文章编号: 1001－411X (2000) 03－0078－03

卡介苗对断乳仔猪免疫功能的影响

刘镇明[1], 蓝　天[1], 罗满林[1], 谢明权[2], 周秀蓉[2], 杨傲冰[2], 杜伟贤[2]
(1 华南农业大学动物医学系, 广东 广州 510642; 2 广东省农业科学院兽医研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 为了避免个体差异, 在 2 窝仔猪中各选择 6 头, 共 12 头仔猪随机分成对照组(6 头)和试验组(6 头), 在 40 日龄时分别肌注卡介苗(试验组)和等量生理盐水(对照组), 于接种前(0 d)和接种后 3、7、10、14 d 采血检测, 研究结果表明, 卡介苗能在 3 d 内提高断乳仔猪淋巴细胞转化率和血清杀菌能力, 分别在第 7 d 和第 3 d 达到高峰, 此后, 于第 10 d 和第 7 d 开始迅速降低, 而对白细胞总数和活性 T 淋巴细胞则无显著影响. 试验结果表明, 卡介苗能显著增强断乳仔猪的细胞免疫水平和机体的抗病能力.

关键词: 卡介苗; 免疫功能; 断乳仔猪
中图分类号: S858　　文献标识码: A

随着免疫增强剂研究的深入, 人们发现卡介苗是一种很好的非特异免疫增强剂, 是巨噬细胞的激活剂. 不仅使单核-吞噬细胞系统的细胞增生, 活力加强, 提高其杀菌、吞噬及杀肿瘤作用, 还能刺激骨髓的多能干细胞, 发育成具有免疫功能的免疫活性细胞. 促使 T、B、K 细胞的分化增生, 从而明显地提高机体的免疫力[1]. 猪外周血单核细胞 (PBMC) 增殖反应是机体总体免疫水平的反映, 通过改良的 MTT 比色法检测 PBMC 增殖反应, 易于量化和标准化[2]. 笔者试图通过检测 PBMC 增殖反应、活性 T 淋巴细胞、血清杀菌功能及白细胞总数的变化来评估卡介苗对断乳仔猪免疫功能的影响, 旨在明确卡介苗在畜禽生产中的应用前景.

1　材料与方法

1.1　试验动物

试验用杜长大三元杂猪购自广东省南海狮山种猪场, 体重约 15 kg, 性别不限.

1.2　卡介苗(BCG)

广东省生物制品研究所出品, 批号为 981102, ρ(BCG)＝75 g/L.

1.3　方法

选择 3～5 胎次母猪 2 头, 共 2 窝仔猪, 选出体重相近的健康仔猪各 6 头, 随机分成试验组(6 头)和对照组(6 头), 所有参试猪均打耳号标记, 40 日龄时每头仔猪前腔静脉采血后, 耳背侧肌注卡介苗 7.5 mg/头(试验组)和对照组(生理盐水 1 mL/头). 各组仔猪在注射免疫增强剂后 3、7、10、14 d 采血, 进行以下各个项目检测.

1.4　猪外周血单核细胞 (PBMC)

无菌采肝素抗凝血, 加入等体积的无 Ca^{2+}、Mg^{2+} Hank's 液混匀, 小心重叠于等体积的淋巴细胞分离液上, 2 000 r/min 离心 20 min, 吸取中间白色细胞层, 用 Ca^{2+}、Mg^{2+} Hank's 液洗 2 次, 用完全 RPMI1640 培养液洗 1 次, 血细胞计数器计算细胞浓度[3,4].

1.5　淋巴细胞转化试验

在 96 孔细胞培养板中按试验设计分别加入 0.012 5 g/mL PHA-p 50 μL, 每一样品设 3 个复孔, 置 37 ℃ φ＝5% CO_2 培养箱中培养 20 h, 再向各孔加入四甲基偶氮唑蓝(MTT)溶液(AMRESCO 产品, 完全 RPMI1640 溶解, pH 7.2～7.4)各 50 μL[5], 继续培养 4 h, 各孔加入酸性 SDS(0.001 mol/L HCl)溶解细胞, 置 4 ℃冰箱作用 20 h, 用酶标比色计在波长 570 nm 测 D_{570} 值, 同时设空白对照, 并按下面公式计算刺激指数(S.I). SI＝免疫后各日龄 D_λ 值/免疫前 D_λ 值.

1.6　卡介苗对猪血清杀菌功能的影响

将 0、1、3、7、10、14 d 采的血液, 分离血清备用. 将金黄色葡萄球菌 37 ℃培养 21 h, 用 0.03 mol/L pH7.2 PBS 稀释, 使之成为 240 个/mL 含菌的菌液备用. 取 0.2 mL 稀释好的金黄色葡萄球菌, 再加上述血清 0.2 mL 充分混匀, 置 37 ℃温箱作用 1 h 后, 每管吸取 0.2 mL 混合液注入营养琼脂平皿中, 于 37 ℃培养观察 72 h, 同时设正常菌数对照, 即菌液 0.1 mL, 加 0.03 mol/L pH 7.2 PBS 0.1 mL. 根据对照平皿中的菌落数, 计算出血清的杀菌百分率(%). 杀菌百分率(%)＝[(正常菌数－试验组菌数)/正常菌数]×100[6].

收稿日期: 2000－02－18　　作者简介: 刘镇明(1946－), 男, 副教授;　通讯作者: 谢明权(1946－), 男, 研究员.
基金项目: 广东省自然科学基金重大项目资助(963007)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1.7　卡介苗对活性 **T** 淋巴细胞和白细胞总数的影响

方法参照文献, 并按下面公式计算刺激指数(SI). *SI*= 免疫后采血日龄活性 T 淋巴细胞数或白细胞总数/ 免疫前活性 T 淋巴细胞或白细胞总数.

2　结果与分析

2.1　卡介苗对 **PBMC** 增殖反应的影响

从图 1 中可以看出卡介苗对 PBMC 有明显的刺激作用, 而且这种作用主要表现在注射免疫增强剂后的前 10 d, 第 7 d 时刺激作用达到最高值, 呈极显著的作用($P<0.01$).

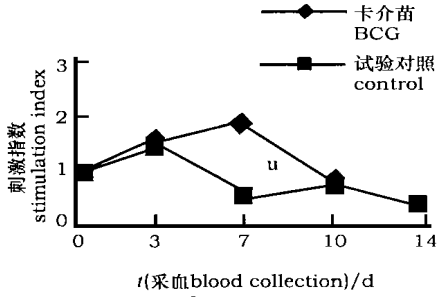

图 1　卡介苗对猪 PBMC 增殖反应的影响

Fig. 1　Effects of BCG on the PBMC proliferation of weaned piglets

2.2　卡介苗对猪血清杀菌功能的影响

从图 2 可知, 卡介苗在接种断乳仔猪后第 3 d 能极显著提高猪血清杀菌功能($P<0.01$). 试验组的血清杀菌百分率对比对照组提高了 18.2%, 此后至第 7 d, 杀菌百分率虽然迅速下降, 仍比对照组高出 14.9%.

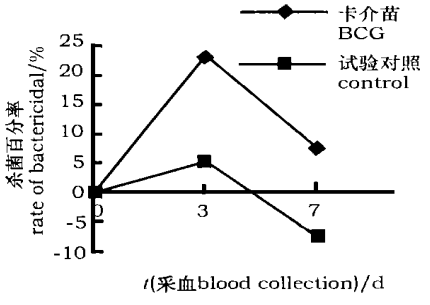

图 2　卡介苗对猪血清杀菌功能影响

Fig. 2　Effects of BCG on the bacteriocidal capability of piglets serum

2.3　卡介苗对活性 **T** 淋巴细胞和淋巴细胞总数的影响

从图 3、图 4 可见, 卡介苗对断乳仔猪血清中的活性 T 淋巴细胞数和白细胞总数没有显著影响($P>0.05$).

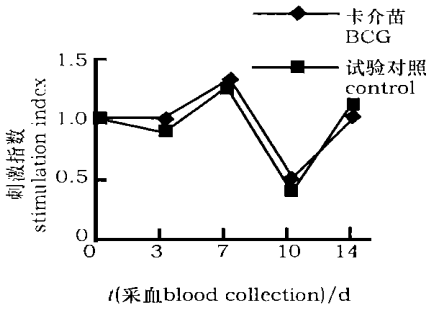

图 3　卡介苗对猪活性 T 淋巴细胞的影响

Fig. 3　Effects of BCG on active T-lyphocytes of weaned piglets

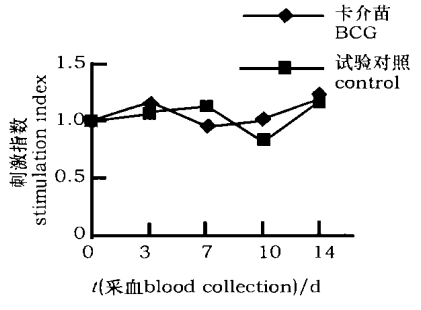

图 4　卡介苗对白细胞总数的影响

Fig. 4　Effects of BCG on the total number of white blood cell of weaned piglets

3　讨论

3.1　自 1926 年法国免疫学家首次发现非特异性免疫增强作用以来, 国内外对免疫增强剂的研究范围不断拓展, 如生物制品、天然物质、人工合成物、中草药等, 本实验是继卡介苗对鸡球虫疫苗的免疫增强效果研究及 5 种免疫增强剂体外刺激猪 PBMC 实验后[8], 筛选出效果较理想的卡介苗进行猪体体内试验, 本实验结果表明: 卡介苗不仅能提高猪 PBMC 增殖反应率, 也能短期内极显著地增强血清杀菌功能, 有效地改善机体的整体抗病能力. 这对于解决畜禽在使用疫苗后, 因抗体水平短期内相对下降所引发的疾病提供了一条有效的研究途径.

3.2　卡介苗对机体的免疫增强作用早有报道, 但以猪单核细胞体外增殖反应和血清杀菌试验等多项细胞、体液免疫检测指标来评价其效果的研究较少见报道. 本实验结果与国外报道的免疫增强剂可以诱导、激活不同的免疫效应细胞和不同的免疫活性分子是相一致的[9~11].

3.3　有文献报道, 适量注射卡介苗能起到免疫增强作用, 但大量接种卡介苗, 会引起机体的免疫抑制、慢性肉芽肿性肿及粟粒结核等副作用[1]. 在本试验中, 对 40 日龄 15 kg 左右的仔猪接种 7.5 mg 卡介苗, 未出现异常情况, 认为此剂量安全可靠. 但其最适剂

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

量的确定,仍待再作更深入的研究.

3.4 卡介苗起免疫增强作用的主要成份是其细胞壁上的胞壁酰二肽(MDP),但无论是MDP的提取物还是其人工合成物,价格都比较昂贵,目前仍不适用于畜禽生产,而卡介苗价格相对较便宜,且其应用安全,效果显著,因此,认为卡介苗有较好的应用前景.

参考文献:

[1] 王世若,王兴龙,韩文瑜. 现代动物免疫学[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1996. 161

[2] 卢锦汉,章以浩,赵 铠. 医学生物制品学[M]. 北京:人民卫生出版社,1995. 324.

[3] 宋长绪,谢明权,杜伟贤,等. 猪外周血单个核细胞增殖反应影响条件的探索[J]. 中国预防兽医学报,1999,(3):289-230.

[4] 吴明生. MTT比色分析法在豚鼠淋巴细胞转化试验中的应用[J]. 中国实验临床免疫学杂志,1992,4(4):10-12.

[5] 张学军. MTT颜色反应法测定人淋巴细胞增殖反应[J]. 上海医学检验杂志,1992,7(4):215-216.

[6] 张显升,蒲万霞,但秉成,等. 复合免疫增强剂对幼畜腹泻的预防作用及其机理的研究[J]. 中国兽医科技,1995,25(7):22-24.

[7] 时玉声,崔中林. 兽医临诊检验手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1989. 55-57.

[8] 李 繁. 免疫增强剂对鸡球虫免疫的影响[D]. 广州:华南农业大学动物医学系,1999.

[9] POWELL M F. Processing and presentation of antigen[A]. POWELL M F. Vaccine design: the subunit and adjuvant approach[C]. New York: Plenum Press, 1995. 2-26.

[10] NIXON D F, HIOE C E, CHEND Pei-De, et al. Synthetic peptides entrapped in microparticles can elicit cytotoxic T cell activity[J]. Vaccine, 1996, 14(16): 1 523.

[11] HIOE C E, QIU H, CHEND Pei-De, et al. Comparison of adjuvant formulation for cytotoxic T cell induction using synthetic peptides[J]. Vaccine, 1996, 14(5): 412.

Effects of BCG on the Immunity of Weaned Piglets

LIU Zheng-ming[1], LAN Tian[1], LUO Man-lin[1], XIE Ming-quan[2], ZHOU Xiu-yong[2], YANG Ao-bing[2], DU Wei-xian[2]

(1 Dept. of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;
2 Veterinary Medicine Research Institute, Guangdong Academy of Agric. Sci., Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to reduce individual deviation, twelve piglets from 2 farrows were randomly divided into 2 groups, 6 piglets each, designated as treatment group and control group, BCG or equal volume of saline solution was administered intramscularly into the piglets when 40 days old, The assay result showed that the proliferation response of peripheral blood T-cell and the bacteriocidal capability of piglets peaked at 7 and 3 days post immunization, and then began to decrease from day 10 and 7, while there was no significant effect on the total number of white blood cell and active T-lymphocyte. In conclusion, BCG could significantly enhance cellular immunity and disease-resistance capability of the weaned piglets.

Key words: BCG; immunity; weaned piglets

【责任编辑 柴 焰】

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net