

切除结膜结合淋巴组织鸡对新城疫疫苗的免疫反应 I. 局部与循环抗体检测

孙斌¹, 任风兰¹, 孙运刚¹, 徐祥顺²

(1. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 密山 158308; 2. 黑龙江省哈尔滨市家畜疫病防治院)

摘要: 实验将 60 只 1 日龄健康雏鸡随机分为 A、B、C 3 组。A 组为 CALT 缺失组, B 组为免疫组, C 组为非免疫对照组。A 组于 1 日龄手术切除下眼睑结膜, A、B 两组于 12 日龄结扎鼻泪管后进行点眼免疫接种新城疫克隆 30 疫苗。23 日龄时, 收集 A、B、C 各实验组鸡的血清和泪液, 做红细胞凝集抑制试验 (HI 试验)、酶联免疫吸附试验 (ELISA)。比较观察各实验组雏鸡血清和泪液抗体 HI 效价与 IgA、IgG、IgM 含量的变化特点。结果, 1 日龄手术切除下眼睑结膜后造成鸡 CALT 缺失, CALT 缺失鸡点眼免疫后, 泪液抗体 HI 效价与 IgA、IgG、IgM 含量比免疫组雏鸡低。但对雏鸡的抗体生成的规律并不产生影响。故实验证实了 CALT 对眼区局部抗体的产生及其种类有重要的调控作用, 协同哈氏腺完成局部免疫的功能。

关键词: 结膜结合淋巴组织; 粘膜免疫; 雏鸡; 新城疫

中图分类号: S858.31

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2002)06-0602-04

鸡结膜结合淋巴组织 (CALT) 功能的确定具有重要的免疫学意义, 可为点眼免疫有效性提供理论依据。点眼免疫方法在养鸡业生产中已广泛应用, 并行之有效地预防了一些传染病 [如新城疫 (ND)、传染性支气管炎 (IB) 等]。但其有效性理论依据尚不清楚^[13]。在以往眼周局部免疫研究中, 较注重禽类眼区特有免疫器官哈德氏腺 (Harderian gland)。现有的研究报和材料表明, 鸡的 CALT 形态学特征使得其易于暴露在环境抗原中, 并很可能是最初接触和摄取抗原的部位, 抗原经处理后提交给未成熟的淋巴细胞, 可能导致这些细胞分化成为 IgA 生成浆细胞定居在粘膜表面并分泌 IgA, 经转运至局部上皮表面和哈氏腺^[14]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 1 日龄健康肉雏鸡 60 只, 由黑龙江省哈尔滨红旗种鸡场提供。雏鸡出生后注射鸡马立克氏病弱毒疫苗。所有雏鸡于 12 日龄新城疫疫苗免疫前, 不注射其它疫苗。

1.1.2 HI 与 ELISA 检测材料及设备: 96 孔 V 型微量反应板, 稀释棒, 5~50 ul 八道微量移液器, 振荡器。

收稿日期: 2001-08-21

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (C9723)

作者简介: 孙斌 (1966-), 男, 辽宁大连, 副教授, 硕士, 从事动物疾病病理学工作。

酶标反应板, ELISA 检测仪。

1.1.3 试剂: 鸡新城疫标准抗原由本校微生物教研室提供, 新城疫 (ND) 克隆 30 弱毒苗由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所生产, 846 麻醉剂, 盐酸普鲁卡因, 肾上腺素, 生理盐水, 1% 鸡红细胞悬液, 红细胞稀释液, 3% 硼酸, H₂O₂, DAB, H₂SO₄, pH7.4 PBST, pH9.6 碳酸缓冲液。

ZYMED 公司 SP-9001 型试剂盒 (正常山羊血清工作液、生物素标记羊抗兔 IgG 工作液、辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液), 兔抗鸡 IgA、兔抗鸡 IgG 和兔抗鸡 IgM 由东北农业大学动物医学系提供。

1.1.4 眼科手术器械: 直眼科镊、弯眼科镊、自制手术刀^[10, 12]、1 ml 注射器。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计: 将实验鸡随机分为 A、B、C 三组, 每组 20 只。A 组, 即 CALT 缺失组, 1 日龄时切除双侧 CALT。12 日龄时结扎鼻泪管并用新城疫克隆 30 疫苗进行点眼免疫, 23 日龄时收集血清、泪液和胆汁。B 组, 即结扎鼻泪管免疫组, 此组在 12 日龄时用新城疫克隆 30 疫苗进行点眼免疫, 免疫前结扎鼻泪管, 23 日龄时收集血清、泪液和胆汁。C 组, 即非免疫对照组, 此组与其它两组隔离, 单独饲养, 23 日龄时收集血清、泪液和胆汁。

1.2.2 手术: 预先将 846 合剂原液用生理盐水作 20 倍稀释, 每只 1 日龄雏鸡胸肌注射 0.2 ml, 注射后,

注意观察呼吸及心跳,且勿仰卧,以防窒息死亡^[10]。手术部位和手术器械都用 3% 硼酸消毒,不可使用强刺激性消毒液,否则,术后眼部炎症反应强烈而持久,不易痊愈。注射 846 药液 10 min 后即可手术。

手术时,使雏鸡右侧卧,将左下眼睑外翻暴露结膜的平台部和纵行皱褶,用弯眼科镊将结膜轻轻提起,用自制的手术刀将结膜平台部和皱褶部一同切除,术后用 3% 硼酸局部消毒。术后可往雏鸡眼中滴加肾上腺素或去甲肾上腺素来收缩结膜的血管以利于止血。手术过程中可用盐酸普鲁卡因喷滴作局部麻醉。切除右下眼睑 CALT 方法同上^[12]。

1.2.3 血清、泪液、胆汁的收集: 23 日龄时, A、B、C 三组的雏鸡分别随机选取 10 只进行心脏采血 0.5~1.0 ml, 保存于 1.5 ml 的微型离心管内, 室温静置 12 h 或在 37℃ 恒温箱内 30 min 析出血清, 对没有析出血清的标本可进行离心提取。用氨水刺激的方法收集泪液^[9]。胆汁则在剖杀后采取。

1.2.4 HI 试验与 ELISA 检测方法: HI 试验与 ELISA 按常规方法进行。

1.2.5 统计方法: A、B、C 三组血清、泪液和胆汁抗体 HI 效价以及各种免疫球蛋白的含量用多元统计分析检验相互之间差异是否显著。

2 结果

2.1 血清、泪液和胆汁抗体 HI 效价 按常规方法

检测血清、泪液和胆汁抗体 HI 效价结果如表 1 所示。

表 1 血清、泪液和胆汁抗体 HI 效价
Table 1 HI titers of sera and tear in the groups

分组 Group	AS23	AL23	AH23	BS23	BL23	BH23	CS23	CL23	CH23
HI 效价 Titers	4.90	4.10	5.35	5.00	6.80	5.60	2.25	1.80	1.50

注: 表中数值为 \log_2 的对数, S 代表血清, L 代表泪液, H 代表胆汁。Note: the numeral values in this table were logarithm of \log_2 , S stands for serum, L stands for tear and H stands for bile.

A 组血清 HI 效价平均值为 4.90; B 组血清 HI 效价平均值为 5.00; C 组血清 HI 效价平均值为 2.25。A 和 B 组血清 HI 效价明显高于 C 组差异极显著 ($P < 0.01$), B 组血清 HI 效价高于 A 组, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。A 组泪液 HI 效价平均值为 4.10; B 组泪液 HI 效价平均值为 5.35; C 组泪液 HI 效价平均值为 1.80。A、B 组泪液 HI 效价明显高于 C 组差异极显著 ($P < 0.01$), B 组泪液 HI 效价高于 A 组差异极显著 ($P < 0.05$)。A 组和 B 组胆汁 HI 效价平均值明显高于 C 组差异显著 ($P < 0.01$), B 组胆汁 HI 效价高于 A 组差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.2 血清、泪液和胆汁各种免疫球蛋白含量 ELISA 检测结果 A、B、C 各组雏鸡血清、泪液、胆汁中 IgA、IgG、IgM 含量 ELISA 检测结果见表 2、表 3 和表 4。

表 2 血清、泪液和胆汁中 IgA 含量
Table 2 IgA content in sera, tear and bile

分组 Group	AS23	AL23	AH23	BS23	BL23	BH23	CS23	CL23	CH23
IgA 含量 Content	0.491	0.796	0.748	0.717	1.208	0.947	0.199	0.164	0.167

注: S 表示血清, L 表示泪液, H 表示胆汁。Note: S stands for serum, L stands for tear

表 3 血清、泪液和胆汁中 IgG 含量
Table 3 IgG content in sera, tear and bile

分组 Group	AS23	AL23	AH23	BS23	BL23	BH23	CS23	CL23	CH23
IgG 含量 Content	0.633	0.802	0.483	0.665	1.076	0.503	0.330	0.333	0.277

注: S 表示血清, L 表示泪液, H 表示胆汁。Note: S stands for serum, L stands for tear

表 4 血清、泪液和胆汁中 IgM 含量
Table 4 IgM content in sera, tear and bile

分组 Group	AS23	AL23	AH23	BS23	BL23	BH23	CS23	CL23	CH23
IgM 含量 Content	0.762	0.601	0.668	0.777	1.048	0.737	0.206	0.176	0.172

注: S 表示血清, L 表示泪液, H 表示胆汁。Note: S stands for serum, L stands for tear

3 讨论

3.1 B组雏鸡血清HI效价显著高于C组而与A组无显著差异,泪液和胆汁HI效价明显高于A组和C组($P < 0.05$, 差异显著)。说明, CALT 不仅是抗原接触的诱导部位, 而且还是免疫应答的效应部位。本实验证实了 CALT 既是眼区重要的免疫应答组织, 又对全身的循环抗体的产生起着调控作用。根据实验结果, A组血清HI效价低于B组, 但仍高于C组, 这表明眼区还有其它免疫应答组织的存在。

此次实验采用双侧切除雏鸡 CALT 的方法, 其血液循环抗体HI效价水平下降程度比以往单侧切除 CALT 雏鸡稍大而明显^[10, 12]。

3.2 经 ELISA 检测, CALT 缺失组雏鸡(A组)血清、泪液和胆汁的 IgA 含量均明显($P < 0.01$), 低于免疫组(B组)雏鸡而高于对照组(C组)雏鸡($P < 0.01$)。这就说明, CALT 在鸡的局部免疫中, IgA 的产生起着重要的作用, 对循环 IgA 的产生也有一定的影响。因此, CALT 是雏鸡眼区局部免疫极其重要的抗原诱导部位, 但不是唯一的。

3.3 ELISA 检测, CALT 缺失组雏鸡(A组)泪液的 IgG 含量均明显($P < 0.01$) 低于免疫组(B组)雏鸡而高于对照组(C组)雏鸡($P < 0.01$)。此结果表明, CALT 对雏鸡眼区局部 IgG 的产生也起着重要的作用。但 CALT 缺失组雏鸡(A组)血清、胆汁的 IgG 含量均低于免疫组(B组)雏鸡($P > 0.05$) 而高于对照组(C组)雏鸡($P < 0.01$, 差异极显著)。这就说明, CALT 对雏鸡的循环 IgG 的产生无明显影响。

3.4 根据 ELISA 检测结果, CALT 缺失组雏鸡(A组)泪液的 IgM 含量均明显低于免疫组(B组)雏鸡而高于对照组(C组)雏鸡, 差异都极显著($P < 0.01$)。此结果表明, CALT 对雏鸡眼区局部 IgM 的产生起着重要的作用。但 CALT 缺失组雏鸡(A组)血清、胆汁的 IgM 含量与免疫组(B组)雏鸡差异不显著($P > 0.05$)。这就说明, CALT 对雏鸡的循环 IgM 的产生无明显影响。

4 结论

4.1 CALT 既是眼区重要的免疫应答组织, 又对全身的循环抗体的产生起着调控作用。

4.2 CALT 对局部抗体(IgA、IgG、IgM)和循环 IgA 的产生有重要作用, 而对循环 IgG、IgM 的产生无明显

作用。

参考文献:

- [1] Fix A S, Arp L H. Conjunctiva associated Lymphoid Tissue (CALT) in Normal and Bordetella avium Turkeys [J]. Vet Pathol, 1989, 26(3): 222~ 230.
- [2] Fix A S, DVM, PHD, Arp L H. Morphologic characterization of conjunctiva associated lymphoid tissue in chickens [J]. Vet Res, 1991, 52(11): 1852~ 1859.
- [3] Axelord A J, Chandler J W. Morphologic characteristic of conjunctiva lymphoid tissue in the rabbit. In: Immunology and Immunopathology of the eye proceedings of the 2nd International symposium. A. M. Silverstele and G. R. O' Connor. ed Masson and Cie, Newyork. 292~ 301.
- [4] Franklin R M, Renu L E. Conjunctiva associated lymphoid tissue: evidence for a role in the secretory immune system. Inv [J]. Ophthalmol Vis Sci, 1984, 25: 181~ 187.
- [5] Bienenstock J, Dean Befus. Gut and bronchus associated lymphoid tissue [J]. Am J Anat, 1984, 170, 437~ 445.
- [6] Fix A S, Arp L H. Quantification of particle uptake by Conjunctiva associated lymphoid tissue (CALT) in turkeys [J]. Avian Diseases, 1991, 35(1): 100~ 106.
- [7] Fix A S, Arp L H. Quantification of particle uptake by conjunctiva associated lymphoid tissue (CALT) in chickens [J]. Avian Diseases, 1991, 35(1): 174~ 179.
- [8] Chandler J W, Axelord A J. Conjunctiva associated lymphoid tissue: a probable component of the mucosa associated lymphoid tissue system [M]. In: Immunologic Diseases of the Mucous Membranes. O' Conner G. R. editor. Newyork, Masson Publishing USA, 1980, 63~ 70.
- [9] 祁保民. 雏鸡结膜结合淋巴组织 (CALT) 的超微结构及其摄取抗原功能的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 1995, 26(6): 545~ 550.
- [10] 孙斌, 等. 鸡结膜结合淋巴组织对新城疫疫苗点眼免疫应答 [J]. 畜牧兽医学报, 1997, 28(3), 245~ 250.
- [11] 孙斌, 等. 新城疫疫苗点眼对雏鸡结膜结合淋巴组织的影响 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 1996, 8(4), 82~ 85.
- [12] 孙斌, 等. 手术切除结膜结合淋巴组织 (CALT) 的程序与结果 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 1995, 8(2), 102~ 105.
- [13] Ratansethahankul C, Cumming R B. Immune response of chickens to various routes of administration of Australian bronchitis vaccine [J]. Australian Veterinary Journal, 1983, 60, 214~ 216.
- [14] 王彩虹, 陈明勇, 高齐瑜. 禽类哈德氏腺免疫功能研究进展 [D]. 动物病理学研究专集, 中国农业大学出版社, 1997, 230~ 232.

The Effect of Immune Response of Conjunctiva-associated Lymphoid Tissue (CALT) to Eye-drop Application of the Newcastle Disease Vaccine in Chickens I. Test of Local and Circle Antibody

SUN Bin, REN Feng-lan, SUN Yung-ang, XU Xiang-shun

(Animal Science and Technology College of Heilongjiang August 1st Land Reclamation University, Mishan)

Abstract: Seventy-five one-day old male chickens were divided into equal groups A, B and C at random. Chickens in groups A were removed lower eyelid conjunctivas by surgically at one day. Chickens in groups A and B were given Newcastle Disease Clone 30 vaccine by eye-drop application at eleven days old. At eighteen days old, sera of the chickens of A and B were collected for microhemagglutination inhibition (HI) test. Group C was used as control and at eighteen days old sera was collected also. At the same time of collecting sera, conjunctiva-associated lymphoid tissue and Harderian glands were collected for all the chickens. Their HI titers and immune cells were observed and compared. As a result, the HI titers of group A were 2 log₂ lower than those of vaccinated normal chickens (group B), the number of immune cells in Harderian gland reduced also. But the CALT of group B bring out earlier and grow faster than group A. Experiment results indicate that CALT is one of most important immune response tissue in ocular region, cooperating with Harderian gland, conducts local immune function. At the same time, removal lower eyelids conjunctiva surgically at one day can result losing of CALT of chickens. The chickens of losing CALT are good models for the study of mucosa immune.

Key words: Conjunctiva-associated lymphoid tissue; Newcastle mucosa immune disease; Chickens; Harderian gland

第四军医大学实验动物中心 SPF 实验部向国内外上等级课题开放公告

第四军医大学实验动物中心是集繁育、科研、教学及成果转化为一体的在编单位。中心的 SPF 实验楼有 29 个独立单元, 共 3700 m²。包括洁净等级实验室、无菌实验室、水平层流实验室、P3 级生物安全实验室、转基因实验室、肿瘤细胞实验室等。现有仪器设施: CO₂ 培养箱、百级净化工作台、液氮罐、高速离心机、转基因显微操作仪、流式细胞仪、断针仪、磨针仪、解剖显微镜、PCR 仪、负压生物安全柜等仪器设施。可提供的动物: 裸鼠、C57、BALB/C、昆明小鼠、糖尿病小鼠、Wister SD 大鼠、高血压大鼠等 20 个不同品系品种和普通清洁 SPF 级实验动物。

可提供细胞株与荷瘤株: 白血病瘤细胞株 (L₁₂₁₀); 胃癌细胞株 (SGC-7901); 宫颈癌 (Hela); 肠癌细胞 (SW480; CW-2; CoLo-320 LoVo); 骨髓瘤细胞株 (SP₂₀) 大鼠肝癌细胞株 (Walker; CBHR-7919); 皮肤黑色素瘤细胞株 (A375); 乳腺癌细胞株 (SKBr; ER-30; MCF-7); 等。2002 年 8 月经省科技厅批准《陕西省实验动物质量监督检测中心》正式挂牌成立于我中心, 本中心将以“三满意”、“五保证”为服务宗旨, 竭诚欢迎国内外科研院所、校、所的科技人员使用本中心提供的上等级动物、荷瘤鼠与瘤株细胞扩充专用转瓶机、温室和实验室及其设备、设施, 并欢迎各种项目的合作。

电话: 饲育部: (029) 3374787; 实验部: (029) 3374792 李 杰 杜蒙; 网址: <http://www.fmmu.sn.cn/web/anim> 传真: (029) 3291025 地址: 西安市长乐西路第四军医大学实验动物中心 邮编: 710032。