

# 毒害艾美耳球虫初次感染雏鸡免疫器官 IL-2 和淋巴细胞增殖功能变化

郑世民, 胡京友, 刘 晶, 高雪丽

(东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030)

**摘 要:** 应用组织匀浆涂片和酸性  $\alpha$ -醋酸萘酯酶(ANAE)染色及细胞培养技术和四甲基偶氮唑盐(MTT)测定法对毒害艾美耳球虫(*Eimeria necatrix*, *E. necatrix*)初次感染雏鸡免疫器官的 T 细胞比例、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)诱生活性、T 细胞和 B 细胞对 ConA 或 PMA 的增殖功能的动态变化进行了较全面系统的研究。结果发现, *E. necatrix* 初次感染雏鸡, 其胸腺和脾脏 T 细胞比例分别于感染后 7~21 d 和 7~24 d 明显高于对照雏鸡; IL-2 诱生活性分别于感染后 16~18 d 和 18~21 d 较对照雏鸡显著升高; T 细胞对 ConA 的增殖反应分别在感染后 14~16 d 和 10~18 d 明显增加。法氏囊和脾脏 B 细胞对 PMA 的增殖反应分别于感染后 14~24 d 和 14~21 d 显著高于对照雏鸡。表明 *E. necatrix* 初次感染雏鸡免疫器官的 IL-2 调节及细胞免疫和体液免疫功能均明显提高。

**关键词:** 毒害艾美耳球虫; 雏鸡; 免疫器官; 白细胞介素-2; T 细胞; B 细胞

中图分类号: S855.9

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)11-1222-04

## Changes of Proliferative Responses and Interleukin-2 Activity of Lymphocytes in Immune Organs of Chickens Primary Infected with *E. Necatrix*

ZHENG Shi-min, HU Jing-you, LIU Jing, GAO Xue-li

(College of Animal Medicine, Northeast Agricultural University,

Harbin 150030, China)

**Abstract:** Dynamic changes of percentage of T cell, interleukin-2 (IL-2) activity and proliferative response of T and B lymphocytes to concanavalin A (ConA) or phorblyl myristate acetate (PMA) in immune organs of 14-day-old chickens primary infected with *E. necatrix* were studied by using acid nonspecific  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase (ANAE), cellular culture technique and [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. The results showed that the IL-2 activity in thymus and spleen of chickens primary infected with *E. necatrix* was significantly increased compared with that of control, respectively, at day 16-18 and 18-21 post primary infection (PPI); The proliferative responses of T lymphocytes to ConA in thymus and spleen of chickens infected with *E. necatrix* were significantly elevated compared with that of control chickens at day 14-16 and 10-18 PPI, respectively. The proliferative responses of B lymphocytes to PMA in spleen and bursa of Fabricius of chickens infected with *E. necatrix* were significantly higher than that of control at 14-21 and 14-24 PPI, respectively. These results showed that IL-2 immune regulation and function of cellular immune and fluid immune in immune organs of chickens primary infected with *E. necatrix* had significantly increased.

**Key words:** *E. necatrix*; chicken; immune organ; IL-2; T cell; B cells

鸡球虫病 (Coccidiosis) 是由艾美耳属 (*Eimeria*) 的一种或几种球虫寄生于鸡肠道黏膜上皮细胞

而引起的原虫病<sup>[1]</sup>。该病是严重危害养鸡业发展的世界性重要肠道寄生虫病之一<sup>[2]</sup>。对球虫病的防治药物一直占主导地位。近年来,随着耐药球虫株的产生,特别是药物残留对畜产品和人类健康以及环境的影响<sup>[3]</sup>。寻找控制球虫病的有效途径,已成为广大兽医学工作者探索和关注的热点。根据已有的研究资料,对球虫生活史、流行病学、抗原组分和疫苗研制等研究较多<sup>[4]</sup>,并取得了一定的进展;而对球虫免疫发病机制的研究较少。特别是毒害艾美耳球虫感染雏鸡后,其免疫器官细胞因子免疫调节及其 T、B 淋巴细胞对 ConA 或 PMA 增殖功能的变化,尚未见有研究报道。因此,笔者选用 14 日龄艾维因 2000 肉用雏鸡感染毒害艾美耳球虫,然后对其免疫器官 T 细胞 IL-2 活性和 T、B 淋巴细胞对 ConA 或 PMA 的增殖反应的动态变化进行了全面系统地研究,为进一步研究球虫病的免疫防制提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 虫 株

毒害艾美耳球虫(*E. necatrix*)强毒株,由中国农业大学寄生虫教研室惠赠。

### 1.2 主要试剂及生物制剂

刀豆蛋白 A(ConA)、RPMI-1640、四甲基偶氮唑盐(MTT)、乙酸豆蔻佛波醇(PMA)、 $\alpha$ -甲基-D-甘露糖苷( $\alpha$ -MM)、Hepes 等,均购自 Sigma 公司。

### 1.3 实验动物及其分组和处理

120 只 1 日龄健康艾维因 2000 肉用商品混合雏鸡,购自哈尔滨市某孵化场,经 ND、MD、IBD、CIA 及鸡球虫虫卵检查均为阴性,然后在严格消毒无球虫的环境中饲养至 14 日龄,并随机分为球虫感染组(I 组)

和未感染球虫的对照组(C 组),每组各 60 只雏鸡。I 组雏鸡于 15 日龄经口给予  $8 \times 10^3$  个/只感染性卵囊;C 组雏鸡未感染球虫卵囊为对照组。两组雏鸡严格隔离,在相同条件下分别饲养管理。

### 1.4 试验材料采取

分别于感染球虫卵囊后 2、4、7、10、14、16、18、21、24、28 d,每组随机抽取 5 只雏鸡,心脏采血处死后,无菌采取胸腺、法氏囊和脾脏,分别制成单细胞悬液,供相应各项免疫指标检测用。

### 1.5 检测指标及方法

1.5.1 胸腺和脾脏 T 淋巴细胞百分含量测定 采用组织匀浆涂片及酸性  $\alpha$ -醋酸萘酯酶(acid nonspecific  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase, ANAE)染色法<sup>[5]</sup>。

1.5.2 胸腺和脾脏 IL-2 诱生活性及增殖反应 体外细胞培养和 ConA 诱生及 MTT 比色法<sup>[6,7]</sup>。

1.5.3 法氏囊和脾脏 B 淋巴细胞增殖反应 体外细胞培养和 PMA 诱生及 MTT 比色法<sup>[6,7]</sup>。

### 1.6 数据处理

用 Minitab 软件包进行统计学处理,经 *t* 检验分析组间差异,结果用平均值 $\pm$ 标准误表示。

## 2 结 果

### 2.1 *E. necatrix* 初次感染雏鸡免疫器官 T 淋巴细胞 IL-2 诱生活性的动态变化

14 日龄雏鸡初次感染 *E. necatrix* 后 28 d 内,其胸腺和脾脏 T 淋巴细胞 IL-2 诱生活性分别于感染后 16~21 d 和感染后 14~21 d 明显高于对照雏鸡( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );并分别于感染后 18 d 和 16 d 达高峰,见表 1。

表 1 *E. necatrix* 初次感染雏鸡免疫器官 T 淋巴细胞 IL-2 诱生活性变化

Table 1 Changes of IL-2 activity of T lymphocytes in immune organs of chickens primary infected with *E. necatrix* ( $A_{590\text{nm}}$ )

时间/d Time		7	14	16	18	21	24
胸腺 Thymus	C	0.240 1 $\pm$ 0.052 3	0.278 2 $\pm$ 0.051 8	0.281 8 $\pm$ 0.031 9	0.287 1 $\pm$ 0.020 8	0.265 8 $\pm$ 0.030 6	0.217 0 $\pm$ 0.031 3
	I	0.253 1 $\pm$ 0.057 8	0.301 1 $\pm$ 0.062 6	0.320 8 $\pm$ 0.021 1*	0.391 8 $\pm$ 0.011 8**	0.351 8 $\pm$ 0.036 2*	0.232 6 $\pm$ 0.022 6
脾脏 Spleen	C	0.239 8 $\pm$ 0.038 7	0.275 7 $\pm$ 0.023 5	0.298 1 $\pm$ 0.021 5	0.289 7 $\pm$ 0.042 9	0.271 8 $\pm$ 0.030 2	0.261 1 $\pm$ 0.061 0
	I	0.258 9 $\pm$ 0.056 4	0.320 9 $\pm$ 0.031 1*	0.391 8 $\pm$ 0.010 3**	0.357 8 $\pm$ 0.049 7*	0.301 1 $\pm$ 0.035 4*	0.281 0 $\pm$ 0.051 3

(1)C. 对照组;I. 球虫感染组;(2)\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ ;无标记者差异不显著  $P > 0.05$ , (3)时间指感染后时间,下同

(1) C. Control group; I. Group infected with *E. necatrix*; (2) The values with asterisk differ significantly (with single asterisk,  $P < 0.05$ ) or very significantly (with double asterisk,  $P < 0.01$ ); (3) The time here indicate the time post primary infection; the same as below

### 2.2 *E. necatrix* 初次感染雏鸡免疫器官 T 淋巴细胞数量的动态变化

雏鸡初次感染 *E. necatrix* 后,其胸腺和脾脏 T

淋巴细胞数量分别于感染后 7~21 d 和 7~24 d 明显高于对照雏鸡( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),并于感染后 16 d 达最高峰,其余时间未见统计学差异,见表 2。

表 2 *E. necatrix* 初次感染雏鸡免疫器官 T 淋巴细胞数量变化Table 2 Changes of the number of T lymphocytes in immune organs of chickens primary infected with *E. necatrix* %

时间/d Time		7	14	16	18	21	24
胸腺 Thymus	C	21.5±2.9	26.7±3.5	31.0±2.6	27.0±1.0	25.0±5.0	29.0±4.4
	I	27.5±4.6*	50.4±5.2**	52.7±5.2**	39.3±1.5**	33.3±2.1*	24.3±2.9
脾脏 Spleen	C	20.3±1.5	29.3±2.5	27.0±2.6	24.7±3.9	29.3±4.9	26.7±2.7
	I	28.7±4.0*	57.3±4.2**	60.7±3.2**	46.4±2.1**	37.3±2.1*	32.0±3.6*

### 2.3 *E. necatrix* 初次感染雏鸡免疫器官 T 淋巴细胞增殖反应的动态变化

14 日龄雏鸡初次感染 *E. necatrix* 后 2~28 d, 其胸腺和脾脏 T 细胞增殖反应分别于感染后 14~18 d

和 10~21 d 明显高于对照雏鸡 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 并分别于感染后 16 d 和 14 d 达到峰值, 见表 3。

表 3 *E. necatrix* 初次感染雏鸡免疫器官 T 淋巴细胞增殖反应变化Table 3 Changes of proliferative responses of T lymphocytes to ConA in immune organs of chickens primary infected with *E. necatrix* ( $A_{590\text{ nm}}$ )

时间/d Time		7	14	16	18	21	24
胸腺 Thymus	C	0.123 8±0.016 6	0.145 1±0.023 8	0.116 2±0.016 8	0.132 6±0.017 8	0.110 3±0.016 2	0.102 0±0.012 6
	I	0.140 1±0.021 8	0.230 8±0.041 8*	0.279 8±0.030 6**	0.181 1±0.201 1*	0.143 1±0.186 5	0.113 1±0.017 5
脾脏 Spleen	C	0.436 8±0.050 1	0.480 0±0.052 1	0.486 8±0.060 2	0.430 1±0.048 1	0.459 8±0.052 6	0.482 6±0.051 2
	I	0.489 8±0.059 8	0.880 1±0.091 2**	0.861 2±0.092 6**	0.697 1±0.072 1**	0.560 2±0.067 8*	0.451 0±0.048 9

### 2.4 *E. necatrix* 初次感染雏鸡免疫器官 B 淋巴细胞增殖反应的动态变化

14 日龄雏鸡初次感染 *E. necatrix* 后 2~28 d, 其

法氏囊和脾脏 B 淋巴细胞增殖反应分别于感染后 14~24 d 和 14~21 d 明显高于对照雏鸡 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 并分别于感染后 18 d 和 16 d 达峰值。

表 4 *E. necatrix* 初次感染雏鸡免疫器官 B 淋巴细胞增殖反应变化Table 4 Changes of proliferative responses of B lymphocytes to PMA in immune organs of chickens primary infected with *E. necatrix* ( $A_{590\text{ nm}}$ )

时间/d Time		7	14	16	18	21	24
法氏囊 Bursa	C	0.471 2±0.052 1	0.511 8±0.058 9	0.480 2±0.052 6	0.601 2±0.071 8	0.571 7±0.068 6	0.701 1±0.081 7
	I	0.520 1±0.060 8	0.712 6±0.081 2*	0.980 1±0.112 1**	1.189 8±0.115 7**	1.102 1±0.120 8**	0.930 2±0.109 8*
脾脏 Spleen	C	0.461 2±0.057 8	0.491 8±0.059 8	0.394 2±0.040 3	0.543 0±0.062 1	0.557 1±0.622 6	0.369 0±0.046 8
	I	0.469 6±0.059 1	0.681 2±0.076 8*	0.980 1±0.122 6**	0.881 2±0.098 9**	0.761 1±0.082 9*	0.420 8±0.051 1

## 3 讨论

### 3.1 *E. necatrix* 初次感染对鸡 IL-2 活性变化的影响

IL-2 是主要由 T 淋巴细胞 ( $CD_4^+$  和  $CD_8^+$  T 细胞) 产生的 15.5 ku 糖蛋白, 它在动物机体的免疫系统中发挥重要的调节作用, 是多种细胞的有效生长因子, 包括 T 细胞的分化、B 细胞的增殖、NK 细胞的活化等<sup>[8]</sup> 都是在 IL-2 的调节下完成的。据报道<sup>[9]</sup>, IL-2 在抵抗 *E. tenella* 和 *E. acervulina* 球虫感染中具有十分重要的作用。Miyamoto 等<sup>[10]</sup> 研究

发现, 雏鸡在首次感染 *E. tenella* 后 7 d, 其血清 IL-2 活性明显高于对照雏鸡, 且可介导机体对再感染的免疫回忆应答。Li 等<sup>[11]</sup> 和 Choi 等<sup>[12]</sup> 分别用 *E. tenella* 和 *E. acervulin* 感染雏鸡, 结果发现, 雏鸡感染 *E. tenella* 后, 其淋巴细胞培养物上清中 IL-2 含量显著升高; *E. acervulin* 感染雏鸡, 其脾脏和肠内的 IL-2 mRNA 表达明显增强。表明 *E. tenella* 和 *E. acervulin* 感染雏鸡后, 可能是通过上调 IL-2 mRNA 的表达水平, 介导细胞免疫反应, 从而抵抗球虫的再侵袭。而 *E. necatrix* 感染雏鸡后, 其 IL-2 活性发生什么样的变化? 迄今未见报道。本研究发

现,雏鸡初次感染 *E. necatrix* 后,其胸腺和脾脏 T 细胞 IL-2 活性分别于感染后 16~21 d 和 14~21 d 明显高于相应对照雏鸡,提示雏鸡初次感染 *E. necatrix* 后一定时段内,IL-2 同样发挥十分重要的作用。但是,*E. necatrix* 初次感染雏鸡后,其免疫器官 T 细胞 IL-2 活性变化时相与其他艾美耳球虫不同,存在明显滞后现象。产生上述变化是否与 *E. necatrix* 在动物体内的发育史、本身的抗原性等有关,尚需进一步试验证实。艾美耳球虫感染雏鸡后,IL-2 活性增强,可与其他细胞因子共同作用加速 T 细胞的早期发育,进而促进  $T_H$  细胞和 CTL 细胞的生成,胸腺 T 细胞 IL-2 分泌增多,使幼稚 T 细胞分化为成熟  $T_H$  细胞、CTL 细胞作用增强,脾脏 T 细胞依赖区的 CTL 细胞,尤其是  $T_H$  细胞数量增加,以提高机体细胞免疫功能,进而抵抗球虫的再感染。

### 3.2 *E. necatrix* 初次感染对鸡淋巴细胞增殖功能变化的影响

本研究发现,雏鸡初次感染 *E. necatrix* 后,其胸腺及脾脏 T 细胞增殖功能,分别在感染后 14~18 d 和 10~21 d 显著高于对照雏鸡,表明细胞免疫与机体抵抗 *E. necatrix* 侵袭密切相关。T 细胞介导的细胞免疫在抗球虫免疫中处于主导地位。*E. necatrix* 侵入雏鸡肠黏膜上皮细胞后,其子孢子和第一代裂殖子可刺激 T 细胞活化、增殖、分化为  $CD_4^+$  和  $CD_8^+$  T 淋巴细胞。 $CD_4^+$  T 细胞是主要诱导群,具有  $T_H$  细胞功能,识别 MHC II 类分子相关抗原,通过产生多种细胞因子,如 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10,抑制各阶段幼虫在肠道内的寄生,从而参与机体的抗球虫免疫;上述细胞因子又可激活巨噬细胞、LAK 及 NK 等杀伤性细胞,调节免疫应答;也可辅助 B 细胞和 TCR3 细胞的免疫应答和细胞毒性反应<sup>[13,14]</sup>。因此, $CD_4^+$  T 细胞是启动和参与抗球虫免疫应答的重要免疫活性细胞之一,在球虫的保护性免疫中处于主导地位。细胞免疫机制与抗 *E. necatrix* 感染关系密切。但体液免疫在抗球虫中的作用不应被忽视<sup>[15]</sup>,本研究发现,雏鸡初次感染 *E. necatrix* 后,其法氏囊和脾脏 B 细胞增殖功能分别于感染后 14~24 d 和 14~21 d 明显高于对照雏鸡,表明雏鸡感染 *E. necatrix* 球虫后,其免疫器官的体液免疫功能也增强,细胞免疫和体液免疫两者相互协同,在抗球虫感染中发挥十分重要的作用。

### 参考文献:

[1] 索 勋,李国清. 鸡球虫病学[M]. 北京:中国农业大

学出版社,1998.

- [2] Williams R B. A compartmentalized model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry [J]. Int J Parasitol, 1999,29(8): 1 209~1 229.
- [3] 马立农,陈杖榴. 鸡球虫耐药性的研究进展[J]. 中国兽药杂志,1999,33(4):47~51.
- [4] 吴绍强,蒋金书,刘 群,等. 鸡球虫疫苗研究进展[J]. 畜牧兽医学报,2005,36(1):1~5.
- [5] 上海市医学化验所. 临床免疫学检验(上册)[M]. 上海:上海科技出版社,1986.
- [6] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65:55~63.
- [7] 宋卫民,王慧琴. 细胞因子研究方法[M]. 北京:人民卫生出版社,2000.
- [8] Lillehoj H S, Kaspers B, Jenkins M C, et al. Avian interferon and interleukins-2. A review by comparison with mammalian homologues [J]. Poult Sci, 1992, 4: 67~85.
- [9] Lillehoj H S, Ding X, Quiroz M A, et al. Resistance to intestinal coccidiosis following DNA immunization with the cloned 3-1E eimeria gene plus IL-2, IL-15, and IFN- $\gamma$ [J]. Avian Dis,2005,49:112~117.
- [10] Miyamoto T, Min W, Lillehoj H S. Kinetics of interleukin-2 production in chickens infected with *Eimeria tenella* [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2002, 25(3): 149~158.
- [11] Li G X, Lillehoj E P, Lillehoj H S. Interleukin-2 production in SC and TK chickens infected with *Eimeria tenella*[J]. Avian Dis, 2002, 46 (1): 2~9.
- [12] Choi K D, Lillehoj H S. Role of chicken IL-2 on gammadelta T-cells and *Eimeria aceroulina*-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and gammadelta T-cells[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2000, 73 (3~4): 309~321.
- [13] Lillehoj H S, Lillehoj E P. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies [J]. Avian Dis, 2000, 44(2): 408~425.
- [14] Arstila T P, Vainio O, Lassila O. Central role of  $CD_4^+$  T cells in avian immune response [J]. Poult Sci,1994, 73(7): 1 019~1 026.
- [15] Guo F C, Kwakkel R P, Williams B A, et al. Effects of mushroom and herb polysaccharides on cellular and humoral immune responses of *eimeria tenella*-infected chickens [J]. Poultry Sci, 2004,83:1 124~1 132.