

脉络宁注射液醇沉废弃物对雏鸡免疫系统和生长性能的影响

肖秋萍^{1,2}, 何成华^{1,2}, 朱华旭², 刘双双², 郭立玮², 段金厥², 汤卫国³(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095; 2. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023; 3. 金陵药业股份有限公司, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 探讨脉络宁注射液醇沉废弃物对雏鸡免疫系统和生长性能的影响。**方法** 将1日龄雏鸡随机分为空白组和实验组(饮水中醇沉物浓度分别为1%、3%、5%**组**), 每组20羽雏鸡, 连续饲养42 d。雏鸡7日龄和21日龄进行新城疫活疫苗免疫, 分别测定各组雏鸡的平均体质量(每周1次)、料肉比; 21日龄和42日龄雏鸡的血清总蛋白、血清球蛋白、新城疫抗体水平和免疫器官指数, 并观察42日龄各组雏鸡的胸腺、脾和法氏囊组织结构。**结果** 实验组与空白组比较, 体质量离散程度明显减小, 集中趋势增强; 血清总蛋白、球蛋白和新城疫抗体水平均增高, 且21日龄雏鸡实验组的球蛋白及新城疫抗体水平显著高于空白组($P < 0.05$); 免疫器官淋巴细胞排列更紧密, 数量增多。**结论** 脉络宁注射液醇沉废弃物可用于雏鸡的饲养, 每日在饮水中添加1%~5%的MFP可显著提高雏鸡的免疫力, 减少其生长过程的个体差异。此外, 本研究为中药废弃物的资源化利用提供了一条可供参考的途径。

关键词: 脉络宁注射液; 多糖; 免疫系统; 生长性能; 雏鸡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2017)01-0052-05

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783. 2017. 01. 011

Effects of dietary supplementation from alcohol sinking of Mailuoning Injection on immune system and growth preformance of broilers chicks

XIAO Qiu-ping^{1, 2}, HE Cheng-hua^{1, 2*}, ZHU Hua-xu^{2*}, LIU Shuang-shuang², GUO Li-wei², DUAN Jin-ao², TANG Wei-guo³

(1. Veterinary medicine of NanJing Agricultural university, Jiangsu Nanjing 210095, China; 2. Nanjing university of Chinese medicine, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Jiangsu Nanjing 210023, China; 3. Jinling pharmaceutical co. LTD, Jiangsu Nanjing 210023)

Abstract: **Objective** The effects of dietary supplementation from alcohol sinking of Mailuoning Injection on immune system and growth preformance of broilers chicks were firstly reported in the experiment. **Methods** A total of 80 1-day-old broiler chicks were randomly allocated to blank group and three experimental groups?supplemented with 1%, 3% and 5% of polysaccharide in drinking water, respectively ($n=20$). On 7th and 21th days, the broiler chicks were immunized with the Newcastle disease vaccine. The experiment was last for 42 days. The average weight of each group chicks (once a week), feed conversion ratio, serum total protein, serum globulin, Newcastle disease antibody levels, immune organs index, organizational structure of thymus, spleen and fabricius were measured on 21th and 42th. **Results** Data showed that dietary supplementation could reduced the weight dispersion degree and enhanced central tendency, serum total protein, globulin and Newcastle disease antibody levels, especially, globulin and antibody levels on 21th day ($p < 0.05$), the lymphocyte of immune organs arranges more closely and increases in

收稿日期: 2016-08-16 **加上“朱华旭, 女, 研究员, 主要从事中药制药过程分离技术研究, Email: huaxu@126.com”**

作者简介: 肖秋萍, 女, 硕士研究生, 研究方向: 民族药物的开发与应用。Email: 18779186616@163.com。通信作者: 何成华, 男, 副教授, 主要从事民族药物开发与应用研究。Email: hechenghua@njau.edu.cn。

基金项目: 江苏省六大人才高峰项目(2014-YY-014); 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心分离平台建设项目(ZDXM-1-6, ZDXM-1-8); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目; 南京中医药大学校级创新团队资助。

number. Conclusion The results indicate that drinking water supplemented waste from alcohol sinking of Mailuoning Injection are benefit to decrease individual differences between chicks and improve immunity. The experiment provides a effective method for recycling use of Traditional Chinese medicine (TCM) waste.

Keywords: Mailuoning Injection ; polysaccharide ; immune system ; growth preformance ; broiler chick

加上“金”

中药脉络宁注射液由牛膝、玄参、石斛、银花共 4 味中药组成, 采用水煎煮提取药效物质, 经乙醇沉淀、乙酸乙酯萃取、浓缩等精制而得。乙醇沉淀物, 为生产脉络宁注射液过程中的废弃物之一, 在前期研究中发现, 其富含多糖类成分, 出渣量较高且性状粘稠, 如不进行资源化利用, 不仅造成浪费, 作为废渣排放还会造成二次污染^[1]。脉络宁注射液醇沉废弃物的多糖类成分主要来源于牛膝、金银花和石斛, 据文献报道, 此 3 味中药均具有抗肿瘤、增强免疫力、抗氧化、促生长等作用。因此, 将醇沉废弃物作为饲料添加剂, 不仅有助于解决废弃物污染、资源浪费及药物残留等问题^[2], 而且对动物促生长、增强免疫力具有积极作用。

1 材料与方法

1.1 动物 一日龄肉鸡 80 羽 (罗斯 308), 购自江苏八达畜禽有限公司。动物合格证号: 。→ 去掉

1.2 饲料 颗粒饲料, 购自南京市青龙山动物繁殖厂, 批号: 。→ 去掉

1.3 试剂 脉络宁注射液醇沉废弃物 (下文简称: MFP, 外观为黑褐色粘稠半固体状), 取自金陵药业股份有限公司; 新城疫疫苗 (LaSota 株), 批准文号为兽药生字 (2013)170262007; 苏木精染液 (G1100, Solarbio); 伊红染液 (G1100, Solarbio); 无水葡萄糖标品 (7B8L-257Z); 公鸡红细胞悬浮液; ND 标准抗原。

1.4 仪器 轮式切片机 (LEICA RM2235); 显微镜 (OLYmpus BX53); 离心机 (SC-02, 低速离心机); 烘箱 (DGG-9140A); 血清生化仪 (BS180)。

1.5 方法

1.5.1 总糖含量的测定 采用烘干法测定 MFP 的固含量, 取无水葡萄糖采用苯酚-硫酸法测定糖含量, 制作标准曲线, 同样的方法测定总糖含量。

1.5.2 分组 取 1 日龄雏鸡 80 羽, 随机分为 4 组, 每组 20 羽。3 个实验组分别给予 MFP 的浓度为 1 %、3 %、5 % 的饮水, 空白组予以正常饮水。所有肉鸡采用笼养, 自由采食, 在同一水平下饲养 42 d。

1.5.3 饲养管理 实验组 用药前适应性饲养 2 d, 24 h

换为“所有雏鸡”

光照, 随后每日减少 1 h 至 12 h。温开水碎玉米开饮开食, 采用加热灯和取暖器控制室内温度, 7 日龄内室内温度 (32 ± 1) °C, 随后逐渐降低至 25 °C 并维持至饲养结束。每天定时对鸡舍进行通风清扫, 每周定时消毒。

1.5.4 测定指标

1.5.4.1 生长性能 适应性饲养 2 d, 分别于雏鸡 3、10、17、24、31、38 日龄时, 提前 12 h 禁食, 称质量。观察并记录雏鸡的精神状况, 饮食情况, 死亡数。

1.5.4.2 免疫器官指数 免疫器官指数 = 免疫器官湿质量 (g) / 活体质量 (kg), 分别于第 21 天 (雏鸡 21 日龄) 和 42 d 在 4 组中随机抽取 40 羽 (每组 10 羽) 称活体质量, 乙醚麻醉, 心脏采血并处死, 摘取其胸腺、脾及法氏囊, 剥离脂肪, 吸取水分后分别称质量。

1.5.4.3 血清生化指标 分别于第 21 天和第 42 天随机抽取雏鸡 40 羽 (每组 10 羽) 心脏采血, 全血在 37 °C 水浴锅中水浴 2 h 后, $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离得到血清, 血清生化仪检测总蛋白 (TP) 及白蛋白含量 (ALB)。

1.5.4.4 新城疫抗体 分别于雏鸡 7、21 日龄时, 进行新城疫活疫苗点眼滴鼻免疫, 分别于 21、42 d 随机抽取 40 羽 (每组 10 羽) 雏鸡心脏采血, 分离得到血清, 采用血凝实验 (HA) 和血凝抑制实验 (HI) 测定新城疫抗体水平^[3]。

1.5.4.5 组织切片观察 将第 21、42 d 所摘取的胸腺、脾、法氏囊采用甲醛固定 48 h, 石蜡包埋, HE 染色, 切片光镜检查^[4]。采用 CAD 软件对不同处理组的特征性组织结构进行测量, 每张切片 5 个视野, 而后求平均值。

1.6 数据处理 实验数据以 “ $\bar{x} \pm s$ ” 表示, 应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 组间指标差异采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 糖含量测定 MFP 固含量为 67.90 %, 葡萄糖检测的标准曲线为 $y=10.921x+0.018$ ($R^2=0.999$), 总糖含量为 69.49 %。

2.2 MFP 对整体鸡群状态的影响 雏鸡饮水正常,饮水量未出现组间差异,说明 MFP 添加至水中适口性良好。第 2~10 天中,空白组死亡 2 只,1 %实验组死亡 1 只,剖检未发现病理性异常。14 日龄后,实验组雏鸡表现明显比空白组活跃,精神状态更佳。

2.3 MFP 对雏鸡生长性能的影响 随着雏鸡生长,组内个体差异越来越大,而实验组与空白组比较,组内的个体差异明显降低,尤其是 5 %用药组,组内个体差异最小,可见 MFP 饮水有利于减小雏鸡间的个体差异。料肉比及日增重组间差异不显著,但空白组死亡率高,42 d 内,空白组死亡率达 10 %高于 1 %实验组(死亡率 5 %),显著高于 3 %及 5 %实验组(死亡率 0 %),见表 1。

表 1 对不同日龄雏鸡平均体质量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 The average weight of each group chicks at different day-age

组别	剂量	不同日龄平均体质量/g				
		10 日龄	17 日龄	24 日龄	31 日龄	38 日龄
空白组	0	73.74 ± 1.92	140.64 ± 7.64	254.82 ± 25.74	382.63 ± 50.96	492.28 ± 61.88
MFP 组	1 %	66.31 ± 2.01	122.47 ± 6.07	211.11 ± 15.32	310.46 ± 24.00	405.34 ± 29.78
MFP 组	3 %	76.44 ± 2.70	141.55 ± 9.53	251.4 ± 22.17	380.60 ± 34.71	479.16 ± 39.20
MFP 组	5 %	74.55 ± 7.20	139.39 ± 4.95	263.03 ± 9.89	375.88 ± 19.89	468.08 ± 29.24

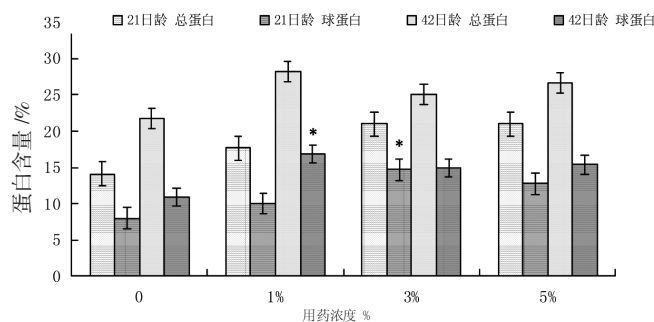
2.4 MFP 对雏鸡免疫器官指数的影响 21 日龄雏鸡免疫器官指数差异性小,而 42 日龄,实验组雏鸡的脾脏、法氏囊及胸腺比重均不同程度的高于空白组,虽然组间差异性不显著,但可以看出 MFP 具有促免疫器官生长的趋势。比较发现 5 %用药组的免疫器官指数均高于对照组,提示 5 %用药组浓度有促免疫器官生长的趋势,见表 2。

表 2 对 42 日龄免疫器官指数的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 immune organs index of on 42 th day

组别	剂量	免疫器官指数		
		脾脏	法氏囊	胸腺
空白组	0	0.38 ± 0.090	2.65 ± 0.35	2.17 ± 0.21
MFP 组	1 %	0.51 ± 0.043	2.13 ± 0.10	2.14 ± 0.40
MFP 组	3 %	0.41 ± 0.088	2.45 ± 0.20	2.47 ± 0.33
MFP 组	5 %	0.46 ± 0.036	2.79 ± 0.32	2.22 ± 0.13

2.5 MFP 对雏鸡血清生化的影响 21 日龄和 42 日龄雏鸡,实验组血清中总蛋白、免疫球蛋白均高于空白组。21 日龄 3 %用药组的球蛋白与空白组比差异性显著($P < 0.05$); 42 日龄 1 %用药组球蛋白显著高于空白组($P < 0.05$),说明 MFP 对增强雏鸡免疫力有一定的效果。见图 1。



注:与空白组比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 对血清生化指标的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Figure 1 biochemical index in serum

2.6 MFP 对雏鸡新城疫抗体水平的影响 各组肉鸡 7 日龄进行新城疫活疫苗首免,检测出 21 日龄肉鸡的抗体水平均高于空白组,3 %、5 %用药组与 1 %用药组、空白组存在差异,其中 5 %用药组差异性显著($P < 0.05$)。42 日龄时,3 %、5 %用药组略高于空白组和 1 %用药组,但差异性不显著($P > 0.05$)。见图 2。

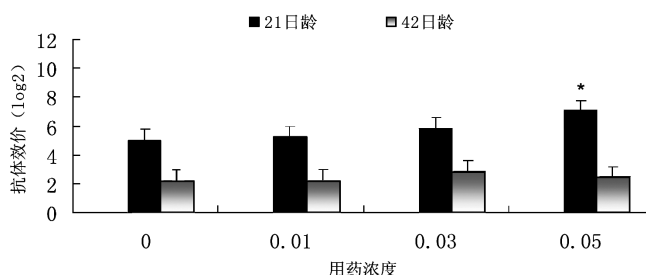


图 2 对新城疫抗体水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Figure 2 Newcastle disease antibody levels

2.7 免疫器官组织切片观察 21 日龄时,空白组胸腺皮、髓质分化明显,皮质较薄,淋巴细胞排列较为疏松,髓质出现弥散性胸腺小体。而 1 %、3 %和 5 %用药组胸腺皮质有不同程度增厚,淋巴细胞排列紧密,数量增多,其中 1 %用药组增强效果最明显。42 日龄时,相比空白组,1 %、3 %和 5 %用药组胸腺皮质有不同程度增厚,淋巴细胞排列紧密,数量增多。

21 日龄时,空白组黏膜层主要由立方柱状上皮组成,固有层淋巴滤泡成熟,皮、髓质分界明显,皮质区淋巴细胞排列相对疏松。用药组较空白组在法氏囊小结面积和皮质厚度上有不同程度的增大,其中,3 %用药组皮质淋巴细胞排列最紧密,淋巴细胞数量显著增多,其法氏囊小结面积和皮质厚度与空白组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。1 %、5 %用药组与空白组比较,差异无统计学意义($P >$

0.05)。42 日龄时,空白组法氏囊黏膜层皱襞变宽,法氏囊小结面积增大,皮质区淋巴细胞排列较为紧密。1 %用药组的法氏囊小结面积和皮质厚度明显增大,镜检淋巴细胞排列更为密集,与空白组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);3 %、5 %用药组与空白组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3 和图 3。

表 3 对法氏囊小结面积和皮质厚度的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 nodulus area and cortical thickness of fabricius

组别	剂量	21 d		42 d	
		淋巴结面积/ $10^6\mu\text{m}^2$	皮质厚度/ μm	淋巴结面积/ $10^6\mu\text{m}^2$	皮质厚度/ μm
空白组	0 %	1.97 ± 0.38	349.87 ± 13.00	3.31 ± 0.33	449.68 ± 49.66
MFP 组	1 %	2.16 ± 0.14	417.45 ± 16.62	$7.77\pm 0.84^*$	$707.12\pm 80.43^*$
MFP 组	3 %	$3.44\pm 0.32^*$	$460.37\pm 29.39^*$	3.88 ± 0.35	418.54 ± 23.86
MFP 组	5 %	2.27 ± 0.20	335.69 ± 36.30	2.37 ± 0.09	402.16 ± 25.56

注:与空白组比较, $*P<0.05$ 。

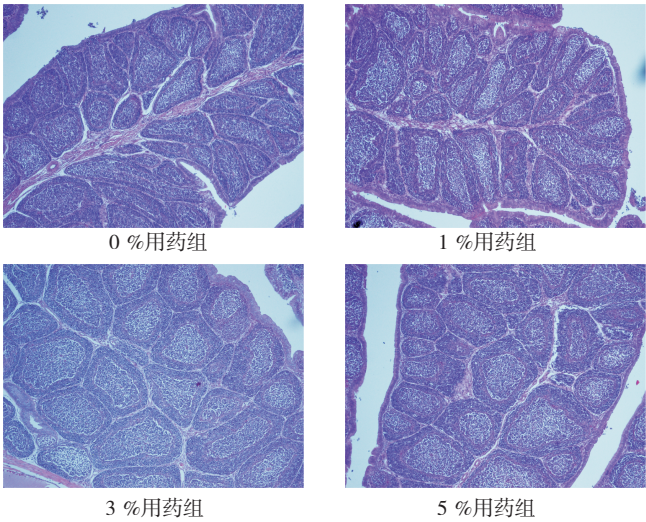


图 3 21 日龄法氏囊组织结构(10×10)

Figure 3 organizational structure of fabricius on 21 th day(10×10)

21 日龄时,空白组脾脏红、骨髓分化完全,红髓比例较大。动脉周围淋巴鞘较薄,细胞排列疏松,核淡染。实验组脾小体数量有不同程度增多,体积变大,与空白组比较,3 %用药组脾小体数量明显增多,差异有统计学意义($P<0.05$)。42 日龄时,与空白组比较,用药组动脉周围淋巴鞘均有增厚,细胞排列更紧密,脾小体数量增多,体积增大,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

3 讨论

研究表明,中药添加剂无残留、副作用小,最大限度降低了对人体的危害,饲料中添加中药多糖

表 4 对脾小体数量、面积、动脉周围淋巴鞘厚度的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 quantity and area of plenic corpuscle, thickness of periarterial lymphatic sheath

组别	剂量	21 d		42 d
		脾小体数量 / 个	脾小体面积/ $10^6\mu\text{m}^2$	动脉周围淋巴鞘/ μm
空白组	0 %	12 ± 0.89	1.71 ± 0.23	491.49 ± 41.24
MFP 组	1 %	11.8 ± 0.37	1.68 ± 0.23	572.87 ± 20.62
MFP 组	3 %	$18.4\pm 1.08^*$	1.87 ± 0.2	534.62 ± 22.9
MFP 组	5 %	13.2 ± 0.73	2.62 ± 0.06	508.10 ± 31.51

注:与空白组比较, $*P<0.05$ 。

能提高畜禽的料肉比和增重^[5-6],而其给药方式以腹腔注射及灌胃为主,规模化养殖中可操作性弱。本试验将多糖溶于饮水供雏鸡自由饮用,遵循生产可行性。通过 42 d 多糖饮水,结果表明,多糖添加后,实验组体重离散程度明显减小,集中趋势增强,个体差异减小,有利于雏鸡的规模化养殖。并且,实验组雏鸡死亡率明显低于空白组,提高了雏鸡存活率,但实验组与空白组对比,料肉比差异性不显著($P>0.05$),可能与个体饮水差异有关,造成实验组组内个体用药量差异比较大。

脾、法氏囊、胸腺是禽类的主要免疫器官,是 B、T 细胞分化成熟的场所。免疫器官的发育状况及机能强弱直接决定着禽类的免疫水平^[7],其相对重量增加,说明机体细胞的免疫机能增强^[8]。本试验结果表明,MFP 具有刺激实验组雏鸡的免疫器官生长和免疫器官指数增大的趋势,组织切片结果表明实验组较空白组淋巴细胞排列更紧密,数量增多,提示 MFP 具有促免疫器官发育及免疫增强效果,增强了“MFP”开发为鸡饮水添加剂的可行性。这与卢选成的马齿苋提取液促家兔免疫增强^[9]、胡蓉的朱砂七多糖对鸡免疫器官的促发育^[4]及靳双星等的复方中药合剂对鸡的脾、法氏囊结构促进作用^[10]的结果一致。

机体在受抗原刺激时,B 细胞转化为浆细胞,浆细胞产生特异性免疫球蛋白,介导机体的体液免疫^[11],所以免疫球蛋白在一定程度上反映了机体的免疫能力。本试验结果显示,不同浓度的 MFP 饮水均可使免疫球蛋白升高。21 日龄 3 %和 42 日龄 1 %的 MFP 饮水使球蛋白显著增加,结果表明,通过多糖饮水,雏鸡的免疫力增强,存活率提高。

脉络宁注射液由金银花、牛膝、石斛、玄参四种中药为原料加工制备而成。研究表明,从这四种原药材中所提取的多糖均具有抗肿瘤,增强免疫力等作用^[12-14]。本试验通过点眼滴鼻两次免疫后,采用

凝血与抗凝血实验测定抗体效价,结果显示,MFP饮水能刺激雏鸡血清中抗体的产生,使21日龄雏鸡的抗体效价显著升高,增强疫苗免疫效力,降低死亡率。但对42日龄雏鸡影响不大,可能是检测抗体时间远大于抗体高峰期(一般在2周左右),致使二免后检测的抗体效价普遍偏低。

结果表明:MFP添加至饮水中具有减小雏鸡个体差异、降低死亡率、提高机体抗体水平、促免疫器官生长的显著效果;同时,对雏鸡健康安全,价格便宜,添加方便,适合作为饮水添加剂,应用于雏鸡规模化养殖。

4 结论与展望

水提醇沉是中药制药生产的通用技术,由此而生成的半固体物料因含有大量糖类高分子物质,稠厚、黏度大,极难干燥,不但限制了其再利用,还成为中药行业污染环境、浪费资源的共有技术难题。本项目以金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂脉络宁注射液为示范。目前,脉络宁注射液生产规模为12600吨/年,脉络宁的利润占公司利润80%左右,而脉络宁注射液生产商每年用于环保投资约500万元,占总投资的15%左右。本项目的研究成果不仅可以有效降低企业的环保投资成本,还可为中药材的资源化利用提供新的研究思路和研究方法。

在中国,一年抗生素用量高达十几吨,其中大部分应用于养殖业,超级细菌、各种奇怪病症的出现使寻找抗生素替代品显得尤为迫切。中草药提取物安全、无毒,有促生长、预防疾病、提高免疫力等活性,有望替代抗生素,促进养殖业可持续发展^[15-16]。本研究通过肉鸡MFP饮水,增强了机体免疫力,提高了疫苗效力,提示免疫增强作用,可减少抗生素的使用量。但其促生长作用不佳,可

能与多糖分子量及抗营养因子干扰有关,接下来的研究将致力于降低多糖分子量及多糖纯化,提高其促生长、促免疫力活性,开发MFP为饲料添加剂。

参考文献:

- [1] 赵振坤,王淑玲,丁刘涛,等.中药药渣再利用研究进展[J].杭州师范大学学报(自然科学版),2012,1:38-42.
- [2] 魏忠华,王学静,宣凤琴,等.规模化肉鸡养殖药物残留的监控[J].今日畜牧医,2011,S1:80-83.
- [3] 魏凯.泰山松花粉多糖的提取及其免疫增强功能的研究[D].山东农业大学,2011.
- [4] 胡蓉.朱砂七多糖对鸡免疫增强及体外抗TGEV作用研究[D].西北农林科技大学,2014.
- [5] 王学斌,陈功义,魏战勇,等.黄芪多糖粉剂和注射剂对雏鸡免疫功能和生活的影响比较[J].中国家禽,2007,29(3):21-23.
- [6] 金光明,赵桂芳,陈娟.黄芪多糖对雏鸡生长性能的影响[J].安徽科技学院学报,2008,22(4):1-4.
- [7] Merry BJ, Holehan AM. Serum profiles of LH, FSH, testosterone and 5 alpha-DHT from 21 to 1000 days of age in ad libitum fed and dietary restricted rats[J]. Experimental Gerontology, 1981, 6(6): 431-444.
- [8] 卢选成.马齿苋提取液对家兔免疫器官组织形态结构影响的研究[D].中国农业大学,2003.
- [9] 靳双星,张桂枝.复方中药合剂对AA肉仔鸡脾脏和法氏囊结构及发育的影响[J].东北农业大学学报,2014,4:94-98.
- [10] 程相朝,张春杰.中药免疫增强剂对肉仔鸡免疫器官生长发育及免疫活性细胞影响的研究[J].中兽医学杂志,2002,(3):6-8.
- [11] 朴香淑,史彬林,李德发.保尔福对肉仔鸡生长、微生物菌群及免疫功能的影响[J].中国饲料,2004(11):24-26.
- [12] 余刚.多糖及石斛多糖研究综述[J].运动,2013,10:148-149.
- [13] 李玉平,张利,黎晓敏.金银花多糖的研究概况[J].饲料博览,2011,2:21-24.
- [14] 金乐红,刘传飞,唐婷,等.石斛多糖抗肿瘤作用的实验研究[J].中国药理学杂志,2010,22:1734-1737.
- [15] 楚维斌,史彬林,红雷,等.抗生素在畜禽生产中的应用·危害及科学使用[J].安徽农业科学,2015,43(48819):128-130.
- [16] 张小莺.兽用抗生素的合理使用与替代[J].中国畜牧业,2015,445(22):45-46.

(编辑:宋威)