

### 3 种免疫增强剂对鸡的免疫促进效果试验

樊福好<sup>1</sup>, 谢明权<sup>2</sup>, 林辉环<sup>3</sup>

(1. 广东省农业厅, 广东 广州 510500; 2. 广东省农业科学院, 广东 广州 510640;

3. 华南农业大学动物医学系, 广东 广州 510642)

中图分类号: S858.312.72-3 文献标识码: B 文章编号: 0529-6005(2001)02-0012-02

球虫病(Coccidiosis)是一种广泛流行的原虫病,几乎所有的畜禽都能被感染,其中鸡球虫病的发生尤为广泛,遍布于全世界,常常造成大批鸡只死亡,引起巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。为了控制鸡球虫病的严重暴发,避免造成巨大的经济损失,世界各国的科学工作者都在积极探讨防止该病的有效方法。对于鸡球虫病的防治,目前仍然以药物为主。随着免疫学和免疫病理学研究的不断深入,对正常鸡机体的免疫反应和免疫反应异常的认识的不断加深,采取某些措施来调整免疫系统的机能和纠正异常的免疫反应,日益成为免疫病理学、免疫药理学和临床免疫学的重要研究内容<sup>[2]</sup>。其中免疫调节剂的研究已经引起了人们的足够重视,但免疫调节剂在动物医学上的应用较少<sup>[3-5]</sup>,且在禽球虫病预防机理的阐述上尚未见报道。

#### 1 材料和方法

##### 1.1 材料

1.1.1 试验动物及其处理 1 日龄艾维茵鸡购自广东正大康地有限公司种鸡场,严格饲养管理条件。黄芪多糖 1 ml/只/次(1 ml 相当于 1 g 原药)肌肉注射;卡介苗 0.1 ml/只/次(人医用卡介苗注射剂、配稀释液)皮内注射;胸腺素 0.1 ml/只/次(武汉生物化学厂生产人用小牛胸腺素注射液)肌肉注射以上 3 种免疫调节剂 7 日龄和 10 日龄各注射 1 次;左旋咪唑 40 mg/kg 拌料<sup>[6]</sup>。左旋咪唑在 14 日龄饲喂,连喂 3 天。肉用鸡全价配合饲料(不含球虫药)由广东省农科院畜牧研究所试验饲料厂提供。

1.1.2 培养基、缓冲液 (1)RPMI 1640 完全培养液: RPMI 1640 粉剂(含谷氨酰胺)10.4 g + 2 g NaHCO<sub>3</sub> + d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 至 100 ml 配制储备液。RPMI 1640 储备液 87.0 ml, BFS(56℃灭活)10.0 ml, Amp 20 000 IU, 链霉素 20 000 μg, 磁力搅拌溶解后,在超净台内无菌条件下,用灭菌的并置有 0.22 μm 孔径滤膜的过滤器除菌,并分装 20 ml,置冰箱 -20℃冰冻保存,1 周内用<sup>[7]</sup>。(2)MTT 液:将 5 mg MTT 溶解于 1 ml pH7.2 的 PBS 中,现用现配。(3)ConA 液:用 d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 配制成 100 μg/ml 的溶液,过滤除菌,在低温冰箱(-20℃)保存备用。将 5 mg MTT 溶解于 1 ml pH7.2 的 PBS 中,现用现配。(4)酸性

异丙醇溶液。(5)0.8%戊二醛溶液。

1.1.3 工作抗体 辣根过氧化物酶标记抗鸡 IgG 单克隆抗体(HRP-McAb),工作浓度为 1:4 000; IgM 与 IgA 为兔抗鸡抗体,工作浓度 IgM 为 1:1 000, IgA 为 1:1 000 倍稀释。以上试剂由华南农业大学微生物教研室提供并标定工作浓度。

1.1.4 工作抗原 以 50,000 个/ml 的 *Eimeria tenella* 球虫卵囊生理盐水溶液冰冻超声粉碎至透明为止,以 1:4 000 IgG 浓度确定工作浓度,将卵囊抗原作倍比稀释,以 P/N 值最大值取其为工作浓度,最适浓度为 1:256,为使用方便,采用 1:200 为实际使用浓度。为方便起见, IgM、IgA ELISA 试验的工作浓度亦定为 1:200。

1.1.5 补体 临用时采取小鼠心脏血液 2 ml,获取血清用 pH7.4 HBSS 作 1:100 倍稀释。

1.1.6 绵羊红细胞制备 颈静脉采取绵羊血液 5 ml(EDTA-Na<sub>2</sub> 抗凝)用 Alserver(阿氏液)保存于 4℃冰箱。取用时用 pH7.4 HBSS 洗涤 3 次,最后 1 次离心转速需固定在 2 500 r/min,尽可能弃去上清后,将压积红细胞用 pH7.4 HBSS 配成 1×10<sup>8</sup>/ml 的浓度。放置保存不超过 72 h。

1.1.7 灭活 BFS 的制备 取 BFS 5 ml,置于 56℃水浴箱中 30 min 灭活后,加入已洗涤过的 SRBC 压积 0.5 ml,混匀后与 37℃水浴箱中感作 1 h,然后置于 4℃冰箱中过夜。次日取出以 2 000 r/min 离心 10 min,取上清液于小瓶中,置 4℃冰箱中保存备用。

1.1.8 鸡淋巴细胞悬液的制备 取 1.5 ml EDTA-Na<sub>2</sub> 抗凝试验鸡的血液,加入等体积 pH7.4 HBSS,混匀后轻轻沿管壁加入于含 1 ml 左右的淋巴细胞分离液之上(切勿混合),以 3 000 r/min 水平离心机内离心 20 min,取出后仔细将血浆和分离液之间的淋巴细胞吸至含 3 ml pH7.4 HBSS 的试管中,混匀后以 1 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液后再用 HBSS 同样洗涤 1 次,尽量吸去上清液,将沉于管底的淋巴细胞摇散后,按白细胞计数法计数每毫升中的淋巴细胞数,用 RPMI 1640 调整细胞浓度至 1×10<sup>6</sup> 个/ml,同时用台盼蓝染色计数细胞死亡率应低于 5%。

1.2 其他试剂及药物 淋巴细胞分离液(葡聚糖、泛影酸葡甲胺)由中国医学科学院血液学研究所提供,批号:970403、970422。噻唑蓝(Sigma 分装)和刀豆球蛋白(Sigma 分装)均由天象人生物制品有限责

收稿日期:1999-10-26

基金项目:广东省“九五”科技攻关项目之一。

任公司提供。RPMI Medium 1640 Life Technologies, 由 Inc. Grand Island, N. Y. 14072 U. S. A. 提供。黄芪多糖注射液(抗病毒 I 号)黑龙江省生物制品一厂生产,批号:9703。冻干皮内注射用卡介苗,卫生部兰州生物制品研究所生产,批号:970512。(小牛)胸腺素注射液,武汉梅山生物化学制药厂生产,批号:970423。

1.3 方法 Et 花环试验,LT 试验,酶联免疫吸附测定试验,均采用常规方法进行。

## 2 结果

由表 1 试验结果表明,所选用的免疫调节剂中,黄芪多糖、胸腺素与卡介苗具有较强的提高健康鸡淋巴细胞玫瑰花环形成率的作用,而左旋咪唑无显著性差异。

表 1 正常状态鸡 EFC 形成率( $\times 100\%$ )

组别	空白组	左旋咪唑组	黄芪多糖组	胸腺素组	卡介苗组
平均值	25.10 $\pm$ 1.89	23.40 $\pm$ 1.93	32.10 $\pm$ 3.78	34.45 $\pm$ 1.72	34.30 $\pm$ 1.95
显著水平		P>0.05	P<0.01	P<0.01	P<0.01
差异显著性		差异不显著	差异极显著	差异极显著	差异极显著

表 2 正常状态鸡 LT 率(刺激指数)

组别	空白组	左旋咪唑组	黄芪多糖组	胸腺素组	卡介苗组
平均值	0.237 $\pm$ 0.562	0.383 $\pm$ 0.288	1.438 $\pm$ 0.407	0.664 $\pm$ 0.372	1.158 $\pm$ 0.357
显著水平		P>0.05	P<0.01	P<0.05	P<0.01
差异显著性		差异不显著	差异极显著	差异显著	差异极显著

表 3 正常状态鸡红细胞免疫复合物酵母花环形成率( $\times 100\%$ )

组别	空白组	左旋咪唑组	黄芪多糖组	胸腺素组	卡介苗组
平均值	5.00 $\pm$ 1.45	5.35 $\pm$ 1.80	6.80 $\pm$ 1.58	6.50 $\pm$ 1.03	6.80 $\pm$ 1.23
显著水平		P>0.05	P<0.01	P<0.01	P<0.01
差异显著性		差异不显著	差异极显著	差异极显著	差异极显著

表 4 红细胞 C3b 受体花环形成率( $\times 100\%$ )

组别	空白组	左旋咪唑组	黄芪多糖组	胸腺素组	卡介苗组
平均值	9.85 $\pm$ 1.00	12.25 $\pm$ 1.42	13.55 $\pm$ 1.37	12.50 $\pm$ 1.60	11.15 $\pm$ 1.03
显著水平		P>0.05	P<0.01	P<0.01	P<0.05
差异显著性		差异不显著	差异极显著	差异极显著	差异显著

表 5 脾脏重/体重相对重(脾脏重/体重 $\times 100\%$ )

组别	空白组	左旋咪唑组	黄芪多糖组	胸腺素组	卡介苗组
平均值	0.116 $\pm$ 0.020	0.117 $\pm$ 0.014	0.112 $\pm$ 0.018	0.134 $\pm$ 0.025	0.136 $\pm$ 0.024
显著水平		P>0.05	P>0.05	P>0.05	P<0.05
差异显著性		差异不显著	差异不显著	差异不显著	差异显著

## 3 讨论

本试验测定了鸡在正常状态下免疫调节剂对鸡的免疫功能指标的影响,试验结果从总体上显示免疫调节剂提高鸡机体的 T 淋巴细胞的数量和 T 淋巴细胞的母细胞化的程度,具备增强鸡机体的细胞免疫功能。

左旋咪唑在本试验中对改善健康鸡机体的免疫功能效果较差。卡介苗和黄芪多糖在本试验中表现出较好的提高健康鸡机体的细胞免疫功能的作用。

黄芪多糖与卡介苗对促进鸡的淋巴细胞母细胞化表现为极显著性差异,胸腺素作用也较强,具体结果见表 2。由表 1、表 2 同时可以看出黄芪多糖、胸腺素与卡介苗对提高鸡机体的细胞免疫功能有重要作用。

黄芪多糖、胸腺素、卡介苗可以提高鸡的红细胞免疫复合物酵母花环形成率,一定程度地促进体液免疫能力(见表 3)。

黄芪多糖、胸腺素与卡介苗均可提高鸡的 C3b 受体花环形成率,说明三者提高鸡红细胞表膜上的 C3b 受体,而 C3b 受体的增加有利于机体参与补体反应。至于它与细胞免疫功能有何关系,机理有待进一步探讨(见表 4)。

本试验中 4 种免疫调节剂均不能增加健康鸡的脾脏相对重(见表 5)。

## 参考文献:

- [1] XIE Ming-quan. The second Asian conference on coccidiosis proceeding[C]. 1994.
- [2] 刘忠贵. 动物免疫病理学[M]. 北京:中国农业出版社,1996.
- [3] 张显升,潘万霞,但秉成,等. 复合免疫增强剂对幼畜腹泻的预防作用及其机理的研究[J]. 中国兽医科技,1995,25(27):22.
- [4] 崔治中. 家禽免疫器官解剖,组织结构[J]. 禽业科技,1996,12(3):50.
- [5] 崔治中. 家禽免疫器官解剖,组织结构[J]. 禽业科技,1996,12(4):49.
- [6] 孔繁瑞. 家畜寄生虫与寄生虫病学[M]. 北京:农业出版社,1983.
- [7] 姜泊,张亚历,周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,1997.