

# 不同品种育成猪基线免疫性状的比较

巨向红, 雍艳红, 肖文疆

(广东海洋大学动物医学系, 广东湛江 524088)

**摘要:** 为了比较不同品种育成猪基线免疫指标的差异, 研究选用巴马香猪、本地黑猪和杜长大3个品种育成猪, 采用显微镜平板计数法计数红、白细胞总数; 血涂片法测定白细胞分类计数; EA花环形成试验检测B淋巴细胞的百分率; 流式细胞仪检测T淋巴细胞亚群百分率。结果表明: 巴马香猪红细胞总数(RBC)、中性粒细胞百分率(GR%)、嗜酸性粒细胞百分率(EO%)以及T淋巴细胞亚群CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>百分率(CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>)等5项指标与本地黑猪、杜长大 $t$ 检验差异显著( $P < 0.05$ ), 其中RBC和GR%显著高于本地黑猪和杜长大, EO%以及CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>显著低于本地黑猪和杜长大( $P < 0.05$ )。B淋巴细胞百分率(BLY%)显著低于本地黑猪, 嗜碱性粒细胞(BASO%)显著低于杜长大, 而白细胞总数(WBC)、淋巴细胞百分率(LY%)、单核细胞百分率(MO%)和CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>等4项指标与本地黑猪、杜长大基本一致。对本地黑猪与杜长大进行比较发现, WBC与BYL%2项差异显著。说明品种是影响基线免疫性状的一个重要因素, 但对同一品种猪, 各项指标间没有相关性。

**关键词:** 基线免疫; T淋巴细胞亚群; 猪

中图分类号: S828.1

文献标识码: A

文章编号: 0258-7033(2009)09-0020-04

我国是养猪大国, 在全球养猪生产中占重要地位。但在养猪业迅速发展的同时, 各种疾病的爆发也呈逐年扩大趋势。其引起猪死亡率的升高和生产力的降低, 给畜牧业造成巨大的经济损失。选择对疾病抵抗力较强的品种不仅可以降低死亡率和发病率, 同时可提高生产力和生产性能。据报道, 动物基线免疫性状的不同可能反映出其对传染病的易感性<sup>[1]</sup>, 或对其他应激原的生物反应性<sup>[2]</sup>。Bianchi等<sup>[3]</sup>比较了猪不同免疫状态和血清皮质醇浓度随年龄的变化趋势, 而Ruis等<sup>[4]</sup>则报道了其随性别的变化趋势。但不同品种之间的横向比较资料并不多见。我们推测不同品种猪对疾病的抵抗力不同可能在基线免疫参数上有所反映。本研究选用巴马香猪、本地黑猪和杜长大猪, 利用光镜及流式细胞仪等技术, 系统分析了不同品种育成猪血液中白细胞总数、淋巴细胞分类计数、B淋巴细胞百分率及T淋巴细胞亚群等基线免疫指标, 为猪抗病品种的选育提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 样品采集** 选择2~3月龄的巴马香猪10头、杜长大11头和本地黑猪10头。前腔静脉采血10 mL, 肝素钠抗凝处理。

**1.2 白细胞计数和淋巴细胞分类计数** 显微镜计数法计数红、白细胞总数, 姬姆萨染色法作白细胞分类计数, 按文献推荐方法<sup>[5]</sup>进行。

**1.3 B淋巴细胞数量测定** 用EA玫瑰花环实验测定猪外周血B淋巴细胞数量。淋巴细胞分离液分离猪淋巴细胞后制作淋巴细胞悬液, 翅下静脉采集鸡血制备EA悬液, 将淋巴细胞悬液和EA悬液混匀后离心, 1%戊二醛固定, 涂片后姬姆萨染色、镜检。凡一个淋巴细胞结合3个以上鸡红细胞即为EA花环形成阳性细胞, 共计数200个淋巴细胞, 计数花环形成率。

**1.4 T淋巴细胞亚群测定** 取抗凝处理的猪全血50  $\mu$ L, 分别加入抗猪CD3单克隆抗体(FITC标记)和抗猪CD4或CD8单克隆抗体(PE标记)各50  $\mu$ L, 避光作用15~20 min后加入0.5 mL溶血素, 用E-PLCS XL型流式细胞仪进行分析。单克隆抗体均购自美国Southern Biotech公司, 溶血素购自eBioscience公司。

**1.5 统计分析** 不同组别相同指标间用 $t$ 检验进行比较, 百分数先作对数转换再进行 $t$ 检验。

## 2 试验结果

**2.1 白细胞数量和淋巴细胞分类计数** 白细胞分类计数结果见表1。白细胞数量, 以本地黑猪最高, 其次是巴马香猪和杜长大, 且差异显著( $P < 0.05$ )。

收稿日期: 2008-09-24, 修回日期: 2009-01-19

基金项目: 广东海洋大学博士启动金(0712107)

作者简介: 巨向红(1977-), 男, 涪川县人, 讲师, 博士

中性粒细胞在巴马香猪最高,本地黑猪最低,两者差异极显著( $P < 0.01$ )。嗜酸性粒细胞在杜长大最高,而香猪最低,且差异显著( $P < 0.05$ )。嗜碱性粒细胞在本地黑猪最高,而在巴马香猪最低,且差异显著( $P < 0.05$ )。而淋巴细胞的百分率在巴马香猪最低,在本地黑猪最高,且差异显著( $P < 0.05$ )。单核细胞的数量在巴马香猪最高,而在杜长大最低,且差异显著( $P < 0.05$ )。

2.2 B淋巴细胞百分率和T淋巴细胞亚群 B淋巴细胞百分率和T淋巴细胞亚群结果如表2所示。EA玫瑰花环实验结果表明,B淋巴细胞百分率在本地黑猪最高,依次分别是巴马香猪和杜长大,且在本地黑猪与巴马香猪及杜长大间差异显著( $P < 0.05$ )。表达CD3蛋白的T淋巴细胞百分率在杜长大最高,而在巴马香猪最低,且在巴马香猪与杜长大及本地黑猪间差异显著( $P < 0.05$ )。同时表达CD3和CD4蛋白的T淋巴细胞(CD4<sup>+</sup>亚群)的百分率以杜长大最高,而在巴马香猪最低,且在巴马香猪与杜长大及本地黑猪之间差异显著( $P < 0.05$ )。而同时表达CD3和CD8蛋白的T淋巴细胞(CD8<sup>+</sup>亚群)杜长大最高,而在巴马香猪最低,且在巴马香猪与杜长大及本地黑猪之间差异显著( $P < 0.05$ )。CD4/CD8的比值在三者之间差异不显著。

### 3 讨论

红细胞具有免疫和参与机体免疫调节的功能,具有许多与免疫有关的物质,如型补体受体(CR1)、淋巴细胞相关抗原-3(LFA-3)、C3b灭活因子、超氧歧化酶(SOD)等<sup>[6]</sup>。本研究中,巴马香猪RBC含量显著高于本地黑猪与杜长大。白细胞作为免疫系统的一部分,帮助动物机体抵抗传染病以及外来异物的入侵,是血液中重要的免疫细胞。据报道,0~4周龄仔猪白细胞和淋巴细胞的数量随年龄增加而增加<sup>[7]</sup>。卿柳庭等<sup>[8]</sup>研究了7~11周龄的长大杂交猪的免疫特性,发现血液中红、白细胞总数、嗜中性白细胞百分含量、淋巴细胞百分含量已稳定在成年猪正常的生理范围。这是由于7~11周龄猪的骨髓功能已发育完全,对这些细胞的发生和释放呈稳定状态。本试验选用2~3月龄的巴马香猪、杜长大和本地黑猪为实验动物,可以作为该品种猪基线免疫状态的标志。另外,据Desautels等<sup>[9]</sup>和Sutherland等<sup>[10]</sup>的报道,动物性别的差异不会对免疫参数产生影响。因此,在本研究中,我们没有分析不同性别间的免疫参数差异。

Sutherland等<sup>[11]</sup>比较了约克夏、杜洛克、眉山、长大(长白×大约克夏)和大约克夏5个品种猪的白细

表1 不同品种育成猪外周血白细胞数量和各类淋巴细胞百分率

免疫指标	巴马香猪		杜长大		本地黑猪	
	$\bar{x} \pm se$	CV/%	$\bar{x} \pm se$	CV/%	$\bar{x} \pm se$	CV/%
红细胞/( $10^{12} \cdot L^{-1}$ )	7.68±0.225 <sup>a</sup>	2.94	6.52±0.34 <sup>b</sup>	5.31	6.72±0.23 <sup>c</sup>	3.50
白细胞/( $10^9 \cdot L^{-1}$ )	17.15±0.87 <sup>a</sup>	5.10	16.15±0.56 <sup>a</sup>	3.48	18.00±0.79 <sup>c</sup>	4.41
中性粒细胞/%	37.80±0.44 <sup>a</sup>	1.51	35.25±1.12 <sup>b</sup>	4.41	34.28±1.10 <sup>c</sup>	4.75
嗜酸性粒细胞/%	2.70±0.24 <sup>a</sup>	10.14	4.75±0.37 <sup>b</sup>	10.53	4.21±0.66 <sup>c</sup>	21.51
嗜碱性粒细胞/%	0.50±0.20 <sup>a</sup>	70.71	1.37±0.18 <sup>b</sup>	18.18	0.93±0.32 <sup>a</sup>	48.45
淋巴细胞/%	55.50±0.80	1.91	55.63±0.69	1.70	57.50±1.71	4.60
单核细胞/%	3.50±0.20	10.10	3.00±0.25	13.61	3.07±0.32	14.65

注:同行数据肩标不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。下表同

表2 不同品种育成猪外周血B淋巴细胞百分率和T淋巴细胞亚群

免疫指标	巴马香猪		杜长大		本地黑猪	
	$\bar{x} \pm se$	CV/%	$\bar{x} \pm se$	CV/%	$\bar{x} \pm se$	CV/%
B淋巴细胞	23.90±0.68 <sup>a</sup>	3.44	22.88±0.86 <sup>a</sup>	4.85	26.36±1.66 <sup>b</sup>	5.66
CD3/%	39.40±5.23 <sup>a</sup>	13.28	60.37±5.42 <sup>b</sup>	10.84	54.08±6.67 <sup>c</sup>	14.85
CD4/%	9.72±2.02 <sup>a</sup>	26.24	17.90±1.93 <sup>b</sup>	14.17	14.21±2.53 <sup>c</sup>	20.89
CD8/%	14.12±2.50 <sup>a</sup>	23.36	20.90±0.53 <sup>b</sup>	3.45	19.25±2.20 <sup>c</sup>	14.86
CD4/CD8	0.71±0.17	30.84	0.86±0.12	17.69	0.77±0.16	28.54

胞总数和淋巴细胞分类计数,发现白细胞总数在大约克夏最高,为  $2.94 \times 10^7/\text{mL}$ ,而杜洛克最低,为  $1.83 \times 10^7/\text{mL}$ 。在本试验中,白细胞数量最高的为本地黑猪,其次是巴马香猪和杜长大。且数量均低于杜洛克,这可能是不同猪种间的种属差异性所致。本研究中,中性粒细胞百分率在巴马香猪最高,在本地黑猪最低。而嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和淋巴细胞的百分率却以巴马香猪最低。说明对同一猪种而言,白细胞分类计数的结果之间无相关性。这与 Sutherland 等<sup>[11]</sup>最近的报道一致。他研究了慢性热应激和社群关系对不同品种猪生理和生产性能指标的影响,发现不同品种猪的淋巴细胞分类计数结果不同,但对同一动物,某一指标的变化与其他的指标之间无相关性。说明动物的免疫机制是一个复杂的灰色系统,并不能依据某些免疫指标的高低来判断动物的免疫力高低,而要用多种指标进行综合判断。

B 淋巴细胞是动物体一种重要的免疫细胞,在体液免疫中发挥重要作用。这种淋巴细胞受抗原刺激后,会增殖分化出大量浆细胞。浆细胞可合成和分泌抗体并在血液中循环,最后与抗原结合。外周血中,B 细胞约占淋巴细胞总数的 10%~15%<sup>[12]</sup>,决定着机体体液免疫水平的高低。本研究中,B 淋巴细胞百分率在本地黑猪最高,而在杜长大最低,这是否说明本地黑猪对疾病抵抗力较强的部分原因是由于外周血 B 淋巴细胞水平较高,这一推论尚需进一步研究证实。

T 淋巴细胞是机体免疫应答的核心细胞,根据其表面分化的抗原不同,将其分成若干亚群。具有 CD3 抗原的 T 细胞为成熟 T 细胞;具有 CD4 抗原的为辅助性 T 细胞(Th)<sup>[13]</sup>。各 T 细胞亚群细胞数量及其比例的正常是动物机体免疫系统功能正常的主要标志,在正常情况下,CD4/CD8 的比值为 2:1,若偏离此值,甚至比值倒置则说明机体免疫功能失常,故 T 细胞亚群的检测是研究机体免疫作用机制和评价免疫功能的主要手段<sup>[14]</sup>。在本研究中,3 个品种猪 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞在其血液白细胞的百分率分别为 39.40、54.08 和 60.37,这与以前的报道基本一致。对 3 个品种猪 T 淋巴细胞亚群百分率进行比较,发现巴马香猪 T 淋巴细胞、CD4<sup>+</sup> 亚群和 CD8<sup>+</sup> 亚群的百分率都显著低于本地黑猪和杜长大,但 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 在 3 个品种间差异不显著,且比值均在 0.71 与 0.86 之间。这与文献报道的 2:1 不一致,也与人类在正常或各种疾病状况

下的比值范围 1.24~1.46 相偏离<sup>[10,14,15]</sup>。这可能源于猪的品种特性。大量的研究表明,猪具有倒转的淋巴解剖学结构和不寻常的淋巴细胞移行定位、外周血中高比例的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞亚群及低比值的 CD4/CD8 细胞比<sup>[16~18]</sup>。这些对于更加深入地了解 CD4 和 CD8 分子在抗原识别和细胞免疫中的功能构成新的挑战,而要探明这种特性形成的确切机理还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Hsing M J, Coeenn G J, Vaiman M, *et al.* Individual differences in cell-mediated and humoral immunity in pigs[J]. *Vet Immunol Immunop*, 1995, 45:97-113.
- [2] Mgaunsson U, Wiklie B, Mlaalrd B, *et al.* Mycoplasma hyorhinis infection of pigs selectively bred for high and low immune response[J]. *Vet Immunol Immunop*, 1998, 61:83-96.
- [3] Bianchi A T, Moonen-leusen H W, Van P J, *et al.* The use of a double antibody sandwich ELISA and monoclonal antibodies for the assessment of porcine IgM, IgG and IgA concentrations[J]. *Vet Immunol Immunop*, 1995, 44:309-317.
- [4] Ruis M A, Te rake J H, Engel B, *et al.* The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: Effects of age, gender, and stress[J]. *Physiol Behav*, 1997, 62: 623-630.
- [5] 东北农学院. 兽医临床诊断学(第 2 版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1990.
- [6] 陈龙,毛鑫智. 血细胞免疫研究进展[J]. *国外畜牧科技*, 1999, 26(4): 33-36.
- [7] Ann B B, Michael M I. Evaluation of the mitogen-induced proliferation and cell surface differentiation antigens of lymphocytes from pigs 1 to 30 days of age[J]. *J Anim Sci*, 1993, 71: 2073-2079.
- [8] 卿柳庭,袁宗辉. 育成猪免疫学指标的测定[J]. *华中农业大学学报*, 2001, 20(6): 561-563.
- [9] Desauts C, Bidanel J, Mormede P. Genetic study of behavioral and pituitary-adrenocortical reactivity in response to an environmental challenge in pigs[J]. *Physiol Behav*, 1997, 62:337-345.
- [10] Sutherland M A, Rodrigrez S L, Ellis M *et al.* Breed and age affect baseline immune traits, cortisol, and performance in growing pigs[J]. *J Anim Sci*, 2005, 83:2087-2095.
- [11] Sutherland M A, Niekamp S R, Rodriguez S L, *et al.* Impacts of chronic stress and social status on various physiological and performance measures in pigs of different breeds[J]. *J Anim Sci*, 2006, 84:588-596.
- [12] 汪仁,薛绍白,柳惠图. 细胞生物学(第 2 版)[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1998.
- [13] 杨汉春. 动物免疫学(第 2 版)[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003.

- [14] 谭成凤, 胡波. 过敏性哮喘患儿 T、B 淋巴细胞亚群检测分析[J]. 现代医药卫生, 2006, 22(8): 1130-1131.
- [15] 马春燕, 焦玉莲, 韩辉, 等. 中西医结合治疗对 Graves 病患者外周血 T、B 淋巴细胞亚群的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2007, 45(8): 767-769.
- [16] Pauly T, Welland E, Dreyer-Bux C, *et al.* Differentiation between MHC-restricted and non-MHC-restricted porcine cytolytic T lymphocytes[J]. Immunology, 1996, 88:238-246.
- [17] Saalmuller A, Bryant J. Characteristics of Porcine T lymphocytes and T-cell lines[J]. Vet Immunol Immunop, 1994, 43: 45-52.
- [18] Zuchermann F A, HUSMANN R J. Functional and Phenotypic analysis of Porcine peripheral blood CD4/CD8 double-Positive T cells[J]. Immunology, 1996, 87:500-512.

### Comparative Study of Baseline Immune Performance in Different Breed Growing Pigs

JU Xiang-hong, YONG Yan-hong, XIAO Wen-jiang

(Department of Veterinary Medicine, Guangdong Ocean University, Guangdong Zhanjiang 524088, China)

**Abstract:** In order to compare the baseline immune indexes of different breeds pigs, We selected the Bama pig, the Local Black pig and the Duroc×Large White×Landrace pig as animal model, taking the Neubauer chamber method to count the total RBC and WBC, the microscopy of stained blood smear method to detect differential counts of the WBC, the Erythrocyte antibody rosette test to detect the bone marrow dependent lymphocyte (B Lymphocyte) and the flow cytometry method to detect the thymus dependent lymphocyte subset. The results showed that the total RBC, percentage of neutrophils and eosinophils (GR%, EO%) as well as percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>(CD4<sup>+</sup>%, CD8<sup>+</sup>%) in the Bama pig are different from the Local Black pig and the Duroc×Large White×Landrace pig (P < 0.05), both of the total RBC and GR% were higher than those of the Local Black pig and the Duroc×Large White×Landrace pig, on the contrary, all of the EO% as well as CD4<sup>+</sup>% and CD8<sup>+</sup>% were lower than of the Local Black pig and the Duroc×Large White×Landrace pig, only the percentage of the bone marrow dependent lymphocyte (BLY%) was lower than the Local Black and the percentage of basophils (BASO%) was lower than those of the Duroc×Large White×Landrace pig; The other indexes such as the total WBC, percentage of lymphocytes and monocytes (LY%, MO%), CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> were not different from the other two breeds. We compared the baseline immune index between the Local Black pig and the Duroc×Large White×Landrace pig, and found that only the total WBC and the BYL% are higher than the Duroc×Large White×Landrace pig. We concluded that the breed was an important factor that impacted the baseline immune characteristic in pigs, but the change of immune measures had no correlated to each other in individual pig.

**Key words:** baseline Immune; thymus dependent lymphocyte subset; pig

# 动物免疫学理论课教学改革的探索与实践

李淑芳, 徐春厚, 雍艳红

(广东海洋大学, 广东 湛江 524088)

**摘要:**在尊重动物免疫学学科特点与规律、抓住学科精髓与实质的前提下,利用课堂语言艺术、启发式教学艺术,结合多媒体演示技术等手段,通过紧密结合生活与临床事例、跟踪免疫学新技术和新成就,激发和培养学生的学习兴趣与感情,开拓学生视野、培养创新性思维意识,提高动物免疫学理论课课堂教学效果。

**关键词:**动物免疫学;教学改革;教学方法

**中图分类号:** G640 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-1981(2009)07-0065-03

动物免疫学是兽医学十分重要的基础学科,它与兽医微生物学、兽医传染病学、兽医寄生虫与寄生虫病学等共同组成预防兽医学的核心学科,<sup>[1]</sup>是动物医学专业重要的基础理论课程之一。动物免疫学侧重于动物疫病的免疫诊断、免疫预防和免疫治疗,在动物疫病的预防与控制中发挥着重要作用。随着动物医学学科的发展,动物免疫学的理论知识和免疫学技术在兽医微生物、兽医传染病、兽医病理学等学科的研究中得到普遍应用,对于推动其他学科的发展和进步起到了不可估量的作用。随着生物学和分子生物学、生物化学的发展,特别是现代生物技术和分子生物学在动物免疫学中的应用,极大地推动了动物免疫学的发展和水平的提高。由于免疫学具有理论性强、抽象、难懂等特点,加上与其他学科相互渗透、交叉和融合,并且涉及分子生物学、生物化学等诸多前沿学科,是医学专业学生反映较难学的课程之一。<sup>[2]</sup>因此,为了使学生更好地学习、理解和掌握免疫学理论知识,提高课堂教学质量,动物免疫学理论课教学有必要进行教学方法与教学手段探索和改革。

一、尊重免疫学学科特点与规律,提高课堂教学技巧与艺术

(一)规范、严密的专业术语与趣味、形象的课堂语言相结合,提高课堂教学效果

动物免疫学作为动物医学专业二年级本科生的一门专业基础课,其理论体系具有一定的抽象性和严密的逻辑性。本学科知识更新快,理论性和实践性极强,其基本概念和基本原理语言描述的严密性、规范性和逻辑性是本学科的重要特点,同时,其理论与技术已经辐射到预防兽医、临床兽医和基础兽医的各个学科,因此,学好动物免疫学将会为今后其他专业的学习打下扎实的理论基础。面对抽象的概念、生疏的原理、繁多的内容,学生很容易感到枯燥、抽象和难以理解,从而产生恐惧和厌学情绪。因此,提高课堂教学的技巧和艺术性是提高教学效果的有效手段。在尊重免疫学特点的前提下,利用规范性专业术语,采用启发式、趣味性语言,对活跃课堂气氛,调动学生学习兴趣,提高课堂教学效果是十分有效的。例如,学习“抗原”概念时,教材将抗原定义为“凡是能刺激动物机体产生抗体或致敏淋巴细胞,并能与之结合引起特异性免疫反应的物质称为抗原”,首先对学生强调此概念定义的严密性,概念中去掉或更换任何词或字,都会使抗原的概念不完整甚至错误。但是对于什么是致敏淋巴细胞?什么是特异性免疫反应?概念中的概念还是十分抽象的。只用利用形象生动的语言将致敏淋巴细胞解释为淋巴细胞接受外来物质刺激后,处于备战状态的淋巴细胞;特异性免疫反应就

收稿日期: 2008-12-28

作者简介:李淑芳(196-),女,农学院动物医学系,副教授,博士。研究方向:预防兽医学,动物免疫学。

是仅仅针对该抗原物质发生的特有的免疫应答反应,而对其他物质刺激产生不同的免疫应答反应。通过这种通俗性语言的解释,学生即可加深对抗原概念及抗原、抗体特异性的理解。

运用形象贴切的比喻式语言,使抽象难懂、索然无味的概念和原理变得易于理解和记忆,提高学生的学习兴趣,从而提高教学效果。例如,学习免疫细胞的功能和作用时,T、B 淋巴细胞通过其相应细胞表面的受体准确识别外来抗原,介导获得性细胞和体液免疫应答,是机体免疫清除病原的主要活性细胞,因此将 T、B 淋巴细胞称为免疫系统的“现代化部队”;嗜中性粒细胞不停地随血液循环遍及全身,当机体的任何局部被微生物感染,中性粒细胞将迅速穿出血管,抵达“出事地点”,吞噬并清除入侵的抗原异物,故称之为免疫系统的“野战部队”。肥大细胞识别微生物所特有的各种危险信号之后募集各种免疫细胞至被侵组织部位,启动炎症过程,是守卫机体门户的“哨兵”细胞;巨噬细胞分布于全身各种组织之中,具有较强的吞噬与杀伤能力,是微生物穿过体表之后所遇到的第一道主要防线,称之为“常驻边防部队”。

(二)结合生活与临床事例提出问题,启发学生思维,培养学习兴趣

免疫学既是现代生物医学的前沿学科,又是理论和实践紧密结合的重要的医学基础桥梁课程。<sup>[3]</sup>动物免疫学与免疫学的理论基本同源,方法和技术基本通用,是动物医学专业设定的必修课程之一。该学科基本概念多、理论性强、内容抽象、逻辑性强和新知识多,采用传统的以教师作为传授知识的主体、学生作为接受知识的客体的教学模式,不但会使课堂气氛沉闷,教学效果不好,而且不利于学生独立思考、开拓创新,甚至束缚学生的个性发展。免疫现象和免疫实践的例子无论是在人类日常生活、医学临床、兽医临床等方面比比皆是,抽象枯燥的理论只有紧密结合生活事例及临床实践才能变得生动有趣。因此,采用理论结合实践、课本结合临床的生动教学方法,让学生体会到免疫学知识的实用意义和价值。如学习变态反应一章,通过日常生活、医学临床和兽医临床上见到的输液过敏反应、海鲜过敏反应、新生骡驹溶血症、输血反应等现象,引入变态反应的类型、概念和原理,针对这些熟悉的现象,带着探究为什么出现这些现象的疑问,学生就会用心去听课,因此对变态反应概念和原理的理解就更为深刻和透彻。结合生活及临床事例提出问题,让学生主动思考,将抽象理论结合临床实践的教学过程,极大地刺激和调动了学生的学习兴

趣和学习动力。

(三)采用多媒体技术的形象性与直观性,提高抽象理论的教学效果

媒体技术辅助教学是现代教育范畴内的一种教育方式,它实现了课堂教学的生动性、直观性和互动性,为课堂教学提供了丰富的教学信息。<sup>[4]</sup>在动物免疫学这门理论性极强的学科上合理地使用多媒体技术于课堂教学中,将会增加知识的生动性、形象性和直观性,对活跃课堂气氛、提高学生注意力,以及对学生理解和接受新知识将是非常有效的。为此,在课件制作和多媒体素材的收集和整理上花费了很大的精力,尽量做到课件生动但不花哨,信息量丰富并且重点突出,章节重点和难点使用图文资料及 Flash 动画加以强化,利用免疫学精品课程相关网站进行知识扩充和更新。例如,学习补体和免疫调节时,利用多媒体动画将补体的概念、补体系统的组成、补体活化的途径、补体的作用等抽象问题形象地一步步演示出来。多媒体技术的利用不仅使教学重点突出,帮助学生强化对重要信息的摄取,而且提高了抽象理论的教学效率,同时,最大限度地提高了学生在单位时间内获取有效信息的量。

二、认真研究和掌握知识的系统性和连贯性,提高课堂教学的实效性

学校动物免疫学教材选用的是中国农业出版社出版的《兽医免疫学》,该教材的读者对象是农业院校动物医学专业本科生和研究生,共分二十五章,包括免疫学基础知识、临床免疫与免疫学应用、免疫学实验技术三大部分。动物免疫学作为动物医学专业的主干课程,三部分都应该是必学内容,缺一不可。但是,在有限的学时内,只有抓住教材实质,合理取舍教学内容,才能引导学生全面了解免疫学教学内容与教材全貌,建立起免疫学的整体理论框架。通过对教材整体分析和解读,结合广东海洋大学特点,除绪论外将课本内容提炼为十章:抗原、抗体和免疫球蛋白、免疫系统、细胞因子、补体系统、免疫应答、抗感染免疫、变态反应、免疫防治、免疫学实验技术,其中前六章为免疫学基本理论,是本课程的重点内容,涵盖了免疫学理论知识的基本要点。临床免疫与免疫学应用则选择了在兽医临床最重要的抗感染免疫、变态反应和免疫防治三部分为主讲内容。免疫学实验技术则以科研和生产中常用的血清学技术为重点,如传统的凝集实验、沉淀反应、免疫标记技术等。同时概括介绍免疫 PCR、核酸探针、免疫印迹等分子生物学与免疫学结合的新技术。通过多年的免疫学教学实践,

证明学生在 50 学时内,通过上述内容的学习,能够基本掌握免疫学理论的实质和精髓,能够学以致用,为动物传染病学、寄生虫病学、兽医生物制品学等专业课程打下良好基础。通过动物免疫学的学习,使学生从思想和知识体系上真正涉足兽医专业领域。

要使学生较好地掌握免疫学知识,教师在课堂教学中要有意识地与前面的授课内容进行联系,引导学生在学习中主动对所学知识进行联系。因此,在讲授新章节课程内容时,首先复习上次讲授的主要内容,提出新章节教学内容的问题,讲授时尽量联系前面已讲授过的知识点。比如讲授免疫应答过程时,先带领学生回顾免疫细胞的产生、分化及其功能,然后讲免疫应答的基本过程,学生就非常容易理解。讲补体时,先回顾免疫球蛋白结构的  $CH_2$  区的功能,引入补体,进一步解释补体的作用,以及补体与抗体的协同与辅助关系,加深学生对补体系统概念和功能理解。通过这种前后连贯,反复强化的教学方式,使学生在课堂上会跟着问题听课,听课过程中在学生头脑中会逐步自然形成一套本学科的理论知识体系。

三、跟踪免疫学科研动态,开拓学生视野,培养创新性思维

本科生的课堂教学过程不仅仅是传授书本知识,更重要的是启发学生的开拓性思维能力和创新意识,培养和提高发现问题、分析问题和解决问题的能力。因此,在应用范围广、知识更新快的动物免疫学教学过程中,适当介绍免疫学研究的新动态和新进展,有意识地拓宽学生视野,打开学生思路,激发学生学习兴趣,培养学生创新性思维是十分必要的。例如,学习免疫防治一章,介绍疫苗种类和应用时,介绍当前兽医临床上常用的传统疫苗时,通过各类疫苗的概念让学生分析这些传统疫苗的优缺点,提出问题,如何

克服这些缺点和弊端?引入利用基因工程技术改造抗原的遗传物质,使其降低或失去毒力。如何改造遗传物质?由此诱导出基因工程重组亚单位疫苗、基因工程活载体疫苗、基因缺失疫苗、核酸疫苗等概念,同时将基因工程疫苗的设计思路、研究现状和应用前景适当介绍给学生,不仅加强了学生对现有传统疫苗优缺点的认识,同时,强调目前用于兽医临床的基因工程疫苗的种类逐渐增多,使学生树立分子生物技术在未来生物和兽医领域是不可或缺的一门科学和技术,利用分子生物学新技术研制的基因工程疫苗是未来疫苗发展的主流和趋势。

四、利用免疫学的辉煌历史和重大成就,培养学生对免疫学和兽医学的感情

免疫学的辉煌历史无疑是引导学生进入免疫学世界的向导,为学生打开了学习免疫学和兽医学的大门,引导学生、吸引学生、激发学生的求知欲望和学习免疫学的兴趣,增强课程的魅力显然十分重要。诺贝尔奖是当今科学界的最高奖励,是科学研究中最杰出成就的象征,迄今,免疫学方面的成果在诺贝尔生理学或医学奖中是获奖最多的学科领域。<sup>[5]</sup>诺贝尔生理学或医学奖自 1901 年设立以来,在 20 世纪共颁发的 98 次奖项中,与免疫学研究有关的奖项就达 27 次,占 27.6%,获奖人数达 40 多人。说明免疫学在生命科学和医学中具有非常重要的地位。因此,在动物免疫学教学过程中,在不同章节将相关的获诺贝尔奖的重大科研成就介绍给学生,让同学们不仅感受到免疫学历史与成就的辉煌,而且能够激发学生对免疫学和动物医学专业的感情,鼓励和支持学生去探索和研究科学知识,培养他们为动物医学乃至其他科学研究贡献自己毕生精力的献身精神。

#### 参考文献:

- [1] 杨汉春,焦新安,周继勇. 兽医免疫学学科发展 [J]. 禽病, 2008, (2): 9 - 13
- [2] 边藏丽,丁建中,王恺斌. 医学免疫学理论课教学方法的探讨 [J]. 山西医科大学学报:基础医学教育版, 2008, (2): 130 - 132
- [3] 陈丽华,李琦,董邦权,等. 医学免疫学教学改革的探索与实践 [J]. 山西医科大学学报:基础医学教育版, 2008, (1): 131 - 133
- [4] 罗旭光,郭淑清,田锋. 多媒体技术在免疫学实验教学中的应用 [J]. 山西医科大学学报:基础医学教育版, 2008, (1): 109 - 111
- [5] 杨汉春. 动物免疫学 [M]. 北京:中国农业大学出版社(第二版), 2003: 8 - 9

(责任编辑与校对 于长志)

# 基于 ASP 的养鹅专家系统的研究与开发

巨向红<sup>1</sup>,程汝庆<sup>1</sup>,曾荣生<sup>1</sup>,陈景航<sup>1</sup>,钟明钧<sup>1</sup>,贾汝敏<sup>2</sup>

(1. 广东海洋大学动物医学系,湛江 524088;2. 广东海洋大学动物科学系,湛江 524088)

**摘要:**为了整合现有的养鹅基本知识和行业资讯以利于广大养殖户及畜牧兽医工作者学习和交流,利用当今流行的 ASP 开发工具,研制开发了养鹅专家系统。该系统由知识库、数据库、推理机、图像库及用户接口组成。涉及详细的养鹅知识体系,具有体系学习、咨询、诊断、检索和相互交流等功能。系统实现养鹅信息共享服务功能,同时为养殖户及从事农业科学研究的人提供有力的后台保证,并且具有应用性、操作简单、界面友好等特点。

**关键词:**养鹅业;专家系统;ASP

我国是当今世界上养鹅数量最多的国家。2004 年我国鹅的存栏量(2.28 亿只)、出栏量(4.94 亿只)和鹅肉产量(197.4 万吨)分别占世界总量的 86.9%、92.73%和 92.67%<sup>[1]</sup>。但目前国内养鹅仍以传统饲养方式为主,有关鹅的饲养标准、疫病防治和科学饲养等相关的知识比较缺乏,养殖户获取帮助的渠道大多数还是依赖书籍或请技术员现场指导。由于书籍更新速度慢,农业专业技术人员缺乏,农民获取信息的速度受到了很大影响。为了改变由于信息不足而制约养鹅业发展的现状,本课题组成员开发了基于 ASP 的养鹅专家系统,旨在为广大畜牧科技工作者和养鹅专业户提供知识窗口和交流平台。

## 1 系统设计与开发

1.1 系统开发环境 本系统开发的硬件环境 PC 机,操作系统

Windows2000 Server。主要开发工具: DreamWeaver MX2004, ASP, Flash MX 8.0, PhotoShop CS2。数据库平台: SQL Server 2000 及其他工具软件。

1.2 系统体系结构 基于 ASP 的养鹅专家系统采用 B/S (Browser/ Server) 网络计算模式,采用 3 层体系结构(如图 1 所示),即数据库服务层(DataBase Service)、功能层(Web Service)和表示层(Browser)。服务器操作系统为 Windows NT 5.1, Web 服务器为 IIS6.0,数据库采用 SQL Server 2000。前台采用 ASP 技术、TML 嵌入的 J script 和 VBScript,后台采用 ASP 技术。这种结构以后台数据库为核心,在 Web 服务器端挂接服务器构件,通过前台浏览器管理和运行<sup>[2]</sup>。

1.3 知识库的构建 知识库是问题求解知识的集合,含有显示

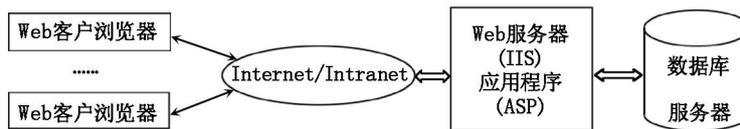


图 1 系统体系结构

表示的各种知识块,包括基本概念、事实、属性、规则和其它有关信息。知识表达实际上是存储知识的数据结构设计,目的是便于知识在计算机中的储存、检索、推理和修改。知识的表达法有:产生式表示法,语义网络表示法,框架表示法,脚本表示法,过程表示法,面向对象表示法等<sup>[3]</sup>。

养鹅专家系统是将从事农业生产研究专家长期积累的知识、总结的经验、出版的专著和发明等,通过整理、分析、加工成具体文字描述,同时把收集到的养殖场、鹅的解剖特征和常见疾病的图片也存入到库,为养鹅平台提供数据。根据养鹅体系的类别,最后确定了数据字典 10 种关系,包括鹅的品种、鹅的解剖特征、鹅的繁育、鹅场的经营管理、鹅的营养与饲料、鹅标准化饲

养管理技术、鹅场建设、鹅的屠宰及肉蛋皮加工、鹅肥肝的生产技术和鹅病防治等关系<sup>[4-15]</sup>。系统大架构主要由前台和后台两部分组成,如图 2 所示。

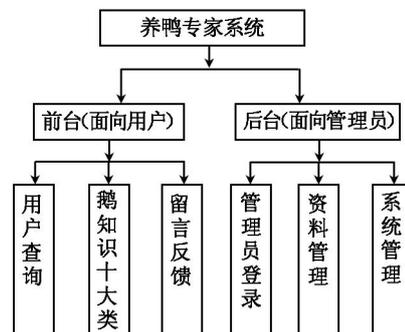


图 2 系统大架构

1.4 推理机建立 养鹅专家系统的推理机主旨思想是设计出智能化的搜索功能,而推理建立是系统开发的一个关键环节,鹅的知识体系因多而复杂,难以把握和区分,本系统分为鹅的品

收稿日期:2008-11-28

基金项目:湛江市科技招标项目(0609135)

作者简介:巨向红(1977-),男,讲师,博士。

通讯作者:贾汝敏(1964-),男,副教授,主要从事动物遗传育种与繁殖方面的研究。

文章编号:1007-9726(2009)02-0035-03(中图分类号:S835)

种、鹅的解剖特征、鹅的繁育、鹅场的经营管理、鹅的营养与饲料、鹅标准化饲养管理技术、鹅场建设、鹅的屠宰及肉蛋皮加工、鹅肥肝的生产技术和鹅病防治 10 大类。再根据每一个类别进行量化。所以专家系统的推理过程和用户获取结果的过程,也是围绕着养鹅知识的分类进行的。推理机的工作流程见图 3 所示:

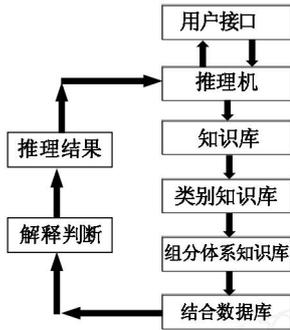


图 3 推理机工作流程图

具体的推理过程包括 3 部分:第一部分是知识库中存放着所有养鹅知识体系信息,对于数据的提取是通过检索文件结构层次模型中结点比对进行的。第二部分是专家系统中的规则库对后台数据库中的信息进行操作和关系运算,每条规则由两部分组成,一部分鉴别规则的适用性和先决条件,另一部分描述规则应用时所完成的动作。应用规则来改变后台数据库,就像应用算符来改变状态一样。第三是按照第二部分提供的知识表达式,将专家知识对应知识库文件(如选择鹅病防治)。然后,由测试模块验证知识库部位的正确性。测试完毕后,由编译知识库文

件把符合条件的描述信息提交出来,再根据描述信息作为条件,进行推理,从后台数据库获取满足条件信息,以文档的形式提交给用户。具体界面如图 4 所示。



图 4 搜索功能

### 2 养鹅专家系统的特点

2.1 系统界面友好 该系统主要是面向养殖户和科技工作者。考虑使用对象在计算机技术方面的水平参差不齐,在兼具实用性和先进的专家系统开发技术的前提下,力争提供赏心悦目、简单、透明、友好的用户平台。养鹅专家系统界面主要分为鹅的品种、鹅的解剖特征、鹅的繁育、鹅场的经营管理、鹅的营养与饲料、鹅标准化饲养管理技术、鹅场建设、鹅的屠宰及肉蛋皮加工、鹅肥肝的生产技术和鹅病防治 10 大板块,其中每个板块又细分为若干小板块,非常符合养鹅知识的系统构架。在界面颜色上,本系统提供了碧海蓝天、棕红预览、浓浓绿意、紫色淡雅、灰色心情和黄色晚霞等 6 种主题方案供用户选择,时尚而个性化,用户只要点击首页最上面的 6 个不同的颜色按钮便能得到不同的视角冲击。系统首页截图如图 5,养鹅专家系统空间地址为: <http://www.gdouye.com.cn>。



图 5 养鹅专家系统首页

2.2 系统功能强大 为了方便知识的查询,养鹅专家系统特意设计了资料统计、资料搜索、推荐资料和查阅排行这几大功能,可以将最热门、最受人好评的养鹅知识准确、智能地递交给用户。

另外,方便的知识交流与发布是本系统的又一大特色。浏览用户可以随时发布资料,把用户掌握的关于养鹅信息添加到知识库中,浏览使用用户越多,养鹅知识体系将越健全。此外,

与用户实现及时互动是养鹅专家系统的新添功能。用户可以将自己要咨询的内容如鹅发病后的症状等信息发表在系统的留言框中,咨询专家则可以选择在线或留言的方式对问题进行解答。强大的后台管理是本系统最大的特色。后台主要具有资源管理、网站管理两大功能,所以本系统更新资料,维护系统的时候方便简单,不需要重新设计系统。系统成型后,无需专业人士便能简洁、灵活、方便的使用和管理,这将有助于本系统的大规模推广与普及。

2.3 可实现模糊搜索 在设计系统的过程中遵循了简洁明了、启发联想的设计原则。系统采用 Web(网站) 技术设计信息操作窗口。而系统的界面首先考虑用户使用简捷搜索方式,以组合框的形式让用户在固定的选项中选择信息,确保使用者查询到准确结果。如:选择鹅的营养与饲料,然后选择营养中的一种,接下来是具体信息,这样相关的信息就以列表形式出现,层层递进选取。另一种是模糊查询,只要在文本框中输入关键字、词,就能显示相关信息。

### 3 结语

该系统实现了网络运行平台,可以支持多用户并发访问和跨用户平台运行。还具备了用户操作灵活、方便及后台数据更新快等优点。另外,系统在实现养鹅信息共享服务功能的同时,为养殖户及从事相关研究的人员提供了有力的后台保证。这不仅有助于解决养鹅专业户找专家难的问题,而且对于加快我省农业的科技创新有一定的促进作用。

### 参考文献

- [1]张喜武. 中国水禽业发展现状与对策[J]. 中国家禽, 2005, 27(10): 1-3.
- [2]张建党. 浅谈 ASP 开发 Web 数据库应用技术[J]. 计算机系统应用, 1998(9): 36-39.
- [3]谢艳新, 潘业兴, 孙艳梅. 基于 ASP.NET 的吉林省病虫害专家诊治[J]. 农业网络信息, 2008(6): 16-18.
- [4]尹兆正. 养鹅手册[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2005.
- [5]许家强, 董尚智, 黄双辉. 养鹅与鹅病防治技术[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 2001.
- [6]李世云. 鹅养殖及产品加工[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2001.
- [7]王继文. 养鹅关键技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2002.
- [8]张帆, 廉爱玲. 肉鹅生产技术指南[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003.
- [9]尹兆正. 肉鹅标准化生产技术[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003.
- [10]李昂. 实用养鹅大全[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [11]刘楠楠. 常见鹅病诊治要领[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2004.
- [12]陈维虎. 高效养鹅 7 日通[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [13]程安春. 养鹅与鹅病防治[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2004.
- [14]贺玉书. 养鹅、鹅致富新技术[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003.
- [15]焦库华, 陈国宏. 科学养鹅与疾病防治[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.

## 生长鹅对多花黑麦草营养成分利用率的研究

尹福泉, 贾汝敏, 王润莲, 黄冠庆

(广东海洋大学农学院动物科学系, 湛江 524088)

**摘要:**为研究生长鹅对特高多花黑麦草各营养成分的消化率,选择 8 只 1 月龄左右,体重 2kg, 体况良好的生长鹅进行代谢试验。试验共分两期: I 期喂给基础日粮(827<sup>#</sup> 肥鸭配合饲料), II 期喂给混合饲料(36% 的基础日粮 + 64% 的黑麦草)。结果表明: I 期平均增重 0.34kg, II 期平均增重 0.32kg, 差异不显著 ( $P < 0.05$ )。黑麦草的表现代谢能为 13.37MJ/kg, 试鹅对黑麦草中干物质、能量、粗蛋白、粗纤维、粗脂肪、粗灰分、Ca、P 的消化率分别为 59.82%、62.29%、51.39%、14.12%、80.49%、15.77%、45.77% 和 52.01%, 说明生长鹅对黑麦草中能量、粗蛋白、粗脂肪、Ca、P 都具有较好的消化能力, 而对粗纤维的利用率不高, 但并不影响试鹅的生长。因此, 用黑麦草代替部分配合饲料来饲喂 1 月龄生长鹅是可行的。

**关键词:**黑麦草; 生长鹅; 代谢试验; 营养成分; 消化率

黑麦草是一种经济价值很高的牧草, 它的茎叶繁茂, 幼嫩多汁, 营养丰富, 为各种家畜(禽)所喜食。其产草量高, 再生性强, 一个生长季内能刈割多次, 是我国南方省(区)的优良禾草<sup>[1-2]</sup>。鹅是唯一能较好利用粗饲料的节粮型家禽。我国是世界上鹅饲养量最大的国家, 利用冬闲农田种植黑麦草来饲养鹅, 其生产技

术简单, 投入少、见效快, 经济效益显著。而关于黑麦草在鹅上营养价值评定的研究鲜有报道, 因此, 为了开辟新的饲料来源, 节约饲料用粮, 大力推广种草养畜(禽)降低成本、提高经济效益, 我们用黑麦草代替部分颗粒饲料来饲喂生长鹅, 探讨鹅对黑麦草中营养物质的利用率, 为种草养鹅生产实践提供依据。

### 1 材料与方 法

1.1 试验动物 选择 1 月龄左右, 生长发育、营养状况、体况等均良好的生长鹅(海大 1 号, 杂交灰鹅) 8 只, 分两期进行试验, 一共 18 d。I 期: 用 827<sup>#</sup> 肥鸭配合饲料(基础日粮); II 期: 用混合饲料(36% 的 827<sup>#</sup> 肥鸭配合饲料 + 64% 的鲜黑麦草)。827<sup>#</sup> 肥鸭配合饲料(含有药物添加剂), 由金钱饲料有限公司(湛江)

收稿日期: 2008-11-20

基金项目: 湛江市科技招标项目(0609135)和广东海洋大学基金项目(C04095)

作者简介: 尹福泉(1972-), 男, 讲师, 博士。

通讯作者: 贾汝敏, Email: zjoujrm@163.com

文章编号: 1007-9726(2009)02-0037-03(中图分类号: S835)

# 米糠多糖对不同免疫状态雏鸡外周血 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞亚群的影响

李淑芳<sup>1</sup>, 李英<sup>2</sup>, 张继东<sup>1</sup>, 雍艳红<sup>1</sup>, 蔡康荣<sup>3</sup>, 谢为天<sup>1</sup>

(1. 广东海洋大学动物医学系, 广东 湛江 524088; 2. 河北省畜牧兽医研究所, 河北 保定 071000; 3. 广东医学院分析中心, 广东 湛江 524023)

**摘要:** 为探讨米糠多糖对不同免疫状态雏鸡免疫功能的调节作用机理, 采用流式细胞技术检测了健康雏鸡、环磷酰胺处理雏鸡和人工感染传染性法氏囊病毒雏鸡在服用米糠多糖 (剂量 150 mg/ (kg · d)) 和不服用米糠多糖情况下, 外周血 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞亚群数量的动态变化。结果表明: 米糠多糖能够提高健康雏鸡外周血 CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞比率, 对 CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞作用不明显; 能够提高环磷酰胺和传染性法氏囊病毒诱导免疫抑制雏鸡外周血中 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞数量。

**关键词:** 米糠多糖; CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞; CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞; 流式细胞术; 雏鸡

**中图分类号:** S852.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-1631 (2008) 05-0074-03

## Effect of Rice Bran Polysaccharide (RBS) on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Lymphocyte Subsets of Peripheral Blood in Different Immunity Chickens

LI Shu-fang<sup>1</sup>, LI Ying<sup>2</sup>, ZHANG Ji-dong<sup>1</sup>, YONG Yan-hong<sup>1</sup>, CAI Kang-rong<sup>3</sup>, XIE Wei-tian<sup>1</sup>

(1. Department of Veterinary Medicine, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Hebei Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Baoding 071000, China; 3. Analysis Centre of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

**Abstract:** To study the regulation mechanism of rice bran polysaccharides (RBS) on different immune states chickens, FCM technique was used to detect the changes of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subsets in peripheral blood of chickens (healthy, treated by CTX and infected with BDV) which were given orally with RBS or not at dosage of 150 mg/ (kg · d). The results indicated that the RBS could increase the rate of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte subsets in peripheral blood of healthy chickens, not remarkably influence the CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subsets, and promoted the rate of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells of peripheral blood in immune suppression chickens induced by CTX and BDV.

**Key words:** Rice bran polysaccharides (RBS); CD4<sup>+</sup> T lymphocyte; CD8<sup>+</sup> T lymphocyte; Flow cytometry (FCM); Chicken

米糠多糖 (rice bran polysaccharide, RBS) 具有促进淋巴细胞增殖活性<sup>[1~5]</sup>、促进正常小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬作用<sup>[4,5]</sup>, 对补体活性和体液免疫也有一定的促进作用<sup>[4]</sup>。提高健康雏鸡和免疫抑制雏鸡 T淋巴细胞转化功能和对疫苗免疫应答反应<sup>[6~8]</sup>。试验采用流式细胞技术 (Flow Cytometry, FCM) 检测了健康雏鸡、环磷酰胺 (CTX) 处理雏鸡和人工感染传染性法氏囊病毒 (BDV) 雏鸡等不同免疫状态雏鸡服用米糠多糖 [剂量 150 mg/ (kg · d)] 和不服用米糠多糖情况下外周血 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞亚群数量的动态变化, 旨在探讨米糠多糖对不同免疫状态雏鸡免疫功能的调节作用机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收稿日期: 2008-04-11

基金项目: 河北省“十五”科技攻关计划 (04220401D)

作者简介: 李淑芳 (1964 -), 女, 河北元氏县人, 副教授, 博士, 主要从事预防兽医学和动物免疫学研究。

1.1.1 试验动物 1日龄三黄鸡, 购于广东省湛江市某孵化场, 琼扩实验检测 BDV 抗体阴性, 常规饲养。待 7日龄时进行试验。

1.1.2 受试药物的制备 以稻谷米皮糠为原料, 用水提醇沉法<sup>[4]</sup>制备米糠多糖。多糖含量 86.3%, 蛋白质含量 2.3%。用生理盐水稀释成 1%溶液, 高压灭菌, 备用。

1.1.3 主要试剂与仪器 环磷酰胺 (CTX): 批号 07020221, 江苏恒瑞医药股份有限公司生产; 传染性法氏囊病毒 (BDV): ( $D_{50} = 1 \times 10^{-4} / 0.1 \text{ mL}$ ), 瑞谱 (保定) 生物工程有限公司惠赠; 淋巴细胞分离液: 中国医学科学院生物工程研究所生产; CD4 和 CD8 鼠抗鸡单克隆抗体 (PE 标记): Southern Biotech 公司产品; 细胞流式仪 (Flow cytometer): EPICS XL 型, Beckman 公司产品; 离心机: TDL-60C 型, 上海安亭科学仪器厂生产。

### 1.2 试验方法

1.2.1 分组与处理 选择 7日龄临床健康雏鸡 180 只, 随机平均分为 6 组, 即: 空白对照组、RBS 组、CTX 组、(CTX + RBS) 组、BDV 组和 (BDV + RBS) 组。BDV 组和 (BDV + RBS) 组隔离饲养。从 7 日龄起,

CTX组和 (CTX + RBS) 组雏鸡肌肉注射 CTX, 剂量 80 mg/(kg · d), 连续 3 d, 其他组雏鸡肌肉注射生理盐水, 0.2 mL/只。从 9 日龄起, RBS组、(CTX + RBS) 组和 (BDV + RBS) 组雏鸡灌服 RBS, 剂量 150 mg/(kg · d), 1 次/d, 连续 5 d; 其他组灌服生理盐水, 0.5 mL/只。11 日龄, BDV 组和 (BDV + RBS) 组雏鸡实施 BDV 人工接种 (100 × D<sub>50</sub>), 0.1 mL/只; 其他组雏鸡肌肉注射等量生理盐水。

1.2.2 样品采集 分别在 7 日龄、14 日龄和 21 日龄, 每组随机抽取 5 只鸡, 心脏采血, 肝素抗凝, 常规分离淋巴细胞, 制备淋巴细胞悬液, 用于外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群的检测。

1.2.3 外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群检测 采用 FCM (Flow cytometry) 法<sup>[8-10]</sup>。

1.2.4 数据处理 结果以平均数 ± 标准差表示。应用 SPSS V13.0 进行单因素方差分析, 用 LSD 法进行组间多重比较。P < 0.05 表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 米糠多糖对试验雏鸡外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群含量的影响

从表 1 可以看出, 试验雏鸡 7 日龄时, 各试验组鸡外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞含量与对照组差异不显著。14 日龄, RBS 组雏鸡外周血中 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞含量高于空白对照组, 但差异不显著; 而其他 4 组的含量均显著低于空白对照组, 但 (CTX + RBS) 组显著高于 CTX 组, (BDV + RBS) 组显著高于 BDV 组。21 日龄, RBS 组鸡外周血中 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞含量显著高于空白对照组, CTX 组、(CTX + RBS) 组、BDV 组和 (BDV + RBS) 组均显著低于空白对照组, 但 (CTX + RBS) 组显著高于 CTX 组; BDV 组与 (BDV + RBS) 组间差异不显著。

表 1 试验鸡外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群的动态变化  
Table 1 Dynamic change of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes subsets of peripheral blood in experimental chickens (%)

组别	7日龄	14日龄	21日龄
空白对照组	38.62 ± 3.86 a	28.50 ± 2.51 a	24.72 ± 2.26 a
RBS组	40.22 ± 3.40 a	31.18 ± 1.66 a	28.76 ± 4.03 b
CTX组	39.34 ± 3.14 a	12.83 ± 2.89 b	14.70 ± 2.63 c
(CTX + RBS) 组	41.40 ± 3.90 a	21.21 ± 2.82 c	18.38 ± 2.86 d
BDV组	40.06 ± 5.53 a	16.20 ± 2.80 b	18.46 ± 2.10 d
(BDV + RBS) 组	38.24 ± 4.44 a	20.78 ± 2.32 c	20.56 ± 2.26 d

\* 同列数据不同小写字母表示差异显著 (P < 0.05), 相同小写字母表示差异不显著 (P > 0.05)。下表相同。

### 2.2 米糠多糖对试验雏鸡外周血 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的影响

从表 2 可以看出, 7 日龄时, 各组雏鸡外周血 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞含量差异不显著; 14 和 21 日龄, 各组雏鸡外周血中 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞含量除 RBS 组与空白对照组差异不显著外, 其他 4 组含量均显著低于空白对照

组, 但 (CTX + RBS) 组显著高于组 CTX, (BDV + RBS) 组显著高于 BDV 组。

表 2 试验鸡外周血 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群的动态变化  
Table 2 Dynamic change of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes subsets of peripheral blood in experimental chickens (%)

组别	7日龄	14日龄	21日龄
空白对照组	24.10 ± 3.24 a	18.46 ± 2.50 a	20.34 ± 3.03 a
RBS组	23.34 ± 2.66 a	18.61 ± 1.64 a	19.94 ± 2.05 a
CTX组	22.92 ± 3.45 a	7.82 ± 2.41 b	6.64 ± 1.72 b
(CTX + RBS) 组	23.16 ± 1.55 a	13.31 ± 3.70 c	11.26 ± 1.81 c
BDV组	21.48 ± 2.47 a	7.30 ± 1.66 b	10.12 ± 1.39 c
(BDV + RBS) 组	24.60 ± 2.69 a	11.67 ± 1.69 c	15.62 ± 1.77 d

### 2.3 米糠多糖对试验鸡外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞的影响

从表 3 可以看出, 7 日龄时, 各处理主雏鸡外周血中 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的比例差异不显著; 14 日龄, RBS 组、CTX 组、(CTX + RBS) 组、(BDV + RBS) 组与空白对照组比较无显著差异, BDV 组显著高于空白对照组; 21 日龄, RBS 组、(CTX + RBS) 组、BDV 组、(BDV + RBS) 组与空白对照组比较差异不显著, CTX 组则显著高于空白对照组, CTX 组和 BDV 组间差异不显著。

表 3 试验鸡外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群比值的动态变化  
Table 3 Dynamic change of the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T lymphocytes subsets of peripheral blood in experimental chickens (%)

组别	7日龄	14日龄	21日龄
空白对照组	1.61 ± 0.19 a	1.27 ± 0.26 a	1.25 ± 0.29 a
RBS组	1.73 ± 0.11 a	1.69 ± 0.19 a	1.45 ± 0.18 a
CTX组	1.75 ± 0.33 a	1.69 ± 0.36 a	2.40 ± 0.99 b
(CTX + RBS) 组	1.79 ± 0.21 a	1.67 ± 0.44 a	1.67 ± 0.36 a
BDV组	1.89 ± 0.36 a	2.33 ± 0.78 b	1.86 ± 0.37 ab
(BDV + RBS) 组	1.60 ± 0.26 a	1.88 ± 0.37 a	1.34 ± 0.13 a

## 3 结论与讨论

### 3.1 环磷酰胺和传染性法氏囊病毒对鸡外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群的影响

现代免疫学理论认为, 机体 T 淋巴细胞各亚群之间相互平衡、互相调节, 使机体对外来抗原刺激产生正常免疫应答, 并维持机体的免疫平衡状态。机体外周血淋巴细胞的数量及 T 淋巴细胞不同亚群的分布与机体的免疫状态直接相关, 当机体受到外来抗原刺激, 诱导体内各类功能性 T 淋巴细胞的数量和免疫活性发生变化, 特别是参与对外源性抗原识别的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞和对内源性抗原识别的 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平与疾病发展阶段、病情转归、用药效果等密切相关。因此, CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群在血液中的分布是医学临床上重要的免疫状态检测指标。本研究发现, 试验雏鸡在注射 CTX 后 7~14 d, 外周血中 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例大幅度降低; 雏鸡感染 BDV 后 3~10 d, 外周血中 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞也明显减少。由于 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细

胞具有诱导和增强机体免疫应答的作用,且能分泌多种具有免疫活性的细胞因子,及刺激B淋巴细胞的活化、增殖和产生特异性中和抗体,因此,CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞减少,导致L-2分泌减少、NK细胞活性降低,T淋巴细胞增殖活性降低,造成机体非特异性细胞免疫应答反应的降低;同时,CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞减少,也使B细胞分化增殖和成熟的诱导作用减弱,从而使试验雏鸡对各种疫苗的特异性免疫应答降低,抗体产生减少,造成体液免疫功能的降低。CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞主要介导细胞毒杀伤作用,其比例的降低表明机体通过细胞毒杀伤作用抵御和清除细胞内的病原的能力降低。因此,CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞比例降低是CTX和BDV诱导细胞免疫和体液免疫双重抑制主要原因之一。

### 3.2 米糠多糖对不同免疫状态雏鸡外周血CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞亚群的影响

试验结果显示,健康雏鸡服用RBS后10d,外周血中CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞显著高于空白对照组,而CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞与空白对照组始终无显著差异。说明米糠多糖能够提高健康雏鸡外周血CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞的数量,从而提高健康雏鸡的非特异性细胞免疫和体液免疫功能;当机体没有内源性抗原(病毒感染细胞或肿瘤细胞)存在时,米糠多糖对体内的CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞活化没有明显作用。当试验雏鸡注射CTX后7~14d,CTX组和(CTX+RBS)组雏鸡外周血CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞数量均低于空白对照组,但(CTX+RBS)组雏鸡外周血CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞数量均高于CTX组;表明RBS能够增加CTX处理雏鸡外周血中CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞数量,促进CTX诱导的机体免疫抑制状态的恢复。当试验雏鸡人工感染BDV后3d,BDV组和(BDV+RBS)组雏鸡外周血CD4<sup>+</sup>T细胞比率低于空白对照组,但(BDV+RBS)组则高于BDV组。此时正是雏鸡服用RBS满5d,表明RBS对BDV引起的CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞减少起到了抑制作用。试验雏鸡在BDV感染后3~10d时,BDV组和(BDV+RBS)组雏鸡外周血CD8<sup>+</sup>T细胞水平均低于空白对照组,但(BDV+RBS)组高于BDV组。上述试验现象说明米糠多糖对CTX和BDV诱导免疫抑制雏鸡外周血CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞水平降低具有一定的抑制作用。米糠多糖通过上调CTX和BDV处理雏鸡血液中CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞水平,增强机体对内源性和外源性抗原的免疫应答水平,从而促进免疫抑制雏鸡免疫功能的恢复。

### 3.3 RBS对不同免疫状态雏鸡外周血CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T细胞比值的影响

在各种临床疾病如自身免疫性疾病、免疫缺陷性疾病、变态反应性疾病和恶性肿瘤等发生过程中均伴随着T淋巴细胞亚群的异常改变<sup>[10]</sup>。医学临床上,健康人群的CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值在一定范围之内,偏离此值便是免疫机能失调的反映。在动物医学方面,该类研究的报道较

少,关于鸡CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞比值研究的报道结果也不一致<sup>[9,11~13]</sup>。本试验结果显示,CTX组在21日龄、BDV组在14日龄时,雏鸡的CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值大于空白对照组,同时大于2,即出现所谓的CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值倒置,是病毒感染和免疫机能紊乱的重要特征<sup>[11]</sup>。在雏鸡14日龄和21日龄(即服完RBS7d之内),CTX+RBS组和BDV+RBS组雏鸡外周血的CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值均与正常对照组相当,表明RBS对CTX和BDV导致的免疫机能紊乱具有良好的调节作用。

### 参考文献:

- [1] 姜元荣,姚惠源,陈正行.米糠多糖的生物活性研究进展[J].食品科技,2002,10:66-68.
- [2] Tanigni Y, Kusumoto S, Nagao S, *et al*. Partial degradation and biological activities of an antitumor polysaccharide from rice bran [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1991, 39 (7): 1782 - 1787.
- [3] Takeo S, Kado H, Yamamoto H, *et al*. Studies on an antitumor polysaccharide RBS derived from rice brain. Preparation and general Properties of RON, an active fraction of RBS [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1988, 36 (9): 3609 - 3613.
- [4] 姜元荣.米糠免疫活性多糖的研究[D].无锡:江南大学,2004.6.
- [5] 丘玉昌,吴曙光,徐伟.米糠多糖的提取及免疫调节作用[J].中国生化药物杂志,1999,20(2):91-93.
- [6] 张晶晶,李淑芳,钟秀会,等.米糠多糖对人工感染传染性法氏囊病毒雏鸡的保护力及NK细胞活性的影响[J].中兽医医药杂志,2007,(3):11-13.
- [7] 李淑芳,杨汉春,张继东,等.米糠多糖对环磷酰胺诱导免疫抑制鸡外周血T淋巴细胞增殖活性及疫苗免疫效果的影响[J].中国兽医科学,2007,37(7):588-592.
- [8] 李淑芳,李英,张继东,等.米糠多糖对健康雏鸡外周血T淋巴细胞转化和体液免疫的影响[J].动物营养学报,2007,19(3):237-244.
- [9] 孙永科,田占成,王云峰,等.表达鸡干扰素和传染性支气管炎病毒SI基因的重组鸡痘病毒疫苗对鸡外周血T淋巴细胞动态分布影响的研究[J].中国预防兽医学报,2006,28(5):539-543.
- [10] 沈关心,周汝麟.现代免疫学实验技术(第二版)[M].武汉:湖北科技出版社,2002.226-252.
- [11] 杨汉春.动物免疫学(第二版)[M].北京:中国农业大学出版社,2003.76-86.
- [12] 王纯洁,斯日古楞,贾德刚,等.雏鸡淋巴细胞变化规律的流式细胞仪检测研究[J].畜牧兽医学报,2005,36(8):828-831.
- [13] 黄军,姜国均,周帮会,等.中药“增免散”对鸡腔上囊细胞凋亡和外周血T细胞亚群的影响[J].中国家禽,2006,28(17):19-21.

# 米糠多糖对雏鸡T淋巴细胞免疫功能的影响

(1. 广东海洋大学动物医学系, 广东湛江 524088; 2. 河北省畜牧兽医研究所, 河北保定 071000; 3. 广东医学院分析中心, 广东湛江 524023)

李淑芳<sup>1</sup>, 李英<sup>2</sup>, 张继东<sup>1</sup>, 雍艳红<sup>1</sup>, 蔡康荣<sup>3</sup>, 谢为天<sup>1</sup>

中图分类号: S825.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-3847(2009)03-0014-03

**摘要:**为探讨米糠多糖(RBS)对不同免疫状态雏鸡免疫功能的影响,本试验采用流式细胞技术检测了健康雏鸡、环磷酰胺(CTX)处理雏鸡和人工感染IBDV雏鸡等三种免疫状态雏鸡在服用米糠多糖(剂量 150 mg/(kg·d))和不服用米糠多糖情况下,外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群数量的动态变化。结果显示,口服米糠多糖能够提高健康雏鸡外周血中 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞比率,对 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞作用不明显;米糠多糖对 CTX 和 IBDV 引起试验雏鸡外周血中 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群减少具有一定的抑制作用。

**关键词:**米糠多糖 T 淋巴细胞亚群 流式细胞术 雏鸡

米糠多糖(rice bran polysaccharide, RBS)是米糠中主要以  $\alpha$ -1,6 糖苷键和少数  $\alpha$ -1,4 糖苷键相连的葡聚糖,是目前所知为数不多的  $\alpha$  类活性多糖之一,研究表明,米糠多糖在试验动物体内外均能够促进淋巴细胞增殖<sup>[1-4]</sup>,促进正常小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬作用,对补体活性和体液免疫也有一定的促进作用<sup>[5-4]</sup>,米糠多糖可以提高 IL-1、IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  4 种细胞因子在小鼠体内的 mRNA 表达水平,显著促进小鼠腹腔巨噬细胞在体外产生 IL-1、TNF- $\alpha$  和脾淋巴细胞产生 IL-2、IFN- $\gamma$  的作用。米糠多糖能够提高健康雏鸡和免疫抑制雏鸡外周血 T 淋巴细胞转化功能和对疫苗免疫应答反应<sup>[5-7]</sup>。本试验采用流式细胞技术(FCM)检测了健康雏鸡、环磷酰胺(CTX)处理雏鸡和人工感染 IBDV 雏鸡等三种免疫状态雏鸡服用米糠多糖(剂量 150mg/(kg·d))后,外周血中 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群数量的动态变化,旨在探讨米糠多糖对不同免疫状态雏鸡免疫功能的调节作用。

## 1 材料与方

### 1.1 受试药物的制备

以稻谷米皮糠为原料,用水提醇沉法<sup>[8]</sup>制得米糠多糖。用蒽酮法测定多糖含量为 86.3%,考马斯亮蓝法测定蛋白质含量为 2.3%。用生理盐水稀释成 1% 溶液,高压灭菌,备用。

### 1.2 主要试剂与仪器

环磷酰胺(CTX)批号 07020221,江苏恒瑞医药股份有限公司生产;传染性法氏囊病毒(IBDV) (ID<sub>50</sub>=1×10<sup>-4</sup>/0.1mL),瑞谱(保定)生物工程有限公司惠赠;淋巴细胞分离液,由中国医学科学院生物工程研究所生产;CD4 和 CD8 鼠抗鸡单克隆抗体(PE 标记),Southern Biotech 公司产品,购于深圳晶美生物有限公司;细胞流式仪(Flow cytometer):EPICS XL 型,Beckman 公司产品。离心机:TDL-60C 型,上海安亭科学仪器厂生产。

### 1.3 试验动物分组与处理

1 日龄三黄鸡(购于广东省湛江市某孵化场,琼扩试验检测 IBDV 抗体阴性),常规饲养。于 7 日龄选择临床健康雏鸡 180 只,随机分为 6 组,每组 30 只,5~6 组单独隔离饲养。第 1 组为空白对照组,第 2 组为 RBS 组,第 3 组为 CTX 组,第 4 组为(CTX+RBS)组,第 5 组为 IBDV 组,第 6 组为(IBDV+RBS)组。第 3、4 组雏鸡从 7 日龄起肌肉注射 CTX,每只 80 mg/(kg·d),连续 3d,其他组注射生理盐水 0.5mL/只。从 9 日龄起,第 2、4、6 组灌服 RBS,剂量为 150mg/(kg·d),每天 1 次,连续 5d;同时,第 1、3、5 组灌服生理盐水 0.5mL/只。11 日龄,第 5、6 组鸡实施 IBDV 人工接种(100×ID<sub>50</sub>),每只 0.1mL。

### 1.4 样品采集

分别在 7 日龄、14 日龄和 21 日龄,每组随机抽取 5 只鸡,心脏采血,肝素抗凝,常规分离淋巴细胞,制备淋巴细胞悬液,用于测定外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群百分率。

### 1.5 外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群检测

采用 FCM<sup>[8-9]</sup>,按下述操作测定外周血中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群百分率。

### 1.5.1 外周血淋巴细胞样品的制备

试验雏鸡心脏采集肝素抗凝血, 1mL/只, 用等量无血清的 PBS(pH7.2~7.4, 0.01mol/L) 稀释混匀, 沿管壁缓慢加到另一支试管中的 2mL 淋巴细胞分离液的上层, 2 500 r/min, 水平离心 10min, 吸取中间部位的淋巴细胞层, 注入盛有 3mL PBS 的试管中, 混匀后, 2 000r/min, 水平离心 10min, 弃上清, 沉淀即为淋巴细胞。同法将淋巴细胞洗涤 3 次, 加入适量 PBS, 调整淋巴细胞浓度为  $1 \times 10^6/\text{mL} \sim 5 \times 10^6/\text{mL}$ 。

### 1.5.2 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分含量测定

取三支试管, 各加入 100 $\mu\text{L}$  制备好的淋巴细胞悬液, 于三支试管中分别加入 15 $\mu\text{L}$  PE 标记的鼠抗鸡 CD4、CD8 单克隆抗体和同型对照 IgG, 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$  避光放置 30min。作用完毕后, 1 500 r/min 离心 5min, 用 PBS 洗涤三次。各管加入 1mL 不含血清的 PBS 液将淋巴细胞重悬, 摇匀, 上流式细胞仪检测。

### 1.6 数据处理

结果以平均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。应用 SPSS V13.0 进行单因素方差分析, 用 LSD 法进行组间多重比较。 $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 米糠多糖对试验鸡外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的影响

试验雏鸡 7 日龄时, 各试验组鸡外周血中 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的百分率和对照组无显著差异 ( $P > 0.05$ )。14 日龄, 空白对照组和 RBS 组雏鸡外周血中 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的百分含量差异不显著 ( $P > 0.05$ )。CTX 组、(CTX+RBS)组、IBDV 组和 (IBDV+RBS)组均显著低于空白对照组 ( $P < 0.05$ ), 但 (CTX+RBS)组高于 CTX 组 ( $P < 0.05$ ), (IBDV+RBS) 组显著高于 IBDV 组 ( $P < 0.05$ )。21 日龄, RBS 组鸡外周血中 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的百分含量显著高于空白对照组 ( $P < 0.05$ )。CTX 组、(CTX+RBS)组、IBDV 组和 (IBDV+RBS)组均显著低于空白对照组 ( $P < 0.05$ ), 但 (CTX+RBS)组高于 CTX 组 ( $P < 0.05$ )。IBDV 组和 (IBDV+RBS) 组间差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

表 1 试验鸡外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群的动态变化(%)

组别	7 日龄	14 日龄	21 日龄
空白对照组	38.62 $\pm$ 3.86 <sup>a</sup>	28.50 $\pm$ 2.51 <sup>a</sup>	24.72 $\pm$ 2.26 <sup>a</sup>
RBS 组	40.22 $\pm$ 3.40 <sup>a</sup>	31.18 $\pm$ 1.66 <sup>a</sup>	28.76 $\pm$ 4.03 <sup>b</sup>
CTX 组	39.34 $\pm$ 3.14 <sup>a</sup>	12.83 $\pm$ 2.89 <sup>b</sup>	14.70 $\pm$ 2.63 <sup>c</sup>
(CTX+RBS)组	41.40 $\pm$ 3.90 <sup>a</sup>	21.21 $\pm$ 2.82 <sup>c</sup>	18.38 $\pm$ 2.86 <sup>d</sup>
IBDV 组	40.06 $\pm$ 5.53 <sup>a</sup>	16.20 $\pm$ 2.80 <sup>b</sup>	18.46 $\pm$ 2.10 <sup>d</sup>
(IBDV+RBS)组	38.24 $\pm$ 4.44 <sup>a</sup>	20.78 $\pm$ 2.32 <sup>c</sup>	20.56 $\pm$ 2.26 <sup>d</sup>

注: 同列数据肩注不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 肩注相同小写字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。下同。

### 2.2 米糠多糖对试验鸡外周血 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的影响

7 日龄时, 各组之间雏鸡外周血中 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的比例差异不显著 ( $P > 0.05$ )。14 和 21 日龄, 空白对照组和 RBS 组雏鸡外周血中 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的比例差异不显著 ( $P > 0.05$ )。CTX 组、(CTX+RBS)组、IBDV 组和 (IBDV+RBS)组均显著低于空白对照组 ( $P < 0.05$ ), 但 (CTX+RBS)组高于 CTX 组 ( $P < 0.05$ ), (IBDV+RBS)组显著高于 IBDV 组 ( $P < 0.05$ ), 详见表 2。

表 2 试验鸡外周血 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群的动态变化

组别	7 日龄	14 日龄	21 日龄
空白对照组	24.10 $\pm$ 3.24 <sup>a</sup>	18.46 $\pm$ 2.50 <sup>a</sup>	20.34 $\pm$ 3.03 <sup>a</sup>
RBS 组	23.34 $\pm$ 2.66 <sup>a</sup>	18.61 $\pm$ 1.64 <sup>a</sup>	19.94 $\pm$ 2.05 <sup>a</sup>
CTX 组	22.92 $\pm$ 3.45 <sup>a</sup>	7.82 $\pm$ 2.41 <sup>b</sup>	6.64 $\pm$ 1.72 <sup>b</sup>
(CTX+RBS)组	23.16 $\pm$ 1.55 <sup>a</sup>	13.31 $\pm$ 3.70 <sup>c</sup>	11.26 $\pm$ 1.81 <sup>c</sup>
IBDV 组	21.48 $\pm$ 2.47 <sup>a</sup>	7.30 $\pm$ 1.66 <sup>b</sup>	10.12 $\pm$ 1.39 <sup>c</sup>
(IBDV+RBS)组	24.60 $\pm$ 2.69 <sup>a</sup>	11.67 $\pm$ 1.69 <sup>c</sup>	15.62 $\pm$ 1.77 <sup>d</sup>

### 2.3 米糠多糖对试验鸡外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞比值的影响

在 7 日龄时, 不同处理的各试验组之间雏鸡外周血中 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的比例无明显差异 ( $P > 0.05$ )。14 日龄, RBS 组、CTX 组、(CTX+RBS)组、(IBDV+RBS) 组和空白对照组之间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。IBDV 组显著高于空白对照组 ( $P > 0.05$ )。21 日龄, RBS 组、(CTX+RBS) 组、IBDV 组、(IBDV+RBS)组和空白对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。CTX 组则高于空白对照组 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 3 试验鸡外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群比值的动态变化(%)

组别	7 日龄	14 日龄	21 日龄
空白对照组	1.61 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	1.27 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	1.25 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>
RBS 组	1.73 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.69 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	1.45 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>
CTX 组	1.75 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	1.69 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	2.40 $\pm$ 0.99 <sup>b</sup>
(CTX+RBS)组	1.79 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	1.67 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	1.67 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>
IBDV 组	1.89 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	2.33 $\pm$ 0.78 <sup>b</sup>	1.86 $\pm$ 0.37 <sup>ab</sup>
(IBDV+RBS)组	1.60 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	1.88 $\pm$ 0.37 <sup>ab</sup>	1.34 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>

## 3 讨论

### 3.1 CTX 和 IBDV 对试验雏鸡外周血 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群的影响

现代免疫学理论认为, 机体外周血淋巴细胞的数量及 T 淋巴细胞不同亚群的分布与机体的免疫状态直接相关。当机体受到外来抗原刺激, 诱导体内各类功能性 T 淋巴细胞的数量和免疫活性发生变化。机体 T 淋巴细胞各亚群之间相互平衡、互相调节, 使机体对外来抗原刺激产生正常免疫应答, 并维持机体的免疫平衡状态<sup>[8]</sup>。特别是外周血中参与对外源性

抗原识别的 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞和内源性识别的 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞水平与疾病发展阶段、病情转归、用药效果等密切相关,因此是医学临床上重要的免疫状态检测指标。本研究发现,试验雏鸡在注射 CTX 后 7~14d,外周血中 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞百分率大幅度降低;雏鸡感染 IBDV 后 3~10d,外周血中 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞也明显减少。由于 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞的减少,IL-2 分泌减少,NK 细胞活性降低,T 淋巴细胞增殖活性降低,造成机体非特异性细胞免疫应答反应的降低;同时,CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞的减少,也使 B 细胞分化增殖和成熟的诱导作用减弱,从而使试验雏鸡对各种疫苗的免疫应答降低,抗体产生减少,造成体液免疫功能的降低。因此,CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞百分率大幅度降低是 CTX 和 IBDV 引起细胞免疫和体液免疫双重抑制的主要原因之一。

### 3.2 RBS 对不同免疫状态雏鸡外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群的影响

试验结果显示,健康雏鸡服用 RBS 后 10d,外周血中 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞显著高于空白对照组,而 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞与空白对照组始终无显著差异。说明米糠多糖能够提高健康雏鸡外周血 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞的数量,从而提高健康雏鸡的非特异性细胞免疫和体液免疫功能;当机体没有内源性抗原(病毒感染细胞或肿瘤细胞)存在时,米糠多糖对体内的 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞活化没有明显作用。试验雏鸡注射 CTX 后 7~14d,CTX 组和 (CTX+RBS) 组雏鸡外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞数量均低于空白对照组,但 (CTX+RBS) 组雏鸡外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞数量均高于 CTX 组,表明 RBS 能够增加 CTX 处理雏鸡外周血中 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞数量,促进 CTX 诱导的机体免疫抑制状态的恢复。当试验雏鸡人工感染 IBDV 后 3d,IBDV 组和 (IBDV+RBS) 组雏鸡外周血 CD4<sup>+</sup>T 细胞比率低于空白对照组,但 (IBDV+RBS) 组则高于 IBDV 组。此时正是雏鸡服用 RBS 后 5d,表明 RBS 对 IBDV 引起的 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞减少起到了抑制作用。试验雏鸡在 IBDV 感染后 3~10d 时,IBDV 组和 (IBDV+RBS) 组雏鸡外周血 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞水平均低于空白对照组,但 (IBDV+RBS) 组高于 IBDV 组。这种结果提示雏鸡服用 RBS 对 IBDV 感染引起雏鸡外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞水平降低具有一定的抑制作用。米糠多糖通过上调 CTX 和 IBDV 处理雏鸡血液中 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞水平,增强机体对内源性和外源性抗原的免疫应答水平,从而促进免疫抑制雏鸡免疫功能的恢复。

### 3.3 RBS 对不同免疫状态雏鸡外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞比值的影响

在各种临床疾病如自身免疫性疾病、免疫缺陷性疾病、变态反应性疾病、再生障碍性贫血、病毒感染和恶性肿瘤等发生过程中 T 淋巴细胞亚群都有异

常改变<sup>[9]</sup>。医学临床上,CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值是评价机体免疫状态的重要指标之一,健康人群的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值在一定的数值范围之内,偏离此值便是免疫机能失调的反映,低于此值是免疫功能降低的表现,高于此值则是病毒感染等免疫机能紊乱的指征。在动物方面该类研究的报道少见,关于鸡的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞研究的报道结果也不一致<sup>[8,10-12]</sup>。本试验结果显示,CTX 组和 IBDV 组在 14 日龄,试验雏鸡的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值大于空白对照组,同时大于 2,即出现所谓的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值倒置,是病毒感染和免疫机能紊乱的重要特征<sup>[10]</sup>。在雏鸡 14 日龄和 21 日龄(即服完 RBS 一周之内),CTX+RBS 组和 IBDV+RBS 组雏鸡外周血的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值均与正常对照组相当,表明 RBS 对 CTX 和 IBDV 导致的免疫机能紊乱具有良好的调节作用。

### 参考文献

- 姜元荣,姚惠源,陈正行.米糠多糖的生物活性研究进展[J].食品科技,2002,10:66~68.
- 姜元荣,姚惠源,陈正行,等.米糠多糖对小鼠免疫调节功能影响研究[J].粮食与油脂,2004,5:20~23.
- 姜元荣.米糠免疫活性多糖的研究[D].博士学位论文.无锡:江南大学,2004,6.
- 丘玉昌,吴曙光,徐伟.米糠多糖的提取及免疫调节作用[J].中国生化药物杂志,1999,20(2):91~93.
- 张晶晶,李淑芳,钟秀会,等.米糠多糖对人工感染传染性法氏囊病毒雏鸡的保护力及 NK 细胞活性的影响[J].中兽医医药杂志,2007,3:11~13.
- 李淑芳,杨汉春,张继东,等.米糠多糖对环磷酰胺诱导免疫抑制鸡外周血 T 淋巴细胞增殖活性及疫苗免疫效果的影响[J].中国兽医科学,2007,37(7):588~592.
- 李淑芳,李英,张继东,等.米糠多糖对健康雏鸡外周血 T 淋巴细胞转化和体液免疫的影响[J].动物营养学报,2007,19(3):237~244.
- 孙永科,田占成,王云峰,等.表达鸡  $\gamma$ -干扰素和传染性支气管炎病毒 S1 基因的重组鸡痘病毒疫苗对鸡外周血 T 淋巴细胞动态分布影响的研究[J].中国预防兽医学报,2006,28(5):539~543.
- 沈关心,周汝麟.现代免疫学实验技术第二版[M].武汉:湖北科学技术出版社,2002.
- 杨汉春.动物免疫学第二版[M].北京:中国农业大学出版社,2003.
- 王纯洁,斯日古楞,贾德刚,等.雏鸡淋巴细胞变化规律的流式细胞仪检测研究[J].畜牧兽医学报,2005,36(8):828~831.
- 黄军,姜国均,周帮会,等.中药“增免散”对鸡腔上囊细胞凋亡和外周血 T 细胞亚群的影响[J].中国家禽,2006,28(17):19~21.

责任编辑:曹伟胜

# 米糠多糖对免疫抑制鸡脾脏和法氏囊细胞周期和抗细胞凋亡作用

李淑芳<sup>1</sup>,张继东<sup>1</sup>,李英<sup>2</sup>,雍艳红<sup>1</sup>,孙凤莉<sup>2</sup>

(1. 广东海洋大学 动物医学系,湛江 524088;2. 河北省畜牧兽医研究所,保定 071000)

**摘要:** 为探讨米糠多糖(RBS)对免疫抑制鸡免疫调节作用的机理,作者采用流式细胞术检测了健康雏鸡、环磷酰胺(CTX)和传染性法氏囊病毒(IBDV)诱导的免疫抑制雏鸡在给予 RBS [剂量 150 mg/(kg·d)] 和不给予 RBS 情况下脾脏和法氏囊细胞的 DNA 含量、细胞周期及细胞凋亡率。结果显示:(1) CTX + RBS 组雏鸡脾脏 S 期细胞比例和 PI 值显著高于 CTX 组 ( $P < 0.05$ ),该 2 组鸡的法氏囊细胞周期没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。 (2) IBDV + RBS 组雏鸡脾脏 S 期、G<sub>2</sub> 期细胞比例和 PI 值、法氏囊的 S 期细胞和 PI 值均高于 IBDV 组 ( $P < 0.05$ )。 (3) CTX + RBS 组和 IBDV + RBS 组雏鸡脾脏和法氏囊细胞的凋亡率分别低于 CTX 组和 IBDV 组 ( $P < 0.05$ )。结果表明: RBS 能够促进 CTX 处理鸡脾脏细胞和 IBDV 感染鸡脾脏和法氏囊细胞 DNA 复制,对 CTX 和 IBDV 诱导鸡的脾脏和法氏囊细胞凋亡过程均有一定的拮抗作用。

**关键词:** 米糠多糖;流式细胞术;免疫抑制;细胞周期;细胞凋亡;鸡

中图分类号:S852.4

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2009)06-0916-06

## Effects of Rice Bran Polysaccharide on Cell Cycle and Anti-apoptosis of Spleen and Bursa Cells in Immunosuppression Chicken

LI Shu-fang<sup>1</sup>, ZHANG Ji-dong<sup>1</sup>, LI Ying<sup>2</sup>, YONG Yan-hong<sup>1</sup>, SUN Feng-li<sup>2</sup>

(1. Department of Veterinary Medicine, Guangdong Ocean

University, Zhanjiang 524088, China; 2. Institute of Animal

Science and Veterinary Medicine of Hebei, Baoding 071000, China)

**Abstract:** To study the immune modulating mechanism of Rice Bran Polysaccharide (RBS) on immunosuppressed chick, the flow cytometry technique was used to detect the DNA content, cell cycle and apoptosis rate of spleen and bursa cells of chickens in healthy, and immunosuppressed chicks induced by CTX and IBDV under the conditions of giving and not giving with RBS at dosage of 150 mg/(kg·d) by intragastric administration. The results were as follows: 1) The cell ratio of S phase and proliferation index (PI) in spleen of CTX + RBS group were higher than that of CTX group ( $P < 0.05$ ), whereas there was no significant difference of bursa cell cycle between CTX + RBS and CTX group ( $P > 0.05$ ). 2) The cell ratio of S and G<sub>2</sub> phase and the PI in spleen and the cell ratio of S phase and the PI in bursa of IBDV + RBS group were higher than that of IBDV group ( $P < 0.05$ ). 3) The apoptosis rate of spleen and bursa in CTX + RBS and IBDV + RBS group were lower respectively than that of CTX and IBDV group ( $P < 0.05$ ). These data indicated that the RBS could improve DNA replication of spleen cells in chickens treated with CTX, as well as spleen and bursa cells in chickens artificially infected by IBDV, and that the RBS could inhibit the apoptosis of spleen and bursa cells in chickens treated with CTX and IBDV.

收稿日期:2008-10-20

基金项目:河北省“十五”科技攻关项目(04220401D)

作者简介:李淑芳(1964-),女,河北元氏县人,副教授,博士,从事动物免疫学及预防兽医学研究,E-mail:lishufang0816@126.com

**Key words:** rice bran polysaccharide; flow cytometry; immunosuppression; cell cycle; apoptosis; chicken

米糠多糖(rice bran polysaccharide, RBS)具有良好的抗肿瘤、增强免疫、抗细菌感染等生物活性<sup>[1-3]</sup>。研究证明<sup>[4]</sup>,米糠多糖在实验动物体内外均能促进淋巴细胞增殖,促进正常小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬作用,对补体活性和体液免疫也有一定的促进作用;米糠多糖可以提高 IL-1、IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN-

4种细胞因子在小鼠体内的 mRNA 表达水平,显著促进小鼠腹腔巨噬细胞在体外产生 IL-1、TNF- $\alpha$ 和脾淋巴细胞产生 IL-2、IFN- $\alpha$ 的作用<sup>[3]</sup>。此外,米糠多糖对健康雏鸡和环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)诱导免疫抑制鸡的免疫功能具有一定的调节作用<sup>[5-6]</sup>。由于 CTX 和传染性法氏囊病毒(IBDV)诱导的免疫抑制均与免疫器官的细胞凋亡有关,因此,本试验利用细胞流式术检测了 CTX 和 IBDV 诱导免疫抑制鸡在灌服和灌服米糠多糖情况下脾脏和法氏囊细胞的 DNA 含量、细胞周期和细胞凋亡率,以探讨米糠多糖对鸡免疫抑制调节作用的机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 受试药物

以稻谷米皮糠为原料,用水提醇沉法分离提取,化学方法分步纯化后制得米糠多糖。其主要成分:多糖 86.30%,蛋白质 2.30%,灰分 1.15%,水分 10.25%,不含脂肪和淀粉。用生理盐水稀释成 1% 溶液,高压灭菌,备用。

### 1.2 主要试剂与仪器

环磷酰胺(CTX):批号 07020221,江苏恒瑞医药股份有限公司生产;传染性法氏囊病毒(IBDV, ID<sub>50</sub> = 1 × 10<sup>4.5</sup>/0.1 mL):临床分离强毒株,由本实验室保存;细胞流式仪:EPICS XL 型,Beckman 公司产品。

### 1.3 实验动物分组与样品采集

1日龄三黄鸡(公雏,购于广东省湛江市某孵化场,AGP 试验检测 IBDV 抗体阴性),常规饲养。7日龄时,选择健康雏鸡 240 只,随机平均分为 6 组,即:空白对照组、RBS 组、CTX 组、CTX + RBS 组、IBDV 和 IBDV + RBS 组。从 7 日龄起,CTX 组和 CTX + RBS 组雏鸡每天一次性注射 CTX 80 mg · kg<sup>-1</sup>,连续 3 d,其他组雏鸡肌肉注射生理盐水,0.2 mL · 只<sup>-1</sup>;IBDV 组和 IBDV + RBS 组雏鸡

肌肉注射接种 IBDV 病毒悬液(100 × ID<sub>50</sub>),0.1 mL · 只<sup>-1</sup>,并与其他组隔离饲养。从 9 日龄起,RBS 组、CTX + RBS 组和 IBDV + RBS 组雏鸡每天一次性灌服 RBS 150 mg · kg<sup>-1</sup>,连续 5 d,其他组灌服生理盐水。分别在 7(CTX 和 IBDV 处理前)、14 和 21 日龄,每组随机取 5 只鸡,取脾脏和法氏囊制备单细胞悬液。

### 1.4 脾脏和法氏囊细胞 DNA 含量、细胞周期和细胞凋亡率测定

1.4.1 脾脏和法氏囊单细胞悬液的制备 取雏鸡新鲜脾脏和法氏囊,剔除结缔组织,用 PBS (pH 7.2 ~ 7.4, 0.02 mol · L<sup>-1</sup>)冲洗,在 300 目不锈钢筛网上用注射器芯轻轻研磨,PBS 冲洗后滤液 300 目筛网过滤,收集细胞悬液,1 000 r · min<sup>-1</sup>离心 8 min,沉淀用 PBS 洗涤 2 次,用少许 PBS 重悬细胞,以体积分数为 70% 的冷乙醇加入细胞中,充分吹打,4 ℃ 过夜固定。

1.4.2 测定细胞样品染色 将固定好的细胞悬液离心,PBS 清洗 1 次,调整细胞浓度为 1 × 10<sup>6</sup>/mL,加入 200 μL RNase,37 ℃ 水浴 30 min。用一步染色法碘化丙啶染色<sup>[7]</sup>,4 ℃ 避光 30 min。

1.4.3 细胞 DNA 含量及凋亡率的细胞流式仪分析(FCM 法<sup>[7-8]</sup>) 染色后的细胞悬液上细胞流式仪进行分析。按 100 cell/s 流速,每样约测 1 × 10<sup>4</sup> 个细胞,Modfit LT 软件分析 DNA 含量,并经计算机处理,拟合出细胞 DNA 倍体、细胞所处分裂时相(包括 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期、S 期、G<sub>2</sub>/M 期)及细胞凋亡率。

1.4.4 细胞增殖指数(PI)计算 以 PI 表示细胞增殖活性,根据流式细胞仪测定的细胞周期比例,用公式:PI = (S + G<sub>2</sub>/M) / (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> + S + G<sub>2</sub>/M) × 100% 计算。

### 1.5 数据分析

数据以平均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。应用 SPSS V13.0 软件进行单因素方差分析,用 LSD 法进行组间多重比较。P < 0.05 表示差异显著,P > 0.05 表示差异不显著。

## 2 结果

细胞周期在细胞的生长、分化及分裂过程中扮演着极其重要的角色。本试验结果显示:在 7 日龄

各组雏鸡尚未实施任何处理时,各组脾脏和法氏囊不同分裂时相的细胞所占比例和细胞增殖指数(PI)均无显著差异( $P > 0.05$ ),脾脏和法氏囊细胞各组间差异不显著( $P > 0.05$ )(数据略),此时,细胞凋亡率较低,个别雏鸡甚至检测不到细胞凋亡。

**2.1 米糠多糖对 CTX 和 IBDV 诱导免疫抑制鸡脾脏细胞周期的影响**

14 日龄,经过 CTX 处理的 CTX 组和 CTX + RBS 组雏鸡脾脏 G<sub>1</sub> 期细胞比例显著高于空白对照组和 RBS 组( $P < 0.05$ ),且二者间差异不显著( $P > 0.05$ ),IBDV 组脾脏 G<sub>1</sub> 期细胞比率显著高于 IBDV + RBS 组( $P < 0.05$ ),IBDV + RBS 组与空白对照组间差异不显著( $P > 0.05$ );IBDV 组 G<sub>2</sub> 期细胞比例

显著低于其他 5 组( $P < 0.05$ );CTX 组、CTX + RBS 组和 IBDV 组 S 期细胞比例以及 PI 值均显著低于空白对照组( $P < 0.05$ ),IBDV + RBS 组与对照组、RBS 组间无显著差异( $P > 0.05$ )。21 日龄,CTX 组、CTX + RBS 组和 IBDV 组 G<sub>1</sub> 期细胞高于空白对照组,而 IBDV + RBS 组显著低于其它 5 组( $P < 0.05$ ),IBDV + RBS 组 G<sub>2</sub> 期细胞显著高于其他 5 组( $P < 0.05$ );S 期细胞比较结果显示,CTX 组显著低于空白对照组( $P < 0.05$ ),IBDV + RBS 组显著高于其他 5 组( $P < 0.05$ );各试验组的 PI 比较,CTX + RBS 组高于 CTX 组( $P < 0.05$ ),且与空白对照组无显著差异( $P > 0.05$ ),IBDV + RBS 组显著高于 IBDV 组和空白对照组( $P < 0.05$ )。详见表 1。

表 1 各组鸡脾脏细胞周期和增殖指数的变化

Table 1 Changes of spleen cell cycle and proliferation index in experimental chicken %

日龄 Age	指标 Parameter	空白对照组 Control group	RBS 组 RBS group	CTX 组 CTX group	CTX + RBS 组 CTX + RBS group	IBDV 组 IBDV group	IBDV + RBS 组 IBDV + RBS group
7 日龄 7 d	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	74.02 ± 2.12 <sup>a</sup>	75.42 ± 1.68 <sup>a</sup>	74.64 ± 2.01 <sup>a</sup>	73.12 ± 1.23 <sup>a</sup>	73.84 ± 2.95 <sup>a</sup>	74.54 ± 1.15 <sup>a</sup>
	S	17.86 ± 3.15 <sup>a</sup>	18.24 ± 3.22 <sup>a</sup>	17.92 ± 2.37 <sup>a</sup>	18.76 ± 1.40 <sup>a</sup>	18.50 ± 1.79 <sup>a</sup>	18.34 ± 1.50 <sup>a</sup>
	G <sub>2</sub> /M	8.12 ± 2.16 <sup>a</sup>	6.34 ± 1.95 <sup>a</sup>	7.44 ± 1.44 <sup>a</sup>	8.12 ± 1.47 <sup>a</sup>	7.66 ± 1.49 <sup>a</sup>	7.92 ± 1.28 <sup>a</sup>
	PI	25.98 ± 2.11 <sup>a</sup>	24.58 ± 1.68 <sup>a</sup>	25.36 ± 2.01 <sup>a</sup>	26.88 ± 1.23 <sup>a</sup>	26.16 ± 2.95 <sup>a</sup>	26.26 ± 1.77 <sup>a</sup>
14 日龄 14 d	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	72.14 ± 2.92 <sup>a</sup>	74.18 ± 2.16 <sup>a</sup>	86.78 ± 2.51 <sup>b</sup>	85.38 ± 1.60 <sup>b</sup>	78.34 ± 2.22 <sup>c</sup>	71.72 ± 3.09 <sup>a</sup>
	S	18.92 ± 2.98 <sup>a</sup>	17.62 ± 1.74 <sup>ad</sup>	4.00 ± 1.27 <sup>b</sup>	5.58 ± 1.14 <sup>b</sup>	16.04 ± 2.48 <sup>cd</sup>	20.50 ± 2.56 <sup>a</sup>
	G <sub>2</sub> /M	8.94 ± 1.15 <sup>a</sup>	8.20 ± 1.49 <sup>a</sup>	9.22 ± 1.34 <sup>a</sup>	9.04 ± 1.44 <sup>a</sup>	5.62 ± 1.57 <sup>b</sup>	7.78 ± 2.11 <sup>a</sup>
	PI	27.86 ± 2.92 <sup>a</sup>	25.82 ± 2.16 <sup>a</sup>	13.22 ± 2.51 <sup>b</sup>	14.62 ± 1.60 <sup>b</sup>	21.66 ± 2.22 <sup>d</sup>	27.28 ± 3.09 <sup>a</sup>
21 日龄 21 d	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	77.48 ± 3.66 <sup>a</sup>	79.26 ± 2.72 <sup>a</sup>	83.14 ± 3.69 <sup>a</sup>	79.60 ± 2.31 <sup>a</sup>	78.02 ± 1.73 <sup>a</sup>	69.68 ± 0.99 <sup>c</sup>
	S	13.14 ± 1.98 <sup>a</sup>	12.86 ± 2.06 <sup>a</sup>	9.02 ± 2.66 <sup>b</sup>	10.94 ± 1.85 <sup>ab</sup>	12.38 ± 2.31 <sup>a</sup>	17.46 ± 1.01 <sup>c</sup>
	G <sub>2</sub> /M	9.38 ± 2.80 <sup>a</sup>	7.88 ± 1.11 <sup>a</sup>	7.84 ± 1.22 <sup>a</sup>	9.86 ± 1.00 <sup>a</sup>	9.60 ± 1.54 <sup>a</sup>	12.86 ± 1.35 <sup>b</sup>
	PI	22.52 ± 3.66 <sup>a</sup>	20.74 ± 2.72 <sup>a</sup>	16.86 ± 3.69 <sup>b</sup>	20.80 ± 2.31 <sup>a</sup>	21.98 ± 1.73 <sup>a</sup>	30.32 ± 0.99 <sup>c</sup>

同行数据肩注字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ ),肩注字母相同表示差异不显著( $P > 0.05$ )。表 2 同

The difference between data with the different letters within a row is significant ( $P < 0.05$ ), and the same letter is not significant ( $P > 0.05$ ). The same in Table 2

**2.2 米糠多糖对 CTX 和 IBDV 诱导免疫抑制鸡法氏囊细胞周期的影响**

14 日龄,各组雏鸡法氏囊 G<sub>1</sub> 期细胞比较,RBS 组显著小于空白对照组( $P < 0.05$ ),CTX 组和 CTX + RBS 组均高于空白对照组( $P < 0.05$ ),且二者差异不显著( $P > 0.05$ ),IBDV 组高于 IBDV + RBS 组和空白对照组( $P < 0.05$ );各试验组间 G<sub>2</sub> 期细胞比例无显著差异( $P > 0.05$ );S 期细胞和 PI 值比较,RBS 组高于空白对照组( $P < 0.05$ ),CTX 组、CTX + RBS 组显著低于空白对照组( $P > 0.05$ ),IBDV 组显著低于 IBDV + RBS 组和空白对照组( $P <$

0.05)。21 日龄,空白对照组、RBS 组和 IBDV + RBS 组的 G<sub>1</sub> 期细胞比例差异不显著( $P > 0.05$ ),均明显低于 CTX 组、CTX + RBS 组和 IBDV 组( $P < 0.05$ );各试验组 G<sub>2</sub> 期细胞比例差异不显著( $P > 0.05$ );RBS 组 S 期细胞比例显著高于空白对照组( $P < 0.05$ ),CTX 组与 CTX + RBS 组无显著差异( $P > 0.05$ ),IBDV 组低于 IBDV + RBS 组( $P < 0.05$ ),且 CTX 和 IBDV 处理组均明显低于空白对照组和 RBS 组( $P < 0.05$ ),PI 值比较显示,RBS 组和 IBDV + RBS 组与空白对照组差异不显著( $P > 0.05$ ),且显著高于 CTX 组、CTX + RBS 组和 IBDV

组( $P < 0.05$ )。详见表 2。

表 2 各组鸡法氏囊细胞周期和增殖指数的变化

日龄	指标	空白对照组	RBS 组	CTX 组	CTX + RBS 组	IBDV 组	IBDV + RBS 组	%
Age	Parametr	Control group	RBS group	CTX group	CTX + RBS group	IBDV group	IBDV + RBS group	
7 日龄 7 d	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	76.76 ±2.82 <sup>a</sup>	73.30 ±4.27 <sup>a</sup>	76.22 ±3.54 <sup>a</sup>	74.84 ±3.46 <sup>a</sup>	73.08 ±4.77 <sup>a</sup>	75.72 ±3.84 <sup>a</sup>	
	S	16.46 ±2.10 <sup>a</sup>	19.64 ±3.69 <sup>a</sup>	16.74 ±2.62 <sup>a</sup>	17.02 ±2.68 <sup>a</sup>	17.74 ±2.45 <sup>a</sup>	16.77 ±1.83 <sup>a</sup>	
	G <sub>2</sub> /M	6.76 ±1.12 <sup>a</sup>	7.06 ±1.24 <sup>a</sup>	6.92 ±1.00 <sup>a</sup>	8.14 ±1.75 <sup>a</sup>	8.78 ±2.84 <sup>a</sup>	7.50 ±2.55 <sup>a</sup>	
	PI	23.24 ±2.82 <sup>a</sup>	26.70 ±4.27 <sup>a</sup>	23.66 ±3.50 <sup>a</sup>	25.16 ±3.46 <sup>a</sup>	26.92 ±4.77 <sup>a</sup>	24.28 ±3.84 <sup>a</sup>	
14 日龄 14 d	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	75.02 ±3.39 <sup>a</sup>	70.54 ±2.53 <sup>b</sup>	86.00 ±3.03 <sup>c</sup>	85.84 ±2.72 <sup>c</sup>	83.44 ±2.07 <sup>c</sup>	75.32 ±2.47 <sup>a</sup>	
	S	17.56 ±2.07 <sup>a</sup>	20.96 ±1.94 <sup>b</sup>	6.26 ±1.54 <sup>c</sup>	6.24 ±1.66 <sup>c</sup>	9.64 ±1.93 <sup>d</sup>	16.40 ±2.04 <sup>a</sup>	
	G <sub>2</sub> /M	7.42 ±1.43 <sup>a</sup>	8.48 ±1.36 <sup>a</sup>	7.74 ±1.85 <sup>a</sup>	7.92 ±1.46 <sup>a</sup>	6.92 ±0.79 <sup>a</sup>	8.28 ±1.64 <sup>a</sup>	
	PI	24.98 ±3.39 <sup>a</sup>	29.44 ±2.54 <sup>b</sup>	14.40 ±3.03 <sup>c</sup>	16.16 ±2.72 <sup>c</sup>	16.56 ±2.07 <sup>c</sup>	20.68 ±2.47 <sup>a</sup>	
21 日龄 21 d	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	74.80 ±2.55 <sup>a</sup>	73.38 ±4.88 <sup>a</sup>	85.00 ±2.91 <sup>b</sup>	84.78 ±2.05 <sup>b</sup>	83.58 ±2.73 <sup>b</sup>	77.64 ±3.21 <sup>a</sup>	
	S	17.76 ±2.01 <sup>a</sup>	18.90 ±2.92 <sup>b</sup>	7.88 ±1.43 <sup>c</sup>	7.72 ±1.15 <sup>c</sup>	10.18 ±2.09 <sup>c</sup>	13.68 ±2.05 <sup>d</sup>	
	G <sub>2</sub> /M	7.44 ±0.84 <sup>a</sup>	7.72 ±2.20 <sup>a</sup>	7.12 ±1.66 <sup>a</sup>	7.50 ±1.15 <sup>a</sup>	6.24 ±1.09 <sup>a</sup>	8.68 ±1.47 <sup>a</sup>	
	PI	25.20 ±2.55 <sup>a</sup>	26.62 ±4.88 <sup>a</sup>	15.00 ±2.91 <sup>b</sup>	15.22 ±2.05 <sup>b</sup>	16.42 ±2.73 <sup>b</sup>	22.36 ±3.21 <sup>a</sup>	

### 2.3 米糠多糖对 CTX 和 IBDV 诱导免疫抑制鸡脾脏和法氏囊细胞凋亡的影响

在试验期内,空白对照组和 RBS 组脾脏和法氏囊细胞凋亡率始终差异不显著( $P > 0.05$ )。各处理组脾脏细胞凋亡情况:在雏鸡 14 日龄和 21 日龄,CTX 组和 CTX + RBS、IBDV 组和 IBDV + RBS 组细胞凋亡率均显著高于空白对照组和 RBS 组( $P < 0.05$ )。14 日龄时,CTX 组和 IBDV 组细胞凋亡率分别高于 CTX + RBS 组和 IBDV + RBS 组( $P <$

$0.05$ ),且 IBDV 组高于 CTX 组。21 日龄,CTX 组与 CTX + RBS 组差异不显著( $P > 0.05$ ),但 IBDV 组高于 IBDV + RBS 组( $P < 0.05$ )。法氏囊细胞凋亡情况:14 日龄,CTX 组高于 CTX + RBS 组( $P < 0.05$ ),IBDV 组和 IBDV + RBS 组差异不显著( $P > 0.05$ ),且 IBDV 处理组显著低于 CTX 组和 CTX + RBS 组( $P < 0.05$ )。21 日龄,CTX 组高于 CTX + RBS 组( $P < 0.05$ ),IBDV 组高于 IBDV + RBS 组( $P < 0.05$ )。详见表 3。

表 3 试验鸡脾脏和法氏囊细胞凋亡率

组别	7 日龄 7 d		14 日龄 14 d		21 日龄 21 d		%
	脾 Spleen	法氏囊 Bursa	脾 Spleen	法氏囊 Bursa	脾 Spleen	法氏囊 Bursa	
空白对照组 Control group	1.30 ±0.83 <sup>a</sup>	1.62 ±1.03 <sup>a</sup>	1.92 ±0.26 <sup>a</sup>	3.86 ±0.65 <sup>a</sup>	1.64 ±0.36 <sup>a</sup>	3.14 ±0.98 <sup>a</sup>	
RBS 组 RBS group	1.60 ±0.37 <sup>a</sup>	1.36 ±0.90 <sup>a</sup>	1.88 ±0.36 <sup>a</sup>	4.26 ±0.89 <sup>a</sup>	1.54 ±0.30 <sup>a</sup>	3.52 ±0.73 <sup>a</sup>	
CTX 组 CTX group	1.20 ±0.74 <sup>a</sup>	1.24 ±0.75 <sup>a</sup>	5.26 ±0.73 <sup>b</sup>	23.92 ±2.93 <sup>b</sup>	2.62 ±0.56 <sup>b</sup>	9.50 ±0.83 <sup>b</sup>	
CTX + RBS 组 TX + RBS group	1.38 ±0.84 <sup>a</sup>	1.28 ±0.83 <sup>a</sup>	3.44 ±1.08 <sup>c</sup>	20.28 ±1.73 <sup>c</sup>	2.86 ±0.75 <sup>bd</sup>	7.70 ±1.41 <sup>c</sup>	
IBDV 组 IBDV group	1.48 ±0.86 <sup>a</sup>	1.56 ±0.91 <sup>a</sup>	6.40 ±1.24 <sup>d</sup>	7.46 ±0.59 <sup>d</sup>	4.36 ±1.06 <sup>c</sup>	6.86 ±0.99 <sup>c</sup>	
IBDV + RBS 组 IBDV + RBS group	1.44 ±0.94 <sup>a</sup>	1.32 ±0.77 <sup>a</sup>	3.84 ±0.56 <sup>c</sup>	6.76 ±1.49 <sup>d</sup>	2.62 ±0.42 <sup>b</sup>	4.84 ±0.91 <sup>d</sup>	

同列数据肩注字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ ),肩注字母相同者表示差异不显著( $P > 0.05$ )

The difference between data with the different letters within a column is significant ( $P < 0.05$ ),and the same letter is not significant ( $P > 0.05$ )

## 3 讨论

### 3.1 米糠多糖对 CTX 诱导免疫抑制鸡脾脏和法氏囊细胞周期的影响

CTX 通过肝酶 P450 水解成醛磷酰胺,与细胞 DNA 双链交叉连接破坏 DNA,杀死循环周期的细胞,破坏和干扰母细胞的增殖分化,非特异性地杀伤抗原敏感性小淋巴细胞,限制其转化为免疫母细胞,对体液免疫和细胞免疫均有抑制作用<sup>[8]</sup>。因此,本试验采用免疫抑制剂剂量的 CTX 诱导雏鸡产生免疫抑制,分析米糠多糖对免疫抑制鸡脾脏和法氏囊细胞发育周期的影响。试验结果显示,CTX 组雏鸡在 14 日龄和 21 日龄,脾脏和法氏囊 G<sub>1</sub> 期细胞比例显著高于空白对照组,S 期细胞比例和细胞增殖活性显著低于空白对照组。说明 CTX 破坏 G<sub>1</sub> 期细胞,阻止 G<sub>1</sub> 期细胞进入 DNA 复制期,从而使 S 期细胞减少,这一结果与 CTX 毒理作用机理基本一致<sup>[8-9]</sup>。S 期是细胞增殖的关键时期,核酸增多是细胞迅速生长的物质基础,故 S 期细胞数量的多少能够反映细胞增殖活性的大小。CTX 诱导免疫抑制鸡灌服 RBS 组在 21 日龄时,脾细胞 G<sub>1</sub> 期和 S 期细胞增加,且与对空白对照组无明显差异,说明 RBS 可促进 CTX 损伤脾脏内细胞 DNA 复制和有丝分裂过程。但是,RBS 对 CTX 处理鸡法氏囊细胞周期则没有显著影响,RBS 对脾脏和法氏囊表现出不同作用结果的原因可能是因为法氏囊是鸡的中枢免疫器官,是 B 细胞分化成熟的场所,而脾脏是外周免疫器官,是成熟淋巴细胞聚集的场所,CTX 主要有丝分裂期母细胞的抑制作用严重,导致 CTX 对法氏囊细胞的损伤较脾脏更为严重,试验剂量的 RBS 不能使法氏囊在试验期内修复,也有可能是由于 RBS 是通过抑制 CTX 对细胞 DNA 的烷化作用而发挥其促进细胞周期活动的。

### 3.2 米糠多糖对 IBDV 诱导免疫抑制鸡脾脏和法氏囊细胞周期的影响

IBDV 主要以 B 细胞为靶细胞,感染未成熟的 B 细胞或 B 细胞前体细胞,法氏囊是 B 细胞分化成熟的重要器官。鸡在感染 IBDV 后,法氏囊淋巴滤泡内的 B 细胞大量裂解死亡和凋亡,网状细胞凋亡,最终导致法氏囊等器官萎缩<sup>[9-10]</sup>。IBDV 感染后脾脏、哈德氏腺和盲肠扁桃体的免疫细胞也有不同程度变性、坏死和凋亡,外周血 T、B 细胞数量下降,最终导致免疫功能抑制。试验结果显示,在 14 日龄

雏鸡,IBDV 处理但未灌服 RBS 组雏鸡的脾脏 G<sub>1</sub> 期细胞比例显著高于对照组,G<sub>2</sub> 期和 S 期细胞显著减少,PI 值低于对照组,表明 IBDV 抑制细胞复制而阻止细胞进入正常细胞周期,从而导致脾脏淋巴细胞损伤。21 日龄时,IBDV 组各细胞周期时相与空白对照组相当,说明 IBDV 感染后 10 d 脾脏细胞开始自主恢复,IBDV + RBS 组雏鸡脾脏 G<sub>1</sub> 期、S 期细胞和 PI 值显著高于 IBDV 组,G<sub>2</sub> 期细胞高于空白对照组,表明 RBS 进一步促进了病毒感染脾脏的 DNA 合成;IBDV 组雏鸡在 14 日龄和 21 日龄,法氏囊 G<sub>1</sub> 期细胞增加,S 期细胞减少,PI 值降低,而 IBDV 感染且灌服 RBS 组的 G<sub>1</sub> 期细胞和 PI 值均与空白对照组相当,表明 RBS 对 IBDV 处理雏鸡法氏囊细胞 DNA 复制表现出较为持续的促进作用。因此,通过免疫调节药物来减轻和逆转 IBDV 对法氏囊组织的损伤是可能的。

### 3.3 米糠多糖对免疫抑制鸡脾脏和法氏囊细胞凋亡的影响

细胞凋亡是在一定生理和病理情况下,机体为维护内环境的稳定,通过基因调控而使细胞自动消亡的过程。在机体的免疫系统,自身免疫细胞克隆的清除和淋巴细胞对靶细胞的杀伤都是细胞凋亡的结果。CTX 可以诱导肿瘤细胞、骨髓细胞、胸腺细胞、脾细胞等多种机体细胞发生凋亡。IBDV 感染引起脾脏、法氏囊、胸腺等细胞损伤是由于器官组织细胞的过度凋亡所致<sup>[10]</sup>。在本试验中,CTX 处理的 2 个试验组在 14 日龄时法氏囊细胞凋亡率高达 20%,至 21 日龄时仍高达 7%~9%;CTX 组雏鸡脾脏的细胞凋亡在 3%~6%,可见 CTX 诱导鸡法氏囊细胞凋亡作用较脾脏更为明显。CTX 处理鸡灌服 RBS 组,脾脏和法氏囊的细胞凋亡率始终低于 CTX 组,但显著高于空白对照组。IBDV + RBS 组脾脏和法氏囊的细胞凋亡率低于 IBDV 组。说明 RBS 对 CTX 和 IBDV 诱导的脾脏和法氏囊细胞凋亡过程有明显的抑制作用,从而减轻 CTX 诱导和 IBDV 感染淋巴细胞的损伤程度。多糖对细胞凋亡作用机理的报道分为两类,一方面研究认为<sup>[11-13]</sup>,银杏多糖、海藻多糖、当归多糖、姬松茸多糖等多糖能够通过下调 K562 白血病细胞、胃癌细胞等肿瘤细胞的 *bcl-2* 基因表达,从而抑制肿瘤细胞的凋亡过程。另一方面研究认为<sup>[14-16]</sup>,当归多糖、枸杞多糖、黄芪多糖等多糖可以上调 *bcl-2* 基因表达,下调 *Fas* 基因的表达,降低 *caspace3* mRNA 转录水平,抑制

铅中毒损伤的脑海马记忆细胞、辐射损伤的肝脏细胞、胰腺细胞等多种病理损伤细胞的凋亡进程。米糠多糖抑制 CTX 和 IBDV 诱导的淋巴细胞细胞凋亡过程的分子机理尚待进一步研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] TANIGAMI Y, KUSUMOTO S, NAGAO S, et al. Partial degradation and biological activities of an anti-tumor polysaccharide from rice bran [J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1991, 39 (7) : 1782-1787.
- [ 2 ] TAKEO S, KADO H, YAMAMOTO H, et al. Studies on an antitumor polysaccharide RBS derived from rice brain. Preparation and general properties of RON, an active fraction of RBS[J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1988, 36 (9) : 3609-3613.
- [ 3 ] 姜元荣. 米糠免疫活性多糖的研究[D]. 无锡:江南大学, 2004:13-108.
- [ 4 ] 丘玉昌, 吴曙光, 徐 伟. 米糠多糖的提取及免疫调节作用[J]. *中国生化药物杂志*, 1999, 20 (2) : 91-93.
- [ 5 ] 李淑芳, 李 英, 张继东, 等. 米糠多糖对健康雏鸡外周血 T 淋巴细胞转化和体液免疫的影响[J]. *动物营养学报*, 2007, 19 (3) : 237-244.
- [ 6 ] 李淑芳, 杨汉春, 张继东, 等. 米糠多糖对环磷酰胺诱导免疫抑制雏鸡外周血 T 淋巴细胞增殖活性及疫苗免疫效果的影响[J]. *中国兽医科学*, 2007, 37 (7) : 588-592.
- [ 7 ] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 第 2 版. 武汉:湖北科技出版社, 2002: 226-266.
- [ 8 ] 刘继彦, 李永强, 彭瑞清, 等. 环磷酰胺单次注射对小鼠淋巴细胞及亚群的早期作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2005, 12 (3) : 179-182.
- [ 9 ] 陈志胜, 计惠琴, 王丙云, 等. 三肽毒素对环磷酰胺诱导的细胞凋亡的影响[J]. *中国兽医学报*, 2005, 25 (1) : 51-52.
- [ 10 ] 韦 平, 丁家波. 几种引起家禽免疫抑制的病毒性疾病及其作用机理[J]. *中国预防兽医学报*, 2000, 22 (4) : 316-318.
- [ 11 ] UMEMURA K, YANASE K, SUZUKI M. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of human cancer cell lines by a marine microalgal polysaccharide [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66 (3) : 481-487.
- [ 12 ] XU A, CHEN H, SUN B. Experimental study of Ginkgo biloba exocarp polysaccharides on HL260 cells *in vitro* [J]. *Zhong Yao Cai*, 2004, 27 (5) : 361-363.
- [ 13 ] 赵 圆, 尚德静. 多糖诱导肿瘤细胞凋亡机制的研究进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13 (6) : 472-475.
- [ 14 ] 陈 蔚, 俞茂华, 李益明. 黄芪多糖对非肥胖糖尿病鼠胰岛超微结构及氧化凋亡因子表达的影响[J]. *复旦学报(医学版)*, 2007, 34 (2) : 269-272.
- [ 15 ] 李德远, 汤 坚, 徐现波, 等. 枸杞多糖对慢性辐射小鼠细胞凋亡及 bac-2 基因表达的影响[J]. *营养学报*, 2005, 27 (3) : 235-237.
- [ 16 ] 余建国, 姜正前, 严晗光, 等. 茯苓多糖对初级细胞免疫活性的影响及其抗肿瘤作用[J]. *中国兽医科技*, 2004, 34 (11) : 70-73.

# 米糠多糖对免疫抑制鸡外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞亚群的调节作用

李淑芳<sup>1</sup>, 张继东<sup>1</sup>, 李英<sup>2</sup>, 雍艳红<sup>1</sup>, 蔡康荣<sup>3</sup>, 谢为天<sup>1</sup>

(1. 广东海洋大学动物医学系, 广东 湛江 524088;

2. 河北省畜牧兽医研究所, 河北 保定 071000;

3. 广东医学院分析中心, 广东 湛江 524023)

**摘要:** 为探讨米糠多糖对免疫抑制鸡免疫功能的调节作用, 采用流式细胞技术检测了环磷酰胺和传染性法氏囊病毒诱导免疫抑制鸡在服用米糠多糖 (剂量为 150 mg/kg) 和不服用米糠多糖情况下, 外周血中 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞亚群数量的动态变化。结果显示, 米糠多糖能够抑制环磷酰胺和传染性法氏囊病毒处理鸡外周血中 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞数量的降低; 提高健康雏鸡外周血中 CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞比率, 对 CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞作用不明显。

**关键词:** 米糠多糖; 免疫抑制; CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞; CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞; 流式细胞术; 鸡

**中图分类号:** S852.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-5130(2009)02-0059-04

目前, 在我国规模化养鸡场, 由于环境应激、营养问题、免疫抑制性病毒感染等原因引起鸡群的免疫抑制现象非常普遍<sup>[1]</sup>。鸡群的免疫抑制常常诱发和加重细菌和寄生虫的继发感染, 提高成年鸡群的发病率和死亡率, 显著降低对疫苗免疫的应答反应<sup>[2]</sup>。因此, 研究和开发免疫增强性药物是有效防治免疫抑制性疾病的有效方法之一。米糠多糖 (bran polysaccharide, RBS) 是米糠中主要以  $\alpha$ -1, 6糖苷键为主的葡聚糖, 具有良好的免疫增强活性<sup>[3-5]</sup>, 能够促进小鼠淋巴细胞增殖、促进腹腔巨噬细胞的吞噬作用, 对补体活性和体液免疫也有一定的促进作用。姜元荣等<sup>[5]</sup>从分子水平研究发现, 米糠多糖可提高 L-1、L-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  4种细胞因子在小鼠体内的 mRNA 表达水平, 显著促进小鼠腹腔巨噬细胞在体外产生 L-1、TNF- $\alpha$  和脾淋巴细胞产生 L-2、IFN- $\gamma$  的作用。本课题组前期研究发现, 米糠多糖能够提高健康雏鸡和免疫抑制雏鸡 T淋巴细胞转化功能和对疫苗免疫应答反应<sup>[6-8]</sup>。为了研究米糠多糖对鸡免疫抑制的调节作用机理, 本试验采用流式细胞技术 (flow cytometry, FCM) 检测了环磷酰胺 (CTX) 和传染性法氏囊病毒 (BDV) 实验性诱导的免疫抑制雏鸡在服用米糠多糖和不服用米糠多糖情况下, 外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞亚群数量的动态变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 受试药物的制备

米糠多糖: 1%水溶液, 由本课题组研制, 多糖

含量为 86.3%。

### 1.2 主要试剂与仪器

环磷酰胺 (CTX): 批号 07020221, 江苏恒瑞医药股份有限公司生产; BDV ( $D_{50} = 1 \times 10^{-4} / 0.1$  mL): 瑞谱 (保定) 生物工程有限公司惠增; 淋巴细胞分离液: 由中国医学科学院生物工程研究所生产; CD4和 CD8鼠抗鸡单克隆抗体 (PE标记): 为 Southern Biotech公司产品; 细胞流式仪: EPICS XL 型, Beckman公司产品。

### 1.3 试验动物及分组与处理

1日龄三黄鸡 (购于广东省湛江市某孵化场, 琼扩试验检测 BDV 抗体阴性), 常规饲养。于 7日龄选择临床健康雏鸡 180只, 随机平均分为 6组, 即: 空白对照组、RBS组、CTX组、(CTX + RBS)组、BDV组和 (BDV + RBS)组。BDV组和 (BDV + RBS)组隔离饲养。从 7日龄起, CTX组和 (CTX + RBS)组雏鸡肌肉注射 CTX, 每只每天 80 mg/kg, 连续 3 d, 其他组雏鸡肌肉注射生理盐水, 0.2 mL/只。从 9日龄起, RBS组、(CTX + RBS)组和 (BDV + RBS)组雏鸡灌服 RBS, 每只每天 150 mg/kg, 每天 1次, 连续 5 d, 其他组灌服生理盐水, 0.5 mL/只。11日龄, BDV组和 (BDV + RBS)组雏鸡实施 BDV人工接种 100  $D_{50}$ , 每只 0.1 mL, 其他组雏鸡肌肉注射等量生理盐水。

### 1.4 样品采集

分别在 7、14和 21日龄, 每组随机抽取 5只鸡, 心脏采血, 肝素抗凝, 常规分离淋巴细胞, 制备淋巴细胞悬液, 用于测定外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T细胞亚群百分率。

### 1.5 外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞亚群检测

采用 FCM法<sup>[9-11]</sup>测定外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T淋

收稿日期: 2008-01-15

基金项目: 河北省“十五”科技攻关计划 (04220401D)。

作者简介: 李淑芳 (1964-), 女, 副教授, 博士。

巴细胞亚群百分率。

### 1.6 数据处理

结果以平均数 ±标准差 (Mean ±SD) 表示。应用 SPSS V13.0 进行单因素方差分析, 用 LSD 法进行组间多重比较。P < 0.05 表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 米糠多糖对试验雏鸡外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群含量的影响

试验雏鸡 7 日龄时, 各试验组鸡外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的百分率和对照组无显著差异 (P > 0.05)。

14 日龄, 空白对照组和 RBS 组雏鸡外周血中 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的百分含量差异不显著 (P > 0.05); CTX 组、(CTX + RBS) 组、BDV 组和 (BDV + RBS) 组均显著低于空白对照组 (P < 0.05), 但 (CTX + RBS) 组高于 CTX 组 (P < 0.05), (BDV + RBS) 组显著高于 BDV 组 (P < 0.05)。21 日龄, RBS 组雏鸡外周血中 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的百分含量显著高于空白对照组 (P < 0.05), CTX 组、(CTX + RBS) 组、BDV 组和 (BDV + RBS) 组均低于空白对照组 (P < 0.05), 但 (CTX + RBS) 组高于 CTX 组 (P < 0.05)。见表 1。

表 1 试验鸡外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群的动态变化

组别	7 日龄	14 日龄	21 日龄
空白对照	38.62 ± 3.86 <sup>a</sup>	28.50 ± 2.51 <sup>a</sup>	24.72 ± 2.26 <sup>b</sup>
RBS	40.22 ± 3.40 <sup>a</sup>	31.18 ± 1.66 <sup>a</sup>	28.76 ± 4.03 <sup>a</sup>
CTX	39.34 ± 3.14 <sup>a</sup>	12.83 ± 2.89 <sup>c</sup>	14.70 ± 2.63 <sup>d</sup>
CTX + RBS	41.40 ± 3.90 <sup>a</sup>	21.21 ± 2.82 <sup>b</sup>	18.38 ± 2.86 <sup>c</sup>
BDV	40.06 ± 5.53 <sup>a</sup>	16.20 ± 2.80 <sup>c</sup>	18.46 ± 2.10 <sup>c</sup>
BDV + RBS	38.24 ± 4.44 <sup>a</sup>	20.78 ± 2.32 <sup>b</sup>	20.56 ± 2.26 <sup>c</sup>

注: 同列数据肩注不同字母表示差异显著 (P < 0.05), 肩注相同字母表示差异不显著 (P > 0.05)。下同。

### 2.2 米糠多糖对试验雏鸡外周血 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的影响

7 日龄时, 各组之间雏鸡外周血 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的比例差异不显著 (P > 0.05)。14 和 21 日龄, 空白对照组和 RBS 组雏鸡外周血中 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的

比例差异不显著 (P > 0.05), CTX 组、(CTX + RBS) 组、BDV 组和 (BDV + RBS) 组均显著低于空白对照组 (P < 0.05), 但 (CTX + RBS) 组显著高于组 CTX (P < 0.05), (BDV + RBS) 组显著高于 BDV 组 (P < 0.05)。见表 2。

表 2 试验鸡外周血 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群的动态变化

组别	7 日龄	14 日龄	21 日龄
空白对照	24.10 ± 3.24 <sup>a</sup>	18.46 ± 2.50 <sup>a</sup>	20.34 ± 3.03 <sup>a</sup>
RBS	23.34 ± 2.66 <sup>a</sup>	18.61 ± 1.64 <sup>a</sup>	19.94 ± 2.05 <sup>a</sup>
CTX	22.92 ± 3.45 <sup>a</sup>	7.82 ± 2.41 <sup>c</sup>	6.64 ± 1.72 <sup>d</sup>
CTX + RBS	23.16 ± 1.55 <sup>a</sup>	13.31 ± 3.70 <sup>b</sup>	11.26 ± 1.81 <sup>c</sup>
BDV	21.48 ± 2.47 <sup>a</sup>	7.30 ± 1.66 <sup>c</sup>	10.12 ± 1.39 <sup>c</sup>
BDV + RBS	24.60 ± 2.69 <sup>a</sup>	11.67 ± 1.69 <sup>b</sup>	15.62 ± 1.77 <sup>b</sup>

### 2.3 米糠多糖对试验鸡外周血 CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> 细胞亚群比值的影响

在 7 日龄时, 不同处理的各试验组之间雏鸡外周血中 CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的比例不存在明显差异 (P > 0.05)。14 日龄, RBS 组、CTX 组、(CTX + RBS) 组、(BDV + RBS) 组与空白对照组比较无显

著差异 (P > 0.05), BDV 组显著高于空白对照组 (P > 0.05)。21 日龄, RBS 组、(CTX + RBS) 组、BDV 组、(BDV + RBS) 组与空白对照组比较差异不显著 (P > 0.05), CTX 组则高于空白对照组 (P < 0.05)。见表 3。

表3 试验鸡外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞亚群比值的动态变化

组别	7日龄	14日龄	21日龄
空白对照	1.61 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.27 ± 0.26 <sup>b</sup>	1.25 ± 0.29 <sup>b</sup>
RBS	1.73 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.69 ± 0.19 <sup>b</sup>	1.45 ± 0.18 <sup>b</sup>
CTX	1.75 ± 0.33 <sup>a</sup>	1.69 ± 0.36 <sup>b</sup>	2.40 ± 0.99 <sup>a</sup>
CTX + RBS	1.79 ± 0.21 <sup>a</sup>	1.67 ± 0.44 <sup>b</sup>	1.67 ± 0.36 <sup>b</sup>
BDV	1.89 ± 0.36 <sup>a</sup>	2.33 ± 0.78 <sup>a</sup>	1.86 ± 0.37 <sup>ab</sup>
BDV + RBS	1.60 ± 0.26 <sup>a</sup>	1.88 ± 0.37 <sup>b</sup>	1.34 ± 0.13 <sup>b</sup>

### 3 讨论

#### 3.1 环磷酰胺和 BDV对鸡外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T细胞亚群的影响

环磷酰胺具有细胞毒性,能够杀死处于有丝分裂和进入循环周期的细胞,破坏和干扰母细胞的增殖分化,非特异性地杀伤抗原敏感性小淋巴细胞,限制其转化为免疫母细胞,对体液免疫和细胞免疫均有抑制作用<sup>[12-13]</sup>。传染性法氏囊病毒主要以B细胞为靶细胞,感染未成熟的B细胞或B细胞前体细胞,法氏囊、脾脏、哈德氏腺和盲肠扁桃体内的浆细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞、巨噬细胞均有不同程度的变性、坏死和凋亡,外周血T、B细胞数量明显下降,最终导致免疫功能抑制<sup>[14-15]</sup>。故本试验选用环磷酰胺和传染性法氏囊病毒处理雏鸡,结果显示,环磷酰胺和传染性法氏囊病毒处理雏鸡外周血中CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞数量较健康对照组显著减少。由于CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞识别MHC II型分子递呈的抗原,刺激B细胞活化、增殖和成熟并分泌抗体,CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞的减少使机体体液免疫功能降低。CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞与MHC I型分子递呈的抗原结合,具有细胞毒性T细胞效应,直接杀伤被病毒感染的自身细胞或肿瘤细胞。CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞减少表明机体细胞免疫功能降低。因此,本试验中用环磷酰胺和传染性法氏囊病毒处理成功诱导试验雏鸡产生了细胞免疫和体液免疫抑制。

#### 3.2 米糠多糖对不同免疫状态雏鸡外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T细胞亚群的影响

试验结果显示,米糠多糖能够提高健康雏鸡外周血CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞的数量,从而提高健康雏鸡的非特异性细胞免疫和体液免疫功能;当机体没有内源性抗原(病毒感染细胞或肿瘤细胞)存在时,米糠多糖对体内的CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞活化没有明显作用。当试验雏鸡注射CTX和接种BDV后,(CTX+RBS)组雏鸡外周血CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞数量高于CTX组,(BDV+RBS)组雏鸡外周血中CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞数量高于BDV组,说明米糠多糖

对CTX和BDV诱导的免疫抑制雏鸡的外周血CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞水平降低具有一定的抑制作用。米糠多糖通过上调免疫抑制雏鸡血液中CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞水平,增强机体对内源性和外源性抗原的免疫应答水平,从而促进免疫抑制雏鸡免疫功能的恢复。

#### 3.3 米糠多糖对试验雏鸡外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T细胞比值的影响

现代免疫学理论认为,机体T淋巴细胞各亚群之间相互平衡、互相调节,使机体对外来抗原刺激产生正常免疫应答,并维持机体的免疫平衡状态。因此,CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞亚群在血液中的分布是医学临床上重要的免疫状态检测指标<sup>[11]</sup>。医学临床上,CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值是评价机体免疫状态的重要指标之一,健康人群的CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值在一定的数值范围之内,偏离此值便是免疫机能失调的反映。在动物医学方面,该类研究的报道较少,关于鸡的CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞比值研究的报道结果也不一致<sup>[9,15-16]</sup>。本试验结果显示,CTX组在21日龄、BDV组在14日龄时,雏鸡的CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值大于空白对照组,同时大于2,即出现所谓的CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值倒置,是病毒感染和免疫机能紊乱的重要特征<sup>[15]</sup>。在雏鸡14日龄和21日龄(即服完RBS一周之内),(CTX+RBS)组和(BDV+RBS)组雏鸡外周血的CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值均与正常对照组相当,表明RBS对CTX和BDV导致的免疫机能紊乱具有良好的调节作用。

#### 参考文献:

- [1] 崔治中. 规模化肉鸡安全生产与免疫抑制性病毒多重感染的预防控制 [J]. 山东畜牧兽医, 2008, 132(1): 1-4.
- [2] 崔治中. 鸡群的免疫抑制病与药物的应用和研发 [J]. 动物保健, 2006, 105(5): 35-36.
- [3] 李传普, 丁升艳, 陈安国. 米糠多糖的开发及应用 [J]. 饲料工业, 2007, 28(13): 55-57.
- [4] 毕晋明, 王永军. 米糠多糖的生物学活性研究及应用前景 [J]. 兽药与饲料添加剂, 2006, 11(1): 21-22.

- [5] 姜元荣. 米糠免疫活性多糖的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2004: 1-99.
- [6] 张晶晶, 李淑芳, 钟秀会, 等. 米糠多糖对人工感染传染性法氏囊病毒雏鸡的保护力及 NK 细胞活性的影响 [J]. 中兽医医药杂志, 2007, 3: 11-13.
- [7] 李淑芳, 杨汉春, 张继东, 等. 米糠多糖对环磷酰胺诱导免疫抑制鸡外周血 T 淋巴细胞增殖活性及疫苗免疫效果的影响 [J]. 中国兽医科学, 2007, 37(7): 588-592.
- [8] 李淑芳, 李英, 张继东, 等. 米糠多糖对健康雏鸡外周血 T 淋巴细胞转化和体液免疫的影响 [J]. 动物营养学报, 2007, 19(3): 237-244.
- [9] 孙永科, 田占成, 王云峰, 等. 表达鸡干扰素和传染性支气管炎病毒 S1 基因的重组鸡痘病毒疫苗对鸡外周血 T 淋巴细胞动态分布影响的研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(5): 539-543.
- [10] 孙庆申, 霍庆莉, 蔡雪晖, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒感染猪外周血 CD4、CD8 分子动态变化研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008, (1): 14-15.
- [11] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术 [M]. 2 版, 武汉: 湖北科技出版社, 2002: 226-266.
- [12] 刘继彦, 李永强, 彭瑞清, 等. 环磷酰胺单次注射对小鼠淋巴细胞及亚群的早期作用 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2005, 12(3): 179-182.
- [13] 朱晓彤, 江青艳, 王丙云, 等. 环磷酰胺诱导黄羽肉鸡免疫抑制的研究 [J]. 华南农业大学学报: 自然科学版, 2003, 24(4): 60-63.
- [14] 崔治中. 鸡群中免疫抑制性病毒蛋传病毒的多重感染 [J]. 中国家禽, 2000, 22(5): 17-18.
- [15] 杨汉春. 动物免疫学 [M]. 2 版, 北京: 中国农业大学出版社, 2003: 77-86.
- [16] 黄军, 姜国均, 周帮会, 等. 中药“增免散”对鸡腔上囊细胞凋亡和外周血 T 细胞亚群的影响 [J]. 中国家禽, 2006, 28(17): 19-21.

## · 简报 · 用好用活项目资金, 大力发展山羊生产

金望强<sup>1</sup>, 徐小聪<sup>1</sup>, 周晓华<sup>1</sup>, 潘臣龙<sup>1</sup>, 章应槎<sup>2</sup>, 章应可<sup>3</sup>

(1. 浙江省永嘉县畜牧兽医局, 浙江 永嘉 325100; 2. 浙江省永嘉县巽宅镇农技站, 浙江 永嘉 325117;

3. 浙江省永嘉县山坑乡农技站, 浙江 永嘉 325117)

永嘉“八山一水一分田”, 气候温和, 草山面积广, 牧草种类多, 发展山羊生产的自然条件优越。当地群众养殖山羊的历史悠久, 经验丰富, 山羊生产已逐渐成为山区农民脱贫致富的重要途径。

### 1 做精管理, 提高资金使用效率

做好项目管理是项目成功实施的前提。我们坚持加强领导, 规范管理, 用好用活省项目资金, 促进山羊生产的发展。成立由县财政、农业和有关乡镇领导参加的协调组, 加强对项目实施的协调管理。县畜牧兽医局和有关乡农技站负责组织实施。各项目实施乡指定一名分管领导、配备一名专职畜牧兽医员负责项目的实施指导。对各示范户实行“户籍化”管理, 建立统一规范的免疫、消毒、用药、生产、销售等台帐资料和相关卡册。在资金补助上, 注重引导作用, 主要向大户倾斜, 根据饲养规模来确定补助金额。建立示范户资金补助公示制度, 做到公开透明, 专款专用, 发挥好项目资金的最大使用效率。

### 2 做强服务, 提高项目实施效果

做好服务是项目成功实施的保障。在项目实施过程中, 我们加强对示范户的政策、技术、信息和市场等方面的服务, 以优质服务提高项目实施的成功率。通过举办培训班、农函大、专题讲座、技术答疑、印发技术资料、组织示范户外出考察学习等方式, 帮助他们提高饲养管理和疾病防治水平。大力推广种植黑麦草等高产优质牧草, 增加青绿饲料供给,

提高饲养效益。加快品种改良步伐, 积极推广“波黄本”和“黄本”等优良杂交组合, 提高了良种覆盖率 and 畜产品质量水平。

### 3 做优典型, 提高示范带动效应

做好典型示范是项目成功实施的重点。我们对山羊养殖示范户在资金、技术等方面进行重点扶持, 使他们尽快上规模、出效益, 起到典型示范、以点带面的作用。在各乡示范户中选择 3~5 个有一定经济条件和文化素质, 并有饲养基础的养羊户作为科技示范户, 对其进行重点指导, 提高其生产水平和经济效益, 起到了典型示范的作用, 带动了我县山区规模养羊业的发展, 提高了山区农民的经济收入。

### 4 做准对接, 提高经济产出效益

做好市场对接是项目成功实施的关键。我们在鼓励帮助各养羊示范户组建专业合作社, 提高产业化水平的基础上, 重点是做好山羊养殖业和“农家乐”乡村旅游业的对接, 解决山羊的销路问题。特别是近年来“农家乐”乡村旅游业蓬勃兴起, 给当地农民带来了可观的经济收入。我们因地制宜, 积极引导“农家乐”经营户发展“烤全羊”项目, 同时帮助山羊养殖户与“农家乐”经营户建立起稳定的购销关系, 既解决了山羊养殖户的销售后顾之忧, 又通过加工使山羊的价值成倍增加, 达到了双赢。

收稿日期: 2008-05-08

西部论坛

# 绵羊妊娠识别、建立和维持的信号系统\*

巨向红<sup>1</sup>, 雍艳红<sup>1</sup>, 余四九<sup>2</sup>

(1. 广东海洋大学动物医学系, 广东 湛江 524088; 2. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070)

**[摘要]** 妊娠的建立和维持归因于胚体的信号和黄体对孕酮的产生, 在反刍动物, 胚体滋养层分泌的激素抑制子宫内膜产生前列腺素 PGF<sub>2</sub>。在发情周期的绵羊, 孕酮下调子宫内膜腔上皮和子宫腺上皮孕酮受体基因的表达, 并伴随着上皮雌激素受体和催产素受体的增加。在催产素的作用下, 子宫开始分泌溶黄体作用的前列腺素 F<sub>2</sub>。在妊娠绵羊, 孕体滋养层产生的干扰素可作用于子宫内膜而直接抑制雌激素受体基因和催产素受体基因的转录。孕酮、干扰素、胎盘催乳素和生殖激素共同组成了一个“作用网络”来调节子宫的功能分化和子宫腺的形态发生, 从而维持绵羊妊娠。本文综述了绵羊妊娠识别、建立和维持的信号系统。

**[关键词]** 绵羊; 妊娠识别; 妊娠建立; 信号系统

**[中图分类号]** S811.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-5228(2009)03-0001-05

妊娠的建立涉及到母体对妊娠的识别和胚胎附植两个过程。Roger Short 1969年提出了“母体识别”的概念, 其可定义为一个胚胎信号在母体的存在和黄体寿命延长的生理过程。黄体产生的孕酮的维持了子宫的相关功能, 使其支持早期胚胎的发育、附植、胎盘形成和成功的胎儿与胎盘发育至分娩。而妊娠的维持则是子宫与胎体之间相互作用的结果。有观点认为胎盘激素可直接作用于子宫内膜而调节细胞分化和细胞功能。众多的化学因子、信号物质参与了妊娠过程中的母-胎对话<sup>[1]</sup>。弄清和人为干预这些生理过程, 有助于提高子宫功能、胎儿存活和生殖健康。

## 1 妊娠识别

### 1.1 黄体溶解机制

在绵羊发情周期, 子宫内膜释放的前列腺素 (PGF) 可导致卵巢黄体的结构和功能退化, 即黄体溶解。它是孕酮、雌激素和催产素作用于其受体的顺序效应。在绵羊, PGF 由子宫内膜腔上皮 (LE) 和

子宫腺上皮 (sGE) 产生<sup>[2]</sup>, 因为 LE 和 sGE 不仅表达催产素受体 (OTR), 而且是唯一的表达前列腺素合成限速酶环加氧酶-2 (COX-2) 的子宫细胞类型。在发情时, 由成熟卵泡产生的雌激素作用于子宫而使子宫雌激素受体的数量增加, 但由于缺乏催产素, 子宫内膜不能分泌 PGF。在发情间期的早期, 新生成的黄体分泌的孕酮刺激了磷脂在 LE 和 sGE 上的沉积, 磷脂能释放花生四烯酸而合成和分泌 PGF。在间情期, 孕酮水平升高并通过其受体阻断了雌激素受体 (ER) 和催产素受体 (OTR) 在子宫内膜腔上皮和腺上皮的表达。因此, 在发情周期的第 5 到第 11 d 检测不到 ER 和 OTR。孕酮抑制 ER 的精确分子机制还不清楚, 可能是孕酮抑制 ER 而间接的抑制了 OTR 基因的表达。孕酮对子宫的作用一直持续到周期的 8~10 d, 到第 11~12 d 以后, 下调子宫内膜腔上皮和腺管上皮 PR 的表达, 并在第 13 d 和第 14 d 出现 ER 和 OTR 表达的快速增加。14~16 d 的子宫 LE 和 sGE 出现催乳素诱导的溶黄体素 PGF。黄体退化后, 绵羊完成了一个发

\* [收稿日期] 2008-11-26

[基金项目] 广东海洋大学博士启动资金, 编号(0712107)。

[作者简介] 巨向红(1977-), 男, 甘肃泾川人, 讲师, 博士, 主要研究方向: 动物生殖生理。

情周期。另外,如果 ER 能被很多生长因子,如胰岛素样生长因子-1 和表皮生长因子以配体依赖型的方式活化,雌激素可能是黄体溶解机制中非必需的激素。

这样,孕酮就以两种方式参与了周期黄体溶解机制:开始抑制,接着诱导。孕酮对其受体下调的时间决定了子宫内膜黄体溶解机制开始的时间。据报道,周期绵羊黄体早期注射 RU486 可延长发情间期,而发情后期注射外源性孕酮可缩短发情周期间隔,这个现象很好的证明了孕酮的这种作用机制。

### 1.2 妊娠识别信号干扰素- $(IFN-)$

在反刍动物,母体对妊娠的识别首先要求胎儿的细线化,即从球形变为管状,最后形成丝状胚体。在妊娠的第 10~25 d 胎儿滋养外胚层的单核细胞能分泌  $IFN-$ ,而第 14~16 d 到达其峰值。在生物活性上,16 d 的胚体培养 24 h 以上能产生  $1 \times 10^8$  个抗病毒单位的  $IFN-$ 。它是胚体产生的唯一具有抑制子宫内膜溶黄体机制的因子,以旁分泌的模式在子宫内膜 LE 和 sGE 中抑制 ER 和 OTR 基因的转录,从而抑制了子宫内膜溶黄体机制的发生。绵羊在发情周期第 11 到 17 d 的子宫内膜 LE 和 sGE 上 ER 和 OTR 基因的表达增加,而在妊娠或灌注了  $IFN-$  的绵羊无此现象。通过抑制 OTR 表达的增加, $IFN-$  抑制了子宫内膜 PGF 的产生,但不影响基础 PGF 的产生。研究发现 PGF 在妊娠绵羊中的表达量高于周期绵羊,并且胎体和  $IFN-$  都不影响妊娠早期绵羊子宫内膜上皮上 COX-2 的表达<sup>[3]</sup>。妊娠绵羊的基础 PGF 不能经血液到达卵巢,其在子宫局部以旁分泌的方式发挥生物效应。这样, $IFN-$

的溶黄体作用是抑制雌激素反应性的子宫上皮 ER 和 OTR 基因的表达,即通过直接的抑制 ER 基因的转录和维持黄体孕酮的分泌。

$IFN-$  是 1 型干扰素家族的新成员,该家族成员作用于子宫内膜 LE、sGE 和基质而调节干扰素刺激基因 (ISGs) 的表达,在子宫内膜分化和胎儿附植上发挥重要作用。与孕酮协同, $IFN-$  发挥妊娠识别作用,并能增强 ISGs17 和 2,5-单腺苷酸合成酶 (OAS) 的表达<sup>[4]</sup>。1 型干扰素受体亚单位 IFNAR1 和 IFNAR2 在子宫内膜的所有类型细胞中均有表达,而子宫内膜 sGE 中表达量最高。在胎体及  $IFN-$  诱导下,大多数的 ISGs 仅在绵羊子宫内膜基质细胞和腺上皮的中层或深层细胞中表达量升高<sup>[5]</sup>,而在腔上皮和腺管上皮上 ISG 缺失。这明显是由于干扰素调节因子 2 (IRF-2) 的表达。IRF-2

是一个基因转录阻遏物,它在子宫内膜 LE 和 sGE 表达,并在怀孕早期表达量升高。另外,在子宫内膜上皮中,IRF-2 还参与了  $IFN-$  对 ER 基因转录的抑制过程。

值得注意的是胚胎的来源不同会影响  $IFN-$  mRNA 的表达时间。Yao 等发现体外受精的胚胎,其  $IFN-$  mRNA 最早出现在发育第 4 天的 16 细胞期,而体细胞核移植的胚胎出现在第 5 天,孤雌激活胚胎则出现在第 6 天。作者还研究了发育第 7 天不同来源胚胎的  $IFN-$  mRNA 表达量的变化,没有发现来源对表达量的影响<sup>[6]</sup>。

孕酮和  $IFN-$  之间精确的对话机制还不清楚,可能是子宫 LE 和 sGE 的基底外侧部上皮表面产生一种叫做“干扰素介素”的物质,以旁分泌放大器的方式作用于基质,或是胎体产生的  $IFN-$  通过腔上皮细胞层转运或被动的进入子宫基质的底层。

## 2 附植和妊娠的建立

### 2.1 孕酮

孕酮是妊娠必须的激素,在哺乳动物的妊娠建立和维持中发挥中心作用。黄体早期,子宫内腔上皮和基质中有孕酮受体 (PR) 的表达,其可被孕酮直接激活而调节其它基因的表达。而在黄体后期,孕酮下调子宫内膜 LE 的 PR 表达。妊娠 11~13 d 的绵羊子宫内膜 LE 和 sGE 上检测不到 PR 蛋白。随着妊娠的继续,PR 仅在绵羊子宫基质和肌层中表达。据报道,在绵羊、牛、猪、西方斑点鼬、狒狒、恒河猴、人和小鼠胚胎附植前较短的一段时间内,子宫上皮上没有 PR。这样,附植前子宫内膜上皮的功能调节可能是基质细胞产生的特殊因子的作用。研究发现,绵羊子宫内膜基质细胞上有成纤维细胞生长因子-10 (FGF-10) 和肝细胞生长因子 (HGF) 的表达。同时,子宫内腔上皮细胞和滋养外胚层也能产生其相应的受体,FGF 受体 2IIIb (FGFR2IIIb)。另外,绵羊子宫血管内膜还产生 FGF-7,其通过 FGFR2IIIb 发挥生理作用。目前对调节基质产生生长因子的机制还不清楚。

在妊娠建立的早期,孕酮的含量与着床的发生密切相关。据最新的研究发现,周期黄体早期,转运蛋白视黄醇结合蛋白和叶酸结合蛋白与孕酮的变化高度相关,但其影响着床的确切分子机理还不清楚<sup>[7]</sup>。

### 2.2 内源性 JS 绵羊逆转录病毒 (enJSRVs)

绵羊基因包含一个 15 到 20 个拷贝的内源性

逆转录酶病毒序列,与两个致癌的外源性逆转录酶病毒(JSRVs和ENTV)序列高度相关<sup>[8]</sup>。绵羊内源性JSRVs仅在输卵管上皮、子宫上皮、子宫颈上皮和阴道上皮表达。在子宫内膜RNA中,enJSRV RNAs的表达量在发情周期或妊娠早期的第1天到第13天增高15倍,但enJSRV RNAs在子宫内腔上皮和腺管上皮的表达被抑制,这可能在调节胎儿-子宫内膜相互作用、IFN- $\gamma$ 的产生及胎盘的分化和发育中有一定的生理作用<sup>[9,10]</sup>。

enJSRV的壳体蛋白和被膜蛋白在子宫内膜的腔上皮、腺上皮和胎儿滋养外胚层的双核细胞中表达。实际上,绵羊子宫腔上皮和腺上皮enJSRV RNAs水平在第1天和第13天快速的升高,在第15天(周期绵羊)和第19天(妊娠绵羊)下降。并且,子宫上皮enJSRV基因表达的增加与外周血液中孕酮的变化水平和子宫内膜上皮孕酮受体的表达高度相关。通过其受体,孕酮可增加enJSRV的转录。这样,enJSRV就是绵羊子宫内膜上皮上少数知道的能被孕酮及孕酮受体作用而使表达量增加的基因。

### 2.3 细胞外基质和细胞黏附分子

滋养层和子宫内腔上皮细胞的外表面形成一个糖蛋白外壳,或称为多糖包被。在绵羊胚泡附植过程中,滋养层多糖包被的组成和分布会发生变化。但相关糖蛋白复合物却研究的并不多。最近,人们发现了几种受孕酮影响的黏附因子对绵羊胚胎附植有调节作用,下面分别讨论这几种因子。

**2.3.1 粘蛋白1(MUC1)** 胚泡靠近子宫内腔上皮的第一道障碍是多糖包被,MUC1便是其成分之一。其胞外区包含一个较大的多聚糖,中心蛋白为120~220 kDa,糖基化后超过400 kDa。MUC1在从子宫内腔上皮的顶层细胞表面伸出的微绒毛和纤毛上大量表达。在人和啮齿动物,MUC1和MUC4在子宫内腔上皮的表达可能通过空间阻遏细胞-细胞和细胞-细胞外基质(ECM)黏附和胎体滋养层进入子宫内腔上皮来控制滋养层整合素受体与配体结合。绵羊的附植级联从MUC1下调后开始,在妊娠9~17天的正常或子宫腺切除绵羊,免疫反应性MUC1在子宫内腔上皮的表达开始下降<sup>[11]</sup>。而在人或家兔,孕酮作用使MUC1在子宫处于接受态时表达量增加;然而,由于胎体旁分泌信号介导的细胞表面蛋白酶活化,在胚胎的附植位点MUC1局部性减少。尽管MUC1下调的机制还不清楚,但移除这种附植阻遏物从而暴露滋养层和子宫腔上皮是附植所必须的。包含大量多聚糖的

MUC1可能被胚体或分泌型动物凝集素识别,从而参与附植的定位阶段。

### 2.3.2 糖基化依赖的细胞粘附分子1(GlyCAM-1)

GlyCAM-1是一个由内皮分泌的硫酸化糖蛋白,它是糖蛋白粘液素家族的成员,大约70%的分子由两个丝氨酸/苏氨酸富含区的O位结合糖基构成。这种粘液素糖蛋白主要在外周内皮微血管腔表面和肠系膜淋巴结表达。在淋巴系统,GlyCAM-1是作为一个白细胞表面选择素(L-selectin)的糖类配体而发挥作用。GlyCAM-1对L-selectin结合活化了整合素1和2,并促进了与纤连蛋白的紧密结合<sup>[12]</sup>。在发情周期的绵羊,从第1~5天,GlyCAM-1在子宫内腔上皮和腺上皮的表达增加,而在第11~15天下降。而妊娠绵羊,GlyCAM-1在第11~13天的LE和sGE表达量较少,从第15天开始增加,到第17~19天大量表达。这种表达模式说明其是一个潜在的附植调节物。免疫反应性GlyCAM-1在第13到19天的胚胎滋养层上也被检测到,在妊娠绵羊第11到13天的子宫冲洗液中相对含量要低于第15到17天的含量。这样,一种GlyCAM-1样蛋白可能是子宫内腔上皮和/或胚胎滋养层的分泌产物。子宫内腔上皮上免疫反应性GlyCAM-1样蛋白分布模式的观察和淋巴系统GlyCAM-1的功能,说明这种粘液素糖蛋白可能参与了妊娠绵羊附植前的胚胎-母体对话。

**2.3.3 Galectin-15** Galectins是一个含有与半乳糖苷结合的保守糖类识别区的蛋白,在细胞表面与糖蛋白或糖脂受体交叉连接,不同galectin的糖类结合特性不同。最近,人们在研究子宫腺切除绵羊附植缺陷的基因表达范型试验中在子宫内腔发现了Galectins家族的新成员Galectin-15<sup>[13]</sup>。绵羊子宫内腔galectin-15包含一个结合半乳糖苷的保守糖类识别区(CRD),除此之外,galectin-15还包含细胞黏附序列(LDV和RGD)来介导与细胞外基质蛋白上的整合素结合。研究发现,其余galectins的功能主要在细胞生长、分化和凋亡中发挥如同在细胞黏附、化学吸引和迁移的作用。

在绵羊子宫,galectin-15 mRNA仅在子宫内腔LE和sGE表达,这里是胚胎定位和黏附的初步位点。无论在周期或妊娠绵羊上,第1~10天的子宫检测不到galectin-15 mRNA,而第10~14天开始出现并增加近13倍,接着在第14~16天,周期绵羊开始下降,而妊娠绵羊不变。在子宫冲洗液中,妊娠第10~12天仅有少量galectin-15存在,而在第

14~16 天较多。子宫内膜上 galectin-15 mRNA 增加归因于孕酮诱导和 IFN 的作用。

galectin-15 mRNA 和蛋白在妊娠子宫表达的时空变化及其家族的其他成员的功能,说明其在胚胎附植中发挥重要作用。因此,子宫腔 galectin-15 的细胞外作用就是结合及交叉连接糖蛋白上的半乳糖苷,如黏蛋白、整合素、迂连蛋白、laminin 及其它糖蛋白和糖脂。因此,galectin-15 就是一个异性的细胞黏附分子而连接胚泡和子宫内膜。胚泡对 galectin-15 的生物反应性可能包括迁移、增殖和分化,这对胚泡的附植是关键的。

有趣的是,galectin-15 最初是在绵羊子宫内膜上皮和胚胎滋养层上与结晶包涵体相连的一种孕酮调节蛋白,是一个 14 K 的蛋白,最初是胚胎条件培养液和子宫冲洗液的一种组成成分,在培养时剔除 14 K 蛋白会导致胚胎细胞崩解。免疫金电子显微镜观察发现其呈大而膜的长菱形或针形晶体结构,说明此蛋白是由子宫内膜上皮分泌,被胎体从子宫营养液中吸收并以晶体样沉积。这些晶体最早在妊娠第 10 天的滋养层发现,在妊娠的第 10 到第 18 天起数量和体积增大。事实上,在妊娠第 14 天的胚泡上,晶体呈 20 nm 的点阵分布。类似的孕酮诱导的晶体蛋白在很多哺乳动物的子宫内膜和胚胎滋养层上均被发现,包括兔子、小鼠、猪及人,但在体外生成的胚胎及单性生物上不存在<sup>[14]</sup>。因此,galectin 家族成员可能在很多哺乳动物的子宫内膜表达来易化胚胎-母体对话。尽管 galectin-15 晶体在胚胎的生物作用还不清楚,但其他 galectin 的分子间作用包括调节细胞生长、分化及通过作为前 mRNA 的剪切因子和与 Bcl-2 等特殊分子间配体相互作用来调节细胞凋亡<sup>[14]</sup>。

**2.3.4 整合素(Integrins)** 整合素是一个异型二聚体的转膜糖蛋白受体家族,其介导细胞分化、迁移和黏附。在子宫内膜上皮和胚胎滋养层上,其主要的是与 ECM 相互作用来转导细胞信号。整合素在附植的黏附级联中的中心作用是结合 ECM 配体而引起细胞骨架重组、稳定的黏附及通过大量的信号中间体来介导细胞迁移、增殖和分化<sup>[15]</sup>。整合素表达的改变与几种不育原因相关,其无效突变会导致附植前胚胎致死,功能性阻滞整合素还会减少胚胎的附植位点。在妊娠绵羊胚胎附植前,整合素亚单位(v, 4, 5)和(1, 3, 5)在胚胎滋养层和子宫内膜的腔上皮的表面表达,其表达不受妊娠及胚胎存在的影响。在绵羊,附植的接受态没有发生整合素表达

的变化,但依赖与其它糖蛋白和 ECM 蛋白的表达。

**2.3.5 骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)** OPN 属于整合素结合配体、N-连接糖蛋白家族成员,该家族在骨钙化、癌转移、细胞介导的免疫应答、炎症、血管发生和细胞存活等过程中发挥主要作用。试验表明,OPN 能明显地上调人子宫内膜上 ECM 黏附分子<sup>[16,17]</sup>。结合 OPN 的整合素受体在人或家畜的子宫腔上皮和滋养层表达,其中某些在附植前增加。猪滋养层细胞和腔上皮细胞的体外试验为 OPN 结合促进了整合素受体的活化和细胞支架的重组提供了证据。在细胞黏附和基质排布过程中,当 OPN 与受体结合时,多聚 OPN 具有较高的拉伸力。OPN 无效或 OPN 杂合小鼠妊娠成功率下降,并且 OPN 无效胚胎也明显的小于野生型对应胚胎。

在上皮细胞和很多组织的分泌物中可检测到 OPN 的存在,包括子宫。OPN 通过其精氨酸-甘氨酸-门冬氨酸序列与整合素杂二聚体(v1, v3, v5, v6, v8, 41, 51 和 81)结合,并且通过其它序列与 41 和 91 结合后能提高细胞黏附、扩展和转移。在妊娠绵羊,OPN 还是子宫内膜腺上皮分泌进入子宫腔的组织营养液成分之一。在附植前,绵羊 OPNmRNA 仅在子宫内膜 GE 表达,最早在第 13 天出现,在第 19 天可出现在所有的腺体中。孕酮能诱导子宫腺 OPN 表达,并且这种诱导与腺上皮 PR 的缺失相关。有证据表明,OPN 在胎儿滋养层和母体子宫内膜腔上皮表达,在胎体的伸长、并置和黏附过程中,能刺激胎体细胞的增殖、迁移、存活、黏附和重建。因此,OPN 可能发挥双功能的配体桥梁作用,来介导胎体与子宫内膜的黏附和胎盘形成。

#### 参考文献:

- [1] Gray C, Bartol FF, Taylor KM, et al. Ovine uterine gland knock-out model: effects of gland ablation on the estrous cycle [J]. Biol Reprod, 2000, 62:448-456.
- [2] Charpigny G, Reinaud P, Tamby JP, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and-2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy [J]. Endocrinology, 1997, 138:2163-2171.
- [3] Johnson GA, Stewart MD, Gray CA, et al. Effects of the estrous cycle pregnancy and interferon tau on 2,5-oligoadenylate synthetase expression in the ovine uterus [J]. Biol Reprod, 2001, 64:1392-1399.
- [4] Choi Y, Johnson GA, Burghardt RC, et al. Interferon regulatory factor-two restricts expression of interferon-stimulated genes to the endometrial stroma and glandular epithelium of the ovine uterus [J]. Biol Reprod, 2001, 65:1038-1049.

- [5] DeMartini JC, Carlson JO, Leroux C, et al. Endogenous retroviruses related to jaagsiekte sheep retrovirus [J]. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 2003, 275:117-137.
- [6] Yao N, Wan P-C, Hao Z-D. Expression of Interferon-tau mRNA in Bovine Embryos Derived from Different Procedures[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2008, 44(1): 132-139.
- [7] Morris D, Diskin M. Effect of progesterone on embryo survival [J]. *Animal*, 2008, 2:1112-1119.
- [8] Johnson GA, Bazer FW, Jaeger LA, et al. Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep[J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 65:820-828.
- [9] Hwang ST, Singer MS, Giblin PA, et al. GlyCAM-1, a physiologic ligand for L-selectin, activates beta 2 integrins on naive peripheral lymphocytes [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1996, 184:1343-1348.
- [10] Gray CA, Adelson DL, Bazer FW, et al. Discovery and characterization of an epithelial-specific galectin in the endometrium that forms crystals in the trophectoderm [J]. *PNAS*, 2004, 101:7982-7987.
- [11] Talbot NC, Powell A, Garrett W, et al. Ultrastructural and karyotypic examination of in vitro produced bovine embryos developed in the sheep uterus[J]. *Tissue and Cell*, 2000, 32: 9-27.
- [12] Giaccotti FG & Ruoslahti E. Integrin signaling[J]. *Science*, 1999, 285:1028-1032.
- [13] Carlow JE, Ka H, Johnson GA, et al. Analysis of osteopontin at the maternal-placental interface in pigs[J]. *Biology of Reproduction*, 2002, 66:718-725.
- [14] Weintraub AS, Lin X, Itskovich VV, et al. Prenatal detection of embryo resorption in osteopontin-deficient mice using serial noninvasive magnetic resonance microscopy[J]. *Pediatric Research*, 2004, 55:419-424.
- [15] Johnson GA, Burghardt RC, Joyce MM, et al. Osteopontin is synthesized by uterine glands and a 45-kDa cleavage fragment is localized at the uterine-placental interface throughout ovine pregnancy[J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 69:92-98.
- [16] Lacroix MC, Devinoy E, Servely JL, et al. Expression of the growth hormone gene in ovine placenta: detection and cellular localization of the protein [J]. *Endocrinology*, 1996, 137: 4886-4892.
- [17] Spencer TE, Gray A, Johnson GA, et al. Effects of recombinant ovine interferon tau, placental lactogen, and growth hormone on the ovine uterus[J]. *Biol Reprod*, 1999, 61:1409-1418.

## Signal System for Recognition and Establishment of Pregnancy in Sheep

JU Xiang-hong<sup>1</sup>, YONG Yan-hong<sup>1</sup>, YU Si-jiu<sup>2</sup>

(1. *Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088*; 2. *Animal Medical Science College, Gansu Agricultural University, Lan Zhou 730070*)

**Abstract:** Establishment and maintenance of pregnancy results from signaling by the conceptus and progesterone produced by the corpus luteum. In ruminants, hormones from the trophoblast are antiluteolytic in that they act on the endometrium to prevent uterine release of luteolytic prostaglandin F<sub>2</sub> alpha. In cyclic sheep, progesterone autoregulate negatively the expression of the progesterone receptor gene in the endometrial luminal and superficial glandular epithelium. And loss of the PR is closely followed by increases in epithelial estrogen receptors and then oxytocin receptors, allowing oxytocin to induce uterine release of luteolytic PGF. In pregnant sheep, the conceptus trophoblast produces interferon tau that acts on the endometrium to inhibit transcription of the ER alpha gene directly and the OTR gene indirectly to cancel development of the endometrial luteolytic mechanism. Progesterone, IFN tau, placental lactogen and growth hormone comprise a hormonal regulation system that regulates endometrial gland morphogenesis and terminal differentiated function to maintain pregnancy in sheep. This review summarizes current information of conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy in sheep.

**Key words:** sheep; pregnancy recognition; pregnancy establishment; signal System

# 热应激对巴马香猪免疫和生化指标的影响

巨向红\*, 雍艳红, 何健嫦, 邓妃才

(广东海洋大学动物医学系, 广东湛江 524088)

**摘要:**为了探讨热应激诱发动物免疫损伤的可能机理,本研究观测了热应激对巴马香猪行为、基线免疫和血液生化指标的影响。对巴马香猪的行为观察发现热应激使其饮欲增强、活动量增大和打斗增多。结果表明:热应激使巴马香猪红、白细胞数量显著升高( $P < 0.05$ ),嗜中性粒细胞百分率下降,嗜酸性和嗜碱性粒百分率上升,单核细胞百分率升高( $P < 0.05$ )。热应激对巴马香猪血浆超氧化物歧化酶(SOD)、总胆固醇(TC)和白蛋白(ALB)的影响不大。血尿素氮(BUN)呈下降趋势,但差异不显著;肌酸激酶(CK)升高( $P < 0.05$ ),乳酸脱氢酶(LDH)含量下降。葡萄糖(GLU)则在早期低于对照组,而后期高于对照组( $P < 0.05$ ),说明热应激引起巴马香猪代谢和内分泌紊乱。

**关键词:**基线免疫;生化指标;巴马香猪

中图分类号:S828.1

文献标识码:A

文章编号:0258-7033(2009)13-0051-04

应激是动物在受到应激源刺激时所表现的一种非特异性的全身性应答反应,包括行为、神经内分泌、代谢和免疫等各种生理功能的剧烈变化<sup>[1]</sup>。由于应激极易诱发各种典型或非典型性传染病的流行,特别使一些免疫抑制疾病发病率和死亡率增加,因此危害巨大。据 St- Pierre 等<sup>[2]</sup>报道,每年由于环境因素或管理因素而发生的应激反应给畜牧业造成的经济损失至少达几十亿美元。就热应激而言,在没有任何防暑措施的情况下,每年的经济损失可达 24 亿美元。因此,重新审视动物应激状态下免疫系统功能的改变及对疾病的敏感性增加这一突出问题变得越来越重要。

近年来,国内外学者对热应激诱发动物免疫损伤的发生机理展开了大量的研究,但报道的结果却很不一致,主要是动物品种、环境及社群关系的差异所致<sup>[3]</sup>。巴马香猪是我国特有的小型猪种,由于长年近交繁殖,其遗传稳定性较高,已被大量地应用于医学实验动物模型。为了系统研究热应激诱发动物免疫损伤发生的机理,本研究以巴马香猪为实验动物,系统研究了热应激处理后不同时间基线免疫和生理生化指标的变化,这不仅有助于了解热应激诱发免疫损伤的发生机理,而且为夏季动物热应激防治提

供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 20 头 3~4 月龄巴马香猪随机分为实验组(10 头)和对照组(10 头),公、母各半。对照组饲养于常温条件下,实验组饲养于人工气候温室中( $35 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ 。24 h 不间断供热。受试猪每日饲喂 3 次,早、中、晚各 1 次。饲养标准参照其他猪种。除环境温度不同外,其他饲养条件对照组与处理组一致。

1.2 样品采集 分别在处理后的第 1、7、14、21 天前腔静脉采血 15 mL 左右,肝素钠抗凝。部分全血经稀释后进行红、白细胞计数及分类计数,其余血样离心分离血浆进行生化指标测定。

1.3 基线免疫指标测定 用显微镜平板计数法计算红细胞(RBC)、白细胞(WBC)的数目;采用血涂片法进行白细胞的分类计数,分别计算中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞及单核细胞的百分率。

1.4 血液生化指标测定 取血浆测定葡萄糖(GLU-葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法),总胆固醇(TC-CHOD-PAP 法),甘油三酯(TG-GPO-PAP 法),总蛋白(TP-考马斯亮兰法),血尿素氮(BUN-二乙酰-肟比色法),白蛋白(ALB-溴甲酚绿比色法),碱性磷酸酶(AKP-酶法),超氧化物歧化酶(SOD-羟胺法),肌酸激酶(CK-酶法),乳酸脱氢酶(LDH-酶法),所用试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

收稿日期:2008-11-25;修回日期:2009-04-29

基金项目:广东海洋大学博士启动金(0712107)

作者简介:巨向红(1977-),男,涪川县人,讲师,博士

\* 通讯作者

1.5 统计分析 采用 SPSS11.0 和 Excel 软件处理, 同组内应激不同时间免疫指标和生化指标的比较用 *t* 检验进行差异显著性分析, 试验结果用平均值±标准差表示。

## 2 结果

2.1 热应激对巴马香猪行为的影响 巴马香猪在热应激的早期表现为活动增强, 性格暴躁, 喜欢打斗, 伸张躯体, 并喜睡湿地或滚卧粪尿。喜欢饮水, 呼吸急促甚至发生喘息等异常行为。而在后期, 表现为精神沉郁, 活动量减少。

2.2 热应激对巴马香猪基线免疫指标的影响 由表 1 可知, 热应激后第 1 天和第 7 天巴马香猪红细胞数高于对照组, 且第 7 天差异显著 ( $P < 0.05$ )。白细胞数在应激后显著升高, 而对照组呈波动状态。嗜中性粒细胞亦呈缓慢上升态势, 但处理组均值小于对照组, 且在第 21 天与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ )。嗜酸性粒细胞在第 1 天和第 7 天时高于对照组, 且第 1 天差异显著 ( $P < 0.05$ )。嗜碱性粒细胞随应激的进行而升高, 在第 14 天达峰值。且处理组大于对照组。单核细胞在第 1、7 天和第 14 天高于对照组, 并呈上升趋势, 且第 1 天与对照组差异显著 ( $P < 0.01$ )。

2.3 热应激对巴马香猪血液生化指标的影响 由表 2 可知, SOD 值在处理组变化不大, 但对照组有较大波动。其中第 7 天对照组高于处理组, 且差异显著 ( $P < 0.05$ )。AKP 在处理组均高于对照组, 且在第 1 天差异显著。TC 和 ALB 无明显变化。TG 在应激后的第 1 天高于对照组, 其余各天均低于对照组。BUN 在处理后的第 1 天和第 7 天维持在较高水平, 第 14

天和第 21 天降低, 但与对照组相比差异不显著。血浆中 GLU 在热应激处理后逐渐升高, 第 21 天与对照组相比差异极显著 ( $P < 0.01$ )。血浆 CK 在热应激处理后第 1 天和第 7 天有升高趋势, 并高于对照组。而在第 14 天和 21 天与对照组基本一致。血浆 LDH 在热应激处理后不同时间均低于对照组, 且在第 21 天与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论和结论

3.1 热应激对免疫指标的影响 红细胞具有免疫和参与机体免疫调节的功能, 其含有许多与免疫有关的物质, 如 型补体受体 (CR1)、淋巴细胞相关抗原-3 (LFA-3)、C3b 灭活因子、超氧歧化酶 (SOD) 等<sup>[4]</sup>。在本试验中, 巴马香猪红细胞数量呈先升后降的趋势。这可能是在应激初期, 机体对热环境做出的适应性反应, 而随着巴马香猪对热环境的逐渐适应, 红细胞数逐渐恢复正常。白细胞是主要免疫细胞之一, 其数量影响动物免疫能力。在本试验中, 巴马香猪白细胞呈逐渐上升趋势, 这可能与环境温度升高使体内炎症过程加强有关。

在本试验中, 除嗜中性粒细胞低于对照组外, 嗜酸性和嗜碱性粒细胞呈先升后降的趋势, 这种免疫细胞数量的下降是否是热应激动物免疫抵抗力下降的标志还需要进一步研究。单核细胞数在热应激后第 1 天的发生明显变化, 而在第 21 天时接近于第 0 天时的水平。可见各种免疫细胞的变化规律并不相同, 这与 Sutherland 等<sup>[5]</sup>最近的报道一致。他研究了慢性热应激和社群关系对不同品种猪生理和性能指标的影响, 发现不同品种猪的淋巴细胞分类计数结果不同, 但对同一动物, 某一指标的变化与其他的指

表 1 热应激不同时间巴马香猪红、白细胞数量和淋巴细胞分类计数

免疫指标	第 1 天		第 7 天		第 14 天		第 21 天	
	对照组	处理组	对照组	处理组	对照组	处理组	对照组	处理组
红细胞/( $10^{12} \cdot L^{-1}$ )	11.4±1.05	10.93±1.26	11.5±2.33 <sup>a</sup>	7.21±0.75 <sup>b</sup>	6.27±0.37	8.54±0.55	9.06±0.76	7.81±0.70 <sup>c</sup>
白细胞/( $10^9 \cdot L$ )	14.86±2.00	14.55±1.57	26.75±3.46 <sup>a</sup>	21.87±3.05 <sup>b</sup>	17.89±4.15	23.58±1.24 <sup>b</sup>	24.28±2.00	26.07±1.83 <sup>b</sup>
中性粒细胞/%	26.20±7.51	21.20±1.57	25.00±6.18	23.86±1.95	28.60±3.04	28.33±2.44	41.00±2.63 <sup>a</sup>	33.87±1.64
嗜酸性粒细胞/%	0.20±0.20 <sup>a</sup>	5.27±0.87	3.20±1.02	5.07±0.79	9.20±1.16	8.20±0.75	0.40±0.24	0.47±0.17
嗜碱性粒细胞/%	1.78±0.46	2.20±0.30	3.40±0.51	6.71±0.97 <sup>b</sup>	7.20±1.16	7.93±1.22 <sup>b</sup>	1.00±0.32	1.47±0.29
淋巴细胞/%	73.20±7.55	68.20±2.00	64.80±6.71	59.29±2.69 <sup>b</sup>	51.00±2.83	50.53±3.20 <sup>b</sup>	56.00±2.77	62.67±1.62
单核细胞/%	0.40±0.24 <sup>a</sup>	3.33±0.69	3.60±0.75	5.00±1.20	3.80±0.58	5.40±0.67	1.60±0.51	1.53±0.29

注: 表中同行数据肩标不同小写字母者表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下表同

表2 热应激不同时间巴马香猪血浆生化指标的变化

生化指标	第1天		第7天		第14天		第21天	
	对照组	处理组	对照组	处理组	对照组	处理组	对照组	处理组
超氧化物歧化酶/(U·mL <sup>-1</sup> )	126.53±8.21	132.54±4.65	143.26±9.19	129.72±6.81 <sup>a</sup>	124.97±18.05	130.73±7.07	133.25±12.51	128.54±8.32
碱性磷酸酶/(kU·100mL)	23.12±7.75	43.28±20.67 <sup>a</sup>	66.61±9.94	76.97±32.42	6.40±1.12	8.03±3.98	24.73±4.74	29.01±11.32
总胆固醇/(mmol·L <sup>-1</sup> )	2.10±0.17	2.00±0.87	2.05±0.13	2.00±0.60	3.15±2.00	3.20±1.21	2.15±0.80	2.50±0.67
甘油三酯/(mmol·L <sup>-1</sup> )	0.32±0.06	0.36±0.05	0.17±0.09	0.15±0.31	0.16±0.24	0.14±0.27	0.27±0.11	0.23±0.14
白蛋白/(g·L <sup>-1</sup> )	37.35±4.31	36.25±2.99	38.04±13.68	33.96±2.96	38.63±1.18	31.84±5.75	39.01±5.53	42.75±5.78
总蛋白/(g·L <sup>-1</sup> )	56.2±1.98	66.6±3.19	69.40±2.15	72.30±2.85	74.90±1.64	74.22±2.08	82.20±2.72	81.92±1.46
血尿素氮/(mmol·L <sup>-1</sup> )	3.21±0.29	4.13±0.97	3.19±0.86	4.08±2.20	3.34±0.82	3.14±0.29	2.69±0.73	2.56±0.34
葡萄糖/(mmol·L <sup>-1</sup> )	1.71±0.59	1.59±1.174	3.48±0.463	253±0.23	3.49±0.76	3.95±0.45	2.31±0.53	4.95±0.74 <sup>a</sup>
肌酸激酶/(U·mL <sup>-1</sup> )	456.00±128.12	503.00±185.44	783.00±394.00	967.00±87.72 <sup>b</sup>	500.00±421.00	543.00±494.00	652.00±246.00	698.00±163.00
乳酸脱氢酶/(U·L <sup>-1</sup> )	378.10±68.65	321.90±29.05	395.43±40.85	360.58±60.30	337.48±24.55	318.34±32.90	344.39±40.29	268.97±27.39 <sup>a</sup>

标之间无相关性。

3.2 热应激对血液生化指标的影响 酶是机体进行新陈代谢的催化剂,对动物体内的多种化学反应起重要作用。一般认为,只要一种酶在体内的活性低于或高于正常水平,将会引起机体的新陈代谢障碍。肌酸激酶(CK)是一种器官特异性酶,在骨骼肌中含量最高。在牛、羊和鸡研究均发现,动物热应激时由于肌肉能量供应不足,导致肌肉中的CK逸出,使血浆中的CK浓度增加<sup>[6,7]</sup>。在本试验中,CK值在第1天先上升,但在第7~21天下降,这与韩博等<sup>[8]</sup>报道结果不一致。该作者发现运输应激后CK值显著上升,这可能与检测的区间不同有关。在热应激后期,动物对环境逐渐适应,CK则恢复到正常水平。乳酸脱氢酶(LDH)在糖的分解代谢和异生过程中起着重要的作用;当LDH活性降低时,机体的能量代谢活动也随之降低。本研究发现巴马香猪血浆LDH在热应激处理后不同时间均低于对照组,且差异显著( $P < 0.05$ ),说明热应激使巴马香猪的能量代谢活动降低。碱性磷酸酶(AKP)活性的高低与肌肉ATP的分解程度有关,活性高,则分解增加,反之亦然。本试验中AKP的变化趋势提示,机体在热应激早期分解ATP增多,而随着处理时间的延长则减少,但均高于对照组。这与魏学良等<sup>[9]</sup>在奶牛上的研究结果一致。

在正常生理情况下,体内自由基产生和清除处于动态平衡状态,当动物受到热应激时,会使得自由基的产生急剧增加,而自由基清除体系的能力不足,造成体内自由基蓄积,导致动物的组织氧化受损。

林海等<sup>[10]</sup>的研究结果表明,肝脏SOD活性的变化与脂质过氧化物(LPO)含量存在负相关关系。短期高温热应激(32℃,24h)处理使血浆和肝脏中的LPO含量显著升高,对肝及肾组织中的SOD活性无显著影响,但随着处理时间延长(5h×24h),肝脏SOD酶活性升高,血浆和肝组织中LPO恢复至正常水平。这与本研究的结果一致。巴马香猪在热应激后第1天,血浆SOD值与对照组无明显差异。但在应激后的第7天,显著低于对照组。

热应激能引起血糖、蛋白质和脂肪的含量发生变化。在本研究中,巴马香猪血浆葡萄糖(GLU)在热应激处理后逐渐升高,第21天与对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ )。刘凤华等<sup>[11]</sup>也发现,仔鸡血液GLU水平在急性热应激中不断上升。38℃时葡萄糖水平比常温下增加了13.93%,40℃时葡萄糖增加了17.27%。在山羊的研究表明,热应激时血糖浓度在15、60、180min后分别上升2.68%、7.63%、10.59%<sup>[12]</sup>。但周杰等<sup>[13]</sup>对22~24日龄肉仔鸡给予(34.5±1.5)℃高温处理,血糖含量无明显变化,若给予更高温处理时血糖浓度下降极显著。刘铀等<sup>[14]</sup>报道,热应激状态下的鸡血糖保持稳定。这些研究结果的差异可能与热应激作用强度、持续时间及检测时间的不同而异。

热应激对巴马香猪血液总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)和血尿素氮(BUN)的影响不明显。这与伍晓雄等<sup>[12]</sup>在山羊上的研究结果一致。山羊处于人工设置的热环境(24.5~26.5℃)中,分别在15、60、80min测定,结果显示总蛋白、清蛋白、尿素氮在热应激前后变化差异不显著。对巴马香猪血脂的检测发现,热

应激对总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)的影响不大。这与对其他动物的研究结果不一致。何世山等<sup>[15]</sup>研究发现,在日温 26~35℃和 28~38℃ 2个阶段的模拟持续高温环境下饲养 34~49日龄的 AA肉鸡,血液 TG含量明显下降。李绍钰等<sup>[7]</sup>的研究表明,肉用仔鸡在热应激状态下血液 TG水平显著下降,而 TC含量无显著下降。动物血脂含量下降的主要原因是由于高温使其采食量下降,营养摄入不足,必然动用脂肪储备加速分解代谢以提供足够能力供应,导致血脂含量下降。本研究发现,尽管热应激能使巴马香猪行为发生某些异常,但对采食量影响不大。这可能是巴马香猪对热环境耐受性较高的表现,也是血脂含量变化不大的原因之一。

参考文献:

- [1] 吴永魁,胡仲明. 动物应激医学及应激的分子调控机制[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(5): 557-560.
- [2] St-Pierre N R, Cobanov B, Schmitkey G. Economic losses from heat stress by US livestock industries[J]. J Dairy Sci, 2003, 86: E52.
- [3] Salak-Johnson L, Mcglone J J. Making sense of apparently conflicting data: Stress and immunity in swine and cattle[J]. J Anim Sci, 2007, 85: E81-E88.
- [4] 陈龙,毛鑫智. 血细胞免疫研究进展[J]. 国外畜牧科技, 1999, 26(4): 33-36.
- [5] Sutherland M A, Niekamp S R, Rodriguez S L, et al. Impacts of chronic stress and social status on various physiological and performance measures in pigs of different breeds [J]. J Anim Sci, 2006, 84: 588-596.
- [6] 樊华,樊丽,王峰,等. 热应激对泌乳奶牛血液生化指标的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(4): 45-47.
- [7] 李绍钰,张敏红,张子仪,等. 热应激对肉用仔鸡生产性能及生理生化指标的影响[J]. 华北农学报, 2000, 15(3): 140-144.
- [8] 韩博,高得仪,王清兰. 复方氯化钠散防治仔猪高气温运输应激的机理研究[J]. 畜牧兽医学报, 1995, 26(3): 261-267.
- [9] 魏学良,张家骅,王豪举,等. 高温环境对奶牛生理活动及生产性能的影响[J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 13-15.
- [10] 林海,杜荣. 热应激对肉鸡组织过氧化状态的影响[J]. 动物营养学报, 2001, 13(2): 30-32.
- [11] 刘凤华,吴国娟,王占贺,等. 热应激中仔鸡血液生化指标及T细胞变化规律[J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(6): 11-13.
- [12] 伍晓雄,张雄民,赵京扬,等. 热应激对山羊生理生化指标的影响[J]. 家畜生态, 2000, 21(3): 7-9.
- [13] 周杰,骆先虎,檀其梅. 高温对肉用仔鸡生产性能和某些血清生化指标的影响[J]. 畜牧与兽医, 1997, 19(2): 57-59.
- [14] 刘铀,林红英,罗东君,等. 热应激对肉鸡血液生化指标及内分泌机能的影响[J]. 湛江海洋大学学报, 1999, 19(1): 61-64.
- [15] 何世山,金小军. 高温对肉鸡血液生化指标的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2003, 29(3): 311-314.

## Effect of Heat Stress on Baseline Immune and Blood Biochemical Index in Ba-Ma Miniature Pig

JU XIANG-hong, YONG Yan-hong, HE Jian-chang, DENG Fei-cai

(Department of Veterinary Medicine, Guangdong Ocean University, Guangdong Zhanjiang 524088, China)

**Abstract:** In order to explore the reasons of animal immune injury induced by heat stress, 20 Bama miniature pigs were used to investigate the change of baseline immune and blood plasma biochemical indexes after treating by heat stress 1,7,14 and 21 day. The results showed that there. the total red blood cell, white blood cell and the percentage of monocytes were increased dramatically ( $P < 0.05$ ), while the percentage of neutrophils was decreased. however, the basophils and Eosinophils had no significant difference compared to control. The change of blood plasma biochemical indexes changed as following, the lactate dehydrogenase was decreased dramatically. On the contrary, the creatine kinase was increased significantly. The characteristic of glucose change in the blood plasma showed lower concentration in the forepart and higher concentration in the end of heat stress. Furthermore, the superoxide dismutase, total cholesterol and albumin no significant difference compared to control. We can concluded that the heat stress influenced the baseline immune indexes and blood biochemical indexes drastically, and the turbulence of endocrine may play an important role in the immune injury in the Bama miniature pig.

**Key words:** baseline immune; biochemical index ;Bama miniature pig

# 天祝白牦牛胚胎移植实验研究

余四九\* 巨向红 王立斌 樊江峰

(甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

**摘要** 选用健康成年天祝母白牦牛(*Poephagus grunniens*)(供体)10 头、黑牦牛(受体)37 头进行实验. 供体牛(组 1)用 CIDR-B+FSH + PG 进行同期发情和超数排卵; 受体牛(组 2 和组 3)分别采用 CIDR-B+PG 和单次注射 PG 法进行同期发情. 结果表明, 平均黄体数、卵泡数、可移植胚胎数和退化胚胎数分别为  $4.75 \pm 2.19$ ,  $1.13 \pm 0.83$ ,  $2.50 \pm 1.31$  和  $1.38 \pm 0.92$ . 在 3 组中, 组 1 的同期发情率最高, 为 80%, 组 2 和 3 分别为 60%和 45.5%. 处理后不同组别的发情开始时间不同, 组 1 的大部分白牦牛在处理结束后的 25~75 h 发情, 而组 2 和 3 的受体黑牦牛分别在 73~96 和 49~72 h 发情. 平均胚胎回收率 55.6%. 共收集 18 枚可用胚胎, 将其中 12 枚移植到 10 头同期发情的受体牦牛, 最终妊娠率 50%, 分娩率 40%.

**关键词** 天祝白牦牛(*Poephagus grunniens*) 超数排卵 同期发情 胚胎移植

天祝白牦牛(*Poephagus grunniens*)是分布在甘肃省天祝县境内、海拔 3000 m 以上的高寒草原上的牦牛地方品种, 是经过长期自然选择和人工选育而形成的特有畜种. 在世界任何地方的牦牛群体中, 白色个体的比例都不超过 5%, 而且遗传并不稳定, 唯独在天祝县分布着遗传性能稳定、白色比例高达 44% 的白牦牛. 它是世界稀有而珍贵的牦牛种质资源, 已被列入《中国畜禽品种志》. 1992 年世界《生物多样性公约》签署以来, 保护天祝白牦牛已成为保护家畜多样性的主要内容之一. 然而, 由于天祝白牦牛的繁殖力低下及现代繁殖技术运用的相对匮乏, 加之黑牦牛对其的遗传污染, 纯种的天祝白牦牛数量日益下降. 保护天祝白牦牛的种质资源刻不容缓.

总体来看, 牦牛的繁殖生理特性与其他牛基本相似<sup>[1,2]</sup>, 但大多数牦牛为两年一胎, 平均一生能生产 4~5 头牛犊<sup>[3]</sup>. 与黄牛或奶牛相比, 牦牛卵巢卵泡和黄体都较小, 这给直肠检查带来了一定的不便<sup>[1,2]</sup>. 另外, 牦牛的性成熟晚、安静发情率高、妊娠率低及

产后乏情时间长, 这些都严重影响了现代繁殖技术在牦牛上的运用和牦牛产业的进一步发展. 尽管有些学者研究报道了牦牛的同期发情及超数排卵特性<sup>[4,5]</sup>, 但迄今为止, 尚没有牦牛胚胎移植成功的先例. 为了验证胚胎移植技术在牦牛上的可行性, 进而探索天祝白牦牛的有效保护措施, 我们系统研究了超数排卵、同期发情及胚胎移植技术在天祝白牦牛的运用效果; 并利用黑牦牛为受体, 将白牦牛胚胎移植给黑牦牛, 取得了成功, 为白牦牛的快速扩繁提供了有效方法.

## 1 材料和方法

### 1.1 试验地及实验动物

实验选用天祝白牦牛育种场健康成年天祝白牦牛 10 头为供体牛, 选用黑牦牛 37 头作为受体牛. 所选牦牛平均年龄 6~8 岁, 平均体重( $141.15 \pm 39.74$ ) kg. 天祝白牦牛育种场位于东经  $102^{\circ}01'$ , 北纬  $36^{\circ}30'$ , 海拔 2900 m. 前 30 年, 平均气温为  $-1 \sim 3$ , 年降雨

收稿日期: 2006-12-26; 接受日期: 2007-01-15

甘肃省农业生物技术研究及应用开发项目(GNSW-2004-07)和甘肃省攻关项目(2GS042-A41-001-05)资助

\* 联系人, E-mail: sjyu@163.com

量 265~632 mm. 实验时间为 2004 年 6~9 月.

## 1.2 同期发情和超数排卵

组 1 的牦牛(供体)在发情周期的任一天放置阴道孕酮栓(CIDR-B, 1.9 g 孕酮, InterAg, Hamilton, 新西兰), 记为第 0 天. 第 5 天开始减量注射促卵泡素(FSH, 中国科学院动物研究所), 每天 2 次, 共 8 次, 总量为 10 mg. 第 7 到第 8 天另外注射 PG(氯前列烯醇, 宁波激素制造厂)2 次, 每次 5 mg. 第 8 天下午撤栓. 受体牛分为 2 组进行实验, 10 头采用 CIDR-B+氯前列烯醇法(组 2), 除不注射 FSH 外, 程序与组 1 相同. 27 头采用 PG 单次注射法(组 3), 直肠检查后, 确认卵巢有黄体的牦牛注射 PG 4 mg.

## 1.3 发情观察和人工授精

将佩戴试情布的成年公牛(试情牛)与实验牛群合群饲养. 每天跟群观察母牦牛的发情情况. 如果发现其被公牛跟随并爬跨, 则认为该母牦牛发情. 供体牦牛采用人工授精技术, 与发情的当天下午和第 2 天早晨两次人工授精. 天祝白牦牛冻存精液由天祝白牦牛场提供.

## 1.4 胚胎回收

人工授精后的第 7 或第 8 天, 用非手术法回收胚胎. 冲胚前仔细检查卵巢的黄体数并记录. 冲胚液(mPBS)自制, 置于 37℃ 水浴锅中待用. 冲胚管、集卵杯等冲胚器械均购自日本. 供体牛保定后, 首先肌肉注射 2% 静松林 0.5 mL, 然后在第一、二尾椎骨间用 2% 普鲁卡因 2~3 mL 作硬膜外麻醉. 左手在直肠把握子宫, 右手将冲胚管经子宫颈放入一侧子宫角的合适部位后给气球充气 15~20 mL. 接通冲胚管和集卵杯, 集卵杯放入保温瓶中(37℃). 冲胚管固定后抽出钢芯, 开始灌流. 每次进液大约 30~50 mL, 反复冲 8~10 次, 每侧总进液量为 500 mL. 冲完一侧后再冲另一侧. 全部冲完后, 供体牛注射 PG 4 mg, 以溶解黄体使其进入发情周期.

## 1.5 胚胎移植

冲胚结束后, 迅速将集卵杯拿回实验室, 用 20 mL 注射器反复冲洗滤网, 然后在体视显微镜下检胚. 检出的胚胎在 mPBS 中冲洗 2~3 遍后移入洁净的培养皿中. 胚胎吸入 0.25 mL 细管后, 将细管装入有外膜的胚胎移植枪. 与供体牛同期发情的受体牛保定后, 肌肉注射 2% 静松林 0.5 mL, 然后在第一、二尾椎骨间用 2% 普鲁卡因 2~3 mL 作硬膜外麻醉. 胚胎移植到受体黄体侧子宫角远端.

## 1.6 统计分析

同期发情率为发情牦牛数量除以处理的总牦牛数量, 受胎率为妊娠牛数量除以胚胎移植的受体牛总数, 黄体数或卵泡数为所有供体牛左右卵巢冲胚当天黄体数或卵泡数总和除以供体牛总数, 胚胎回收率为所得胚胎数除以黄体数. 所有数据进行 *t* 检验.

## 2 实验结果

### 2.1 同期发情效果

在撤栓或 PG 注射后 5 天之内发情的牦牛均认为是处理的结果. 如表 1 和图 1 所示, 同期发情率在组 1 最高, 为 80%; 组 2 和组 3 较低, 分别为 60% 和 44.5%. 组 1 供体牛大多数于处理后的第 25~72 h 发情, 组 2 主要集中在 73~96 h, 而组 3 则主要在 49~72 h 内. 表明不同的处理方法对牦牛的同期发情效果不同, 发情集中时间也不同.

### 2.2 超数排卵效果和胚胎回收

超排效果和胚胎回收如表 2 和图 2 所示. 黄体数、卵泡数、可用胚胎数和退化胚胎数的平均值分别为  $4.75 \pm 2.19$ ,  $1.13 \pm 0.83$ ,  $2.50 \pm 1.31$  和  $1.38 \pm 0.92$ . 但超数排卵效果个体差异较大, 最高黄体数为 8 个, 最低为 1 个; 回收胚胎数最高为 7 个, 但胚胎的平均回收率较低, 仅为 55.6%.

表 1 不同处理方法诱导的牦牛同期发情率与发情集中的时间

组别	样本数	不同组的发情集中时间/h					发情率/%
		0~24	25~48	49~72	73~96	97~120	
组 1	10	1	3	3	0	1	80
组 2	10	0	1	1	3	1	60
组 3	27	0	1	10	1	0	44.5

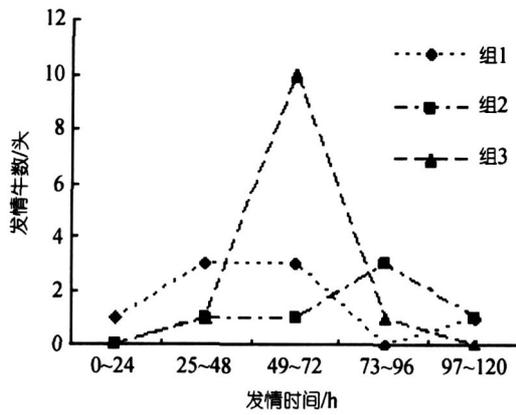


图 1 各组牦牛的发情集中时间分布图

表 2 供体牛的超排效果(平均值 ± 标准差)

样本数	黄体数	卵泡数	正常胚胎数	退化胚胎数	
供体牛	10	4.75 ± 2.19	1.13 ± 0.83	2.50 ± 1.13	1.38 ± 0.92

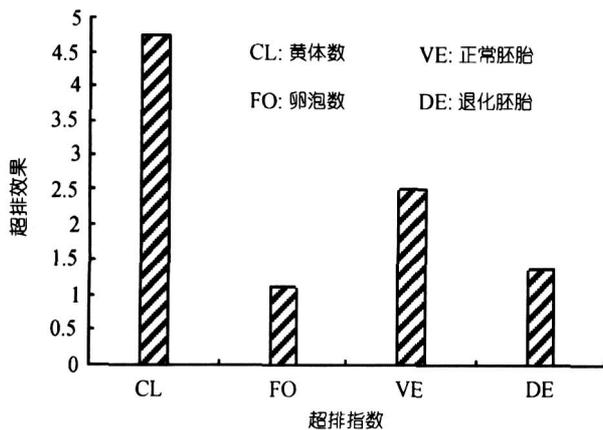


图 2 供体牦牛的超数排卵效果图

### 2.3 胚胎移植

天祝白牦牛早期胚胎的发育与黄牛和奶牛类似。受精后第 7 天所得胚胎大多数为桑葚胚, 而第 8 天回收的胚胎大多为囊胚(图 3)。共获得可用胚胎 18 枚, 将其中 12 枚胚胎移植到了 12 头受体牦牛上, 两个月后妊娠检查发现有 5 头受体牦牛妊娠, 其中一头因为管理问题摔死。最终有 4 头牛成功产犊(图 4), 妊娠率 50%, 产犊率 40%。

### 3 讨论

促性腺激素被广泛用于哺乳动物的诱导发情。无论是促卵泡素(FSH), 还是马绒毛膜促性腺激素(equine chorionic gonadotropin, eCG)都能刺激动物卵巢卵泡的生长发育。帅蔚文等人<sup>[6]</sup>用“三合激素”

(含有孕酮、雌激素和睾酮)诱导牦牛发情, 配种后受胎率为 30.9%。据报道, 发情季节不泌乳母牦牛注射促性腺激素释放激素(GnRH)后的发情率明显高于对照组<sup>[7]</sup>。这些研究结果表明, 促性腺激素类似物对牦牛能产生类似于黄牛的效果。然而, 胚胎移植的成功要求供体和受体同步发情, 这样妊娠率最高, 并且消除了冷冻保存对胚胎的损失。Andrade 等人<sup>[8]</sup>进行了 Nelore 肉牛的超数排卵和胚胎回收研究, 实验牛在发情周期的不同阶段阴道埋植孕酮栓(CIDR-B), 注射甾类激素进行超数排卵, 冲胚后直接移植受体牛, 发现埋栓时 Nelore 肉牛所处的发情时期并不影响实验结果。由于牦牛属自然放牧动物, 应激性较强, 每次保定都可能产生强烈的应激反应。为了简化牦牛的胚胎移植过程, 本研究运用 CIDR-B+FSH+PG 法, 在牦牛发情周期的任意一天进行处理。

Davaa 等人<sup>[4]</sup>用 FSH, PMSG(孕马血清促性腺激素)和前列腺素进行了牦牛的超数排卵和同期发情实验, 在前列腺素注射后的(34.1 ± 0.52) h 后出现发情症状。另外, 权凯<sup>[5]</sup>使用氯前列烯醇两次注射法诱导牦牛同期发情, 大部分牦牛在第二次注射后的 25~48 h 之间发情, 发情率为 58.8%。在本实验中, 组 1 的牦牛在处理结束后的 48~72 h 发情, 而组 2 的牦牛则在 72 h 后出现发情, 说明处理方法的不同对同期发情的效果及发情集中时间均有较大的影响。

另外, 在 Davaa 等人<sup>[4]</sup>的实验中, 卵巢的平均卵泡数为 5.4 ± 0.65, 而平均排卵数为 4.5 ± 0.43(左右卵巢的平均排卵数分别为 1.9 ± 0.20 和 2.6 ± 0.30)。Zagdsuren 等人<sup>[9]</sup>也报道了牦牛的超数排卵实验, 他们选用了 3 头 4~8 岁的牦牛进行实验, 牦牛阴道埋植 CIDR-B12 天后注射 FSH(第 0 天), 第 3 天注射 PGF<sub>2a</sub>, 最后一次 FSH 注射后的 24 和 36 h 进行人工授精, 结果平均黄体数和平均卵泡数分别为 5.0 ± 0.6 和 1.3 ± 0.9, 但没有报道胚胎回收率。在本实验中, 尽管有部分牦牛对促性腺激素的处理没有反应, 但其仍被统计在内。也从另一方面说明牦牛在超排处理中的个体差异性较大。

根据本实验结果, 牦牛的鲜胚移植受胎率和分娩率分别为 50%和 30%, 低于奶牛。本实验受胎率和分娩率较低的原因可能与胚胎移植的不同环节有关。进一步系统的研究探索程序化的牦牛胚胎技术, 有望提高牦牛胚胎移植的成功率。

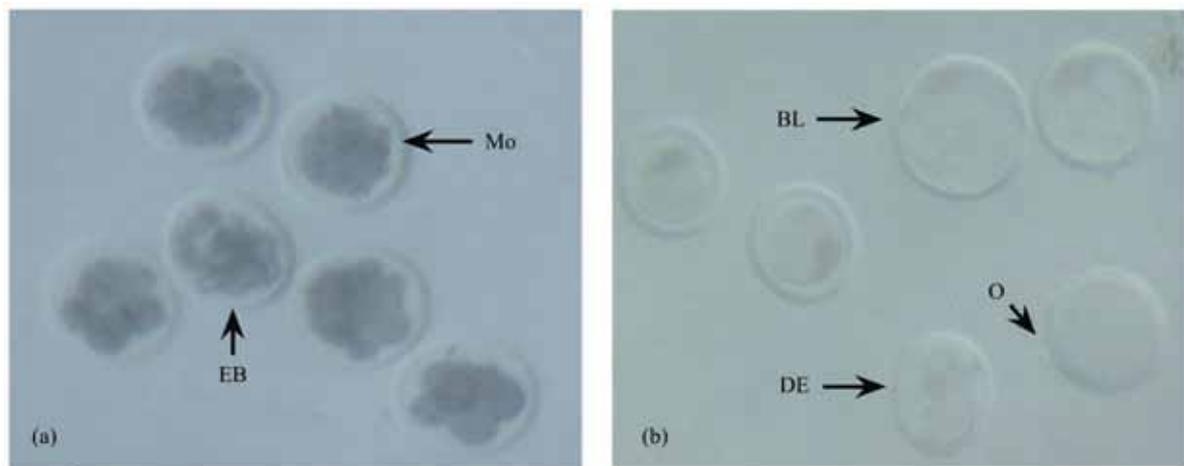


图 3

(a) 受精后 7 天的牦牛胚胎; (b) 受精后 8 天的牦牛胚胎. Mo 为桑葚胚, EB 为早期囊胚, BL 为囊胚, DE 为退化的胚胎, O 为未受精的卵母细胞



图 4 由黑牦牛所生胚胎移植白牦牛犊

阎萍等人<sup>[10]</sup>报道了高寒放牧条件下牦牛的超数排卵结果, 在处理的 12 头牦牛中, 最终有 6 头冲胚, 共得到了 20 枚胚胎. 但没有做进一步的移植实验的报道. 权凯<sup>[5]</sup>在天祝白牦牛场进行了白牦牛的胚胎移植实验, 4 头牦牛用于超数排卵. 在发情周期的第 9 天减量注射 FSH, 发情配种后第 7 天直肠检查, 发现反

应最好的一头牦牛有 13 个黄体, 但在冲胚过程中可能由于技术原因而没能冲出胚胎. 这就说明操作过程中一些技巧是牦牛胚胎移植能否成功的重要因素. 我们有 20 多年从事牦牛的繁殖生理方面的研究, 对牦牛的生殖生理特性比较熟悉, 这是本次实验能成功的重要原因.

## 参 考 文 献

- 1 Cui, Y, Yu S J. An anatomical study of the internal genital organs of the yak at different age. *The Veterinary Journal*, 1999, 157: 192—196
- 2 Cui, Y, Yu S J. Ovarian morphology and follicular systems in yaks of different ages. *The Veterinary Journal*, 1999, 157: 197—205
- 3 Yu S J, Chen B X. Traditional systems of management of yak cows in China and observations on reproductive characteristics using milk and plasma progesterone. *Strengthening Animal Reproduction Research in Asia through the Application of Immunoassay Techniques*, Vienna, 1993, 127—135
- 4 Davaa M, Altankhuag N, Zagdsuren Yo, et al. The preliminary experiment to induce superovulation in female yaks. *International Yak Newsletter*, 2000, 5: 78—80
- 5 权 凯. 牦牛超排技术的研究. 硕士论文: 甘肃农业大学, 2004
- 6 帅蔚文, 赵光前. 应用三合激素诱导牦牛同期发情试验初报. *中国牦牛*, 1985, 2: 24—27
- 7 Magash A. The use of biotechniques in yak reproduction. *Proceedings of the Second International Congress on Yak China*, 1997. 175—178
- 8 Andrade J C, Oliveira M A, Lima P F, et al. The use of steroid hormones in superovulation of Nelore donors at different stages of estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, 2003, 15: 117—125
- 9 Zagdsuren Y, Davaa M, Magash A, et al. Superovulation in female yaks. *Proceedings of the Second International Congress on Yak*, 1997. 193—194
- 10 阎 萍, 梁春年, 姚 军, 等. 高寒放牧条件下牦牛超数排卵试验. *中国草食动物*, 2003, 3: 9—10

# 天祝白牦牛血液生化指标的测定

霍生东<sup>1</sup>, 阿依木古丽<sup>1</sup>, 陈士恩<sup>1</sup>, 龙玲<sup>1</sup>, 巨向红<sup>2</sup>, 余四九<sup>3</sup>

(1. 西北民族大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030; 2. 广州海洋大学 农学院, 广州 湛江 524088; 3. 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070)

**[摘要]** 采用全自动生化分析仪, 测定天祝白牦牛生化指标, 并进行统计分析, 结果显示: TP、ALB、GLO、A/G、LDL - C 水平在雌雄天祝白牦牛之间有显著性差异( $P < 0.05$ ); GLO、A/G、GLU、Urea、CREA 水平在 7 岁和 10 岁的天祝白牦牛之间有显著性差异( $P < 0.05$ ).

**[关键词]** 天祝白牦牛; 生化指标; 测定

**[中图分类号]** Q85      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1009 - 2102(2008)03 - 0046 - 03

天祝白牦牛是我国稀有而珍贵的地方牦牛类群, 是经过长期自然选育的特有畜种. 它不仅是甘肃省宝贵的畜种资源, 也是我国乃至世界珍稀的牦牛种质资源, 享有草原“白珍珠”、祁连“雪牡丹”之美称, 已被列入国家级畜禽保护品种. 天祝白牦牛产区天祝藏族自治县, 位于甘肃省中部, 祁连山脉的东端, 青藏高原北边. 境内南部有终年积雪的马雅雪山, 东部有毛毛山, 乌鞘岭横跨中部. 天祝地势复杂, 地貌类型多样, 沟谷长深, 山系纵横交错, 海拔 2 040 ~ 4 878 m, 无霜期 90 ~ 120 d, 年均气温 - 0.2 ~ 1.3, 气候寒冷, 最低气温 - 30, 年降水量 300 ~ 416 mm<sup>[1]</sup>. 张德寿对天祝白牦牛的研究<sup>[2]</sup>(1985); 卢福山对高原牦牛的研究<sup>[3]</sup>(2006); 李鹏对甘南牦牛部分生化指标进行的研究<sup>[4]</sup>(2007); 霍生东对牦牛胚胎及胎儿发育过程的研究<sup>[5]</sup>(2006); 余四九对天祝白牦牛胚胎移植的研究<sup>[6]</sup>(2007), 给牦牛的研究注入了活力. 本研究首次采用全自动血清分析仪测定了天祝白牦牛的部分生化指标, 以期给遗传育种、疫病防治、高寒适应机理、天祝白牦牛的开发等方面提供理论依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

在天祝县屠宰场, 静脉采集待屠宰的白牦牛血液 10 mL, 带回实验室分离血清, 待测.

### 1.2 方法

血液生化指标共 11 项, 包括总蛋白(TP, g/L)、白蛋白(ALB, g/L)、球蛋白(GLO, g/L)、白球比(A/G)、葡萄糖(GLU, mmol/L)、尿素(Urea, mmol/L)、肌酐(CREA,  $\mu$ mol/L)、总胆固醇(CHO, mmol/L)、甘油三酯(TG, mmol/L)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL - C, mmol/L)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL - C, mmol/L). 血清样用 HITACHI - 7060C 全自动生化分析仪进行测定.

### 1.3 数据分析

利用 SPSS10.0 进行统计分析.

**[收稿日期]** 2008 - 08 - 10

**[基金项目]** 西北民族大学中青年科研基金(XBMU2006AD50)

**[作者简介]** 霍生东(1979 -), 男, 甘肃金塔人, 助教, 主要从事动物生殖生理学方面的教学与研究工作.

## 2 结果

将采集的血样带回实验室,高速离心分离血清,并用 HITACHI - 7060C 全自动生化分析仪进行测定. 测定结果如表 1、表 2 所示.

### 2.1 不同性别天祝白牦牛血液生化指标

统计分析结果表明 TP、ALB、GLO、A/G、LDL - C 水平在雌雄天祝白牦牛之间有显著性差异. 被检的 11 项生化指标中,其中只有 A/G、Urea、CREA 是雄性高于雌性,其他均是雌性高于雄性.

表 1 不同性别天祝白牦牛血液生化指标的比较

项目	测定值	性别	
		雄性 (n = 12)	雌性 (n = 8)
总蛋白 (TP, g/L)	51.29 ±8.21	49.42 ±7.91 <sup>a</sup>	59.70 ±0.42 <sup>a</sup>
白蛋白 (ALB, g/L)	34.90 ±3.87	34.03 ±3.72 <sup>a</sup>	38.80 ±1.27 <sup>a</sup>
球蛋白 (GLO, g/L)	16.39 ±5.14	15.39 ±5.15 <sup>a</sup>	20.90 ±1.70 <sup>a</sup>
白球比 (A/G)	2.26 ±0.61	2.34 ±0.64 <sup>a</sup>	1.86 ±0.21 <sup>a</sup>
葡萄糖 (GLU, mmol/L)	5.76 ±2.26	5.71 ±2.40	5.99 ±2.20
尿素 (Urea, mmol/L)	5.79 ±0.98	5.79 ±1.08	5.76 ±0.46
肌酐 (CREA, mmol/L)	198.63 ±32.12	198.78 ±31.36	198.00 ±49.50
总胆固醇 (CHO, mmol/L)	2.32 ±0.38	2.30 ±0.40	2.41 ±0.35
甘油三酯 (TG, mmol/L)	0.33 ±0.17	0.32 ±0.18	0.36 ±0.19
高密度脂蛋白胆固醇 (HDL - C, mmol/L)	1.26 ±0.25	1.24 ±0.25	1.31 ±0.32
低密度脂蛋白胆固醇 (LDL - C, mmol/L)	0.74 ±0.13	0.70 ±0.01 <sup>a</sup>	0.90 ±0.21 <sup>a</sup>

a: 差异显著

### 2.2 不同年龄天祝白牦牛血清生化指标

统计分析结果表明,部分血清生化指标不同年龄之间差异显著. 其中 GLO、A/G、GLU、Urea、CREA 水平在 7 岁和 10 岁的天祝白牦牛之间有显著性差异.

表 2 不同年龄天祝白牦牛血液生化指标的比较

项目	测定值	年龄	
		7 (n = 6)	10 (n = 14)
总蛋白 (TP, g/L)	51.29 ±8.21	51.73 ±7.74	50.76 ±9.63
白蛋白 (ALB, g/L)	34.90 ±3.87	34.27 ±3.60	35.67 ±4.45
球蛋白 (GLO, g/L)	16.39 ±5.14	17.47 ±5.29 <sup>a</sup>	15.1 ±5.22 <sup>a</sup>
白球比 (A/G)	2.26 ±0.61	2.10 ±0.70 <sup>a</sup>	2.44 ±0.49 <sup>a</sup>
葡萄糖 (GLU, mmol/L)	5.76 ±2.26	5.17 ±2.11 <sup>a</sup>	6.48 ±2.46 <sup>a</sup>
尿素 (Urea, mmol/L)	5.79 ±0.98	5.43 ±0.51 <sup>a</sup>	6.22 ±1.28 <sup>a</sup>
肌酐 (CREA, mmol/L)	198.63 ±32.12	188.17 ±27.13 <sup>a</sup>	211.20 ±36.02 <sup>a</sup>
总胆固醇 (CHO, mmol/L)	2.32 ±0.38	2.28 ±0.20	2.37 ±0.55
甘油三酯 (TG, mmol/L)	0.33 ±0.17	0.3 ±0.11	0.36 ±0.24
高密度脂蛋白胆固醇 (HDL - C, mmol/L)	1.26 ±0.25	1.21 ±0.22	1.31 ±0.30
低密度脂蛋白胆固醇 (LDL - C, mmol/L)	0.74 ±0.13	0.76 ±0.16	0.72 ±0.11

a. 差异显著

## 3 分析讨论

### 3.1 性别对天祝白牦牛生化指标的影响

从统计结果来看,性别对天祝白牦牛的部分生化指标有一定的影响,其中 TP、ALB、GLO、A/G、LDL - C 水平在雌雄天祝白牦牛之间有显著性差异,这与卢福山<sup>[3]</sup>对高原牦牛、李莉<sup>[7]</sup>对互助白牦牛在 TP 上的研究不相一致,产生这种情况的原因,是由于采样以及测定方法,还是种属的特异性的不同引起的,有待进一步的研究。除此以外,在被检测的 11 项血液生化指标中 TP、ALB、GLO、GLU、CHO、TG、HDL - C、LDL - C 的水平都是雌性高于雄性。本研究所测定的生化指标只是部分,其他生化指标在性别间的变化趋势还有待进一步的研究。

### 3.2 年龄对天祝白牦牛生化指标的影响

从试验结果可知,7 岁天祝白牦牛的 A/G、GLU、Urea、CREA 水平显著低于 10 岁天祝白牦牛,而 GLO 水平显著高于 10 岁天祝白牦牛,其他指标高低不一,说明不同年龄的天祝白牦牛具有复杂的生化指标。这种复杂的变化规律,正是生物体存在的基础,也是天祝白牦牛研究的迷人之处。

### 参考文献:

- [1] 张容旭. 中国的牦牛[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,1989. 75 - 82.
- [2] 张德寿,张容昶,曹建华等. 天祝白牦牛(成年母牛)的血液生理生化指标[J]. 甘肃畜牧兽医,1985,(4):8 - 9.
- [3] 卢福山,张才俊. 高原型牦牛 8 项血液指标的测定[J]. 青海畜牧兽医杂志,2006,(4):3 - 4.
- [4] 李鹏,余群力,王存堂. 对甘南牦牛血清生化指标的测定[J]. 山地农业生物学报,2007,(4):362 - 364.
- [5] 霍生东. 牦牛妊娠早期胚胎及胎儿形态发育的研究[D]. 硕士论文,甘肃农业大学,2006.
- [6] 余四九,巨向红,王立斌等. 天祝白牦牛胚胎移植实验研究[J]. 中国科学 C 辑,2007,(2):185 - 189.
- [7] 李莉,马森,沈明华,等. 青海互助白牦牛 14 项生化指标测定[J]. 青海畜牧兽医学院学报,1995,(2):22 - 24.

## Characterization of Blood Biochemical Parameters in Tianzhu white Yak

HUO Sheng - dong, Ayimuguli, CHEN Shi - en, LONG Ling, JU Xiang - hong, YU Si - jiu

(1. Life Science and Engineering College of Northwest University for Nationalities, Lanzhou Gansu 730030, China; 2. agricultural College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang Guangdong 524088, China; 3, Animal Medicine College of Gansu Agricultural University, Lanzhou Gansu 730070, China)

[ **Abstract** ] Many blood biochemical parameters of Tianzhu white yaks were measured by an automatic biochemical analyzer. Statistics data showed that TP, ALB, GLO, A/G, LDL - C were significant difference ( $P < 0.05$ ) between female and male of Tianzhu white yaks. GLO, A/G, GLU, urea, CREA were also significant difference ( $P < 0.05$ ) between 7 and 10 years old sheep.

[ **Key words** ] Tianzhu white yak; Biochemical indexes; measurement