

四君子汤及加味四君子汤对商品肉鸡免疫功能的影响

王自然

(山东省临沂师范学院 农林学院, 山东 临沂 276005)

【摘要】 **【目的】**为开发优质高效的中药免疫增强剂提供参考依据。**【方法】**选用 420 只 1 日龄 AA 肉鸡,随机分成 I ~ VII 7 个处理组,每组设 3 个重复,每重复 20 只。试验鸡在新城疫 Lasota 系冻干苗免疫时分别用四君子汤和加味四君子汤煎剂按 2.5,5.0,7.5 mL/L 3 个添加量兑水自由饮用,连用 4 d。于 14,28 和 42 日龄分别在鸡翅静脉采血,进行白细胞、淋巴细胞计数, α -醋酸萘酯酶染色(ANAE)和 β -微量血凝抑制试验检测各项免疫指标,研究四君子汤及加味四君子汤对商品肉鸡免疫功能的影响。**【结果】**新城疫疫苗免疫时以 2.5 mL/L 剂量添加四君子汤或加味四君子汤,在 14,28 和 42 日龄均可极显著提高鸡的淋巴细胞数和血液中新城疫的抗体水平($P<0.01$);四君子汤以 5.0 mL/L 剂量或加味四君子汤以 2.5 mL/L 剂量添加均能显著提高白细胞数和 T 淋巴细胞百分率($P<0.05$)。**【结论】**四君子汤和加味四君子汤均能有效提高鸡的特异性免疫和非特异性免疫水平。

【关键词】 加味四君子汤;四君子汤;淋巴细胞;T 淋巴细胞;抗体;AA 肉鸡
【中图分类号】 S853.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2008)02-0072-05

Study on the effect of sijunzi decoction and supplementary sijunzi decoction on immune function in broilers

WANG Zi-ran

(College of Agriculture and Forestry, Linyi Normal University of Shandong Province, Linyi, Shandong 276005, China)

Abstract: **【Objective】**The study is to provide the basis for impoldering high quality and efficacy immunopotentiator of traditional Chinese medicine. **【Method】** 420 one-day old AA broilers were randomly divided into seven groups, 3 replicates for 20 broilers with in each. Broilers drank the water added supplementary sijunzi decoction or sijunzi decoction with the concentration of 2.5, 5.0 and 7.5 mL/L respectively for 4 days, and at the same time, they were immunized with Lasota. Then the numbers of white blood cell and lymphocyte were counted, HI antibody level and T lymphocyte percentage were tested in blood with ND-HI and ANAE on 14th, 28th and 42th d respectively to investigate the effect of sijunzi decoction and supplementary sijunzi decoction on immune function in broilers. **【Result】** When the broilers were immunized with Lasota, the numbers of lymphocyte and HI antibody level were improved ($P<0.01$) significantly on 14th, 28th and 42th d in 2.5 mL/L sijunzi or supplementary sijunzi decoction group; Meanwhile, the numbers of white blood cell and T lymphocyte percentage were promoted ($P<0.05$) significantly in 2.5 mL/L supplementary sijunzi decoction group and 5.0 mL/L sijunzi decoction group. **【Conclusion】** Sijunzi decoction and supplementary sijunzi decoction can improve the level of specific and non-specific immunity effectively in broiler chickens.

* **【收稿日期】** 2007-02-06
【基金项目】 山东省教育厅科技计划项目(J06K58);临沂市科技计划项目(615006)
【作者简介】 王自然(1959—),男,山东临沂人,副教授,主要从事动物微生物学研究。E-mail: wzrly@126.com

Key words: supplementary sijunzi decoction; sijunzi decoction; lymphocyte; T lymphocyte; antibody; AA broilers

四君子汤出自宋代太医局编著的《太平惠民和剂局方》,由人参、白术、茯苓、炙甘草四味中药组成,是中医扶正固本的经典名方,具有益气健脾之功效,主治脾胃气虚证^[1]。近年来研究发现,该方具有促进骨髓造血、加速红细胞生成、提高机体免疫等功能,并有抗脂质过氧化和清除自由基等作用^[2]。目前,研究人员对四君子汤在体液免疫、细胞免疫、提高巨噬细胞的吞噬能力、免疫调节及清除体内自由基等方面进行了较深入地探讨,并取得了一定的进展^[3]。但有关四君子汤在兽医领域的系统研究尚未见报道。本试验以1日龄AA肉鸡为供试动物,研究以四君子汤和加味四君子汤(党参、白术、茯苓、炙甘草、黄芪、当归)煎剂作为免疫增强剂,对AA肉鸡新城疫(Newcastle disease, ND)抗体效价和外周血液中白细胞(WBC)数、淋巴细胞(PBL)数以及T淋巴细胞百分率的影响,分析四君子汤和加味四君子汤对鸡群的特异性免疫力和非特异性免疫力的影响,旨在为我国丰富的中草药成方及其加减运用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 中药方剂 中药复方制剂用党参、黄芪、当归、白术、茯苓、炙甘草6味补养中药组方配伍成A、B两种方剂。其中配方A为四君子汤,由党参、白术、茯苓、炙甘草四味中药组成,其质量比为2:2:2:1;配方B为加味四君子汤,由党参、白术、茯苓、炙甘草、黄芪、当归六味中药组成,其质量比为2:2:2:2:2:1。上述中药材均购于山东临沂市药材供应站中药经销部,质量均符合中华人民共和国兽药典(2005年版)标准^[4]。

1.1.2 主要试剂 包括ND抗原和阳性血清(购于中国兽药监察所)、新城疫Lasota系冻干苗(由山东齐鲁动物药品厂提供,批号:20060122)、淋巴细胞分离液(购于上海试剂二厂)、25 mL/L戊二醛(固定液)、1.4 g/L亚硝酸钠溶液(现用现配)、 α -醋酸萘酯溶液和孵育液等。

1.1.3 主要仪器 冰箱(BCD-268型,青岛海尔电冰箱公司)、电热恒温培养箱(HH. B11-II型,上海康华生化医疗仪器制造有限公司)、离心机(TGL-16G型,上海医用分析仪器厂)、微量振荡仪(TL-

2000mm-III型,姜堰市天力医疗器械有限公司)等。

1.1.4 试验动物 420只1日龄健康AA雏鸡,由山东临沂师范学院农林学院实验牧场提供。

1.2 试验药液的制备

分别按A、B两种中药方剂的配比称取中药材,放入容器内加自来水煎煮25~30 min,过滤取汁,然后再加自来水煎煮25~30 min,将2次药液混合浓缩,使每毫升药液含生药1 g,高压蒸汽灭菌后置4℃冰箱保存备用^[5]。

1.3 试验设计与分组

选用420只1日龄AA肉鸡,随机分成I~VII 7个处理组,每组设3个重复,每重复20只鸡。I组为对照组(CK),不用药;II、III、IV组为四君子汤低、中、高试验组,分别饮用含2.5、5.0和7.5 mL/L四君子汤药液的水;V、VI、VII组为加味四君子汤低、中、高试验组,分别饮用含2.5、5.0和7.5 mL/L加味四君子汤药液的水,连用4 d^[6]。对照组和试验组AA肉鸡的免疫程序为:7日龄新城疫Lasota系冻干苗点眼滴鼻,25日龄新城疫Lasota系冻干苗肌肉注射。网上平养,自由采食和饮水,试验期6周,试验期间各组饲养管理条件一致。

1.4 鸡血液样品的采集与处理

分别于14、28和42日龄,对I~VII组每只鸡翅下静脉采血,一部分血样置于加有肝素抗凝剂的小试管内;另一部分血样置于无抗凝剂的干燥灭菌小试管内分离血清。

1.5 鸡白细胞数的测定

采用文献^[7]的方法进行。

1.6 鸡淋巴细胞数和T淋巴细胞百分率的测定

取1.4中抗凝血1 mL,加入1 mL Hank's液稀释,然后将其加到含有2 mL淋巴细胞分离液的离心管中,1 500 r/min离心10 min,将悬浮的淋巴细胞取出,用Hank's液洗涤后,加少量Hank's液摇匀得细胞悬液。取细胞悬液1滴,加到洁净玻片上,涂片,自然干燥。将制备的细胞涂片用25 mL/L戊二醛4℃固定10 min,流水冲洗,待干。将玻片置于盛有孵育液的染色缸内,37℃孵育1 h,取出用蒸馏水冲洗,待干。再用甲基绿染色液染30 s,蒸馏水冲洗,吹干,油镜下对淋巴细胞观察计数。

采血当日,用酸性 α -醋酸萘酯酶(ANAE)染色法测定血液中T淋巴细胞的百分率^[8-10]。经酸性 α -

醋酸萘酯酶染色后,淋巴细胞可分为 2 大类,即酯酶染色阳性细胞(T 淋巴细胞)和酯酶染色阴性细胞(B 淋巴细胞)。酯酶阳性细胞形态为圆形,胞质少,胞核为棕红色、大圆形,胞质边缘及其他部位有 1 个或多个粗大的红色或棕红色颗粒;酯酶阴性细胞形态为圆形,胞质少,呈黄绿色,胞浆内无明显着色颗粒。油镜下观察 200 个淋巴细胞,计算 T 淋巴细胞的百分率。

1.7 鸡 ND 抗体效价的测定

采用红细胞凝集抑制试验法检测鸡 ND 抗体效价^[11]。鸡 ND 抗体效价用对数 $\lg x$ (x 表示血清稀释倍数)表示。

1.8 数据统计分析

用 SPASS 统计软件进行方差分析,用邓肯氏法

进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 四君子汤和加味四君子汤对鸡白细胞(WBC)数的影响

四君子汤和加味四君子汤对鸡白细胞数的影响如表 1 所示。从表 1 可以看出,在 14,28 和 42 日龄,与对照组和Ⅱ组相比,Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ组的白细胞数显著提高($P<0.05$),但Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ组间差异不显著($P>0.05$)。说明以 5.0 mL/L 剂量添加四君子汤或以 2.5 mL/L 剂量添加加味四君子汤,均能显著提高鸡新城疫免疫期间的白细胞数($P<0.05$)。

表 1 四君子汤和加味四君子汤对鸡白细胞数的影响

Table 1 Effect of sijunzi decoction and supplementary sijunzi decoction on the numbers of WBC in broilers

组别 Group	白细胞数/ $(\times 10^9 \cdot L^{-1})$ Numbers of WBC		
	14 d	28 d	42 d
I (CK)	24.95±1.64 b	24.86±2.20 b	25.41±1.97 b
Ⅱ	26.32±2.40 b	25.52±1.91 b	25.74±2.31 b
Ⅲ	27.68±1.60 a	27.98±2.31 a	27.82±3.26 a
Ⅳ	27.75±2.15 a	28.00±2.55 a	28.57±2.80 a
Ⅴ	28.15±1.82 a	28.24±1.45 a	27.95±2.53 a
Ⅵ	27.89±2.53 a	28.15±3.65 a	27.87±2.45 a
Ⅶ	27.75±1.65 a	28.04±3.35 a	27.77±3.55 a

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$),标不同大写字母者表示差异极显著($P<0.01$)。下表同。

Note: Marking different superscript letter after data expressed significant difference ($P<0.05$); capital letter expressed significant difference ($P<0.01$). The following table is the same.

2.2 四君子汤和加味四君子汤对鸡淋巴细胞数的影响

表 2 表明,在 14,28 和 42 日龄,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ组鸡淋巴细胞数与对照组相比差异极显著($P<0.01$),Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ组与Ⅱ组相比差异显

著($P<0.05$),Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ组间差异不显著($P>0.05$)。说明免疫期间以 2.5 mL/L 剂量添加四君子汤和加味四君子汤,在 14,28 和 42 日龄均能极显著提高鸡的淋巴细胞数($P<0.01$)。

表 2 四君子汤和加味四君子汤对鸡淋巴细胞数的影响

Table 2 Effect of sijunzi decoction and supplementary sijunzi decoction on the numbers of lymphocyte in broilers

组别 Group	淋巴细胞数量/ $(\times 10^9 \cdot L^{-1})$ Numbers of lymphocyte		
	14 d	28 d	42 d
I (CK)	11.13±1.59 cB	14.05±1.64 cB	11.53±1.56 cB
Ⅱ	13.54±2.33 bA	15.60±2.17 bA	13.48±1.68 bA
Ⅲ	16.86±1.47 aA	17.02±1.75 aA	16.77±2.48 aA
Ⅳ	16.92±2.51 aA	16.95±2.36 aA	16.64±1.74 aA
Ⅴ	17.16±1.74 aA	17.11±2.13 aA	16.86±0.98 aA
Ⅵ	16.96±1.67 aA	17.20±2.66 aA	16.67±2.05 aA
Ⅶ	17.07±1.74 aA	17.00±1.53 aA	16.06±2.13 aA

2.3 四君子汤和加味四君子汤对鸡 T 淋巴细胞百分率的影响

表 3 表明,在 14,28 和 42 日龄,与对照组和Ⅱ组相比,Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ组的 T 淋巴细胞百分率显

著提高($P<0.05$);Ⅱ组与对照组相比差异不显著($P>0.05$);Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅶ组间差异不显著($P>0.05$)。说明以 5.0 mL/L 剂量添加四君子汤或以 2.5 mL/L 剂量添加加味四君子汤,均能显著提高

鸡新城疫免疫期间的 T 淋巴细胞百分率 ($P<0.05$)。

表 3 四君子汤和加味四君子汤对鸡 T 淋巴细胞百分率的影响

组别 Group	T 淋巴细胞百分率/% T Lymphocyte percentage		
	14 d	28 d	42 d
I (CK)	32.17±3.50 b	31.92±3.35 b	33.42±4.29 b
II	35.28±4.29 b	33.08±3.97 b	34.89±4.29 b
III	38.62±3.35 a	39.75±3.59 a	38.58±2.99 a
IV	39.65±3.53 a	39.46±2.74 a	39.66±2.73 a
V	39.75±4.32 a	38.55±3.44 a	38.28±3.46 a
VI	39.66±3.59 a	39.59±4.23 a	39.64±4.12 a
VII	38.87±2.95 a	38.77±3.44 a	38.65±3.65 a

2.4 四君子汤和加味四君子汤对鸡 ND 抗体效价的影响

($P<0.05$), III、IV、V、VI、VII 组间差异不显著 ($P>0.05$)。说明以 2.5 mL/L 剂量添加四君子汤或加味四君子汤,在 14,28,42 日龄均能极显著提高鸡新城疫抗体水平 ($P<0.01$)。

表 4 表明,在 14,28 和 42 日龄,与对照组相比,II、III、IV、V、VI、VII 组的 ND 抗体效价极显著提高 ($P<0.01$), III、IV、V、VI、VII 组与 II 组间差异显著

表 4 四君子汤和加味四君子汤对鸡 ND 抗体效价的影响

组别 Group	ND 抗体效价 ND antibody titer		
	14 d	28 d	42 d
I (CK)	4.50±0.25 cB	5.20±0.39 cB	4.9±0.27 cB
II	5.40±0.33 bA	6.10±0.30 bA	5.20±0.25 bA
III	7.20±0.35 aA	7.10±0.25 aA	6.90±0.52 aA
IV	6.95±0.43 aA	7.00±0.38 aA	6.78±0.19 aA
V	7.50±0.40 aA	7.41±0.23 aA	7.08±0.36 aA
VI	7.40±0.22 aA	7.16±0.16 aA	7.00±0.57 aA
VII	6.38±0.39 aA	6.27±0.55 aA	6.34±0.47 aA

3 结论与讨论

(1)本试结果验表明,肉鸡免疫时,饮用 2.5 mL/L 四君子汤或加味四君子汤,在 14,28 和 42 日龄均可极显著提高肉鸡血液中的淋巴细胞数和新城疫抗体水平 ($P<0.01$);饮用 5.0 mL/L 四君子汤或 2.5 mL/L 加味四君子汤,均可显著提高其白细胞数和 T 淋巴细胞百分率 ($P<0.05$),从而使商品肉鸡在整个生长期保持较高的特异性免疫和非特异性免疫水平;在用量上,四君子汤与加味四君子汤相比可加倍应用。

(2)加味四君子汤是在四君子汤的基础上添加了补气固本的黄芪和补血活血的当归,研究表明黄芪、当归单味均能提高机体的免疫功能^[12-14]。因此,在临床用药时可以根据当地的药源情况灵活运用,从而降低成本,充分利用当地药源。此外,本试验结果表明,中药传统方剂能增强机体的多种免疫功能,但究竟是哪些有效成分在起作用,还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 宁康健,何玉意,吕锦芳,等. 四君子汤对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 [J]. 中兽医医药杂志,2005(5):30-32.
Ning K J,He Y Y,Lu J F,et al. Effects of sijunzi decoction on phagocytic activity of peritoneal macrophage of mice [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine,2005(5):30-32. (in Chinese)

[2] 刘钟杰,许剑琴. 中兽医学 [M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,2005:353-354.
Liu Z J,Xu J Q. Traditional Chinese veterinary medicine [M]. 3rd ed. Beijing: The Publishing Company of Chinese Agriculture,2005:353-354. (in Chinese)

[3] 孙惠玲,苗得园,龚玉梅,等. 黄芪、岩藻和油菜 3 种植物提取多糖对新城疫弱疫苗免疫效果的影响 [J]. 中国预防兽医学报,2005,27(3):205-208.
Sun H L,Miao D Y,Gong Y M,et al. Effect of extractive amylose from tragacanth, rock alga and cole on the immunity with ND live vaccine in chickens [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,2005,27(3):205-208. (in Chinese)

[4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 [M]. 北京:化学工业出版社,2005:80-260.
Codex Committee of Chinese Veterinary drug. Veterinary Codex of the People's Republic of China [M]. Beijing: The Pub-

- lishing Company of Chemic Industry, 2005: 80-260. (in Chinese)
- [5] 王自然. 中药乳炎康治疗乳牛乳腺炎的临床试验[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(2): 68-69.
- Wang Z R. The preclinical experiment on therapy for dairy cow mastitis using Chinese traditional medicine Ruyankang [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2004, 34(2): 68-69. (in Chinese)
- [6] 陈常秀, 李同树. 大蒜素对肉鸡免疫器官发育及 T 淋巴细胞阳性率的影响 [J]. 家畜生态学报, 2006, 26(2): 88-90.
- Chen C X, Li T S. Effects of garlicin on the immune organs growth and T lmyphocyte electropositive percentage in broiler chickens [J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2006, 26(2): 88-90. (in Chinese)
- [7] 王俊东. 兽医药实验室检验技术[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2005: 30-34.
- Wang J D. Technology of veterinary laboratory examination [M]. Beijing: The Publishing Company of Science and Technology of Chinese Agriculture, 2005: 30-34. (in Chinese)
- [8] 王世若, 王兴龙, 韩文瑜. 现代动物免疫学[M]. 吉林: 吉林科学技术出版社, 1996: 395-396.
- Wang S R, Wang X L, Han W Y. Modern animal immunology [M]. Jilin: The Publishing Company of Jilin Science and Technology, 1996: 395-396. (in Chinese)
- [9] 史秋梅. 中草药免疫增强剂对鸡 T 淋巴细胞数量的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(7): 21-23.
- Shi Q M. Effect of immunopotentiator on the quantity of T lymphocyte in chicken [J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2005, 33(7): 21-23. (in Chinese)
- [10] 王自然. 中草药添加剂对猪瘟免疫调节作用的研究[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(4): 579-582.
- Wang Z R. A study on immunity regulative effect of traditional Chinese medicine on immunizing swine fever vaccine [J]. Acta Agriculturae Universitis Jiangxiensis, 2006, 28(4): 579-582. (in Chinese)
- [11] 傅先强, 刘占君. 养禽场禽病检验手册 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1992: 97-104.
- Fu X Q, Liu Z J. A Handbook of bird disease examination in fowl-run [M]. Beijing: The Publishing Company of China Agricultural University, 1992: 97-104. (in Chinese)
- [12] 李 诺, 余锐萍, 韩鲁佳, 等. 黄芪提取物对鸡生长发育及免疫功能的影响[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(5): 61-64.
- Li N, She R P, Han L J, et al. Effect of extractive from traga-canth on the growth and immunity in chickens [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2004, 34(5): 61-64. (in Chinese)
- [13] 张 琰, 程建峰, 贺建荣, 等. 黄芪多糖对环磷酰胺致小鼠骨髓抑制及毒性的保护作用[J]. 第四军医大学学报, 2003, 25(5): 447-448.
- Zhang Y, Cheng J F, He J R, et al. The protective effect of astragalus polyaaccharides on marrow control and toxicity of mice caused by Cyclophosphamidecy [J]. Journal of The Fourth Military Medical University, 2003, 25(5): 447-448. (in Chinese)
- [14] 魏锡云. 黄芪和何首乌对老龄小鼠胸腺影响的超微结构研究[J]. 中国药科大学学报, 1993, 24(4): 238-241.
- Wei X Y. Effects of astragalus mongholicus and polygonum multiflorum on thymus in aged mice ultrastructural study [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 1993, 24(4): 238-241. (in Chinese)