

抗菌肽对肉鸡外周血 T 淋巴细胞转化的影响

王 静,李同树*

(山东农业大学动物科技学院,山东 泰安 271018)

[摘要] 将 420 只 7 日龄 AA 肉雏鸡随机分为 7 组,在其日粮中分别添加 300mg/kg、600mg/kg 两个浓度的抗菌肽粗提品,分不同饲养阶段添加到肉鸡日粮中,同时设抗生素组和空白对照组于 28 日龄早晨空腹翅静脉采抗凝血,分离淋巴细胞,分别用 ConA、抗菌肽刺激,MTT 法检测 T 淋巴细胞转化情况。结果表明,抗菌肽能够促进肉鸡外周血淋巴细胞增殖转化,且因添加日龄不同效果有所差异。

[关键词] 抗菌肽;肉鸡;T 淋巴细胞;转化

[中图分类号] S811.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-5228(2007)03-0045-04

抗菌肽(antimicrobial peptides)是生物进化过程中为适应环境,求得生存而最早产生的免疫活性分子,在生物体内广泛存在。近年来研究证实,抗菌肽具有抵抗细菌、真菌、病毒及原虫的侵害,且对真核细胞无毒害作用。据有关研究报道,在动植物及人体基因组中有其基因编码,这类自体合成含多氨基酸残基的短肽,除具有抗生素作用外,还作为刺激自体免疫的重要成分,协助宿主提高天然免疫力。目前已有的关于抗菌肽的研究多集中在离体诱导培养,及新种类的不断发现。对抗菌肽对动物机体功能影响的研究较少,应用性研究更少。本试验采用在日粮中添加抗菌肽和在淋巴细胞悬液中加入抗菌肽,应用 MTT 法检测其对肉鸡外周血淋巴细胞转化的影响,旨在探讨抗菌肽在免疫调节方面的作用,为抗菌肽添加剂的推广应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物与试验设计

采用单因子试验设计,将 420 只初生 AA 肉雏鸡,随机分为 J、K、KH、TS、TSH、TL、TLH 七个处理组,每组设 3 个重复,每个重复 20 只。J 组试验鸡作空白对照组,全程饲喂基础日粮,其余六个处理的试验鸡饲养至 8 日龄转入试验期, K、TS、TL 三

个处理的试验鸡,分别在基础日粮中添加 40mg/kg 的金霉素、300mg/kg 和 600mg/kg 的抗菌肽粗提品;KH、TSH、TLH 三个处理的试验鸡,8~20 日龄喂基础日粮,21~28 日龄在基础日粮中分别添加 40mg/kg 的金霉素、300mg/kg 和 600mg/kg 的抗菌肽粗提品。

1.2 抗菌肽制剂与基础日粮

抗菌肽制剂为 α -螺旋抗菌肽粗提品(含 10%活性成分),由博凯国际(香港)集团有限公司生产;金霉素由当地医药公司提供。基础日粮配方及营养水平(按 NRC(1994)肉鸡饲养标准),见表 1。

1.3 试验鸡免疫程序

试验鸡采用网上平养,7 日龄新城疫、传支二联苗点眼,禽流感 H₅ 油苗皮下注射,14 日龄法倍灵饮水,18 日龄禽流感 H₉ 油苗皮下注射,21 日龄新城疫弱毒苗饮水。

1.4 样品采集

试验鸡于 28 日龄早晨饲喂前,每处理组随机取 6 只,无菌翅静脉采血 2.5mL,加入 5%的柠檬酸钠 0.5mL 抗凝,作淋巴细胞转化测定样品。

1.5 样品测定

1.5.1 试剂配制 20% RPMI1640 培养液:将 RP-

* [收稿日期] 2006-06-29,修回日期:2006-07-24

[基金项目] 山东省财政支持重点农业科技成果推广项目(SDGP2004-54-O)资助。

[作者简介] 王 静(1981-),女,山东潍坊人,在读硕士研究生,主攻方向:动物营养。

* [通讯作者] 李同树,教授。E-mail:y010196@sdau.edu.cn

MI1640 培养基 (sigma 公司产品) 用双蒸水配制, 过滤分装后 4℃ 保存, 临用前加浓度为 20% 小牛血清 (杭州四季青生物制品厂产品) 和常量的双抗; ConA (伴刀豆素球蛋白, 为 Sigma 公司产品) 配制: 用无血清 RPMI1640 培养液配成 100 μg/mL; MTT (四甲基偶氮唑蓝, 为 Sigma 公司产品) 配制: 用 pH7.4 的 RPMI1640 培养液配成 5 mg/mL 的溶液, 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 避光保存; 裂解液: 用 50% DMF 与 20% SDS (N-N-二甲基甲酰胺与等体积双蒸水混匀, 再加 20% SDS 于温箱中完全溶解) 配制; 淋巴细胞分离液 (上海恒信化学试剂公司产品); D- Hanks 液由山东农业大学动物科技学院微生物免疫实验室提供。

1.5.2 测定仪器 酶联检测仪 (DG3022); CO₂ 培养箱 (Heraeus BB16/BB5060)。

1.5.3 淋巴细胞转化 采用 MTT 法。淋巴细胞分离将抗凝血缓慢加入到等体积淋巴细胞分离液上层, 2600 rpm 离心 10 min。取中间絮状白细胞层转入 1.5 mL 离心管中, 加入少量 D- Hanks 液洗涤, 2600 rpm 离心 10 min; 重复洗涤一次, 2600 rpm 离心

10 min, 弃去上清液, 加适量含 20% 小牛血清的 RPMI1640 培养液 (含双抗) 重悬, 混匀。稀释计数, 调整细胞浓度, 使细胞终浓度为 8×10^6 个/mL, ConA 处理每孔加 ConA 至终浓度为 7.5 μg/mL, RPMI1640 调零, 细胞悬液不加 ConA 作对照。取 100 μL 细胞稀释液至 96 孔板, 设 ConA 刺激孔和无 ConA 刺激孔, 每孔 4 个重复; 抗菌肽处理 RPMI1640 培养液溶解抗菌肽, 最终浓度分别为 10 μg/mL。分别设抗菌肽刺激孔和无抗菌肽刺激孔, 并设 ConA 刺激对照孔, 每孔 4 个重复, 轻轻混匀。在 37.2℃, 5% CO₂ 条件下培养 48 h, 培养结束前 4 h 加 MTT, 每孔 10 μL, 继续培养。检测 OD 值 经以上培养后, 每孔加裂解液 100 μL, 放置 0.5 h, 用酶标仪 570 nm 处检测各孔 OD₅₇₀ 值, 统计出平均 OD 值, OD 值的大小评价反应体系中细胞增殖程度。

1.6 数据统计分析

各处理组测定数据, 用 SPSS 统计分析软件 One-Way ANOVA 法进行统计分析, 用邓肯氏法进行差异显著性比较。

表 1 基础日粮及营养水平

Table 1 The composition and nutrient level of basal diet

日粮成分 Diet Composition	1~4 周 1~4 Weeks (%)	营养水平 Nutrient Level	1~4 周 1~4 Weeks (%)
玉米 Corn	50.2	代谢能 ME (MJ/kg)	13.24
豆粕 Soybean meal	34.9	粗蛋白 CP	22.28
鱼粉 Finish meal	5.00	蛋氨酸 Met	0.56
豆油 soybean oil	6.50	蛋氨酸 + 胱氨酸 Met + Cys	0.87
磷酸氢钙 Calcium phosphate	1.0	赖氨酸 Lys	1.22
石粉 Limestone	1.0	色氨酸 Trp	0.30
食盐 Salt	0.25	钙 Ca	0.92
蛋氨酸 DL - Met	0.15	有效磷 AP	0.55
赖氨酸 L-Lys HCL			
预混料 Premix	1.00		

表 2 ConA 处理组测定平均 OD 值

Table 2 Average optical density values of ConA treated group

组别 Group	平均 OD 值 Average OD Value
J	0.2384 ± 0.0243 ^b
K	0.3436 ± 0.0359 ^{ab}
KH	0.3423 ± 0.0344 ^{ab}
TS	0.2871 ± 0.0203 ^{ab}
TSH	0.3837 ± 0.0756 ^a
TL	0.2931 ± 0.0147 ^{ab}
TLH	0.4028 ± 0.0637 ^a

注: 同列样品间凡标不同小写字母者为差异达显著水平 ($P < 0.05$); 无字母标注者为差异不显著 ($P > 0.05$), 下表同。

Note: Values with different small letters are significantly different ($P < 0.05$) in the same line; No letters marked values are quiet ($P > 0.05$), The same below.

表 3 抗菌肽处理组测定平均 OD 值

Table 3 Average optical density values of antibacterial peptides treated group

组别 Group	平均 OD 值 Average OD value
J	0.1867 ±0.0146 ^b
K	0.2165 ±0.0138 ^{ab}
KH	0.2323 ±0.0204 ^{ab}
TS	0.2612 ±0.0192 ^a
TSH	0.2524 ±0.0332 ^a
TL	0.2522 ±0.0126 ^a
TLH	0.2356 ±0.0142 ^{ab}
ConA (control)	0.2378 ±0.0074 ^{ab}

2 结果和分析

2.1 ConA 处理结果及分析

不同处理肉鸡外周血淋巴细胞转化中,经 ConA 处理后所测定的 OD 值见表 2。

由表 2 ConA 处理的测定值分析,8 日龄添加 0.03%、0.06% 两水平抗菌肽 TS、TL 组,肉鸡外周血淋巴细胞转化的 OD 值分别比 J 组提高了 20.43% 和 22.94%,但差异均不显著 ($P > 0.05$); 21 日龄添加 0.03%、0.06% 两水平抗菌肽 TSH、TLH 组,肉鸡外周血淋巴细胞转化的 OD 值与 J 组比较分别提高了 60.95% 和 68.96%,且均差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 抗菌肽处理结果及分析

不同处理肉鸡外周血淋巴细胞转化中,经抗菌肽处理后所测定的 OD 值见表 3。

由表 3 抗菌肽处理的测定值分析,TS、TSH、TL 组的 OD 值与 ConA 对照孔相比分别提高了 9.84%、6.14% 和 6.06%,差异均不显著 ($P > 0.05$); J、K、KH、TLH 组 OD 值与 ConA 对照孔相比分别降低了 21.49%、8.96%、2.31% 和 0.93%,差异均不显著 ($P > 0.05$)。表明抗菌肽对肉鸡外周血淋巴细胞增殖反应具有直接作用。

3 讨论

3.1 动物机体的淋巴细胞增殖反应是衡量细胞免疫能力的一项重要指标,也是研究鸡的免疫功能及防御疫病机制一个重要方面。在机体免疫应答的发生发展过程中,T 淋巴细胞参与细胞免疫应答,T 淋巴细胞增殖量和功能直接决定机体细胞免疫效果。ConA 是 T 淋巴细胞增殖的丝裂原。丝裂原能刺激淋巴细胞进行有丝分裂和增殖,并伴随着 DNA 的复制。MTT(四甲基偶氮蓝唑盐)作为活细胞线粒

体内脱氢酶氧还反应的底物参与其氧化还原反应,生成蓝色甲月替结晶,经溶解后在 570nm 波长具有最高吸收值,依此反映细胞增殖情况。

本次试验结果表明,日粮中添加抗菌肽有使肉鸡机体外周血淋巴细胞在 ConA 刺激下,产生外周血 T 淋巴细胞反应性升高的作用。据报道,在猪皮肤伤口上应用特异性 progegrin 加工酶抑制剂,导致伤口 protegrin 活性下降,对病菌抵抗力下降。Scott 等(2000)报道,抗菌肽在宿主天然免疫反应的不同阶段表现出多种作用,能促进辅助性 T 细胞趋化因子的产生及辅助性 T 细胞的增殖。另据 Yang D 等(1999)报道,人 γ -防御素在 10~10mmol/L 的浓度下对单核细胞、为分化的树突状细胞和 T 细胞有趋化性,而 α -防御素则通过细胞因子受体对记忆 T 细胞和未分化的树突状细胞有趋化性。Yang 等报道有些防御素还具有促进未成熟树突状细胞以及 T 细胞的趋化的功能。Lfcin 能与人多行核白细胞作用,促进对中性粒细胞具激活作用的干扰素-8 释放,增强细胞免疫反应。人的 cathelicidin LL-37 通过 G 蛋白偶联受体对单核细胞和某些 T 细胞有趋化作用。这些研究从不同方面研究证实了抗菌肽在宿主天然免疫中的重要作用。本试验不同添加时间相比,21 日龄添加 300g/kg 和 600g/kg 抗菌肽粗提品组检测结果明显高于对照组,而 8 日龄两添加水平组效果不明显。可能原因是出孵后的雏鸡在母源抗体的保护下,对早期添加外源药物或免疫调节剂等,很难产生效果或效果不明显。并且由于持续添加,导致肉鸡机体对添加制剂的免疫调节效果没有 21 日龄添加的效果好。不同日龄抗生素添加组与对照组比较均没有明显差异。

3.2 有试验研究发现,BMAP-27、BMAP-28、CA(1~8)M(1~18)、Lactoferricin 等具有在体外可激活人淋巴细胞,可清除感染病毒和细菌的细胞以及癌

细胞等功能 (Risso 等, 1998; Lillard 等, 1999; GH 等, 1999; Andrea 等, 1998); 另有研究报道, Nisin 具有诱导 CD4 和 CD8 细胞的产生, 增强细胞免疫功能和 T 细胞的辅助功能。本试验对鸡外周血淋巴细胞增殖反应研究表明, 直接在鸡血淋巴细胞悬液中加入抗菌肽刺激淋巴细胞, 与 ConA 刺激对照孔相比没有明显差异, 说明对肉鸡外周血淋巴细胞增殖反应也有一定作用。以上结果显示, 在肉鸡日粮中添加抗菌肽能使其机体的外周血淋巴细胞 T 淋巴细胞转化升高, 表明抗菌肽有促进肉鸡机体细胞免疫功能, 增强机体特异性免疫应答功能。采用抗菌肽刺激也对淋巴细胞转化产生刺激作用, 具体机理仍需进一步深入研究证实。

3.3 目前, 淋巴细胞转化多用形态学、同位素掺入法和 MTT 法。形态学法具有主观性强, 同位素掺入法具有对环境污染重、成本高、一般实验室操作困难等局限性, MTT 比色法方便、安全, 采用半自动化分析过程, 客观性较好, 能够批量检测样品, 成为最常用方法。同时, MTT 法的原理在于活细胞的琥珀酸脱氢酶能还原 MTT, 形成甲月替结晶, 经裂解液裂解后, 在 570nm 波长处有最高吸收值, 由于结晶物的形成与细胞数量及代谢活性成比例, 因此, 570nm 处吸收值的大小可反应细胞的数量及活性。比同位素掺入法反应细胞增殖时 DNA 合成情况, 更能直接反应细胞增殖能力。本试验选用此法更客观、易操作。

参考文献:

- [1] Robert E W. Hancock, cationic peptide: effectors in innate immunity and novel antimicrobial [J]. *The Lancet Infectious Disease*, 2001(1): 156-164.
- [2] Jacopo Vizioli, Michel Salzet. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2002, 23 (11).
- [3] Milner SM, Ortega MR, Reduced antimicrobial peptide expression in human burn wounds [J], *Burns*, 1999, 25 (5): 411-413.
- [4] Bals R, Wang X, Meegalla RL, et al, Mouse α -defensin 3 is an inducible antimicrobial peptide expressed in the epithelia of multiple organs [J] *Infect Immun*, 1999, 67(7): 3542-3547.
- [5] Hancock RE, Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobial [J]. *Lancet Infect Dis*, 2001, 1: 156-164.
- [6] 李祥瑞, 金红, 王秀丽, 等. 以 MTT 比色法检测鸡脾淋巴细胞转化效果 [J]. *畜牧与兽医*, 1996, 28(1): 3-5.
- [7] Reynolds D L, Maraqa A D. Protective immunity against Newcastle disease: The role cell-mediated immunity [J]. *Avian Dis*, 2000, (44): 145-154.
- [8] Ota B, Vera B, Frank W P. Optimum condition for the chicken lymphocyte transformation test [J]. *Avian Dis*, 1992, (36): 945-955.
- [9] Mosmaan T. Colorimetric assay cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55.
- [10] Cole A M, Shi J, Ceccarelli A, et al. Inhibiting of neutrophil elastase prevents cathelicidin activation and impairs clearance of bacteria from wounds [J]. *Blood*, 2001, 97: 297-304.

The Effects of Antibacterial Peptides on Peripheral Lymphocyte Transformation in Broilers

WANG Jing, LI Tong-shu *

(College of Animal Science and Technology, Shan dong Agricultural University Tai'an 271018, China)

Abstract: The experiments were designed to investigate the effects of antibacterial peptides on Peripheral Lymphocyte Transformation in broilers. 420 chickens (7 day-old) were randomly divided into 7 groups. And fed on diets as follow: J, 0 mg/kg antibacterial peptides (control group); K, 40mg/kg Chlorotetracycline, TS, 300mg/kg antibacterial peptides, TL, 600mg/kg antibacterial peptides from 8 days old; KH, 40 mg/kg Chlorotetracycline, TSH, 300 mg/kg antibacterial peptides, TLH, 600mg/kg antibacterial peptides from 21 days old. At 28 days old, anticoagulated blood collected from venous blood from chicken's wing. To determine the peripheral T lymphocyte transformation. The results showed that, antibacterial peptides could enhance the cell multiplication and transformation of broilers' peripheral T lymphocyte, compared with control group.

Key words: Antibacterial peptide; broiler; T Lymphocyte; transformation