

刘俊峰,郭雪峰.甘草皂苷对卡拉库尔羊血液中免疫球蛋白 IgA 和 IgG 的影响[J].江苏农业科学,2014,42(1):172-174.

甘草皂苷对卡拉库尔羊血液中免疫球蛋白 IgA 和 IgG 的影响

刘俊峰,郭雪峰

(新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室/新疆塔里木大学动物科学学院,新疆阿拉尔 843300)

摘要:为了研究甘草皂苷对卡拉库尔羊血液中免疫球蛋白 IgA 和 IgG 的影响,探讨甘草皂苷的免疫学效应。选取健康的卡拉库尔羊 6 只,随机分为 2 组,每组 3 只,平均体重为 18.65 kg/只。饲养的第 15、第 30、第 45 天采集血液并分离血清,采用酶联免疫吸附法检测卡拉库尔羊血清中免疫球蛋白 IgA、IgG 的水平。结果显示:第 15、第 30、第 45 天的 IgA 试验组含量分别为 84.75、93.16、86.31 $\mu\text{g/mL}$,对照组含量分别为 43.13、42.57、32.63 $\mu\text{g/mL}$,且试验组显著高于对照组 ($P < 0.05$);IgG 试验组的含量分别为 87.99、83.00、76.29 $\mu\text{g/mL}$,对照组的含量分别为 46.05、43.57、41.55 $\mu\text{g/mL}$,且试验组显著高于对照组 ($P < 0.05$)。说明甘草皂苷可显著提高卡拉库尔羊血液中免疫球蛋白 IgA、IgG 的含量。

关键词:甘草皂苷;卡拉库尔羊;血液;IgA;IgG

中图分类号: S858.262.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0172-02

甘草皂苷别称甘草酸,是甘草的主要成分之一^[1],具有甜味(即甘草甜素),它属于三萜类皂苷,为次生代谢产物。由于它的水溶液容易引起肥皂样持久性泡沫,因此称之为皂苷。随着免疫学的迅速发展,对中草药添加剂的免疫药理研究也取得了较快的发展。国内外许多科学家对中草药添加剂在人、畜疾病上的免疫,尤其是与免疫有关的疾病防治进行了大量的科学研究。例如,苜蓿素是一种苜蓿提取物,能增强免疫系统功能,相对减少了营养的沉积量^[2];黄芪皂苷能提高和促进调节机体免疫功能。另外,还有一些关于皂苷对人的免疫及其他应用的研究,如高血脂病人应用甘草甜素后,血浆免疫球蛋白 IgG、IgA 及补体 C3 含量均显著降低,其作用主要为免疫增强、免疫调节和免疫抑制 3 种。皂苷成分类型多样,结构复杂,性质不稳。

20 世纪 80 年代,日本学者首次用试验证明,甘草甜素可抑制 HIV 增殖,并具有免疫激活作用^[3]。张炳文等发现三七皂苷具有抗肝纤维化作用^[4]。甘草皂苷主要具有增强巨噬细胞和细胞免疫的功能,但对体液免疫功能有抑制作用。甘草提取物抑制抗体的作用已经有不少报道,以羊的红细胞作为抗原免疫动物,其注射后不久,受抑制反应就会明显,而抑制程度与甘草提取物的剂量有关;甘草皂苷也可以促进羔羊生长,提高绵羊产毛量和产奶量;对绵羊疾病防治都有过研究,其效果也相对突出。本研究对卡拉库尔羊饲喂添加甘草皂苷的日粮,采集卡拉库尔羊血液并分离血清,测定免疫指

标,旨在确定甘草皂苷对卡拉库尔羊血液 IgA 和 IgG 的影响,为开发以甘草皂苷为主要成分的饲料添加剂提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 甘草皂苷的检验

1.1.1 甘草的采集与前处理 甘草于 2012 年 3 月在新疆阿克苏阿拉尔市十二团随机采集,将采集回来的甘草切成 1~2 cm 的小段,晒至半干,再放于 50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中烘干,再将样品放入精密粉碎机(xf-96b)中进行粉碎,重复 2 次,得到样本,采用新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室已经建立的提取方法提取甘草皂苷。

1.1.2 皂苷的检测

1.1.2.1 泡沫试验 取检品的水溶液 2 mL 于带塞试管中,用力振摇 3 min,即产生持久性蜂窝状泡沫(维持 10 min 以上),且泡沫量不少于液体体积的 1/3。

1.1.2.2 醋酐浓硫酸试验 取样品水溶液并置于平皿中,于水浴上蒸干,残渣加入少量冰醋酸使其溶解,再加入醋酐浓硫酸(19:1)试液,呈现红紫色并变成绿色。

1.1.2.3 比色法^[5] 准确吸取标准品溶液,置于具塞试管中,水浴挥干溶剂,加入一定量的 5% 香草醛-冰醋酸溶液,再加入定量的高氯酸,摇匀,于水浴中加热,立即取出用流水冷却至室温,加入冰醋酸稀释,摇匀,以不加标准品的样品管为空白,于 400~700 nm 波长处进行扫描,香草醛高氯酸试剂在 589 nm 处有最大吸收峰,精密度高,加样回收率 99.23%。

1.2 卡拉库尔羊免疫球蛋白 IgA、IgG 的检测

1.2.1 试验动物的饲养管理 选取健康的卡拉库尔羊 6 只,随机分为 2 组,每组 3 只,平均体重为 18.65 kg/只。试验所用基础日粮参照我国苏尼特羊营养标准^[6-7]配制,精粮组成为:玉米 68.53%,麸皮 3.08%,胡麻饼 20.09%,预混料 8.04%,食盐 0.27%;营养水平为:消化能 8.41 MJ/kg,粗蛋白 11%,钙 4.96%,磷 2.93%。精粗比为 30:70,精料

收稿日期:2013-05-31

基金项目:新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室课题(编号:HS201106);新疆生产建设兵团博士基金(编号:2009JC08)。

作者简介:刘俊峰(1980—),男,内蒙古乌兰察布人,硕士,讲师,从事兽医药理与免疫药理学研究。E-mail:liujunfeng423@163.com。

通信作者:郭雪峰,博士,副教授,从事反刍动物营养与饲料添加剂研究。E-mail:guoxuefeng807@163.com。

0.30 kg/(只·d),粗料为棉籽壳 0.26 kg/(只·d)及青贮 0.44 kg/(只·d)。甘草皂苷在日粮中的添加量为 150 mg/kg,甘草皂苷由新疆阿拉尔新农甘草产业有限责任公司按照试验要求提供,经检验符合试验标准。

1.2.2 采血及血液处理 静脉采血 5 mL,注入真空采血管,3 000 r/min 离心 10 min,取上清 4 ℃ 冷藏待测。

1.2.3 IgA、IgG 检测 确定标准品中 IgA 的浓度梯度为 160、80、40、20、10、5 μg/mL,IgG 的浓度梯度则为 64、32、16、8、4、2 μg/mL。由标准品稀释 5 倍得到样品稀释液,用稀释液浓度和 D 值共同绘制标准曲线。根据 ELISA 检测试剂盒说明书,检测卡拉库尔羊血清样品中 IgA、IgG 的含量。

1.3 数据处理

试验结果用“平均值±标准差”表示,数据统计分析采用 SPSS 17.0 软件中的平衡试验设计方差分析过程(ANOVA),均值的多重比较采用 Duncan’s 法进行,同时绘制标准曲线。

2 结果与分析

2.1 甘草皂苷提取结果检测

由泡沫试验、醋酐浓硫酸试验、比色法证明试验所的甘草提取物为甘草皂苷。

2.2 甘草皂苷对卡拉库尔羊 IgA 含量的影响

2.2.1 IgA 含量的拟合方程 根据试剂盒说明书,利用紫外分光光度计,在波长 450 nm、光径 1 cm 下,蒸馏水调零,测定标品吸光度(x),拟合方程为 $y = 0.051\ 1x + 0.195\ 2$ ($r^2 = 0.994\ 7$),其中 y 为样品 IgA 的含量,在 0.05 水平显著,该方程符合试剂盒要求,可以以此为标准计算样品中 IgA 含量。

2.2.2 皂苷对 IgA 含量影响 IgA 为血清中的免疫球蛋白^[7],约占 20%,结构有多体形态,免疫功能分为血清型和分泌型,缺乏会导致体液免疫降低。有研究表明,马的血液中 IgA 含量为 27.5 ~ 120 μg/mL,绵羊的正常 IgA 含量范围为 10 ~ 150 μg/mL,而人的正常范围在 0 ~ 3 900 μg/mL。本试验测得卡拉库尔羊血液中 IgA 的含量在 32 ~ 94 μg/mL 范围内,与其他动物结果一致,说明本试验结果属于正常范围。由表 1 看出,在第 15、第 30、第 45 天测得试验组卡拉库尔羊血液中 IgA 含量均显著大于对照组($P < 0.05$)。说明甘草皂苷能显著提高卡拉库尔羊血液中免疫球蛋白 IgA 含量。

表 1 添加甘草皂苷对卡拉库尔羊血清中 IgA 的影响

组别	各试验期血清中 IgA 含量(μg/mL)			
	第 15 天	第 30 天	第 45 天	平均值
对照组	43.23 ± 28.92a	42.57 ± 32.93a	32.63 ± 32.04a	39.47 ± 31.29a
试验组	84.75 ± 21.10b	93.16 ± 22.47b	86.31 ± 9.31b	88.07 ± 17.63b

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

2.3 甘草皂苷对卡拉库尔羊 IgG 含量的影响

2.3.1 IgG 含量的拟合方程 根据试剂盒说明书拟合本试验 IgG 回归方程,放入紫外分光光度计,在波长 450 nm、光径 1 cm 下,蒸馏水调零,测定标品吸光度(x),拟合方程为 $y = 0.019\ 9x + 0.232\ 7$ ($r^2 = 0.992\ 8$),其中 y 为样品 IgG 的含量,在 0.05 水平显著,该方程符合试剂盒要求,可以此为标准计算样品中 IgG 含量。

2.3.2 甘草皂苷对卡拉库尔羊血清中 IgG 含量的影响 IgG 是血清中的免疫球蛋白,是血清的主要抗体成分,约占血清的

50%,其半寿命期为 10.6 ~ 14.5 d,在机体免疫中起保护作用,大多具有抗菌、抗病毒等感染性疾病的作用。有研究表明,兔子的血液中 IgG 含量为 17.5 ~ 800.0 μg/mL;小鼠血液中的 IgG 含量为 12.5 ~ 40.0 μg/mL。本试验测得卡拉库尔羊血液中 IgG 含量在 41 ~ 87 μg/mL 之间,在报道的绵羊正常范围(17 ~ 120 μg/mL)之内。由表 2 可知,第 15、第 30、第 45 天所测得的试验组卡拉库尔羊血清中 IgG 含量均大于对照组,且差异显著($P < 0.05$)。说明本试验在饲料中添加甘草皂苷能使卡拉库尔羊的血液中 IgG 含量明显升高。

表 2 添加甘草皂苷对卡拉库尔羊血清中 IgG 含量的影响

组别	血清中 IgG 含量(μg/mL)			
	第 15 天	第 30 天	第 45 天	平均值
对照组	46.05 ± 13.18a	43.57 ± 6.68a	41.55 ± 9.28a	43.72 ± 9.71a
试验组	87.99 ± 21.75b	83.00 ± 19.80b	76.29 ± 15.60b	82.43 ± 19.05b

3 结论

甘草皂苷具有非特异性免疫调节作用,经研究发现,甘草皂苷能显著提高小鼠对静脉碳粒的廓清指数,说明其不仅具有增强网状内皮系统的活性,同时具有非特异性免疫加强的作用,主要增强了细胞的免疫作用^[8],可选择性地增强辅助性 T 细胞的增殖能力和活性,使 CD4 细胞增加、CD8 细胞减少及胸腺外 T 淋巴细胞分化,对 γ-干扰素产生诱发作用和 NK 细胞活化作用。但由于甘草皂苷同时具有类固醇作用,因而不能简单地把它归为免疫抑制剂,实际上它可能是具有双向作用的免疫调节剂。本试验在饲料中添加甘草皂苷

150 mg/kg 饲喂卡拉库尔羊,能提高血液中的 IgA、IgG 含量,说明甘草皂苷能提高卡拉库尔羊的免疫水平。因此,可进一步开展关于饲料添加剂应用的研究,以提供更多的基础试验数据。

参考文献:

[1]叶 静,肖美添,汤须崇,等. HPLC-ELSD 法测定甘草中 3 种甘草皂苷的含量[J]. 广东药学院学报,2009,25(4):368-369.
[2]杨江涛,董晓芳,佟建明,等. 苜蓿素多糖、黄酮和皂苷对小鼠巨噬细胞防御素基因表达的影响[J]. 畜牧兽医学报,2010,41(5):608-614.

程培培, 杨亚军, 刘希望, 等. 新型复方氟苯尼考注射液的安全性评价[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 174-176.

新型复方氟苯尼考注射液的安全性评价

程培培^{1,2}, 杨亚军¹, 刘希望¹, 李剑勇^{1,2}

(1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所/农业部兽用药物创制重点实验室/甘肃省新药工程重点实验室, 甘肃兰州 730050;

2. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州 730070)

摘要:按照 2010 版《中国兽药典》和《兽药及添加剂安全性毒理学评价程序》的要求, 对新型复方氟苯尼考注射液进行安全性评价, 相应进行了热原检查、注射途径 LD₅₀测定、皮肤刺激试验和肌肉刺激试验等。结果表明: 新型复方氟苯尼考注射液制剂热原检查符合药典规定; 腹腔注射对小鼠的 LD₅₀ 为 1 888.73 mg/kg, 95% 可信限为 1 575.90 ~ 2 263.65 mg/kg; 该注射液对皮肤有轻度刺激性; 对股四头肌有轻微刺激, 但在给药后 7 d 可以完全恢复。说明新型复方氟苯尼考注射液安全可靠, 可应用于兽医临床。

关键词:新型复方氟苯尼考注射液; 热原检查; LD₅₀; 皮肤刺激; 肌肉刺激; 安全性评价

中图分类号: S859.79+6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0174-03

猪、牛呼吸系统感染性疾病的发病率高, 病原微生物多种多样, 血清型复杂, 疫苗的交叉保护力较差, 在这类疾病治疗过程中, 药物防治发挥着巨大的作用^[1-3]。

新型复方氟苯尼考注射液是由抗菌药物氟苯尼考和抗炎药物氟尼辛葡甲胺以及辅料等成分组成, 用于皮下注射和肌肉注射。氟苯尼考是动物专用的广谱抗生素, 克服了氯霉素引起骨髓抑制和再生障碍性贫血的缺点, 且抗菌活性优于同类的氯霉素、甲砒霉素等, 广泛应用于畜禽和水产细菌性疾病^[4], 如由多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*)、溶血性巴氏杆菌 (*Pasteurella hemolytica*)、昏睡嗜血杆菌 (*Haemophilus somnus*) 等引起的牛呼吸系统疾病、由猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*)、多杀性巴氏杆菌、胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、支气管败血波氏杆菌 (*Bordetella bronchiseptica*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 等引起的猪呼吸系统疾病、禽大肠杆菌病和霍乱等防控。氟尼辛葡甲胺是一种非选择性的非甾体抗炎药^[5], 通过抑制花生四烯酸环氧合酶途径, 阻止前列腺素的合成, 起到抗炎、镇

痛、退热的作用, 该药已被《英国兽药典》2001 版、《美国药典》2002 版^[6]和《中国兽药典》2010 版收录, 被批准用于肉牛、奶牛、马的内毒素血症引起的炎症, 控制呼吸系统疾病伴随的发热症状和急性牛乳房炎^[7]。已有的相关研究表明, 氟尼辛葡甲胺和抗菌药物联用治疗牛、猪呼吸系统疾病效果良好^[8-9]。

依据抗菌、抗炎的原则和长效、缓释的目的, 研制出新型复方氟苯尼考注射液, 用于治疗猪、牛呼吸系统原发或继发细菌和支原体感染, 具有很好的抗菌和抗炎作用。为了将复方氟苯尼考注射液制剂合理、安全的应用于临床并提供理论依据, 依据 2010 版《中国兽药典(一部)》对注射剂要求^[10]和《兽药及添加剂安全性毒理学评价程序》^[11]对该注射液进行了安全性评价, 包括热原检查、注射途径 LD₅₀测定、皮肤刺激试验和肌肉刺激试验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品 新型复方氟苯尼考注射液(批号: F20120730, 氟苯尼考含量为 30%, 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所); 空白溶剂(批号: 20120913, 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所); 0.9% 氯化钠注射液(批号: 1210032B, 安徽双鹤药业有限责任公司)。

1.1.2 试验动物 日本大耳白兔, 雌雄各半, 体重 2.0 ~ 3.0 kg, 购自中国农业科学院兰州兽医研究所, 许可证号: SCXK(甘)2012-0001; 昆明小鼠, 雌雄各半, 体重 18 ~ 22 g, 购自兰州大学实验动物中心, 许可证号: SCXK(甘)2009-0004。

51-53.

[7] Greene D M, Bondy G S, Azcona - Olivera J I, et al. Role of gender and strain in vomitoxin - induced dysregulation of IgA production and IgA nephropathy in the mouse[J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, 1994, 43(1): 37-50.

[8] Yi H, Nakashima I, Isobe K. Enhancement of nitric oxide production from activated macrophages by glycyrrhizin[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 1996, 24(3/4): 271-278.

收稿日期: 2013-05-09

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(编号: 1610322012005); 国家公益性行业(农业)科研专项(编号: 201303038-4)。

作者简介: 程培培(1987—), 女, 河南洛阳人, 硕士, 主要从事药物筛选研究。E-mail: chengpeipei117@163.com。

通信作者: 李剑勇(1971—), 男, 甘肃秦安人, 博士, 研究员, 主要从事新兽药的研究与开发工作。Tel: (0931)2115290; E-mail: lijy1971@163.com。

[3] 李铁民, 梁再赋. 甘草提取物及其衍生物的抗病毒研究现状[J]. 中草药, 1994, 25(12): 655-658.

[4] 张炯文, 李凤贤, 李辉. 三七皂苷抗肝纤维化作用的现状[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(4): 260-263.

[5] 张中伟, 谢明勇, 王远兴, 等. 比色法测定苦瓜总皂苷[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2005, 29(5): 447-449, 453.

[6] 曹丙蕾. 山羊 IL-18 定量抗原捕获 ELISA 检测方法的建立及其免疫增强作用的研究[D]. 青岛: 山东农业大学, 2010: