

泰山白皮松花粉对雏鸡免疫增强作用的初步研究

孟秀彦¹,黄河²,廉爱玲³,胡莉萍³,朱瑞良^{4*}

1. 泰山职业技术学院, 山东 泰安 271000
2. 山东新希望六和集团有限公司, 山东 青岛 266061
3. 山东省动物疫病预防与控制中心, 山东 济南 250022
4. 山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018

摘要: 本试验设计旨在研究泰山白皮松花粉对雏鸡免疫功能的增强作用。取1日龄海兰褐公雏1050只,随机分为7组,3个松花粉佐剂组(I、II、III),2个松花粉投喂组(IV、V),另外2组分别为无松花粉对照组(VI)和正常对照组(VII)。以不同含量的泰山白皮松花粉作为免疫佐剂配制ND疫苗,胸肌注射接种各试验组雏鸡,9日龄1免,32日龄2免。I、II、III、IV、V、VI组松花粉佐剂剂量分别为162 μg/只,108 μg/只,54 μg/只,0,0,0;IV、V组6~11日龄投喂松花粉,剂量分别为0.3 g/只,0.1 g/只;VII组注射灭菌生理盐水。各试验组分别于1免后的第3 d、7 d、14 d、21 d及2免后的第3 d、7 d、14 d、21 d采取血液,用β-微量法检测血清抗体。I、II、III、VI组2免14 d后,每组随机取30只鸡采血进行体外淋巴细胞转化率检测。数据采用SPSS11.2软件进行T值检验分析。结果表明,I、II、III组各指标均显著高于VI组($P<0.05$),其中I、II组与VI组相比差异极显著($P<0.01$)。IV、V组显著高于VI组($P<0.05$),VI组、VII组差异不显著。并且1免后14 d,2免后14 d、21 d的各试验组显著高于相应对照组($P<0.05$)。因此,泰山白皮松花粉能提高雏鸡的抗体水平、血液淋巴细胞转化率。

关键词: 白皮松花粉; 抗体; 淋巴细胞; 免疫增强

中图分类号: S852.4;S853.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2016)03-0362-04

Research on the Effect of Immune Enhancement of Taishan White Bark Pine Pollen on Chicks

MENG Xiu-yan¹, HUANG He², LIAN Ai-ling³, HU Li-ping³, ZHU Rui-liang^{4*}

1. TaiShan Vocational Technical College, Taian 271000, China
2. Shandong New Hope Six and Group Co., Ltd., Qingdao 266061, China
3. Animal Disease Prevention and Control Center of Shandong Province, Jinan 250022, China
4. College of Animal Science and Technology/Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

Abstract: An experiment was conducted to study the effects of immune enhancement caused by the Taishan white bark pine pollen on chicks. One thousand and fifty one-day-old Lyline male chicks were randomly divided into 7 groups: 3 pine pollen adjuvant groups (I, II, III), 2 pine pollen feeding groups (IV, V), the non-pine pollen control group (VI) and the control group (VII). The ND-vaccines were made by the immune adjuvant with different content of Taishan white bark pine pollen. The experimental group chicks were injected with the ND-vaccine in chest muscle when they were 9 and 32 days old, pine pollen does of group I, II, III, IV and V was 162 μg/feather, 108 μg/feather, 54 μg/feather, 0, 0, 0 respectively. Pine pollen was fed to group IV, V with 0.3 g, 0.1 g respectively when they were 6 and 11 days old. Group VII was injected with physiological saline. Samples of blood were taken on the 3rd, 7th, 14th and 21st day after each immunization. The lever of systemic antibody was detected by β-Microtest HA and HI. 30 chicks were randomly selected from I, II, III, VI group, Samples of blood were taken on 14th day after the second immunization, the conversion rate of Lymphocytes was detected by MTT. SPSS11.2 software was used for T-score test analysis. The results showed that the indices in Group I, II, III were significantly higher than Group VI ($P<0.05$). The differences between Group I, II and Group VI were very significant ($P<0.01$). Group IV, V were significantly higher than Group VII ($P<0.05$). The difference between Group VI and VII was not significant. And the test results of the groups on the 14th day after first immunity, 14th and 21st day after second immunization were significantly higher than that on the 3rd and 7th day ($P<0.05$). Therefore Taishan white bark pine pollen could improve antibody level and lymphocyte transformation rate of chick.

Keywords: White bark pine pollen; antibody; lymphocyte; immune enhancement

收稿日期: 2015-05-18

修回日期: 2015-06-26

基金项目: 山东省科技发展计划项目(2012GNC11020); 泰安市科技发展专项计划(20103001); 山东省高校中医药抗病病毒协同创新资助项目(XTCX2014B01-08)

作者简介: 孟秀彦(1969-),女,副教授,主要从事预防兽医学教学和研究工作. E-mail:meng_xiuyan@163.com

***通讯作者:** Author for correspondence. E-mail:zhurl@sda.edu.cn

松花粉,药名松花、松黄,始载于唐《新修本草》,其味甘平无毒,蕴藏着丰富的营养成分,具有增强机体免疫力,调节内分泌,抗疲劳,增加锌利用度等功能^[1-4]。我国松花粉产量高,采集方便,开发潜力巨大。近几年松花粉在人类保健方面的研究利用逐渐产业化。新型植物免疫增强剂的研究与开发正在成为国内畜牧行业研发的新热点^[5,6]。松花粉在增强免疫方面的独特功效引起了畜牧界的重视,探索将松花粉研制成为新型高效的免疫佐剂,对控制畜禽传染病的发生,生产绿色安全的畜禽产品具有十分重要的意义。在松科中不同品种花粉的营养物质含量不一,有的品种之间某些营养物质含量可能差异较大^[7,8],利用松花粉时需要考虑花粉品种和营养之间的关系,以便选用适合的松花粉。破壁后的松花粉氨基酸含量高于天然松花粉,对体液免疫功能和锌的利用度的增强作用更明显^[9,10]。本试验将泰山白皮松花粉破壁后作为鸡新城疫疫苗佐剂和饲料添加剂,通过测定雏鸡新城疫抗体效价和淋巴细胞转化率来研究松花粉对机体免疫效果的影响,旨在探索松花粉的免疫增强作用,为进一步研究、开发、利用松花粉作为免疫佐剂提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 松花粉 采自泰山白皮松成熟的松花粉,经晾干、260目过筛、破壁处理^[11],其破壁率达95%~98%;并在山东农业大学辐照中心以60 Co γ 、6 kGy辐照剂量灭菌后^[12],4℃贮存。

1.1.2 试验动物 1050只1日龄海兰褐公雏,购自泰安市东岳种禽有限公司,平均体重为77g。

1.1.3 病毒液和试剂 灭活鸡新城疫病毒尿囊液,HA效价为1:2¹¹,由山东农业大学动物科技学院微生物研究室提供;1%鸡红细胞悬液;淋巴细胞分离液,上海恒信化学试剂有限公司产品,批号20141220,4℃避光保存;D-Hank's液;PRMI 1640培养液(Gbico)(加10%小牛血清和双抗),伴刀豆球蛋白A(ConA,试验浓度为10 μg/mL)(Sigma公司产品,PBS液;0.4%台盼兰液;MTT(Sigm公司产品,5 mg/mL,用PBS配制,pH=7.4);裂解液(DMF-SDS)(20% SDS,50% DMF,用盐酸调至pH7.4)。

1.1.4 主要仪器 离心机800型,上海手术器械厂;光学显微镜OLYMPUS,CH-2型,JAPAN;5%CO₂培养箱SANYO;超净工作台1012型,美国产;电子天平FA1104型,上海天平仪器厂;自动酶标仪,澳大利亚TECAN公司产品;倒置显微镜;微型振荡器。

1.2 方 法

1.2.1 松花粉佐剂的制备 破壁白皮松花粉溶解在一定溶剂中,再加入一定比例的聚乙二醇6000和丙三醇,配制成松花粉佐剂溶液(每mL含有松花粉有效成份600 μg)。

1.2.2 疫苗的制备 将松花粉佐剂溶液按照不同的比例分别与灭活鸡新城疫病毒尿囊液及灭菌生理盐水混匀,即依次为I号苗、II号苗、III号苗、IV号苗(见表1)。

表1 松花粉佐剂疫苗的配制

Table 1 The formulation of pine pollen vaccine adjuvant

疫苗编号 Vaccine number	尿囊液 Allantoic fluid	松花粉佐剂 Pine pollen adjuvant	生理盐水 Saline
I	50 mL	30 mL	20 mL
II	50 mL	20 mL	30 mL
III	50 mL	10 mL	40 mL
IV	50 mL	—	50 mL

1.2.3 松花粉饲喂液制备 取10g经破壁处理的白皮松花粉加生理盐水至总体积200 mL,4℃保存备用。

1.2.4 动物试验设计 将1050只海兰褐公雏随机分为7组,每组150只。试验分组:I、II、III组为松花粉佐剂组,IV、V组为松花粉投喂组,VI组为无松花粉对照组,VII组为正常对照组。松花粉用量:I、II、III、IV、V、VI组松花粉佐剂剂量分别为162 μg/只,108 μg/只,54 μg/只,0,0,0;IV、V组松花粉投喂剂量分别为0.3 g/只,0.1 g/只。各试验组均采用胸肌注射的方式进行疫苗接种,9日龄1免,0.3 mL/只;32日龄2免,0.6 mL/只;I、II、III组分别接种I、II、III号疫苗;IV、V、VI组均接种IV号疫苗,VII组接种灭菌生理盐水。IV、V组在6~11日龄每天早上空腹投喂松花粉。

1.2.5 抗体效价的检测 首先于7日龄时对雏鸡测定母源抗体,以后分别于1免后的第3 d、7 d、14 d、

21 d 以及 2 免后的第 3 d、7 d、14 d、21 d 取各组雏鸡心脏采血 0.5 mL，分离血清，用β-微量法检测血清的 ND 抗体效价。数据采用 SPSS 11.2 软件进行 T 值检验分析。

1.2.6 雏鸡淋巴细胞转化率(MTT 法)的检测 以 I、II、III、VI 组雏鸡作为检测对象，I、II、III 组为松花粉佐剂组，VI 组为对照组。二免 14 d 后，每组随机取 30 只鸡心脏采血进行检测。

无菌取试验鸡抗凝血 3 mL，用淋巴细胞分离液制备淋巴细胞，PRMI1640 培养液重悬细胞，台盼兰测活计数，调整细胞浓度为 5×10^6 个/mL，接种于 96 孔细胞培养板，100 μL/孔，加 20 μL ConA。于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 44 h。倒置显微镜下观察。每孔加 MTT 20 μL，继续培养 4 h。每孔加裂解液 100 μL，低速振荡 10 min，使结晶物充分溶解。在酶标仪上读取 490 nm 处的光密度值 (OD_{490nm})。同时设置对照孔(淋巴细胞、PRMI1640 培养液、MTT、裂解液)，空白调零孔 (PRMI1640 培养液、MTT、裂解液)，其它试验步骤保持一致。每组设 4 个复孔^[13,14]。

结果用刺激指数 SI 表示。

$$SI = \frac{OD_{490nm} (\text{试验孔}) - OD_{490nm} (\text{空白孔})}{OD_{490nm} (\text{对照孔}) - OD_{490nm} (\text{空白孔})}$$

2 结果

2.1 ND 抗体检测结果

表 2 一免后各组 ND-HI 的抗体效价

Table 2 The antibody titers of each group ND-HI after first immunization (n=150, $\bar{X} \pm SD$); log₂

组别 Group	免疫后时间 Time after immunization(d)				
	0	3	7	14	21
I	4.5±0.171	6.0±0.213	6.8±0.225*	7.6±0.323**	6.3±0.352*
II	4.5±0.169	5.6±0.221	6.6±0.221*	7.0±0.330*	5.8±0.357
III	4.5±0.168	5.2±0.214	6.0±0.226	6.4±0.342*	5.2±0.344
IV	4.5±0.170	5.8±0.230	5.6±0.228	6.4±0.339*	5.2±0.349
V	4.5±0.171	5.2±0.226	5.8±0.310	6.0±0.411*	5.0±0.351
VI	4.5±0.169	5.2±0.222	5.3±0.275	5.5±0.375	4.8±0.355
VII	4.5±0.170	5.4±0.233	3.9±0.251	0	0

注:标记*的表示与6组比较差异显著(P<0.05), 标记**表示与6组比较差异极显著(P<0.01)。下同。

Note: *showed the significant difference at P<0.05, **showed the high significant difference at P<0.01 comparing with Group 6. The same as follows.

由表 2 可见，1 免后，试验各组的抗体水平与对照组相比上升迅速。其中 I、II 组在免疫后抗体上升速度最快，抗体效价水平明显高于其他各组。IV、V 组是松花粉的饲料添加组，抗体水平居中，略高于对照组。

表 3 二免后各组 ND-HI 的抗体效价

Table 3 The antibody titers of each group ND-HI after second immunization (n=150, $\bar{X} \pm SD$); log₂

组别 Group	免疫后时间 Time after immunazition(d)			
	3	7	14	21
I	5.5±0.332*	7.5±0.412*	9±0.437**	9.6±0.459**
II	5.0±0.348*	7.5±0.430*	9.2±0.442**	9.2±0.451**
III	4.7±0.372	6.8±0.428*	7.0±0.432	7.6±0.448
IV	4.8±0.375	6.7±0.424*	7.2±0.440	7.4±0.456
V	4.2±0.339	6.2±0.429	6.8±0.419	7.0±0.439
VI	4.0±0.347	5.8±0.431	6.7±0.399	6.9±0.364
VII	0	0	0	0

由表 3 可见，二免 7 d 后，IV、V 组抗体效价水平与对照组的差距有缩小趋势，I、II 组抗体持续高水平表达，二免后 14 d、21 d 时与对照组差异极显著(P<0.01)。

2.2 体外淋巴细胞转化率的测定(OD490 nm)结果

表 4 MTT 试验的数据

Table 4 The data of MTT test

组别 Group	试验孔 OD _{490nm} Test hole OD _{490nm}	对照孔 OD _{490nm} Control hole OD _{490nm}	空白调零孔 OD _{490nm} Zero adjustment hole	刺激指数 SI Stimulation index
I	0.894	0.628		1.62
II	0.598	0.494	0.2	1.35
III	0.383	0.343		1.28
VI	0.330	0.319		1.09

注:空白调零孔 OD_{490nm} 均值为 0.2。Note: Average of zero adjustment hole OD_{490nm} was 0.2.

由图1可见,试验组的刺激指数 SI 明显高于对照组,且在一定范围内与疫苗中松花粉佐剂剂量有一定的依赖关系。

3 分析与讨论

3.1 破壁白皮松花粉可以明显增强雏鸡对鸡新城疫疫苗的免疫反应,提高其抗体效价

抗体效价的变化能够反映体液免疫的状态^[15],本研究结果显示:松花粉佐剂组 HI 抗体效价的明显好于松花粉投喂组和对对照组, I、II、III组各指标均显著高于VI组 ($P < 0.05$),其中 I、II组与VI组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。IV、V组显著高于VI组 ($P < 0.05$),VI组、VII组差异不显著。并且1免疫14 d,2免后14 d、21 d的各组显著高于免疫后3 d、7 d的各对应组 ($P < 0.05$)。证明了松花粉能够明显增强雏鸡的体液免疫能力,其增强效果与剂量在一定范围内成依赖关系,高剂量组的松花粉佐剂疫苗组效果最好。

3.2 破壁白皮松花粉可以增强雏鸡淋巴细胞转化率

体外淋巴细胞转化率变化能够反映细胞免疫的状态^[16]。体外淋巴细胞转化(MTT法)试验的结果表明:破壁白皮松花粉对淋巴细胞的转化率提高效果较好,刺激指数 SI 比对照组有所提高,且在一定范围内,与剂量有一定的依赖关系(图1)。松花粉作为疫苗佐剂,具有提高细胞免疫的作用。

3.3 松花粉作为免疫佐剂的广泛应用还需要进一步研究

本试验研究初步证明,白皮松花粉破壁后作为疫苗佐剂具有可行性,但仍存在一些问题:如对白皮松花粉的处理(直接使用完整的松花粉、破壁处理、发芽等)与其作用的关系尚不清楚;不能确定、提取其有效成分;最佳量效关系的确定等等。另外,在松科中不同种花粉的营养物质含量不一,品种之间某些营养素差异较大,生长条件不同,同一种松花粉的营养物质含量也不同^[17,18],在畜牧业中应用松花粉时是否需要考虑松花粉品种和营养之间的关系等,这些问题均需要我们在本试验的基础上进行更加深入、细致的研究。

3.4 展望

泰山松花粉资源丰富,生产时间集中,较易采集且不与农业争地,如果成功利用新技术将松花粉开发研制为新型疫苗佐剂将有着十分巨大的经济价值和应用前景。

参考文献

- [1] 刘明,尹伟荣,杨飞,等.蜂花粉与松花粉主要组分和食疗保健功效探讨[J].蜜蜂杂志,2009,7:3-5
- [2] 刘协,胡启之,李小宁,等.松花粉抗疲劳作用的研究[J].中国生化药物杂志,2004,25:169-170
- [3] 赵立新,喻陆.松花粉对小鼠抗衰老的研究[J].湖北中医学院学报,2004,3(6):8-9
- [4] 何晓燕,孙雪圆,于智洋.松花粉的有效成分及药理作用[J].东北林业大学学报,2007,35(9):78-80
- [5] 王晓娟.疫苗佐剂的研究进展[J].微生物学免疫学进展,2008,3:98-100
- [6] 樊淑华,葛红莲.免疫增强剂的种类和应用[J].周口师范学院学报,2009,26(2):103-105
- [7] 支崇远,王开发.四种松花粉营养成分比较研究[J].中国自然医学杂志,2004,6(2):81-81
- [8] 高赛,王建立,王金金,等.4种花粉矿质元素含量测定及分析[J].农学学报,2014,4(10):79-80
- [9] 李显华,邓晓梅,向绍杰,等.破壁与不破壁松花粉对免疫功能影响的比较研究[J].国珍国医国药,2001,12(3):205
- [10] 樊柏林,刘烈刚.破壁松花粉对大鼠将血脂效应及作用研究[J].职业与健康,2005,21:809-811
- [11] 郝晓亮,王静,刘毅.松花粉破壁方法的比较研究[J].农产品加工学刊,2005,11:21-22,25
- [12] 沈伟桥,傅俊杰,卢红霞.松花粉辐射灭菌效应的研究[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,1997,23(3):351-354
- [13] Thekisoe MM, Mbatia PA, Bisschop SP. Different approaches to the vaccination of free ranging village chickens against Newcastle disease in Qwa-Qwa, South Africa[J]. Veterinary Microbiology, 2004,101(1):23-30
- [14] 李宏梅,胡敬东,郭慧君,等.MTT法检测鸡脾脏和外周血NK细胞杀伤活性的条件优化[J].中国兽医学报,2009,29(4):477
- [15] Macpherson AJ, Hunziker L, McCoy K, et al. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms[J]. Microbes and Infection, 2001,3(12):1021-1035
- [16] Li CH, Santoso S, Lo DD. Quantitative analysis of T cell homeostatic proliferation[J]. Cellular Immunology, 2007,250(1-2):45-54
- [17] 杭晓波,王颖,马兰婷,等.花粉中的矿物质及其对蜜蜂的作用[J].中国蜂业,2012,63(Z4):83-86
- [18] 刘静.不同施肥条件下白皮松营养元素含量年周期变化的研究[D].太谷:山西农业大学,2013

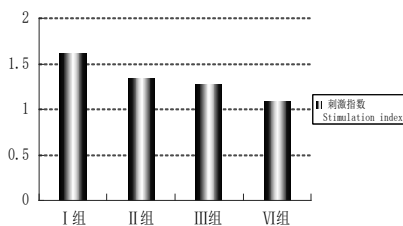


图1 MTT试验刺激指数
Fig.1 MTT test stimulation index