

中药成分复方对兔外周血淋巴细胞增殖、IFN- γ 和 IL-10 的 mRNA 表达以及兔出血症疫苗免疫效果的影响

杨龙圣^{1,2}, 胡元亮¹, 薛家宾², 王芳², 王德云¹, 徐为中²

(¹ 南京农业大学动物医学院中兽医学研究室, 南京 210095; ² 江苏省农业科学院兽医研究所, 南京 210014)

摘要: 【目的】研究两个中药成分复方 (cCHMIs) 的免疫增强作用和机理。【方法】选择黄芪多糖、淫羊藿多糖、蜂胶黄酮和人参皂苷 4 种中药成分组成两个复方, 用 MTT 法和荧光定量 RT-PCR 法测定它们对兔外周血淋巴细胞增殖和 IFN- γ 、IL-10 mRNA 的表达影响; 并将两个复方作为佐剂, 配合兔出血症疫苗免疫幼兔, 以铝胶苗和无佐剂苗为对照, 分别于免疫后 7、14、21、35、49 d 用 MTT 法和血凝抑制法测定外周血淋巴细胞增殖和血清抗体的动态变化, 于免疫后 63 d 测定免疫器官指数和攻毒保护率。【结果】两个复方在体外均可以显著促进淋巴细胞增殖, 提高淋巴细胞 IFN- γ 、IL-10 mRNA 的表达; 作为佐剂, 两个复方可以显著提高免疫兔的血清抗体效价, 促进体内淋巴细胞增殖, 显著促进圆小囊、肠淋巴结等免疫器官的发育, 有较高的攻毒保护效果。【结论】两个复方中药成分具有较强的免疫增强作用, 可被开发成新型的免疫增强剂。

关键词: 中药成分复方; 兔出血症; 淋巴细胞增殖; mRNA 表达; 抗体效价; 免疫器官指数

Effects of Compound Chinese Medicinal Ingredients on Peripheral Lymphocyte Proliferation, mRNA Expression of IFN- γ and IL-10 and Immunologic Effect on Rabbit Hemorrhagic Disease (RHD) Vaccine

YANG Long-sheng^{1,2}, HU Yuan-liang¹, XUE Jia-bin², WANG Fang², WANG De-yun¹, XU Wei-zhong²

(¹Institute of Traditional Chinese Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095; ²Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

Abstract: 【Objective】The objective of this experiment was to investigate the immune enhancement and mechanism of two cCHMIs. 【Method】Two compound Chinese herbal medicine ingredients (cCHMIs) were prepared with four Chinese herbal medicine ingredients (CHMI), astragalus polysaccharide (APS), epimedium polysaccharide (EPS), propolis flavone (PF), and ginsenosides (GS). The effects of the two cCHMIs on lymphocyte proliferation and mRNA expression of IFN- γ , IL-10 were determined by MTT method and fluorescent real-time PCR method. As adjuvant, the two cCHMIs were mixed respectively with RHD vaccine virus to vaccinate rabbits with aluminum and non-adjuvant vaccine as controls. On the 7, 14, 21, 35, and 49 day after vaccination, the dynamic changes of peripheral lymphocyte proliferation and antibody titers were tested by MTT method and HI method, on the 63th day after vaccination, the immune organ and challenge protection were observed. 【Result】The two cCHMIs could significantly enhance lymphocyte proliferation, enhance mRNA expression of IFN- γ , IL-10. As adjuvant, the two cCHMIs could significantly enhance serum antibody titers, promote lymphocyte proliferation, stimulate the organ index of Sacculus Rotundus and intestinal lymph node, and present higher protective effect for challenge rabbits. 【Conclusion】Two cCHMIs have stronger immune enhancement and can be expected to exploit into new-type of immunopotentiators.

Key words: Compound Chinese herbal medicinal ingredients (cCHMIs); Rabbit hemorrhagic disease (RHD); Lymphocyte proliferation; mRNA expression; Antibody titer; Immune organ index

收稿日期: 2007-07-30; 接受日期: 2008-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070566)

作者简介: 杨龙圣 (1980-), 男, 江苏盐城人, 博士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: yls123456@hotmail.com。通讯作者胡元亮 (1953-), 男, 江苏邳州人, 教授, 研究方向为中兽医免疫学。Tel: 025-84395203; E-mail: ylhu@njau.edu.cn

0 引言

【研究意义】临床和研究实践证明,疫苗与免疫佐剂或免疫增强剂合用时可有效地提高疫苗的免疫效果。目前常用的佐剂有氢氧化铝、白油等化学物质,但是常有局部反应重、致癌等毒副作用^[1]。中药佐剂作为一种新型的免疫佐剂,具有来源广泛、效果显著、无毒副作用等优势。不仅能显著增强机体的细胞免疫和体液免疫功能,而且能促进免疫器官的发育和细胞因子的分泌。【前人研究进展】在笔者前期研究中,首先以雏鸡为研究对象,比较了9种中药成分的免疫增强作用^[2]。筛选出黄芪多糖(astragalus polysaccharide, APS)、淫羊藿多糖(epimedium polysaccharide, EPS)、蜂胶黄酮(propolis flavone, PF)和人参皂苷(ginsenosides, GS)4种中药成分(CHMI),制成2个复方(compound CHMIs, cCHMIs),并证明两个中药成分复方能显著促进新城疫苗免疫雏鸡外周血淋巴细胞增殖,提高血清抗体效价,效果类似于甚至优于油佐剂、优于相应的中药单方,但与IL-2的免疫协同作用不明显^[3-5]。在家兔试验中,测定了两个复方对兔出血症疫苗免疫家兔血清抗体效价的影响,证明两个中药成分复方有显著的免疫增强作用,与无佐剂对照组相比,显著提高免疫家兔的血清的抗体效价^[6]。【本研究切入点】本试验以家兔为研究对象,测定这两个复方对兔外周血淋巴细胞增殖和IFN- γ 、IL-10 mRNA表达以及对兔出血症疫苗免疫家兔后外周血淋巴细胞增殖、抗体效价、免疫器官指数和攻毒保护率的影响。【拟解决的关键问题】旨在验证两个中药成分复方的免疫增强作用和机理,为开发复方中药成分免疫增强剂提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 中药、疫苗与试剂

中药成分复方(cCHMIs),由南京农业大学中兽医研究室提供。cCHMIs 1含有蜂胶黄酮(PF,黄酮含量为70.99%)和淫羊藿多糖(EPS,多糖含量为71.23%),cCHMIs 2含有黄芪多糖(APS,多糖含量为88.96%)与人参皂苷(GS,皂苷含量为75%)^[4],各中药成分按一定配比,两个复方浓度均为20 mg·ml⁻¹,经热源试验检验合格。用于离体试验,按照高、中、低3个剂量用等量RPMI1640稀释,使cCHMIs 1的3种剂量分别为180、90、45 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,cCHMIs 2为600、300、150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ^[7],高压消毒,4℃保存备用。

兔出血症(RHD)组织灭活苗(组织含量为10%,不含任何佐剂),由南京天邦生物有限公司提供,批号20051201。铝胶佐剂,由江苏省农业科学院兽医所提供,批号20051201。cCHMIs 1疫苗,取10 ml 20 mg·ml⁻¹ cCHMIs 1与20 ml RHD灭活苗混合配比;cCHMIs 2疫苗,取10 ml 20 mg·ml⁻¹ cCHMIs 2与20 ml RHD灭活疫苗混合配比;铝胶疫苗,取3 ml铝胶、7 ml PBS与20 ml RHD组织灭活苗混合配比;疫苗对照,取10 ml PBS与20 ml RHD组织灭活苗混合配比。保证各疫苗的抗原量相同。

淋巴细胞分离液,上海化精高科技生物公司产品,批号060218。RPMI1640培养液,Gibco公司产品,按照说明书用三蒸水配制,过滤除菌,分装,4℃保存,临用时加入10%小牛血清(杭州四季青生物制品厂)、100 IU·ml⁻¹的青霉素和100 IU·ml⁻¹链霉素。植物血凝素(PHA),上海伊华科技有限公司产品,用RPMI1640培养液配成0.05 g·L⁻¹。脂多糖(LPS),Sigma公司产品,用RPMI1640培养液配成0.025 g·L⁻¹。四甲基偶氮蓝(MTT),Amresco公司产品,用pH 7.2的PBS配成5 mg·ml⁻¹的溶液,220 nm微孔滤膜过滤,避光保存。裂解液,二甲亚砜(DMSO),天津科密欧化学试剂公司产品,批号050601。RHDV、阳性血清和阴性血清,由江苏省农业科学院兽医研究所提供。人“O”型红细胞,由南京军区总医院提供。AMV Reverse Transcriptase XL(5U· μl^{-1})、RNase Inhibitor(40 U· μl^{-1})、Oligo dT-Adaptor Primer(2.5 μl)、dNTP Mixture(10 mmol·L⁻¹)、SYBR Premix Ex Taq试剂盒、胶回收试剂盒和pMD-T19载体系统试剂盒均为TaKaRa公司产品。

1.2 中药成分复方离体影响兔外周血淋巴细胞增殖的测定

取35日龄非免疫清洁级新西兰肉兔(江苏省农业科学院提供)。无菌抗凝心脏采血2 ml,分离淋巴细胞^[3,8],用含血清RPMI1640培养液调整细胞密度为 6×10^6 个/ml,加入到96孔板中,80 μl /孔,各孔分别加入各浓度的cCHMIs 100 μl (每个浓度重复4孔),再分别向每孔中分别加入PHA或LPS,使其终浓度为20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 或5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,另设cCHMIs、PHA、LPS对照孔,细胞调零孔。将细胞板放入5%CO₂、37℃培养箱(Revco, Co., USA, BB16UV/BB5060UV)中培养44 h,加入MTT液20 μl ,继续培养4 h,各孔吸出上清液,加入裂解液100 μl 。微量振荡器振摇5 min使其沉淀完全融解,在酶联免疫检测仪(DG-3022型,

华东电子管厂) 检测 570 nm 处的光密度 (OD) 值, 作为 T、B 淋巴细胞转化活性的指标^[9,10]。

1.3 中药成分复方离体影响兔外周血淋巴细胞 IFN- γ 、IL-10 mRNA 表达的测定^[11]

1.3.1 RNA 的提取 淋巴细胞的分离和计数同 1.2, 调整细胞浓度为 6×10^6 个/ml, 加入到 24 孔板中, 1 ml/孔, 将细胞板放入 5% CO₂、37 °C 条件下培养 24 h, 向其中加入 1 ml cCHMIs 1 使其终浓度达到 45 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 或 cCHMIs 2 使其终浓度达到 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 每浓度重复 4 孔, 再加入 PHA 使其终浓度达到 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。另设不加 cCHMIs 对照组, 空白对照组, 继续培养 12 h 后, 收集淋巴细胞, 2 000 r/min 离心 10 min, 倾去上清, 再加入 DEPC 水 200 μl 悬浮淋巴细胞^[12]。按照 TRIZOL 试剂盒一步法提取淋巴细胞的总 RNA, 并在分光光度计上检测 RNA 在 260 nm 和 280 nm 下的 OD 值, 计算 A₂₆₀/A₂₈₀ 的值, 理想值在 1.8~2.0。

1.3.2 引物的设计和合成 利用 Primer Premier 5.0 引物设计软件, 根据美国国立生物技术中心 (NCBI) 上公布的兔 IFN- γ (NO.DQ852341)、IL-10 (NO.AF068058)、18S rRNA (NO.X00640) mRNA 基因序列^[11], 设计各引物。并通过 NCBI 上的 Blast 功能, 初步检测引物的特异性。引物由大连宝生物工程合成。IL-10 上游引物: 5'-AAGCCTTGTC GGAGATGA-3', 下游引物: 5'-CTTTGTAGACGCCTT CCTC-3'; IFN- γ 上游引物: 5'-AGCCAAATTGTCTCCT TC-3', 下游引物: 5'-AAACAGCGTCTGACTCCT-3'; 18S rRNA 上游引物: 5'-TCCAGCTCCAATAGCGT AT-3'; 下游引物: 5'-TAATCATGGCCTCAGTTCC-3'。

1.3.3 Real-time PCR 反转录总反应体系为 10 μl , 其中包含 MgCl₂ 2 μl , 10 \times RT Buffer 1 μl , RNase Free ddH₂O 3.75 μl , dNTP Mixture 1 μl , RNase Inhibitor 0.25 μl , AMV Reverse Transcriptase 0.5 μl , Oligo dt 0.5 μl , 试验样品 RNA 1 μl 。反应按如下条件进行: 30 °C 10 min, 42 °C 15 min, 99 °C 5 min, 4 °C 5 min。PCR 反应按照试剂盒条件在 MJ mini 荧光实时多波长 PCR 检测系统上进行检测 (美国 Bio-Rad 公司产品)。将 PCR 产物纯化后与 pMD-T19 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 经酶切鉴定选择阳性质粒, 用双蒸水将该阳性质粒稀释成 10 倍梯度浓度作为标准样品, 绘制标准荧光曲线。反应体系 25 μl , 其中包含 SYBR Green I Real-time ex taq 12.5 μl , 校正液 0.5 μl , 20 pmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 上下游混合引物各 1 μl , 不同处理组 cDNA 2 μl , 超纯水 9 μl 。反应条件: 94 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 30

s, (IFN- γ 51 °C, IL-10、18S rRNA 53 °C) 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 72 °C 收集荧光信号, 共计 35 个循环。荧光曲线呈指数上升 “S” 型, 标准曲线方程斜率在一 3.22 左右, R² 在 0.99 左右, 熔点曲线分析: 90 °C 10 s, 65 °C 10 s 然后每个循环增加 0.1 °C, 时间为 1 s。融解曲线呈现单一峰, 通过融解曲线消除产物的非特异性或者引物二聚体。根据循环圈数阈值 (Ct) 和标准曲线方程计算出各组 IFN- γ 、IL-10、18S rRNA 的表达量。IFN- γ 、IL-10 mRNA 表达量与同一 cDNA 中 18S rRNA mRNA 表达量比较进行归一化, 得到 IFN- γ 、IL-10 mRNA 的相对含量。

1.4 免疫试验

取 35 日龄非免疫清洁级新西兰肉兔 40 只, (江苏省农业科学院提供), 随机分为 5 组, I: 复方 1 组; II: 复方 2 组; III: 铝胶组; IV: 疫苗组; V: 空白对照组, 每组 8 只。前 4 组分别颈部皮下注射相应疫苗 3 ml, 抗原量相同, 第 5 组颈部皮下注射灭菌 PBS 3 ml。分别于免疫后 7、14、21、35、49 d 采血, 按 1.2 法测定 T、B 淋巴细胞增殖, 按照常规血凝抑制试验 (hemagglutination inhibition)^[13] 测定血清抗体效价。免疫后 63 d, 每组随机抽取 3 只称重后捕杀, 分离脾脏、肠淋巴结和圆小囊称重, 计算器官指数^[14]。每组剩余的 5 只进行攻毒试验, 每只兔颈部皮下注射 1 000 LD₅₀ 活病毒 (RHDV)^[15], 连续观察 8 d, 统计各组兔死亡率。

1.5 数据处理

数据以 “ $\bar{x} \pm \text{SD}$ ” 表示, 以 SPSS 软件进行 Duncan's 多重分析。比较体外淋巴细胞增殖、mRNA 表达量以及体内淋巴细胞增殖、抗体效价、器官指数的差异性。

2 结果与分析

2.1 离体试验淋巴细胞增殖的变化

两个 cCHMIs 的 OD 值变化列举在表 1。cCHMIs 1 在 45 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, cCHMIs 2 在 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时, cCHMIs+PHA 的 OD 值显著高于 PHA 对照组 ($P < 0.05$)。cCHMIs 1 在 45 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 和 22.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时, cCHMIs 2 在 3 个浓度时, cCHMIs+LPS 的 OD 值显著高于 LPS 对照组 ($P < 0.05$)。

2.2 离体试验淋巴细胞 IFN- γ 、IL-10 mRNA 表达的变化

由表 2 可见, PHA 组 IFN- γ 、IL-10 的 mRNA 表达量均显著高于对照细胞组 ($P < 0.05$)。cCHMIs 1 组 IFN- γ 、IL-10 的 mRNA 表达量均显著高于 PHA 组

表 1 离体试验免外周血淋巴细胞增殖的影响

Table 1 Changes of peripheral lymphocyte proliferation *in vitro*

浓度 Content ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)		cCHMIs	cCHMIs+PHA	cCHMIs+LPS
1	90	0.305±0.025	0.340±0.081bc	0.330±0.052bcd
	45	0.320±0.034	0.398±0.043ab	0.433±0.013a
	22.5	0.285±0.022	0.260±0.014d	0.415±0.031a
2	300	0.305±0.021	0.335±0.031bc	0.413±0.013a
	150	0.315±0.022	0.418±0.033a	0.443±0.010a
	75	0.296±0.019	0.280±0.021cd	0.378±0.038ab
对照 Control		0.255±0.039 ¹⁾	0.283±0.025cd ²⁾	0.265±0.087d ³⁾

同列数据标有不同字母者差异性显著 ($P<0.05$)。1) 细胞对照, 2) PHA 对照, 3) LPS 对照。下同

Data in same column with different letters show significant difference in $P<0.05$. 1) Cell CK, 2) PHA CK, 3) LPS CK. The same as below

和细胞对照组 ($P<0.05$)；cCHMIs 2 组 IFN- γ 、IL-10 的 mRNA 表达量均显著高于 PHA 组和细胞对照组 ($P<0.05$)。两个 cCHMIs 之间 IFN- γ 、IL-10 的 mRNA 表达量无显著差异 ($P>0.05$)。

2.3 免疫试验淋巴细胞增殖的变化

表 3 各组 B 淋巴细胞增殖的动态变化

Table 3 The dynamic changes of B lymphocyte proliferation in different adjuvant groups (A_{570} value)

组别 Group	D0	D7	D14	D21	D35	D49
复方 1 cCHMIs 1	0.220±0.046	0.372±0.030b	0.418±0.036ab	0.364±0.049ab	0.340±0.050	0.331±0.036
复方 2 cCHMIs 2	0.206±0.062	0.430±0.036a	0.444±0.042a	0.390±0.037a	0.348±0.099	0.339±0.064
铝胶 Aluminum	0.232±0.062	0.342±0.073bc	0.390±0.020bc	0.340±0.035bc	0.304±0.097	0.292±0.051
疫苗对照 Vaccine	0.234±0.067	0.301±0.081c	0.375±0.052c	0.322±0.042c	0.306±0.091	0.306±0.054
空白对照 Non-adjuvant	0.248±0.124	0.258±0.019d	0.260±0.012d	0.270±0.019d	0.280±0.075	0.274±0.057

表 4 各组 T 淋巴细胞增殖的动态变化

Table 4 The dynamic changes of T lymphocyte proliferation in different adjuvant groups (A_{570} value)

组别 Group	D0	D7	D14	D21	D35	D49
复方 1 cCHMIs 1	0.264±0.022	0.370±0.032a	0.330±0.041	0.330±0.038	0.323±0.042	0.323±0.033
复方 2 cCHMIs 2	0.258±0.043	0.378±0.049a	0.331±0.083	0.325±0.037	0.323±0.069	0.333±0.037
铝胶 Aluminum	0.268±0.070	0.375±0.068a	0.341±0.097	0.331±0.088	0.327±0.010	0.325±0.037
疫苗对照 Vaccine	0.268±0.017	0.282±0.017b	0.304±0.086	0.304±0.046	0.303±0.089	0.306±0.068
空白对照 Non-adjuvant	0.292±0.033	0.280±0.034b	0.282±0.027	0.285±0.031	0.288±0.075	0.300±0.079

2.4 免疫试验血清抗体的动态变化

免疫后第 7 天, 两个复方组与对照组之间无显著性差异。免疫后第 14~35 天, cCHMIs 1 组各时间点

表 2 IFN、IL-10 mRNA 的变化

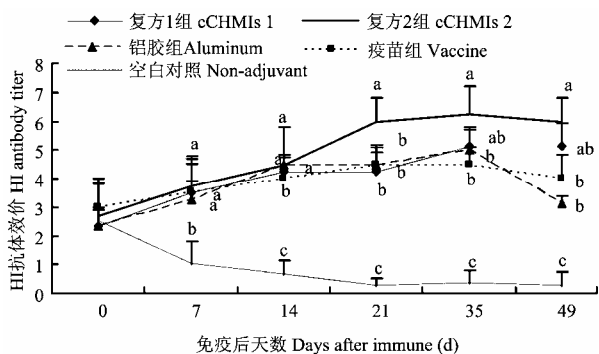
Table 2 Changes of mRNA expression of IFN and IL-10 mRNA

组别 Group	IFN- γ	IL-10
复方 1 cCMHI1+PHA	51.80±3.16a	30±3.75a
复方 2 cCMHI2+PHA	43.55±13.80a	31.43±2.30a
PHA	7.75±1.76b	5.71±0.34b
对照 Control	1.00±0.06c	1.00±0.06c

B 淋巴细胞增殖的动态变化: 免疫后第 7~21 天, 两个 cCHMIs 组的 OD 值显著高于疫苗对照组 ($P<0.05$)，cCHMIs 2 组的 OD 值显著高于铝胶佐剂组 ($P<0.05$)，cCHMIs 1 组在所有时间点 OD 值高于铝胶佐剂组, 两者之间无显著性差异 ($P>0.05$)。铝胶佐剂组 OD 值与疫苗对照组之间无显著性差异 ($P>0.05$)。免疫后第 35 天以后, 各佐剂组的 OD 值与对照组之间无显著差异 ($P>0.05$, 表 3)。T 淋巴细胞增殖的动态变化: 免疫后第 7 天, 两个 cCHMIs 组、铝胶佐剂组均能显著促进 T 淋巴细胞增殖 ($P<0.05$)，3 组之间无显著差异 ($P>0.05$)。第 14 天之后, 两个 cCHMIs 组与其它各组之间 T 淋巴细胞增殖无显著性差异 ($P>0.05$, 表 4)。

抗体效价与铝胶佐剂组相当, 显著高于空白对照组 ($P<0.05$)，第 42~49 天, cCHMIs 1 组抗体效价显著高于无佐剂组和铝胶佐剂组。第 21~49 天, cCHMIs 2

组抗体效价显著高于疫苗对照组和铝胶佐剂组（图 1）。



同一天数中标有不同字母者差异显著 ($P < 0.05$)
Data in same day with different letters show significant difference in $P < 0.05$

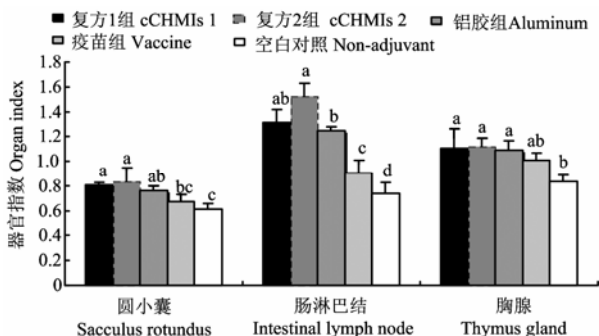
图 1 各组抗体效价动态变化
Fig. 1 The dynamic changes of antibody titers in different adjuvant groups

2.5 免疫器官指数的比较

由图 2 可见，两个复方组肠淋巴结、圆小囊器官指数显著高于疫苗组 ($P < 0.05$)，cCHMIs 2 组肠淋巴结器官指数显著高于铝胶佐剂组 ($P < 0.05$)。各佐剂组之间脾脏器官指数无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.6 攻毒保护的比较

攻毒后 24~112 h 内，两个复方组存活 5 只，保护率为 100%，铝胶组、疫苗组、空白对照组存活数分别为 4、3、0 只，保护率分别为 80%、60% 和 0。



同一免疫器官中标有不同字母者差异显著 ($P < 0.05$)
Data in same immune organ with different letters show significant difference in $P < 0.05$

图 2 各组器官指数的比较
Fig. 2 Immune organ indexes in different adjuvant groups

所有死亡兔只经检查均诊断为兔出血症。

3 讨论

细胞免疫状态与淋巴细胞增殖状态 (OD 值) 成正相关。PHA 是 T 淋巴细胞增殖刺激剂。在离体试验中，cCHMIs 1 在 $45 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、cCHMIs 2 在 $150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时，两个复方可以协同 PHA 显著促进 T 淋巴细胞增殖 ($P < 0.05$)。cCHMIs 1 在 45 和 $22.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、cCHMIs 2 在 300、150 和 $75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时，两个复方可以协同 LPS 显著促进 B 淋巴细胞增殖 ($P < 0.05$)。在免疫试验中，试验结果显示两个复方组的 B 淋巴细胞增殖和 T 淋巴细胞增殖分别在免疫后 7~21 d 和免疫后 7 d 显著高于疫苗组。表明两个复方在体外和体内均能显著促进淋巴细胞增殖，而淋巴细胞增殖反映了机体细胞免疫的状态，所以本结果证明两个复方能增强细胞免疫。

中和抗体反映了机体的体液免疫状态，在疾病中起着关键的作用^[16]。免疫试验结果显示，cCHMIs 1 和 cCHMIs 2 组的血清抗体效价分别在免疫后 14 d 和 14~49 d 显著高于疫苗组。由于抗体的分泌与 B 淋巴细胞活性密切相关，而在体外和体内试验中，B 淋巴细胞增殖结果表明，两个复方均显著地促进 B 淋巴细胞增殖。因此，以上结果进一步证实两个复方可以显著促进体液免疫。

IFN- γ 也称免疫干扰素，属于 Th1 型细胞因子，主要促进细胞免疫。是由原初的 TH0 和 TH1 的 CD4+ 辅助性 T 细胞和几乎所有的 CD8+ 细胞产生。它可以特异性地诱导抗病毒状态，直接促进 T、B 淋巴细胞增殖分化、CTL 成熟和 B 淋巴细胞分泌抗体^[17,18]。IL-10 属于 Th2 型细胞因子，主要促进体液免疫，具有 B 细胞活化增殖和分化效应，在对蛋白质抗原的应答中是 B 细胞增殖和抗体分泌必不可少的^[19]。本研究表明，PHA 组 IFN- γ 、IL-10 的 mRNA 表达量显著高于细胞对照组，两个复方+PHA 组 IFN- γ 、IL-10 的 mRNA 表达量显著高于 PHA 组和对照组 ($P < 0.05$)，表明两个复方可以显著地促进 IFN- γ 、IL-10 的 mRNA 表达，进而促进细胞因子 IFN- γ 、IL-10 的分泌，从而增强细胞免疫和体液免疫。

笔者对两个复方和铝胶佐剂进行比较。抗体测定结果表明，cCHMIs 2 组的抗体效价在免疫后 7~49 d 显著高于铝胶组的抗体效价。免疫试验中的 B 淋巴细胞增殖结果表明，cCHMIs 2 组的 B 淋巴细胞增殖在免疫后 7、14 和 21 d 显著高于铝胶组的 B 淋巴细胞增殖。由此可见，复方 2 的佐剂效果优于铝胶。

器官指数是免疫器官重量相对于体重的比值,免疫器官的大小与免疫成熟程度呈一定的正相关。胸腺是中枢淋巴免疫器官^[20],肠淋巴结是最主要的肠道相关性淋巴组织,圆小囊是家兔特有肠道相关性淋巴组织^[21],含有丰富的淋巴样细胞。本试验结果发现,两个复方组肠淋巴结器官指数和圆小囊器官指数均显著高于疫苗对照组,并且cCHMIs 2组的肠淋巴结器官指数显著高于铝胶佐剂组。表明两个复方组均可显著提高肠淋巴结和圆小囊的器官指数($P < 0.05$),cCHMIs 2稍优于cCHMIs1。试验还表明两个复方可有效促进免疫器官的发育,从而提高兔的免疫功能。由于复方可以显著促进细胞免疫和体液免疫,笔者在最后进行了攻毒保护试验,结果显示两个复方组的保护率(5/5)高于铝胶组、疫苗组和空白对照组的保护率(4/5、3/5和0/5),表明两个复方可以有效提高免疫保护效果。

4 结 论

本试验通过离体试验、免疫试验,从细胞免疫、体液免疫、细胞因子基因表达和免疫器官发育等方面评价了两个cCHMIs的免疫增强作用和机理,并通过初步攻毒试验判定它们的免疫保护效果。所有结果都证明两个cCHMIs具有较强的免疫增强作用,可望开发成为新型的免疫佐剂。

References

- [1] 孙建宏. 免疫佐剂的研究进展. 黑龙江畜牧与兽医, 1998, (2): 40-42.
Sun J H. Research headway of immunopotentiator. *Heilongjiang Journal of Animal Husbandry Veterinary Medicine*, 1998, (2): 40-42. (in Chinese)
- [2] Kong X F, Hu Y L, Rui R, Wang D Y, Li X R. Effects of Chinese herbal medicinal ingredients on peripheral lymphocyte proliferation and serum antibody titer after vaccination in chicken. *International Immunopharmacology*, 2004, 7: 975-982.
- [3] Wang D Y, Hu Y L, Sun J L, Kong X F, Zhang B K, Liu J G. Comparative study on adjuvantivity of compound Chinese herbal medicinal ingredients. *Vaccine*, 2005, 23: 3704-3708.
- [4] Wang D Y, Li X R, Xu L X, Hu Y L, Zhang B K, Liu J G. Immunologic synergism with IL-2 and effects of cCHMIs on mRNA expression of IL-2 and IFN- γ in chicken peripheral T lymphocyte. *Vaccine*, 2006, 24: 7109-7114.
- [5] 孙峻岭, 薛家宾, 胡元亮, 王德云, 张宝康, 刘家国. 中药成分复方的佐剂作用及其与中药复方的功效比较. 南京农业大学学报, 2005, 28(4): 109-112.
Sun J L, Xue J B, Hu Y L, Wang D Y, Zhang B K, Liu J G. Adjuvantivity of compound Chinese herbal medicinal ingredients and their efficacy comparison with compound Chinese herbal medicines. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2005, 28 (4): 109-112. (in Chinese)
- [6] Sun J L, Hu Y L, Wang D Y, Zhang B K, Liu J G. Immunologic enhancement of compound Chinese herbal medicine ingredients and their efficacy comparison with compound Chinese herbal medicines. *Vaccine*, 2006, 24: 2342-2348.
- [7] 刘家国, 胡元亮, 陈玉库, 张宝康, 宋大鲁, 凌雯, 李银, 张则斌, 唐余华, 钱建飞. 天然复方药物在 CEF 上的安全浓度筛选及其抗 IBDV 感染的试验研究. 中兽医医药杂志, 2002, (5): 88-91.
Liu J Q, Hu Y L, Chen Y K, Zhang B K, Song D L, Lin W, Li Y, Zhang Z B, Tang Y H, Qian J F. The safety concentration of Chinese herbal medicinal ingredients on CEF. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2002, (5): 88-91. (in Chinese)
- [8] 王燕平, 李小明, 宋纯青, 胡之璧. 黄芪皂甙 IV 对小鼠 T、B 淋巴细胞增殖和腹腔巨噬细胞功能的影响. 中国药理学报, 2002, 3: 263-266.
Wang Y P, Li X Y, Song C Q, Hu Z B. Effect of astragaloside IV on T, B lymphocyte proliferation and peritoneal macrophage function in mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2002, 3: 263-266. (in Chinese)
- [9] Wu J Y, Munroe K J, Gardner B H, Wyand M S, Newman M J. Use of particulate forms of protein antigens to increase the sensitivity of antigen-specific proliferation assays. *Journal of Immunological Methods*, 1993, 1: 39-45.
- [10] Candida F, Caterina A, Mirella G, Claudio C. Regulation of human cytotoxic T lymphocytes development by the synergistic effect of IL-7 and sCD23. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1998, 1: 34-44.
- [11] Perkins H D, van Leeuwen B H, Hardy C M, Kerr P J. The complete cDNA sequences of IL-2, IL-4, IL-6 and IL-10 from the European rabbits. *Cytokine*, 2000, 6: 555-565.
- [12] 王德云, 胡元亮, 孙峻岭, 张宝康, 刘家国. 复方中药成分对新城疫疫苗免疫雏鸡外周血 T 淋巴细胞转化和血清抗体效价的影响. 中国兽医学报, 2006, 26(3): 194-196.
Wang D Y, Hu Y L, Sun J L, Zhang B K, Liu J G. Effect of Chinese herbal medicinal ingredient prescription on peripheral T lymphocyte transformation and serum antibody titer of chickens inoculated with ND vaccine. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2006, 2: 194-196. (in Chinese)

- [13] 杨汉春, 曹彬泽. 应用间接血凝试验检测兔出血症病毒抗体的研究. 畜牧与兽医, 1989, 21(3): 100-101.
- Yang H C, Cao P Z. The study of the detection of rabbit hemorrhagic disease (RHD) antibody titers by indirect hemagglutination test. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 1989, 21(3): 100-101. (in Chinese)
- [14] 郝光荣. 实验动物学. 上海: 第二军事医学院出版社, 1999.
- Hao G R. *Experimental Animals*. Shanghai: Second Military Surgeon University Press, 1999. (in Chinese)
- [15] Bertagnoli S, Gelfi J, Petit F, Vautherott J F, Rasschaert D, Laurent S, Gall G L, Boilletot E, Chantal J, Boucraut-Baralon C. Protection of rabbits against rabbit viral haemorrhagic disease with a vaccinia-RHDV recombinant virus. *Vaccine*, 1996, 14(6): 506-510.
- [16] Parra P, Prieto M. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *Journal of Virology*, 1990, 64: 4013-4015.
- [17] Clark E A, Lane P J. Regulation of human B-cell activation and adhesion. *Annual Review of Immunology*, 1991, 9: 97-127.
- [18] Abul K A, Andrew H L, Jordan S P. 现代细胞与分子免疫学. 北京: 科学出版社, 1997: 194-212.
- Abul K A, Andrew H L, Jordan S P. *Cellular and Molecular Immunology*. Beijing: Science Press, 1997: 194-212. (in Chinese)
- [19] Lin J Y, Chen M L, Chiang B L, Lin B F. Ganoderma tsugae supplementation alleviates bronchoalveolar inflammation in an airway sensitization and challenge mouse model. *International Immunopharmacology*, 2006, (2): 241-251.
- [20] Brekelman P, van Ewijk W. Phenotypic characterization of murine thymic microenvironments. *Seminars in Immunology*, 1990, 2: 13-24.
- [21] 余锐平, 刘海虹, 贾君政, 宋俊霞, 刘如玉. 家兔肠相关淋巴组织圆小囊超微结构观察. 电子显微学报, 2002, 21(4): 360-364.
- Yu R P, Liu H H, Jia J Z, Song J X, Liu R Y. Observation of ultrastructure of Sacculus Rotundus of rabbits' GALT. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2002, 21(4): 360-364. (in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)