

# 大肠杆菌诱导对肉鸡白细胞粗提物抗菌活性的影响

赵志雨, 王 青, 杭柏林, 尚田田, 徐彦召, 胡建和\*

(河南科技学院 动物科学学院, 河南 新乡 453003)

**摘要:** 为研究异物刺激对肉鸡机体抗菌物质活性的影响。测定了大肠杆菌诱导后肉鸡白细胞粗提物活性变化, 分别对大肠杆菌诱导前和诱导后的健康肉鸡进行采血, 血液红细胞溶胀、离心后, 各取含  $1 \times 10^7$  个白细胞的溶液经超声波破碎, 10% (V/V) 乙酸浸提、旋转蒸发, 获得白细胞粗提物, 采用微量琼脂扩散法测定粗提物的抗菌活性。结果表明, 所得到的白细胞粗提物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均表现抑制作用, 诱导后的粗提物比诱导前具有更强的抗菌活性。大肠杆菌诱导增强了肉鸡白细胞粗提物的抗菌活性。

**关键词:** 大肠杆菌; 诱导; 粗提物; 抗菌活性

**中图分类号:** S813.92      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2013)04-0149-04

## Influence of *E. coli* Induction on Antimicrobial Activity of Crude Extract from Leukocytes of Broiler Chickens

ZHAO Zhi-yu, WANG Qing, HANG Bo-lin, SHANG Tian-tian, XU Yan-zhao, HU Jian-he\*

(College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

**Abstract:** To test the influence of *E. coli* induction on the antimicrobial activity of body's anti-biont, the change of the activity of crude extract from leukocytes of broiler chickens induced by *E. coli* was investigated. The healthy broiler chickens were injected with *E. coli* and ddH<sub>2</sub>O, respectively. Leukocytes were isolated from whole blood of the broiler chickens by swelling erythrocytes and centrifugation. The leukocytes were disrupted by ultrasonic and its crude extract was acquired by extraction with 10% (V/V) acetic acid and rotary evaporation. The efficacy of the crude extract was detected by trace agar diffusion method. All the crude extract could inhibit the growth of *E. coli* and *Staphylococcus aureus*, and the crude extract from leukocytes of broiler chickens induced by *E. coli* revealed better inhibitor activity than the crude extract of normal broiler chickens' blood. The results indicate that the activity of the crude extract was enhanced by the induction of *E. coli*.

**Key words:** *E. coli*; induction; crude extract; antimicrobial activity

白细胞是机体抵御病原微生物等异物入侵的主要防线, 在机体损伤治愈、抗御病原的入侵和对疾病免疫方面起着重要作用<sup>[1]</sup>, 白细胞的总数直接反映机体的状态。研究发现, 从禽类血液白细胞中可分

离出多种天然抗菌类物质, 如白细胞介素 2(IL-2)、白细胞介素 18(IL-18)。IL-2 是由 T 淋巴细胞分泌的一种淋巴因子, 在 T 细胞生长与分化、B 细胞生长、NK 细胞的激活等方面起重要作用, 是一种能影

收稿日期: 2012-11-16

基金项目: 河南省科技创新杰出青年基金项目(104100510028)

作者简介: 赵志雨(1988-), 男, 河南商丘人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物微生物学与免疫学。E-mail: haoxyz365@qq.com

\* 通讯作者: 胡建和(1968-), 男, 河南辉县人, 教授, 博士, 主要从事动物微生物学、免疫学与分子病毒学研究。

E-mail: hujianhe@hist.edu.cn

响机体免疫反应各个方面的调节因子<sup>[2-4]</sup>。IL-18 是 Okamura 等<sup>[5]</sup>在 1995 年从中毒性休克小鼠的肝细胞中克隆出的,它在动物机体抗感染、免疫调节中起着重要的作用;Kaiser<sup>[6]</sup>证明,火鸡体内也存在 IL-18,探索鸡 IL-18 的生物学功能在养禽业中有着重要意义。鸡血液白细胞中也可分离得到阳离子抗菌肽(cationic antimicrobial peptides),即抗菌肽(antibacterial peptides),是机体抵抗病原微生物的主力军<sup>[7-8]</sup>,在宿主抗感染防御过程中起着重要作用,它不仅可以直接杀灭侵入体内的病原微生物,并在宿主天然免疫反应的不同阶段表现出多种强有力的作用,如对单核细胞和 T 淋巴细胞具有趋化作用、促进 T 辅助细胞的增殖、诱导巨噬细胞活化及促进淋巴细胞的凋亡等。

本研究以健康肉鸡为试验对象,用大肠杆菌对其进行人工诱导,并从其血液白细胞中提取抗菌肽粗提物,对其活性进行测定,研究诱导前后肉鸡血液白细胞中抗菌物质的活性差异,为新型抗菌物质的研究提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要仪器 低温高速离心机(3-18K,德国 Sigma 公司);全自动高压灭菌锅(HV85,日本 Hirayama 公司);冷冻干燥机(Alpha-4LSC,德国 CHRIST 公司);超声波破碎仪(VCX750,美国 Sonics 公司);旋转蒸发仪(RD-86,北京欣旺德实验设备有限公司);超低温冰箱(U410,美国 NBS 公司);恒温振荡培养箱(HZHYP-250,上海精宏实验设备有限公司)。

1.1.2 主要试剂 TSB 培养基为 Cole-Parmer 公司产品;琼脂糖为美国 Sigma 公司产品;氯化钠、磷酸氢二钾、柠檬酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、乙酸均为国产分析纯。

1.1.3 菌株与抗生素对照物 大肠杆菌(经动物试验后无致病性)、金黄色葡萄球菌均由河南科技学院动物科学学院预防兽医学实验室保存。多黏菌素为美国 Sigma 公司产品;尼生素(乳酸链球菌肽)为兰州伟日公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌诱导及血液采集 健康活鸡 30 只,随机分为 5 组,分别标记为 1、2、3、4、5,第 5 组为对照组(CK)。正常条件下饲养,于试验前每只鸡采 5 mL 新鲜血液,用 0.2 mL 10% 的柠檬酸钠进行抗凝处理,4℃保存。然后对 1、2、3、4 组鸡分别肌

肉注射 0.05 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL 大肠杆菌液(约  $1 \times 10^8$  cfu/mL),对照组肌肉注射 0.1 mL 灭菌蒸馏水。诱导后第 3 天,每只鸡采 5 mL 新鲜血液,0.2 mL 10% 的柠檬酸钠进行抗凝处理,4℃保存。诱导后第 8 天再次采血,作如上处理。

1.2.2 粗提物的制备 将血液分装在 10 mL 离心管中,4℃、3 000 r/min 离心 15 min,弃上清,加入等体积生理盐水,涡旋。4℃、4 500 r/min 再次离心 30 min,重复此步骤,至上清变成淡黄色,弃上清,加 3 倍沉淀体积的灭菌蒸馏水,轻摇 15 s。取含有  $1 \times 10^7$  个白细胞的溶液分装在 10 mL 的离心管中,4℃、10 000 r/min 离心 20 min,收集沉淀,加入 3 倍体积的灭菌蒸馏水,静置 10 s,弃上清。重复此步骤,至沉淀变为乳白色,收集沉淀,加入适量 0.01% 的乙酸,超声处理。4 000 r/min 离心 10 min。取上清,然后加入 30 mL 10% 的乙酸,置 4℃冰箱,搅拌过夜。4℃、10 000 r/min 离心 20 min,取上清,旋转蒸发,收集物于 -80℃冰箱中冷冻过夜,置于冷冻干燥机上冷冻干燥,冻干粉于 4℃保存备用。

1.2.3 粗提物抗菌活性检测 采用经典微量琼脂糖平板扩散法检测白细胞粗提物的抗菌活性。具体操作方法如下:融化 15 mL 底层培养基(TSB 培养基 3 g,琼脂糖 0.5 g,蒸馏水 50 mL,pH 值 7.4),冷却至 50℃左右,加入  $4 \times 10^6$  cfu/mL 对数生长期的测试菌,混匀,倒入直径 10 cm 的培养皿中,冷却后,用打孔器打孔,孔径为 2 mm。阳性对照孔中加 5  $\mu$ L 阳性对照物(多黏菌素 B 针对大肠杆菌,尼生素针对金黄色葡萄球菌)。阴性对照孔加 5  $\mu$ L 0.01% 的乙酸,其余孔加入 5  $\mu$ L 质量浓度分别为 200、400、600 mg/mL 的样品(每只鸡所提取的白细胞抗菌物质粗提物均以此浓度梯度进行活性检测),倒置,37℃下培养 3 h。然后倒入 50℃的上层培养基(TSB 培养基 6 g,蒸馏水 200 mL,pH 值 7.4)10 mL,凝固后,倒置,37℃培养过夜,次日观察结果并测定抑菌圈直径,记录试验数据。

1.2.4 数据处理 采用 SPSS 和 Excel 软件进行数据处理和统计分析,用邓肯氏新复极差法进行检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 白细胞粗提物的制备量比较

表 1 显示,1、3、4 组经大肠杆菌诱导后第 3 天采集血液中白细胞粗提物的质量极显著高于诱导前( $P < 0.01$ ),2 组显著高于诱导前( $P < 0.05$ );1、2、

3、4 组第 8 天采集血液得到的白细胞粗提物的质量显著高于诱导前( $P<0.05$ ),略低于诱导后第 3 天,但差异不显著( $P>0.05$ )。整个试验过程中,诱导后第 3 天及第 8 天组间差异均不显著( $P>0.05$ )。对照组差异均不显著( $P>0.05$ ),诱导前后白细胞粗提物的质量无明显变化。

表 1 白细胞粗提物制备量 g

时间	1 组	2 组	3 组	4 组	5 组(CK)
诱导前	1.23±0.22Bb	1.27±0.24Ab	1.22±0.13Bb	1.27±0.12Bb	1.26±0.21a
诱导后第 3 天	2.15±0.20Aa	1.84±0.15Aa	2.25±0.24Aa	2.34±0.17Aa	1.22±0.23a
诱导后第 8 天	1.96±0.14ABa	1.78±0.23Aa	1.92±0.16ABa	1.95±0.22ABa	1.22±0.25a

注:同列不同大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ ),不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ),下同。

2.2 粗提物抗菌活性分析

本试验用大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,检测样品质量浓度分别为 200、400、600 mg/mL 试验鸡白细胞粗提物。结果显示,样品质量浓度为 200 mg/mL 的白细胞粗提物没有活性,表 2、3 中舍去;样品质量浓度为 400、600 mg/mL 的白细胞粗提物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌抑菌圈直径见表 2、表 3。

由表 2、表 3 可以看出,鸡白细胞粗提物抑菌

圈(针对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌)直径,诱导后第 3 天与诱导前相比均显著增大( $P<0.05$ );诱导后第 8 天与诱导前相比,检测样品质量浓度为 400 mg/mL 时差异不显著( $P>0.05$ ),但检测样品质量浓度为 600 mg/mL 时差异显著( $P<0.05$ );诱导后第 8 天与第 3 天相比及同一浓度对照组内差异均不显著( $P>0.05$ ),白细胞粗提物抑菌圈大小无明显变化。

表 2 大肠杆菌检测肉鸡白细胞粗提物抑菌圈直径 mm

样品质量浓度/ (mg/mL)	采样时间	1 组	2 组	3 组	4 组	5 组(CK)	阳性对照	阴性对照
400	诱导前	3.9±0.2a	4.0±0.1a	4.3±0.2a	4.2±0.1a	3.8±0.2a	17.7	0
	诱导后第 3 天	5.3±0.1b	5.2±0.3b	5.2±0.2b	5.4±0.1b	3.9±0.3a	17.5	0
	诱导后第 8 天	4.8±0.1ab	4.7±0.2ab	4.8±0.2ab	4.9±0.2ab	3.7±0.1a	17.8	0
600	诱导前	4.7±0.2ab	4.5±0.1ab	4.7±0.2ab	5.0±0.1ab	4.7±0.2b	17.8	0
	诱导后第 3 天	6.5±0.2c	6.2±0.1c	6.5±0.1c	6.4±0.2c	4.6±0.2b	17.4	0
	诱导后第 8 天	5.8±0.1cd	5.8±0.2cd	6.0±0.2cd	6.2±0.2c	5.0±0.1b	17.3	0

表 3 金黄色葡萄球菌检测肉鸡白细胞粗提物抑菌圈直径 mm

样品质量浓度/ (mg/mL)	采样时间	1 组	2 组	3 组	4 组	5 组(CK)	阳性对照	阴性对照
400	诱导前	4.4±0.2a	4.6±0.1a	4.5±0.2a	4.8±0.1a	4.2±0.2a	17.5	0
	诱导后第 3 天	5.7±0.2b	5.6±0.1b	5.6±0.1b	5.8±0.2b	4.4±0.2a	16.9	0
	诱导后第 8 天	5.0±0.1ab	5.0±0.2ab	5.1±0.2ab	5.2±0.2ab	4.3±0.1a	17.8	0
600	诱导前	5.6±0.2b	5.5±0.1b	5.7±0.2b	5.8±0.1b	5.2±0.2b	17.6	0
	诱导后第 3 天	6.8±0.2c	6.5±0.1c	6.9±0.1c	7.1±0.2c	5.6±0.2b	17.5	0
	诱导后第 8 天	6.4±0.1cd	6.2±0.2cd	6.5±0.2cd	6.7±0.2cd	5.6±0.1b	16.8	0

诱导后 1、2、3、4 组及对照组测试样品质量浓度为 600 mg/mL 与 400 mg/mL 的抑菌圈直径相比差异均显著( $P<0.05$ )。

3 讨论

目前,动植物体内含有的很多种类抗菌肽已被分离获得<sup>[9-10]</sup>。根据抗菌肽的结构特征可将其分为 4 类,即杀菌肽、防御素、蛙皮素和蜂毒素。尽管不同类型的抗菌肽具有不同的抗菌机制,但是这些抗菌肽都

具有一些相似的特征:带有正电荷,可以与细胞膜上带负电荷凝脂发生结合反应;是两性分子,可以与靶细胞膜上疏水性的物质发生结合反应,进而使靶细胞膜上形成孔洞而杀死靶细胞;这些抗菌肽常常存在于小肠上皮细胞,口腔上皮细胞,生殖道上皮细胞以及白细胞中。动物白细胞能产生不同类型的抗菌活性物质,在动物的先天性免疫中扮演重要的角色。迄今,在绵羊和山羊白细胞中分离获得了某些具有广谱抗菌效力的抗菌肽<sup>[11-13]</sup>。本研究结果表明,鸡白细胞

提取物中含有高效、广谱的抗菌活性物质。

细菌侵染或机械损伤可引发动物脂肪体或血细胞产生抗菌肽,并释放进入血淋巴中,动物机体通过这种有效的自我防御系统抵御细菌侵染。有研究尝试采用微生物感染或其他理化因素刺激昆虫,然后从这些动物体内分离纯化到多种抗菌蛋白,大量的证据提示这些小肽分子在保护机体抵御病原体感染过程中发挥重要作用。安春菊等<sup>[14]</sup>和盛长忠等<sup>[15]</sup>利用针刺、带菌针刺和超声波诱导家蝇幼虫等方法,分析鉴定了多种抗菌肽和抗菌蛋白;彭蓉等<sup>[16]</sup>选取 3 种离体培养的鳞翅目昆虫细胞系,采用热灭活的大肠杆菌诱导产生了分子量约 8 kD 的抗菌肽,该抗菌肽具有明显抑菌活性。

本试验对肉鸡诱导前和诱导后所提取的血液白细胞抗菌物质的活性进行对比,发现诱导后血液白细胞抗菌物质的活性增强。这可能是机体在受到外界异物刺激时,防御系统为抵御细菌侵染,血细胞产生抗菌肽,导致诱导后肉鸡血液白细胞抗菌物质活性增强。诱导一段时间后肉鸡血液白细胞抗菌物质的活性下降,但不同浓度诱导后肉鸡血液白细胞抗菌物质活性下降程度不一样,诱导后肉鸡血液白细胞抗菌物质浓度越大,其活性下降程度越小。说明机体在免疫耐过后,其免疫水平有所恢复,但仍然保持在相当高的水平。另外在肉鸡血液白细胞粗提物制备量上,诱导后血液白细胞粗提物的质量增加,且对肉鸡注射更多的大肠杆菌会刺激机体产生更多的抗菌物质。这可能是由于机体对更多的异物刺激产生更强的免疫应答所致。

本研究结果表明,大肠杆菌诱导可提高肉鸡血液白细胞抗菌物质的活性,当诱导过一定时间后,抗菌物质的活性又会恢复到正常水平。本试验从影响抗菌物质抗菌活性的因素入手,研究异物刺激对机体抗菌物质活性的影响,为理想抗菌药物的开发应用提供科学依据。

#### 参考文献:

- [1] 李佩国,薛瑞晨. 动物生理学[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [2] Merluzzi V J, Welte K, Savage D M, *et al.* Expansion of cyclophosphamide-resistant cytotoxic precursors in vitro and in vivo by purified human interleukin-2[J]. The Journal of Immunology, 1983, 131(2): 806-809.
- [3] Choi K D, Lillehoj H S. Role of chicken IL-2 on gamma-delta T-cells and *Eimeria acervulina*-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and gamma-delta

- ta T-cells[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2000, 73(3/4): 309-321.
- [4] Lillehoj H S, Choi K D, Jenkins M C, *et al.* A recombinant *Eimeria* protein inducing interferon-gamma production: comparison of different gene expression systems and immunization strategies for vaccination against coccidiosis[J]. Avian Diseases, 2000, 44(2): 379-389.
- [5] Okamura H, Tsutsi H, Komatsi T, *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells[J]. Nature, 1995, 378(6552): 88-91.
- [6] Kaiser P. Turkey and chicken interleukin-18 (IL-18) share high sequence identity, but have different polyadenylation sites in their 3'UTR [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2002, 26(8): 681-687.
- [7] Hancock R E W, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences[J]. Trends in Microbiology, 2000, 8(9): 402-410.
- [8] Travis S M, Anderson N N, Forsyth W R, *et al.* Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides[J]. Infect Immun, 2000, 68(5): 2748-2755.
- [9] Lehrer R I, Ganz T. Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides[J]. Current Opinion in Hematology, 2002, 9(1): 18-22.
- [10] Yeaman M R, Yount N Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance[J]. Pharmacol Rev, 2003, 55(1): 27-55.
- [11] Garcia J R, Krause A, Schulz S, *et al.* Human  $\beta$ -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity [J]. FASEB J, 2001, 15(10): 1819-1821.
- [12] Shamova O, Brogden K, Zhou C, *et al.* Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes[J]. Infect Immun, 1999, 67(8): 4106-4111.
- [13] 邹黎黎, 罗永煌, 郝娟, 等. 暹罗鳄外周血白细胞提取物抗菌活性的初步研究[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(4): 1-6.
- [14] 安春菊, 石明, 郝友进, 等. 家蝇幼虫抗菌相关蛋白多肽的诱导和抗菌活性分析[J]. 昆虫学报, 2003, 46(5): 545-548.
- [15] 盛长忠, 耿华, 叶玲玲, 等. 家蝇蛹血淋巴抗菌活性的诱导及相关蛋白/多肽的表达规律[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2002, 35(1): 7-11.
- [16] 彭蓉, 杨忠, 刘凯于, 等. 鳞翅目昆虫细胞抗菌肽的诱导、筛选及抗菌活性的研究[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2006, 40(2): 240-243.