

免疫初乳对腹泻大鼠血液免疫细胞活性和免疫介质调节作用研究

高伟¹, 陈龙^{1,2,*}, 许龙兵¹, 潘道东³

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046; 2. 江苏省生物医药功能材料工程研究中心, 江苏 南京 210097; 3. 南京师范大学金陵女子学院食品科学系, 江苏 南京 210097)

摘要: 目的: 探讨免疫初乳在干预急性感染性腹泻病中的保护效应及其机制。方法: 选用32只健康成年SD大鼠, 随机分成对照组(C组)、模型组(M组)、普通初乳保护组(NC组)、免疫初乳保护组(IC组)。NC和IC组每天分别灌服普通初乳和免疫初乳(1ml/100g bw), C和M组灌服生理盐水, 连续12d。在灌服实验后的第5、10d, M、NC和IC组大鼠(1ml/100g)感染混合的肠侵袭性大肠杆菌和沙门氏菌菌液(10^8 /ml)。结果: M和NC组大鼠血液红细胞CR₁(RBC-CR₁)花环率和红细胞免疫复合物(RBC-IC)花环率分别显著低于和高于C组, 而IC组和C组无显著差异; M和NC组T淋巴细胞比例显著下降, 但IC组与C组无明显差异; 感染腹泻病原菌导致血浆IL-2水平下降, TNF- α 水平升高, 但IC组和C组相近。结论: 免疫初乳可以通过改善和提高血液免疫细胞功能活动, 介导免疫介质的调整作用发挥抗大鼠感染性腹泻的保护效应。

关键词: 免疫初乳; 大鼠; 腹泻; 血液; 免疫细胞; 免疫介质

Effects of Immune Colostrum on Blood Immunocyte Activities and Immune-mediator Regulation in Diarrhea Rats

GAO Wei¹, CHEN Long^{1,2,*}, XU Long-bing¹, PAN Dao-dong³

(1. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China ;
2. Jiangsu Engineering Research Center for Bio-medical Function Materials, Nanjing 210097, China ;
3. Department of Food Sciences, Ginling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract : Objective: To discuss the protective effect and its mechanisms of immune colostrum in intervening in acute infectious diarrhea disease. Methods: Thirty-two healthy adult SD rats (half females and half males) were chosen and randomly divided into a control group (group C), a model group (group M), a group protected with normal colostrum (group NC) and a group protected with immune colostrum (group IC). Rats in groups NC and IC were orally given normal colostrum and immune colostrum at a dosage of 1 ml per 100 g body weigh once each day for 12 days, respectively. The animals in groups C and M were received physiologic saline at the same dose and frequency. On days 5 and 10 post experiment, animals from groups M, NC and IC were orally infected (1 ml/100 g body weight)with mixed enteroinvasive *E. coli* and *Salmonella typhi* (10^8 /ml). Results: During the whole experimental period, red blood cell complement receptor type 1 (RBC-CR1) rosette rates and red blood cell immune complex (RBC-IC) rosette rates in groups M and NC are obviously lower and higher than those in group C, respectively, while there is no significant difference between group IC and group C. The proportions of T-lymphocytes in groups M and NC significantly reduce, but no obvious difference is observed between group IC and group C during the whole experiment period. The decreased IL-2 and elevated TNF- α levels are detected in plasma of diarrhea pathogens-infected rats, but the levels of IL-2 and TNF- α in group IC are close to those in group C. Conclusion: Immune colostrum provides effective protection of anti-infectious diarrhea in rats via ameliorating and enhancing activities and function of blood immunologic cells as well as mediating regulation of immune-mediators.

收稿日期: 2008-06-16

基金项目: “十五”国家奶业重大科技专项项目(2002BA518A12); 江苏省“十五”攻关项目(BE2002302)

作者简介: 高伟(1976-), 讲师, 硕士, 主要从事动物免疫生理学研究。E-mail: gaowei@njnu.edu.cn

* 通讯作者: 陈龙(1964-), 教授, 博士, 主要从事免疫生理学与生物化学研究。E-mail: lchen@njnu.edu.cn

Key words: immune colostrum; rat; diarrhea; blood; immunocyte; immune mediator

中图分类号: R392

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)07-0239-04

急性感染性腹泻病是指以腹泻为主要临床表现的一组肠道传染病,可致儿童营养不良,生长发育障碍及成人劳动力损失,严重危害人类健康,尤其在6月龄以后的婴幼儿发病率和死亡率较高^[1]。急性感染性腹泻是危害我国儿童健康第二疾病。据WHO统计,目前腹泻是全球仅次于呼吸道疾病及结核,死亡率居第三位的传染病,严重影响发展中国家婴幼儿健康。临床上对婴幼儿急性感染性腹泻病的治疗手段单一,多以调理为主,疗效不甚佳^[2-4]。本研究室研制的抗婴幼儿17株腹泻病原菌免疫乳制品,前期研究发现,从免疫初乳中分离纯化的高纯度特异性IgG在体外能够通过特异性凝集反应,显著抑制病原菌的生长;口服免疫初乳有效地保护急性感染性腹泻的发生发展^[5],但其深入的免疫调控机制尚不完全清楚。

机体免疫系统是由免疫细胞和免疫分子组成的一个完整的免疫网络。免疫细胞包括淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、粒细胞和红细胞等。研究已证实,红细胞具有识别、黏附、浓缩、杀伤异己、清除免疫复合物的能力,与白细胞免疫互为调控,对白细胞免疫具有增强和扩大免疫效应作用,并参与机体的免疫调控^[6-7]。淋巴细胞是体内最重要的免疫活性细胞,其中T淋巴细胞在细胞免疫中起重要作用。免疫介质是一类低分子量的活性物质,如:白细胞介素-2(IL-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等^[8]。腹泻病原菌致机体急性腹泻病生理过程中这些免疫细胞和免疫介质的变化及免疫乳如何干预,尚未见资料报道。为此,本研究用腹泻病原性细菌感染大鼠,通过综合分析急性腹泻大鼠血液红细胞免疫功能、T淋巴细胞比例及IL-2和TNF- α 水平变化,探讨抗婴幼儿17株腹泻病原菌免疫初乳在干预急性感染性腹泻病中活性保护效应及其机制,为揭示免疫初乳在发挥抗感染性腹泻中的保护作用及其机理提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与仪器

普通全价饲料,(g/100g):小麦粉20、玉米粉38、豆饼粉20、麸皮10、鱼粉5、酵母粉1、骨粉1、食盐1、鱼肝油1、植物油2、矿物添加剂1、维生素添加剂0.1;冻干补体致敏酵母多糖和冻干未致敏酵母多糖 上海长海医院红细胞免疫室提供。

SN-695B型智能放免 γ 测量仪 中国科学院上海原子核研究所日环仪器一厂。

1.2 免疫初乳制备

将17株来源于人肠道的致腹泻感染性病原菌(12株大肠杆菌、2株沙门氏菌、3株志贺菌,购自中国药品生物制品检定所)分别在37℃的BSB中扩增培养24h后,用0.4%甲醛灭活48h,经接种BSB琼脂板培养检验无活菌后收菌、生理盐水洗菌3次(4500r/min,15min),计数数使其为 10^9 /ml,然后将各病原菌按1:1比例制备成混合菌液。用2%硬脂酸铝溶液作为佐剂将混合菌液经高速搅拌乳化成灭活联合多效价疫苗。

选择健康生理条件近似的预产期6~8w妊娠荷斯坦奶牛(由南京奶业(集团)公司南京西岗联营牛奶场提供)10头,随机分为对照组和实验组,每组5头。实验组在颈部两侧肌肉注射疫苗10ml(2 \times 5ml),对照组按同样的方法注射由生理盐水和佐剂制成乳化液。疫苗免疫在预产期前的2个月开始,在免疫注射开始后每2w加强免疫1次,共3次。在整个免疫期间奶牛健康、不注射任何抗生素,以利于抗17株病原菌的活性抗体产生。分娩后1~4d采初乳,每次1000ml。乳样立即经纱布过滤,4℃离心去脂肪(10000r/min,15min),再经巴斯杀菌后,置-20℃保存。

1.3 实验动物

32只健康、体重 179.62 ± 0.97 g的成年SD大鼠(南京医科大学实验动物中心提供),雌雄对半。经1w适应饲养后,随机分成4组,即对照组(C组)、模型组(M组)、普通初乳保护组(NC组)、免疫初乳保护组(IC组),每组8只。C和M组每天分别灌服1ml/100g bw的生理盐水,NC和IC组分别灌服1ml/100g bw的普通初乳和免疫初乳,连续12d。大鼠均自由采食普通全价饲料、饮水,饲养过程中,每天换水,隔日换1次笼中的木屑垫料以保持清洁,环境温度20~25℃。

1.4 感染病原菌诱发大鼠腹泻

分别在灌服实验后的第5、10d,M组、NC组和IC组大鼠灌服感染由强致病性1株肠侵袭性大肠杆菌和1株沙门氏菌混合制成的菌液(10^8 /ml),剂量为1ml/100g体重,C组给予同样剂量生理盐水。

1.5 样品采集和处理

分别于灌服实验后的第7、12d,对各组大鼠由眼眶静脉丛采集血样1.5ml。迅速放入含有肝素钠(1:500)的塑料管内,混匀,取抗凝血0.2ml作血涂片,剩余的抗凝血置4℃离心(3000r/min,20min),取出血浆置-20℃保存,用于指标的测定。

1.6 测定指标和方法

血液红细胞免疫功能:红细胞CR1花环(RBC-CR1R)

和红细胞免疫复合物花环(RBC-ICR)实验, 参照郭峰的方法^[7]; 血液 T 淋巴细胞比例: 采用酸性非特异性酯酶(axidic α -naphthyl acetate, ANAE)组织化学染色法^[9]; 血浆 IL-2 和 TNF- α 水平: 采用放射免疫分析法(试剂盒由中国科学院上海原子核研究所和中国人民解放军总医院放射免疫研究所提供, 严格按说明书进行)。

1.7 数据处理

以平均值±标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示, 用计算机统计软件包 Statistica 对数据作方差分析, 确定差异显著性。

2 结果与分析

2.1 大鼠表现

在第 1 次感染病原菌后, M、NC 组大鼠粪便成长条状, 且有黏连, 甚至有个别大鼠有呈水样粪便。再次染菌后, M、NC 组大鼠粪便成水样, 并且精神更为萎靡, 毛色暗淡。在整个实验期间, IC 组大鼠除有 1 只在染菌后的粪便不呈椭圆形, 其余大鼠同对照组在粪便形态、精神状态、毛色上无明显差异。由于 M、NC 组大鼠严重腹泻, 体重逐渐下降, 低于 C 组和 IC 组, 而 C 组与 IC 组无差异。

2.2 免疫初乳干预急性感染性腹泻大鼠血液红细胞免疫功能变化

表 1 免疫乳干预急性感染性腹泻大鼠血液红细胞免疫功能变化($\bar{x} \pm s_x$)
Table 1 Changes of blood RBC immune function in acute infectious diarrhea rats after intervened with immune colostrum ($\bar{x} \pm s_x$)

指标	组别	灌服实验后	
		7d	12d
RBC-CR ₁ 花环率(%)	C	6.00 ± 1.07	6.00 ± 0.93
	M	4.00 ± 1.07**	3.00 ± 0.76**
	NC	4.38 ± 0.74**	3.63 ± 0.92**
	IC	6.00 ± 0.76##	5.63 ± 0.74##
RBC-IC 花环率(%)	C	3.13 ± 0.65	3.63 ± 0.92
	M	4.25 ± 0.89*	5.13 ± 1.25*
	NC	4.37 ± 0.92**	5.13 ± 0.99**
	IC	3.25 ± 0.71##	3.88 ± 0.64##

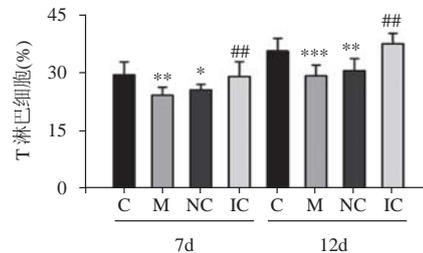
注: *.与对照组相比较, $p < 0.05$; **.与对照组相比较, $p < 0.01$; ##.与模型组相比较, $p < 0.01$ 。

由表 1 可见, 在整个实验期, M、NC 组大鼠血液 RBC-CR₁ 花环率极显著低于对照组, 而 IC 与 C 组接近, 显著高于 M 组; M、NC 组大鼠血液 RBC-IC 花环率显著上升, 而 IC 组 RBC-IC 花环率与 C 组接近, 明显低于 M 组。

2.3 免疫初乳干预急性感染性腹泻大鼠血液 T 淋巴细胞比例变化

图 1 显示, 在整个实验期, M 和 NC 组大鼠血液 T 淋巴细胞显著低于对照组, 而 IC 组和对照组无显著差异, 腹泻病原菌感染导致的 T 淋巴细胞下降。特别在

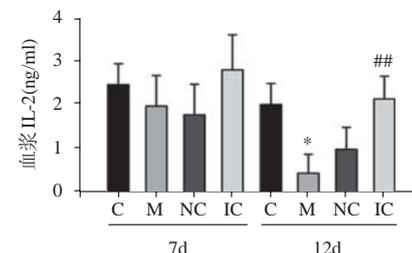
实验后 12d, 其比例甚至稍高于 M 组, 表明免疫初乳在改善和提高血液免疫细胞功能活动, 发挥抗大鼠感染性腹泻的保护效应方面起重要作用。



*.与对照组相比较, $p < 0.05$; **.与对照组相比较, $p < 0.01$; ***.与对照组相比较, $p < 0.001$; ##.与模型组相比较, $p < 0.01$ 。

图 1 免疫乳干预急性感染性腹泻大鼠血液 T 淋巴细胞比例变化
Fig.1 Changes of proportion of blood T-lymphocyte in acute infectious diarrhea rats after intervened with immune colostrum

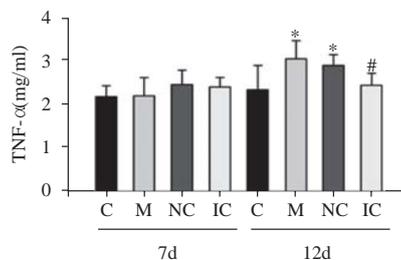
2.4 免疫初乳干预急性感染性腹泻大鼠血浆 IL-2 水平变化
急性感染腹泻病原菌大鼠血浆 IL-2 水平表现为: 在感染后 7、12d, M 组和 NC 组均下降, 且 12d 明显低于 C 组。然而, IC 组未见明显下降, 高于或显著高于 M 和 NC 组(图 2)。



*.与对照组相比较, $p < 0.05$; ##.与模型组相比较, $p < 0.01$ 。

图 2 免疫乳干预急性感染性腹泻大鼠血浆 IL-2 水平变化
Fig. 2 Changes of plasma IL-2 level in acute infectious diarrhea rats after intervened with immune colostrum

2.5 免疫初乳干预急性感染性腹泻大鼠血液 TNF- α 水平变化



*.与对照组相比较, $p < 0.05$; #.与模型组相比较 $p < 0.01$ 。

图 3 免疫乳干预急性感染性腹泻大鼠血浆 TNF- α 水平变化
Fig.3 Changes of plasma TNF- α level in acute infectious diarrhea rats intervened with immune colostrum

由图3可见,在实验后的第7d各组血浆TNF- α 水平比较无明显差异,然而,在实验的第12d,M组和NC组大鼠TNF- α 水平分别显著高于C组,而IC组和C组无显著差异,且明显高于M组。

3 讨论与结论

本研究显示,感染性腹泻病原菌大鼠血液RBC-CR₁花环率极显著低于对照组,并随着再次染菌呈进一步下降,口服普通初乳虽稍有改善,但从大鼠临床表现看,与M组一样,粪便成水样,并且精神萎靡,毛色暗淡。然而,给予免疫初乳的大鼠RBC-CR₁花环率与对照组无明显差异,且显著高于M组,提示免疫初乳能有效地调控红细胞免疫功能,保护腹泻病原菌感染诱发的红细胞免疫功能低下。另外,M和NC组RBC-IC花环率在整个实验期内均显著升高,而IC组RBC-IC花环率未见明显上升,与对照组相近,进一步暗示给予免疫初乳能有效地保护和稳定红细胞黏附清除循环系统中CIC的能力,对共同维持机体内环境的平衡和生理机能的稳定起积极作用。

淋巴细胞是体内最重要的免疫活性细胞,其中T淋巴细胞在细胞免疫中起重要作用。本研究发现,在IC组T-淋巴细胞与对照组差异不显著,而M组下降明显。说明免疫初乳能提高机体的细胞免疫功能,保护腹泻病原菌感染诱发的细胞免疫抑制。IL-2是由活化的T淋巴细胞产生并促进T淋巴细胞生长的因子,它是保障机体正常免疫功能的关键环节,具有广泛的免疫增强效应^[10]。现已证明,IL-2可以通过促使某一特定的T细胞群体的克隆性扩增,通过T_H细胞数目及功能的提高来增强整体的免疫功能;能够增强胸腺细胞和T细胞对有丝分裂原的应答;参与IFN的分泌;对杀伤性T细胞(cytolytic T cell, CTL)、淋巴因子激活杀伤细胞(lymphokine activated killer cell, LAK)、NK细胞都具有促进增殖和增强活性的能力;还能够有效的促进激活的B细胞增殖等效应^[10-12]。因此,IL-2已成为衡量机体免疫功能尤其是细胞免疫状况的重要指标^[10]。本研究显示,M组和NC大鼠血浆IL-2总体水平低于或显著低于对照组,而IC组未见明显下降,高于或显著高于M和NC组。进一步暗示,免疫初乳可通过调控IL-2水平,进而提高染菌后大鼠的整体免疫功能,尤其是细胞免疫功能而发挥保护效应。

TNF- α 由巨噬细胞产生,是机体炎症反应的重要介质。根据TNF- α 在体内浓度的高低,具有截然不同的生物学效应。低浓度TNF- α 以旁分泌和自分泌方式在局部发挥其生物学效应,激活炎性细胞在炎症局部发挥杀伤作用,同时具有干扰素样作用^[13],对机体产生保护效

应;如果机体内致病因子不能及时地遏制或清除,体内这些分子可能就会产生过量,造成正常组织的伤害,起致炎作用^[14]。作为炎症介质在加重局部炎症的同时,还可通过循环引起远处组织损伤,严重者导致多系统器官障碍、衰竭^[15-17]。本研究结果显示,在二次染菌后,M和NC组大鼠TNF- α 水平分别显著高于对照组,而IC组与对照组比较无显著差异,表明免疫初乳在调整机体内TNF- α 发挥正常生理作用和有效地抑制机体炎症反应进一步扩大方面有积极效应,从而较好地保护机体免遭严重损伤。

总之,免疫初乳可以通过改善和提高血液免疫细胞功能活动,介导免疫介质的调整作用发挥抗大鼠感染性腹泻的保护效应。

参考文献:

- [1] 林良明. 中国5岁以下儿童死亡抽样调查[J]. 中华儿科杂志, 1994, 32(3): 150.
- [2] 张美芳. 小儿腹泻治疗近况[J]. 广西医学, 1997, 19(2): 218-220
- [3] 刘杨. 艰难梭菌相关性腹泻的治疗和预防[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2001, 1(2): 125-126.
- [4] 方松鹤. 小儿腹泻与肠道微生态的关系[J]. 中国实用儿科杂志, 1996, 11(4): 201.
- [5] XU L B, CHEN L, GAO W, et al. Bovine immune colostrum against seventeen strains of diarrhea bacteria and *in vitro* and *in vivo* effects of its specific IgG[J]. Vaccine, 2006, 24(12): 2131-2140.
- [6] 刘景田, 张浩. 红细胞免疫学[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1995: 11-100.
- [7] 郭峰, 虞紫茜, 赵中平. 红细胞免疫功能的初步研究[J]. 中华医学杂志, 1982, 62: 715-716.
- [8] 陈龙, 朱善良, 高伟. CCl₄致小鼠肝损伤中几种免疫介质含量变化的研究[J]. 实验生物学报, 2004, 37(1): 50-54.
- [9] KAJIKAWA O, KOYAMA H, YOSHIKAWA T, et al. Use of alpha-naphthyl acetate staining to identify T lymphocytes in cattle[J]. Am J Vet Res, 1983, 44(8): 1549-1552.
- [10] 杨廷彬, 尹学念. 实用免疫学[M]. 长春: 长春出版社, 1994: 31-45.
- [11] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2001: 133-139.
- [12] DOMZIG W, STADLER B M, HERBERMAN R B. Interleukin 2 dependence of human natural killer(NK) activity[J]. J Immunol, 1983, 130(4): 1970-1973.
- [13] 高天祥, 田竟生. 医学分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 189-190.
- [14] KARCK U, PETERS T, DECKER K. The release of tumor necrosis factor from endotoxin-stimulated rat Kupffer cells is regulated by prostaglandin E₂ and dexamethasone[J]. J Hepatol, 1988, 7: 352-361.
- [15] WANG B Y, CHEN L, MAO X Z, et al. Changes of the levels of blood NO and TNF- α concentrations in water buffaloes and goats infected with *Fasciola hepatica*[J]. Agricultural Sciences in China, 2003(3): 308-313.
- [16] CHEN L, ZHOU J, GAO W, et al. Action of NO and TNF- α release of rats with cadmium loading in mediating malfunction of multiple system organs[J]. 生理学报, 2003, 55(5): 535-540.
- [17] 许龙兵, 陈龙, 江善祥, 等. 富硒乳酸菌抑制镉诱发小鼠血浆NO和TNF- α 释放作用[J]. 南京师范大学学报: 自然科学版, 2005, 28(2): 75-78.