西北农业学报 2019,28(1):17-24
Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica

网络出版日期:2019-01-11 doi: 10.7606/j.issn.1004-1389.2019.01.003
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20190111.0924.006.html

沙门氏菌胞外囊泡对肉仔鸡免疫保护效果的研究

梁 柳,胡如久,林 华,苏 源,高玉鹏,杨明明
(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西杨凌 712100)

摘 要 探究鼠伤寒沙门氏菌(ST)胞外囊泡(OMVs)对肉仔鸡的免疫保护效果。350 只 1 日龄健康爱拔益加雏鸡常规条件下饲养至 7 日龄,选择沙门氏菌感染为阴性、健康及体质量差异不显著的雏鸡 320 只随机等分为 5 组,每组 8 重复,每重复 8 只。试验设计为未感染的对照组(PBS 组)、沙门氏杆菌感染组(ST 组,攻毒试验用)和 3 个不同 OMVs 免疫剂量免疫组,分别注射 5、10 和 20 μg/(d·只)的 OMVs(OMV5、OMV10 和 OMV20)。从 8 日龄开始,每隔 1 周对 OMVs 免疫组分别腹腔注射对应剂量的 OMVs,每次连续 3 d,共免疫 3 次;PBS 组和 ST 组分别注射等量 PBS 溶液。试验鸡 30 日龄时,对 ST 组和 3 个 OMVs 免疫组腹腔注射 1×10^9 CFU 的 ST 进行攻毒,PBS 组注射等量 PBS 溶液,饲养观察 5 d。结果表明:1)在 8~28 日龄的免疫期,与 PBS 组相比,OMV5 和 OMV10 组的试验鸡日均采食量、平均日增量和饲料转化率均无显著差异,而 OMV20 组的试验鸡日均采食量和平均日增量显著降低、饲料转化率显著增加;3 个 OMVs 免疫组的死亡率及免疫器官指数与 PBS 组均无显著差异;2)3 个 OMVs 免疫组试验鸡的免疫器官指数与 PBS 组无显著差异;OMVs 免疫可显著提高免疫期间血清中的溶菌酶活力、白蛋白和 C3 质量浓度及 SOD 活力;3)与 ST 组相比,OMVs 免疫组在 ST 攻毒后显著消除 ST 感染引起的试验鸡体质量下降,显著提高 ST 感染鸡的存活率,尤以 OMV10 和 OMV20 免疫组效果最好。此外,10 μg/(d·只)的 OMVs 免疫可显著降低 ST 感染后血液中的 IL-1β 和 TNFα 的质量浓度,且有降低 IL-6 质量浓度的趋势。由此可知,适量剂量的 OMVs 免疫对肉仔鸡生产性能无显著影响,但可增强肉仔鸡机体免疫功能,且具有显著提高肉仔鸡抗 ST 感染的能力,本试验中 ST-OMVs最佳免疫剂量为 10 μg/(d·只)。

关键词 鼠伤寒沙门氏菌;胞外囊泡;肉仔鸡;生长性能;免疫保护

中图分类号 S831.7 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2019)01-0017-08

沙门菌是肉鸡生产中常见的病原菌,会引起急性或慢性常见多发疾病,且是贯穿整个养禽周期的恶性循环式疾病,对人类和动物健康均具有极大危害[1]。沙门菌感染会引起各种疾病如鸡白痢、鸡伤寒和副伤寒,造成机体病变甚至死亡,对家禽养殖业造成极大的经济损失。预防和控制沙门菌感染的措施主要有药物防治和疫苗免疫。常用的疫苗有 3 大类:灭活疫苗、弱毒活疫苗和亚单位疫苗[2]。尽管这些措施在防控疾病方面有所成效,但仍存在一些缺陷。如:长时间用药控制沙门菌感染效果可能要好些,但是大剂量和频繁用药,成本很高,耐药性和药物残留也是大问题[3];传统的疫苗存在免疫力低,免疫周期短,安全稳定性不好,生产程序复杂等[4]问题。因此,寻求一种更安全可靠,具有高免疫原性和免疫能力的方法来预防沙门氏菌感染势在必行。

细菌胞外囊泡(Outer membrane vesicles,OMVs)是革兰氏阴性细菌外膜在生长过程中自发释放的一种由脂质双层膜包围的球形囊泡[5]。OMVs 的直径一般为 50~200 nm[6],主要含有蛋白质、核酸、磷脂、酶及脂多糖等生物活性分子。OMVs 具有多种生物功能如:作为药物载体在机体内发挥作用和对细菌生理与病理的功能等[7]。OMVs 中的脂多糖和外膜蛋白可以作为免疫评估分子的辅助剂刺激抗原呈递细胞,增强免疫反应[8]。OMVs 也会产生多种毒性因子,如碱性磷

收稿日期:2018-04-10 **修回日期**:2018-06-20
基金项目:陕西省农业科技创新转化项目(NYKJ-2016-09);国家自然科学基金(31672437)。
第一作者:梁 柳,女,硕士,研究方向动物营养与饲料科学。E-mail: 1184120382@qq.com
通信作者:高玉鹏,男,教授,博士生导师,主要从事动物营养与免疫及现代家禽生产技术研究。E-mail:gaoyupeng112@sina.com
杨明明,男,副教授,硕士生导师,主要从事动物营养与饲用生物技术研究。E-mail:biodna@126.com

酸酶、溶血性磷脂酶 C 和胆囊纤维调控因子抑制因子，从而影响宿主细胞生物学功能[9]。此外，OMVs 还可诱导免疫调节功能，表面可以展示抗原，从而在宿主中引起强烈的炎症和免疫反应。从脑膜炎菌（*N. meningitidis*）中分离的 OMVs 可作为疫苗抵抗其引起的脑膜炎症[6]。Alaniz 等[7]研究表明鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*，ST）OMVs（ST-OMVs）可以刺激促炎因子的产生，如肿瘤坏死因子 α（Tumor necrosis factor alpha，TNF-a）和白介素-2（Interleukin-2，IL-2）。Muralinath 等[10]研究表明 ST 获得的 OMVs 可诱发保护性免疫反应，并被用作载体从其他病原体中传递抗原。这些研究提示，一些革兰氏阴性细菌的 OMVs 具有开发成疫苗的潜力，并且 OMVs 疫苗是以纳米微囊泡的形式被宿主细胞识别，具有高效、毒性小等优点[11]。本试验旨在从 ST 培养液中分离并纯化 ST-OMVs，探究其对肉仔鸡的毒性及免疫保护效果，为肉仔鸡的疫病防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株及其培养

鼠伤寒沙门氏菌（编号：CVCC2226）购自中国兽医药品监察所，将新鲜 LB 液体培养基于 200 r/min 37 ℃的水平摇床上振荡培养。

1.2 主要试剂

酵母粉，蛋白胨，琼脂粉，氯化钠，氯化钾，磷酸氢二钠，磷酸二氢钾，OptiPrepTM Density Gradient Medium 溶液，BCA 试剂盒购自南京建成生物技术有限公司。

1.3 ST-OMVs 的分离、纯化与鉴定

将保存的 ST 菌种复苏，在新鲜 LB 液体培养基中于 200 r/min 37 ℃的水平摇床上扩大培养；然后将培养物于 4 ℃ 12 000×g 进行高速冷冻离心 15 min；取上清用直径为 0.45 μm 的滤膜过滤；过滤后的滤液经过 100 ku 滤膜进行超滤得到超滤浓缩液；浓缩液于 4 ℃ 150 000×g 进行超速离心 2 h，去上清得到沉淀，用 0.1 mol/L 的 PBS 溶液重悬沉淀物。随后对重悬液采用从 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%到 50%不同体积分数的 OptiPrepTM Density Gradient Medium 溶液进行梯度密度离心[12]，取 20%～40%体积分数间的组分后超速离心 2 h，富集得到的沉淀即为纯化 ST-OMVs[12]，置于－80 ℃保存。

利用扫描电镜[13]来观察 OMVs 的外部形态特征，利用 Nanosight NS300 纳米颗粒跟踪分析仪[14]来测定 OMVs 的粒径与浓度，利用 BCA 法[14]测定 ST-OMVs 的蛋白浓度。

1.4 试验动物及饲养管理

将 350 只 1 日龄健康爱拔益加（AA）雏鸡，在清洁环境中饲养至 7 日龄。选择经沙门氏菌感染为阴性、健康及体质量一致的 320 只肉仔鸡随机等分为 5 组，每组 8 个重复，每重复 8 只，试验设计分别为对照组（PBS 组）、后期攻毒试验用的 ST 感染组（ST 组）和 3 个不同剂量 OMVs 的 ST-OMVs 组，OMVs 注射剂量分别为 5、10 和 20 μg/（d·只）（OMV5、OMV10 和 OMV20）。饲养第 1 周采用 24 h 光照，室温保持在 35 ℃，从 8 日龄开始每天降低 1 ℃直到 25 ℃。8 日龄起采用 23L:1D 光照制度，每日 19:00－20:00 停止光照 1 h。试验鸡饲喂商品饲料，0～21 日龄饲喂前期料，22～36 日龄饲喂中期料，营养成分满足或超过 NRC（1994）的标准，每日于 8:00、14:00 和 20:00 共投料 3 次，自由饮水。

1.5 ST-OMVs 免疫程序

3 个 OMVs 免疫组试验鸡从 8 日龄开始每隔 1 周对试验鸡腹腔注射 200 μL 含有 OMVs 的 PBS，OMVs 剂量分别为 5、10 和 20 μg/（d·只），每次连续 3 d，共注射 3 次。即在 8、9、10 日龄进行第 1 次注射；在 15、16、17 日龄进行第 2 次注射；在 22、23、24 日龄进行第 3 次注射。PBS 组和 ST 组按相同方法注射等量 PBS 溶液。每次注射前试验鸡禁水禁食 2 h，注射后 1 h 恢复食水。

1.6 ST 对试鸡的攻毒

30 日龄时，对 ST 组和 3 个 OMVs 免疫组肉仔鸡腹腔注射 1×10^9 CFU 的 ST[15]，PBS 组腹腔注射等量 PBS 溶液作为对照，继续观察饲养 5 d。

1.7 样品采集与预处理

ST-OMVs 第 3 次免疫后 1 周，即试验第 29 天，随机选定各重复的 2 只试验鸡翅静脉采血 2 mL，以重复作为 1 个分析血样，屠宰，采集右侧胸腺、脾脏和法氏囊称量；血液 37 ℃静置 1 h 后，4 ℃放置过夜，低温冷冻离心机 1 500×g 离心 15 min，吸取上层血清，－20 ℃保存，用于血清免疫相关生理指标的测定。

试验鸡攻毒后的第 5 天，即试验第 35 天，随机选定各重复的 2 只试鸡翅静脉采血。血液置于

抗凝管中，1 500×g，4 ℃离心 15 min，吸取上清，－20 ℃保存，用于测定血清炎性细胞因子。

1.8　检测指标与方法

1.8.1　OMVs 免疫期间的生产性能　试验开始时（第 8 天）记录初始体质量，分别在试验第 15、22、29 天（即一免、二免和三免 1 周后）8：00 空腹称质量、结料，计算日均采食量（DFI）、平均日增量（BWG）和饲料效率（FCR）。

第 8～29 天，每天观察记录各重复死亡数，按周计算各组死亡率。

1.8.2　免疫器官指数测定　第 29 天采样时，胸腺、脾脏和法氏囊去尽脂肪和结缔组织，用滤纸吸干残血后，用分析天平称其湿量，计算胸腺、脾脏和法氏囊指数，即每 100 g 体质量中脾脏所占的质量。公式如下：

免疫器官指数（g/100 g）＝免疫器官质量/试鸡体质量×100

1.8.3　血清免疫相关生理指标测定　测定第 3 次免疫 1 周后即试验第 29 天采集血清中免疫相关生理指标，本试验样品检测工作由北京华英生物技术研究所完成。溶菌酶活力（Lysozyme，LZM）：采用血清溶菌酶活性测定试剂盒测定；补体活力：采用免疫透射比浊法试剂盒测定血清补体 C3 质量浓度；白蛋白质量浓度（Albumin，ALB）：采用试剂盒溴甲酚绿比色法测定；超氧化物歧化酶活性（Superoxide dismutase，SOD）：采用超氧化物歧化酶测定试剂盒进行测定。

1.8.4　OMVs 的免疫保护效果　攻毒后体质量变化。试验第 30 天，ST 攻毒后，每日 8：00 按重复空腹对活鸡称量。

攻毒后存活率。ST 攻毒 5 d 后，记录各重复死亡鸡数，计算各组存活率。

炎性细胞因子测定。采用放射免疫法测定试验第 35 天采集的血清，每重复 2 只鸡，以重复作为 1 个分析血样，测定其中的 IL-1β（Interleukin-1β，IL-1β）、IL-6（Interleukin-6，IL-6）、TNF-α 促炎性细胞因子的分泌量，本试验样品检测工作由北京华英生物技术研究所完成。

1.9　数据分析

采用 SPSS 21.0 统计软件 One-Way ANOVA 模块进行方差分析，用 Duncan's 法进行多重比较，数据均用“平均值±标准差”表示，以 $P<0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2　结果与分析

2.1　ST-OMVs 生物特性分析

采用差速离心法从 ST 培养液上清中富集、密度梯度离心法纯化后得到较多量的纯化 ST-OMVs 沉淀。对纯化 ST-OMVs 进行扫描电镜检测，结果（图 1）显示，无杂质、视野清晰，ST-OMVs 大小不一，外形呈现圆形或椭圆形，直径 100 nm 左右，在 50～200 nm 范围之内，符合细菌 OMVs 颗粒粒径的要求。随后采用 Nanosight 检测纯化 ST-OMVs 的粒径分布（图 2），结果显示 MODE 曲线线条平缓流畅，说明含有的杂质较少，纯度较好；粒径峰值为 76 nm，还有少数在 100～200 nm 间，与细菌 OMVs 的理论颗粒粒径大小值基本吻合，偏离范围的小部分可能与颗粒间粘着有关。最后，采用 BCA 法对纯化 ST-OMVs 进行蛋白定量，结果显示 1×10^{10} particles/mL 的 ST-OMVs 的蛋白质量浓度为 7.3 μg/mL。

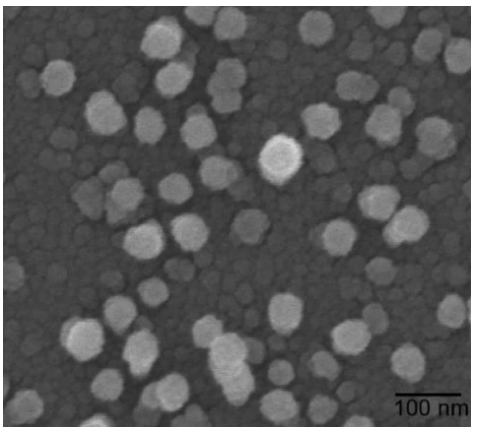


图 1　扫描电镜观察 ST-OMVs 形态

Fig. 1　Observation of ST-OMVs morphoiogical using SEM

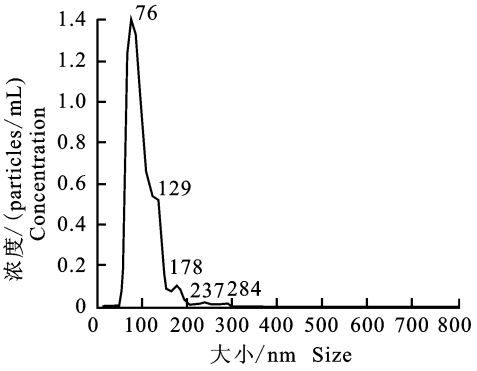


图 2　NAnosight 检测 ST-OMVs 粒径分布

Fig. 2　NAnosight analysis of ST-OMVs

2.2 ST-OMVs 对肉仔鸡生产性能及免疫功能的影响

由表 1 可知，与对照组相比，OMV5 和 OMV10 组肉仔鸡在 8～28 日龄各阶段及整个免疫期的 DFI、BWG 和 FCR 均无显著差异（$P>0.05$），而 OMV20 组试验鸡的 DFI 和 BWG 显著降低（$P<0.05$），FCR 显著增加（$P<0.05$）。OMV20 组试验鸡在 7～14 d 和 15～21 d 有少量死亡，但与 PBS 组无显著差异（$P>0.05$）；OMV5 和 OMV10 组均无试验鸡死亡。说明，5 和 10 μg/(d·只)的 OMVs 免疫剂量对免疫期间肉仔鸡生产性能没有显著影响，而 20 μg/(d·只)的 OMVs 免疫剂量可显著降低免疫期间肉仔鸡生产性能。

由表 2 可知，虽然 3 个 OMVs 剂量免疫组试验鸡的免疫器官指数有高于 PBS 组趋势，但无统计学上的差异（$P>0.05$）。表 3 结果显示，OMVs 免疫可显著提高免疫期间肉仔鸡血清中溶菌酶活力、白蛋白质量浓度、C3 质量浓度及 SOD 活力（$P<0.05$），并且 OMV10 组鸡血清的白蛋白质量浓度、C3 质量浓度及 SOD 活力最高。说明 OMVs 免疫在一定程度上能够促进免疫器官生长发育，显著改善机体免疫功能。

表 1 ST-OMVs 对肉仔鸡生产性能及死亡率的影响

Table 1 Effects of ST-OMVs on performance and mortality in broilers

项目 Item	时段 Phase	PBS	OMV5	OMV10	OMV20	P 值 P value
日均采食量/(g/只) DFI	7～14 d	36.7±1.2 a	36.4±0.8 a	36.3±1.3 a	32.1±1.2 b	<0.001
	15～21 d	90.2±4.3 a	89.4±3.6 a	85.1±3.4 a	71.9±7.7 b	<0.001
	22～28 d	137.5±9.9 a	138.4±7.4 a	132.8±7.3 a	114.7±8.1 b	<0.001
	7～28 d	88.1±4.9 a	88.1±3.5 a	84.7±3.0 a	72.9±6.0 b	<0.001
平均日增质量/(g/只) BWG	7～14 d	30.5±2.3 a	30.3±1.4 a	29.3±1.6 a	20.1±4.4 b	<0.001
	15～21 d	69.0±4.6 a	67.9±3.7 a	66.4±4.2 a	57.4±2.9 b	<0.001
	22～28 d	97.9±8.9 a	100.5±6.1 a	94.5±6.7 a	79.6±8.7 b	<0.001
	7～28 d	64.5±6.7 a	66.2±3.2 a	63.4±3.7 a	53.4±4.9 b	<0.001
饲料转化率/% FCR	7～14 d	1.21±0.06 b	1.20±0.04 b	1.24±0.06 b	1.65±0.28 a	<0.001
	15～21 d	1.31±0.05	1.32±0.03	1.29±0.07	1.25±0.10	0.243
	22～28 d	1.41±0.05	1.38±0.02	1.41±0.03	1.44±0.04	0.279
	7～28 d	1.32±0.05 b	1.30±0.02 b	1.31±0.04 b	1.45±0.06 a	<0.001
死亡率/% Mortality	7～14 d	0	0	0	2.1±5.9	0.389
	15～21 d	0	0	0	2.1±5.9	0.389
	22～28 d	0	0	0	0	—
	7～28 d	0	0	0	4.2±7.2	0.109

注：同列数据后相同字母或无字母表示差异不显著（$P>0.05$），不同字母表示差异显著（$P<0.05$）。下表同。

Note: In the same colum, values with the same letter or without letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$), the different lowercase letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$). The same below.

表 2 ST-OMVs 对肉仔鸡免疫器官指数的影响

Table 2 Effects of ST-OMVs levels on organ index in broilers

项目 Item	PBS	OMV5	OMV10	OMV20	P 值 P value
胸腺指数/(g/kg) Thymus index	2.09±0.52	2.34±0.65	2.41±0.46	2.36±0.66	0.647
脾脏指数/(g/kg) Spleen index	1.09±0.26	1.15±0.28	1.18±0.30	1.11±0.28	0.831
法氏囊指数/(g/kg) Bursa index	1.61±0.42	1.85±0.38	1.83±0.34	1.69±0.32	0.530

表 3 ST-OMVs 对肉仔鸡血清免疫相关生理指标的影响

Table 3 Effects of ST-OMVs on serum immunity-related indices in broilers

项目 Item	PBS	OMV5	OMV10	OMV20	P 值 P value
溶菌酶/(U/mL) LZM	188.9±41.5 a	270.8±88.0 b	343.7±92.3 bc	362.4±86.1 c	0.001
白蛋白/(g/L) ALB	14.0±1.6 a	15.7±1.3 b	17.2±1.9 b	16.1±1.4 b	0.003
补体 C3/(g/L) Complement C3	0.39±0.15 a	0.66±0.25 ab	0.76±0.29 b	0.67±0.34 b	0.011
SOD/(U/mL)	70.4±15.1 a	103.7±12.67 b	108.1±34.1 b	97.1±13.1 b	0.005

2.3　ST-OMVs 对肉仔鸡的免疫保护效果

由图 3 可知，除 OMV20 组试验鸡外，各组试验鸡攻毒前的初始体质量均无显著差异（$P>0.05$）。但随着攻毒后时间的延长，ST 组试验鸡体质量出现显著下降（$P<0.05$），而 OMVs 免疫组试验鸡体质量均显著增加（$P<0.05$）。与 PBS 组相比，OMV5 和 OMV10 组的试验鸡体质量无显著变化（$P>0.05$）。表明，ST-OMVs 免疫能够消除 ST 感染引起的鸡体质量下降。

由图 4 可知，与 PBS 组相比，ST 组试验鸡的存活率显著降低（$P<0.01$）；OMV5 组试验鸡的存活率显著低于 PBS 组（$P<0.01$），但又显著高于 ST 组；OMV10 和 OM20 组的试验鸡存活率与 PBS 组没有显著差异，且两者之间也没有显著差异（$P>0.01$）。表明，ST-OMVs免疫能够显著增强 ST 感染试验鸡的存活率，且 OMV10 和 OMV20 免疫组效果相对较好。综合免疫期间的生产性能和 ST 攻毒后的体质量和存活率指标，认为 OMV10 为 OMVs 的最佳免疫剂量组。随后比较分析 OMV10 组、ST 组和 PBS 组试验鸡在攻毒 5 d 后血清中的促炎性细胞因子水平，由表 4 可知，OMV10 组的 IL-1β 和 TNFα 分泌量显著低于 ST 组（$P<0.05$），而 OMV10 组的 IL-6 分泌量虽然没有显著低于 ST 组，但有较大降低（$0.05<P<0.01$）。表明 OMVs 免疫可以降低 ST 感染后血液中的促炎性细胞因子的质量浓度。

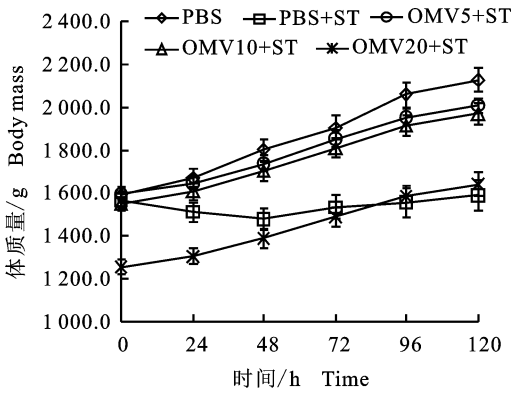
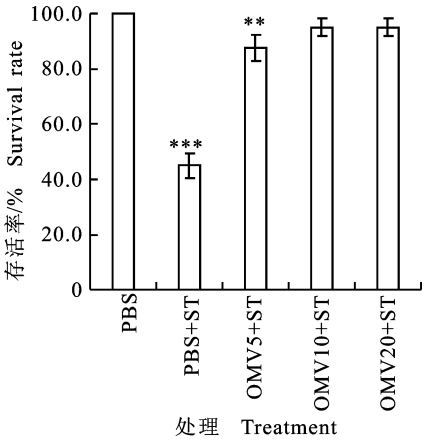


图 3　攻毒后肉仔鸡体质量变化

Fig. 3　Body mass change of broilers changed by ST



数据表示为“平均值±标准误”（$n=8$）；与对照组相比，* * $P<0.01$，* * * $P<0.001$

Data is expressed as “mean value±SEM”（$n=8$）；compared with control group，* * $P<0.01$，* * * $P<0.001$

图 4　攻毒后肉仔鸡存活率

Fig. 4　Survival rate of broilers changed by ST

表 4　ST-OMVs 对肉仔鸡炎性细胞因子分泌的影响

Table 4　Effect of ST-OMVs on secretion of inflammatory cytokines in broilers

项目　Item	PBS	PBS+ST	OMV10	*P* 值　*P* value
IL-1β/(pg/mL)	12.3±2.6 a	23.1±2.3 b	20.4±6.2 b	0.023
IL-6/(pg/mL)	93.0±16.6	132.6±22.3	110.6±23.9	0.074
TNFα/(pg/mL)	27.8±5.1 a	71.4±23.8 b	38.1±8.9 a	0.007

3　讨 论

OMVs 是革兰氏阴性细菌自然释放的一种具有球形双层膜结构的分泌物，其粒径平均为 50～200 nm。本试验采用扫描电镜和 Nanosight 纳米检测技术从形态学和颗粒大小对 ST-OMVs 进行系统分析，更好地验证了提取的 OMVs 的质量和纯度。试验结果表明，大多数的 ST-OMVs 直径在 50～100 nm 之间，呈圆形、椭圆形，大小各异，有的还聚集成团，符合文献报道[6]中关于 OMVs 的形态学特征。同时，也有一些超过范围的颗粒粒径，这可能是由于超速离心后囊泡融合在一起未吹散开的结果。

本试验研究了 OMVs 对肉仔鸡生长性能、死亡率和各免疫器官指数的影响，结果表明，OMVs 免疫剂量在 5 和 10 μg/(d・只)时对肉仔鸡生产性能没有显著的负面影响。当 OMVs 免疫剂量达到 20 μg/(d・只)时，肉仔鸡生产性能出现显著下降，并伴随少量试鸡死亡。可见，就肉仔鸡生产性能而言，OMVs 的免疫接种有一定的剂量范

围，在此范围内的免疫对生产没有负面影响。本试验研究结果与 Kim[15] 利用大肠杆菌 OMVs 对小鼠的存活率的研究结果一致。可见，ST-OMVs 对于肉仔鸡机体存在一定的安全性。此外，本研究发现，OMVs 免疫可显著提高免疫期间血清中的溶菌酶活力、白蛋白和 C3 质量浓度及 SOD 活力。LZM 是动物体液和组织中普遍存在的一种水解酶，是具有溶解细菌作用的非特异性免疫因子，在动物机体的免疫防御中发挥重要作用[16]。ALB 几乎均由肝脏实质细胞合成，是血清中的主要蛋白质成分，能够说明机体的营养状态[17]。补体系统是动物预防细菌入侵的第 2 道免疫防线，特别是对革兰氏阴性细菌。作为血清中质量浓度最高的补体 C3 在机体的免疫应答中发挥极重要的作用[18]。SOD 是一种普遍存在于生物界的活性物质，对生物体新陈代谢过程中产生的有害物质起清除作用[19]。试验表明高剂量［20 μg/(d·只)］的 OMVs 对肉仔鸡有一定负效应或毒副作用，影响其生长；低剂量［5 μg/(d·只)和 10 μg/(d·只)］的 OMVs 的应用对肉仔鸡安全可行，具有免疫作用。

本试验记录了试验鸡在 30 日龄攻毒后 5 d 内的体质量变化和存活率，结果显示，ST-OMVs 免疫能够消除 ST 感染引起的试鸡体质量下降，显著提高 ST 攻毒后试验鸡存活率。说明 ST-OMVs 免疫后可显著提高试验鸡抵抗 ST 感染的能力；攻毒后体质量和存活率的变化说明 OMVs 对于肉仔鸡具有免疫保护作用，与 Liu 等[20] 对 OMVs 的免疫保护效果研究一致。本试验测定了 30 日龄鸡攻毒后的第 5 天血液炎性细胞因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平。IL-1β、IL-6 和 TNF-α 是由多种细胞分泌的促炎性因子，具有不同生物学功能，会介入炎性反应等病理与生理反应。Sinha 等[21] 研究表明，经霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)OMVs 作用能诱导骨髓源树突细胞分泌 IL-1β、IL-6。Lee 等[22] 研究表明经肺炎双球菌(*K. pneumoniae*)OMVs 诱导巨噬细胞分泌 IL-6 和 TNF-α。乔智慧等[23] 在对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤中的研究同样表明当机体发生损伤时，IL-1β 质量浓度会升高。本试验中，在 30 日龄进行攻毒后，未曾免疫过的 ST 组的肉鸡血清中的 IL-1β 质量浓度明显高于 PBS 组。Kim[15] 研究表明受到大肠杆菌攻击后，OMV 免疫的小鼠的血清和腹腔液中没有检测到 IL-6 和 TNF-α 水平的上升，而在未免疫小鼠中观察到这些细胞因子显著增加。然而，即使在 OMV 免疫小鼠中，腹膜液中的 IL-6 和 TNF-α 水平也增加，表明免疫组受细菌攻击仍会导致局部炎症。在本试验中，ST 组与其他 2 组相比 IL-6 的质量浓度并没有显著差异，但是 3 组结果中，ST 组的 IL-6 质量浓度高于 PBS 组，ST 组 TNF-α 的分泌量显著高于其他 2 组，炎性因子的分泌趋势与 Kim[15] 研究结果一致。本试验中炎性因子的分泌量，与 PBS 组相比，OMV10 组的分泌量还是有所上升，表明即使免疫组攻毒后还是会产生炎症，与前人[15] 研究一致。

4 结 论

OMVs 作为细菌向外空间分泌的一种物质体，作为免疫物质，在一定程度上能够促进肉仔鸡免疫器官生长发育，且免疫剂量为 10 μg/(d·只)时对其生产性能没有显著的负面影响；当 OMVs 免疫剂量达到 20 μg/(d·只)时则会明显导致肉仔鸡生产性能下降，并伴随少量试鸡死亡；OMVs 免疫可显著提高免疫期间肉仔鸡血清中的溶菌酶活力、白蛋白质量浓度和 C3 质量浓度及 SOD 活力；ST-OMVs 免疫能够消除 ST 感染引起的肉仔鸡体质量下降，显著提高 ST 攻毒后肉仔鸡存活率，ST-OMVs 免疫后可显著提高肉仔鸡抵抗 ST 感染的能力，本试验中 ST-OMVs 最佳免疫剂量为 10 μg/(d·只)。

参考文献 Reference：

[1] 张婷婷，陈 健，周岩民. 沙门氏菌在肉鸡生产中的危害及其饲料控制技术[J]. 家畜生态学报，2010，31(6)：113-116.
ZHANG T T，CHEN J，ZHOU Y M. The hazard of Salmonella in broiler production and its control technology [J]. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*，2010，31(6)：113-116.

[2] 姚俊峰. 禽沙门氏菌病、疫苗和免疫保护机制：现状和前景[J]. 国外畜牧学(猪与禽)，2013，33(1)：34-38.
YAO J F. Salmonellosis，vaccines and immune protection mechanisms in poultry：status and prospects[J]. *Animal Science Abroad-Pigs and Poultry*，2013，33(1)：34-38.

[3] 徐仕忠. 家禽沙门氏菌病及其疫苗控制[J]. 中国家禽，2006，28(17)：48-50.
XU SH ZH. Poultry Salmon disease and its vaccine control [J]. *China Poultry*，2006，28(17)：48-50.

[4] KADURUGAMUWA J L，BEVERIDGE T J. Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other gram-negative bacteria[J]. *Microbiology*，1999，145(8)：2051.

[5] KWON S O, GHO Y S, LEE J C, *et al*. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate[J]. *Fems Microbiology Letters*, 2009, 297(2): 150-156.

[6] ELLIS T N, KUEHN M J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles[J]. *Microbiology & Molecular Biology Reviews Mmbr*, 2010, 74(1): 81-94.

[7] ALANIZ R C, DEATHERAGE B, LARA J C, *et al*. Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells prime B and T cell responses and stimulate protective immunity in vivo[J]. *Journal of Immunology*, 2007, 179(11): 7692.

[8] BOBAT S, LANGARICA A F, HITCHCOCK J, *et al*. Soluble flagellin FliC. induces an Ag-specific Th2 response yet promotes T-bet-regulated Th1 clearance of *Salmonella typhimurium* infection[J]. *European Journal of Immunology*, 2011, 41(6): 1606-18.

[9] DURAND V, MACKENZIE J, LEON J, *et al*. Role of lipopolysaccharide in the induction of type I interferon-dependent cross-priming and IL-10 production in mice by meningococcal outer membrane vesicles[J]. *Vaccine*, 2009, 27(13): 1912-1922.

[10] MURALINATH M, KUEHN M J, ROLAND K L. Immunization with *Salmonella enterica* serovar *Typhimuriumd* erived outer membrane vesicles delivering the pneumococcal protein PspA confers protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Infection & Immunity*, 2011, 79(2): 887.

[11] LAUGHLIN R C, MICKUM M, ROWIN K, *et al*. Altered host immune responses to membrane vesicles from *Salmonella* and Gram-negative pathogens[J]. *Vaccine*, 2015, 33(38): 5012-5019.

[12] PRADOS-ROSALES R, BROWN L, CASADEVALL A A, *et al*. Isolation and identification of membrane vesicle-associated proteins in Gram-positive bacteria and mycobacteria[J]. *Methods*, 2014, 1(C): 124-129.

[13] 杜　健. 支持细胞通过外泌体途径维持精原干细胞存活的研究[D]. 陕西杨凌：西北农林科技大学，2017.
DU J. Sertoi cells maintain the survival of spermatogonial stem cells by exosome[D]. Yangling Shaanxi: Northwest A&F University, 2017.

[14] 陈加贵. 肝癌细胞外泌体的鉴定及蛋白质组学研究[D]. 南宁：广西医科大学，2016.
CHEN J G. Identification exosomes of hepatoma cell and proteomics detection[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2016.

[15] KIM O Y, HONG B S, PARK K S, *et al*. Immunization with *Escherichia coli* outer membrane vesicles protects bacteria-induced lethality via Th1 and Th17 cell responses [J]. *Journal of Immunology*, 2013, 190(8): 4092.

[16] 雷小文. 互叶百千层提取物对仔猪血清溶菌酶的影响[J]. 猪业科学，2016，33(6)：98-99.
LEI X W. Effect of extracts from the leaves of each other on the serum lysozyme of piglets[J]. *Swine Industry Science*, 2016, 33(6): 98-99.

[17] 陈　瑶. 人血清白蛋白与配体之间相互作用的核磁共振研究[D]. 武汉：中国科学院研究生院（武汉物理与数学研究所），2016.
CHEN Y. NMR based study of the interaction between human serum albumin and ligands[D]. Wuhan: Wuhan Institute of Physics and Mathematics in Chinese Academy of Sciences, 2016.

[18] 马雪云. 鸡补体 C3 部分生物学特性的研究[D]. 山东泰安：山东农业大学，2006.
MA X Y. The biological characterization of the chicken's complement C3[D]. Tai'an Shandong: Shandong Agricultural University, 2006.

[19] 徐之勇，陈小盘，汪文阁，等. 银杏叶提取物对雏鸭血清中 SOD 活力及 MDA 含量的影响[J]. 河南科技学院学报（自然科学版），2016，44(1)：39-42.
XU ZH Y, CHEN X P, WANG W G, *et al*. The effect of *Ginkgo biloba* extract on SOD activity and MDA content of duckling's serum[J]. *Journal of Henan Institute of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2016, 44(1): 39-42.

[20] LIU Q, LIU Q, YI J, *et al*. Outer membrane vesicles from flagellin-deficient Salmonella entericaserovar *Typhimurium* induce cross-reactive immunity and provide cross-protection against heterologous Salmonella challenge[J]. *Scientific Reports*, 2016(6): 34776.

[21] SINHA R, KOLEY H, NAG D, *et al*. Pentavalent outer membrane vesicles of *Vibrio cholerae* induce adaptive immune response and protective efficacy in both adult and passive suckling mice models[J]. *Microbes & Infection*, 2015, 17(3): 215-227.

[22] LEE W H, CHO H I, HONG S W, *et al*. Vaccination with *Klebsiella pneumoniae* derived extracellular vesicles protects against bacteria-induced lethality via both humoral and cellular immunity [J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2015, 47(9): e183.

[23] 乔智慧，黄秀兰，蔡娜莉，等. 抵抗素及 IL-1β 在新生大鼠缺氧缺血性脑损伤中的表达及其意义[J]. 免疫学杂志，2010，26(12)：1104-1106.
QIAO ZH H, HUANG X L, CAI N L, *et al*. Expressions of resistin and IL-1β in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage and its significance[J]. *Immunological Journal*, 2010, 26(12): 1104-1106.

Effects of Salmonella Outer Membrane Vesicles on Immune Protection of Broilers

LIANG Liu, HU Rujiu, LIN Hua, SU Yuan, GAO Yupeng and YANG Mingming

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract The study was conducted to investigate the impacts of *Salmonella typhimurium* outer membrane vesicles on broilers. Three hundred and twenty 1-day-old AA broilers were randomly allocated in five treatments with eight replicates of eight broilers each. ST-OMVs levels were 0, 5 μg/(d · bird), 10 μg/(d · bird), 20 μg/(d · bird)(CK, ST, OMV5, OMV10, OMV20), respectively. Growth performance, survival, immune indexes, mass and survival(after changed by ST) were determined. The results showed that OMV20 had effect on DFI, BWG and FCR, whereas between the other groups were not significant. The OMVs levels had no effect on survival and immune indexes. OMV immunization could significantly increase LZM, ALB, C3 and SOD activity in serum during immunization. After it was changed by ST, compared with the CK group, the ST group significantly decreased body weight and survival. In addition, immunization with 10 μg/(d · bird) OMV significantly reduced the levels of IL-1β and TNFα in blood after ST infection and decreased the IL-6 level. The results showed that the appropriate dose of OMVs immunization had no significant effect on broiler performance, but it could enhance the body immune function of broilers, and had a significant increase in ability of broilers to resist ST infection. The best immunization dose of ST-OMVs in this experiment was 10 μg/(d · bird).

Key words *Salmonella typhimurium*; Outer membrane vesicles; Broilers; Performance; Immune protection

Received 2018-04-10 **Returned** 2018-06-20

Foundation item Agricultural Science and Technology Innovation Transformation Project in Shaanxi Province(No. NYKJ-2016-09); the National Natural Science Foundation of China(No. 31672437).

First author LIANG Liu, female, master student. Research area: animal nutrition and feed science. E-mail: 1184120382@qq.com

Corresponding author GAO Yupeng, male, professor, doctoral supervisor. Research area: animal nutrition and immunity, modern poultry production technology. E-mail: gaoyupeng112@sina.com

YANG Mingming, male, associate professor, master supervisor. Research area: animal nutrition and biotechnology research. E-mail: biodna@126.com

（责任编辑：潘学燕 **Responsible editor: PAN Xueyan**）