

## 4 种多糖对免疫雏鸡抗体效价和 T 淋巴细胞的影响

邱妍<sup>1</sup>, 崔保安<sup>2</sup>, 胡元亮<sup>1\*</sup>, 张红英<sup>2</sup>, 王远阁<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 河南农业大学牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 450 羽 14 日龄蛋公鸡随机均分成 9 组, 用鸡新城疫-传染性支气管炎二联 (NDV-IBV) 弱毒苗首次免疫的同时, 8 个试验组分别肌肉注射高、低剂量的黄芪多糖、板蓝根多糖、牛膝多糖和山药多糖溶液, 对照组注射生理盐水, 每天 1 次, 连续 3 d。28 日龄用 NDV-IBV 灭活油乳苗再次免疫。各组分别于首次免疫后第 7、14、21、28、35、42 和 49 天随机抽取 8 羽翼下静脉采血, 分离血清, 用微量法测定新城疫血凝抑制 (HI) 抗体效价; 于首次免疫后第 10、20、30、40 和 50 天每组随机抽取 5 羽心脏采血, 分离淋巴细胞, 分别用 MTT 法和流式细胞仪双染色法测定淋巴细胞增殖和 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T 淋巴细胞含量的动态变化。结果表明, 4 种多糖均能显著提高新城疫 HI 抗体效价, 促进外周血 T 淋巴细胞增殖, 提高 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T 淋巴细胞含量和 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 值, 低剂量的黄芪多糖和板蓝根多糖的效果最好。

**关键词:** 黄芪多糖; 板蓝根多糖; 牛膝多糖; 山药多糖; 抗体效价; T 淋巴细胞

中图分类号: S853.74 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2008) 01-0077-05

## Effects of four polysaccharides on antibody titer and T lymphocyte in vaccinated chicken

QIU Yan<sup>1</sup>, CUI Bao-an<sup>2</sup>, HU Yuan-liang<sup>1\*</sup>, ZHANG Hong-ying<sup>2</sup>, WANG Yuan-ge<sup>2</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Four hundreds and fifty 14 day-old chickens were randomly assigned into equal nine groups and all chickens were vaccinated with NDV-IBV live virus vaccine. At the same time as the first vaccination, the chickens in groups 1 to 8 were intramuscularly injected respectively with astragalus polysaccharide (APS), isatis root polysaccharide (IRPS), achyranthes root polysaccharide (ARPS) and Chinese yam polysaccharide (CYPS) at high and low dosages, group 9 (control group), saline, once a day for three successive days, secondly with NDV-IBV oil adjuvant vaccine at 28 days of age. On days 7, 14, 21, 28, 35, 42 and 49 after the first vaccination, 8 chickens' bloods from each group were sampled for determination of serum ND-HI antibody titer by micro-method. On days 10, 20, 30, 40 and 50 after the first vaccination, 5 chickens' bloods per group were collected to determine the proliferation of peripheral T lymphocyte by MTT method and the content of CD<sub>4</sub><sup>+</sup> and CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T cells by flow cytometry and double-color-staining method. The results showed that the four polysaccharides could significantly enhance the antibody titers, promote the proliferation of peripheral T lymphocyte, raise the content of CD<sub>4</sub><sup>+</sup> and CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T cells and ratio of CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup>, the effect of APS and IRPS at low dosage were best.

**Key words:** astragalus polysaccharide (APS); isatis root polysaccharide (IRPS); achyranthes root polysaccharide (ARPS); Chinese yam polysaccharide (CYPS); antibody titer; T lymphocyte

近年来研究发现, 许多中药尤其是补益类中药具有免疫促进作用, 多糖是其活性成分之一, 对机体的特异性和非特异性免疫功能具有增强作用, 其作用机制是通过刺激单核-巨噬细胞系统的吞噬功能, 促进淋巴细胞增殖和转化, 促进抗体生成, 诱导细胞因子的分泌, 激活补体系统等途径实现对机体免疫系统功能的调节<sup>[1]</sup>。而且多糖是天然产物, 对动物及人类安全, 无毒副作用, 因此受到人们的普遍重视<sup>[2-3]</sup>。本试验从黄芪、板蓝根、怀牛膝和怀山药 4 种中草药中提取黄芪多糖 (APS)、板蓝根多糖 (IRPS)、牛膝多糖 (ARPS) 和山药多糖 (CYPS), 配合鸡新城疫-传染性支气管炎二联 (NDV-IBV) 疫苗免疫雏鸡, 通过测定新城疫抗体效价、T 淋巴细胞增殖、外周血 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 和 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 淋巴细胞百分率及 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 值的动态变化比较 4 种多糖的免疫增强效果, 旨在为开发多糖类免疫增强剂提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 多糖准备

黄芪、板蓝根、怀牛膝和怀山药购于河南省医药公司。分别用水煎醇沉法提取 APS、IRPS、ARPS 和 CYPS, 经硫酸-蒽酮法测定其净含量分别为 65%、56%、54% 和 73%, 然后按净含量用去离子水稀释成高 (H)、低 (L) 2 种质量浓度 ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ):  $\text{APS}_\text{H} 4$ ,  $\text{APS}_\text{L} 2$ ;  $\text{IRPS}_\text{H} 3$ ,  $\text{IRPS}_\text{L} 1.5$ ;  $\text{ARPS}_\text{H} 6$ ,  $\text{ARPS}_\text{L} 3$ ;  $\text{CYPS}_\text{H} 6$ ,  $\text{CYPS}_\text{L} 3$ , 常规高压消毒后备用。

### 1.2 主要试剂

鸡新城疫-传染性支气管炎二联 (NDV-IBV) 弱毒苗和鸡 NDV-IBV 油乳剂灭活苗, 由河南省兽医总站提供, 批号 315、200551; 新城疫标准抗原, 由河南农业大学微生物实验室提供; 犊牛血清, 郑州佰安生物工程有限公司产品, 批号 200511003; RPMI 1640 培养液, Gibco 公司产品, 按说明书用三蒸水配制, 临用前加小牛血清使终含量达 10% (体积分数), 青霉素、链霉素含量分别达  $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 伴刀豆素球蛋白 (ConA), 购自华美生物工程公司, 用无血清 RPMI 1640 培养液配制成  $0.025 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 过滤除菌, 分装,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT), Amresco 公司产品, 用 pH 7.4 的 PBS 配成  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 过滤除菌, 避光  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存; 淋巴细胞分离液, 上海华精生物科技发展公司产品, 批号 051106; 二甲基亚砜, 分析纯; 鼠抗鸡  $\text{CD}_3$ -FITC、 $\text{CD}_4$ -PE、 $\text{CD}_{8\alpha}$ -PE, 鼠抗人  $\text{IgG}_1$ -FITC 和  $\text{IgG}_1$ -PE 单克隆抗体, 购自晶美生物工程有限公司。

### 1.3 动物分组及处理

1 日龄罗曼蛋公鸡 (购自河南省郑州市瑞祥孵化厂) 饲养至 14 日龄 (母源抗体效价为  $4.5 \log_2$ , 平均体重为  $97.6 \text{ g}$ ), 随机分为 9 组, 每组 50 只, 全部用 2 羽份的 NDV-IBV 弱毒苗点眼、滴鼻。同时, 8 个试验组分别肌肉注射 2 种浓度的多糖, 每羽  $0.5 \text{ mL}$ , 对照组注射等量生理盐水, 每天 1 次, 连续 3 d; 28 日龄每羽肌肉注射  $0.3 \text{ mL}$  NDV-IBV 油乳剂灭活苗进行二免。分别于首次免疫后第 7、14、21、28、35、42 和 49 天, 每组随机抽取 8 羽翼下静脉采血  $0.5 \text{ mL}$ , 分离血清, 用微量血凝抑制法 (HI) 测定鸡新城疫 HI 抗体滴度<sup>[4]</sup>; 首次免疫后第 10、20、30、40 和 50 天, 每组分别随机抽取 5 羽经心脏采血  $5 \text{ mL}$ , 柠檬酸钠抗凝, 测定 T 淋巴细胞增殖和 T 淋巴细胞亚群。

### 1.4 淋巴细胞增殖测定方法

用 MTT 法<sup>[5]</sup>测定淋巴细胞增殖。分离淋巴细胞, 用 RPMI 1640 培养液调整细胞含量为  $5.0 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ , 加入到 96 孔细胞培养板中, 每孔  $80 \mu\text{L}$ , 再加  $20 \mu\text{L}$  ConA, 每个样品重复 4 孔, 然后置于  $39.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 44 h 后取出; 每孔再加入 MTT 溶液  $20 \mu\text{L}$ , 继续培养 4 h 后取出弃去培养液, 每孔加二甲基亚砜  $100 \mu\text{L}$ , 在酶联免疫仪上检测  $570 \text{ nm}$  处的吸光值 ( $A_{570}$ )。

### 1.5 淋巴细胞亚群测定方法

同上方法分离淋巴细胞, 用 PBS 溶液将细胞数调至  $5.0 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。一管加入鼠抗鸡  $\text{CD}_3$ -FITC、 $\text{CD}_4$ -PE 单克隆抗体各  $10 \mu\text{L}$ , 另一管加入  $\text{CD}_3$ -FITC、 $\text{CD}_{8\alpha}$ -PE 单克隆抗体各  $10 \mu\text{L}$ , 相应对照管加入鼠抗人  $\text{IgG}_1$ -FITC、 $\text{IgG}_1$ -PE 单克隆抗体各  $10 \mu\text{L}$ , 再分别加入淋巴细胞悬液  $50 \mu\text{L}$ , 混匀,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  避光作用 20 min。加入 PBS 溶液  $500 \mu\text{L}$ , 混匀, 室温避光作用 10 min。重悬细胞, 流式细胞仪检测<sup>[6]</sup>。

### 1.6 数据处理

数据以  $\bar{x} \pm SD$  表示, 用 SPSS 11.0 软件进行 Duncan's 多重分析比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 新城疫抗体效价的动态变化

首次免疫后第 7 天, 各组的抗体效价差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 第 14 天,  $\text{APS}_\text{L}$  和  $\text{IRPS}_\text{L}$  组的抗体效价显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 第 21 天,  $\text{APS}_\text{L}$ 、 $\text{IRPS}_\text{L}$  和  $\text{CYPS}_\text{H}$  组的抗体效价显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 第 28 天, 除  $\text{APS}_\text{H}$  和  $\text{CYPS}_\text{L}$  组外其他 6 个组的抗体效价显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 第 35 天, 除  $\text{ARPS}_\text{L}$  和  $\text{CYPS}_\text{L}$  组外其他 6 个组的抗体效价显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 第 42、49 天,  $\text{APS}_\text{L}$ 、 $\text{IRPS}_\text{L}$ 、 $\text{ARPS}_\text{H}$  和  $\text{CYPS}_\text{H}$  组的抗体效价显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。表明 4 种多糖在适当的剂

量下能显著提高疫苗的抗体效价，低剂量的 APS 和 IRPS 的效果较好。

表 1 各组抗体效价的动态变化 ( $\log_2$ )

Table 1 Dynamic changes of antibody titer in every group ( $\log_2$ )

组别 Group	首次免疫后时间/d Time after the first vaccination						
	7	14	21	28	35	42	49
APS <sub>H</sub>	5.5 ± 0.51 <sup>a</sup>	6.8 ± 0.76 <sup>ab</sup>	11.4 ± 0.49 <sup>ab</sup>	11.3 ± 0.47 <sup>ab</sup>	11.8 ± 0.29 <sup>b</sup>	9.8 ± 0.63 <sup>abcd</sup>	8.9 ± 0.41 <sup>ab</sup>
APS <sub>L</sub>	6.0 ± 0.53 <sup>a</sup>	7.0 ± 0.57 <sup>b</sup>	12.3 ± 0.61 <sup>b</sup>	12.0 ± 0.50 <sup>b</sup>	12.3 ± 0.61 <sup>b</sup>	10.5 ± 0.50 <sup>d</sup>	9.6 ± 0.54 <sup>d</sup>
IRPS <sub>H</sub>	5.4 ± 0.94 <sup>a</sup>	6.6 ± 0.45 <sup>ab</sup>	11.6 ± 0.48 <sup>abc</sup>	11.5 ± 0.63 <sup>b</sup>	11.7 ± 0.44 <sup>b</sup>	9.8 ± 0.63 <sup>abcd</sup>	8.8 ± 0.65 <sup>ab</sup>
IRPS <sub>L</sub>	5.9 ± 0.87 <sup>a</sup>	6.9 ± 0.57 <sup>b</sup>	12.2 ± 0.59 <sup>b</sup>	12.0 ± 0.25 <sup>b</sup>	12.1 ± 0.25 <sup>b</sup>	10.3 ± 0.57 <sup>cd</sup>	9.5 ± 0.36 <sup>cd</sup>
ARPS <sub>H</sub>	5.3 ± 0.81 <sup>a</sup>	6.6 ± 0.41 <sup>ab</sup>	11.7 ± 0.41 <sup>abc</sup>	11.5 ± 0.50 <sup>b</sup>	11.7 ± 0.83 <sup>b</sup>	10.2 ± 0.64 <sup>cd</sup>	9.4 ± 0.48 <sup>cd</sup>
ARPS <sub>L</sub>	6.1 ± 0.66 <sup>a</sup>	6.4 ± 0.48 <sup>ab</sup>	11.6 ± 0.45 <sup>abc</sup>	11.4 ± 0.46 <sup>b</sup>	11.5 ± 0.74 <sup>ab</sup>	9.6 ± 0.41 <sup>abc</sup>	8.8 ± 0.69 <sup>ab</sup>
CYPS <sub>H</sub>	6.0 ± 0.91 <sup>a</sup>	6.7 ± 0.61 <sup>ab</sup>	11.9 ± 0.48 <sup>bc</sup>	11.8 ± 0.62 <sup>b</sup>	11.9 ± 0.73 <sup>b</sup>	10.0 ± 0.50 <sup>bcd</sup>	9.1 ± 0.77 <sup>bcd</sup>
CYPS <sub>L</sub>	5.8 ± 0.56 <sup>a</sup>	6.4 ± 0.49 <sup>ab</sup>	11.7 ± 0.81 <sup>abc</sup>	11.3 ± 0.56 <sup>ab</sup>	11.5 ± 0.75 <sup>ab</sup>	9.4 ± 0.47 <sup>ab</sup>	9.0 ± 0.81 <sup>abc</sup>
Control	5.5 ± 0.31 <sup>a</sup>	6.1 ± 0.49 <sup>a</sup>	11.0 ± 0.73 <sup>a</sup>	10.6 ± 0.47 <sup>a</sup>	10.7 ± 0.67 <sup>a</sup>	9.1 ± 0.74 <sup>a</sup>	8.3 ± 0.52 <sup>a</sup>

注：1) APS：黄芪多糖 Astragalus polysaccharide；IRPS：板蓝根多糖 Isatis root polysaccharide；ARPS：牛膝多糖 Achyranthes root polysaccharide；CYPS：山药多糖 Chinese yam polysaccharide。H：High dosage；L：Low dosage。

2) 同列数据没有相同字母者差异显著 ( $P < 0.05$ )。The same column data marked without the same superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ )。The same as follows.

### 2.2 T 淋巴细胞增殖的动态变化

首次免疫后第 10 天，APS<sub>L</sub>、IRPS<sub>L</sub>、ARPS<sub>H</sub> 和 CYPS<sub>H</sub> 组的  $A_{570}$  值显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )；第 20 天，APS<sub>H</sub>、APS<sub>L</sub>、IRPS<sub>L</sub>、ARPS<sub>H</sub> 和 CYPS<sub>H</sub> 组的  $A_{570}$  值显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )；第 30、40 和 50 天，除 ARPS<sub>L</sub> 和 CYPS<sub>L</sub> 组外，其他 6 个组的  $A_{570}$  值显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

从试验组  $A_{570}$  值峰值出现的时间看，APS<sub>H</sub>、APS<sub>L</sub>、IRPS<sub>H</sub> 和 IRPS<sub>L</sub> 组在免疫后第 30 天，其他 4 组在第 40 天。比较各组  $A_{570}$  值峰值从大到小依次为：IRPS<sub>L</sub>、APS<sub>L</sub>、ARPS<sub>H</sub>、CYPS<sub>H</sub>、ARPS<sub>L</sub>、IRPS<sub>H</sub>、APS<sub>H</sub>、CYPS<sub>L</sub>，说明低剂量的 IRPS 促进淋巴细胞增殖效果最好，低剂量的 APS 和高剂量的 ARPS、CYPS 效果较好。

表 2 各组 T 淋巴细胞增殖的动态变化 ( $A_{570}$  值)

Table 2 Dynamic changes of T lymphocyte proliferation in every group ( $A_{570}$  value)

组别 Group	首次免疫后时间/d Time after the first vaccination				
	10	20	30	40	50
APS <sub>H</sub>	0.262 ± 0.042 <sup>ab</sup>	0.378 ± 0.020 <sup>b</sup>	0.447 ± 0.010 <sup>b</sup>	0.443 ± 0.007 <sup>ab</sup>	0.425 ± 0.015 <sup>ab</sup>
APS <sub>L</sub>	0.291 ± 0.032 <sup>b</sup>	0.440 ± 0.045 <sup>c</sup>	0.499 ± 0.054 <sup>bc</sup>	0.494 ± 0.019 <sup>b</sup>	0.478 ± 0.030 <sup>bc</sup>
IRPS <sub>H</sub>	0.257 ± 0.029 <sup>ab</sup>	0.364 ± 0.016 <sup>ab</sup>	0.453 ± 0.020 <sup>b</sup>	0.449 ± 0.018 <sup>ab</sup>	0.434 ± 0.032 <sup>ab</sup>
IRPS <sub>L</sub>	0.298 ± 0.048 <sup>b</sup>	0.435 ± 0.015 <sup>c</sup>	0.502 ± 0.032 <sup>c</sup>	0.497 ± 0.015 <sup>b</sup>	0.481 ± 0.015 <sup>c</sup>
ARPS <sub>H</sub>	0.272 ± 0.020 <sup>b</sup>	0.390 ± 0.016 <sup>b</sup>	0.417 ± 0.015 <sup>b</sup>	0.488 ± 0.010 <sup>b</sup>	0.485 ± 0.033 <sup>c</sup>
ARPS <sub>L</sub>	0.259 ± 0.017 <sup>ab</sup>	0.356 ± 0.028 <sup>ab</sup>	0.381 ± 0.030 <sup>ab</sup>	0.455 ± 0.016 <sup>ab</sup>	0.436 ± 0.020 <sup>ab</sup>
CYPS <sub>H</sub>	0.279 ± 0.015 <sup>b</sup>	0.392 ± 0.023 <sup>bc</sup>	0.419 ± 0.081 <sup>b</sup>	0.482 ± 0.024 <sup>b</sup>	0.479 ± 0.018 <sup>bc</sup>
CYPS <sub>L</sub>	0.260 ± 0.020 <sup>ab</sup>	0.368 ± 0.013 <sup>ab</sup>	0.393 ± 0.031 <sup>ab</sup>	0.445 ± 0.012 <sup>ab</sup>	0.431 ± 0.031 <sup>ab</sup>
Control	0.210 ± 0.021 <sup>a</sup>	0.310 ± 0.027 <sup>a</sup>	0.354 ± 0.017 <sup>a</sup>	0.382 ± 0.013 <sup>a</sup>	0.373 ± 0.027 <sup>a</sup>

### 2.3 T 淋巴细胞亚群的动态变化

**2.3.1 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群的动态变化** 首次免疫后第 10 和 20 天，APS<sub>H</sub>、APS<sub>L</sub>、IRPS<sub>L</sub>、ARPS<sub>H</sub> 和 CYPS<sub>H</sub> 组的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T 淋巴细胞百分率显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )；第 30 天，除 ARPS<sub>L</sub> 和 CYPS<sub>L</sub> 组外，其他 6 组的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T 淋巴细胞百分率显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )；第 40 天，APS<sub>L</sub>、IRPS<sub>L</sub>、ARPS<sub>H</sub> 和 CYPS<sub>H</sub> 组的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T 淋巴细胞百分率显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )；第 50 天，APS<sub>H</sub>、APS<sub>L</sub> 和 IRPS<sub>L</sub> 组的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T 淋巴细胞百分率显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。表明 4 种多糖都可以提高 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T 淋巴细胞百分率，低剂量的 APS 和 IRPS 效果最好。

表3 各组 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群的动态变化  
Table 3 Dynamic changes of CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T lymphocyte subsets in every group %

组别 Group	首次免疫后时间/d Time after the first vaccination				
	10	20	30	40	50
APS <sub>H</sub>	37.4 ± 3.87 <sup>b</sup>	38.4 ± 3.94 <sup>b</sup>	38.8 ± 4.02 <sup>b</sup>	36.2 ± 4.18 <sup>ab</sup>	38.3 ± 3.81 <sup>b</sup>
APS <sub>L</sub>	41.1 ± 3.58 <sup>b</sup>	41.6 ± 3.66 <sup>b</sup>	41.9 ± 3.55 <sup>b</sup>	40.6 ± 3.79 <sup>b</sup>	40.2 ± 3.69 <sup>b</sup>
IRPS <sub>H</sub>	36.7 ± 4.87 <sup>ab</sup>	37.2 ± 4.13 <sup>ab</sup>	40.1 ± 4.94 <sup>b</sup>	35.2 ± 4.51 <sup>ab</sup>	38.0 ± 4.29 <sup>ab</sup>
IRPS <sub>L</sub>	40.5 ± 4.36 <sup>b</sup>	40.6 ± 3.85 <sup>b</sup>	42.8 ± 3.75 <sup>b</sup>	39.6 ± 3.93 <sup>b</sup>	41.9 ± 3.71 <sup>b</sup>
ARPS <sub>H</sub>	37.9 ± 4.60 <sup>b</sup>	38.7 ± 3.99 <sup>b</sup>	39.5 ± 3.88 <sup>b</sup>	36.7 ± 4.23 <sup>b</sup>	36.8 ± 4.35 <sup>ab</sup>
ARPS <sub>L</sub>	35.8 ± 4.73 <sup>ab</sup>	35.0 ± 4.32 <sup>ab</sup>	37.5 ± 5.16 <sup>ab</sup>	34.7 ± 4.47 <sup>ab</sup>	34.6 ± 4.53 <sup>ab</sup>
CYPS <sub>H</sub>	38.0 ± 4.57 <sup>b</sup>	38.6 ± 4.21 <sup>b</sup>	39.3 ± 4.11 <sup>b</sup>	37.2 ± 4.06 <sup>b</sup>	37.3 ± 3.90 <sup>ab</sup>
CYPS <sub>L</sub>	35.3 ± 4.67 <sup>ab</sup>	37.0 ± 5.25 <sup>ab</sup>	37.8 ± 4.59 <sup>ab</sup>	34.4 ± 4.38 <sup>ab</sup>	34.6 ± 4.40 <sup>ab</sup>
Control	29.5 ± 4.76 <sup>a</sup>	30.0 ± 4.44 <sup>a</sup>	30.7 ± 4.60 <sup>a</sup>	27.7 ± 4.20 <sup>a</sup>	30.3 ± 4.55 <sup>a</sup>

2.3.2 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群的动态变化 除在首次免疫后第20天 ARPS<sub>H</sub> 和 ARPS<sub>L</sub> 组的 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T 淋巴细胞百分率高于对照组外, 其他时间点试验组的 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T 淋巴细胞百分率都低于对照组, 但差异均不显著 ( $P > 0.05$ ) (表4)。表明4种多糖对 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T 淋巴细胞百分率的影响不显著。

表4 各组 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群的动态变化  
Table 4 Dynamic changes of CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T lymphocyte subsets in every group %

组别 Group	首次免疫后时间/d Time after the first vaccination				
	10	20	30	40	50
APS <sub>H</sub>	20.1 ± 1.92	22.1 ± 2.20 <sup>a</sup>	20.7 ± 2.31	20.2 ± 2.62 <sup>b</sup>	22.5 ± 1.83
APS <sub>L</sub>	19.3 ± 1.43	22.7 ± 1.52 <sup>a</sup>	21.5 ± 1.38	21.7 ± 1.77 <sup>ab</sup>	20.2 ± 1.57
IRPS <sub>H</sub>	19.1 ± 3.68	21.6 ± 2.52 <sup>a</sup>	22.3 ± 3.75	21.2 ± 3.31 <sup>ab</sup>	19.6 ± 2.87
IRPS <sub>L</sub>	19.5 ± 2.99	23.3 ± 1.89 <sup>a</sup>	23.1 ± 1.69	22.6 ± 2.17 <sup>ab</sup>	21.4 ± 1.61
ARPS <sub>H</sub>	18.2 ± 3.53	23.6 ± 2.26 <sup>b</sup>	21.5 ± 1.98	22.5 ± 2.78 <sup>ab</sup>	20.1 ± 2.95
ARPS <sub>L</sub>	20.9 ± 3.58	24.5 ± 2.90 <sup>b</sup>	21.3 ± 3.82	22.1 ± 3.23 <sup>ab</sup>	19.8 ± 3.37
CYPS <sub>H</sub>	19.6 ± 3.45	21.2 ± 2.70 <sup>a</sup>	21.7 ± 2.49	23.3 ± 2.39 <sup>ab</sup>	22.6 ± 2.06
CYPS <sub>L</sub>	19.0 ± 3.55	21.9 ± 3.97 <sup>a</sup>	23.2 ± 3.49	22.8 ± 3.07 <sup>ab</sup>	21.2 ± 3.14
Control	21.1 ± 3.62	23.3 ± 3.18 <sup>a</sup>	24.0 ± 3.52	25.2 ± 2.67 <sup>a</sup>	23.1 ± 3.40

2.3.3 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 值的动态变化 首次免疫后第10和40天, APS<sub>L</sub>、IRPS<sub>L</sub>、ARPS<sub>H</sub> 和 CYPS<sub>H</sub> 组的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 值显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 第20天, APS<sub>H</sub>、APS<sub>L</sub>、IRPS<sub>L</sub> 和 CYPS<sub>H</sub> 组的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 值显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 第30天, 除 ARPS<sub>L</sub> 和 CYPS<sub>L</sub> 组外, 其他6组的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 值显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 第50天, APS<sub>L</sub>、IRPS<sub>H</sub>、IRPS<sub>L</sub>、ARPS<sub>H</sub> 和 CYPS<sub>H</sub> 组的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 值显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。并且, IRPS<sub>L</sub> 组、ARPS<sub>H</sub> 组和 CYPS<sub>H</sub> 组的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 值均稍低于 APS<sub>L</sub> 组 (表5)。表明合适剂量的4种多糖都可以使 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 值显著升高, 低剂量的 APS 和 IRPS 效果最好。

表5 各组 T 淋巴细胞 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 值的动态变化  
Table 5 Dynamic changes of the ratio of T lymphocyte CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> in every group

组别 Group	首次免疫后时间/d Time after the first vaccination				
	10	20	30	40	50
APS <sub>H</sub>	1.89 ± 0.35 <sup>abc</sup>	1.74 ± 0.31 <sup>b</sup>	1.87 ± 0.22 <sup>b</sup>	1.56 ± 0.18 <sup>ab</sup>	1.70 ± 0.05 <sup>ab</sup>
APS <sub>L</sub>	2.13 ± 0.09 <sup>c</sup>	1.83 ± 0.29 <sup>b</sup>	1.95 ± 0.36 <sup>b</sup>	1.87 ± 0.37 <sup>b</sup>	1.99 ± 0.30 <sup>b</sup>
IRPS <sub>H</sub>	1.90 ± 0.50 <sup>abc</sup>	1.72 ± 0.09 <sup>ab</sup>	1.80 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.63 ± 0.25 <sup>ab</sup>	1.94 ± 0.10 <sup>b</sup>
IRPS <sub>L</sub>	2.08 ± 0.43 <sup>bc</sup>	1.74 ± 0.22 <sup>b</sup>	1.85 ± 0.20 <sup>b</sup>	1.75 ± 0.24 <sup>b</sup>	1.96 ± 0.49 <sup>b</sup>
ARPS <sub>H</sub>	1.95 ± 0.18 <sup>bc</sup>	1.64 ± 0.21 <sup>ab</sup>	1.84 ± 0.24 <sup>b</sup>	1.67 ± 0.18 <sup>b</sup>	1.83 ± 0.11 <sup>b</sup>
ARPS <sub>L</sub>	1.71 ± 0.19 <sup>ab</sup>	1.43 ± 0.13 <sup>ab</sup>	1.76 ± 0.30 <sup>ab</sup>	1.57 ± 0.28 <sup>ab</sup>	1.77 ± 0.15 <sup>ab</sup>
CYPS <sub>H</sub>	1.94 ± 0.15 <sup>bc</sup>	1.82 ± 0.30 <sup>b</sup>	1.81 ± 0.13 <sup>b</sup>	1.69 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.84 ± 0.19 <sup>b</sup>
CYPS <sub>L</sub>	1.86 ± 0.26 <sup>abc</sup>	1.68 ± 0.27 <sup>ab</sup>	1.63 ± 0.23 <sup>ab</sup>	1.51 ± 0.28 <sup>ab</sup>	1.63 ± 0.13 <sup>ab</sup>
Control	1.40 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.28 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.31 ± 0.09 <sup>a</sup>

### 3 讨论

体液免疫是由 B 淋巴细胞介导通过分泌抗体而进行的免疫应答。新城疫抗体水平是反映新城疫-传染性支气管炎二联苗免疫后鸡特异性体液免疫功能的指标。本试验结果表明合适剂量的多糖能显著增强雏鸡的特异性免疫应答反应, 提高疫苗的免疫效力, 使抗体产生早、上升速度快、高峰持续时间长。这

与Wang等<sup>[7]</sup>报道的中药有效成分复方能够增强免疫雏鸡的体液免疫是一致的。

淋巴细胞转化状态与用MTT法所测得的 $A_{570}$ 值呈正比。本试验结果表明, 4种中药多糖均能促进T淋巴细胞增殖, 并有一定的量效和时效关系。多数中药多糖在体内或体外均能促进脾细胞或ConA诱导的淋巴细胞的转化。有研究证实12种多糖对淋巴细胞有丝裂原样作用。而且大部分对有丝分裂原反应有增强作用。也有学者<sup>[8]</sup>认为亚适剂量的ConA可诱导T细胞IL-2受体表达, 使T细胞活化, 故合适剂量的中药多糖对活化的T淋巴细胞有促进增殖的作用。

T淋巴细胞两个重要的表面标志是 $CD_4^+$ 和 $CD_8^+$ , 其中 $CD_4^+$ T淋巴细胞的主要功能是分泌细胞因子, 具有诱导和增强免疫应答的作用,  $CD_8^+$ T淋巴细胞主要介导细胞毒杀伤作用<sup>[9]</sup>。 $CD_4^+$ 和 $CD_8^+$ T淋巴细胞是机体免疫调节的枢纽, 在正常值范围内当 $CD_4^+/CD_8^+$ 值高时, 表明机体处于高的免疫状态, 当 $CD_4^+/CD_8^+$ 的比例失调或缺陷时, 可导致各种免疫疾病发生。本试验所有试验组的 $CD_4^+$ T淋巴细胞含量、 $CD_4^+/CD_8^+$ 值均比对照组高, 尤其是 $APS_L$ 、 $IRPS_L$ 、 $ARPS_H$ 和 $CYPS_H$ 组显著高于对照组。表明合适剂量的多糖可以促进鸡外周血 $CD_4^+$ T淋巴细胞增殖, 从而增强细胞免疫。此外, 鸡 $CD_4^+$ T淋巴细胞还具有辅助B淋巴细胞产生抗体的作用, 从而提高体液免疫。

黄芪多糖的免疫增强作用已得到认可, 黄芪多糖注射液已经广泛应用于动物生产中。有研究报道黄芪多糖作为免疫佐剂的效果优于氢氧化铝佐剂<sup>[10]</sup>。本试验选择黄芪多糖作为参照, 观察其他3种多糖的免疫增强效果及机理, 结果表明板蓝根多糖的免疫增强效果与黄芪多糖相当, 高剂量的牛膝多糖和山药多糖也有好的免疫增强效果。

中药对机体一般都表现为双向调节作用, 可调整机体过高或过低的免疫状态。中药多糖的免疫调节作用也呈现一定的量效关系<sup>[11-12]</sup>。因此在选择多糖作为免疫增强剂时需要选择其有效剂量范围和最佳剂量。

#### 参考文献:

- [1] 陈洪亮. 植物多糖的制备及对肉仔鸡免疫功能影响的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2002
- [2] 金海丽, 许梓荣. 多糖抗病毒及免疫调节作用研究进展 [J]. 中国饲料, 2002(9): 5-7
- [3] 卢杏通, 戴镜红, 廖明. 多糖类免疫调节剂研究概况 [J]. 动物医学进展, 2003, 24(1): 10-12
- [4] Thekisoe M M O, Mbatia P A, Bisschop S P R. Different approaches to the vaccination of free ranging village chickens against Newcastle disease in Qwa-Qwa, South Africa [J]. Veterinary Microbiology, 2004, 101: 23-30
- [5] 李祥瑞, 金红, 王秀丽, 等. 以MTT比色法检测鸡脾淋巴细胞转化效果 [J]. 畜牧与兽医, 1996, 28(1): 3-5
- [6] Ashwood P, Wakefield A J. Immune activation of peripheral blood and mucosal  $CD_3^+$  lymphocyte cytokine profiles in children with autism and gastrointestinal symptoms [J]. Journal of Neuroimmunology, 2006, 173: 126-134
- [7] Wang Deyun, Hu Yuanliang, Sun Junling, et al. Comparative study on adjuvanticity of compound Chinese herbal medicinal ingredients [J]. Vaccine, 2005, 23(28): 3704-3708
- [8] 何燕, 吴雄志. 中药多糖的免疫调节作用 [J]. 四川中医, 2001, 19(2): 15-17
- [9] 孙庆申, 蔡雪晖, 童光志.  $CD_4$ 和 $CD_8$ 分子在细胞免疫中的作用及其与PRRSV感染的关系 [J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24(2): 151-152
- [10] 林树乾, 张燕, 杨少华, 等. 中药黄芪多糖的免疫佐剂作用 [J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(5): 58-61
- [11] 王德云, 胡元亮, 张宝康, 等. 几种中药成分与IL-2免疫协同作用的比较 [J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(3): 140-142
- [12] 任宇皓, 胡元亮, 刘家国, 等. 黄芪多糖、淫羊藿多糖和淫羊藿总黄酮对新城疫病毒感染细胞的影响 [J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(2): 102-105

责任编辑: 周广礼