

周帮会, 翟向和, 陈 斌, 等. 奶牛发生胎衣不下的胎盘免疫学及中药防治机理[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 181-183.

奶牛发生胎衣不下的胎盘免疫学及中药防治机理

周帮会¹, 翟向和¹, 陈 斌², 姜国均¹

(1. 河北农业大学中兽医学院, 河北定州 071000; 2. 河北省石家庄市动物园, 河北石家庄 050081)

摘要:为探讨奶牛发生胎衣不下的胎盘免疫学及中药防治机理, 本试验采用益母生化散对奶牛胎衣不下进行治疗, 应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测奶牛胎盘组织中 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 和 IL-10 等 Th1/Th2 的含量变化。结果发现, 奶牛胎衣不下的发生与胎盘组织中 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 和 IL-10 等 Th1/Th2 细胞因子含量变化关系密切。结果表明, 胎盘组织中 Th1/Th2 细胞因子含量失衡是导致奶牛发生胎衣不下的因素之一, 传统中药方剂益母生化散对奶牛胎衣不下有较好的预防和治疗作用, 其机理与益母生化散具有调节胎盘组织中 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 和 IL-10 等 Th1/Th2 细胞因子分泌作用有关。

关键词:奶牛; 胎衣不下; 胎盘免疫学; 中药防治; 益母生化散

中图分类号: S858.237.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0181-02

奶牛胎衣不下是指奶牛产后 12 h 胎衣还未全部排出^[1], 这是奶牛常见的产科疾病之一, 发病率高达 10%~25%, 其中大多数因继发子宫内膜炎造成产后发情延迟、暂时性或永久性不孕, 并更容易继发乳房炎, 严重降低奶牛的生产性能^[2]。胎盘是尿膜绒毛膜及子宫黏膜发生联系所形成的构造, 它虽然只是一个暂时性器官, 但它可通过胎盘屏障作用有效执行新陈代谢、物质交换以及内分泌和免疫等重要功能, 胎盘内含大量单核细胞, 滋养层细胞本身可合成细胞因子。有研究表明, 奶牛疾病不但与血液细胞因子含量有密切联系^[3], 还与胎盘组织中激素水平紧密相关^[4], 但对胎盘组织局部的免疫细胞因子水平与胎衣不下发生的相关性少见报道。益母生化散是临床上防治胎衣不下的经典方剂, 本研究结果对揭示胎衣不下发生的免疫学机理及中药防治机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验奶牛由河北农业大学附属奶牛场提供, 在正常饲养条件下常规饲养, 不使用其他药物。

1.2 动物分组及处理

将试验奶牛分为 4 组: 健康对照组, 随机选择 1~4 胎龄健康黑白花奶牛 10 头; 中药预防组, 选择 1~4 胎龄产后健康黑白花奶牛 17 头, 产后立即灌服益母生化散 250 g; 胎衣不下组, 选择 1~4 胎龄产后胎衣不下奶牛 10 头; 中药治疗组, 选择 1~4 胎龄产后胎衣不下奶牛 26 头, 产犊后 12 h 灌服益母生化散 500 g。对胎衣不下组奶牛确诊后手术剥离滞留在子宫内的胎衣, 选取 10 个剥离的新鲜子叶; 其余各组采集 10 个

自然脱离子宫的新鲜干净子叶。将采集的子叶密封于 -20℃ 冰箱中冷冻保存。

1.3 试验仪器与试剂

IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 和 IL-10 酶联免疫分析试剂盒, 美国 ADL 公司生产; 益母生化散, 由河北省保定冀中药业有限公司提供; 680 型酶标仪, 美国伯乐公司生产; MIKRO 22R 台式冷冻离心机, 德国 Hettich 公司生产。

1.4 试验方法

1.4.1 奶牛产后胎衣不下发生及受孕情况的观察 观察奶牛胎衣不下的发生率, 记录胎衣排出时间、恶露排尽时间和受孕率等。

1.4.2 胎盘组织中细胞因子的检测 将冷冻保存的子叶充分研磨成匀浆, 取 5 mL 匀浆以 10 000 r/min 低温冷冻离心 3 min, 取上清液按照试剂盒说明书检测 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 和 IL-10 的含量。

1.5 数据处理

试验数据使用 Excel 2007 和 SPSS 18.0 软件进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 对奶牛产后胎衣不下发生及受孕情况的影响

由表 1 可知, 健康对照组奶牛分娩后恶露排出和产后受孕情况均良好, 中药预防组、胎衣不下组发病率极显著高于健康对照组($P < 0.01$); 中药治疗组受孕率极显著高于胎衣不下组($P < 0.01$)。说明益母生化散对奶牛胎衣不下有较好的预防和治疗作用。

2.2 对奶牛胎盘组织中 Th1 细胞因子含量的影响

由表 2 可知, 中药预防组奶牛胎盘组织中 IL-2 的含量与健康对照组差异不显著($P > 0.05$), 中药治疗组极显著高于健康对照组和中药预防组($P < 0.01$), 胎衣不下组极显著高于其他 3 组($P < 0.01$)。中药预防组奶牛胎盘组织中 TNF- α 的含量显著低于健康对照组($P < 0.05$), 中药治疗组与中药预防组、健康对照组差异不显著($P > 0.05$), 胎衣不下组极显著高于其他 3 组($P < 0.01$)。中药预防组奶牛胎盘组织中

收稿日期: 2013-03-27

基金项目: 河北省自然科学基金(编号: C20100000659)。

作者简介: 周帮会(1970—), 女, 重庆人, 硕士, 副教授, 主要从事中药防治畜禽疾病的研究。E-mail: zhoubanghue@sohu.com。

通信作者: 姜国均, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药药理及生殖免疫学研究。E-mail: jgj857@sohu.com。

表 1 奶牛产后胎衣不下发生及受孕情况观察结果

组别	样本数 (头)	胎衣不下 发病率(%)	产后 90 d 的 受孕数(头)	产后 90 d 的 受孕率(%)
健康对照组	10	0C	10	100.00A
中药预防组	17	7.41B	17	100.00A
胎衣不下组	10	100.00A	3	30.00C
中药治疗组	26	100.00A	20	76.92B

注:同列数据后标有不同小写、大写字母者表示差异显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)。下表同。

IFN- γ 的含量和中药治疗组间差异不显著($P > 0.05$),中药预防组显著低于健康对照组($P < 0.05$),胎衣不下组极显著高于其他 3 组($P < 0.01$)。

表 2 奶牛胎盘中 Th1 细胞因子的含量变化

组别	样本数 (个)	Th1 细胞因子含量(pg/mL)		
		IL-2	TNF- α	IFN- γ
健康对照组	10	8.08 \pm 0.39Cc	3.12 \pm 0.27Bb	3.82 \pm 0.17Bb
中药预防组	10	8.81 \pm 0.70Cc	2.66 \pm 0.26Bc	3.52 \pm 0.09Bc
中药治疗组	10	10.15 \pm 0.82Bb	2.82 \pm 0.56Bbc	3.59 \pm 0.11Bc
胎衣不下组	10	16.68 \pm 1.36Aa	4.74 \pm 0.65Aa	4.33 \pm 0.35Aa

2.3 对奶牛胎盘组织中 Th2 细胞因子含量的影响

由表 3 可知,中药预防组奶牛胎盘组织中 IL-4 的含量与健康对照组差异不显著($P > 0.05$),中药治疗组显著低于健康对照组($P < 0.05$),胎衣不下组极显著低于其他 3 组($P < 0.01$)。中药预防组奶牛胎盘组织中 IL-10 的含量与健康对照组差异不显著($P > 0.05$),胎衣不下组与中药治疗组差异不显著($P > 0.05$),但极显著低于中药预防组与健康对照组($P < 0.01$)。

表 3 奶牛胎盘中 Th2 细胞因子的含量变化

组别	样本数 (个)	Th2 细胞因子含量(pg/mL)	
		IL-4	IL-10
健康对照组	10	10.08 \pm 1.2Aa	7.10 \pm 0.96Aa
中药预防组	10	10.56 \pm 0.81Aa	7.45 \pm 0.61Aa
中药治疗组	10	8.88 \pm 0.84Ab	6.57 \pm 0.37Bb
胎衣不下组	10	5.06 \pm 1.45B	6.27 \pm 0.48Bb

3 结论与讨论

3.1 Th1/Th2 细胞因子对胎衣不下的影响

胎儿胎盘是一种特殊的、功能复杂的免疫器官,含有多种具有免疫功能的细胞,胎盘滋养层细胞、蜕膜细胞及单核巨噬细胞等能分泌 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 和 IL-10 等 Th1/Th2 细胞因子,这些不同种类的细胞因子相互作用,构成母胎界面免疫微环境的复杂细胞因子网络^[5-6]。整个产程就是胎盘绒毛膜的滋养层细胞和基质细胞凋亡萎缩的过程^[7],母体机体中的 Th1/Th2 细胞因子相互协调才能顺利分娩和排出胎衣。当这 Th1/Th2 细胞因子失去平衡时,就会导致胎盘滋养层细胞和基质细胞等凋亡速度异常,出现胎衣不下等问题。

IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 等 Th1 细胞因子水平升高,子宫中免疫抑制解除,利于胎儿娩出,但 Th1 细胞因子过高又会

引起母子胎盘界面间的炎性反应,阻碍胎衣的排出。感染、营养缺乏、应激或遗传因素均可引起胎盘滋养层细胞凋亡率增高,导致胎盘组织激素合成能力降低,导致 Th1 细胞因子分泌量增加^[8]。有资料证实,胎衣不下的奶牛血液中雌激素含量显著低于正常奶牛^[9],雌激素能够有效抑制胎盘组织 Th1 细胞因子的产生^[10]。这些研究表明,Th1 细胞因子含量升高导致胎盘组织中雌激素分泌量降低,而雌激素含量降低又会增加 Th1 细胞因子的分泌量,最终通过这种反馈效应促使胎盘组织细胞凋亡率增高、炎性反应加重,从而阻碍胎衣正常排出。笔者发现,胎衣不下组胎盘中 IL-2、IFN- γ 等 Th1 细胞因子含量极显著高于健康对照组($P < 0.01$),与以上观点一致,进一步证实机体 Th1 细胞因子含量升高是导致胎衣不下的重要因素之一。

Th2 细胞因子主要有 IL-4、IL-10 等,IL-4 可调节胎盘生长,并在感染初期发挥抗早产作用,在体外可抑制 NK 样细胞的细胞毒性。IL-4 主要作用是维持妊娠,在发动分娩时,其胎盘组织中含量会降低。一方面 IL-4 含量降低有利于产后胎衣排出,另一方面 IL-4 有较强的抗炎作用,能对抗 Th1 细胞因子所导致的炎性反应。所以,IL-4 含量过度升高或过度降低均不利于胎衣排出。本试验发现,中药预防组奶牛胎盘组织中 IL-4 的含量与健康对照组差异不显著($P > 0.05$),中药治疗组显著低于健康对照组($P < 0.05$),胎衣不下组极显著低于其他 3 组($P < 0.01$)。中药预防组奶牛胎盘组织中 IL-10 的含量与健康对照组差异不显著($P > 0.05$),胎衣不下组与中药治疗组差异不显著($P > 0.05$),但极显著低于中药预防组与健康对照组($P < 0.01$)。试验结果表明,胎盘组织中 Th2 细胞因子 IL-4、IL-10 含量过度降低,是奶牛发生胎衣不下的因素之一。

3.2 益母生化散对胎衣不下奶牛细胞因子含量的影响

益母生化散由益母草、当归、川芎、桃仁、干姜(炮)、甘草(炙)等组成,每一单味中药均含有多种有效成分,比如益母草含有益母草碱、益母草定、益母草宁等多种生物碱;当归含有当归多糖、归酮等物质。目前关于益母生化散对细胞因子的影响的研究较少^[11-12],多集中在中药单体成分的研究上,同一中药不同成分对免疫有不同影响,方剂虽然由单味中药组成,但其作用并不是单味中药对细胞因子影响的简单相加。本试验发现,益母生化散对健康奶牛 IL-2、IL-4、IL-10 等细胞因子没有显著影响($P > 0.05$),但对胎衣不下奶牛影响较显著,中药治疗组 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 均与胎衣不下组差异极显著($P < 0.01$)。细胞因子通过调节机体的生殖免疫状态,从而影响奶牛内分泌的作用是极其复杂的,同时也证实中药方剂对调节机体免疫作用的复杂性。但总的来看,益母生化散对奶牛胎衣不下有较好的预防和治疗作用,其作用机理是促使胎盘 Th1/Th2 细胞因子趋于平衡,从而达到正常水平。

胎盘组织中 Th1/Th2 细胞因子含量失衡是导致奶牛发生胎衣不下的因素之一,其中 Th1 细胞因子含量升高起主导作用。益母生化散对奶牛胎衣不下有较好的预防和治疗作用,其机理与益母生化散具有调节胎盘组织中 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 和 IL-10 等 Th1/Th2 细胞因子分泌作用有关。

乔海博,谷新利,朱晓庆,等.复方中药多糖不同给药途径对鸡淋巴细胞转化率的影响[J].江苏农业科学,2013,41(10):183-185.

复方中药多糖不同给药途径对鸡淋巴细胞转化率的影响

乔海博,谷新利,朱晓庆,李效振,张东升,贾书红

(石河子大学动物科技学院,新疆石河子 832003)

摘要:将中药复方多糖制成口服剂和针剂,对鸡进行灌胃和注射给药,采用 MTT 比色法计算淋巴细胞转化率,探讨不同给药途径、不同药物浓度对细胞免疫的影响。结果表明:不同剂型、不同剂量的最佳纯度复方中药多糖均可显著提高淋巴细胞转化功能;在同剂型下均以中剂量效果最好;在不同剂型下以针剂中剂量见效最快,以口服中剂量药效最长。

关键词:复方中药多糖;口服剂;针剂;淋巴细胞;鸡

中图分类号: S858.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0183-03

在体外培养的正常机体淋巴细胞,在受到非特异性有丝分裂原(如 PHA、ConA)或特异性抗原刺激后,细胞代谢及其形态可发生一系列变化,主要表现为电荷改变、细胞内蛋白质和核酸合成增加、细胞形态的转化。因此在体外利用各种刺激剂激发淋巴细胞,根据其转化程度可测定淋巴细胞的应答功能,以此作为测定机体细胞免疫功能的指标^[1-2]。

近年来,研究者发现左旋咪唑和中药多糖都具有增强机体免疫功能的效果,特别是由于多糖为非细胞毒性物质^[3]而成为研究热点,其中又以对黄芪多糖^[4-5]的研究最深入,而对复方中药多糖的研究较少。中药的精髓是复方,很少以单味成药。本研究将已分离纯化到一定纯度的中药复方多糖^[6]制成口服剂和针剂,对鸡进行灌胃和注射给药,采用 MTT 比色法^[7]计算淋巴细胞转化率^[8],探讨不同给药途径、不同药物浓度对细胞免疫的影响,以期将中药多糖活性成分开发

成免疫增强剂提供理论依据,为其临床用药奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验药物 中药复方原料:党参、山楂、熟地、川芎、何首乌、当归等 11 味中药(新疆石河子市医药公司)。

最佳纯度复方中药多糖^[9]由石河子大学化学化工学院提供,含糖量 77.10%。用蒸馏水分别将其配制成高(50 mg/mL)、中(25 mg/mL)、低(12.5 mg/mL)剂量浓度。

黄芪多糖由石河子大学化学化工学院提供,含糖量 29.42%。用蒸馏水将其配制成 25 mg/mL 剂量浓度。

1.1.2 其他试剂及器材 盐酸左旋咪唑片(25 mg×100 片,批号 100608,杭州萧山兴农兽药制造有限公司);鸡淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司);RPMI-1640 培养基(GIBCO 公司);胎牛血清(GIBCO 公司);刀豆蛋白(ConA)、脂多糖(LPS)、二甲基偶氮唑蓝(MTT)(Sigma 公司);Synergy2 多功能酶标仪(Synergy2 Multi-Mode Microplate Reader)等。

1.1.3 试验动物 600 羽 1 日龄麻花鸡(新疆石河子市养鸡场)经临床检测合格后,按常规肉鸡饲养方式进行饲养,自由

收稿日期:2013-04-01

基金项目:国家自然科学基金(编号:30960291)。

作者简介:乔海博(1984—),男,河南孟津人,硕士研究生,研究方向为中草药开发与利用。E-mail:harborjoe@163.com。

通信作者:谷新利,教授,博士生导师,从事中草药开发与利用研究。

E-mail:xlgu@shzu.edu.cn。

参考文献:

- [1] 韩建滨,侯小露,张宇,等.奶牛胎衣不下与部分氧化和抗氧化指标变化的关系研究[J].广西畜牧兽医,2012,28(3):134-136.
- [2] 周帮会,王凤霞.奶牛胎衣不下发病机理研究进展[J].动物医学进展,2008,29(6):83-86.
- [3] 冯士彬,张磊,李志明,等.乳房炎奶牛血液流变学指标及细胞因子的变化[J].中国兽医学报,2011,31(5):730-733,739.
- [4] 周帮会,刘荣欣,姜国均,等.“益母生化散”对胎衣不下奶牛胎盘激素含量的影响[J].中国兽医学报,2010,30(7):988-991.
- [5] Dudley D J, Trautman M S, Mitchell M D. Inflammatory mediators regulate interleukin-8 production by cultured gestational tissues: evidence for a cytokine network at the chorio-decidual interface[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1993, 76(2): 404-410.
- [6] Szekeres-Bartho J, Wegmann T G. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance[J]. Journal of Reproductive Immunology, 1996, 31(1/2):81-95.
- [7] 王爱华,闫华.自然流产时蜕膜、绒毛组织中 TNF- α 和 IL-10 的水平研究[J].承德医学院学报,2002,19(3):189-192.
- [8] 吴琦嫦,陈美波. p53, bcl-2 和 bax 基因表达与 IUGR 胎盘细胞凋亡的相关性研究[J].现代妇产科进展,2000,9(4):265-267.
- [9] 刘智喜,李权武,武浩,等.奶牛分娩前后血浆类固醇激素水平变化与胎衣不下的关系[J].核农学报,1994,8(3):172-176.
- [10] Laird S M, Tuckeman E M, Saravelos H, et al. The production of tumour necrosis factor α (TNF- α) by human endometrial cells in culture[J]. Human Reproduction, 1996, 11(6):1318-1323.
- [11] 吕建存,刘荣欣.四君子散与益母生化散对围产期奶牛血浆 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 的影响[J].中国兽医杂志,2011,47(6):45-47.
- [12] 吕建存,安胜英,王凤霞.中药对围产期奶牛血浆 IL-2、IL-6 含量的影响[J].畜牧与兽医,2010,42(6):79-81.