

邢玉娟,王建国,陈玉库,等. 中药成分复方及其组分对新城疫疫苗免疫应答的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(22):182-186.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.050

中药成分复方及其组分对新城疫疫苗免疫应答的影响

邢玉娟¹,王建国²,陈玉库¹,胡元亮³,王德云³,蔡丙严¹

(1. 江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300; 2. 山东省威海市环翠区动物疫病预防控制中心,山东威海 264200;

3. 南京农业大学动物医学院,江苏南京 210095)

摘要:将 14 日龄非免疫健康罗曼蛋公鸡 594 羽随机均分为 11 组,1~9 组分别为 OM-APS、OM 和 APS 的高、中、低剂量组,10 组为免疫对照组,11 组为空白对照组。除空白对照组外均用 NDV-IV 系疫苗滴鼻、点眼免疫,28 日龄重复免疫。在首次免疫的同时,1~9 组分别口服高、中、低剂量药物,疫苗对照组和空白对照组口服等量生理盐水,每天 1 次,连续 3 d。分别于 14、21、28、35、42 日龄采血,用 MTT 法测定 T 淋巴细胞增殖的变化,用 β -微量法测定血清抗体效价变化。于 14、21、28、35 日龄,每组随机抽取 4 羽,称体质量,剖杀,摘取法氏囊和脾脏并称体质量,计算免疫器官指数。于 69 日龄用新城疫强毒攻毒,观察保护率。结果表明,OM-APS、OM、APS 的高、中浓度在各时间点均能促进 T 淋巴细胞增殖;OM-APS 高、中浓度在各时间点抗体效价明显高于免疫对照组;OM-APS 的高、中、低浓度在各时间点的脾指数、高、中浓度各时间点的法氏囊指数均明显高于免疫对照组;OM-APS、APS 的高、中、低浓度,OM 中、低浓度的攻毒保护率均高于或明显高于免疫对照组。

关键词:中药成分复方;T 淋巴细胞增殖;新城疫疫苗;免疫应答;抗体效价;免疫器官指数;攻毒保护率

中图分类号: S853.74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)22-0182-05

研究证明,中药作为一种免疫增强剂,具有来源广泛、效果显著、无毒副作用等优势,不仅能克服油乳类、铝胶类化学佐剂副作用大、局部刺激重、致癌、制备和使用麻烦或不能足提高弱抗原的免疫原性等弊病^[1-2],而且能显著增强机体的细胞免疫和体液免疫功能,促进免疫器官的发育和细胞因子

的分泌^[3-4]。

在以前的研究中,笔者首先通过体外试验筛选出 OM、APS 等中药成分,这些成分具有显著抑制 NDV 病毒增殖的作用,然后比较了中药成分复方体外抗 NDV 感染的效果。结果表明,中药成分复方高、中、低浓度能显著抑制 NDV 感染 CEF^[5]。并通过临床试验比较了中药成分复方对雏鸡人工感染新城疫的疗效,结果表明,中药成分复方在攻毒前、攻毒时和攻毒后 3 种给药方式,均能显著降低受试鸡的死亡率,提高血清 NDV 抗体效价,减轻死亡鸡的器官出血^[6]。

本试验在测定了 4 种中药成分及其 4 个复方对鸡脾脏淋巴细胞增殖影响的基础上,进一步测定了中药成分复方及其组分药配合新城疫疫苗免疫后雏鸡外周血 T 淋巴细胞增殖的

收稿日期:2016-10-18

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2008BADB4B06);公益性行业(农业)科研专项(编号:201403051-1-5)。

作者简介:邢玉娟(1964—),女,山东济南人,副教授,主要从事中药药理研究工作。E-mail:1903048595@qq.com。

通信作者:胡元亮,教授,博士生导师,主要从事中兽医学研究。E-mail:ylhu@njau.edu.cn。

展过程中,当代的饲养方式、饲料、选育方法的不同,使得江海型地方猪的各生产性能有所不同。

参考文献:

- [1] 陈斌,赵德明. 中国地方猪种利用现状及展望[J]. 中国畜牧杂志,2006,42(13):40-42.
- [2] 张仲葛,李炳坦,陈效华,等. 中国猪品种志[M]. 上海:上海科学技术出版社出版,1986.
- [3] 方美英,吴常信. 猪品种遗传多样性的研究进展[J]. 畜牧与兽医,2001,33(5):40-42.
- [4] 王林云,王爱国,王立贤,等. 中国畜禽遗传资源志——猪志[M]. 北京:中国农业出版社,2011.
- [5] 陈伟生,徐桂芳,周新民,等. 中国家畜地方品种资源图谱[M]. 北京:中国农业出版社,2004.
- [6] 杜月辉,李月连,李利平,等. 气象因素对畜牧业生产的影响[J]. 当代生态农业,2008(增刊1):19-21.
- [7] 尤翠萍,徐娟. 对畜牧业经济效益产生影响的因素及提升对策

分析[J]. 中国农业信息,2014(19):121-122.

- [8] 王林云. 对中国地方猪遗传资源的再认识[J]. 猪业科学,2012,29(10):120-122.
- [9] 殷方芝,肖耀明,陶军,等. 近年来我国地方猪种遗传资源保护与利用[J]. 猪业科学,2015,32(10):130-131.
- [10] 张光辉. 我国传统养猪经验的分析[J]. 中国农史,1986(4):54-59.
- [11] 薛梅,王金勇,尹春晖,等. 浅谈规模化养殖荣昌种猪的后备猪基础选育[J]. 上海畜牧兽医通讯,2012,(6):50-51.
- [12] 邢军,肖安磊,陈胜,等. 枫泾猪生长发育和早期繁殖性状观测[J]. 青海师范大学学报(自然科学版),2013,29(3):45-50.
- [13] 曹宏发,韩惠华,陈俊芳,等. 米猪[J]. 畜牧与兽医,1988(2):63-65.
- [14] 李玉娥,董红敏,林而达. 气候变化对畜牧业生产的影响[J]. 农业工程学报,1997,13(增刊1):20-23.
- [15] 徐锡良,曲万文. 新世纪初山东省猪育种方向探讨[J]. 养猪,2002(1):9-10.

变化,血清抗体效价的变化,对法氏囊指数、脾指数以及对攻毒保护率的影响,通过各中药组和免疫对照组、空白对照组差异比较的观察,进一步探讨中药成分复方免疫增强的作用机理,为研制中药成分免疫增强剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物准备

根据以前的试验结果^[5-6],分别用双蒸水将 OM、APS 和 OM-APS (OAP) 稀释成高 (4 mg/mL)、中 (2 mg/mL)、低 (1 mg/mL) 3 种浓度,常规消毒后备用。

1.2 疫苗和病毒

新城疫 IV 系 (newcastle disease virus IV strain, NDV-IV) 疫苗,中牧股份南京药械厂生产,批号 753-3。新城疫检测抗原,由南京农业大学动物医学院中兽医研究室提供。新城疫强毒 (newcastle disease virus, NDV) E₀₁ 株,由江苏省农业科学院兽医研究所禽病研究室提供。将病毒按常规方法接种 9 日龄 SPF 鸡胚,恒温培养 72 h,收获尿囊液,按 Reed-Muench 法^[7]测定 EID₅₀ 为 10^{-8.83}。

1.3 主要试剂

RPMI1640 培养液, Gibco 公司产品,按说明书用三蒸水配制后过滤除菌,分装,4℃保存,临用前加入犊牛血清达 5% 和青霉素、链霉素各 100 IU/mL; 植物血凝素 (PHA), 上海伊华科技有限公司产品,用 RPMI1640 培养液配制成 0.1 mg/mL, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,分装后 -20℃保存; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 溶液, Amresco 公司产品,用 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶解,使终浓度为 5.0 mg/mL, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,分装后 4℃冰箱避光保存; 淋巴细胞分离液, 上海恒信化学试剂有限公司产品; 淋巴细胞裂解液, 二甲亚砜 (DMSO), 分析纯, 苏州正兴化工研究院产品。

1.4 试验动物

1 日龄非免疫健康罗曼蛋公鸡 594 羽, 购自汤泉农垦种鸡场。试验期间采用笼养, 全价饲料, 自由采食和饮水, 1~14 日龄采用红外灯保温, 全日制光照。

1.5 试验设计

雏鸡饲养至 14 日龄 (平均体质量 95 g, 平均母源抗体效价 3.3log₂ 时, 随机均分为 11 组 (每组 54 羽)。1~9 组为 OAP 高剂量组 (OAP_H)、OAP 中剂量组 (OAP_M)、OAP 低剂量组 (OAP_L)、OM 高剂量组 (OM_H)、OM 中剂量组 (OM_M)、OM 低剂量组 (OM_L)、APS 高剂量组 (APS_H)、APS 中剂量组 (APS_M) 和 APS 低剂量组 (APS_L), 10 组为疫苗对照组, 11 组为空白对照组。除空白对照组外均用 NDV-IV 系疫苗滴鼻、点眼免疫, 每羽 4 羽份。28 日龄重复免疫。在首次免疫的同时, 3 个中药复方组分别口服高、中、低剂量的 OAP 复方, 每羽 1.0 mL, 6 个单味药对照组分别口服高、中、低剂量的 OM 和 APS, 每羽 1.0 mL, 免疫对照组和空白对照组口服等量生理盐水, 每天 1 次, 连续 3 d。分别于 14、21、28、35、42 日龄, 每组随机抽取 4 羽, 无菌心脏采血 (每羽 4.0 mL), 肝素抗凝, 测定外周血淋巴细胞增殖; 每组随机抽取 10 羽翼静脉采血, 分离血清, 用 β-微量法测定 HI 抗体效价; 在 14、21、28、35 日龄, 每组随机抽取 4 羽, 称质量, 剖杀, 摘取法氏囊和脾脏并称质量, 计算免疫器官指数 (免疫器官质量/体质量 ×

100%) ; 于 69 日龄用新城疫强毒攻毒, 观察保护率。

1.6 淋巴细胞增殖测定方法

采用 MTT 法^[3-4,8]。将抗凝血样 (每羽 4.0 mL) 用 Hank's 液稀释 1 倍, 小心加在淋巴细胞分离液上层, 2 000 r/min 离心 20 min, 吸取中间云雾状白细胞层, 用无血清 RPMI1640 营养液洗 2 遍, 1 500 r/min 离心 15 min。台盼蓝染色, 细胞计数活细胞大于 90% 后, 用 RPMI1640 营养液调整细胞浓度为 2.5 × 10⁶ 个/mL, 加入到 96 孔细胞培养板 (德国 Nunclon 公司生产) 中, 80 μL/孔, 再加 20 μL/孔 PHA, 每个样品重复 4 孔, 然后置于 39.5℃、5% CO₂ 条件下 (CO₂ 培养箱, 美国 Revco 公司产品) 培养 44 h, 取出, 加入 MTT 溶液 20 μL/孔, 继续培养 4 h, 加裂解液 100 μL/孔, 将细胞板置于微量振荡器 (75-2A 型, 上海医用分析仪器厂生产) 上振荡 5 min 使沉淀完全溶解, 在酶联免疫仪 (DG-3022 型, 中国华东电子管厂生产) 上检测 570 nm 处的吸光度 (D_{570 nm}) 作为 T 淋巴细胞增殖的指标。

1.7 抗体效价测定方法

在 96 孔微量血凝板上, 从左到右各加 50 μL/孔 PBS 液, 再向每排的第 1 孔加入 50 μL 待检血清, 依次向后倍比稀释直至第 12 孔, 然后向每孔加入 50 μL 4 个单位抗原, 在微量振荡器上振荡混匀后置于温箱中感作 20 min; 取出, 加入 50 μL/孔鸡红细胞悬液, 同时设阳性血清、阴性血清及空白对照孔。振荡混匀后置于 37℃温箱中感作 30 min, 待对照孔红细胞已经沉淀时观察结果^[7]。

1.8 攻毒保护率测定方法

除空白对照组外, 根据预试验结果, 将新城疫病毒 E₀₁ 株稀释 100 倍, 肌肉注射 0.5 mL/羽。每天记录各组死亡数, 死亡鸡剖检, 至攻毒后 8 d 停止死亡时计算死亡率和攻毒保护率。

1.9 数据处理

淋巴细胞 D_{570 nm} 值、HI 效价和免疫器官指数以“平均值 ± 标准差”表示。用 SPSS 软件 11.0 统计分析, 比较各时间点淋巴细胞转化、抗体效价和免疫器官指数的差异性。死亡率和攻毒保护率用 t 检验比较各组之间的差异。

2 结果与分析

2.1 淋巴细胞增殖的变化

各时间点 D_{570 nm} 值均显著高于空白对照组 (P < 0.05)。OAP_H、OAP_M、OM_H、OM_M、APS_H、APS_M 在各时间点, OAP_L 和 APS_L 在 21、28、35、42 日龄, OM_L 在 21、28、42 日龄的 D_{570 nm} 值显著高于免疫对照组。OAP_H 在各时间点 D_{570 nm} 值均显著高于 OM_H 和 APS_H (P < 0.05); OAP_M 在 28 日龄 D_{570 nm} 值高于 APS_M, 但差异不显著, 其余各时间点 D_{570 nm} 值均明显高于 OM_M 和 APS_M (P < 0.05); 各复方组和 OM_H、APS_H 在 21 日龄 D_{570 nm} 值达到高峰, 其余各单味药对照组在 28 日龄达到高峰 (表 1)。

2.2 抗体效价的变化

各时间点抗体效价均显著高于空白对照组 (P < 0.05); OAP_H、OAP_M 在 14 日龄, OAP_H、OAP_M、OAP_L、APS_H、APS_M、APS_L、OM_H、OM_M 在 21 日龄, OAP_H、OAP_M、OAP_L、OM_M 和 APS_M 在 28 日龄, OAP_H、OAP_M、OAP_L、OM_M、APS_H、APS_M 在 35

表 1 淋巴细胞增殖的变化

组别	$D_{570\text{ nm}}$				
	14 日龄	21 日龄	28 日龄	35 日龄	42 日龄
OAP _H	0.342 ± 0.040a	0.395 ± 0.086a	0.384 ± 0.051a	0.366 ± 0.083a	0.318 ± 0.040a
OAP _M	0.334 ± 0.073a	0.386 ± 0.061a	0.375 ± 0.055ab	0.352 ± 0.047a	0.312 ± 0.049a
OAP _L	0.211 ± 0.065de	0.309 ± 0.041bc	0.308 ± 0.078c	0.284 ± 0.063b	0.258 ± 0.032bc
OM _H	0.240 ± 0.022b	0.343 ± 0.087b	0.312 ± 0.041c	0.282 ± 0.059b	0.254 ± 0.048bc
OM _M	0.231 ± 0.028cd	0.305 ± 0.052bc	0.331 ± 0.041c	0.289 ± 0.054b	0.268 ± 0.032b
OM _L	0.208 ± 0.044de	0.284 ± 0.066c	0.304 ± 0.042c	0.262 ± 0.042bc	0.234 ± 0.064c
APS _H	0.255 ± 0.019bc	0.340 ± 0.034b	0.324 ± 0.070c	0.301 ± 0.044b	0.263 ± 0.040bc
APS _M	0.238 ± 0.044bcd	0.331 ± 0.091bc	0.340 ± 0.042bc	0.291 ± 0.029b	0.275 ± 0.048b
APS _L	0.209 ± 0.034de	0.296 ± 0.047bc	0.306 ± 0.055c	0.273 ± 0.048b	0.251 ± 0.036bc
免疫对照	0.188 ± 0.027e	0.236 ± 0.068d	0.239 ± 0.041d	0.224 ± 0.093c	0.171 ± 0.024d
空白对照	0.155 ± 0.016f	0.174 ± 0.019e	0.187 ± 0.031e	0.173 ± 0.036d	0.130 ± 0.029e

注:同列数据后不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。下表同。

日龄,OAP_H、OAP_M、APS_M 在 42 日龄抗体效价显著高于免疫对照组($P < 0.05$)。OAP_H 的抗体效价在各时间点均显著高于 OM_H 和 APS_H($P < 0.05$);OAP_M 抗体效价在 21、28、35、42 日龄显著高于 OM_M,在 21、28、35 日龄显著高于 APS_M($P < 0.05$);OAP_L 抗体效价在 28 日龄显著高于 OM_L($P < 0.05$,表 2)。

表 2 血清抗体效价的变化($n = 10$)

组别	抗体效价(log ₂)				
	14 日龄	21 日龄	28 日龄	35 日龄	42 日龄
OAP _H	6.7 ± 0.48a	7.5 ± 0.52a	8.7 ± 0.67a	7.9 ± 0.56a	7.0 ± 0.67a
OAP _M	6.5 ± 0.71ab	7.2 ± 0.42ab	8.4 ± 0.51a	7.4 ± 0.69a	6.8 ± 0.63ab
OAP _L	5.6 ± 0.69cd	6.8 ± 0.42bc	7.5 ± 0.71bc	6.3 ± 0.67bc	5.5 ± 0.52de
OM _H	5.5 ± 0.75d	6.6 ± 0.52c	6.7 ± 0.48e	6.1 ± 0.56bcd	5.5 ± 0.72de
OM _M	6.0 ± 0.70bcd	6.4 ± 0.69c	7.7 ± 0.67b	6.4 ± 0.51bc	5.7 ± 0.67d
OM _L	5.6 ± 0.69cd	6.2 ± 0.79cd	6.8 ± 0.63de	6.2 ± 0.78bcd	5.6 ± 0.51de
APS _H	6.0 ± 0.66bcd	6.5 ± 0.84c	7.0 ± 0.67cde	6.6 ± 0.69b	6.1 ± 0.73cd
APS _M	6.2 ± 0.42abc	6.6 ± 0.51c	7.8 ± 0.42b	6.7 ± 0.48b	6.3 ± 0.67bc
APS _L	6.1 ± 0.56abcd	6.7 ± 0.67bc	7.4 ± 0.84bcd	5.9 ± 0.73cd	5.6 ± 0.51de
免疫对照	5.6 ± 0.70cd	5.8 ± 0.42d	6.8 ± 0.78de	5.6 ± 0.69d	5.0 ± 0.47e
空白对照	2.9 ± 0.32e	2.9 ± 0.57e	2.8 ± 0.42f	2.7 ± 0.67e	2.6 ± 0.42f

2.3 免疫器官指数的变化

2.3.1 法氏囊指数的变化 OM_L、OPA_L 免疫对照组和空白对照组的法氏囊指数在 21 日龄达到峰值,其他各组在 28 日龄达到峰值;各药物组及免疫对照组法氏囊指数均显著高于空白对照($P < 0.05$);OAP_H、OAP_M、OM_M、OM_L、APS_H、APS_M、

APS_L 在各时间点,OM_H 在 21、28 日龄,OAP_L 在 14、21、28 日龄法氏囊指数显著高于免疫对照组($P < 0.05$)。OAP_H 的法氏囊指数在各时间点均显著高于 OM_H,在 28、35 日龄显著高于 APS_H,OAP_M 的法氏囊指数在 35 日龄显著高于 APS_M(表 3)。

表 3 法氏囊指数的变化

组别	法氏囊指数			
	14 日龄	21 日龄	28 日龄	35 日龄
OAP _H	0.56 ± 0.030a	0.58 ± 0.041a	0.63 ± 0.021a	0.52 ± 0.035a
OAP _M	0.54 ± 0.012ab	0.55 ± 0.037ab	0.58 ± 0.014b	0.50 ± 0.011ab
OAP _L	0.45 ± 0.022d	0.50 ± 0.020cd	0.48 ± 0.024cd	0.36 ± 0.040d
OM _H	0.43 ± 0.018de	0.48 ± 0.024d	0.46 ± 0.024d	0.34 ± 0.019d
OM _M	0.52 ± 0.037abc	0.54 ± 0.033abc	0.56 ± 0.028b	0.46 ± 0.038bc
OM _L	0.50 ± 0.035c	0.54 ± 0.015bc	0.51 ± 0.029c	0.44 ± 0.017c
APS _H	0.53 ± 0.024abc	0.55 ± 0.031abc	0.57 ± 0.009b	0.47 ± 0.031bc
APS _M	0.54 ± 0.035ab	0.56 ± 0.034ab	0.57 ± 0.011b	0.45 ± 0.042c
APS _L	0.51 ± 0.026bc	0.53 ± 0.025abc	0.57 ± 0.036b	0.44 ± 0.022c
免疫对照	0.40 ± 0.013e	0.43 ± 0.024e	0.42 ± 0.036e	0.33 ± 0.020d
空白对照	0.36 ± 0.028f	0.38 ± 0.030f	0.34 ± 0.040f	0.26 ± 0.015e

2.3.2 脾指数的变化 OAP_H、OAP_M、OAP_L、OM_M、APS_H、APS_M 在各时间点,OM_H 在 14、35 日龄,OM_L、APS_L 在 14、21、35 日龄脾指数显著高于空白对照 ($P<0.05$);OAP_H、OAP_M、OAP_L、OM_M、APS_H、APS_M 在各时间点,OM_L 在 21 日龄,APS_L

在 14、21 日龄的脾指数均显著高于免疫对照组 ($P<0.05$)。OAP_H 在各时间点均显著高于 OM_H,OAP_M 在 21、28、35 日龄显著高于 OM_M,在 28 日龄显著高于 APS_M,OAP_L 在 14、28 日龄显著高于 OM_L(表 4)。

表 4 脾指数的变化

组别	脾指数			
	14 日龄	21 日龄	28 日龄	35 日龄
OAP _H	0.19±0.017ab	0.21±0.014ab	0.22±0.015ab	0.20±0.015ab
OAP _M	0.20±0.011a	0.23±0.014a	0.24±0.017a	0.22±0.014a
OAP _L	0.18±0.016ab	0.20±0.034abc	0.20±0.016bc	0.18±0.027bc
OM _H	0.14±0.019d	0.14±0.024d	0.17±0.015d	0.16±0.015cd
OM _M	0.19±0.018ab	0.19±0.023bc	0.20±0.012bc	0.18±0.016bc
OM _L	0.15±0.010cd	0.18±0.023c	0.16±0.009d	0.16±0.020cd
APS _H	0.18±0.022ab	0.20±0.016abc	0.21±0.015b	0.18±0.026bc
APS _M	0.19±0.019ab	0.21±0.019ab	0.21±0.019b	0.20±0.020ab
APS _L	0.17±0.019bc	0.18±0.017bc	0.18±0.013cd	0.17±0.013cd
免疫对照	0.13±0.020de	0.14±0.012d	0.16±0.013d	0.14±0.012d
空白对照	0.11±0.013e	0.14±0.021d	0.14±0.014d	0.12±0.017e

2.4 攻毒保护率的变化

攻毒后 24 h,鸡出现精神萎靡,蹲伏笼角;食欲减退或废绝,垂头缩颈,羽毛松散、粗乱,翅膀下垂,闭眼昏睡,伸颈张口呼吸等症状,少数病鸡出现神经症状;腹泻,排黄白色或黄绿色水样粪便。48 h 开始出现死亡,72~96 h 各组死亡数均达到高峰,随后开始下降,至攻毒后 192 h 停止死亡。死亡的鸡剖检,可见典型的新城疫变化,喉头、气管有多量黏液,黏膜有出血点或出血斑;腺胃黏膜肿胀,乳头出血;盲肠扁桃体肿大、出血;肠管严重出血;脾肿大、出血。各组保护率极显著高于空白对照组 ($P<0.001$);OAP 高、中剂量组保护率显著高于免疫对照组 ($P<0.05$),APS 的高、中、低浓度、OM 中、低浓度保护率均高于免疫对照组,由高到低依次为 OAP_M、OAP_H、APS_H、APS_M、OM_M、OAP_L、OM_L 和 APS_L(表 5)。

表 5 攻毒后 192 h 各组攻毒保护率

组别	攻毒前数量 (羽)	攻毒后死亡数 (羽)	死亡率 (%)	保护率 (%)
OAP _H	38	3	7.89	91.82a
OAP _M	38	2	5.26	95.72a
OAP _L	38	8	21.05	77.89b
OM _H	37	10	27.03	70.00b
OM _M	31	9	29.03	78.82b
OM _L	36	8	22.22	77.89b
APS _H	38	5	13.16	86.67b
APS _M	38	7	18.42	80.38b
APS _L	38	9	23.68	77.14b
免疫对照	38	10	26.32	72.73b
空白对照	38	36	94.73	5.27c

注:a 表示与空白对照组相比较差异极显著 ($P<0.01$);b 表示与空白对照组相比差异显著 ($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 中药成分复方及其组分药对淋巴细胞增殖的影响

淋巴细胞增殖是反映机体细胞免疫水平的一个重要指标^[9]。细胞免疫是通过致敏淋巴细胞与相应抗原作用而发

挥抗病原体感染、抗肿瘤、帮助 B 淋巴细胞产生抗体等作用。本试验结果表明,9 个试验药物组中,除 OAP_L、OM_L、APS_L 在 14 日龄,OM_L 在 35 日龄外,其余各组、各时间点的 $D_{570\text{ nm}}$ 值均显著高于免疫对照组。说明复方、APS 和 OM 在合适的剂量下均能刺激淋巴细胞增殖,促进细胞免疫,其中以 OAP_M、OAP_H 的效果最好。

3.2 中药成分复方及其组分药对新城疫疫苗免疫应答的影响

血清抗体效价反映机体体液免疫状态^[10],体液免疫是机体抗御感染的主要因素之一,通过抗原-抗体结合反应而引起抗菌、抗病毒、抗外毒素等多种作用。本试验结果表明,OAP_H、OAP_M 和 APS_M 在 5 个时间点,OM_M 在 4 个时间点,OAP_L 和 APS_H 在 3 个时间点,OM_H 和 APS_L 在 1 个时间点的抗体效价显著高于免疫对照组。表明 OAP、APS 和 OM 在合适的剂量下均能刺激抗体产生,提高机体体液免疫水平,其中以 OAP_H、OAP_M 和 APS_M 的作用最强。

3.3 中药成分复方及其组分药对免疫器官指数的影响

一般认为,免疫器官指数降低为免疫抑制所致,而免疫器官指数增加则为免疫增强的表现^[11]。在本试验中,OAP_H、OAP_M 在各时间点法氏囊指数、脾指数均明显高于免疫对照和空白对照组,OAP_L 在 14、21、28 日龄法氏囊指数和各时间点的脾指数显著高于免疫对照组。除 OM_H 在 14、35 日龄以及 OAP_L 在 35 日龄法氏囊指数高于免疫对照但差异不显著外,其余各药物组法氏囊指数均显著高于免疫对照组 ($P<0.05$)。在脾指数方面,OM_H 在各时间点,OM_L 在 14、28、35 日龄,APS_L 在 28、35 日龄外,其余各组、各时间点均显著高于免疫对照组 ($P<0.05$)。表明中药成分复方及其组分药能增加免疫器官质量,从而增强机体的免疫功能。

3.4 中药成分复方及其组分药对免疫保护力的影响

攻毒保护率直接反映动物的抗病力,中药可直接杀灭侵入机体的病毒,或通过增强疫苗的免疫应答而提高保护率^[12-14]。本试验将各组鸡在 69 日龄用 NDV 强毒进行攻毒,OAP_H、OAP_M 的保护率分别达到 91.82%、95.72%,显著高于

免疫对照组 ($P < 0.05$), APS 的 3 个浓度组、OM_M、OM_L 和 OAP_L 的攻毒保护率也高于免疫对照组,表明 OAP 及中药组能显著提高或提高新城疫疫苗的免疫应答,从而提高雏鸡对新城疫的抗病能力。

3.5 复方及其组分药增强免疫作用有一定的量效关系

本试验发现,OAP 增强免疫作用有一定的量效关系。在促进 T 淋巴细胞增殖方面,OAP_H、OAP_M 在各时间点均显著高于免疫对照组,而 OAP_L 在 14 日龄则与免疫对照组无显著差异。OM 和 APS 的高、中剂量组在各时间点与免疫对照组相比差异显著,而低剂量组在 14 日龄与免疫对照组无显著差异,是否因为剂量过小,不足以刺激机体产生致敏淋巴细胞,还有待于进一步研究;在提高血清抗体效价方面,OAP_H、OAP_M 在各个时间点均显著高于免疫对照组,OAP_L 在 21、28 和 35 日龄显著高于免疫对照组;在提高法氏囊指数方面,OAP_H、OAP_M 各时间点显著高于免疫对照,OAP_L 在 14、21、28 日龄显著高于免疫对照,在 35 日龄与对照组相比较差异不显著。孔祥峰等在观察 9 种中药成分对新城疫 IV 系疫苗免疫雏鸡血清中血凝抑制抗体水平的影响,也得到相似的结果^[15-16]。

3.6 复方增强免疫作用优于单味组分药

OAP 是由 OM 和 APS 组成的复方,其增强免疫作用优于单味组分药,表明 2 种组分药有协同作用。在促进 T 淋巴细胞增殖方面,OAP_H 在各时间点 $D_{570\text{nm}}$ 值均显著高于 OM_H 和 APS_H ($P < 0.05$)。OAP_M 在 28 日龄 $D_{570\text{nm}}$ 值高于 APS_M,但差异不显著,其余各时间点 $D_{570\text{nm}}$ 值均显著高于 OM_M 和 APS_M ($P < 0.05$)。Wang 等观察当归多糖、黄芪多糖及其复方等对培养的鸡脾脏淋巴细胞增殖、抗体生成、细胞因子分泌的影响,也得到相似结果^[17-18]。Fan 等研究中药成分黄酮及其复方增强免疫作用时也发现,复方的作用效果优于单味成分^[19]。

在提高血清抗体效价方面,OAP_H 抗体效价在各时间点均显著高于 OM_H 和 APS_H ($P < 0.05$);OAP_M 抗体效价在 21、28、35、42 日龄显著高于 OM_M,21、28、35 日龄显著高于 APS_M ($P < 0.05$);OAP_L 抗体效价在 28 日龄显著高于 OM_L ($P < 0.05$)。

在提高免疫器官指数方面,OAP_H 的法氏囊指数在各时间点均显著高于 OM_H,在 28、35 日龄显著高于 APS_H;OAP_M 的法氏囊指数在 35 日龄显著高于 OM_M 和 APS_M;在提高脾指数方面,OAP_H 在各时间点均显著高于 OM_H,OAP_M 在 21、28、35 日龄显著高于 OM_M,在 28 日龄显著高于 APS_M,OAP_L 在 14、28 日龄显著高于 OM_M。表明 2 种组分药有协同作用。

综合以上结果可见,OAP 能显著增强雏鸡对新城疫疫苗的免疫应答,中、高剂量的效果较好,显著优于单味组分。鉴于中、高剂量的效果多差异不显著,推荐临床使用 OAP 中剂量配合疫苗使用,可作为新型免疫增强剂的候选方。

参考文献:

[1]潘杭君,孙红祥. 免疫佐剂的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2004,38(1):32-37.

- [2]龚晓明,吴耀妹. 免疫佐剂研究的现状与趋势[J]. 中国兽医杂志,1996,30(1):41-43.
- [3]郭振环,胡元亮,马 震,等. 硫酸化香菇多糖对新城疫疫苗免疫效果的影响[J]. 南京农业大学学报,2010,33(1):76-80.
- [4]Ma X,Guo Z H,Wang D Y,et al. Effects of sulfated polysaccharides and their prescriptions on immune response of ND vaccine in chicken[J]. Carbohydrate Polymers,2010,82(1):9-13.
- [5]陈玉库,邢玉娟,蔡丙彦,等. 四种中药成分复方抗 NDV 感染 CEF 细胞筛选效果分析[J]. 江苏农业科学,2008(5):176-179.
- [6]邢玉娟,陈玉库,蔡丙彦,等. 氧化苦参碱-黄芪多糖复方防治鸡新城疫的效果观察[J]. 畜牧与兽医,2009(1):91-93.
- [7]殷 震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997.
- [8]刘 钊,杨占秋,肖 红,等. MTT 法在抗病毒药物筛选中的应用[J]. 武汉大学学报:医学版,2004,25(3):333-336.
- [9]Huang Y, Jiang C, Hu Y, et al. Immunoenhancement effect of rehmannia glutinosa polysaccharide on lymphocyte proliferation and dendritic cell[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 96(2):516-521.
- [10]Fan Y, Ma L, Zhang W, et al. Microemulsion can improve the immune-enhancing activity of propolis flavonoid on immunosuppression and immune response[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2014,63:126-132.
- [11]Grossman C J. Interrationbetween the gonadal steroids and the immune system[J]. Science,1995,227:261-357.
- [12]Wu X N, Wang G J. Experimental studies of oxymatrine and its mechanisms of action in hepatitis B and C viral infections[J]. Chinese Journal of Digestive Diseases,2004,5(1):12-16.
- [13]许 斌,周双成,黄玉仙. 氧化苦参碱在鸭原代肝细胞中抗鸭乙型肝炎病毒(DHBV)作用的研究[J]. 病毒学报,2006,22(5):369-374.
- [14]何 诚,杨 明,杨建民,等. 中药制剂 SHY 对新城疫、禽流感 H9、H5 亚型病毒的抑制和攻毒保护效果[J]. 中国农业大学学报,2005,10(6):7-10.
- [15]孔祥峰,胡元亮,李祥瑞,等. 9 种中药成分对新城疫 IV 系疫苗免疫雏鸡血清中血凝抑制抗体水平的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2004,35(4):468-472.
- [16]聂小华,史宝军,敖宗华,等. 黄芪活性成分的提取及其对淋巴细胞增殖的影响[J]. 无锡轻工大学学报,2003,22(4):49-51.
- [17]Wang D,Hu Y,Sun J,et al. Comparative study on adjuvantcity of compound Chinese herbal medicinal ingredients[J]. Vaccine, 2005,23(28):3704-3708.
- [18]Wang D,Li X,Xu L,et al. Immunologic synergism with IL-2 and effects of cCHMIs on mRNA expression of IL-2 and IFN- γ in chicken peripheral T lymphocyte[J]. Vaccine,2006,24(49/50):7109-7114.
- [19]Fan Y, Hu Y, Wang D, et al. Epimedium polysaccharide and propolis flavone can synergistically stimulate lymphocyte proliferation *in vitro* and enhance the immune responses to ND vaccine in chickens[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010,47(2):87-92.