

蛇附子对肉鸡细胞因子及免疫器官发育的影响

陈培荣,李 洵
(信阳农林学院,河南 信阳 464000)

摘要: 为研究蛇附子对肉鸡免疫功能的影响,选用 150 只 7 日龄三黄肉鸡,随机分为 5 组(Ⅰ—Ⅴ组),每组 30 只鸡。Ⅰ组为对照组,饲喂基础饲料;Ⅴ组在基础饲料中添加 10 mg/kg 的盐酸左旋咪唑;Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组分别在基础饲料中添加 0.5%、1%、2% 的蛇附子。分别在给药 5 d、10 d、20 d 后测定肉鸡血清中细胞因子白介素 1(IL-1)、白介素 4(IL-4)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、肿瘤坏死因子 γ (TNF- γ) 含量及免疫器官指数。结果显示,日粮中添加蛇附子可以提高肉鸡血清 IL-1、IL-4、TNF- α 、TNF- γ 的含量和免疫器官指数。其中,IL-1、IL-4 以添加 1% 的蛇附子在给药 20 d 后提高幅度最大,分别较对照组提高了 56.99% ($P < 0.05$) 和 74.60% ($P < 0.05$)。TNF- α 、TNF- γ 以添加 2% 的蛇附子组提高幅度最大,TNF- γ 在给药 10 d 后较对照组提高了 99.50% ($P < 0.05$),TNF- α 在给药 5 d 后提高了 60.02% ($P < 0.05$)。脾脏指数、胸腺指数、法氏囊指数以添加 1% 的蛇附子组提高幅度最大,脾脏指数、胸腺指数在给药 20 d 后提高 116.67% ($P < 0.05$)、27.27% ($P < 0.05$);法氏囊指数在给药 10 d 后较对照组提高了 60.00% ($P < 0.05$)。可见,蛇附子具有提高肉鸡免疫功能的作用。

关键词: 蛇附子; 肉鸡; 细胞因子; 免疫功能

中图分类号: S859.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)05-0134-04

Effects of *Tetrastigma hemsleyanum* on Cell Factors and Immune Function of Broilers

CHEN Peirong, LI xun
(Xinyang College of Agricultural and Forestry, Xinyang 464000, China)

Abstract: The research aimed to explore the effect of *Tetrastigma hemsleyanum* on broilers immune function. One hundred and fifty broilers were randomly into five treatments and thirty broilers in each replicate. The broilers in control group were fed basal diet. The broilers in group Ⅱ, group Ⅲ, and group Ⅳ were fed the basal diet supplemented with *Tetrastigma hemsleyanum* at 0.5%, 1% and 2%, respectively. Group Ⅴ broilers were fed the basal diet supplemented with levamisole hydrochloride at 10 mg/kg. The test duration lasted for twenty days to find out the impact of supplementary *Tetrastigma hemsleyanum* could improve IL-1, IL-4, TNF- α , TNF- γ and the weight of immune organs. Compared with the control group, IL-1, IL-4 of the group adding 1% increased by 56.99% ($P < 0.05$) and 74.60% ($P < 0.05$) respectively. TNF- γ increased by 99.50% ($P < 0.05$) after ten days and TNF- α increased by 60.02% ($P < 0.05$) after five days in group Ⅳ. Spleen index, thymus index of the group Ⅲ increased by 116.67% ($P < 0.05$) and 27.27% ($P < 0.05$) after twenty days, and bursal index increased by 60.00% after ten days. In conclusion, *Tetrastigma hemsleyanum* could enhance the immune function of broilers.

Key words: *Tetrastigma hemsleyanum*; broilers; cell factors; immune function

当前,畜禽免疫抑制性疾病日趋增多,如猪蓝耳病、圆环病毒病、伪狂犬病,鸡马立克氏病、传染性法氏囊病、传染性贫血等。由于免疫抑制病的存在,常导致免疫接种失败、继发感染多种疾病,甚至引起畜禽成批死亡。此外,畜禽的免疫抑制状态将会严重减弱药物的疗效。对于畜禽免疫抑制性疾病的防治,采用中草药提高畜禽机体免疫能力进行辅助治疗是重要方法之一^[1-3]。

蛇附子又名三叶青,为葡萄科崖爬藤属植物,学名为三叶崖爬藤,主要分布于我国西南及安徽、浙江、江西等省。蛇附子以块根或全草入药,具有清热解毒、祛风化痰、活血止痛的功能^[4]。研究表明,蛇附子具有免疫调节作用^[5]。

目前,针对蛇附子药理研究主要集中在抗肿瘤活性方面,关于蛇附子对机体免疫功能研究较少。为此,本研究通过饲喂不同剂量的蛇附子后,检测肉鸡体内各项细胞因子的变化以及免疫器官的变化,探讨蛇附子对健康肉鸡细胞免疫功能及细胞因子水平的影响,为进一步研究其免疫机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验动物及饲料

150 只 1 日龄三黄肉仔鸡,由信阳农林学院孵化室孵化提供;饲料为肉仔鸡颗粒料,购于南阳正大集团饲料有限公司。

1.2 主要药品及试剂

蛇附子(信阳医药集团公司)、5% 盐酸左旋咪唑(0.05 g/kg,江西省农科院兽药厂)、鸡白介素 1(IL-1)、白介素 4(IL-4)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、肿瘤坏死因子 γ (TNF- γ)ELISA 试剂盒(美国 ADL 公司)。

1.3 试验设计

将雏鸡饲养至 7 日龄,随机分为 5 组,每组 30 只鸡,在 20~35℃ 条件下分笼饲养,14 日龄后试验组 II、III、IV 每日分别在基础日粮中添加 0.5%、1%、2% 蛇附子粉混饲。I 组设为空白组。V 组设为左旋咪唑组,混饲 10 mg/kg 盐酸左旋咪唑。

1.4 测定项目及方法

分别在给药 5 d、10 d、20 d 后每组随机抽取 5 只,称质量,心脏采血,分离血清,检测 IL-1、IL-4、TNF- α 、TNF- γ 细胞因子的含量。参照试剂盒说明,在包被板孔中加入标准品或待测样品 100 μ L/孔,将反应板充分混匀后置于 37℃ 温育 120 min;每孔中加入第一抗体工作液 50 μ L,37℃ 温育 60 min;每孔中加入酶标抗体工作液 100 μ L,37℃ 温箱育

60 min;每孔中加入底物工作液 100 μ L,37℃ 温育 5 min。以 B/BD 值(B = 标准品 OD 值,BD = 标准品含量为 0 时的 OD 值)为纵坐标,以标准品含量的对数值为横坐标绘制标准曲线,并根据标准曲线求出回归方程,根据公式计算待测血清的 IL-1、IL-4、TNF- α 、TNF- γ 含量。同时精密称定胸腺、脾脏、法氏囊的质量,根据免疫器官指数计算公式计算,免疫器官指数 = 免疫器官质量/体质量。

1.5 数据统计处理

试验数据采用 SAS 8.0 软件单因素方差分析进行统计分析,若经 F 检验差异显著再用 LSD 法进行多重比较,试验结果以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 IL-1、IL-4、TNF- α 、TNF- γ 标准曲线

由表 1 可以看出,本试验中所建立的 IL-1、IL-4、TNF- α 、TNF- γ 标准曲线相关性好,相关系数(r)均在 0.999 0 以上。

表 1 血清的 IL-1、IL-4、TNF- α 、TNF- γ 标准曲线
回归方程

项目	回归方程	相关系数
IL-1	$y = -0.5098x + 1.8192$	$r = 0.9993$
IL-4	$y = -0.9395x + 2.1496$	$r = 0.9990$
TNF- α	$y = -0.6980x + 2.0275$	$r = 0.9993$
TNF- γ	$y = -0.6586x + 1.7132$	$r = 0.9994$

2.2 蛇附子对肉鸡体内细胞因子含量的影响

由表 2 可知,给药 5 d 后,与 I 组相比,II、III、IV 组的血清 IL-1 含量分别提高 4.34%、7.15%、5.75%,差异均不显著;V 组血清 IL-1 含量下降 4.09% ($P > 0.05$)。给药 10 d 后,与 I 组相比,II、III、IV、V 组的血清 IL-1 含量均有所下降,分别显著降低 34.92%、7.38%、22.13%、12.47%。给药 20 d 后,与 I 组相比,II、III、IV 组的 IL-1 含量分别显著提高 26.85%、56.99%、32.39%;V 组血清 IL-1 含量提高 6.29%,但差异不显著。与 V 组相比,II、III、IV 组的 IL-1 含量分别显著提高 19.34%、47.69%、24.55%。

与 I 组相比,给药 5 d 后,II、IV、V 组的肉鸡血清 IL-4 含量分别提高了 9.15%、8.53%、1.24%,但差异不显著;给药 10 d 后,II、III、IV、V 组的血清 IL-4 含量分别显著提高 23.41%、51.85%、30.75%、14.18%;给药 20 d 后,II、III、IV 组的 IL-4 含量分别显著提高了 52.73%、74.60%、58.64%,V 组血清 IL-4 含量较 I 组下降了 1.66% ($P > 0.05$)。

给药 5 d 后,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组的血清 TNF-α 含量与 I 组相比分别显著提高 52.49%、50.30%、60.02%,与 V 组相比分别显著提高 37.01%、35.04%、43.78%;给药 20 d 后,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组的血清 TNF-α 含量分别显著高于 I 组 21.13%、42.11%、15.22%,分别显著高于 V 组 18.24%、38.72%、12.48%。

给药 5 d、10 d、20 d 后,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、V 组肉鸡血清 TNF-γ 含量均显著高于 I 组。给药 5 d 后,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、V 组的血清 TNF-γ 含量分别显著高于 I 组 55.79%、45.42%、41.46%、38.59%,但Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组与 V 组相比差异均不显著;给药 10 d 后,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、V 组的 TNF-γ 含量分别显著高于 I 组 86.07%、55.21%、99.50%、58.92%;给药 20 d 后,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组的 TNF-γ 含量分别显著高于 I 组 31.47%、64.67%、57.43%,但分别显著低于 V 组 26.90%、8.44%、12.47%。

表 2 蛇附子对三黄肉鸡细胞因子的影响 ng/mL

项目	组别	测定时间		
		5 d	10 d	20 d
IL-1	I	7.83 ± 1.67 ^a	15.32 ± 0.55 ^a	17.32 ± 0.55 ^c
	II	8.17 ± 0.81 ^a	9.97 ± 0.75 ^c	21.97 ± 0.75 ^b
	III	8.39 ± 0.45 ^a	14.19 ± 0.62 ^b	27.19 ± 0.62 ^a
	IV	8.28 ± 1.31 ^a	11.93 ± 1.05 ^{ab}	22.93 ± 1.05 ^b
	V	7.51 ± 1.53 ^a	13.41 ± 0.97 ^b	18.41 ± 0.97 ^c
IL-4	I	8.09 ± 0.54 ^a	12.13 ± 1.65 ^c	15.04 ± 1.65 ^c
	II	8.83 ± 1.25 ^a	14.97 ± 1.54 ^b	22.97 ± 2.54 ^b
	III	7.52 ± 1.23 ^a	21.26 ± 1.27 ^a	26.26 ± 1.27 ^a
	IV	8.78 ± 0.66 ^a	15.86 ± 1.31 ^b	23.86 ± 1.18 ^b
	V	8.19 ± 1.39 ^a	13.85 ± 1.18 ^b	14.79 ± 2.18 ^c
TNF-α	I	8.23 ± 0.76 ^c	16.57 ± 0.87 ^a	19.64 ± 0.87 ^c
	II	12.55 ± 0.94 ^b	17.79 ± 1.16 ^a	23.79 ± 2.16 ^b
	III	12.37 ± 0.71 ^b	16.91 ± 1.54 ^a	27.91 ± 2.14 ^a
	IV	13.17 ± 1.47 ^a	18.63 ± 1.04 ^a	22.63 ± 1.04 ^b
	V	9.16 ± 1.21 ^c	17.62 ± 1.12 ^a	20.12 ± 1.12 ^c
TNF-γ	I	9.07 ± 0.64 ^b	9.98 ± 0.07 ^c	12.71 ± 0.07 ^c
	II	14.13 ± 0.54 ^a	18.57 ± 1.34 ^a	16.71 ± 3.34 ^{ab}
	III	13.19 ± 1.03 ^a	15.49 ± 0.74 ^b	20.93 ± 1.74 ^b
	IV	12.83 ± 1.53 ^a	19.91 ± 1.23 ^a	20.01 ± 1.23 ^b
	V	12.57 ± 1.14 ^a	15.86 ± 0.57 ^b	22.86 ± 1.37 ^a

注:同一列不同组别数据肩标字母不相同者表示差异显著(P<0.05),下表同。

2.3 蛇附子对肉鸡免疫器官指数的影响

从表 3 可知,给药 5 d 后,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组的胸腺指数与 I 组相比差异均不显著,给药 20 d 后,Ⅲ组胸腺指数较 I 组显著提高 27.27%,而 I、Ⅱ、Ⅳ、V 组间差异均不显著。

给药 5 d 后,除 V 组外,试验各处理组间的脾脏指数差异不显著;给药 10 d 后,Ⅲ、Ⅳ、V 组的脾脏

指数显著高于 I 组,较 I 组分别提高 18.18%、27.27%、9.09%;给药 20 d 后,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组的脾脏指数分别显著高于 I 组 116.67%、116.67%、33.33%,Ⅱ、Ⅲ组脾脏指数均显著高于 V 组 30.00%。

给药 5 d 后,各处理组间的法氏囊指数差异均不显著;给药 10 d 后,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组的法氏囊指数显著高于 I 组,分别提高了 40%、60%、30%,较 V 组分别显著提高了 27.27%、45.45%、18.18%;给药 20 d 后各处理组间的法氏囊指数差异均不显著。

表 3 蛇附子对三黄肉鸡免疫器官指数的影响 g/kg

指标	组别	测定时间		
		5 d	10 d	20 d
胸腺指数	I	0.08 ± 0.03 ^a	0.07 ± 0.02 ^c	0.11 ± 0.02 ^b
	II	0.09 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.03 ^b	0.11 ± 0.01 ^b
	III	0.11 ± 0.05 ^a	0.10 ± 0.02 ^a	0.14 ± 0.04 ^a
	IV	0.10 ± 0.03 ^a	0.08 ± 0.04 ^b	0.11 ± 0.02 ^b
	V	0.10 ± 0.03 ^a	0.09 ± 0.04 ^b	0.12 ± 0.02 ^b
脾脏指数	I	0.08 ± 0.02 ^b	0.11 ± 0.01 ^c	0.06 ± 0.04 ^c
	II	0.09 ± 0.03 ^b	0.11 ± 0.05 ^c	0.13 ± 0.03 ^a
	III	0.10 ± 0.02 ^b	0.13 ± 0.02 ^b	0.13 ± 0.02 ^a
	IV	0.08 ± 0.01 ^b	0.14 ± 0.03 ^a	0.08 ± 0.03 ^b
	V	0.11 ± 0.03 ^a	0.12 ± 0.06 ^b	0.10 ± 0.08 ^b
法氏囊指数	I	0.12 ± 0.07 ^a	0.10 ± 0.06 ^c	0.09 ± 0.02 ^a
	II	0.13 ± 0.06 ^a	0.14 ± 0.08 ^b	0.10 ± 0.03 ^a
	III	0.13 ± 0.04 ^a	0.16 ± 0.06 ^a	0.10 ± 0.03 ^a
	IV	0.12 ± 0.05 ^a	0.13 ± 0.04 ^b	0.09 ± 0.02 ^a
	V	0.14 ± 0.07 ^a	0.11 ± 0.06 ^c	0.10 ± 0.02 ^a

3 结论与讨论

IL-1 是一种主要由单核细胞、巨噬细胞合成、分泌的多肽,是细胞因子网络功能形成的中心^[6]。IL-4 是 Th2 型细胞产生的一种多效应性的免疫活性调节分子,可间接介导细胞免疫,在免疫调节中具有十分重要的作用^[7]。本试验结果表明,在日粮中添加蛇附子 5 d、10 d、20 d 后,添加蛇附子各组较对照组 IL-1、IL-4 含量不同程度地提高,尤其在给药 20 d 后添加 1% 蛇附子组 IL-1、IL-4 含量最高,分别较对照组提高了 56.99% 和 74.60%,表明蛇附子具有提高机体免疫功能的作用。

肿瘤坏死因子具有很强的免疫调节作用^[8]。前人研究^[9-12]表明,三叶青能明显提高小鼠免疫功能,提高机体内 TNF-α、TNF-γ 含量。本试验结果表明,给药 5 d、10 d、20 d 后,添加蛇附子组血清 TNF-γ 含量显著高于对照组,给药 5 d 后,添加 1% 蛇附子组的肉鸡血清 TNF-γ 含量显著高于对照组,给药 20 d 后,添加 1% 蛇附子组 TNF-γ 含量较对照组提高了 64.67%,但比左旋咪唑组降低了

8.44%。表明盐酸左旋咪唑在促进 $\text{TNF}-\gamma$ 分泌方面效果优于蛇附子。给药 5 d、20 d 后,添加 1% 蛇附子组的肉鸡血清 $\text{TNF}-\alpha$ 含量比对照组提高了 50.30%、42.11%,较左旋咪唑组分别提高了 35.04%、38.72%。

脾脏、胸腺和法氏囊质量可用于评价鸡的免疫状况,免疫器官指数在一定程度上可以作为衡量免疫器官生长发育的一个重要指标。孙才华^[13]研究发现,添加中草药能促进鸡免疫器官的生长发育。Ducki 等^[14]研究表明,蛇附子能增加正常小鼠脾脏的质量,且能完全对抗皮质激素引起的胸腺及肠淋巴结的显著萎缩,并可对抗环磷酰胺造成的脾脏质量显著下降。本试验结果表明,在给药 5 d 后各组肉鸡的胸腺、脾脏和法氏囊指数和对照组相比差异不显著,在给药 20 d 后,日粮中添加蛇附子各组肉鸡的胸腺、脾脏和法氏囊指数不同程度高于对照组,表明长时间添加蛇附子对肉鸡免疫器官质量有一定的促进作用,有利于提高肉鸡的免疫功能。而王志俊^[15]研究表明,蛇附子对小鼠胸腺、脾脏指数增加不明显,这可能与用药时间长短、药物添加剂量及供试动物有一定关系。此外,试验中发现中药添加剂对肉鸡免疫功能的影响与中药添加剂量有很大关系,这可能与中草药的适口性及双向调节作用有关。

综上所述,蛇附子可以提高鸡的细胞因子水平和免疫器官指数,具有免疫增强的作用。

参考文献:

[1] 郑成江,吕世玺,张连洪,等. 中草药饲料添加剂的研究进展与展望[J]. 天津农业科学,2010,16(5):51-54.
[2] 于晓磊,涂军,余明华,等. 左旋咪唑对新城疫疫苗免

疫效果的影响[J]. 现代农业科技,2014(2):280,285.
[3] 赵亮,赵瑞萍,李向阳,等. 中草药饲料添加剂在畜禽上应用研究进展[J]. 山西农业科学,2014,42(2):206-208.
[4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(2010 版二部)[M]. 北京:中国农业出版社,2010.
[5] 陈巧利,巩江,曹梦晔. 三叶青药理学研究新进展[J]. 辽宁中医杂志,2011,4(1):18-20.
[6] 夏绍军. 中医药与肿瘤的免疫调节概述[J]. 中医药临床志,2004,16(4):388-390.
[7] 杨雄志. 三叶青对小鼠免疫性肝损伤保护作用的研究[J]. 实用中西医结合临床,2008,8(2):189-191.
[8] 徐彩菊,丁钢强,孟佳,等. 中药三叶青提取物抗肿瘤机制初探[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(1):14-16.
[9] 徐彩菊,白宁宁,孟佳,等. 三叶青提取物体内抑瘤作用及其机理研究[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(2):278-280.
[10] 丁钢强,徐彩菊,孟佳. 三叶青对小鼠细胞因子及免疫功能影响研究[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(9):1724-1726.
[11] 杨雄志. 三叶青对小鼠免疫性肝损伤保护作用的研究[J]. 实用中西医结合临床,2008,8(2):88-89.
[12] 杨雄志,巫军. 三叶青提取物抗乙肝病毒活性的研究[J]. 南京中医药大学学报,2009,25(4):294-296.
[13] 孙才华. G- 中药复方多糖对雏鸡免疫调节机理的研究[D]. 石河子:石河子大学,2007.
[14] Ducki S, Forrest R, Hadifield J A, et al. Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones [J]. Bioorg Med Chem Lett, 1998, 8(9):1051-1056.
[15] 王志俊. 人工种植与野生三叶青冻干粉增强免疫功能的比较[J]. 浙江中医杂志,2012,47(12):922-923.