。对鸡的研究表明,向饲料中添加一定量的黄芪,可促进雏鸡法氏囊和脾脏淋巴小结的扩大和发育,提高外周血液中抗体水平和免疫细胞数量^[9,10]。本试验结果表明,黄芪中剂量组和高剂量组产生抗体早、抗体上升速度快、抗体的高峰期持续时间长。与对照组相比,免疫后期能延长抗体存在的时间,能够产生有效的保护力,使机体免受外界病毒的攻击,说明黄芪能显著增强肉鸡的免疫应答反应,提高疫苗的免疫效力;而黄芪低剂量组与对照组鸡外周血液 ND 血凝抑制效价差异不显著,说明黄芪对肉鸡体液免疫的增强作用与剂量有关。

机体的细胞免疫主要包括淋巴细胞、单核细胞、造血干细胞及粒细胞等,在免疫应答中,淋巴细胞起核心作用^[11]。淋巴细胞包括 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞,分别由胸腺、法氏囊和骨髓诱导、分化和发育而来。T 细胞在抗原的识别和提呈过程中起着关键的作用,T_H 和 T_S 细胞可以调节 B 细胞的活性、增殖和分化,T 细胞和 B 细胞是机体最重要的免疫效应细胞^[12-17]。胸腺是中枢免疫器官,为 T 淋巴细胞分化成熟的场所。黄芪和何首乌制剂能改善胸腺微环境、促进胸腺细胞的分化和成熟,对抗环磷酰胺引起的胸腺细胞凋亡^[18]。黄芪提取物对胸腺细胞的自发凋亡及由地塞米松磷酸钠诱导的胸腺细胞凋亡均有明显的抑制作用^[19]。本试验结果表明,黄芪高剂量组和黄芪低剂量组淋巴细胞转化率呈快速上升趋势,显著高于黄芪低剂量组和对照组,说明黄芪能够提高鸡体的细胞免疫功能,具有显著的促进免疫细胞的分裂、增殖、活化作用,能加速机体细胞免疫功能的发育完善,从而增强肉鸡免疫应答能力,提高免疫效果,并且这种免疫增强作用与给药剂量密切相关。本试验为进一步研究黄芪的药物作用以及指导临床用药提供了理论依据。

参考文献

[1] 雷连成,韩文瑜. 免疫增强剂的研究进展. 中国兽药杂志, 2002, 06: 36 - 38

[2] 郭亮,李德发,邢建军,赵君梅,李宝玉. 免疫增强剂对肉鸡生产性能的影响. 中国饲料, 2000, 19: 14 - 16

[3] Phillips R, Horsfield C, Kuiper S, et al. Cytokine response to antigen stimulation of whole blood from patients with Mycobacterium ulcerans disease compared to that from patients with tuberculosis[J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13 (2): 253 - 257.

[4] Dannull J, Su Z, Rizzieri D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells[J]. Clin Invest, 2005, 115 (12): 3623 - 3633.

[5] 吴发宝,陈希元. 黄芪药理作用研究综述. 中药 (下转 74 页)

施肥管理:如果床土有机肥充足,秧苗生长正常,一般不需追肥。如发现小苗颜色淡绿,秧苗细弱,可用温水将磷酸二氢钾和尿素按 1:1 比例溶解后配成 0.5% 溶液用喷壶喷洒,随后用清水再喷洒一遍,以防烧伤叶片。

2.2.8 嫁接 一般在 12 月下旬至元月上旬嫁接,砧木和接穗长至 6 - 8 片叶,茎粗 5 - 8mm 时开始嫁接,采用劈接法。用刮胡刀片在砧木离地 5cm 处横切切断,然后从中间向下竖切 1cm 长,接穗保留两片大叶从茎部两边平切,使接穗茎横切面变成扇形,然后插入砧木,使接穗圆边与砧木一边对齐,用嫁接夹夹牢,嫁接后放入日光温室内 1.2m 的畦中,搭小拱棚用棚膜盖严,畦内浇透水,不要把水浇到刚嫁接的苗上,以防止苗子伤口处腐烂,上盖遮阳网,7d 后去掉小拱棚即可。

2.2.9 炼苗 定植前 10d,只需挪动一下营养钵,以切断伸向钵外的根系。待秧苗根系愈合后,逐渐加大通风量,降温排湿,进行秧苗锻炼,以增强秧苗的适应性。

3 定植后的管理

3.1 整地 要求每 1m^2 施优质腐熟基肥 75000 - 150000kg,过磷酸钙 750kg,饼肥 1500kg,先将有机肥砸碎,然后结合整地翻入土中。整带埂 250cm 宽左右的大平畦,畦间留 50cm 宽的走道以备压棚膜用,畦内定植 4 行。用宽竹皮搭拱,盖棚膜,然后上盖草苫。

3.2 定植 要求晴天上午进行。选壮苗,按 60cm \times 50cm 的密度定植。先铺好地膜,然后定植。根系埋土不宜过深,以和苗坨齐平为宜。定植后浇水,水量不宜过大,以免地温下降,影响缓苗。

3.3 温度管理 定植后 7d 内不通风或少通风,以提高地温,促进缓苗。待秧苗恢复生长后,应适当通风降温,以防

苗子徒长,保持秧苗蹲实,叶色深绿。待进入结果期后,随着外界温度的升高和浇水量的增大,开始加大通风量。早晨太阳出后掀开草苫,下午 5 点盖草苫。草苫根据天气情况盖到 4 月上中旬为止。

3.4 水肥管理 定植后 7d 浇一小水,即缓苗水。以后以控水蹲苗为主,促进根系发育。待大部分门茄开始膨大时,结束蹲苗,结合浇催果水施入少量速效化肥。进入采收期后,因气温升高,通风量增大,应加强水分管理,以提高产量。

3.5 保花保果 拱棚内湿度较大,通风不良,不易授粉,因此必须采用激素处理才能座果。一般用 50 - 80 μ l/L 的 2,4 - D 涂抹花柄。每天一次,不能重复。

3.6 植株调整 门茄下选择一强壮侧枝,与主杆并进生长,其余侧枝及时抹除,改双杆整枝,保留 1 穗 1 花。门茄对茄采收完毕,四门斗茄长足 10cm 左右时,门茄下面的叶子可全部摘除,带出棚外深埋,减少老叶与植株上部幼果的养分争夺。

3.7 采收 门茄容易坠秧,因此应及早采收,以促进植株生长和对茄的发育。

3.8 病虫害防治 保护地茄子最主要的虫害是红蜘蛛、茶黄螨和瓢虫、蚜虫。应加强虫情检查,在茶黄螨、红蜘蛛发生初期及早进行药剂防治。可用 73% 克螨特乳油 2000 - 3000 倍液,或 15% 扫螨净可湿性粉剂 1500 - 2000 倍液,或阿维菌素交替喷雾防治,7 - 10d 喷一次,连喷数次。药剂必需喷到植株上、中部叶背面,重点是新叶、嫩茎生长点及花蕾、幼果等。蚜虫用特灭蚜虱防治,瓢虫用敌敌畏或晶体敌百虫防治。因采用嫁接栽培,植株健壮,病害很少,特别是完全没有根部病害,因而可减少用药,在无公害茄子生产中可以起到很好的作用。(责编:张杨林)

(上接 82 页)材, 2004, 27(3): 232 - 23.

[6] 吴长德,吕戴春,方永辉. 复方女贞子 - 黄芪制剂对雏鸡的免疫增强作用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2003, (1): 30 - 31.

[7] 杜志德,来玉梅. 黄芪的免疫作用研究进展. 中草药, 1988, (9): 40 - 42.

[8] 石达友,刘汉儒,黎建华等. 中药对鸡新城疫灭活疫苗免疫效果的影响[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(2): 42 - 46.

[9] 程相朝,张春杰. 中药免疫增强剂对内仔鸡免疫器官生长发育及免疫活性细胞影响的研究. 中兽医学杂志, 2002, (3): 6 - 8.

[10] 赵银丽,李国喜,刘来亭,张慧如. 黄芪及当归对增强固始鸡免疫作用的适宜配伍研究. 畜牧兽医学, 2006, 22: 8 - 10.

[11] Ismail N, Bretscher PA. The Th1/Th2 nature of concurrent immune responses to unrelated antigens can be independent[J]. Immunol, 1999, 163(9): 4842 - 4850.

[12] Tang LL, Zhang Z, Zheng JS, et al. Phenotypic and functional characteristics of dendritic cells derived from human peripheral blood monocytes[J]. Zhejiang Univ Sci B, 2005, 6(12): 1176 - 1181.

[13] Benlagha K, Wei DG, Veiga J, et al. Characterization of the early stages of thymic NKT cell development[J]. Exp Med, 2005, 202(4): 485 - 492.

[14] Khatri M, Palmquist JM, Cha RM, et al. Infection and activation of bursal macrophages by virulent infectious bursal disease virus[J]. Virus Res, 2005, 113(1): 44 - 50.

[15] Wang KX, Zhang LH, Peng JL, et al. Effect of liniment levamisole on cellular immune functions of patients with chronic hepatitis B[J]. World Gastroenterol, 2005, 11(45): 7208 - 7210.

[16] Bronzino P, Abbo L, Bagnasco F, et al. Splenic marginal zone lymphoma: case report and review of the literature[J]. G Chir, 2005, 26(11 - 12): 419 - 421.

[17] 姚旌旗,舒思洁,赵骥,等. 脂糖舒对糖尿病大鼠血液 T 淋巴细胞亚群和免疫器官系数的影响[J]. 山东医药, 2006, 46(7): 8 - 10.

[18] 魏锡云,张锦,罗映辉,等. 黄芪和何首乌抗环磷酰胺诱导胸腺细胞凋亡[J]. 中国药科大学学报, 2000, 31(1): 35 - 38.

[19] 杨燕萍,胡冬根,陈新. 黄芪多糖和加味玉屏风汤对小鼠胸腺细胞凋亡抑制作用的比较[J]. 湖北中医学院学报, 2001, 3(4): 34 - 35.

(责编:陆艾五 潘兰)