

# 持续、低剂量金霉素对肉仔鸡免疫 机能的抑制作用研究

佟建明<sup>1</sup>, 张日俊<sup>2</sup>, 萨仁娜<sup>1</sup>, 潘淑媛<sup>2</sup>, 黄 燕<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院畜牧研究所; <sup>2</sup> 中国农业大学动物科技学院; <sup>3</sup> 中国农业大学基础科技学院, 北京 100094)

**摘要:** 270只 Abore Acre 商品代肉用公鸡随机分成3组, 金霉素在饲料中添加水平分别为0、50和150mg/kg, 研究饲用金霉素对肉仔鸡法氏囊、脾脏和胸腺等免疫器官发育、以及免疫反应的影响。结果表明, 50mg/kg的金霉素对肉仔鸡脾脏和21日龄的胸腺无明显抑制作用, 对T、B淋巴细胞转化率也无明显抑制作用; 150mg/kg的金霉素对肉仔鸡的胸腺和脾脏发育具有显著的抑制作用( $P < 0.05$ ), 而且显著促进法氏囊的萎缩( $P < 0.05$ )。金霉素对T淋巴细胞转化率有明显的直接抑制作用; 50mg/kg和150mg/kg的金霉素对BSA特异性抗体的产生均有显著的抑制作用( $P < 0.01$ )。研究结果表明, 持续、低剂量的金霉素对肉仔鸡免疫器官发育和免疫应答具有显著的抑制作用, 抑制作用随剂量增加而加强。150mg/kg的金霉素对肉仔鸡具有显著促生长作用。

**关键词:** 免疫抑制; 金霉素; 肉仔鸡

**中图分类号:** S816.73 **文献标识码:** A **文章编号:** 0578-1752(2001)02-0200-05

## Immunosuppressant Effect of Long Term and Subtherapeutic Chlortetracycline in Broiler

TONG Jian-ming<sup>1</sup>, ZHANG Ri-jun<sup>2</sup>, SA Ren-na<sup>1</sup>, PAN Shu-yuan<sup>2</sup>, HUANG Yan<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Animal Science, CAAS; <sup>2</sup> College of Animal Science and Technology, CAU;

<sup>3</sup> College of Basal Science and Technology, CAU, Beijing 100094)

**Abstract:** Experiments were conducted with 270 Abore Acre male broilers to study the influence of dietary chlortetracycline (CTC) on the bursal, thymus and spleen weight index and T, B cell proliferation and antibody responses of broilers. Results show that 50mg/kg CTC had no significant inhibitory effect on thymus and spleen weight index, and T, B cell proliferation of broilers at 21 day old. 150mg/kg CTC had significant inhibitory effect on bursal, thymus and spleen, and T, B cell proliferation ( $P < 0.05$ ). Dietary CTC had a direct inhibitory effect on lymphocyte proliferation *in vitro*. 50mg/kg and 150mg/kg CTC have significant inhibitory effect on the antibody responses to BSA ( $P < 0.01$ ). Results demonstrated that subtherapeutic and long term CTC had significant inhibitory effects on immune organs and antibody response. The immunosuppressant effect became higher when the level of CTC increased. 150mg/kg CTC increased the growth rate of broilers significantly.

**Key words:** Immunosuppression; Chlortetracycline; Broiler

金霉素(Chlortetracycline, CTC)是一种四环素类抗生素, 在国内外畜牧生产中以持续、低剂量在饲料中使用, 目的是促进畜禽生长。Glette等

(1984)<sup>[1]</sup>研究发现, 金霉素在离体条件下, 对人体白细胞的免疫功能产生抑制作用。Marie(1993)<sup>[2]</sup>研究认为, 虽然许多抗生素, 包括四环素类抗生素, 在离

收稿日期: 2000-02-15

基金项目: 国家科技攻关项目(99-009-02-01), 饲料专用抗生素及配套生态技术与开发

作者简介: 佟建明(1960-), 男, 北京人, 博士, 副研究员, 主要从事饲料添加剂研究。Tel: 010-62816061; Fax: 010-62816061; E-mail: tjming@public.fhnet.cn.net

体条件下对免疫细胞的功能具有调节作用,然而是在活体上表现相同的作用尚有待研究。以前对饲用抗生素影响免疫机能的研究结果很不一致,以四环素类抗生素为例,Harmon 等(1973)<sup>[3]</sup>研究发现,土霉素不仅对仔猪的免疫系统无抑制作用,反而对羊红细胞(SRBC)特异性抗体的产生有促进作用。Glick(1968,1979)<sup>[4,5]</sup>研究认为四环素类抗生素对畜禽免疫机能可以产生明显的抑制作用。Dafwang 等(1985)<sup>[6]</sup>又对土霉素影响肉仔鸡免疫机能的作用进行了研究,结果发现土霉素对肉仔鸡的免疫系统既无明显抑制也无促进作用。到目前为止,国内外对饲用抗生素如何影响动物机体免疫机能的问题尚无定论。因此,本试验通过在饲料中添加不同剂量的金霉素,研究持续、低剂量的金霉素对肉仔鸡免疫系统发育以及免疫反应的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物及饲养管理

试验用 1 日龄 Abore Acre 商品代肉用公鸡 270 只,随机分成 3 组,每组 6 个重复,每个重复 15 只。在日粮中分别添加 0、50 和 150mg/kg 的金霉素纯品(有效成分含量 98.8%)。试验鸡分 3 层笼养,暖气控温,14 日龄以前室温维持在 33~34℃,以后逐渐降低并最终维持在 20~22℃。自由采食和饮水,试验基础日粮配方及主要营养成分见表 1。

### 1.2 预防免疫

1 日龄胫部皮下注射马立克(MDV)冻干疫苗(HTV 株,SOLVAY 动物保健品公司生产)0.2ml/只,接种传染性法氏囊(IBV)疫苗(MB 株,以色列 ABIC 公司生产),滴鼻点眼各 1 滴;7 日龄接种新城疫(NDV)冻干菌苗(clone-30,INTERVET 公司生产),点眼、滴鼻各 1 滴。14 日龄时接种新城疫和传染性支气管炎二联苗,滴鼻点眼各 1 滴。

### 1.3 检测指标和测定方法

1.3.1 生产性能 每周末称空腹重和剩余饲料,计算饲料转化率。

1.3.2 免疫器官重量 分别于 21 日龄和 49 日龄,每组取 12 只鸡,心脏采血后剖杀,摘取脾脏、法氏囊以及左侧胸腺,剔除脂肪后称鲜重,计算免疫器官指数(每千克体重中免疫器官的克数),计算免疫器官的生长抑制率,生长抑制率=(对照组指数-处理组指数)/对照组指数×100。

1.3.3 T、B 淋巴细胞免疫功能测定(淋巴细胞转化试验) 为了克服放射性同位素的污染和核辐射问题以及形态学方法的人为影响,本试验采用 BrdU-ELISA 法测定 T、B 淋巴细胞的转化率,即通过定量测定 BrdU(5-Bromo-2'-deoxyuridine,5-溴-2'-脱氧尿嘧啶)掺入到细胞增殖(复制)时新合成的 DNA 中的数量,来检查淋巴细胞的分裂情况或活性。BrdU-ELISA 试剂盒由德国 Bioehringer Mannheim 公司提供。

表 1 肉仔鸡日粮配方及营养水平

Table 1 The formulation and the nutrient levels of diet in broiler chicken

饲料 Feedstuffs	配比(%) Composition		营养素 Nutrients	营养水平 The levels of nutrient	
	0~3 周	4~7 周		0~3 周	4~7 周
	0~3weeks	4~7weeks		0~3weeks	4~7weeks
玉米 Corn	60.81	64.00	代谢能 ME(MJ/kg)	12.67	13.10
豆粕 Soybean meal	28.00	26.90	粗蛋白 CP(%)	21.00	19.50
鱼粉 Fishmeal	3.00	2.00	钙 Calcium(%)	1.90	0.90
棉粕 Cotton meal	2.00	—	有效磷 AP(%)	0.51	0.45
石粉 Limestone	1.25	1.00	赖氨酸 Lys(%)	1.09	1.05
大豆油 Soybean oil	2.00	3.00	蛋氨酸 Met(%)	0.45	0.36
蛋氨酸 Methionine	0.17	0.12	蛋-胱 Met-Cys(%)	0.85	0.78
赖氨酸 Lysine	0.06	0.03	食盐 Salt(%)	0.37	0.35
磷酸氢钙 Dicalcium phosphate	1.40	1.65			
食盐 Salt	0.30	0.03			
预混料 <sup>1)</sup> Premix	1.00	1.00			

<sup>1)</sup> 每千克日粮添加:铜 11mg,碘 0.44mg,铁 110mg,锰 100mg,硒 0.25mg,锌 120mg,钴 0.40mg,VA8800IU,VD<sub>3</sub>300IU,VE22.5IU,VK<sub>1</sub>1.8mg,生物素 0.2mg,叶酸 1.0mg,尼克酸 50mg,泛酸 11mg,核黄素 6.6mg,硫胺素 3.0mg,吡哆醇 4.4mg,VB<sub>12</sub>0.02mg,胆碱 1300mg(0~3 周)和 1000mg(4~7 周)

The content per kilogram diet: Cu 11mg, I 0.44mg, Fe 110mg, Mn 100mg, Se 0.25mg, Zn 120mg, Co 0.4mg, VA 8800IU, VD<sub>3</sub> 300IU, VE 22.5IU, VK<sub>1</sub> 1.8mg, biotin 0.2mg, folic acid 1.0mg, niacin 50mg, pantothenic acid 11mg, riboflavin 6.6mg, thiamin 3.0mg, pyridoxine 4.4mg, VB<sub>12</sub> 0.02mg, choline 1300mg(0~3 weeks) and 1000mg(4~7 weeks)

淋巴细胞收集:在7周龄时,从每组随机选12只鸡,在无菌状态下进行以下全部操作:心脏采血3~4ml肝素抗凝(25单位/ml血)。在灭菌尖嘴离心管中各加入比重为1.063的无菌percoll细胞分离液0.5ml(Pharmacia公司生产),然后沿管壁缓缓加入1ml全血,盖上灭菌橡胶塞,用水平离心机离心(3000r/min, 30min)分离外周血淋巴细胞,共得到4个分层。用无菌1ml加样器小心吸收上数第2层中的淋巴细胞,移入无菌离心管中,加入4ml无钙镁Hank's平衡液洗涤2次(2000r/min, 20min),第3次用3ml完全RPMI1640细胞培养液(含青霉素100IU/ml、链霉素100mg/ml、灭活犊牛血清10%)洗涤离心(3000r/min, 15min),弃上清,加入完全RPMI1640培养液2ml,混匀,盖上灭菌橡胶塞,4℃保存备用。

细胞计数和浓度调整:吸取50 $\mu$ l细胞原液与1950 $\mu$ l的含0.16%曲利本蓝(Trypanblue)的无钙镁Hank's细胞平衡液混匀,用血球计数板在显微镜下计数活的淋巴细胞(死细胞蓝染),然后用完全RPMI1640细胞培养液将细胞浓度调整到 $1 \times 10^6$ 个/ml,4℃贮存备用。细胞培养:用完全RPMI1640培养液配制丝裂原,ConA浓度为45 $\mu$ g/ml,LPS浓度为25 $\mu$ g/ml,PHA浓度为120 $\mu$ g/ml。用96孔组织细胞培养板(平底)培养细胞,每种刺激原各做3个平行样,同时作空白对照和背景对照。

测定:各孔加2mol/L的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 $\mu$ l终止反应。用MC-318型酶联检测仪在450nm波长处测定各孔的吸光度(ABS)值,以每孔ABS减去空白ABS的值表示淋巴细胞转化率,求出3个重复的平均值代表该样的淋巴细胞转化率。

1.3.4 在金霉素-RPMI1640培养介质中测定淋巴细胞对丝裂原刺激的反应性 用完全RPMI1640

液配制含金霉素0,18.75,37.5,75,150 $\mu$ g/ml的培养液,以PHA(120 $\mu$ g/ml)作丝裂原,培养对照组鸡血液淋巴细胞,每种处理设3个重复。

#### 1.4 BSA特异性抗体测定

7日龄时,用0.5%的牛血清白蛋白(BSA)在左右大腿进行肌肉注射,各注射0.5ml。14日龄时同前法进行BSA强化免疫,分别在21和42日龄时心脏采血约4ml,静置30min后,2500r/min离心10min,吸取血清,-30℃保存,用酶联免疫吸附(ELISA)方法测定BSA特异性抗体。

#### 1.5 统计分析

所有试验结果用SAS软件进行显著性检验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 金霉素对肉仔鸡生产性能的影响

统计结果表明,在饲料中添加金霉素对肉仔鸡的生长具有促进作用,但对饲料转化效率的促进作用在试验中期作用效果显著,前期和后期的作用效果不显著(表2)。另外,不同添加剂量的金霉素影响效果不同。从第2周末起,150组的体重显著高于对照组和50组( $P < 0.01$ ),而且这种促进作用一直维持到第6周末(表3)。关于促生长的有效剂量,本试验结果与前期的研究结果有差异,朱蓓蕾(1992)<sup>[7]</sup>研究认为金霉素在肉仔鸡饲料中的适宜添加量为35~50mg/kg。佟建明等(1995)<sup>[8]</sup>研究发现,在不同环境条件下,金霉素对肉仔鸡生长的作用效果不同,在笼养条件下,40mg/kg的金霉素对肉仔鸡生长无显著影响。前期研究结果差异的主要原因可能是饲养环境条件,另外,本次试验结果与佟建明等(1995)的研究结果一致<sup>[8]</sup>,这进一步证明了金霉素的促生长作用与饲养环境有关。

表2 金霉素对不同日龄肉仔鸡饲料转化率的影响<sup>1)</sup>(饲喂量/体重)

Table 2 The effect of CTC on the feed conversion of broiler at different ages(feed/body weight)

处理 Treatment (mg/kg)	7日龄 7day	14日龄 14day	21日龄 21day	28日龄 28day	35日龄 35day	42日龄 42day
0	1.12 $\pm$ 0.14a	1.35 $\pm$ 0.05a	1.58 $\pm$ 0.08 a	1.69 $\pm$ 0.05 A	1.77 $\pm$ 0.08 a	1.93 $\pm$ 0.09 a
50	1.15 $\pm$ 0.12 a	1.36 $\pm$ 0.06 a	1.55 $\pm$ 0.07a	1.67 $\pm$ 0.03AB	1.78 $\pm$ 0.06a	1.90 $\pm$ 0.08a
150	1.14 $\pm$ 0.04 a	1.35 $\pm$ 0.06a	1.49 $\pm$ 0.06a	1.62 $\pm$ 0.02 B	1.73 $\pm$ 0.06 a	1.90 $\pm$ 0.04 a

<sup>1)</sup> 同列数字有不同大写字母的表示差异极显著( $P < 0.01$ ),不同小写字母的表示差异显著( $P < 0.05$ ),下同

Values in a line followed by different capital letter are extreme significantly different ( $P < 0.01$ ), by different letter are significantly different ( $P < 0.05$ ). The same as below

### 2.2 金霉素对不同日龄肉仔鸡免疫器官指数的影响

表4的数据表明,金霉素在日粮中分别添加50

和150mg/kg对各免疫器官的发育都有不同程度的抑制作用,在21日龄时对胸腺生长的抑制率分别为

10%和 24%, 42 日龄时的抑制率分别为 22%和 31%。表明,随着日粮中金霉素添加量的增加,胸腺生长受到抑制的程度越大,且随着饲用日龄的延长,胸腺受到抑制的程度也越大。

50 和 150mg/kg 的金霉素对脾脏发育的影响不同,在 21 和 42 日龄时,高剂量组鸡脾脏指数均比对照组低,且存在显著差异( $P < 0.05$ )。低剂量组与

对照组差异不显著( $P > 0.05$ )。说明,随着日粮中金霉素添加量的增加和饲用时间的延长,脾脏发育受到抑制的程度越来越大。

50 和 150mg/kg 的金霉素对法氏囊指数均有不同程度的显著降低作用( $P < 0.05$ ),随金霉素水平的增加,法氏囊指数降低越大。结果表明,日粮中的金霉素具有促进法氏囊萎缩的作用。

表 3 金霉素对不同日龄肉仔鸡体重的影响(g)

Table 3 The effect of CTC on the body weight of broiler at different ages

处理 Treatment(mg/kg)	7 日龄 7day	14 日龄 14day	21 日龄 21day	28 日龄 28day	35 日龄 35day	42 日龄 42day
0	126.6±5.3a	311.6±11.3B	597.5±24.1 B	848.4±44.7 B	1126.7±49.4 B	1451.1±49.5 B
50	129.2±8.2 a	311.4±12.4 B	609.5±12.4AB	876.6±20.8 AB	1152.9±55.8 AB	1478.1±39.1 AB
150	131.7±5.7 a	330.5±5.9A	633.9±11.9A	898.1±14.9 A	1206.5±30.9 A	1531.3±36.2 A

表 4 金霉素对肉仔鸡免疫器官指数的影响<sup>1)</sup>(g/kg b. w.)

Table 4 The effect of CTC on the index of immune organs

处理 Treatment (mg/kg)	胸腺 Thymus		脾脏 Spleen		法氏囊 Fabricius' bursa	
	21st day index(IR)	42th day index(IR)	21st day index(IR)	42th day index(IR)	21st day index(IR)	42th day index(IR)
0	2.20±0.26a(0)	1.97±0.14a(0)	1.22±0.06a(0)	1.91±0.31a(0)	2.82±0.38a(0)	0.76±0.21a(0)
50	1.98±0.29ab(10)	1.54±0.20b(22)	1.02±0.10 a b(16)	1.45±0.19 a b(24)	2.62±0.24b(7)	0.54±0.10b(29)
150	1.68±0.24b(24)	1.36±0.14b(31)	0.90±0.16b(26)	1.41±0.12b(26)	1.80±0.22b(36)	0.49±0.03b(36)

<sup>1)</sup> IR = 抑制率 inhibitory rate

### 2.3 金霉素对活体 T、B 淋巴细胞转化率的影响

机体的免疫系统主要由 4 部分组成,即吞噬细胞、补体、B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞。在免疫应答的发生发展过程中,T 淋巴细胞主要参与细胞免疫应答,B 淋巴细胞主要参与体液免疫应答。丝裂原能刺激它们进行有丝分裂和增殖。Con A 是 T 细胞增殖的刺激原,LPS 是 B 细胞增殖的刺激原。统计结果表明,150mg/kg 的金霉素使 T 细胞受 Con A 刺激后的增殖率降低 25.86%( $P < 0.05$ ),使 B 细胞受 LPS 刺激后的增殖率降低 19%( $P < 0.05$ )。50 mg/kg 的金霉素对 T、B 淋巴细胞的增殖率无显著影响(表 5)。试验结果表明,持续饲用金霉素使肉仔鸡的 T、B 淋巴细胞对 Con A 和 LPS 刺激的反应性降低,这种抑制作用随金霉素在饲料中水平的提高而增强,当达到 150 mg/kg 时,呈现显著的抑制作用。

### 2.4 金霉素在体外对淋巴细胞对丝裂原刺激的反应性的影响

表 6 的试验结果表明,随着培养介质中金霉素浓度的提高,T 淋巴细胞的增殖率逐渐降低,呈明显的负相关。当培养介质中金霉素浓度达 150 $\mu$ g/ml

时,T 细胞的增殖几乎停止,其抑制率高达 84.4%。因此,金霉素对鸡 T 淋巴细胞的增殖具有直接的抑制作用。这与 Marie(1993)报道的金霉素对人的 T、B 淋巴细胞的增殖具有直接抑制作用的结果相同<sup>2)</sup>。

### 2.5 金霉素对特异性抗体产生的影响

表 7 数据表明,在日粮中添加 50 或 150mg/kg 的金霉素,在 21 和 42 日龄时,BSA 特异性抗体效价与对照组相比均有极显著的降低( $P < 0.01$ ),说明金霉素对肉仔鸡的体液免疫系统有极显著的抑制作用。

## 3 结论

肉仔鸡免疫器官发育、体内淋巴细胞的转化试验、体外淋巴细胞培养试验和特异性抗体研究分析结果表明金霉素对肉仔鸡免疫系统具有显著影响。第一,金霉素对肉仔鸡免疫器官发育具有明显抑制作用;第二,金霉素对动物体内 T、B 淋巴细胞的转化具有显著抑制作用;第三,在体外对淋巴细胞的增殖具有显著抑制作用,说明金霉素对淋巴细胞具有直接抑制作用;第四,金霉素对肉仔鸡的体液免疫反

表 5 金霉素对 T、B 淋巴细胞对丝裂原刺激的反应性的影响

Table 5 The effects of CTC on the response of T or B cell to the mitogens

金霉素 CTC (mg/kg)	T 细胞反应 T cell action		B 细胞反应 B cell action	
	Con A	抑制率(%)	LPS	抑制率(%)
		Inhibitory rate		Inhibitory rate
0	1.017±0.16a	0	0.863±0.10a	0
50	0.817±0.14ab	20	0.761±0.28ab	12
150	0.754±0.13b	26	0.703±0.12b	19

表 6 金霉素在 RPMI1640 介质中对淋巴细胞对 PHA 刺激的反应性的影响

Table 6 The effect of CTC on the response of lymphocyte to mitogen PHA

	金霉素 CTC(μg/ml)				
	0	18.75	37.50	75.00	150.00
增殖率 ABS(%)	1.051±0.13	0.793±0.10	0.605±0.03	0.249±0.12	0.164±0.03
抑制率 IR(%)	0	24.56	42.45	76.27	84.426

表 7 金霉素对 BSA 抗体效价的影响

Table 7 The effect of CTC on the BSA antibody production

金霉素 CTC (mg/kg)	21 日龄	42 日龄
	21days	42days
0	1.76±0.27A	1.51±0.34A
50	1.51±0.16B	1.33±0.42B
150	1.23±0.30B	1.21±0.34B

应具有显著抑制作用;第五,金霉素的免疫抑制作用随其剂量的增加而增强;第六,金霉素对免疫系统具有屏障作用,并借此促进肉仔鸡的生长。

## References:

- [1] Glette J, Sandberg S, Haneberg B, et al. Effect of tetracyclines and uvlight on oxygen consumption by human leukocytes[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1984, 26: 489-492.
- [2] Marie Therese Labro. Immunomodulation by antibacterial agents[J]. *Drugs*, 1993, 45 (3): 319-328.
- [3] Harmon B G, A H Jensen, D H Baker. Influence of dietary antibiotics on antibody response to specific antigens[J]. *J. Anim. Sci.* 1973, 37: 1155-1158.
- [4] Glick B. The immune response of bursaless birds as influenced by antibiotics and age[J]. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 1968, 127: 1054-1057.
- [5] Glick B. The avian immune system[J]. *Avian Dis.* 1979, 23: 282-289.
- [6] Dafwang I I, M E Cook, M I Sunde, et al. Bursal, intestinal and spleen weights and antibody response of chicks fed sub therapeutic levels of dietary antibiotics[J]. *Poultry Science*, 1985, 64: 634-639.
- [7] Zhu B L. The report of the clinical effect of CTC[J]. *Feed Industry*, 1992, 13(6): 24-25. (in Chinese)  
朱蓓蕾. 饲料金霉素实验临床药效试验报告[J]. *饲料工业*, 1992, 13(6): 24-25.
- [8] Tong J M, Xiao X L, Sa R N, et al. The effect of CTC on broiler performance in different environment[J]. *China Feed*, 1995, 22: 17-19. (in Chinese)  
佟建明, 肖希龙, 萨仁娜, 等. 不同饲养条件下金霉素对肉仔鸡的作用效果[J]. *中国饲料*, 1995, 22: 17-19.