

杜仲多糖对三黄鸡免疫应答的佐剂作用

王 凯¹, 卢 曦¹, 刘艳芬¹, 陈绍红², 刘 铀^{2*}

(1. 广东海洋大学 农学院, 广东 湛江 524088; 2. 广东海洋大学 生化中心, 广东 湛江 524088)

摘要: 为研究杜仲多糖(EOP)对家禽免疫应答的影响,将120只1日龄三黄鸡随机分成A、B、C、D 4组,分别接种含有0、2、5、8 mg/mL EOP的新城疫和禽流感疫苗,检测相关免疫指标的变化。结果显示,添加8 mg/mL EOP能显著提高三黄鸡新城疫和禽流感抗体水平、T淋巴细胞含量和白细胞吞噬指数($P < 0.05$),但对三黄鸡免疫器官指数、血清IgG含量影响不大($P > 0.05$)。可见,EOP对疫苗免疫具有佐剂作用,且EOP的添加量与其佐剂效果有一定的相关性。

关键词: 三黄鸡; 杜仲多糖; 免疫佐剂; 免疫应答

中图分类号: S853.74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)01-0123-04

Adjuvant Effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. Polysaccharide on Immune Response of Sanhuang Chicken

WANG Kai¹, LU Xi¹, LIU Yan-fen¹, CHEN Shao-hong², LIU You^{2*}

(1. Agricultural College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Biochemistry Center of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: The present study was aimed to investigate the effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. Polysaccharide(EOP) on immune response of avian. 120 1-day-old Sanhuang broilers were randomly divided into A, B, C and D four groups. The four groups were subsequently inoculated with Newcastle disease and Avian influenza vaccines supplemented with 0, 2, 5, 8 mg/mL doses of EOP respectively, and the associated immune parameters were detected. The results indicated that the HI antibody titers of Newcastle disease and Avian influenza, percentage of T lymphocytes and phagocytic index of white blood cells of group D were significantly elevated ($P < 0.05$) owing to the EOP addition, whereas the immune organ index and serum IgG content were not affected. It can be inferred that EOP had adjuvant effect on vaccine inoculation and there was some dose-effect relationship between them.

Key words: Sanhuang chicken; *Eucommia ulmoides* Oliv. polysaccharide; immune adjuvant; immune response

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliver)是我国特有的一种中药材,其干燥树皮入药,具有补肝肾、强筋骨、降血压等多种药理作用。杜仲含有儿茶素、绿原酸、咖啡酸、芦丁、松脂素、杂多糖等多种生物活性成分^[1-2],研究证实,杜仲提取物中含有多种抗氧化成分,能清除动物体内的过氧化物和自由基,保护细胞内DNA等生物大分子物质及细胞结构^[3-4]。杜仲多糖(*Eucommia ulmoides* Oliv. polysaccharides, EOP)能

抑制环磷酸胺引起的小鼠肝脏损伤和纤维化^[5-6],提高动物免疫功能^[7]。在现代畜牧业科研及生产实践中,杜仲提取物作为特殊功能型饲料添加剂、抗生素替代品等已被广泛研究并取得良好的应用效果^[8-10],而EOP作为免疫佐剂方面的研究鲜见报道。鉴于此,以三黄鸡为试验对象,研究了EOP作为免疫佐剂对新城疫和禽流感疫苗应答免疫的影响,旨在为EOP在家禽疫苗免疫中的应用提供理论依据。

收稿日期:2013-08-19

基金项目:广东省科技计划项目(2007A020200006-8)

作者简介:王 凯(1987-),男,河南焦作人,在读硕士研究生,研究方向:动物营养与免疫。E-mail:342381481@qq.com

*通讯作者:刘 铀(1966-),男,湖南湘乡人,教授,博士,主要从事动物传染病学教学和科研。E-mail:liuy6254282@163.com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物 三黄鸡购自湛江遂溪种鸡场。

1.1.2 主要试剂 干燥杜仲树皮购自湛江医药公司;新城疫Ⅰ、Ⅱ系苗购自广东生物制品厂;禽流感 H5 亚型油剂灭活疫苗购自广东大华农生物制品有限公司;乙酸-1-萘脂购自国药集团化学试剂有限公司;H5 亚型禽流感血凝抑制(HI)诊断抗原和阳性血清购自哈尔滨兽医研究所;新城疫标准抗原及阳性血清、白色葡萄球菌由广东海洋大学现代生化中心保存。

1.1.3 主要仪器 722s 型可见光分光光度计购自上海仪器分析总厂,高速组织捣碎机购自江苏金坛医疗仪器厂,XSZ-D2 型倒置显微镜购自重庆光学仪器厂。

1.2 EOP 的提取及含量测定

参照文献[5]的方法,将干燥杜仲皮粉碎过 0.178 mm 孔径筛,蒸馏水浸泡过夜后,加热至 80℃ 浸提 3 次,合并滤液,用旋转蒸发器浓缩后,加入一定量的乙醇(终体积分数为 80%)沉淀多糖,经减压抽滤后弃滤液,将得到的粗多糖沉淀用 80%的乙醇反复洗涤 3 次,真空干燥后重新溶解于适量双蒸水中,采用 Sephacryl-S300 柱层析纯化,即获得 EOP,并采用硫酸-苯酚法测定多糖含量。

1.3 疫苗的预处理

分别在禽流感、新城疫疫苗中添加 EOP,使其终质量浓度分别为 0、2、5、8 mg/mL,用高速组织捣碎机乳化。

1.4 试验动物分组及疫苗免疫

将 120 只 1 日龄三黄鸡,随机分为 A(对照)、B、C、D 4 组,每组设 3 个重复,每个重复 10 只,按常

规方法育雏 3 周后分笼饲养,自由采食和饮水。按照新城疫和禽流感疫苗的推荐剂量,A、B、C、D 组试验鸡分别接种含有 0、2、5、8 mg/mL EOP 的新城疫和禽流感疫苗。免疫程序:1 周龄用新城疫Ⅱ系滴鼻,2 周龄肌肉注射新城疫Ⅱ系和禽流感疫苗,并在 5 周龄时同 2 周龄方法加强免疫 1 次。

1.5 样品采集与检测指标

分别于 4、7、12 周龄采血检测 T 淋巴细胞含量(α -醋酸萘酯酶染色法^[11])、白细胞吞噬指数(白色葡萄球菌吞噬细胞计数^[12])、血清禽流感和新城疫抗体效价(微量 HI 试验^[13],以 $\log_2 N$ 值表示)和血清 IgG 含量(免疫比浊法^[14]);分别在 7、12 周从每个重复随机剖杀 3 只鸡,分离胸腺、法氏囊和脾脏,称取质量,并计算免疫器官指数(免疫器官指数=免疫器官质量/体质量)。

1.6 数据统计

采用 SPSS 17.0 统计软件按对各项数据进行方差分析,计算结果用“平均值±标准差”,采用 LSD 法进行各组间差异性比较。

2 结果与分析

2.1 EOP 的提取结果

采用加热浸提、80%的乙醇沉淀获得杜仲粗提物多糖含量约 56.2%,真空干燥后呈灰色粉状,仍含有少量蛋白质和杜仲胶,用双蒸水溶解后稍浑浊。通过 Sephacryl-S300 柱层析进一步纯化后,EOP 含量可达 72.6%。

2.2 EOP 对三黄鸡免疫器官指数的影响

由表 1 可知,各组试验鸡的胸腺指数、脾脏指数、法氏囊指数与对照组相比差异均不显著($P>0.05$)。

表 1 EOP 对三黄鸡免疫器官指数的影响($n=9$)

mg/g

指标	7 周龄				12 周龄			
	A	B	C	D	A	B	C	D
胸腺指数	0.83±0.12	0.83±0.10	0.82±0.17	0.83±0.12	0.76±0.08	0.74±0.12	0.76±0.17	0.74±0.18
脾脏指数	0.33±0.04	0.34±0.04	0.34±0.03	0.33±0.05	0.56±0.11	0.54±0.09	0.54±0.03	0.56±0.21
法氏囊指数	0.92±0.10	0.94±0.07	0.92±0.12	0.91±0.11	1.12±0.15	1.19±0.07	1.15±0.02	1.13±0.11

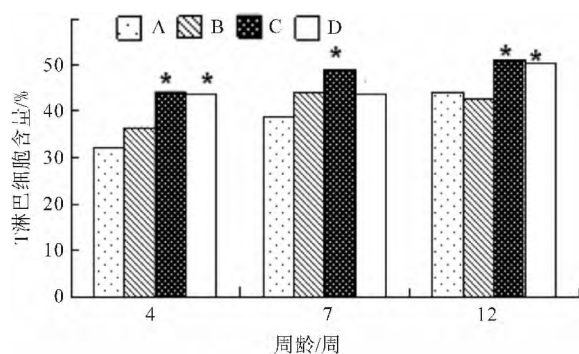
2.3 EOP 对三黄鸡 T 淋巴细胞含量的影响

如图 1 所示,与 A(对照)组相比,除 12 周龄 B 组外,各试验组 T 淋巴细胞含量均高于对照组,4~12 周龄时 C 组均显著高于对照组;在 4、12 周龄时,给予高剂量 EOP 的 D 组鸡 T 淋巴细胞含量也显著高于对照组。

2.4 EOP 对三黄鸡白细胞吞噬指数的影响

由图 2 可见,随着雏鸡的生长发育,三黄鸡白细胞吞噬功能逐渐增强,至 7 周龄时,白细胞吞噬指数已超过 50%;在新城疫和禽流感疫苗免疫的同时给予 EOP,能促进吞噬指数的提高,4~7 周龄时 C、D 组白细胞吞噬指数显著高于对照组;12 周龄时,D

组吞噬指数显著高于对照组。



* 表示试验组与对照组差异显著 ($P < 0.05$),
** 表示差异极显著 ($P < 0.01$), 下同

图 1 EOP 对 T 淋巴细胞含量的影响

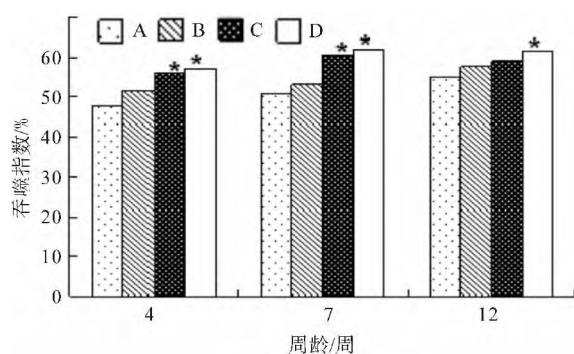


图 2 EOP 对白细胞吞噬指数的影响

2.5 EOP 对三黄鸡血清 IgG 含量的影响

由表 2 可见,随着周龄增加,三黄鸡血清 IgG 含量有升高的趋势,但各试验组 IgG 水平与对照组差异均不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 各处理不同周龄三黄鸡血清 IgG 含量 ($n=9$)

周龄/周	试验组			
	A	B	C	D
4	2.10±0.26	2.12±0.32	2.09±0.18	2.15±0.16
7	2.57±0.13	2.62±0.14	2.66±0.12	2.69±0.13
12	2.85±0.16	2.78±0.22	2.82±0.13	2.90±0.10

2.6 EOP 对新城疫和禽流感疫苗免疫产生的血清抗体效价的影响

由图 3 可以看出,EOP 能增强新城疫苗的免疫应答,各试验组新城疫 HI 效价均高于对照组。7 周龄时 D 组和 12 周龄 C、D 组新城疫抗体水平显著高于对照组。另外,采用本试验中的免疫程序,新城疫 HI 效价在 1:16 以上 (即 $\log_2 N > 4$)。

由图 4 可以看出,与对照组相比,除 4 周龄 B 组鸡外,整个试验期内各试验组鸡血清禽流感抗体均显著或极显著高于对照组。虽然 EOP 不足以改变禽流感抗体水平的下降趋势,但给予 EOP 的各组始终高于对照组。

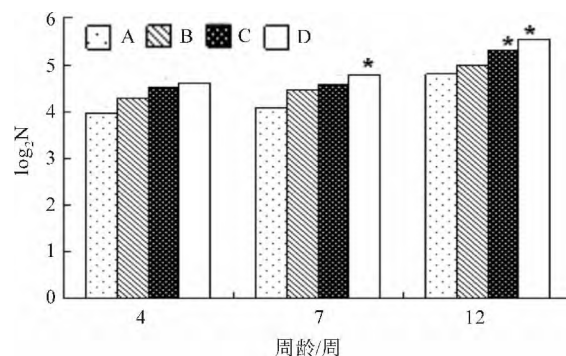


图 3 EOP 对新城疫血清 HI 抗体效价的影响

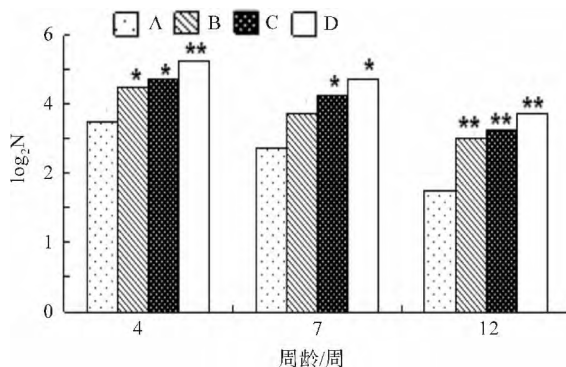


图 4 EOP 对禽流感 HI 抗体效价的影响

3 结论与讨论

3.1 EOP 的提取

杜仲作为一种中药,其活性成分复杂,各成分生理药理功能也不甚清楚,这在很大程度上限制了杜仲经济价值的开发和利用。而经水提醇沉法提取 EOP 工艺简单,提取率较高,为在畜牧业生产上应用奠定了基础。

3.2 EOP 对三黄鸡的免疫增强作用

在动物机体免疫过程中都会出现一些应激反应,若疫苗、佐剂使用不当或操作不当则会使机体产生严重的应激反应,造成免疫器官萎缩,免疫器官指数下降。对禽类来说,胸腺、脾脏、法氏囊是最重要的免疫器官,参与禽类机体的全部体液和细胞免疫,T 淋巴细胞的活性能直接反映出机体的细胞免疫水平,而抗体滴度则直接反映出免疫效果的好坏。由本试验结果可以看出,EOP 对禽流感和新城疫疫苗的免疫增强效果与其添加量有一定的正相关关系,EOP 按 8 mg/mL 的剂量添加到新城疫和禽流感疫苗中能有效地增强免疫效果,在不降低免疫器官指数的情况下,能显著提高三黄鸡 T 淋巴细胞含量与外周血白细胞吞噬指数,显著增强新城疫和禽流感疫苗的免疫应答,但对血清 IgG 水平影响不大。这表明 EOP 在不增加免疫器官负担的情况下 (免疫器官指数组间差异不显著) 增强了细胞免疫功能,提高了白细胞吞噬

指数。其原因可能是大多数 EOP 属于杂多糖,具有较强的抗氧化活性^[2],这些抗氧化成分有利于清除细胞代谢过程产生的过氧化物和自由基^[15],减少细胞内活性氧自由基的产生以及线粒体膜的破坏^[16],保护细胞膜的完整性和流动性,有利于免疫细胞对抗原的识别、处理以及抗原提呈,进而增强机体的免疫应答^[7]。本研究表明,EOP 对疫苗免疫具有佐剂作用,但其确切机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈彩娟,沈舒,肖同书,等.杜仲化学成分研究[J].亚太传统医药,2012,8(3):25-26.
- [2] Dai X, Huang Q, Zhou B, *et al.* Preparative isolation and purification of seven main antioxidants from *Eucommia ulmoides* Oliv. (Du-zhong) leaves using HSC-CC guided by DPPH-HPLC experiment [J]. Food Chem, 2013, 139(1/4):563-570.
- [3] Hsieh C L, Yen G C. Antioxidant actions of du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) toward oxidative damage in biomolecules[J]. Life Sci, 2000, 66(15):1387-1400.
- [4] Yen G C, Hsieh C L. Inhibitory effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. on oxidative DNA damage in lymphocytes induced by H₂O₂ [J]. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 2003, 23(S1):23-34.
- [5] 辛晓明,郭桂丽,王浩,等.杜仲多糖对环磷酰胺致小鼠毒性的影响[J].时珍国医国药,2009,20(7):1664-1665.
- [6] 周程艳,艾凌艳,王美,等.杜仲多糖抗肝纤维化作用的实验研究[J].中草药,2011,42(2):324-329.

- [7] 徐贤柱,饶华,蔡险峰,等.杜仲叶多糖提取及对小鼠免疫功能影响研究[J].时珍国医国药,2013,24(3):541-542.
- [8] 宋琼莉,邹志恒.杜仲的功能及其在畜牧生产中的应用前景[J].黑龙江畜牧兽医:综合指导版(下),2011(1):95-96.
- [9] 王福明,陈莉.杜仲粉对建昌鸭生长速度和屠宰性能的影响[J].水禽世界,2012(1):22.
- [10] 陈静,刘昌勇,杜红岩,等.杜仲叶饲料添加剂对鸡肉及鸡皮中胶原蛋白含量的影响[J].河南大学学报:医学版,2011,30(1):17-19.
- [11] 朱辛为,李质馨,窦肇华,等.T 淋巴细胞标记染色-ANAE 法的改进[J].解剖学杂志,2003,26(3):300-301.
- [12] 胡宇莉,廖晓兵,黎建华,等.穿心莲对肉鸡淋巴细胞活性及白细胞吞噬功能影响的研究[J].广东畜牧兽医科技,2007,32(2):42-44.
- [13] 李德山,梁艳荣,李维义.鸡新城疫微量血凝抑制试验标准化的研究[J].中国兽医科技,1986,16(11):9-11.
- [14] 朱立平,陈学清.免疫学常用实验方法[M].北京:人民军医出版社,2000:88-99.
- [15] Lee M K, Cho S Y, Kim D J, *et al.* Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) cortex water extract alters heme biosynthesis and erythrocyte antioxidant defense system in lead-administered rats[J]. J Med Food, 2005, 8(1):86-92.
- [16] Kwon S H, Kim M J, Ma S X, *et al.* *Eucommia ulmoides* Oliv. Bark. protects against hydrogen peroxide-induced neuronal cell death in SH-SY5Y cells[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 142(2):337-345.

(上接第 122 页) 研究的一大突破。本研究表达的 HA 蛋白大小为 65 kD,与前人研究结果相符^[7-9]。关于本研究中采用杆状病毒表达系统表达的重组 HA 蛋白的免疫原性及其诱导中和抗体产生的能力有待进一步研究。

本研究成功制备了表达禽流感 H9 亚型 HA 蛋白重组杆状病毒,并在昆虫细胞 Sf9 中获得了高效表达,Western-blot、间接免疫荧光试验表明该蛋白具备良好的免疫活性。同时,本研究进行了血凝抑制试验,检验表达的 HA 蛋白是否具有凝集活性,以此鉴定其与天然蛋白结构的相似性,结果表明,该蛋白保持了血凝素蛋白可吸附红细胞的活性。

参考文献:

- [1] 甘孟侯.中国禽病学[M].北京:中国农业出版社,1999:66.
- [2] Negawa K, Nobusawa E, Nakajima K, *et al.* Analysis of epitope recognition of antibodies induced by DNA immunization against hemagglutinin protein of influenza

- A virus[J]. Vaccine, 2003, 21(23):3118-3125.
- [3] 刘明,刘春国,张云,等.N3 亚型禽流感病毒 NA 基因在昆虫细胞中的高效表达[J].动物医学进展,2005,26(10):50-54.
- [4] Sugiura T, Sugita S, Imagawa H, *et al.* Serological diagnosis of equine influenza using the hemagglutinin protein produced in a baculovirus expression system [J]. Virol Methods, 2001, 98(1):1-8.
- [5] 万春和,刘明,刘春国,等.H1 亚型猪流感病毒血凝素基因在昆虫细胞中的表达及其间接 ELISA 方法的初步建立[J].微生物学报,2008,48(2):220-225.
- [6] 顾大勇,徐云庆,史蕾,等.人及禽类禽流感病毒蛋白芯片检测方法建立[J].中国公共卫生,2012,28(1):71-73.
- [7] 詹爱军,王新卫,谭婉明,等.H9N2 亚型 AIV HA 基因的克隆及其在昆虫细胞中的表达[J].中国农学通报,2008,24(1):18-22.
- [8] 周雪媚,霍惠玲,余锐萍,等.表达禽流感 HA 基因的重组马立克氏病毒的构建[J].华北农学报,2007,22(4):168-171.
- [9] 薛金艳,王清路,窦烨,等.禽流感的分子生物学研究进展[J].现代农业科技,2009(11):216-217.