

2 种植物多糖对 PRRSV 灭活苗免疫猪抗体及 T 淋巴细胞亚群的影响

张红英^{1,2}, 崔保安^{1,2*}, 王学兵^{1,2}, 赵现敏¹, 邱妍³

(1.河南农业大学 牧医工程学院,河南 郑州 450002;2.河南省动物性食品安全重点实验室,河南 郑州 450002;3.河南科技大学 动物科技学院,河南 洛阳 471004)

摘要: 将 24 头 35 日龄断奶仔猪随机分为 6 组,2 种多糖(山药多糖和黄芪多糖)分别以高、低 2 个剂量(山药多糖剂量 17.10、8.55 mg/kg,黄芪多糖剂量为 11.50、5.75 mg/kg)和猪 PRRSV 灭活苗同时注射,于免疫后不同时间点采血,监测 PRRSV 抗体水平和外周血中 T 淋巴细胞亚群的变化。结果表明,2 种多糖均能增强免疫猪的体液免疫,其中以高剂量的黄芪多糖效果较好;2 种多糖均能促进猪 CD3⁺细胞的增殖,其中以山药多糖效果较好,提示 2 种多糖对 PRRSV 灭活苗免疫效果均有较好的增强作用。

关键词: 山药多糖;黄芪多糖;猪繁殖与呼吸综合征病毒灭活苗;抗体;T 淋巴细胞亚群;仔猪

中图分类号: S853.74 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)02-0210-05

Effects of two polysaccharides on T subpopulations and antibody in the immune response to PRRSV killed virus vaccine

ZHANG Hong-ying^{1,2}, CUI Bao-an^{1,2*}, WANG Xue-bing^{1,2}, ZHAO Xian-min¹, QIU Yan³

(1.College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2.Key Laboratory of Animal-Derived Food Safety, Zhengzhou 450002,China; 3.College of Animal Science and Technology, Henan Science and Technology University, Luoyang, Henan 471004,China)

Abstract: In order to study the effects of two polysaccharides on specific-humoral immunity and T subpopulations in piglets peripheral blood in the immune response to PRRSV killed virus vaccine, 24 35-day-old piglets were randomly assigned into equal six groups and five groups were vaccinated with PRRSV killed virus vaccine. At the same time, the piglets in groups 1 to 4 were intramuscularly injected with Chinese yam polysaccharide(CYPS) at 17.10, 8.55 mg/kg, and astragalus polysaccharide(APS) at 11.50, 5.75 mg/kg, while group 5 with saline, once a day for three successive days, group 6 only injected with saline. On different time after vaccination, peripheral blood were sampled for detection of serum antibody titer to PRRSV by ELISA and T lymphocytes subpopulations by cytofluorometry. The results showed that both polysaccharides could enhance the antibody titers, APS at high dosage was better than others and the two polysaccharides can improve the proportion of CD3⁺ and CD8⁺ lymphocytes in the piglets peripheral blood, CYPS was better than APS. These results indicated that both polysaccharides had significant immune enhancement effect on immunity of PRRSV killed virus vaccine in piglets.

Key words: Chinese yam polysaccharide(CYPS); astragalus polysaccharide(APS); porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV) killed virus vaccine; antibody; T lymphocyte subpopulations; piglets

猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)感染可引起

母猪繁殖障碍和新生仔猪呼吸道症状。目前,对猪繁殖与呼吸综合征病的防治,主要是使用 PRRSV

收稿日期: 2009-10-11

基金项目: 教育部博士点专项科研项目(20070466001); 河南省基础与前沿技术研究计划项目(082300453207)

作者简介: 张红英(1968—),女,河南舞阳县人,博士,河南农业大学副教授,主要从事中药抗微生物与免疫调节作用研究; *通讯作者, baoancui@henau.edu.cn

灭活苗或弱毒苗进行免疫预防。弱毒疫苗免疫效果较好,但本身存在散毒危险^[1-2],而灭活疫苗接种后,特异性抗体产生的滴度低、速度慢,只能提供部分免疫保护^[3-5]。母安雄等^[5]对国内主要厂家生产的几种PRRSV灭活苗免疫效果进行的监测发现,猪PRRS灭活苗免疫效果不理想,一免后20 d血清抗体的阳转率最高仅20%;二免后21 d仅1种疫苗的阳转率达到75%,并且绝大部分阳性样品抗体S/P值小于1.0,难以诱导有效的体液应答反应,而且PRRSV的抗体依赖性增强作用,还会增强该病毒的复制,导致长期的持续性感染^[6-7],因此,提高疫苗免疫的保护抗体水平和细胞免疫是抵抗PRRSV感染的关键。

许多植物多糖具有免疫增强作用,能提高动物机体的非特异性免疫和特异性免疫力^[8-9]。笔者选用黄芪多糖和山药多糖分别与PRRSV灭活苗联合使用,研究它们对仔猪免疫抗体和T细胞亚群的影响,旨在为筛选PRRSV灭活苗免疫增强剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物

PRRSV抗体ELISA检测为阴性、体重10 kg左右、35日龄长白二元杂交断奶仔猪(河南省种猪育种中心提供)。

1.1.2 植物多糖

山药多糖(CYPS)和黄芪多糖(APS)由河南省动物性食品安全重点实验室用水煎醇沉法提取,经硫酸-萘酮法测定其多糖净含量分别为73.5%和65.8%,分别按净含量用双蒸水稀释成高、低2种剂量,配制好后115℃高压灭菌20 min,备用。

1.1.3 疫苗及主要试剂

PRRSV灭活疫苗购自哈尔滨维科生物技术开发公司,批号:2005015;PRRSV抗体检测ELISA试剂盒购自INDEXX公司(PRRS 2×R Ser NO.09418-GA295);FITC标记鼠抗猪CD3e、鼠抗猪CD4a、鼠抗CD8a, FITC-抗小鼠IgG单克隆抗体购自晶美生物工程有限公司;Opticycle C溶血素购自Beckman

公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与接种

将24只仔猪随机分成6组,每组4只,第1、2组分别为山药多糖(CYPS)的低、高剂量组,剂量依次为8.55、17.10 mg/kg,第3、4组分别为黄芪多糖(APS)的低、高剂量组,剂量依次为5.75、11.50 mg/kg,第1天注射PRRSV灭活疫苗,2 mL/头,全部肌肉注射,同时每组分别注射不同剂量的植物多糖,3 mL/头,每天1次,连续3 d。第5组为疫苗对照组(CK₁),免疫同多糖组,每天注射同量生理盐水。第6组为空白对照组(CK₂),不免疫,只注射同量生理盐水。其他疫苗的免疫按常规程序进行。

1.2.2 血样采集

分别在免疫前3 d,免疫后第7、14、24、34、44、54、69、79天于前腔静脉采血。血样分成2份:1份不加抗凝剂,分离血清,-20℃冻存,备用;另1份用EDTA-K盐作抗凝剂用于T细胞亚群检测。

1.2.3 项目检测

血清ELISA抗体检测:按照试剂盒说明书进行,S/P值(ELISA抗体滴度)大于0.4,检测为阳性。

T细胞亚群检测:每管加入经过预试验确定体积的鼠抗猪淋巴细胞CD3、CD4、CD8单克隆抗体10 μL,相应对照管加入抗小鼠IgG单克隆抗体10 μL,分别加入全血50 μL,混匀,室温避光作用20 min,加入Opticycle C溶血素250 μL,室温避光作用10 min,加入PBS溶液500 μL,混匀,室温避光作用10 min,1 500 r/min离心10 min,弃上清,再加入PBS溶液500 μL,重悬细胞,流式细胞仪(美国Beckman Coulter,型号为EPICSXL)分析。

1.2.4 数据分析

试验数据采用SPSS11.5软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 免疫猪血清中的PRRSV抗体测定结果

免疫后第7天,只有黄芪多糖高剂量组检测到PRRSV阳性抗体,而其他组均为阴性,差异显著($P<0.05$);第14天,所有免疫组抗体均为阳性;第

24天,除了黄芪多糖低剂量组和山药多糖高剂量组外,其他2个组的抗体水平显著高于疫苗对照组($P<0.05$);第34天,4个组的抗体效价显著高于疫苗对照组($P<0.05$);第44天,所有多糖试验组的抗体效价均显著高于对照组($P<0.05$);第54天,除山药多糖低剂量组外,其他3个组的抗体水平显著高

于对照组($P<0.05$);第69天,山药多糖低剂量组和黄芪多糖组的抗体水平均显著高于对照组($P<0.05$);第79天,山药多糖高剂量组、黄芪多糖高低剂量组的抗体水平显著高于对照组($P<0.05$ (表1)。表明2种多糖均能增强PRRSV灭活苗免疫猪的体液免疫,其中黄芪多糖效果好于山药多糖。

表1 免疫后不同时间点血清中PRRSV抗体的动态变化
Table 1 Dynamic variation of antibody against PRRSV in serum after immunization

组别	免疫后不同时期的抗体效价							
	第7天	第14天	第24天	第34天	第44天	第54天	第69天	第79天
1	(0.06±0.00)a	(0.62±0.01)b	(2.24±0.03)c	(2.54±0.14)cd	(2.19±0.11)cd	(2.60±0.10)bc	(2.96±0.31)c	(3.21±0.33)b
2	(0.08±0.00)a	(0.63±0.01)b	(1.06±0.06)b	(2.87±0.17)d	(2.43±0.10)d	(2.82±0.13)c	(2.32±0.23)b	(4.23±0.35)c
3	(0.08±0.04)a	(0.45±0.21)b	(1.05±0.38)b	(2.87±0.46)d	(2.43±0.48)d	(3.98±0.36)d	(3.09±0.46)c	(4.25±0.25)c
4	(0.53±0.10)c	(0.62±0.45)b	(2.28±0.56)c	(2.54±0.28)cd	(2.19±0.51)cd	(3.79±0.40)d	(2.88±0.49)c	(3.65±0.20)b
CK ₁	(0.24±0.03)b	(1.64±0.25)c	(2.15±0.30)c	(2.06±0.33)b	(1.42±0.13)b	(2.43±0.39)b	(2.46±0.34)b	(3.34±0.27)b
CK ₂	(0.02±0.00)a	(0.02±0.00)a	(0.03±0.01)a	(0.03±0.00)a	(0.30±0.010)a	(0.05±0.00)a	(0.07±0.01)a	(0.08±0.01)a

2.2 免疫猪外周血T细胞亚群检测结果

2.2.1 对外周血CD3⁺淋巴细胞的影响

免疫后第7天,2种多糖不同剂量组的CD3⁺淋巴细胞在外周血中所占百分比均高于疫苗对照

组,而且差异显著($P<0.05$);山药多糖不同剂量组之间差异不显著;其他时间点,多糖组CD3⁺细胞均高于对照组。说明这2种多糖均能促进猪CD3⁺细胞的增殖,其中以山药多糖效果较好(表2)。

表2 免疫后不同时间点猪外周血CD3⁺细胞所占百分比
Table 2 CD3⁺ proportion in peripheral lymphocytes of the piglets after immunization %

组别	CD3 ⁺ 细胞所占百分比						
	第7天	第24天	第34天	第44天	第54天	第69天	第79天
1	(55.8±5.2)bc	(63.3±6.4)b	(69.3±2.7)c	(64.2±4.0)d	(70.9±2.6)b	(64.9±4.2)c	(68.4±4.9)b
2	(60.5±4.2)c	(65.7±7.4)b	(71.5±5.3)c	(58.5±1.7)cd	(65.2±4.3)b	(66.2±2.4)c	(68.2±2.8)b
3	(53.3±2.6)b	(49.7±2.6)a	(50.2±5.0)ab	(53.2±3.5)bc	(54.6±5.4)a	(54.6±2.8)b	(59.6±5.9)a
4	(59.1±2.3)bc	(59.8±2.3)b	(53.9±5.2)b	(54.5±4.6)bc	(48.2±3.7)a	(55.3±4.1)b	(54.5±6.3)a
CK ₁	(45.6±3.8)a	(47.6±4.8)a	(46.0±6.1)a	(44.2±6.3)a	(48.6±7.0)a	(52.0±2.5)ab	(53.2±3.8)a

2.2.2 对外周血CD4⁺淋巴细胞的影响

从表3可以看出,免疫后第7天,山药多糖组和黄芪多糖高剂量组CD4⁺细胞在外周血中所占百分比显著高于疫苗对照组($P<0.05$);第24天,山药多糖高剂量组显著高于对照组($P<0.05$),其他组之间差异

不显著;第34天后,各多糖组与对照组之间差异不显著,说明山药多糖和黄芪多糖在免疫的早期对CD4⁺细胞的增殖有一定的促进作用,其中以山药多糖效果较好。

表3 免疫后不同时间点猪外周血CD4⁺细胞在外周血所占百分比
Table 3 CD4⁺ proportion in peripheral lymphocytes of the piglets after immunization %

组别	CD4 ⁺ 细胞所占百分比						
	第7天	第24天	第34天	第44天	第54天	第69天	第79天
1	(28.4±0.8)cd	(28.1±2.9)bc	(27.4±1.8)ab	(25.0±3.0)b	(28.5±2.3)bc	24.3±5.7	24.0±3.2
2	(31.6±2.1)d	(29.9±4.5)c	(27.7±1.7)a	(18.3±4.7)a	(30.0±7.8)c	26.2±3.4	22.9±2.1
3	(28.0±4.4)bcd	(23.1±3.9)ab	(28.0±2.0)ab	(18.0±2.0)a	(22.6±1.7)ab	25.7±2.9	23.3±3.7
4	(31.2±2.5)d	(20.8±4.2)a	(23.9±4.2)a	(22.0±2.4)ab	(20.3±1.4)a	23.5±1.2	23.6±3.7
CK ₁	(22.8±3.4)ab	(22.2±1.7)ab	(27.5±3.0)ab	(21.0±3.6)ab	(23.8±2.7)abc	26.2±3.6	24.4±1.6

2.2.3 对外周血CD8⁺淋巴细胞的影响

从表4可以看出,免疫后第7天,除黄芪多糖低剂量组外,其他多糖组CD8⁺细胞数量显著高于疫苗对照组($P<0.05$);第24天,除山药多糖低剂量组外,其他多糖组CD8⁺细胞数量显著高于疫苗对照组($P<0.05$);第34天,山药多糖组显著高于对照组($P<0.05$);第44天,多糖组均高于对照组,黄芪多

糖高剂量组与对照组相比差异显著($P<0.05$);第54天,多糖组均高于对照组,山药多糖组与对照组相比差异显著($P<0.05$);第69天,多糖组与对照组差异不显著;第79天,多糖组均高于对照组,以低剂量山药多糖组与对照组相比差异显著($P<0.05$)。说明黄芪多糖和山药多糖均能促进猪CD8⁺细胞的增殖,其中以山药多糖效果较好。

表4 免疫后不同时间点猪外周血CD8⁺细胞所占百分比
Table 4 CD8⁺ proportion in peripheral lymphocytes of the piglets after immunization %

组别	CD8 ⁺ 细胞所占百分比						
	第7天	第24天	第34天	第44天	第54天	第69天	第79天
1	(41.5±1.7)cd	(33.7±4.9)ab	(48.8±2.4)b	(36.9±3.8)ab	(46.8±5.6)c	(35.9±2.0)abc	(44.6±4.4)c
2	(38.1±2.8)bc	(43.6±2.6)c	(52.0±4.8)b	(36.2±3.8)ab	(45.4±3.4)bc	(35.4±3.4)ab	(38.2±1.9)abc
3	(34.6±3.7)ab	(38.6±5.1)bc	(31.5±4.8)a	(33.8±5.7)ab	(39.9±3.8)abc	(42.0±4.2)c	(34.2±4.4)a
4	(42.3±6.0)cd	(38.9±3.3)bc	(37.7±5.4)a	(41.4±1.2)b	(38.5±9.1)abc	(39.7±4.5)bc	(37.6±5.9)ab
CK ₁	(30.9±4.2)a	(30.0±3.9)a	(34.3±5.1)a	(32.3±7.8)a	(34.8±4.8)a	(37.4±4.0)abc	(33.6±1.3)a

3 小结和讨论

2种多糖和PRRSV灭活疫苗联合使用,均能提高PRRSV抗体水平,但不同多糖发挥免疫增强作用的时间不同。黄芪多糖无论是在免疫的初期(第7天)还是中后期(第24天后),均能显著提高抗体水平,而山药多糖对体液免疫的增强作用在中后期(第34天后)效果显著,且一直持续到试验结束,这与笔者所做的板蓝根多糖对体液免疫的影响一致^[10]。这说明不同多糖对体液免疫的影响有一定差别,其提高机体体液免疫的作用机理可能不同。

由于受试验时间的限制,在免疫后的第79天,各免疫组抗体仍处于上升趋势,在达到高峰以后2种多糖是否能延长高水平抗体在体内的存在时间尚需要进一步研究。

机体抵抗病毒感染需要体液免疫和细胞免疫的协同作用,参与细胞免疫的主要是T淋巴细胞,其中CD4⁺是辅助性T细胞,具有协助体液免疫和细胞免疫功能,CD8⁺是细胞毒性T淋巴细胞,能特异性杀伤具抗原标记的靶细胞,其百分比率体现着机体细胞免疫功能状况。试验结果显示,这2种多糖

均能提高外周血淋巴细胞中CD8⁺细胞的百分比,说明这2种多糖在提高猪的体液免疫的同时,还可明显提高猪的细胞免疫功能。该试验结果与对鸡的研究报道一致^[11]。

黄芪多糖高剂量组血清中PRRSV抗体均显著高于对照组,而且在免疫后第7天即能检测出阳性抗体,而低剂量组在免疫的中后期显著高于对照组;黄芪多糖的2个剂量之间抗体水平也有差异,前期,高剂量组抗体水平高于低剂量组,后期则低于低剂量组。山药多糖高、低剂量组之间抗体水平在某些时间点(24、69、79 d)也有差异。

同一多糖不同剂量对T细胞亚群的影响也不同,黄芪多糖高剂量组在免疫后第7天CD3⁺、CD4⁺T淋巴细胞所占百分比高于低剂量组,山药多糖高剂量组在免疫后第7天CD3⁺细胞所占百分比显著高于低剂量组。这说明多糖的剂量对免疫细胞、免疫抗体的影响较大,因此适宜的剂量选择是发挥多糖免疫增强作用的重要因素^[12]。另外,这2种多糖对PRRSV抗体和对T细胞亚群的影响有一定相关性(同一种多糖),但并非完全正相关,推测多糖对体液免疫的增强作用不仅仅是由于对CD3⁺、

CD4⁺T 淋巴细胞的促增殖作用,可能是受多种因素影响的结果.

参考文献:

- [1] Mengeling W L , Lager K M , Vorwald A C . Safety and efficacy of vaccination of pregnant gilts against porcine reproductive and respiratory syndrome[J] .Vet Res ,1999 , 60(7) : 796-801 .
- [2] Botner A ,Nielsen J ,Oleksiewicz M B et al Heterologous challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome(PRRS) vaccine virus : No evidence of reactivation of previous european-type PRRS virus infectious [J] . Vet Microbiol , 1999 , 68(3/4) : 187-195 .
- [3] Nielsen T L , Nielsen J , Have P , et al . Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J] . Vet Microbiol , 1997 , 54(2) : 101-112 .
- [4] Nilubol D , Platt K B , Halbur P G , et al . The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs[J] .Vet Microbiol ,2004 , 102(1/2) : 11-18 .
- [5] 毋安雄,濮文正,蒋建一,等.4种猪生殖和呼吸综合征灭活疫苗免疫效果比较[J].中国兽医杂志,2003,39(9):18-19.
- [6] Yoon K J , Wu L L , Zimmerman J J , et al . Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement(ADE) of infection[J] . Vet Microbiol , 1997 , 55(4) : 277-287 .
- [7] Yoon K J , Wu L L , Zimmerman J J , et al . Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs[J] . Viral Immunol , 1996 , 9(1) : 51-63 .
- [8] 孔祥峰,胡元亮,李祥瑞,等.9种中药成分对新城疫IV系疫苗免疫雏鸡血清中血凝抑制抗体水平的影响[J].畜牧兽医学报,2004,35(4):468-472.
- [9] 刘自遼,陈小军,屠迪,等.复方黄芪多糖注射液对仔猪血液生理生化指标的影响[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2009,35(5):514-516.
- [10] 张红英,赵现敏,崔保安,等.板蓝根多糖对猪繁殖与呼吸综合征疫苗免疫猪T细胞亚群的影响[J].中国免疫学杂志,2007,23(2):134-137.
- [11] 邱妍,崔保安,胡元亮,等.4种多糖对免疫雏鸡抗体效价和T淋巴细胞的影响[J].南京农业大学学报,2008,31(1):77-81.
- [12] 李彦.马尾藻多糖的分离纯化及其作为免疫佐剂对猪PRRS病免疫效果的影响研究[D].南宁:广西大学动物科技学院,2004.

责任编辑:苏爱华
英文编辑:罗文翠