

仔猪痢清对动物细胞免疫功能影响的初步研究

洪伟鸣, 邢晓玲, 郁杰, 葛竹兴, 王旦 (江苏畜牧兽医职业技术学院动物药理学系, 江苏泰州 225300)

摘要 [目的] 研究仔猪痢清口服液对动物细胞免疫功能的影响。[方法] 分别采用 MIT 法和中性红吞噬法测定仔猪痢清口服液对猪淋巴细胞转化和小鼠腹腔巨噬细胞吞噬作用的影响。[结果] 给药组猪淋巴细胞的转化显著高于对照组; 给药组小鼠腹腔巨噬细胞活性与生理盐水对照组相比有显著性差异。[结论] 该口服液具有良好的促进 ConA 诱导的猪外周血 T 淋巴细胞转化作用和促进小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红作用, 表明其具有良好的免疫增强效果。

关键词 仔猪痢清口服液; 免疫功能; 淋巴细胞转化; 巨噬细胞

中图分类号 S859 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)01-00142-02

Preliminary Study on the Effects of Zizhuliqing on Animal Cellular Immune Function

HONG Wei-ming et al (Department of Animal Pharmaceutics, Jiangsu Animal Husbandry & Veterinary College, Taizhou, Jiangsu 225300)

Abstract [Objective] The study aimed to explore the effects of Zizhuliqing Oral Liquid on animal cellular immune function. [Method] MIT method and phagocytizing natural red method were used to determine the effects of Zizhuliqing Oral Liquid on piglet lymphocyte transformation and the phagocytosis of mouse peritoneal macrophages respectively. [Result] The lymphocyte transformation rates of piglets in medicated groups were significantly higher than that in control group; the difference of mouse peritoneal macrophage activities between the medicated groups and the control group was obvious. [Conclusion] Zizhuliqing Oral Liquid could promote the transformation of piglet T lymphocytes induced by ConA and the phagocytosis of mouse peritoneal macrophages to natural red, indicating its good immune enhancement effects.

Key words Zizhuliqing Oral Liquid; Immune function; Lymphocyte transformation; Macrophage

仔猪痢清口服液是根据中兽医学理论和中医药理论在现代药理学上的应用原理, 以黄连、黄柏、白头翁等 8 味中药制成的纯中药复方制剂, 临床试验表明其对仔猪大肠杆菌性腹泻具有良好的防治效果。据文献报道, 上述几味中药均具有免疫增强作用^[1-3], 具有潜在的开发价值。该研究讨论了仔猪痢清口服液对动物细胞免疫功能的影响, 旨在为深入探讨其免疫增强作用和机理奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验用药及准备 仔猪痢清口服液是由黄连、黄柏、白头翁等 8 味中药精制而成, 煎煮浓缩至 1 mL 药液相当于原药材 1 g。临用时用生理盐水分别稀释成 1%、2%、4% 3 种浓度的溶液, 用于小鼠腹腔巨噬细胞吞噬试验。

1.2 主要试剂 RPM1640 培养基(Gibco 公司); 新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); 伴刀豆素球蛋白(ConA)(Sigma 公司), 用无血清 RPM1640 培养液配成 0.25 ng/mL; 唑蓝(MIT)(Sigma 公司), 用 pH=7.4 的 PBS 液配成 5 ng/mL 的溶液, 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 避光保存; 淋巴细胞分离液(上海华精生物高科技有限公司, 批号 20061218); 二甲基亚砜(DMSO)(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 主要仪器 DG3022A 型酶联免疫检测仪(国营华东电子管厂); CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司); PM6 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司); MI 型微量振荡器(德国 IKA 广州公司); 96 孔、6 孔细胞培养板(德国 Bousing 公司)。

1.4 仔猪痢清口服液对淋巴细胞转化的影响

1.4.1 试验动物分组与处理。 试验用哺乳仔猪 20 只, 随机均分为 4 组, 其中 3 个试验组分别灌服仔猪痢清口服液 2.0、1.5、1.0 mL/kg·BW, 对照组灌服 1.5 mL/kg·BW 生理盐水, 每天 2 次, 连续 3 d。分别于试验前 1 d、末次用药后 3、6、9 d 时无菌前腔静脉采血, 5 mL/只, 肝素抗凝, 测定淋巴细胞转化。

1.4.2 淋巴细胞活性测定。 将抗凝血样用 Hanks 液稀释 1 倍, 小心加在淋巴细胞分离液上层, 2 000 r/min 离心 20 min, 吸取中间云雾状白细胞层, 用无血清 RPM1640 营养液洗 2 次, 1 500 r/min 离心 15 min。活细胞计数后, 用含有 10% 新生牛血清和常规量双抗的 RPM1640 培养液调整细胞密度为 2.5×10^6 个/mL, 然后转入细胞培养瓶, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。待上述细胞长成单层后, 去除上清液, 用等量的新鲜培养液悬浮细胞, 并分装于 96 孔细胞培养板中 (80 μL/孔), 每孔再加 20 μL ConA, 每个样品重复 4 孔, 然后置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 44 h 后取出, 每孔加 MIT 液 20 μL, 置于上述培养箱中继续培养 4 h 后, 弃去上清液, 每孔加裂解液(DMSO) 100 μL, 将细胞板置于微量振荡器上振荡 5 min 使沉淀完全溶解, 在酶联免疫仪上检测 570 nm 处的吸光值(OD₅₇₀), 作为淋巴细胞转化的指标^[4-5]。

所得数据用“平均值 ± 标准差”表示, 通过 t 检验比较各组间的统计学差异。

1.5 仔猪痢清口服液对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬作用的影响
1.5.1 试验动物分组与处理。 清洁级 ICR 小白鼠 24 只, 购自扬州大学比较医学中心, 平均体重 (20 ± 2) g。随机分为 4 组, 每组雌雄各半。3 个试验组分别灌服不同浓度 (1%、2%、4%) 的仔猪痢清口服液稀释液 0.5 mL, 分别相当于 5、10、20 ng/只, 对照组灌服等量的生理盐水, 每天 3 次, 连续 3 d。于末次给药后 24 h 测定腹腔巨噬细胞吞噬活性。

1.5.2 腹腔巨噬细胞活性测定。 采用中性红吞噬法测定。巨噬细胞制备、纯化、培养及吞噬中性红的测定参照文献^[6-7]。巨噬细胞浓度 4×10^6 个/mL, 中性红生理盐水浓度 0.1%, 每孔加细胞溶解液 2 mL。用分光光度计测定 540 nm 处的吸光值(OD₅₄₀)。

2 结果与分析

2.1 仔猪痢清口服液对淋巴细胞转化的影响 由表 1 可见, 各试验组的 OD 值均显著大于对照组, 说明仔猪痢清口服液对 ConA 诱导的猪外周血 T 淋巴细胞转化具有良好的促进作用, 且以中剂量组效果最佳。

基金项目 江苏畜牧兽医职业技术学院院级课题 (200605)。

作者简介 洪伟鸣 (1981-), 男, 江苏泰州人, 硕士, 助教, 从事新兽药研发工作。

收稿日期 2008-11-03

表1 仔猪痢清口服液对仔猪淋巴细胞转化的影响

Table 1 Effects of Zizhuqing Oral liquid on piglet lymphocyte transformation

剂量 Dose ml/kg·BW	给药前 Before administration	给药后 Post-administration		
		3 d	6 d	9 d
2.0	0.118 ±0.012 a	0.187 ±0.028 ba	0.273 ±0.045 b	0.162 ±0.028 ab
1.5	0.125 ±0.007 a	0.345 ±0.033 a	0.311 ±0.015 a	0.213 ±0.014 a
1.0	0.120 ±0.022 a	0.194 ±0.036 b	0.182 ±0.027 c	0.159 ±0.032 ab
0	0.124 ±0.008 a	0.129 ±0.009 c	0.120 ±0.011 d	0.117 ±0.006 c

注:表中数据为 OD₅₇₀;同列不同字母表示差异显著(P < 0.05)。

Note: Data in the table were OD₅₇₀ values; different letters in the same column meant significant difference at 0.05 level.

2.2 仔猪痢清口服液对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬活性的影响 由表2可见,不同剂量的仔猪痢清口服液均具有较强的促进小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红的作用。其中,20和10 ng/只组与对照组有极显著差异(P < 0.01),5 ng/只组与对照组有显著差异(P < 0.05)。

表2 仔猪痢清口服液对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红活性的影响

Table 2 Effects of Zizhuqing Oral liquid on phagocytosis of mouse peritoneal macrophages to natural red

剂量 Dose ng/只	小鼠数量 Mice number 只	巨噬细胞吞噬活性 Macrophage phagocytic activity
20	6	0.376 ±0.019 **
10	6	0.377 ±0.027 **
5	6	0.292 ±0.025 *
0	6	0.214 ±0.014

注:表中腹腔巨噬细胞吞噬活性以 OD₅₄₀表示。*表示与对照组差异显著(P < 0.05),**表示与对照组差异极显著(P < 0.01)。

Note: Phagocytic activities of peritoneal macrophages were shown by OD₅₄₀ values; * meant significant difference at 0.05 level between the medicated group and the control group; ** meant significant difference at 0.01 level between the medicated group and the control group.

3 讨论

(1) 该试验结果表明,仔猪痢清口服液具有良好的促进ConA诱导的猪外周血T淋巴细胞转化的作用;不同剂量的仔猪痢清口服液对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红均有较强的促进作用。说明该口服液具有良好的免疫增强作用。

(上接第120页)

对灌木的应用较少,乔灌木的复层结构构建的较少,整个系统物种多样性较差,结构还比较简单,对自然干扰的抵抗力也较弱。园林建设应该致力于可持续景观的建设,并能对人类提供持续的生态服务的节约型园林和环境友好型生态园林的建设,这才是园林建设的根本出路。

参考文献

[1] MARY G PADUA. 一条精致的红飘带:设计检验艺术与生态的边界[J].

(2) 该试验对传统的MTT法进行了适当变动,即:将调整好细胞密度的细胞悬液预先培养24 h后再转入培养板中,这样可以提高细胞活性,同时保证各孔中细胞数量的均一,从而减少了各孔之间OD值的系统误差^[8-9]。

(3) 先期已研究过仔猪痢清口服液的体外抗菌活性^[10]和体内抗炎效果,结果表明该口服液具有良好的体外抗菌活性和一定的抗炎效果;目前的临床试验研究结果表明其对仔猪黄、白痢具有良好的防治疗效。

(4) 仔猪大肠杆菌病是危害仔猪较严重的传染性疾病之一,给养猪业造成重大经济损失,严重影响其发展。临床上常用庆大霉素、土霉素等抗生素进行治疗,虽具有较好的疗效,但易产生耐药性及畜产品药残超标等问题。应用中药替代抗生素来防治疾病,能有效解决耐药性和药残问题,日益受到国内外的重视。仔猪痢清口服液属于纯中药复方制剂,其中多味药材均具有良好的免疫增强效果^[11-12]。该研究讨论了仔猪痢清口服液对动物细胞免疫功能的影响,为下一步深入探讨其免疫增强作用和机理奠定了基础。

参考文献

- [1] 胡元亮. 中药免疫药理学研究进展[J]. 中国免疫学杂志,1997,13(专刊):96-98.
- [2] 谢秀琼. 中药新制剂开发与应用[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2000:367-384.
- [3] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用(第一卷)[M]. 北京:学苑出版社,1997:104-146.
- [4] 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.
- [5] 王德云,胡元亮,孔祥锋,等. 中药成分对雏鸡外周血T淋巴细胞转化的影响[J]. 中国兽医学报,2004,24(6):578-580.
- [6] 顾立刚,周勇,严宣左,等. 薄盖灵芝对小鼠腹腔巨噬细胞的作用[J]. 现代免疫学,1990,10(4):15-16.
- [7] 王晓京,丁桂凤,范少光. 几种阿片肽及ACTH对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的作用[J]. 中国免疫学杂志,1987,3(4):211-217.
- [8] 乔彦良,朱剑英,张妍,等. 二甲硝咪唑对鸡离体外周血淋巴细胞的作用[J]. 莱阳农学院学报,2001,18(4):335-340.
- [9] 储岳峰,李祥瑞,颜新敏,等. 九种中药成分对体外培养小鼠淋巴细胞功能的影响[J]. 中国兽医科技,2005,35(11):908-911.
- [10] 洪伟鸣,郁杰,葛竹兴,等. “仔猪痢清”体外抗菌活性的研究[J]. 中兽医医药杂志,2008,27(4):29-30.
- [11] 邱全琪,谭允育,赵岩松,等. 黄柏和小檗碱对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国病理生理杂志,1996(6):47-48.
- [12] 路西明,王学廷,王建刚. 白头翁对小鼠免疫功能的影响[J]. 甘肃中医学院学报,1998,15(2):32-34.

Landscape Architecture,2008(1):90-99.

- [2] 俞孔坚,陈晨,牛静. 最少干预——绿林中的红飘带:秦皇岛汤河滨河公园设计[J]. 城市环境设计,2007(1):18-27.
- [3] 俞孔坚,李迪华. 可持续景观[J]. 城市环境设计,2007(1):7-12.
- [4] 俞孔坚. 城市生态基础设施建设的十大景观战略[J]. 东南置业,2002(8):14-19.
- [5] 庞治国,王世岩,胡明罡. 河流生态系统健康评价及展望[J]. 中国水利水电科学研究院学报,2006,2(4):151-155.
- [6] 程绪珂. 生态园林的理论与实践[M]. 北京:中国林业出版社,2006.