

五种免疫增强剂对绍兴雏鸭胸腺组织部分炎症和凋亡相关因子表达的影响

顾天天^{1,2} 李国勤² 许文武^{1,2} 田勇^{1,2} 李柳萌³ 陈斌丹³ 曾涛^{1,2} 陈黎^{1,2} 陶争荣² 沈军达²
卢立志^{1,2*}

1 浙江农业科学院 省部共建农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室, 杭州 310021; 2 浙江省农业科学院 畜牧兽医研究所, 杭州 310021; 3 浙江国伟科技有限公司, 诸暨 311800

*通讯作者, lulizhibox@163.com

摘要 抗生素的过度使用严重威胁着鸭产业的发展, 甚至危害人类健康, 因此寻找可靠的抗生素替代物已成为当务之急。免疫增强剂可以通过提高自身非特异性免疫能力, 增强机体应对病原微生物或病原体的防御。本研究旨在对5种不同的免疫增强剂对绍兴雏鸭(*Anas platyrhynchos*)胸腺组织凋亡及免疫因子相关基因表达的影响进行研究。将150只1日龄的绍兴雏鸭随机均分为6组, 连续3 d分别于颈部皮下注射生理盐水、绿原酸、 β -葡聚糖、黄芪黄酮、未甲基化CpG的核苷酸(CpG-containing DNA, CpG DNA)和鸡免疫球蛋白G (immunoglobulin G, IgG), 18日龄采集胸腺组织, 通过qPCR结合Western blot检测炎症相关基因和凋亡基因mRNA和蛋白表达水平。结果发现, 与对照组相比, 分别注射绿原酸、 β -葡聚糖、黄芪黄酮、CpG-DNA和鸡IgG的绍兴雏鸭胸腺组织中, B淋巴细胞瘤2 (B-cell lymphoma 2, *Bcl2*) mRNA和蛋白水平均显著降低($P < 0.05$), 半胱天冬酶-3 (*Caspase3*)的表达水平均在不同程度上调。此外, 分别注射五种免疫增强剂后均在不同程度上提高了胸腺组织中诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, *iNOS*)和环氧化酶2 (cyclooxygenase-2, *COX2*)的表达水平, 干扰素- α (interferon- α , *IFN- α*)、干扰素- β (interferon- β , *IFN- β*)、白介素-1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*)、视黄酸诱导基因I (retinoic acid-inducible gene- I, *RIG- I*)、Toll样受体3 (toll-like receptor 3, *TLR3*)和Toll样受体7 (toll-like receptor 7, *TLR7*)基因的mRNA水平均呈现不同程度的上调表达。综上所述, 绿原酸、 β -葡聚糖、黄芪黄酮、CpG-DNA和鸡IgG可作为免疫增强剂调控鸭先天性免疫。本研究为预防鸭重要传染性疾病提供新途径, 同时也为动物生产过程中抗生素替代物的应用提供一定的参考。

关键词 免疫增强剂; 胸腺; 天然免疫应答; 绍兴雏鸭

中图分类号 S834 文献标识码 A

Effects of Five Immunopotentiators on the Expression of Some Inflammatory and Apoptosis-related Factors in Thymus Tissues of Shaoxing Ducklings (*Anas platyrhynchos*)

GU Tian-Tian¹ LI Guo-Qin¹ XU Wen-Wu¹ TIAN Yong¹ LI Liu-Meng² CHEN Bin-Dan²
ZENG Tao¹ CHEN Li¹ TAO Zheng-Rong¹ SHEN Jun-Da¹ LU Li-Zhi^{1*}

1 State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Institute of Animal Science & Veterinary, Zhejiang Academy of Agricultural Science, Hangzhou 310021, China; 2 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science,

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-42-6); 浙江省农业(畜禽)新品种选育重大科技专项(2021C02068-10); 浙江省重点研发项目(2018C04014)

收稿日期: 2021-09-18 接受日期: 2021-11-03

Abstract The misuse of antibiotics seriously imperils the development of duck husbandry and even endangers human health. Therefore, it is urgent to find reliable alternatives to antibiotics. Immunopotentiator can effectively increase the ability of specific immune responses to enhance the defense against microorganisms or pathogens. The aim of this study was to investigate the effects of 5 different immunopotentiators on the thymus apoptosis and immune-related gene expression in Shaoxing ducklings (*Anas platyrhynchos*). The 150 1-day-old Shaoxing ducklings were randomly divided into 6 groups, and saline, chlorogenic acid, β -D-glucan, astragalus flavone, nonmethylated CpG DNA and chicken immunoglobulin G (IgG), were injected subcutaneously once daily for 3 d, respectively. At the age of 18 d, the mRNA and protein expression of apoptosis and immune-related genes were detected by qPCR and Western blot. The results showed that compared with control group, the mRNA and protein levels of thymus B-cell lymphoma 2 (*Bcl2*) were significantly decreased during injecting chlorogenic acid, β -D-glucan, astragalus flavone, nonmethylated CpG DNA and chicken IgG, respectively ($P < 0.05$). And the expression levels of thymus *Caspase 3* showed significantly up-regulated in some extent ($P < 0.05$). In addition, the expression level of thymus inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) and cyclooxygenase-2 (*COX2*) were increased in some extent during injecting 5 different immunopotentiators, respectively. Meanwhile, compared with control group, the levels of interferon- α (*IFN- α*), interferon- β (*IFN- β*), interleukin-1 β (*IL-1 β*), tumor necrosis factor- α (*TNF- α*), retinoic acid-inducible gene-1 (*RIG-I*), toll-like receptor 3 (*TLR3*) and toll-like receptor 7 (*TLR7*) mRNA expression were up-regulated in some extent during injecting 5 different immunopotentiators, respectively. Taken together, chlorogenic acid, β -D-Glucan, astragalus flavone, nonmethylated CpG DNA and chicken IgG could be used as immunopotentiators to regulate duck innate immune. This study provides new insight to prevent the duck disease from pathogen infections, and provides reference for reliable alternatives to antibiotics in animal production.

Keywords Immunopotentiators; Thymus; Innate immune response; Shaoxing ducklings

我国作为世界养鸭(*Anas platyrhynchos*)第一大国,鸭养殖量占全球的74.2%,饲养量平均每年以10%~15%的速度递增(侯水生等,2007)。然而,近年来,随着我国集约化和规模化养殖业的快速发展以及养鸭模式的迅速转变,造成机体免疫功能紊乱,抗病力下降,鸭的疾病尤其是病毒性传染病的传播与危害日趋严重,不仅给养鸭业造成了严重的损失,而且可能危害公共卫生安全(Casewell et al., 2003; Mathew et al., 2007; Millet, Maertens, 2011)。抗生素作为我国长期以来防治鸭传染性疾病的主要手段,可以有效促进生产,提高生产性能。但抗生素的过度使用不仅提高了细菌病原体的耐药性,降低机体免疫力,而且鸭产品中抗生素的残留对环境造成了严重的影响,甚至危害人类健康(杨波,2007; Seal et al., 2013)。因此,寻找有效的抗生素替代物已成为当务之急(Millet, Maertens, 2011; Dahiya et al., 2006)。

免疫增强剂是一种可以通过增强自身非特异性免疫,以应对机体对抗病原微生物或病原体防御

的调节剂(王玉堂,2016)。陈如明和单忠芳(1996)研究报道黄芪多糖和当归多糖等植物性多糖通过提高机体内免疫细胞抗体的生成,激活体内免疫活性,增强免疫能力。在病毒感染过程中,先天免疫可以通过激活模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRRs)产生快速防御应答反应。Toll样受体(toll-like receptor, TLR)和视黄酸诱导基因 I (retinoic acid inducible gene- I)样受体(RIG-I-like receptor, RLR)作为 PRRs 的重要成员,当机体受到病原体或病原微生物侵袭时,能够激活体内的核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B)信号通路,诱导 I 型干扰素和炎症因子的产生,增强宿主的天然免疫(Takeda, 2005)。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)作为 NF- κ B 的刺激因子,能够增强巨噬细胞活性,提高其杀伤活性,释放超氧阴离子和一氧化氮(nitric oxide, NO)(窦肇华等,2004)。同时,诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)作为 NO 合成过程中重要的诱导型激酶(García et al., 2009)。iNOS 和环氧化酶 2 (cyclo-

oxygenase-2, COX2)基因的表达上调与NF- κ B信号通路密切相关。当细胞受到刺激时,NF- κ B抑制蛋白(inhibitor of NF- κ B, I κ B)诱导发生磷酸化并解离活化二聚体,转位于细胞核内促进胞内*iNOS*基因转录与表达(Bauerle, Baltimore, 1996)。Hiss和Sauerwein (2003)研究表明 β -葡聚糖可以提高猪(*Sus scrofa*)的PRRs滴度,从而提高断奶仔猪的免疫力。此外,NF- κ B参与了多种凋亡相关基因的转录调控(Campbell, Perkins, 2006; Shishodia, Aggarwal, 2002),细胞凋亡发生过程中,一方面可以通过介导TNF- α 活化细胞内NF- κ B、P53等基因,激活Caspase8 (Peter, Krammer, 2003);另一方面B淋巴细胞瘤2 (B-cell lymphoma 2, *Bcl2*)上调可以阻止线粒体内的细胞色素C的释放,抑制线粒体凋亡的产生(Edlich, 2018),两者最终导致效应性半胱天冬酶-3 (Caspase3)活化。Kim等(2009)研究表明人(*Homo sapiens*)结肠癌细胞受到 β -葡聚糖处理后显著抑制了*Bcl2* mRNA的表达,增加*Caspase3* mRNA的表达水平。表明免疫增强剂可以明显增强免疫系统的功能。然而,免疫增强剂的调控作用机制复杂,免疫增强剂能否触发鸭先天免疫反应以及诱导适应性免疫反应尚不清楚。

本课题组前期通过体外筛选22种不同的免疫增强剂,发现绿原酸、 β -葡聚糖、黄芪黄酮、未甲基化CpG的核苷酸(CpG-containing DNA, CpG DNA)和鸡免疫球蛋白G (immunoglobulin G, IgG)在鸭胚胎成纤维细胞中具有积极的免疫调节作用(Gu et al., 2020)。本研究以绍兴雏鸭为研究对象,进一步探讨这5种不同的免疫增强剂对绍兴雏鸭胸腺组织凋亡及免疫因子相关基因表达的影响,以期为其在调控鸭天然免疫功能中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

绍兴雏鸭(*Anas platyrhynchos*)由周口桂柳种鸭育种有限公司提供。取150只健康的1日龄绍兴雏鸭随机分成6组(每组25只,自由取食,饮水),随后连续3 d分别于颈部皮下(孙秋艳等, 2018)注射生理盐水(0.5 mL)、绿原酸(0.4 mL, 1 mg/mL)(源叶, 上海)、 β -葡聚糖(0.7 mL, 1 mg/mL)(源叶, 上海)、黄芪黄酮(0.4 mL, 5 mg/mL)(源叶, 上海)、CpG-DNA (5'-GATATGCGACCGATT-3', 0.5 mL, 5 μ g/mL)(擎

科, 北京)和鸡IgG (0.5 mL, 1 mg/mL)(索莱宝, 北京)(Gu et al., 2020)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的采集与处理

在第18日龄,每组分别随机抽取5只雏鸭,颈部放血处死,解剖取胸腺,用无菌生理盐水轻轻晃动清除绒毛,置于液氮中保存。

1.2.2 免疫印迹(Western blot)

用RIPA (radio immunoprecipitation assay)裂解液和蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)溶解胸腺组织,用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白浓度(碧云天, 上海)。采用SDS-PAGE法从各组胸腺组织中分离出30 μ g总蛋白,并转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)印迹膜上。用5%脱脂奶粉封闭PVDF膜,然后用抗*Bcl2* (1:500; Abcam, 英国), *Caspase3* (1:1000; Abcam, 英国), *iNOS* (1:1000; Abcam, 英国), *COX2* (1:500; Bioybyt, 英国)和3磷酸-甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(1:10000; Abcam)的一抗4 $^{\circ}$ C过夜孵育。用含吐温20的Tris缓冲溶液(tris buffered saline with tween 20, TBST)洗涤后,用辣根过氧化物酶结合二抗(1:5000)孵育膜,并用ChamChem化学发光凝胶成像系统(赛智创业科技有限公司, 北京)观察免疫印迹并拍照,灰度值图像用Image J进行统计。

1.2.3 荧光定量PCR (qPCR)

采用TRIzol法提取各胸腺组织总RNA,按照天根(北京)反转录试剂盒说明书将RNA反转录为cDNA。然后以cDNA为模板进行qPCR。采用Primer Premier 5软件设计引物(表1),由北京擎科生物技术有限公司合成。按照PowerUp SYBR Green Master Mix试剂盒(Thermo, 美国)说明书进行操作,反应体系在ABI 7500荧光定量PCR仪(ABI, 美国)上进行。以 β -actin作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的相对表达量。

1.2.4 数据分析

采用SPSS 25.0统计软件中的*t*-test方法进行分析,GraphPad8.0软件制图,结果以 $\bar{X}\pm SD$ 来表示, $P<0.05$ 代表差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同免疫增强剂对绍兴雏鸭胸腺凋亡基因的影响

由图1可以看出,较对照组而言,分别注射绿原酸、 β -葡聚糖、黄芪黄酮、CpG-DNA和鸡IgG后,绍兴雏鸭胸腺*Bcl2*的蛋白表达和mRNA水平显著降低($P < 0.05$)(图1A; 1B; 1D)。此外,分别注射这5种免疫增强剂后,与对照相比,*Caspase3*基因的蛋白表达水平显著上调($P < 0.05$)(图1A; 1C),而其mRNA水平在注射绿原酸、 β -葡聚糖和CpG-DNA后表达量显著增加($P < 0.05$)(图1E)。

2.2 不同免疫增强剂对绍兴雏鸭胸腺免疫和炎症相关基因的影响

与对照组相比,分别注射绿原酸、 β -葡聚糖和鸡IgG后,绍兴雏鸭胸腺*iNOS*的蛋白水平显著提高($P < 0.05$)(图2A; 2B),而其mRNA水平在注射绿原酸、CpG-DNA和鸡IgG后显著上调($P < 0.05$)(图2D)。此外,分别注射绿原酸、 β -葡聚糖、CpG-DNA和鸡IgG后,*COX2*的蛋白水平较对照组显著增加($P < 0.05$)(图2A; 2C),而其mRNA水平在分别注射这五种免疫增强剂后表达量均显著增加($P < 0.05$)

(图2E)。对绍兴雏鸭胸腺免疫炎症因子*IFN- α* 、*IFN- β* 、*IL-1 β* 和*TNF- α* 进行研究,结果发现与对照组相比,分别注射绿原酸、黄芪黄酮、CpG-DNA和鸡IgG后,*IFN- α* 和*IFN- β* 基因的mRNA水平显著上调($P < 0.05$),而注射 β -葡聚糖后*IFN- α* 和*IFN- β* 基因的mRNA水平未发生明显的变化($P > 0.05$)(图2F; 2G)。同时,分别注射绿原酸和鸡IgG后,*IL-1 β* 基因的mRNA水平较对照组而言显著增加($P < 0.05$),而注射 β -葡聚糖、黄芪黄酮和CpG-DNA后*IL-1 β* 基因的mRNA水平未发生显著的变化($P > 0.05$)(图2H)。此外,相较对照组而言,分别注射绿原酸和 β -葡聚糖后*TNF- α* 基因mRNA表达水平显著上调($P < 0.05$),而注射黄芪黄酮、CpG-DNA和鸡IgG后,*TNF- α* 基因mRNA表达水平未发生明显的变化($P > 0.05$)(图2I),表明注射这五种免疫增强剂后胸腺组织中*iNOS*、*COX2*、*IFN- α* 、*IFN- β* 、*IL-1 β* 和*TNF- α* 的表达量均呈现不同程度的提高。

2.3 不同免疫增强剂对绍兴雏鸭胸腺*RIG-I*、*TLR3*和*TLR7*基因的影响

先天免疫可以通过激活PRRs产生快速防御应答反应。病毒性传染病一般是由单链或者双链的RNA组成,*TLR3*和*RIG-I*能够识别双链病毒

表1 qPCR引物信息

Table 1 Information of primers for qPCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'~3') Primer sequence	用途 Usage
qCOX-2	F: CACGCTCTGATTGTTGCC; R: AGGATTTGTAGGGATGGG	qPCR
qiNOS	F: CCACCAGGAGATGTTGAATATGTC; R: AGGATTTGTAGGGATGGG	
qCaspase3	F: CTACTGCTCCAGGCTATTACT; R: AACTCTGCGATTTACACG	
qBcl2	F: TCTCGCAGAGGGGATAC; R: ACATCTGGGCGAAGTCC	
qIFN- β	F: CACCTCCTCCAACACCTCTT; R: TGGAGGAAGTGTGGATGCT	
qIL-1 β	F: TGGGCATCAAGGGCTACAAG; R: GCTGTGATGTCCCTCATGAC	
qTNF- α	F: CACAGGACAGCCTATGCCAACA; R: CTGAACTGGGCGTGCATAAAAATAC	
qRIG- I	F: AGCAGCAGGCATAACTAACTCA; R: TCACTGTCAACATCTTTGGCATT	
qTLR3	F: GCAACACTCCGCCTAAGTATCA; R: CAGTAGAAAGCTATCCTCCACCCT	
qTLR7	F: GACAACCTTTCCAGAGCATTC; R: ACAGCCTTTTCCTCAGCCTAAC	
qIFN- α	F: TCCTCCAACACCTCTTCGAC; R: GGGCTGTAGGTGTGGTTCTG	
β -actin	F: ATGTCGCCCTGGATTTTCG; R: CACAGGACTCCATACCCAAGAA	内参基因 Reference gene

COX-2: 环氧化酶2; iNOS: 一氧化氮合酶; Caspase3: 半胱天冬酶-3; Bcl2: B淋巴细胞瘤2; IFN- β : 干扰素- β ; IL-1 β : 白介素-1 β ; TNF- α : 肿瘤坏死因子 α ; RIG- I : 视黄酸诱导基因 I ; TLR3: Toll样受体3; TLR7: Toll样受体7; IFN- α : 干扰素- α ; 下同
COX-2: Cyclooxygenase-2; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; Bcl2: B-cell lymphoma 2; IFN- β : Interferon- β ; IL-1 β : Interleukin-1 β ; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; RIG- I : Acid-inducible gene- I ; TLR3: Toll-like receptor 3; TLR7: Toll-like receptor 7; The same below

RNA, *TLR7* 识别病毒单链 RNA 和小干扰 RNA (Takeda, 2005), 本研究利用 5 种不同的免疫增强剂探究绍兴雏鸭胸腺组织 *RIG- I*、*TLR3* 和 *TLR7* 的表达变化。由图 3 可知, 分别注射不同免疫增强剂后, 雏鸭胸腺组织 *RIG- I*、*TLR3* 和 *TLR7* 基因 mRNA 水平均发生明显的变化。与对照组相比, 注射绿原酸、 β -葡聚糖、黄芪黄酮、CpG-DNA 和鸡 IgG 的绍兴雏鸭胸腺中, *RIG- I* 和 *TLR3* 基因的 mRNA 水平显著上调 ($P < 0.05$)。而 *TLR7* 基因 mRNA 表达水平仅在注射绿原酸、黄芪黄酮和鸡 IgG 后显著上调 ($P < 0.05$), 表明注射这五种免疫增强剂后可以显著提高胸腺组织中模式识别受体相关基因的表达量。

3 讨论

细胞凋亡是由基因调控的细胞自杀性死亡的过程, 可以及时清除体内过剩或有害的细胞从而调节机体的发育并维持内环境稳态 (Tsuchiya, 2021)。本研究表明, 分别注射绿原酸、 β -葡聚糖、黄芪黄酮、CpG-DNA 和鸡 IgG 后, 雏鸭胸腺组织 *Caspase3* mRNA 和蛋白水平较对照组而言显著升高, 而 *Bcl2* 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低。这与哺乳动物研究结果一致。Yamagata 等 (2018) 研究表明绿原酸处理人肺癌细胞后可显著降低 *Bcl2* 的 mRNA 表达水平, 升高 *Caspase3* mRNA 的表达, 从而抑制癌细胞的增殖。Kim 等 (2009) 研究证实 β -葡聚糖处

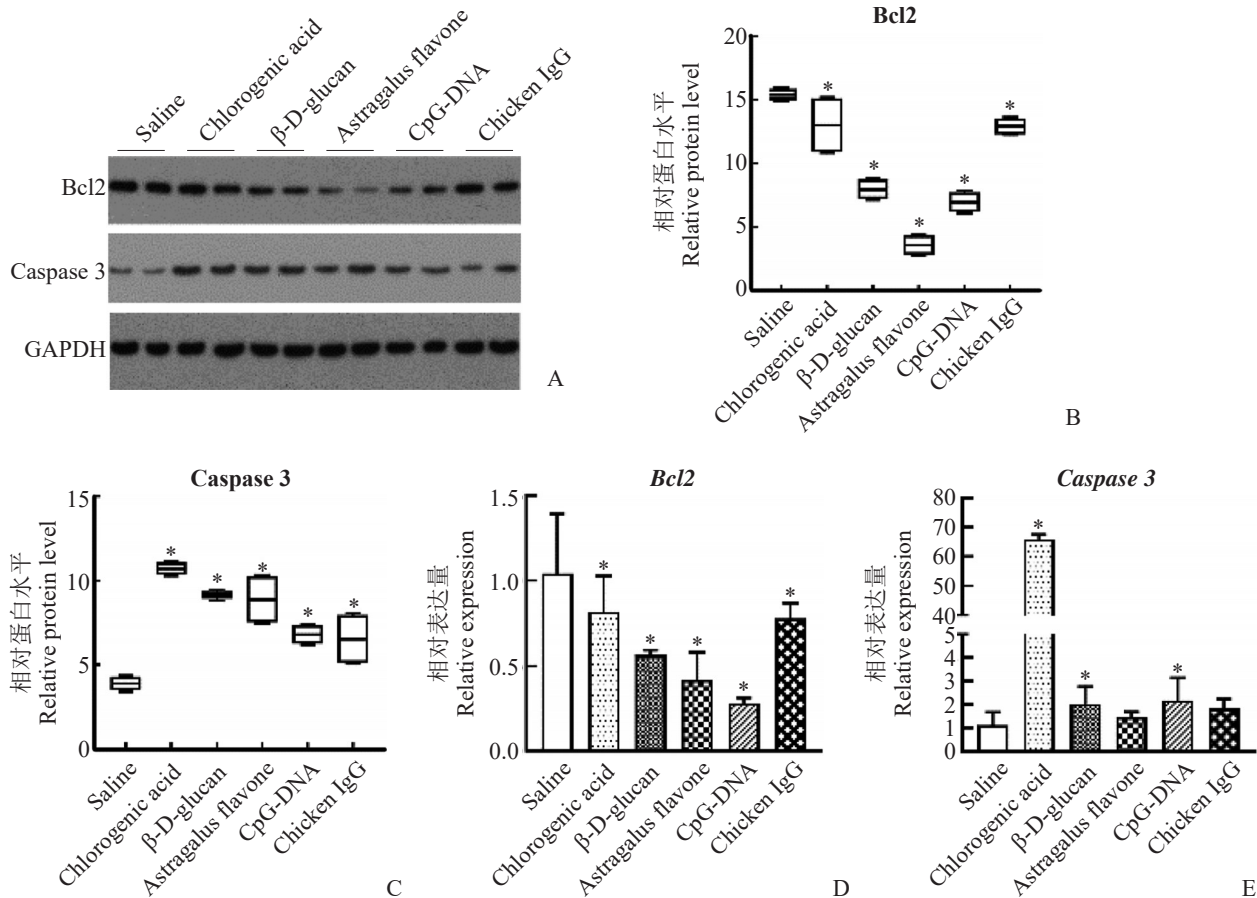


图 1 不同免疫增强剂对绍兴雏鸭胸腺凋亡基因的影响

Figure 1 Effect of different immunopotentiators on thymus apoptosis-related genes in Shaoxing ducklings

A. Western blot. B, C. 相对蛋白水平。D, E. 基因相对表达量。Saline: 生理盐水组; Chlorogenic acid: 绿原酸组; β -D-Glucan: β -葡聚糖组; Astragalus flavone: 黄芪黄酮组; CpG-DNA: 未甲基化 CpG 的核苷酸组; Chicken IgG: 鸡 IgG 组。*: 与生理盐水组相比差异显著 ($P < 0.05$); 下同

A. Western blot. B, C. Relative protein level. D, E. Gene relative expression. Saline: Saline group; Chlorogenic acid: Chlorogenic acid group; β -D-Glucan: β -D-Glucan group; Astragalus flavone: Astragalus flavone group; CpG-DNA: Nonmethylated CpG-containing DNA; Chicken IgG: Chicken IgG group. *: Significant difference compared with saline group ($P < 0.05$); The same below

理人结肠癌细胞后显著抑制了 *Bcl2* mRNA 的表达水平,上调 *Caspase3* mRNA 的表达水平。表明这5种免疫增强剂能显著诱导绍兴雏鸭胸腺组织促凋亡因子的生成,进而导致细胞发生凋亡。

炎症反应是一个双向的过程,一方面损伤因子

通过损伤组织和细胞产生炎症反应,另一方面机体通过炎症产生的渗出反应进一步抵抗损伤因子,从而修复受损组织(Arroyo, Iruela-Arispe, 2010)。本研究利用5种不同的免疫增强剂对绍兴雏鸭胸腺抗炎作用及机制进行深入的探讨,发现绿原酸、 β -

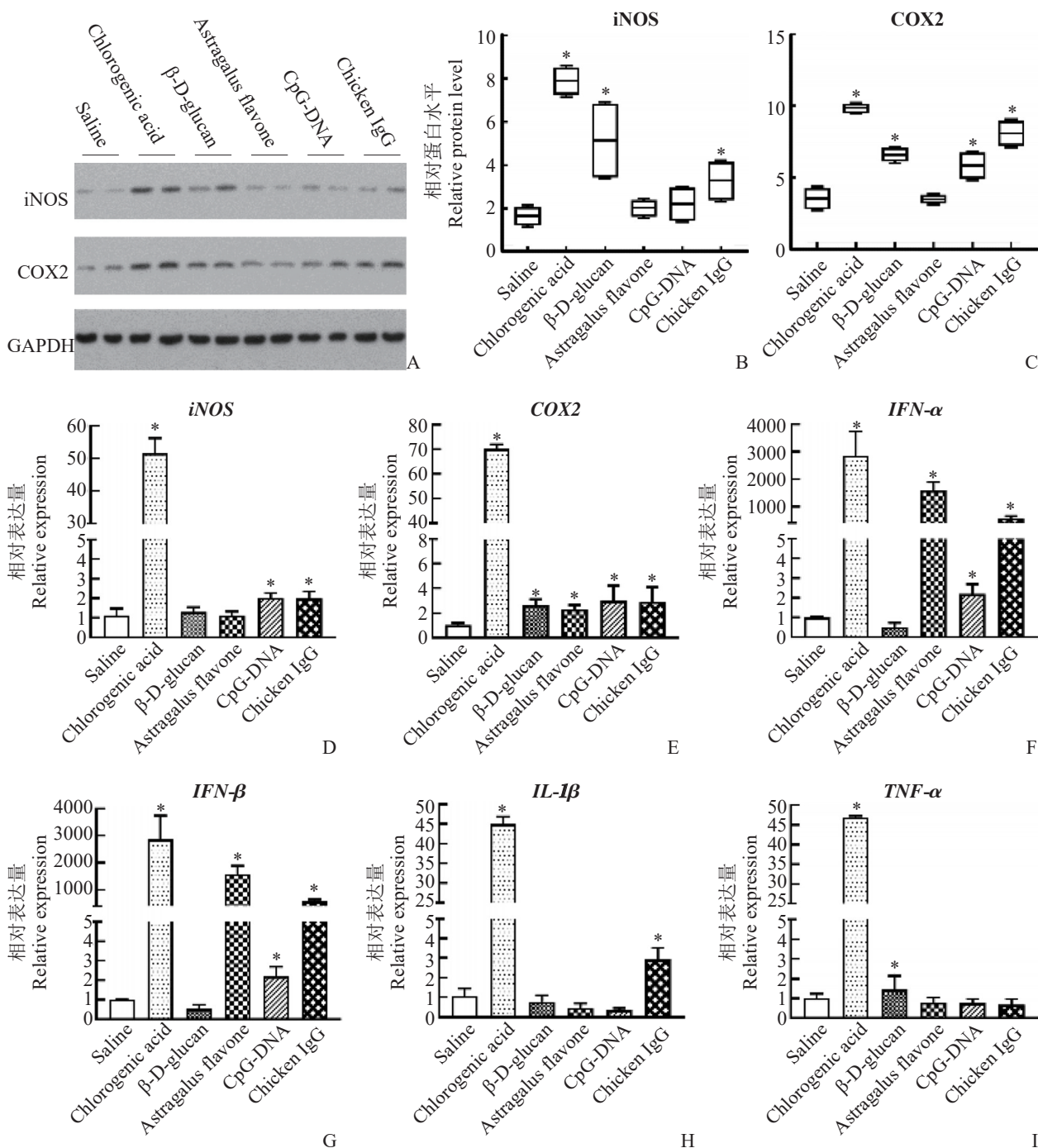


图2 不同免疫增强剂对绍兴雏鸭胸腺免疫炎症相关基因的影响

Figure 2 Effect of different immunopotentiators on thymus immune inflammation-related genes in Shaoxing Ducklings

A. Western blot. B~C. 相对蛋白水平. D~I. 基因相对表达量

A. Western blot. B~C. Relative protein level. D~I. Gene relative expression

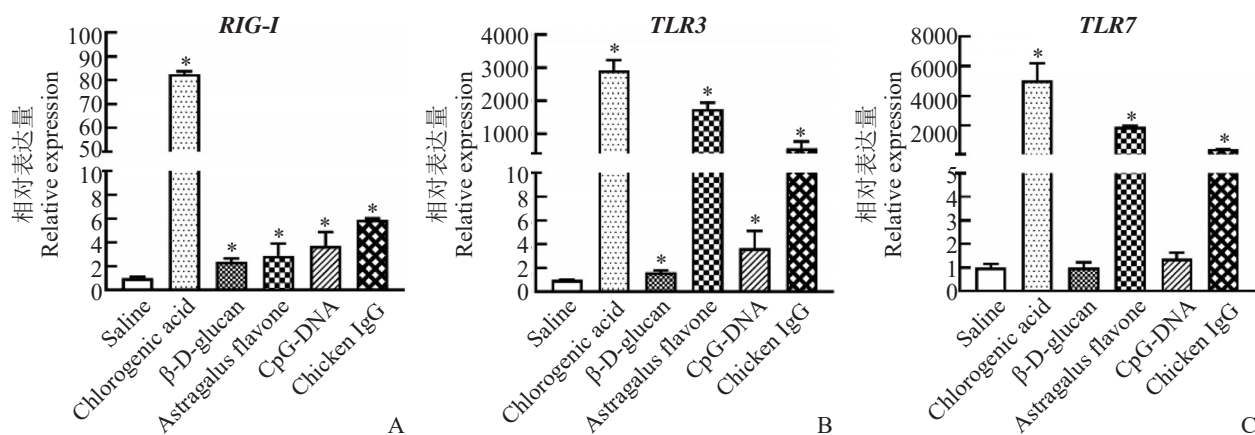


图4 不同免疫增强剂对绍兴雏鸭胸腺 PRRs 基因的影响

Figure 4 Effect of different immunopotentiators on thymus PRRs genes in Shaoxing ducklings

葡聚糖和鸡 IgG 显著增加绍兴鸭 *iNOS* 的蛋白水平,而 mRNA 水平仅在注射绿原酸、CpG DNA 和鸡 IgG 中显著提高,此外分别注射绿原酸、 β -葡聚糖、黄芪黄酮、CpG-DNA 和鸡 IgG 可以显著提高 *COX2* 的蛋白和 mRNA 水平。同时研究发现,注射不同免疫增强剂的胸腺组织中 *Caspase 3*、*iNOS* 和 *COX2* mRNA 和蛋白水平表达水平存在差异,这可能是由于基因表达调控过程中存在动态转换关系,即在转录后过程中存在转录后加工、转录产物的降解、翻译、翻译后修饰等多个过程(Liu et al., 2016)。此外,分别注射绿原酸和鸡 IgG 的雏鸭胸腺组织 *IL-1 β* 的 mRNA 水平较对照组显著提高,同时,绿原酸和 β -葡聚糖处理显著增强了雏鸭胸腺组织 *TNF- α* 的表达,这与哺乳动物研究结果一致。宋卓等(2014)研究发现绿原酸处理小鼠(*Mus musculus*)后,可以显著提高机体 *IL-1 β* 和 *TNF- α* mRNA 的表达水平,促进 *iNOS* 和 *COX2* mRNA 的转录。王萌(2020)研究发现黄芪黄酮处理小鼠单核巨噬细胞后促进了 *IL-1 β* 、*TNF- α* mRNA 的转录水平。这些结果提示绿原酸、 β -葡聚糖、黄芪黄酮、CpG-DNA 和鸡 IgG 可在不同程度上通过改善体内胸腺组织中 *TNF- α* 和 *IL-1 β* 的表达,提高体内 NO 的合成,从而增强绍兴鸭机体的非特异性免疫,最终改善雏鸭机体的免疫状态(Suzuki et al., 2002)。

模式识别受体是先天免疫系统重要组成成分,可以作为病原体的监视器监测细胞内、外感染,增强宿主的非特异性免疫能力,促进 I 型干扰素和免疫炎症因子的产生(Takeda, 2005)。Karasawa 等(2011)研究发现小鼠饲喂绿原酸后可以显著刺激机体 *IFN* mRNA 的表达水平,激活机体免疫系统。本

研究结果也表明,注射绿原酸、黄芪黄酮、CpG-DNA 和鸡 IgG 后,雏鸭胸腺组织 *IFN- α* 和 *IFN- β* 的表达量显著提高,同时 *RIG- I* 和 *TLR3* 的 mRNA 水平显著增加,且 *TLR7* 的 mRNA 水平在注射绿原酸、黄芪黄酮和鸡 IgG 中显著增加。然而,由于不同品种家禽的免疫器官与免疫功能存在差异,李国勤等(2008)研究表明缙云麻鸭和绍兴鸭的免疫系统发育与细胞免疫功能均有一定差异,因此关于免疫增强剂是否能够调控不同品种地方鸭的免疫能力还需要进一步的验证。这些结果表明这 5 种不同的免疫增强剂可以通过激活模式识别受体诱导 I 型干扰素的产生,进而调控先天性免疫反应,增强绍兴雏鸭机体免疫能力。

4 结论

本研究分别利用绿原酸、 β -葡聚糖、黄芪黄酮、CpG DNA 和鸡 IgG 注射绍兴雏鸭,检测胸腺组织中炎症相关基因和凋亡基因的表达。结果表明,绿原酸、 β -葡聚糖、黄芪黄酮、CpG DNA 和鸡 IgG 在不同程度上降低了胸腺组织中 *Bcl2* 基因的表达水平,提高了 *Caspase 3*、*iNOS*、*COX2*、*IFN- α* 、*IFN- β* 、*IL-1 β* 、*TNF- α* 、*RIG- I*、*TLR3* 和 *TLR7* 基因的表达。这些结果提示,免疫增强剂在绍兴鸭天然免疫中发挥着重要的调控作用,为预防鸭重要传染性疾病,同时也为动物生产过程中抗生素替代物的应用提供一定的理论依据。

参考文献

陈如明,单忠芳. 1996. 复方中药制剂预防 IBD 的研究[J]. 中

- 兽医医药杂志, (1): 3-4. (Chen R M, Shan Z F. 1996. Study on prevention of IBD with compound traditional Chinese medicine[J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, (1): 3-4.)
- 窦肇华, 张远强, 郭顺根. 2004. 免疫细胞学与疾病[M]. 中国医药科技出版社, 北京. pp. 106-127. (Dou Z H, Zhang Y Q, Guo S G. 2004. Immunocytology and Diseases [M]. China Medical Science and Technology Press, Beijing. pp. 106-127.)
- 侯水生, 黄苇, 刘五岳. 2007. 我国养鸭业发展现状与前景分析[J]. 水禽世界, (1): 38-39. (Hou S H, Huang W, Liu W Y. 2007. Analysis on the development status and prospect of duck industry in China[J]. Waterfowl World, (1): 38-39.)
- 李国勤, 卢立志, 罗锦标, 等. 2008. 缙云麻鸭与绍兴鸭免疫器官与细胞免疫功能比较研究[J]. 中国家禽, 30(4): 19-21. (Li G Q, Lu L L, Luo J B, et al. 2008. Comparative study on the immune organs and between Jingyun and Shaoxing cell immune function ducks[J]. China Poultry, 30(4):19-21.)
- 宋卓, 黄康, 黄林, 等. 2014. 高剂量绿原酸对脂多糖诱导肝脏炎症因子 mRNA 表达的影响[J]. 营养学报, 36(5): 481-485. (Song Z, Huang K, Huang L, et al. 2014. Effect of chlorogenic acid at high dose on expression of hepatic inflammatory cytokines mRNA induced by lipopolysaccharides[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 36(5):481-485.)
- 孙军培, 刘久华. 2013. Apaf-1、Caspase-9 及凋亡体调节的研究进展[J]. 中华全科医学, 11(7): 1102-1104. (Sun J P, Liu J H. 2013. Research progress of Apaf-1, caspase-9 and apoptotic regulation[J]. Chinese Journal of General Practice, 11(7): 1102-1104.)
- 孙秋艳, 沈美艳, 朱明恩, 等. 2018. 浒苔多糖对鸡免疫增强效果的研究[J]. 动物医学进展, 39(01): 51-55. (Sun Y Q, Shen M Y, Zhu M E, et al. 2018. Immunological enhancement effects of enteromorpha polysaccharides on Chickens[J]. Progress in Veterinary Medicine, 39(01): 51-55.)
- 王萌, 郭泽, 周鸿缘, 等. 2020. 黄芪总黄酮对巨噬细胞 RAW264.7 抗炎免疫的双向调节研究[J]. 中国预防兽医学报, 42(8): 1-7. (Wang M, Guo Z, Zhou H Y, et al. 2020. Study on the bi-directional regulation of anti-inflammatory immune response by total flavonoids of *Astragalus* in macrophages RAW264.7[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 42(8): 1-7.)
- 王玉堂. 2016. 渔用免疫增强剂的科研进展(一)[J]. 中国水产, (1): 75-77. (Wang Y T. 2016. Research progress of fishery immune enhancers (one) [J]. China Fisheries, (1): 75-77.)
- 杨波. 2007. 饲用抗生素的使用现状及面临的挑战[J]. 饲料工业, 28(22): 3-5. (Yang B. 2007. Current situation and challenges of feed antibiotics[J]. Feed Industry, 28(22): 3-5.)
- Arroyo A G, Iruela-Arispe M L. 2010. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response[J]. Cardiovascular Research, 86(2): 226-235.
- Baeuerle P A, Baltimore D. 1996. NF-kappa B: Ten years after [J]. Cell, 87(1): 13-20.
- Campbell K J, Perkins N D. 2006. Regulation of NF-kappaB function[J]. Biochemical Society Symposia, 73: 165-180.
- Casewell M, Friis C, Marco E, et al. 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health[J]. Journal of Antimicrob Chemother, 52(2): 159-161.
- Dahiya J P, Wilkie D C, Kessel A, et al. 2006. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era[J]. Animal Feed Science & Technology, 129(1): 60-88.
- Edlich F. 2018. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 500(1): 26-34.
- García-Criado F J, Rodríguez-Barca P, García-Cenador M B, et al. 2009. Protective effect of new nitrosothiols on the early inflammatory response to kidney ischemia/reperfusion and transplantation in rats[J]. Journal of Interferon & Cytokine Research, 29(8): 441-450.
- Gu T, Li G, Wu X, et al. 2020. Effects of immunopotentiators on biochemical parameters, proinflammatory cytokine, and nonspecific immune responses in Shaoxing ducklings[J]. Poultry Science, 99(11): 5461-5471.
- Hiss S, Sauerwein H. 2003. Influence of dietary ss-glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentrations in pigs[J]. Journal of Animal Physiology & Animal Nutrition, 87(1): 2-11.
- Jang S I, Marsden M J, Kim Y G, et al. 2010. The effect of glycyrrhizin on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), leucocyte responses[J]. Journal of Fish Diseases, 18(4): 307-315.
- Karasawa K, Uzuhashi Y, Hirota M, et al. 2011. A matured fruit extract of date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) stimulates the cellular immune system in mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(20): 11287-11293.

- Kim M J, Hong S Y, Kim S K, et al. 2009. Beta-Glucan enhanced apoptosis in human colon cancer cells SNU-C4. *Nutrition Research & Practice*, 3(3): 180-184.
- Liu Y, Beyer A, Aebersold R. 2016. On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance[J]. *Cell*, 165(3): 535-550.
- Mathew A G, Cissell R, Liamthong S. 2007. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: A United States perspective of livestock production[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(2): 115-133.
- Millet S, Maertens L. 2011. The European ban on antibiotic growth promoters in animal feed: From challenges to opportunities[J]. *Veterinary Journal*, 187(2): 143-144.
- Peter M E, Krammer P H. 2003. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond[J]. *Cell Death & Differentiation*, 10(1): 26-35.
- Seal B S, Lillehoj H S, Donovan D M, et al. 2013. Alternatives to antibiotics: A symposium on the challenges and solutions for animal production[J]. *Animal Health Research Reviews*, 14(1): 78-87.
- Shishodia S, Aggarwal B B. 2002. Nuclear factor-kappaB activation: A question of life or death[J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1): 28-40.
- Suzuki T, Kumamoto H, Ooya K, et al. 2002. Expression of inducible nitric oxide synthase and heat shock proteins in periapical inflammatory lesions[J]. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 31(8): 488-493.
- Takeda K. 2005. Toll-like receptors in innate immunity[J]. *International Immunology*, 17(1): 1-14.
- Tsuchiya K. 2021. Switching from apoptosis to pyroptosis: gasdermin-elicited inflammation and antitumor immunity[J]. *International Journal of Molecular Science*, 22(1): 426-449.
- Ueno H, Hawrylowicz C M, Banchereau J. 2007. Immunological intervention in human diseases[J]. *Journal of Translational Medicine*, 5: 59-66.
- Yamagata K, Izawa Y, Onodera D, et al. 2018. Chlorogenic acid regulates apoptosis and stem cell marker-related gene expression in A549 human lung cancer cells[J]. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 441(1): 9-19.

(责任编辑 金素娟)