

猪附红细胞体病免疫调节剂的筛选

刘 操¹, 王振勇¹, 杨笃宝¹, 雷留真², 高媛媛¹,
陈甜甜¹, 夏俊峰¹, 朱 辉¹

(1 山东农业大学 动物医学院, 山东 泰安 271018; 2 济宁出入境检验检疫局, 山东 济宁 272000)

【摘要】 **【目的】**探讨猪附红细胞体病对仔猪非特异性免疫功能的影响,并筛选有效的免疫调节剂作为辅助治疗药物。**【方法】**选取 20 头 40 日龄个体质量相近、无附红细胞体感染的健康仔猪,随机分为 5 组,1~3 组为试验组,4 组为阳性对照组,5 组为阴性对照组。1~4 组人工接种附红细胞体菌血 5 mL/头,5 组同时注射等量生理盐水。随后 1~3 试验组分别给予防风多糖溶液 0.1 mL/kg、黄芪多糖注射液 0.1 mL/kg 和左旋咪唑注射液 0.05 mL/kg,阴性和阳性对照组给予生理盐水各 0.1 mL/kg,连用 7 d,分别于第 0,4,7,14 天自猪前腔静脉采血,测定红细胞感染率、血清溶菌酶活力、淋巴细胞总数、血清总蛋白含量、血清球蛋白含量、血清免疫抑制酸性蛋白(IAP)含量。**【结果】**阳性对照组、防风多糖组、左旋咪唑组和黄芪多糖组的红细胞感染率分别为 62.75%,52.25%,51.25%和 40.00%。仔猪感染附红细胞体后,阳性对照组血清总蛋白含量、球蛋白含量显著降低,IAP 含量显著升高($P < 0.05$),淋巴细胞总数略有下降,血清溶菌酶活力无显著变化($P > 0.05$)。黄芪多糖、左旋咪唑能显著提高感染仔猪的血清总蛋白含量和溶菌酶活力($P < 0.05$),3 种免疫调节剂均能显著提高感染仔猪的血清球蛋白含量($P < 0.05$),降低 IAP 含量($P < 0.05$)。**【结论】**3 种免疫调节剂均能提高感染仔猪的非特异性免疫,其中以黄芪多糖的效果最好。

【关键词】 附红细胞体病;仔猪;非特异性免疫;免疫调节剂

【中图分类号】 S858.282.71

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)05-0013-04

Selection of effective immunomodulators for eperythrozoonosis

LIU Cao¹, WANG Zhen-yong¹, YANG Du-bao¹, LEI Liu-zhen², GAO Yuan-yuan¹,
CHEN Tian-tian¹, XIA Jun-feng¹, ZHU Hui¹

(1 College of Veterinary Medicine, Shandong Agriculture University, Tai'an Shandong 271018, China;

2 Jining Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Jining, Shandong 272000, China)

Abstract: **【Objective】** The experiment was conducted to study effects of eperythrozoonosis on nonspecific immunity of piglets and select effective immunomodulators. **【Method】** A total of 20 healthy piglets with similar body weight, aged 40 days, were assigned to 5 treatment groups randomly. The first 3 groups were experimental groups, the 4th positive control and the 5th negative control. Piglets of the first 4 groups were inoculated with porcine blood containing Eperythrozoon suis, and piglets of the 5th group were simultaneously treated with saline. Then, piglets of experimental groups were intramuscularly injected with Polysaccharide of Radix Sileris (PRS), Astragalus Polysaccharin (APS) and Levamisole (LMS) respectively, and piglets of controls were simultaneously treated with saline for 7 days. Blood was sampled from precaval vein on the 0th, 4th, 7th and 14th day after inoculation. Lisozyma activity, total lymphocyte count, total protein level, globulin level and immunosuppressive acid protein (IAP) level were tested. **【Result】** Positive, PRS, LMS, APS red blood cell infection was 62.75%, 52.25%, 51.25%, 40.00%. The results showed that

* [收稿日期] 2009-10-17

[基金项目] 山东省科技攻关项目(GG200730009011)

[作者简介] 刘 操(1983-),男,山东宁阳人,在读硕士,主要从事动物营养代谢病研究。E-mail:zyxuvw.2009@163.com

[通信作者] 王振勇(1966-),男,山东邹城人,副教授,博士,主要从事动物营养代谢病研究。

eperythroozoonosis infection significantly decreased total protein level and globulin level, significantly enhanced IAP level, and gently decreased total lymphocyte count of piglets of positive. But there was no significant change of lysozyme activity. APS and PRS could significantly increase total protein level and lysozyme activity, and all of the three immunomodulators could significantly increase globulin level and decrease IAP level of infectious piglets. 【Conclusion】 All the three immunomodulators could increase nonspecific immunity of piglets, and APS was the best.

Key words: eperythroozoonosis; piglet; nonspecific immunity; immunomodulator

附红细胞体病(Eperythroozoonosis)是由附红细胞体(Eperythroozoon, EH)寄生于人和动物红细胞表面、血浆及骨髓所引起的一种传染性疾病^[1-2]。附红细胞体病给我国养猪业带来了极大的损失,相继报道该病流行的省、市、自治区已有 20 多个^[3-4]。相关研究表明,猪附红细胞体能够降低机体的免疫能力^[5-6],易继发其他疾病。黄芪多糖、左旋咪唑具有广泛的非特异性免疫和细胞、体液免疫增强作用^[7-11];防风多糖的免疫增强作用也被许多报道证实^[12-13]。为了探索黄芪多糖、防风多糖和左旋咪唑 3 种免疫调节剂对附红细胞体病所致的免疫抑制的调节作用,本研究采用人工接种方法使仔猪感染附红细胞体后,用上述 3 种免疫调节剂进行辅助治疗,比较其治疗效果,以期对附红细胞体病的综合治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病原体 从山东农业大学动物保健医院送诊的病例中采集抗凝血,经山东农业大学动物保健医院检测(常规涂片检查,PCR 检测),确定为附红细胞体感染阳性血样,选择红细胞感染率在 90% 以上的血样作为附红细胞体菌血,于 4℃ 冰箱内保存备用。

1.1.2 试验动物 从山东省某猪场购买 20 头 40 日龄大白猪,经实验室检查,附红细胞体阴性,并进行 7 d 的饲养观察,健康状况良好。

1.1.3 主要试剂与仪器 黄芪多糖注射液(瑞普药业有限公司);盐酸左旋咪唑注射液(江苏南农高科动物药业有限公司);防风多糖溶液(山东农业大学动物营养代谢病及中毒病实验室自制);全自动血液分析仪(深圳市普康电子有限公司);分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);低速离心机(上海手术器械厂);溶菌酶试剂盒(南京建成生物工程研究所);总蛋白、白蛋白试剂盒(南京建成生物工程研究所);血清免疫抑制酸性蛋白试剂盒(Adlitteram Di-

agnostic Laboratories, Inc.)。

1.2 方法

1.2.1 接种及给药 将试验大白猪随机分为 5 组,即防风多糖组(PRS)、黄芪多糖组(APS)、左旋咪唑组(LMS)、阳性对照组(Positive)和阴性对照组(Negative)。试验第 1 天,给前 4 组猪每头颈部肌肉注射 5 mL 的附红细胞体菌血,阴性对照组按同样方法给予等量生理盐水,然后各组仔猪分别肌肉注射防风多糖溶液 0.1 mL/kg、黄芪多糖注射液 0.1 mL/kg、盐酸左旋咪唑注射液 0.05 mL/kg、生理盐水 0.1 mL/kg、生理盐水 0.1 mL/kg,每天 1 次,连续注射 7 d。分别在第 0, 4, 7, 14 天自猪前腔静脉采血 5 mL,其中 2.5 mL 加肝素制备抗凝血,2.5 mL 常规分离血清。

1.2.2 测定项目与方法 红细胞感染率,采用涂片镜检法测定。淋巴细胞总数,采用全自动血液分析仪测定。血清溶菌酶活力、血清蛋白、血清免疫抑制酸性蛋白(IAP)含量均采用相应的试剂盒测定。

1.2.3 数据处理 试验所得数据用 SAS 9.1 软件进行方差分析,结果以“平均值±标准差($\bar{X} \pm SE$)”表示,以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 免疫调节剂对猪红细胞感染率的影响

由表 1 可知,阴性对照组的猪红细胞感染率始终为 0,其他各组红细胞感染率随感染后时间的延长显著升高。第 0 天,各组的红细胞感染率均为 0;第 4, 7 天时,3 个免疫调节组和阳性对照组的红细胞感染率显著高于阴性对照组,但 4 组之间无显著性差异;第 14 天时,红细胞感染率由高到低的顺序为阳性对照组 > 防风多糖组 > 左旋咪唑组 > 黄芪多糖组,分别为 62.75%, 52.25%, 51.25%, 40.00%。

2.2 免疫调节剂对猪血清溶菌酶活力的影响

由表 2 可知,各组猪血清溶菌酶活力随感染后时间的延长没有发生显著性的变化。第 0, 4 天,各组猪血清溶菌酶活力无显著差异;第 7 天,黄芪多糖

组血清溶菌酶活力显著高于阳性对照组和防风多糖组,左旋咪唑组显著高于阳性对照组;第 14 天,黄芪多糖组血清溶菌酶活力显著高于除左旋咪唑组外的其他组。

表 1 免疫调节剂对猪红细胞感染率的影响

Table 1 Effects of immunomodulators on red blood cell infection

%

感染后时间/d Day after infection	防风多糖组 PRS	黄芪多糖组 APS	左旋咪唑组 LMS	阳性对照组 Positive	阴性对照组 Negative
0	0 aC	0 aC	0 aD	0 aC	0 aA
4	10.25±1.11 aB	8.50±1.32 aBC	10.00±1.78 aC	9.00±1.83 aB	0 bA
7	17.25±2.69 aB	14.00±1.58 aB	19.25±2.78 aB	17.00±3.94 aB	0 bA
14	52.25±4.33 abA	40.00±8.43 bA	51.25±1.49 abA	62.75±3.17 aA	0 cA

注:同行数据后标不同小写字母和同列数据后标不同大写字母均表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

Note: Different letters in the same lines or different capital letters in the same rows represent significant difference ($P<0.05$). The following tables are the same.

表 2 免疫调节剂对猪血清溶菌酶活力的影响

Table 2 Effects of immunomodulators on lisozyma activity

U/mL

感染后时间/d Day after infection	防风多糖组 PRS	黄芪多糖组 APS	左旋咪唑组 LMS	阳性对照组 Positive	阴性对照组 Negative
0	15.67±1.91 aA	13.82±1.19 aB	14.28±3.56 aA	13.82±3.57 aA	14.75±1.99 aA
4	14.75±1.99 aA	16.59±4.38 aAB	15.21±2.42 aA	13.82±2.87 aA	15.21±1.38 aA
7	14.75±0.75 bcA	27.19±4.96 aA	26.27±6.18 abA	13.82±0.53 cA	16.59±1.99 abcA
14	15.21±0.88 bA	21.20±2.66 aAB	18.89±2.42 abA	14.75±0.75 bA	14.29±1.57 bA

2.3 免疫调节剂对猪淋巴细胞总数的影响

由表 3 可知,阳性对照组猪的淋巴细胞总数随感染后时间的延长而逐渐下降,各组淋巴细胞总数的变化均没有显著性差异。第 0 天,各组淋巴细胞

总数无显著性差异;第 4,7,14 天,阳性对照组的淋巴细胞总数都低于阴性对照组,3 个免疫调节组的淋巴细胞总数均高于阳性对照组,但均无显著性差异。

表 3 免疫调节剂对猪淋巴细胞总数的影响

Table 3 Effects of immunomodulators on total lymphocyte count

10⁶/mL

感染后时间/d Day after infection	防风多糖组 PRS	黄芪多糖组 APS	左旋咪唑组 LMS	阳性对照组 Positive	阴性对照组 Negative
0	3.90±0.53 aA	3.80±0.54 aA	3.95±0.38 aA	3.98±0.40 aA	3.85±0.40 aA
4	3.73±0.56 aA	3.78±0.59 aA	3.70±0.40 aA	3.53±0.36 aA	4.08±0.32 aA
7	3.68±0.50 aA	3.73±0.40 aA	3.90±0.27 aA	3.38±0.15 aA	3.95±0.25 aA
14	3.65±0.52 aA	3.63±0.54 aA	3.85±0.43 aA	3.30±0.28 aA	3.80±0.20 aA

表 4 免疫调节剂对猪血清总蛋白和球蛋白含量的影响

Table 4 Effects of immunomodulators on total protein and globulin leve

mg/mL

感染后时间/d Day after infection	总蛋白 Total protein level				
	防风多糖组 PRS	黄芪多糖组 APS	左旋咪唑组 LMS	阳性对照组 Positive	阴性对照组 Negative
0	56.63±4.92 aA	55.15±2.01 aA	55.39±3.51 aA	54.30±2.48 aA	56.46±2.41 aA
4	52.91±1.71 aAB	54.49±3.41 aA	54.77±1.30 aA	53.06±4.89 aAB	56.97±4.38 aA
7	45.42±1.72 bB	47.34±2.44 abAB	47.62±0.45 abB	43.18±2.89 bBC	54.92±1.67 aA
14	45.14±1.63 bcB	46.38±1.58 bB	46.47±1.31 bB	39.36±1.68 cC	55.06±1.80 aA

感染后时间/d Days after infection	球蛋白 Globulin level				
	防风多糖组 PRS	黄芪多糖组 APS	左旋咪唑组 LMS	阳性对照组 Positive	阴性对照组 Negative
0	23.47±2.15 aA	25.09±2.76 aA	25.16±2.32 aA	23.84±2.47 aA	23.61±1.96 aA
4	21.95±1.74 aAB	24.03±2.28 aAB	25.05±1.86 aA	21.13±2.87 aA	25.83±2.56 aA
7	15.81±1.78 bC	16.53±2.42 bB	17.05±1.33 abB	13.46±1.63 bB	22.54±1.87 aA
14	16.99±1.59 bBC	18.06±1.77 bAB	16.97±1.75 bB	12.01±1.06 cB	23.25±1.03 aA

2.4 免疫调节剂对猪血清总蛋白和球蛋白含量的影响

由表 4 可知,阳性对照组的猪血清总蛋白和球蛋白含量随着感染后时间的延长而呈显著下降趋势,3 个免疫调节组的血清总蛋白和球蛋白含量的变化整体呈下降趋势。第 0,4 天时,各组血清总蛋白和球蛋白含量差异不显著;第 7 天时,阳性对照组血清总蛋白和球蛋白含量显著低于阴性对照组,试验组之间差异不显著;第 14 天时,阳性对照组血清总蛋白和球蛋白含量显著低于阴性对照组,黄芪多糖组和左旋咪唑组总蛋白含量显著高于阳性对照

组,3 个免疫调节组血清球蛋白含量显著高于阳性对照组。

2.5 免疫调节剂对猪 IAP 含量的影响

由表 5 可知,猪 IAP 含量随感染后时间的延长呈现升高趋势,说明免疫能力下降。试验第 0 天,各组 IAP 含量差异不显著;第 4,7 天时,阳性对照组 IAP 含量显著高于其他各组;第 14 天,阳性对照组 IAP 含量显著高于阴性对照组、防风多糖组和黄芪多糖组,IAP 含量从低到高依次为阴性对照组、黄芪多糖组、左旋咪唑组、防风多糖组、阳性对照组。

表 5 免疫调节剂对猪 IAP 含量的影响

Table 5 Effects of immunomodulators on IAP level

感染后时间/d Day after infection	防风多糖组 PRS	黄芪多糖组 APS	左旋咪唑组 LMS	阳性对照组 Positive	阴性对照组 Negative
0	1.28±0.12 aB	1.47±0.21 aA	1.39±0.33 aA	1.49±0.28 aB	1.19±0.62 aA
4	1.46±0.29 bAB	1.48±0.21 bA	1.47±0.09 bA	4.18±0.96 aA	1.01±0.19 bA
7	2.51±0.54 bAB	2.14±0.41 bA	2.21±0.54 bA	4.39±0.82 aA	0.94±0.31 bA
14	2.84±0.68 bA	1.92±0.35 bA	2.61±0.91 abA	4.40±1.06 aA	0.98±0.19 bA

3 讨 论

Zachary 和 Smith^[14]报道,猪附红细胞体可通过降低辅助性 T 细胞的功能导致 B 细胞数量和多种免疫球蛋白含量减少,从而间接地抑制了机体的体液免疫应答。马海利等^[5]发现,猪感染附红细胞体后,C3b 受体活性下降,红细胞免疫功能降低。柴方红等^[6]发现,附红细胞体自然感染发病仔猪的红细胞 C3b 受体花环率、IC 花环率、淋巴细胞转化率、Ea 花环率、EAC 花环率均明显降低,外周血嗜中性白细胞吞噬率及吞噬指数明显降低。本研究结果表明,仔猪感染附红细胞体后,随感染后时间的延长,阳性对照组的血清总蛋白和球蛋白含量都显著下降,IAP 显著升高,淋巴细胞总数略有下降,说明猪感染附红细胞体病能够降低机体的非特异性免疫力,这与以上结果类似。

本研究发现,3 种免疫调节剂均能提高感染附红细胞体仔猪的血清总蛋白和球蛋白含量及淋巴细胞总数,其中黄芪多糖、左旋咪唑能显著提高感染仔猪的血清总蛋白含量,3 种免疫调节剂均能显著提高感染仔猪的血清球蛋白含量;3 种免疫调节剂均能降低 IAP 含量;仔猪感染附红细胞体后,其血清溶菌酶活力没有受到显著影响,而使用黄芪多糖和左旋咪唑后,能明显增强血清溶菌酶活力。可见,仔猪感染附红细胞体后机体的免疫力全面下降,这可能是附红细胞体感染猪易继发感染其他疾病的直接

原因。本试验所选 3 种药物都能在一定程度上提高患病仔猪的非特异性免疫力,其中黄芪多糖的作用最为明显。另有报道表明,黄芪多糖能促使 B 细胞增殖,增强巨噬细胞活性^[7],调节细胞因子如 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6 的表达^[8],增强自然杀伤细胞的细胞毒性^[15],促进肿瘤坏死因子 TGF α 和 TGF β 的分泌^[16],还能增强红细胞膜上补体受体的活性或功能,增强红细胞免疫功能^[9]。因此建议,在对患有附红细胞体病的猪进行积极治疗的同时,应使用黄芪多糖进行辅助治疗,以提高机体的抵抗力。

本试验仅采用了 3 种免疫调节剂的常规使用剂量,其他剂量可能会发挥更好的免疫调节作用,这有待于进一步试验筛选。

[参考文献]

- [1] Oberst R D, Gwaltney S M, Hays M P, et al. Experimental infections and natural outbreaks of eperythrozoonosis in pigs identified by PCR-DNA hybridizations [J]. J Vet Diagn Invest, 1993, 5: 351-358.
- [2] Leman A D, Straw B, Glock R D, et al. Diseases of swine [M]. 6th ed. Ames: Iowa State University Press, 1986: 683-687.
- [3] 陈启军, 尹继刚, 刘明远. 附红细胞体及附红细胞体病 [J]. 中国兽医学报, 2006, 26(4): 460-464.
Chen Q J, Yin J G, Liu M Y. Eperythrozoon and Eperythrozoonosis [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2006, 26(4): 460-464. (in Chinese)