

# 实验性免疫应激对雏鸡血液激素与免疫功能的影响

徐 彤<sup>1</sup>, 高文伟<sup>1</sup>, 任家琰<sup>1</sup>, 贾荣平<sup>2</sup>, 贾 瑜<sup>2</sup>

(1. 山西农业大学 动物科技学院, 山西 太谷 030801; 2. 山西原平市畜禽防治站, 山西原平 034100)

**摘要:** 将 200 只 2 周龄雏鸡随机分成试验组(T)和对照组(C)。以鸡新城疫(ND)I 系疫苗作为免疫应激原, 给 T 组雏鸡肌肉接种 2 头份/(mL·只), 诱发免疫应激; C 组不做任何处理。分别于接种后不同时间检测免疫应激对试验鸡血液激素水平和免疫功能的影响。结果, T 组雏鸡血液中促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质酮(Cor)、甲状腺素(T<sub>4</sub>)显著(P< 0.05)或极显著(P< 0.01)高于 C 组, 血液中 T 淋巴细胞对 PHA 的反应性显著降低, 血清总 IgG 先减少, 后增多。血液中皮质酮与 T 淋巴细胞转化试验结果呈负相关、与血清 IgG 变化无相关性。提示发生免疫应激后, 鸡血液中 ACTH, Cor, T<sub>4</sub> 会发生明显变化; 体液免疫功能先受到抑制, 然后得到加强; 细胞免疫功能受到抑制。

**关键词:** 免疫应激; 血液激素; 体液免疫; 细胞免疫

**中图分类号:** S852.36      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-7091(2002)01-0114-05

应激是集约化、规模化养鸡业发展中值得重视的一个问题, 探明应激发生机理是建立应激监测和防制方法的科学依据, 具有重要的意义。近年来, 免疫预防接种引发鸡免疫应激常有报道<sup>[1~3]</sup>。由于应激原性质、刺激强度、持续时间以及频率的不同, 对鸡血液生理生化和免疫功能的影响存在明显的差异<sup>[4]</sup>, 关于免疫应激对这两方面的影响未见国内外报道。因此, 本试验旨在建立实验性免疫应激动物模型, 研究免疫应激对鸡血液激素和免疫功能的影响, 为从细胞和分子生物学水平阐明鸡免疫应激发生、发展机理奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和仪器

<sup>125</sup>I 皮质酮(Cor)、<sup>125</sup>I 促肾上腺皮质激素(ACTH)、<sup>125</sup>I 甲状腺素(T<sub>4</sub>)、<sup>125</sup>I 三碘甲腺原氨酸(T<sub>3</sub>) 放免试剂盒分别为美国洛杉矶 DPC 公司、天津德普生物技术和医学产品公司、山东 3V 诊断技术公司产品。<sup>3</sup>H-TdR 放免试剂盒为中国科学院原子能研究所产品, 比活性 1.0 mCi/mg, 浓度为 1 mCi/mL。植物血凝素(PHA)、MEM 细胞培养液分别购自广州医药工业研究所和上海生物制品研究所。辣根过氧化物酶标记兔抗鸡 IgG 重链单克隆抗体由江苏家禽研究所惠赠。GG-911 型 γ 放免自动检测仪、2200CA 液体闪烁分析仪分别为中国科技大学附属校办工厂, 美国 Packard 公司生产。

收稿日期: 2001-08-14

基金项目: 山西省自然科学基金资助项目(971068)

作者简介: 徐 彤(1970-), 男, 讲师, 硕士, 主要从事动物免疫教学工作。

## 1.2 试验动物饲养与分组处理

将 1 日龄海兰白雏鸡置于实验隔离室观察饲养 2 周, 无异常后, 随机分成实验组(T)和对照组(C)各 100 只, T 组用 NDI 系疫苗肌肉接种 2 头份/(mL·只), C 组不做任何处理。两组鸡饲养管理条件一致。处理后 1, 3, 5, 10, 15, 21 d, 每组取 5 只雏鸡无菌心脏采血, 分离血清, 同时另取 5 只雏鸡采肝素钠抗凝血, 分离血浆, 血清和血浆分装塑料采血管, -20℃冰箱保存待测。

## 1.3 检测指标及方法

1.3.1 ACTH 和  $T_3$  测定 取待测血清, 用 $^{125}\text{I}$ -ACTH 和 $^{125}\text{I}$ - $T_3$  放免试剂盒, 按使用说明书规定的程序检测, 用 GG-911 型  $\gamma$ -放免计数器计数放射脉冲数。

1.3.2 Cor 和  $T_4$  测定 取待测血浆, 用 $^{125}\text{I}$ 皮质酮和 $^{125}\text{I}$ - $T_4$  试剂盒, 按使用说明进行。脉冲计数同 1.3.1。

1.3.3 血液 T 淋巴细胞转化功能测定 对参考文献[5, 6]中的 $^3\text{H}$ -TdR 法略作改进用于本检测。取装量 1.8 mL MEM 培养液的培养瓶, 每瓶加入 0.1 mL 新鲜肝素钠抗凝血, 每个样品做 6 个重复, 其中 3 瓶各加 0.1 mL PHA, 使终浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 40℃培养 72 h。培养结束前 16 h, 每个样品加入 0.1 mL  $^3\text{H}$ -TdR, 使其浓度为 1  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ 。培养结束后, 将培养物移入一次性塑料管内, 用 3% 冰醋酸 6 mL 分两次冲洗培养瓶, 洗液一并加入塑料管, 2 000 r/min 离心 10 min, 反复 2 次, 弃上清液。收获沉淀物置 80℃干燥箱烘干。每管加入 0.2 mL 30% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0.6 mL 浓甲酸, 置 85℃烘箱中加热。待溶液呈无色, 将消化液体移入测样杯, 在 80℃烘箱中烤至液体少于 0.1 mL, 每杯加闪烁液 5 mL, 2200CA 液体闪烁分析仪液闪计数 CPM。结果用刺激指数(SI)表示。

1.3.4 血清 IgG 含量变化的检测 直接 Dot-ELISA 优选辣根过氧化物酶标记兔抗鸡 IgG 重链单克隆抗体工作条件, 检测倍比稀释的被检血清中 IgG 的滴度。

## 1.4 数据处理

以平均值和标准误差( $\bar{x} \pm \text{SE}$ )表示, 用方差分析和 t 检验比较组间差异的显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 接种后不同时间雏鸡血液激素水平变化

从表 1 可以看出, T 组血清 ACTH 在 1, 3, 5, 10 d 均极显著高于 C 组( $P < 0.01$ ), 接种后第 5 d ACTH 浓度达到高峰, 然后逐渐降低, 但在接种后 21 d, T 组 ACTH 浓度仍高于 C 组( $P < 0.05$ )。

T 组血浆皮质酮从接种后第 1 d 开始上升, 第 5 d 出现显著差异( $P < 0.05$ ), 第 10 d 差异极显著( $P < 0.01$ ), 第 15 d 达到高峰, 第 21 d 开始下降, 但仍显著高于 C 组( $P < 0.05$ )。

T 组血清中  $T_3$  在接种 1, 3, 15, 21 d 均无显著差异, 第 5 d 显著低于 C 组( $P < 0.05$ )。

T 组血浆中  $T_4$  从接种后第 1 d 开始上升, 第 3 d 出现显著差异, 15 d 达到高峰, 极显著高于 C 组, 21 d 开始下降, 仍高于 C 组, 但差异不显著。

### 2.2 血液中 T 淋巴细胞转化水平的变化

在预定的 3 次检测中, T 组雏鸡血液中 T 淋巴细胞转化水平与 C 组相比, 第 7 d 降低,

第 15 d 差异极显著, 第 21 d 开始回升, 但仍显著低于 C 组(表 2)。

表 1 实验性免疫应激雏鸡血液激素水平的变化

接种后时间(d)		1	3	5	10	15	21
ACTH (pg·mL <sup>-1</sup> )	试验组	115.12±41.10 A	153.60±26.44 A	224.52±24.91 A	163.20±40.10 A	112.20±10.40 a	75.66±12.50 a
	对照组	70.47±1.67	76.92±4.14	181.56±9.69	121.10±21.30	100.14±13.60	62.10±14.60
Cor (ng·mL <sup>-1</sup> )	试验组	8.56±3.59	13.12±7.30	14.72±1.67 a	22.75±9.63 A	47.12±6.67 A	40.10±7.72 a
	对照组	8.20±3.59	8.42±4.29	7.78±3.79	10.64±3.32	35.36±2.10	28.57±6.00
T <sub>3</sub> (ng·mL <sup>-1</sup> )	试验组	1.83±0.53	3.26±0.18	3.37±0.55 a	—	3.44±0.50	4.62±0.75
	对照组	2.13±0.45	3.28±0.84	5.34±0.29	—	4.29±0.45	3.30±0.17
T <sub>4</sub> (ng·mL <sup>-1</sup> )	试验组	27.44±1.98	29.39±17.96 a	57.42±8.19 A	—	65.45±14.48 A	61.75±23.14
	对照组	21.38±9.96	19.98±5.44	37.59±12.40	—	43.39±8.89	56.31±1.39

注:t 检验:a 为 P<0.05,A 为 P<0.01

2.3 血液中 IgG 的变化

接种后第 3 d T 组血液中 IgG 开始下降, 第 5 d 显著低于 C 组(P<0.05), 第 10 d 开始回升, 15 d 显著高于 C 组, 21 d 出现高峰, 极显著高于 C 组(P<0.01)(表 3)。

表 2 实验性免疫应激雏鸡血液中 T 淋巴细胞转化水平的变化

接种后时间(d)	试验组(刺激指数)	对照组(刺激指数)
7	22.1±1.6	25.6±3.4
15	17.3±1.8 A	24.7±2.6
21	19.4±1.2 a	25.4±3.6

表 3 实验性免疫应激雏鸡血液中 IgG 滴度的变化

接种后天数(d)	试验组	对照组
1	22.4±3.2	21.6±2.1
3	17.6±3.9	19.2±1.6
5	12.8±1.9 a	16.8±0.4
10	15.6±1.7	14.4±1.2
15	19.4±1.6 a	13.1±2.3
21	31.2±3.4 A	12.3±2.7

3 讨论

诱发鸡免疫应激的因素较为复杂, 预防接种过程中捕捉、惊吓, 疫苗株毒力较强, 接种过量以及其他疫苗质量问题等均可能增强鸡只的免疫应激。应激可产生广泛、复

杂的生物学效应, 应激因子一方面可刺激外周血白细胞产生 ACTH、促甲状腺素(TSH)及内啡肽等; 另一方面作用于中枢神经系统, 中枢神经对应激反应信息感受与整合, 对下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴和下丘脑—垂体—甲状腺轴等发出调节信息, 使 ACTH, TSH 以及 Cor, 甲状腺激素等合成和分泌增强。因此, 血液中 ACTH, Cor, 甲状腺激素含量变化可作为衡量发生应激及应激状态的重要指标。本试验以 2 头份 NDI 系疫苗接种 14 日龄雏鸡, 由于接种超常规剂量, 以及 NDI 系疫苗株相对于雏鸡毒力较强, 这些因素无疑会成为试验鸡的激原, 使其产生免疫应激。接种后血液激素的检出结果显示, 虽然个别试验鸡对免疫应激原反应性低, 激素水平变化差异较大, 但是 T 组群体 ACTH, Cor, T<sub>4</sub> 水平显著或极显著高于 C 组, 说明实验性免疫应激模型业已建立。被检 4 种激素中, ACTH 在整个试验期中均保持着较高水平, 极显著或显著高于 C 组; Cor 和 T<sub>4</sub> 变化较迟缓, 在接种后 5 d 和 3 d 与 C 组呈现显著差异, 第 15 d 出现高峰; T<sub>3</sub> 在接种后第 5 d 与 T<sub>4</sub> 呈反向变化, 显著低于 C 组, 其余各次检出结果与 C 组无显著差异。

T 组雏鸡血清总 IgG 接种后第 5 d 显著低于 C 组, 然后持续回升, 21 d 时极显著高于 C

组, 同时在另一试验中对 ND HI 抗体测定时亦反映出相同的消长规律, 根据免疫球蛋白产生的动力学原理分析, 这种变化似乎符合机体对抗原刺激的一般应答反应规律, 即 ND I 系疫苗株进入体内, 与母源抗体中和反应, 使血清 IgG 和 ND HI 抗体水平略有降低, 而后很快上升。但是与雏鸡 ND 正常免疫后血清 IgG 和 HI 抗体滴度消长的有关资料<sup>[7,8]</sup>比较分析, 第一, T 组雏鸡接种后血清 IgG 下降幅度大于正常 ND 免疫雏鸡; 第二, 接种后血清 IgG 显著上升的速度较正常 ND 免疫雏鸡滞后约一周。所以认为, 免疫应激时 T 组雏鸡体液免疫功能先受到抑制, 然后逐渐增强。

T 组雏鸡血液中 T 淋巴细胞对 PHA 反应性明显降低, 接种后第 15 d 出现低峰, 表现雏鸡细胞免疫功能受到一定抑制。

关于应激对免疫系统的作用机制, 一般认为是由具有免疫抑制作用的糖皮质激素介导的, 但这可能不是唯一的机制, 因为给予切除肾上腺动物应激刺激同样出现免疫抑制效应。应激对免疫系统的作用亦可通过免疫活性细胞因子的调节实现, 应激时神经内分泌反应和免疫活性细胞产生的多种递质、激素和细胞因子之间存在双向调节活性。Monjan 以脂多糖刺激小鼠 B 淋巴细胞作为观察指标, 给予声音刺激 39 d, 发现 B 淋巴细胞功能前 10 d 受到抑制, 随刺激时间延长, 其功能逐渐增强<sup>[9]</sup>。Bleaga 报道<sup>[10]</sup>, 鸡接种绵羊红细胞后, 43 ℃热应激抑制抗体产生, 42 ℃下 2 h 则促进抗体产生。因此应激类型、时间、强度、动物种系等不同, 对动物免疫功能影响的机制也不同。本试验血浆 Cor 变化与雏鸡 T 淋巴细胞转化试验结果呈现负相关。当 Cor 分泌达到峰值时, 血液中 T 淋巴细胞转化试验刺激指数最低, 而与血清 IgG 的变化无相关性。有关机制尚需进一步探讨。

## 参考文献:

- [1] 卞汝霖. 应激诱发高产蛋鸡脂肪肝综合症[J]. 中国兽医杂志, 1998, 24(9): 20.
- [2] 刘忠琛. 由应激引起父母代肉种鸡温和性 ND 和 *E. coli* 病的诊治报道[J]. 上海畜牧兽医通讯, 1996, (2): 40.
- [3] 邱怀忠. 环境应激引起 MD 的诊治报告[J]. 上海畜牧兽医通讯, 1996, (3): 22.
- [4] Stein M, Brun R, Larsen M. In: Zeckes MR[ A ]. Stress in Health and Disease[ M ]. New York: Academic Press, 1984. 97.
- [5] 刘玉斌, 苟仕金. 动物免疫学实验技术[ M ]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1989. 229– 231.
- [6] 吴建设, 张日倩, 周毓平, 等. 全血法鸡淋巴细胞转化试验最佳试验条件的研究[J]. 畜牧兽医学报, 1997, 28(3): 212– 216.
- [7] 韩维廉, 李福生, 张凌志. 等. 鸡新城疫的免疫应答[J]. 家畜传染病, 1986, (4): 4– 9.
- [8] 冯炳文. 鸡新城疫 II 系、I 系疫苗早期免疫的探讨及其免疫应答的形态学观察[J]. 畜牧兽医学报, 1986, 17(4): 249– 253.
- [9] Monjan A A, Crabitz R G, Wolfgang E, *et al.* Effect of exposure to a long-duration sound on immunological response of mice[J]. Exp Med, 1990, 846: 969– 989.
- [10] Bleaga E, Snick V, Salvati A L, *et al.* Heat-stress influence on antibody in chicken lines selected for high and low immune responsiveness[J]. Poul Sci, 1990, 69: 599– 607.

## Effects of Experimental Immunologic Stress on Blood Hormone and Immunity in Chickens

XU Tong<sup>1</sup>, GAO Wen-wei<sup>1</sup>, REN jia-yan<sup>1</sup>, JIA Rong-ping<sup>2</sup>, JIA Yu<sup>2</sup>

(Animal Science and Technology College, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

**Abstract:** 200 two-week-old chickens were randomly divided into treatment group(T) and control group(C) in this experiment. Newcastle Disease I Series(NDI) was taken as the source of immunological stress; the muscles of chicken group T were inoculated with 2 dose per chicken to induce immunological stress, and group C wasn't given any treatment. The effects of immunological stress on blood hormone level and immunity function of experimental chickens were detected at different time after inoculation. The results shows that content of ACTH、Cor and T<sub>4</sub> in the blood of group T were higher( $p < 0.05$ ) or significantly higher( $p < 0.01$ ) than that of group C; The reaction properties of T-lymphocyte in blood to PHA decreased greatly, the total content of IgG in serum first decreased and later increased. There is negative correlation between the content of Cor in blood and the transformation rate of T-lymphocyte, and there isn't any correlation between the content of Cor in blood and the change of IgG in serum. Result indicated that, after the occurrence of immunological stress, ACTH、Cor and T<sub>4</sub> in chicken blood will change evidently, the immunological function of humoral was first restrained, then enhanced; the immunological function of cell was restrained, too.

**Key words:** Immunological stress; Blood hormone; Humoral immunity; Cell immunity