

DOI:10.13331/j.cnki.jhau.2014.02.016

投稿网址: http://www.hunau.net/qks

五味子药渣发酵菌质对仔猪血液生理指标和免疫功能的影响

罗杰, 贺晓玉, 黄朝翔, 牟超, 李英伦*

(四川农业大学动物医学院, 四川 雅安 625014)

摘要:选择28日龄“杜×长×大”断奶仔猪90头,随机分为3组:对照组饲喂基础日粮;低剂量组饲喂基础日粮+0.1%蛹虫草菌发酵五味子药渣菌质;高剂量组饲喂基础日粮+0.2%蛹虫草菌发酵五味子药渣菌质。每组3个重复,每个重复10头。饲喂14 d后,从每个重复中随机选取1头仔猪,前腔静脉采血,测定血液生理成分,外周血淋巴细胞亚群和增殖活性,以及血清中白细胞介素-2(IL-2)和 γ -干扰素(IFN- γ)的含量。结果:与对照组相比,低剂量组和高剂量组仔猪的白细胞(WBC)、淋巴细胞(LYM)、平均血红蛋白浓度(MCHC)、血小板(PLT)、平均血小板体积(MPV)和血小板分布宽度(PDWcv)均无显著性差异($P < 0.05$);高剂量组红细胞(RBC)和血红蛋白(HGB)含量显著增加($P < 0.05$);低剂量和高剂量组CD4⁺T细胞与CD8⁺T细胞比值、淋巴细胞增殖指数均极显著增加($P < 0.01$);高剂量组血清IFN- γ 含量显著提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),各组猪的血清IL-2含量的差异均不显著($P > 0.05$)。以上结果表明,五味子药渣发酵菌质能优化仔猪血液的生理指标,提高仔猪的免疫功能。

关键词:仔猪;五味子药渣;发酵;蛹虫草菌;血液指标;免疫活性

中图分类号:S816.7;S852.72

文献标志码:A

文章编号:1007-1032(2014)02-0188-04

Effect of fermented *Schisandra chinensis* residue on blood physiology parameters and immunomodulation of weaned piglets

LUO Jie, HE Xiao-yu, HUANG Chao-xiang, MOU Chao, LI Ying-lun*

(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: Ninety crossbred weaned piglets “Duroc × Landrace × Yorkshire” aged 28 days were randomly allocated into 3 groups (3 replicates for each group and 10 pigs for each replicate). Pigs in the control group were fed with basic diet, in low-dose group with basic diet plus 0.1% *Cordyceps militaris* fermented *Schisandra chinensis* residue and in high-dose group with basic diet plus 0.2% *Cordyceps militaris* fermented *Schisandra chinensis* residue for 14 days. Then one pig from each replicate was selected for blood collection by anterior vena cava venipuncture for analysis of the routine blood parameters, peripheral T lymphocyte subgroups and their proliferative activities, as well as the IL-2, IFN- γ contents. Results showed there was no difference in white blood cells (WBC), lymphocyte (LYM), mean erythrocyte haemoglobin concentration (MCHC), platelet count (PLT), mean platelet volume (MPV) and platelet distribution width (PDWcv) ($P > 0.05$) between the control group and the low- and high-dose groups. Compared to the control, the contents of RBC and HGB in high-dose group were significantly increased ($P < 0.05$), the CD4⁺/CD8⁺ ratio and proliferation function of peripheral blood T cell in low- and high-dose groups were extremely significantly increased ($P < 0.01$), the serum IFN- γ contents in high-dose group were also increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but there was no significant difference in serum IL-2 contents of piglets among groups ($P > 0.05$). It was concluded that dietary supplied with *Cordyceps militaris* fermented *Schisandra chinensis* residue improves the immunologic function and optimizes blood physiology parameters of piglets.

收稿日期: 2013-10-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272599)

作者简介: 罗杰(1987—),男,四川丹棱人,硕士研究生,主要从事中兽药与中兽医研究,luojie1588@sina.cn; *通信作者, liyinglun01@163.com

Key words: weaned piglets; residue of *Schisandra chinensis* extract; fermentation; *Cordyceps militaris*; hematologic parameters

随着中国中医药事业的蓬勃发展,提取中药后产生的药渣越来越多。据统计,中国每年的药渣排放量已超过 3 000 万吨^[1]。制备生脉注射液过程中产生的五味子药渣就是其中之一。这些药渣或被废弃,造成环境污染和中药资源浪费;或经粗加工后添加于动物日粮中。但由于可利用活性物质少、制备工艺粗糙,导致生物学效应较低。中药渣经有益微生物发酵和受微生物酶的影响,其自身成分得到改变,产生新的有效物质和性味功能,从而提高药效和扩大适应症^[2-3]。已有研究表明,川芎辛夷汤药渣^[4]、木薯渣^[5]和海带废渣^[6]的发酵物具有增强免疫、促生长和抗氧化等功效。近年来,蛹虫草菌(*Cordyceps militaris*)发酵工艺日趋成熟,发酵产物具有广泛的药理活性,但未见蛹虫草菌发酵五味子药渣的相关报道。本试验以断奶仔猪为试验对象,在日粮中添加不同水平的蛹虫草菌发酵五味子药渣菌质,研究其对仔猪血液生理指标和免疫功能的影响,旨在为发酵菌质的开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 供试动物及饲料

选择胎次一致、品种相同的“杜×长×大”28 日龄断奶仔猪 90 头,平均体重(7.4±0.3) kg。基础饲料参照美国 NRC (1998)^[7]猪的营养需要设计,配制成全价粉状料,其组成见表 1。营养水平包括消化能

(14.48 MJ/kg)、粗蛋白质(20.50%)、钙(0.85%)、总磷(0.67%)、赖氨酸(0.55%)、蛋氨酸(1.55%)、色氨酸(0.27%)、苏氨酸(1.01%)。

1.1.2 菌种与药渣

蛹虫草菌购自中国科学院微生物研究所;五味子药渣为生脉注射液中北五味子提取后残渣(雅安三九药业惠赠)。

1.1.3 仪器与试剂

KDC-2046 低速冷冻离心机(中佳公司); Thermo Forma 311 型 CO₂ 培养箱(Thermo Labsystems 公司);Bio-rad 680 酶联免疫检测仪(Bio-Rad 公司); ECLIPSE TS100-F 型倒置显微镜(Nikon 公司); BD FACSCalibur 1010 流式细胞仪(BD 公司)。

刀豆蛋白 A(ConA)购自 Signa 公司; Cell counting kit-8 试剂购自日本同仁化学研究所;胎牛血清购自 Gibco 公司; RPMI-1640 培养液购自 Hyclone 公司;其他试剂为国产,分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 蛹虫草菌发酵五味子药渣菌质的制备

将蛹虫草菌接种于土豆培养基(马铃薯 200.0 g、葡萄糖 20.0 g、琼脂 20.0 g、水 1 L)上复壮 6 d;在装有 200 mL 菌种营养液(葡萄糖 20 g,酵母膏 5 g,蛋白胨 5 g,磷酸二氢钾 2 g,硫酸镁 1 g,维生素 B₁ 50 mg,水 1 L)的 500 mL 三角瓶中无菌接入 2 个蛹虫草菌斜面菌块,120 r/min 摇床培养 6 d,形成均匀菌球;将五味子药渣与水以 1 : 1.5 的质量比混合,在发酵瓶中搅拌均匀,经 121 ℃灭菌 30 min 后降至室温,按干药渣的 15%无菌接入菌种,静置于生化培养箱中 22 ℃发酵 15 d。发酵结束后将菌质在 40~50 ℃烘箱中干燥,粉碎过 250 μm 孔径筛。

1.2.2 试验分组与饲养管理

将 90 头试验猪随机分为 3 组:对照组饲喂基础日粮;低剂量组在基础日粮中添加 0.1%蛹虫草菌发酵五味子药渣菌质;高剂量组在基础日粮中添加 0.2%蛹虫草菌发酵五味子药渣菌质进行饲喂。每组 3 个重复,每个重复 10 头猪,分圈饲养。按猪场常

表 1 基础饲料组成(风干基础)

Table 1 Constituent of the base diet (dry level)		%	
原料	用量	原料	用量
玉米	41.18	碳酸氢钙	0.90
豆粕	12.00	胆碱	0.10
膨化大豆	11.22	乳糖	8.75
鱼粉	5.00	食盐	0.35
血浆蛋白粉	4.00	维生素预混料 1	0.50
乳清粉	15.00	矿物质预混料 2	0.50
石粉	0.50		

维生素预混料 1 为每千克饲料提供 V-A 12 000 IU ;V-D 33 200 IU ; V-E 80 IU ;V-K₃ 2.5 mg ;V-E 80 mg ;V-B₁ 2.5 mg ;V-B₂ 6.5 mg ;V-B₆ 5 mg ;V-B₁₂ 0.05 mg ;烟酸 45 mg ;D-泛酸 20 mg ;叶酸 1.5 mg ;生物素 0.15 mg。

矿物质预混料 2 为每千克饲料提供 Fe 150 mg ;Cu 125 mg ;Zn 200 mg ;Mn 30 mg ;I 0.3 mg ;Se 0.3 mg。

规饲养管理程序饲养。预试期 3 d, 正试期 14 d。饲喂方法采用群饲, 每日均定时(7 30、12 00、17 00)喂料 3 次, 自由饮水, 保持圈内清洁。

1.2.3 血液的采集

于试验 14 d 时, 早上喂料前从每个重复中选 1 头仔猪, 前腔静脉采血 10 mL, 注入 EDTA-Na 抗凝管中, 即为抗凝血; 采血 2 mL 不加抗凝分离血清, -20 °C 冷冻保存, 备用。

1.2.4 仔猪血液指标的测定

采用 SysnecK-1000 血液细胞自动分析仪测定白细胞(WBC)、淋巴细胞(LYM)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、平均血红蛋白浓度(MCHC)、血小板(PLT)、平均血小板体积(MPV)和血小板分布宽度(PDWcv)。

1.2.5 仔猪外周血淋巴细胞亚群分类的测定

取 2 mL 抗凝血加入 2 mL 淋巴细胞分离液, 800×g 离心 20 min, 小心收集中间层淋巴细胞, RPMI-1640 液调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 从中取 200 μ L, 以小鼠抗猪 CD3、CD4、CD8 单克隆抗体(BIOTECT 公司)染色后, 以流式细胞仪检测 CD3⁺T 细胞、CD3⁺CD4⁺T 细胞、CD3⁺CD8⁺T 细胞占外周血淋巴细胞的百分比, 并计算 CD3⁺CD4⁺T 细胞与 CD3⁺CD8⁺T 细胞的比值。

1.2.6 仔猪外周血淋巴细胞增殖功能测定

按 1.2.5 的方法获取淋巴细胞, 最后以 RPMI-1640 培养液(青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μ g/mL, 小牛血清 10%), 将细胞稀释成 2.5×10^6 个/mL, 制

成单细胞悬液(台盼蓝检测细胞存活率大于 95%)。取单细胞悬液 90 μ L 加入 96 孔板中, 每个样品重复 3 次, 并加入 50 μ g/mL 的 Con A 溶液 10 μ L, 同时设立阴性对照组(不加 Con A); 置 37 °C, 5% CO₂ 箱中培养 44 h 后加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续培养 4 h, 在 Bio-Rad 酶联免疫检测仪上以 A630 nm 为参比波长, 测定样品的吸光值($A_{450 \text{ nm}}$), 并计算增殖指数 SI (stimulation index, SI)。SI=试验孔 A 均值/对照孔 A 均值。

1.2.7 仔猪血清 IL-2、IFN- γ 的测定

用 IL-2、IFN- γ 检测试剂盒(武汉基因美公司)测定血清中 IL-2、IFN- γ 的含量。

1.2.8 数据处理

采用 SPSS20.0 进行数据统计分析, 并用方差分析(one-way ANOVA)法进行多组间显著性检验。

2 结果与分析

2.1 蛹虫草菌发酵五味子药渣菌质对仔猪血液生理指标的影响

由表 2 可知, 断奶仔猪添加蛹虫草发酵五味子药渣后, 低剂量组 WBC、LYM、RBC、HGB、HGB、MCHC、PLT、MPV、PDWcv 与对照组的差异均没有统计学意义。高剂量组 RBC、HGB 均显著高于对照组($P < 0.05$); WBC、LYM、HCHC、PLT、MPV 高于对照组, 但差异没有统计学意义; PDWcv 值低于空白对照组, 但差异没有统计学意义。

表 2 断奶仔猪血液生理指标测定结果

Table 2 Test results for blood physiological index of weaned pigs

组别	白细胞/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	淋巴细胞/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	红细胞/ ($\times 10^{12} \cdot L^{-1}$)	血红蛋白/ ($g \cdot L^{-1}$)	平均血红蛋白/ ($g \cdot L^{-1}$)	血小板/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	平均血小板 体积/fL	血小板分布 宽度/%
对照	(22.59 \pm 0.89)AB	(13.19 \pm 1.40)ab	(5.48 \pm 0.82)a	(92.00 \pm 10.82)a	(312.00 \pm 33.72)ab	542.00 \pm 36.50	8.43 \pm 0.59	38.20 \pm 3.12
低剂量	(20.69 \pm 0.68)A	(11.49 \pm 0.46)a	(5.42 \pm 0.49)a	(95.33 \pm 7.51)ab	(287.67 \pm 12.71)a	539.33 \pm 22.90	7.90 \pm 0.46	36.60 \pm 2.80
高剂量	(24.57 \pm 2.10)B	(13.95 \pm 1.30)b	(7.22 \pm 0.41)b	(112.67 \pm 5.51)b	(336.67 \pm 4.16)b	578.33 \pm 38.55	8.47 \pm 0.67	38.03 \pm 2.50

2.2 蛹虫草菌发酵五味子药渣菌质对仔猪外周血淋巴细胞亚群的影响

断奶仔猪外周血淋巴细胞流式检测结果见表 3。与对照相比, 在日粮中添加蛹虫草菌发酵五味子药渣对仔猪外周血淋巴细胞亚群有正面影响。低剂量组 CD3⁺T 细胞百分率与对照组的差异没有统

计学意义($P > 0.05$), CD3⁺CD4⁺T 细胞、CD3⁺CD8⁺T 细胞的百分率均低于对照组($P < 0.01$), CD4⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞的比值高于对照组($P < 0.01$); 高剂量组 CD3⁺T 细胞、CD3⁺CD4⁺T 细胞的百分率高于对照组, 但差异没有统计学意义($P > 0.05$), CD3⁺CD8⁺T 细胞的百分率低于对照组($P < 0.01$), CD4⁺T 细胞与 CD8⁺T 细胞的比值高于对照组($P < 0.01$)。

表 3 断奶仔猪外周血淋巴细胞的流式检测结果

Table 3 Results of flow cytometry for lymphocytes in peripheral blood of weaned pigs				
组别	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ T 细胞	CD3 ⁺ CD8 ⁺ T 细胞	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T 细胞
对照	67.63±2.19	(30.10±2.41)B	(38.27±4.77)B	(0.79±0.04)A
低剂量	66.78±0.57	(25.21±1.51)A	(27.61±2.44)A	(0.91±0.03)B
高剂量	68.03±0.76	(33.12±0.71)B	(30.33±0.12)A	(1.09±0.03)C

2.3 蛹虫草菌发酵五味子药渣菌质对仔猪外周血 T 淋巴细胞增殖能力和细胞因子的影响

从表 4 可看出，蛹虫草发酵五味子药渣菌质组能提高仔猪血液 T 淋巴细胞增殖指数，低剂量组和高剂量组增值指数比对照组分别提高 5.36% ($P<0.01$)和 21.43%($P<0.01$)。与对照组相比，低剂量组和高剂量组能提高仔猪血清 IL-2 的含量，但差异没有统计学意义($P>0.05$)；与对照组相比，低剂量组和高剂量组血清 INF- γ 的含量增加，分别提高 3.93%($P<0.05$)和 5.71%($P<0.01$)。可见，血清细胞因子的分泌量与淋巴细胞活性呈正相关。

表 4 断奶仔猪外周血 T 淋巴细胞增值指数和 IL-2、INF- γ 含量

Table 4 T lymphocyte amplification index and contents of IL-2 and INF- γ in blood of weaned pigs			
组别	增殖指数	IL-2/(ng·mL ⁻¹)	INF- γ /(pg·mL ⁻¹)
空白对照	(1.12±0.02)A	36.93±1.88	(120.71±2.94)Aa
低剂量	(1.18±0.02)B	37.19±1.32	(125.45±3.02)ABb
高剂量	(1.36±0.01)C	38.81±0.75	(127.60±1.43)Bbc

3 讨 论

在生脉注射液制备过程中，主要提取了五味子脂溶性的萜类、挥发油、五味子素，以及水溶性的多糖、有机酸和维生素等。在提取后的五味子药渣中，有些残留物质仍具有良好的生物活性。微生物发酵药渣有着独特的生物转化机制^[2,8]，蛹虫草菌可利用五味子药渣中的纤维、糖类、蛋白质等营养成分进行生长，并破坏细胞壁使五味子木脂素等残留的有效成分溶出和富集；在生长过程中产生初生或次生代谢产物，并有可能与五味子药渣中的一些物质发生反应，或直接对五味子药渣中的某些成分进行转化而形成新的化合物等。秦岭等^[9]以生脉饮药渣为原料，多菌种混合发酵后产物蛋白增加 86.96%，粗纤维降低 20.09%。本试验结果显示，在断奶仔猪基础日粮中添加 0.2% 的五味子药渣发酵菌质，能提高仔猪血液中 RBC、HGB、WBC、LYM、

HCHC、PLT 和 MPV，提示发酵菌质有可能改善免疫应激下红细胞向机体运送氧气的的能力。试验结果还表明，饲喂五味子药渣发酵菌质的仔猪的外周血 CD4⁺T 细胞/CD8⁺T 细胞比值提高，ConA 介导的淋巴细胞增殖能力加强，且血清中 IL-2、INF- γ 含量增加，这与血液常规生理指标显示免疫增强的结果相同。本试验结果不同于张瑞等^[10]报道的五味子残渣对白羽野鸭生产性能和免疫功能无显著影响的结论，这可能是由于五味子药渣经过蛹虫草菌发酵后的菌质生物活性比原药渣显著提高所致。

参考文献：

[1] 谭显东,王向东,黄健盛,等. 中药渣资源化技术研究进展[J]. 中成药, 2010, 32(5): 847-849.

[2] 王延年,董雪,乔延江,等. 中药发酵研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2010, 12(3): 437-441.

[3] 庄毅,洪净. 药用真菌双向性固体发酵工程与中成药药渣再开发[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(22): 1918-1919.

[4] 张振宇,田雪梅,宋爱荣. 六种食用菌中药渣固体发酵及其粗多糖对 NK 细胞活性的影响[J]. 食用菌学报, 2010, 17(3): 46-50.

[5] 于向春,刘易均,杨志斌,等. 发酵木薯渣粉在文昌鸡日粮中的应用[J]. 中国农学通报, 2011, 27(1): 394-397.

[6] 张炳照,闫培生. 海带废渣真姬菇发酵产物抗氧化活性研究[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(3): 157-162.

[7] NRC. Nutrient requirements of swine[M]. 10th edn. Washington D C: National Academy Press, 1998.

[8] 张李阳,周业飞,虞蔚岩,等. 药用真菌发酵产物调控肉鸡内分泌及免疫力的研究[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2005, 26(4): 16-38.

[9] 秦岭,王向东,潘朝智,等. 多菌种混合发酵生脉饮药渣生产蛋白饲料工艺条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(4): 122-128.

[10] 张瑞,赵景辉,王英平,等. 人参,黄芪(残渣),五味子(残渣) 等对白羽野鸭生产性能和免疫性能的影响[J]. 中兽医医药杂志, 2011(3): 48-51.

责任编辑：罗 维
英文编辑：罗 维