

高钼对艾维茵肉鸡法氏囊细胞周期和凋亡影响分析

杨帆, 崔恒敏*, 肖杰, 彭西, 崔伟, 程安春, 陈涛, 柏才敏

(四川农业大学动物医学院 环境公害与动物疾病四川省高校重点实验室, 雅安 625014)

摘要: 300只1日龄艾维茵肉鸡健雏随机分为4组, 分别饲以对照日粮(Mo 13 mg·kg⁻¹)和高钼日粮(Mo 500 mg·kg⁻¹, 高钼I组; Mo 1 000 mg·kg⁻¹, 高钼II组; Mo 1 500 mg·kg⁻¹, 高钼III组)6周, 以实验病理学和流式细胞术的方法观察雏鸡法氏囊变化。结果, 高钼II、III组法氏囊绝对质量和脏器指数显著低于对照组。组织学观察见法氏囊淋巴细胞减少, 网状细胞增生。超微结构观察, 淋巴细胞线粒体肿胀、嵴断裂, 或见线粒体基质电子密度增高; 凋亡淋巴细胞增多。流式细胞结果显示, 28和42日龄时高钼II、III组法氏囊淋巴细胞G₀/G₁期显著升高(P<0.01), S期、G₂+M期和增殖指数(PI)显著降低(P<0.01), 同时凋亡率显著高于对照组(P<0.01), TUNEL染色观察结果与流式细胞仪检测结果一致。结果表明, 日粮钼含量为1 000及1 500 mg·kg⁻¹时可抑制法氏囊生长发育。

关键词: 高钼; 法氏囊; 细胞周期; 凋亡; 肉雏鸡

中图分类号: S859.8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)08-1031-08

Effect of Dietary High Molybdenum on the Cell Cycle and Apoptosis of Bursa of Fabricius in Broilers

YANG Fan, CUI Heng-min*, XIAO Jie, PENG Xi, CUI Wei,

CHENG An-chun, CHEN Tao, BAI Cai-min

(Key Laboratory of Environmental Hazard and Animal Diseases of Sichuan Province, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: The experiment was conducted with the objective of examining the effects of high molybdenum on the bursa of Fabricius in broilers by the methods of experimental pathology and flow cytometry (FCM). 300 one-day-old Avian broilers were divided into four groups and fed on Control diet (Mo 13 mg·kg⁻¹) and High molybdenum diets (Mo 500 mg·kg⁻¹, High molybdenum group I; Mo 1 000 mg·kg⁻¹, High molybdenum group II; Mo 1 500 mg·kg⁻¹, High molybdenum group III) for 6 weeks. The result showed that the weight and the relative weight of bursa of Fabricius were decreased, lymphocytes were histopathologically decreased and reticulocytes were increased in number in high molybdenum group II and III. Ultrastructurally, the frequency of lymphocyte apoptosis was higher in high molybdenum group II and III than that in control group. The mitochondria were swelled and mitochondria cristas were broken, or the density of mitochondrial matrix was increased. The statistical analyses by FCM indicated that the G₀/G₁ phase was increased (P<0.01) and the G₂+M phase, S phase and the PI (Proliferating index) were decreased (P<0.01) of bursa in high molybdenum group II and III at 28 and 42 days of age. Meanwhile, the percentage of cellular apoptosis was higher in high molybdenum group II and III than that in control group. Also, the TUNEL staining was consistent with the result of FCM. It was concluded that dietary molybdenum in 1 000 and 1 500 mg·kg⁻¹ inhibited the development of the

收稿日期: 2009-12-04

基金项目: “教育部长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(IRT 0848); 四川省重大培育项目(09ZZ017); 四川省科技厅基础应用研究项目; 四川省教育厅重点项目; 四川农大“双支”计划创新团队项目

作者简介: 杨帆(1985-), 女, 内蒙古赤峰人, 硕士, 主要从事畜禽病理学研究, E-mail: yangfan0867@126.com

* 通讯作者: 崔恒敏, E-mail: cuihengmin2008@sina.com

bursa of Fabricius, caused pathological changes in the bursa of Fabricius in broilers.

Key words: high molybdenum; bursa of Fabricius; cell cycle; apoptosis; broilers

钼是动植物生长发育必须的微量元素之一,具有重要的生理学作用,是动物体内多种酶的组成成分^[1]。对克山病区贫钼人群细胞免疫功能的研究发现,其非特异性细胞免疫功能降低,补钼后显著增高,T细胞功能也得到加强^[2]。黄淑云等研究表明,注射带钼免疫原的试验兔血清抗体效价高于对照组,并认为钼能增强机体的体液免疫功能^[3]。但过量钼可造成动物免疫器官萎缩,生长指数降低,细胞免疫功能和体液免疫功能下降^[3-5]。杨自军等研究发现,高剂量钼可引起绵羊 T、B 淋巴细胞百分率下降,其中 B 淋巴细胞较敏感^[6]。法氏囊是禽类独有的免疫器官,是 B 淋巴细胞发育、成熟与分化的主要场所,与体液免疫有着密切联系^[7],目前尚未见高钼对禽类法氏囊发育影响的研究报道。本试验以艾维茵肉鸡为研究对象,研究不同水平高钼日粮对雏鸡法氏囊病理形态学,超微结构以及淋巴细胞增殖分化与凋亡的动态影响,旨在探讨高钼对动物体液免疫功能影响的作用机理。

1 材料与方法

1.1 试验动物和日粮

选用 1 日龄艾维茵肉鸡健雏 300 只(购自成都温江正大种禽场),随机分为 4 组,每组 75 只(其中 20 只用于全程观察),分别采食基础日粮和 3 种高钼日粮。4 组雏鸡分别饲养于木制试验禽笼内,自由饮水和采食,常规饲养管理,试验期 6 周。试验期间每日进行临床观察,记录临床症状。

玉米、豆粕型基础日粮($\text{Mo } 13 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)作为对照组日粮,其中蛋白质含量、能量以及维生素和微量元素(钼除外)添加量均参照肉鸡 NRC(1994)的营养标准,即 CP 20.12%、ME(MJ $\cdot \text{kg}^{-1}$) 12.623、Ca 0.879 6%、P 0.621 5%。在对照组日粮中分别添加 Mo 487、987 和 1 487 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 构成高钼组日粮:高钼 I 组($\text{Mo } 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、高钼 II 组($\text{Mo } 1 000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和高钼 III 组($\text{Mo } 1 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。钼源为 Na_2MoO_4 。

1.2 试验方法

1.2.1 临床观察 每日观察记录各试验组鸡只生长情况以及临床症状。每周进行一次称重。

1.2.2 病理形态学观察 试验第 7、14、21、28、35 天每组随机抽取 5 只剖杀,第 42 天雏鸡全部剖

杀,观察并记录法氏囊肉眼变化。

1.2.2.1 病理组织学观察:上述剖杀作尸检的同时,取法氏囊组织以 10% 中性福尔马林固定液固定,脱水,石蜡包埋,切片,HE 常规染色,显微镜下观察并记录其病理组织学变化。

1.2.2.2 超微结构观察:试验结束时,每组随机抽取 4 只剖杀后立即取法氏囊 1~2 块,2.5% 戊二醛固定,环氧树脂包埋,超薄切片,锇酸染色,在透射电镜下观察并记录超微结构变化。

1.2.3 法氏囊脏器指数的检测 试验第 7、14、21、28、35、42 天每组随机抽取 5 只,空腹称重,剖杀后取法氏囊去脂肪、结缔组织等称其净质量,分别记录。法氏囊的脏器指数为其净质量对应空腹体质量的比值。

1.2.4 法氏囊细胞生长周期的检测 试验的 14、28、42 天每组随机抽取 5 只剖杀后立即取适量法氏囊组织块,加入 pH 7.0~7.4 的冰冻 PBS 后用机械法制成细胞匀浆,300 目筛过滤后,500~800 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 低速离心,弃上清液,PBS(同上)洗 2 次后,调整细胞浓度为 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,用 PI 染液(5 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 碘化丙啶,0.5% Tritonx-100, RNA 酶)避光染色 30 min 后,洗涤,重悬细胞,流式细胞仪检测,Modifit 软件分析处于静止期(G_0/G_1 期),DNA 合成期(S 期)及分裂期(G_2+M 期)的细胞数量百分比。检验用试剂盒购于基因公司,试剂生产厂家为 BD Pharmingen 公司。

1.2.5 法氏囊细胞凋亡的检测

1.2.5.1 流式细胞术:同上方法制作法氏囊的单细胞悬液,V-FITC 和 PI 双染法测细胞凋亡,流式细胞仪检测,Cell quest 软件分析。检验用试剂盒购于基因公司,试剂生产厂家为 BD Pharmingen 公司。

1.2.5.2 TUNEL 法(TdT 介导的原位末端标记法):试验第 42 天每组随机抽取 5 只鸡,剖杀后立即取法氏囊 1~2 块,10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋切片,按下列步骤操作:石蜡切片常规脱蜡处理;蛋白酶 K 室温孵育 15 min 后 PBS 冲洗 2 次;滴加 TUNEL 反应复合物,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min 后 PBS 冲洗 3 次;加入转化剂 POD,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后 PBS 冲洗 3 次;加 DAB 底物溶液室温孵育 10 min 后 PBS 冲洗 3 次;甲基绿复染、封片、镜检。TUNEL 法检测试剂盒购于南京建成生物制品有限公司。

1.3 数据统计与分析

数据经 SPSS16.0 统计软件统计。各组数据均以平均数(\bar{x})±标准差(SD)表示,并用单因素方差分析法比较各高钼组与对照组间差异的显著性。

2 结果

2.1 临床观察及体质量增长

试验第 3 天,各高钼组雏鸡采食量与对照组比较均出现不同程度的下降,全群鸡只喜卧,嗜睡。第 11 天,各高钼组雏鸡与对照组比较精神委顿,食欲下降。试验第 28 天,高钼 I 组雏鸡采食量有所上

升,高钼 II、III 组个别鸡只出现轻微运动障碍,表现为站立不稳,被驱赶时,俯卧不动或卧行,但关节无肿胀变形。高钼 III 组部分雏鸡兴奋性升高,表现为对声音和光线的敏感性较其他组高,被惊动后常高飞。试验第 30 天,高钼 II、III 组个别雏鸡出现腹泻,肛周羽毛粘连棕黑色粪便,至试验结束时,腹泻鸡只明显增多。试验期间各高钼组均无死亡发生。

高钼 I、II、III 组雏鸡的生长发育迟缓。至 42 日龄试验结束时,高钼 I、II、III 组体质量分别占对照组体质量的 95.47%、78.62%和 45.31%,详细体增质量情况见表 1。

表 1 雏鸡体质量增长结果

Table 1 The body weight of experimental chicken

组别 Group	1 天 1 day	7 天 7 day	14 天 14 day	21 天 21 day	28 天 28 day	35 天 35 day	42 天 42 day
对照组 Control	45.11±1.92 ^A	171.15±11.34 ^A	457.40±40.56 ^A	770.00±78.22 ^A	1 100.65±122.54 ^A	1 684.60±104.15 ^A	2 046.40±97.40 ^A
高钼 I 组 HMo I	44.40±1.43 ^A	147.20±8.87 ^B	366.45±26.08 ^B	660.00±52.86 ^B	999.30±111.83 ^B	1 575.65±145.70 ^B	1 953.70±80.37 ^B
高钼 II 组 HMo II	44.30±1.84 ^A	123.75±11.68 ^C	290.60±33.82 ^C	557.80±63.05 ^C	828.75±96.59 ^C	1 290.80±82.89 ^C	1 609.00±107.04 ^C
高钼 III 组 HMo III	44.10±1.81 ^A	99.30±9.21 ^D	194.60±16.24 ^D	312.35±27.20 ^D	505.00±38.13 ^D	714.75±46.26 ^D	927.25±65.03 ^D

同列数据标注不同字母表示差异极显著($P<0.01$),相同字母无显著差异($P>0.05$)

Values within a column followed by different letters were significantly different between two groups ($P<0.01$), and the same letters were not different between two groups ($P>0.05$)

2.2 法氏囊病理形态学变化

2.2.1 剖检变化 7~28 日龄时,各高钼组法氏囊与对照组比较出现不同程度的体积缩小。35 和 42 日龄时,高钼 I 组法氏囊病变趋于缓和,体积与对照组比较无明显差异;高钼 II、III 组法氏囊体积明显小于对照组(图 1a、1b)。各组法氏囊颜色、质地均无明显改变。

2.2.2 病理组织学变化 试验期间,高钼 I 组法氏囊未见有明显组织学变化。28 日龄时,高钼 II、III 组淋巴滤泡体积和淋巴细胞数量与对照组差异不明显,但皮质、髓质分界不清,髓质见网状细胞增生(图 1c)。35 日龄时,高钼 II、III 组法氏囊髓质淋巴细胞数量减少,排列稀疏,网状细胞增生(图 1d)。42 日龄时,高钼 II、III 组法氏囊部分淋巴滤泡髓质区扩大,皮质变薄,皮质和髓质淋巴细胞数量减少,排列稀疏,或呈打孔状,网状细胞增生,间质无明显病变(图 1e、1f)。

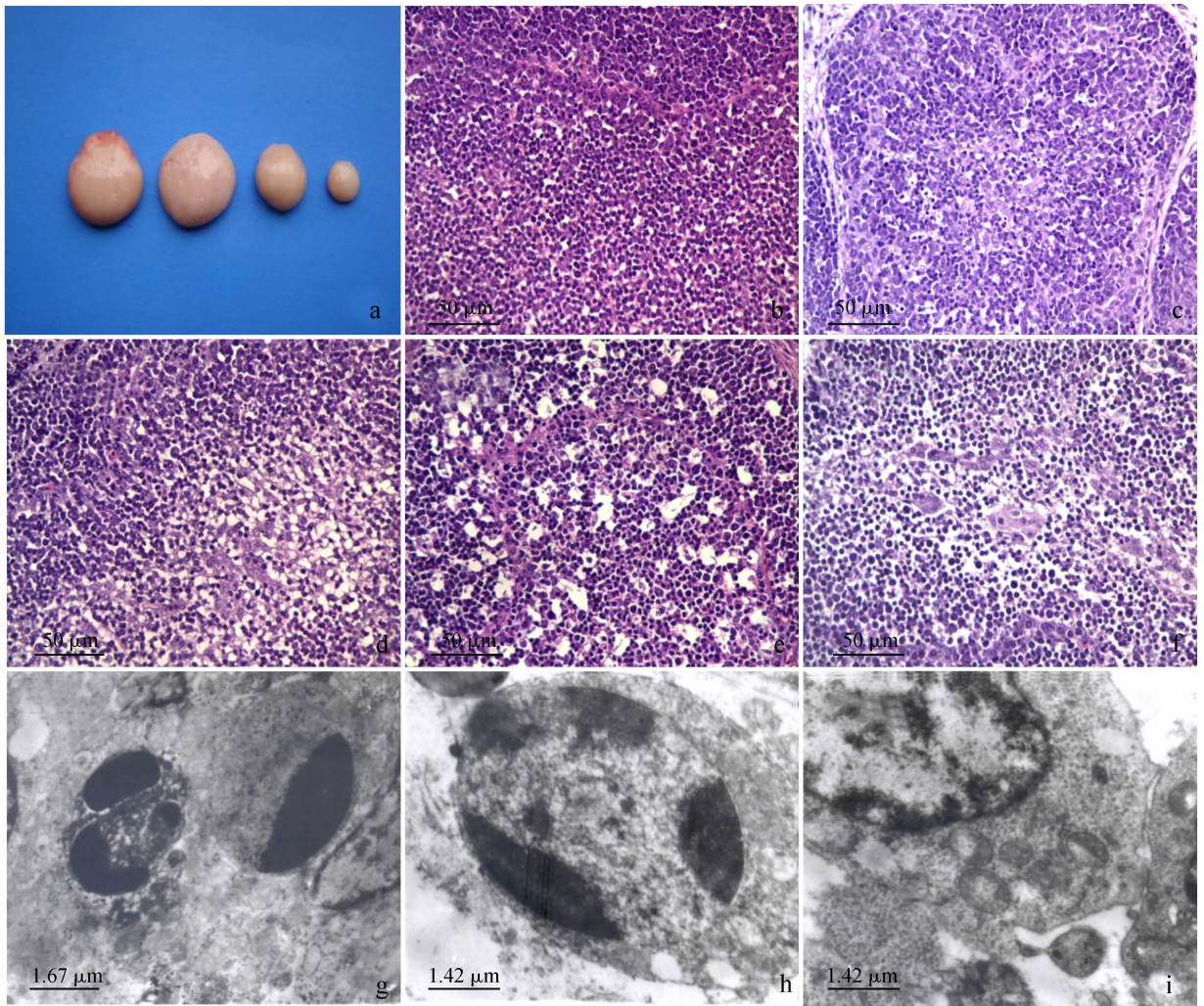
2.2.3 超微病理结构变化 与对照组比较,高钼 I 组法氏囊无明显的病理变化,高钼 II、III 组凋亡淋巴细胞数量较对照组增多。凋亡淋巴细胞核染色质边集呈新月形、马蹄形或团块状,并见有凋亡小体(图 1g、1h)。淋巴细胞线粒体变化表现有两种形

式:①线粒体肿胀,嵴断裂、排列紊乱甚至消失呈空泡状(图 1h);②线粒体肿胀,周边基质电子密度显著增高,中央基质电子密度低呈空泡状,线粒体嵴结构模糊,甚至可见线粒体体积缩小呈椭圆形团块,电子密度极高,结构消失(图 1i)。

2.3 法氏囊的绝对质量及脏器指数

2.3.1 法氏囊绝对质量 高钼 I 组 7~28 日龄时法氏囊质量显著或极显著低于对照组($P<0.01$ 或 $P<0.05$),35 和 42 日龄时与对照组比较差异不显著($P>0.05$)。高钼 II 和 III 组 7 日龄至试验结束时法氏囊质量均显著或极显著低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。详情见表 2。

2.3.2 脏器指数 高钼 I 组 7 日龄至试验结束时法氏囊脏器指数与对照组比较差异不显著($P>0.05$)。高钼 II 组 7~28 日龄时法氏囊脏器指数与对照组比较差异不显著($P>0.05$),35 和 42 日龄时显著或极显著低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。高钼 III 组 7 日龄和 14 日龄时法氏囊脏器指数与对照组比较差异不显著($P>0.05$),21~42 日龄时显著或极显著低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。详情见表 3。



a. 42 日龄雏鸡法氏囊, 从左至右依次为对照组, 高钼 I、II、III 组。示高钼 I 组法氏囊无显著变化; 高钼 II 和 III 组法氏囊体积缩小; b. 42 日龄对照组法氏囊。HE \times 400; c. 28 日龄高钼 III 组法氏囊。淋巴滤泡皮-髓质分界不清, 髓质见网状细胞增生。HE \times 400; d. 35 日龄高钼 III 组法氏囊。淋巴滤泡髓质淋巴细胞减少, 网状细胞增生。HE \times 400; e. 42 日龄高钼 II 组法氏囊。皮质髓质淋巴细胞减少, 排列稀疏呈打孔状。HE \times 400; f. 42 日龄高钼 III 组法氏囊。淋巴滤泡髓质区扩大, 淋巴细胞减少, 网状细胞增生。HE \times 400; g. 42 日龄高钼 III 组法氏囊。凋亡细胞染色质边集呈团块状(⇩), 并出现凋亡小体(↑)。TEM \times 12 000; h. 42 日龄高钼 III 组法氏囊。凋亡细胞线粒体肿胀, 呈空泡状。TEM \times 17 000; i. 42 日龄高钼 III 组法氏囊。淋巴细胞线粒体基质密度增加。TEM \times 17 000。b-f 图中标尺为 50 μ m, g 图中标尺为 1.67 μ m, h 和 i 图中标尺为 1.42 μ m

a. The bursa of Fabricius of chickens at 42 days of age in control group, high Mo groups I、II and III from left to right respectively. There was no obvious change in high Mo group I. In high Mo group II and high Mo group III, the size of the bursa was diminished; b. The bursa of Fabricius in control group at 42 days of age. HE \times 400; c. The reticulocytes were increased in number in the medulla of lymphoid follicles and the boundary of cortex and medulla was unclear in high Mo group III at 28 days of age. HE \times 400; d. The bursa of Fabricius in high Mo group III at 35 days of age. Lymphocytes are decreased and reticulocytes were increased in number in the medulla of lymphoid follicles. HE \times 400; e. The bursa of Fabricius in high Mo group II at 42 days of age. Lymphocytes are decreased both in cortex and medulla and loosely arranged in the lymphoid follicles. HE \times 400; f. The bursa of Fabricius in high Mo group III at 42 days of age. Lymphocytes are decreased and reticulocytes were increased in number in the lymphoid follicles. HE \times 400. g. Apoptotic lymphocyte(⇩) and apoptotic body(↑) are appeared in the bursa of Fabricius in high Mo group III at 42 days of age. TEM \times 12 000. h. The mitochondria are swelled in an apoptotic lymphocyte in high Mo group III at 42 days of age. TEM \times 17 000. i. The density of mitochondrial matrix was increased in high Mo group III at 42 days of age. TEM \times 17 000. b-f scale bars, 50 μ m. g scale bars, 1.67 μ m. h and i scale bars, 1.42 μ m

图 1 雏鸡法氏囊病理形态学变化

Fig. 1 Changes of the bursa of Fabricius of chicken by morphopathology

表 2 法氏囊绝对质量

Table 2 The weight of the bursa of Fabricius

g

组别 Group	7 天 7 day	14 天 14 day	21 天 21 day	28 天 28 day	35 天 35 day	42 天 42 day
对照组 Control	0.27±0.02 ^A	0.91±0.13 ^A	1.68±0.19 ^A	2.68±0.43 ^A	4.03±0.22 ^A	4.42±0.97 ^A
高钼 I 组 HMo I	0.20±0.07 ^{ab}	0.65±0.18 ^{ab}	1.18±0.23 ^{BC}	2.02±0.38 ^a	3.08±0.41 ^A	3.60±0.76 ^A
高钼 II 组 HMo II	0.19±0.04 ^{ab}	0.61±0.11 ^{ab}	1.10±0.27 ^C	1.77±0.51 ^a	2.23±0.57 ^B	2.56±0.74 ^{ab}
高钼 III 组 HMo III	0.13±0.01 ^B	0.45±0.15 ^B	0.58±0.11 ^D	0.60±0.33 ^B	1.14±0.17 ^B	1.60±0.57 ^B

同列数据标注不同字母之间差异极显著($P<0.01$);大写字母和小写字母之间差异显著($P<0.05$);相同字母之间差异不显著($P>0.05$)。以下各表同

Values within a column followed by different letters were significantly different between two groups ($P<0.01$). Values within a column followed by small and capital of the same letter were different between two groups ($P<0.05$). Values within a column followed by the same letters were not different between two groups ($P>0.05$). The same as below

表 3 法氏囊脏器指数

Table 3 The relative weight of the bursa of Fabricius

%

组别 Group	7 天 7 day	14 天 14 day	21 天 21 day	28 天 28 day	35 天 35 day	42 天 42 day
对照组 Control	0.17±0.02 ^A	0.21±0.03 ^A	0.22±0.01 ^A	0.21±0.02 ^A	0.24±0.02 ^A	0.22±0.02 ^A
高钼 I 组 HMo I	0.16±0.01 ^A	0.18±0.06 ^A	0.20±0.05 ^{AB}	0.20±0.02 ^A	0.22±0.04 ^A	0.20±0.07 ^{AB}
高钼 II 组 HMo II	0.16±0.03 ^A	0.23±0.05 ^A	0.18±0.03 ^{AB}	0.18±0.03 ^A	0.15±0.02 ^{BC}	0.16±0.01 ^{ab}
高钼 III 组 HMo III	0.15±0.02 ^A	0.20±0.04 ^A	0.16±0.02 ^{ab}	0.13±0.01 ^B	0.15±0.02 ^C	0.15±0.01 ^{ab}

2.4 法氏囊淋巴细胞的生长周期

14 日龄时,高钼各组法氏囊淋巴细胞分裂各期与对照组比较差异不显著($P>0.05$);28 和 42 日龄时,高钼 I 组法氏囊淋巴细胞分裂各期与对照组比较差异不显著($P>0.05$),高钼 II、III 组变化趋势相

似, G_0/G_1 期淋巴细胞比例极显著高于对照组($P<0.01$), G_2+M 和 S 期淋巴细胞比例和 PI 指数显著或极显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)低于对照组。详情见表 4,图 2。

表 4 法氏囊淋巴细胞周期变化

Table 4 Cell cycle of the bursa of Fabricius

时间 Time	时期 Phase	时照组 Control	高钼 I 组 HMo I	高钼 II 组 HMo II	高钼 III 组 HMo III
14 天 14 day	G_0/G_1	86.68±0.86 ^A	90.30±1.59 ^A	90.42±1.33 ^A	90.62±1.26 ^A
	S	5.26±0.53 ^A	4.72±0.82 ^A	4.86±0.72 ^A	4.59±0.47 ^A
	G_2+M	5.06±0.66 ^A	4.98±1.11 ^A	4.72±0.64 ^A	4.79±0.86 ^A
	PI	10.32±0.86 ^A	9.70±1.59 ^A	9.59±1.33 ^A	9.38±1.25 ^A
28 天 28 day	G_0/G_1	89.43±1.70 ^A	90.54±1.12 ^A	93.55±0.28 ^B	95.88±1.12 ^b
	S	5.22±0.87 ^A	4.54±0.39 ^A	3.24±2.17 ^B	2.02±0.50 ^C
	G_2+M	5.34±1.06 ^A	4.92±0.75 ^A	3.20±0.23 ^B	2.10±0.65 ^b
	PI	10.57±1.70 ^A	9.46±1.12 ^A	6.45±0.28 ^B	4.12±1.12 ^b
42 天 42 day	G_0/G_1	90.37±2.4 ^A	90.38±0.89 ^A	94.95±0.42 ^B	94.33±2.31 ^B
	S	4.92±1.26 ^A	4.77±0.43 ^A	2.56±0.19 ^B	2.74±1.08 ^B
	G_2+M	4.94±1.27 ^A	4.77±0.43 ^A	2.52±0.26 ^B	2.93±1.23 ^B
	PI	9.86±2.53 ^A	9.54±0.86 ^A	5.08±0.31 ^B	5.68±2.30 ^B

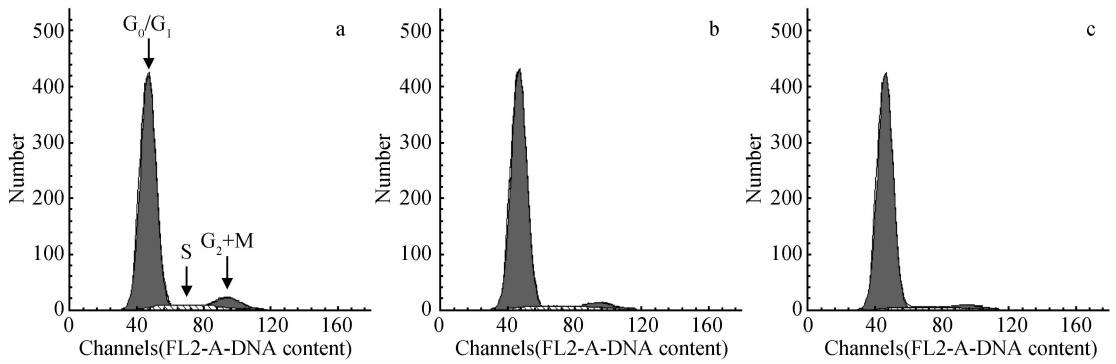
$$\text{Proliferating index (PI)} = \frac{S+(G_2+M)}{(G_0/G_1)+S+(G_2+M)} \times 100\%$$

2.5 法氏囊淋巴细胞凋亡率

2.5.1 流式细胞术检测法氏囊淋巴细胞凋亡率

高钼 I 组 14 日龄时法氏囊淋巴细胞凋亡率与对照组无显著性差异($P>0.05$),28 日龄时显著高于对照组($P<0.05$),42 日龄时与对照组无明显差异

($P>0.05$)。高钼 II 组 14 日龄时法氏囊淋巴细胞凋亡率显著高于对照组($P<0.05$),28 日龄和 42 日龄时极显著高于对照组($P<0.01$)。高钼 III 组 14 日龄至试验结束,法氏囊淋巴细胞凋亡率与对照组比较极显著升高($P<0.01$)。详情见表 5,图 3。



与对照组(a)比较,高钼Ⅱ(b)和Ⅲ组(c)的 G_0/G_1 期细胞百分率升高,S期和 G_2+M 期细胞百分率减小。Histograms show the cell cycle progression: G_0/G_1 , S and G_2+M phase distribution of the bursal cells. The percentage of G_0/G_1 phase is higher, and the percentages of G_2+M phase and S phase are lower in high Mo group II (b) and in high Mo group III (c) than that in control group(a)

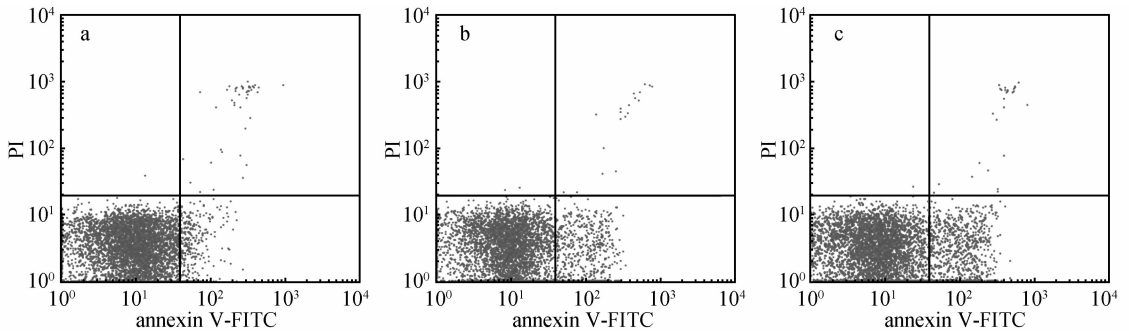
图2 法氏囊细胞周期直方图

Fig. 2 DNA histogram of cells in the bursa of Fabricius cell cycle

表5 法氏囊淋巴细胞凋亡率

Table 5 Percentage of apoptotic lymphocytes in the bursa of Fabricius

组别 Group	14天 14 day	28天 28 day	42天 42 day
对照组 Control	6.41±1.26 ^A	5.36±1.34 ^A	5.15±1.93 ^A
高钼Ⅰ组 HMoⅠ	6.87±2.67 ^A	8.64±0.76 ^{ab}	7.40±1.02 ^A
高钼Ⅱ组 HMoⅡ	12.02±2.17 ^{ab}	12.07±2.14 ^{bc}	12.09±1.91 ^B
高钼Ⅲ组 HMoⅢ	15.91±3.79 ^B	15.32±1.98 ^C	16.52±1.63 ^C



与对照组凋亡图(a)比较,高钼Ⅱ和Ⅲ组(分别为b和c)的凋亡细胞数量明显增多。Quadrantal diagrams show that minor percentage of cells in the bursa of Fabricius of control group are undergoing apoptosis (a), and increased percentage of cells in high Mo group II and III (b and c) are undergoing apoptosis

图3 雏鸡法氏囊细胞凋亡散点图

Fig. 3 Scattergram of apoptotic of cells in the bursa of Fabricius

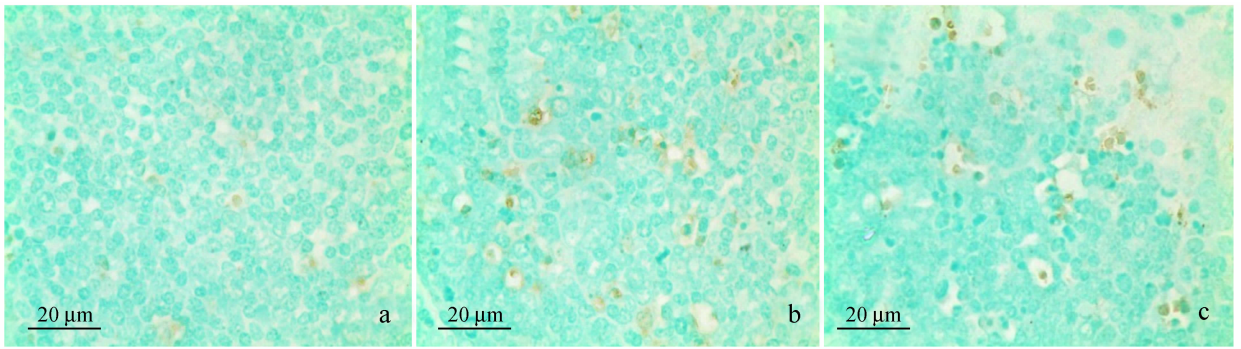
2.5.2 TUNEL 法检测结果 TUNEL 染色结果显示,凋亡细胞核呈棕褐色,并有核浓缩,核形状不规则等变化。42日龄时,对照组法氏囊阳性细胞数量少,高钼Ⅰ组与对照组比较无明显差异,高钼Ⅱ、Ⅲ组凋亡细胞数量明显高于对照组。详情见图4。

3 讨论与结论

3.1 高钼对法氏囊形态结构的影响

法氏囊是B淋巴细胞的发源地,在B淋巴细胞

的成熟过程中起着非常重要的作用。本试验结果显示,高钼Ⅰ组14~42日龄法氏囊形态结构与对照组无差异;高钼Ⅱ、Ⅲ组镜下病变始于28日龄,主要表现为淋巴滤泡的皮质、髓质分界不清,随试验期延长淋巴细胞数量减少,网状细胞增生,表现出蓄积毒性。42日龄法氏囊电镜观察显示,高钼除引起淋巴细胞凋亡外,还造成线粒体的损伤,表现为线粒体肿胀、嵴断裂或基质密度增加、体积缩小。试验结果表明,日粮钼含量 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及其以上可引起雏



a. 42 日龄对照组法氏囊, 见有极少量凋亡细胞。b. 42 日龄高钼 II 组法氏囊, 凋亡细胞数量增多。c. 42 日龄高钼 III 组法氏囊, 凋亡细胞数量增多。a~c 图中标尺为 20 μm

a. Few apoptotic cells in control group at 42 days of age. b. The number of apoptotic cells was higher in high Mo group II at 42 days of age than that in control group. c. The number of apoptotic cells was higher in high Mo group III at 42 days of age than that in control group. a-c scale bars, 20 μm

图 4 雏鸡法氏囊 TUNEL 染色结果

Fig. 4 TUNEL staining of the bursa of Fabricius

鸡法氏囊的病理损伤, 其结构损伤和功能障碍可致机体体液免疫功能受损。

3.2 高钼对法氏囊淋巴细胞周期的影响

许多细胞因子和生物活性物质对淋巴细胞的增殖具有调控作用^[8], 然而钼对法氏囊淋巴细胞增殖的影响尚无文献报道。本试验结果显示, 高钼 I 组各期淋巴细胞比例及 PI 值与对照组相比差异不显著, 且法氏囊脏器指数也与对照组差异不显著, 表明日粮钼含量 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 对雏鸡法氏囊生长无明显影响。随日龄的增长和钼摄入量的增多, 高钼 II 组和高钼 III 组法氏囊 28 和 42 日龄时静止期 (G_0/G_1) 淋巴细胞比例较对照组显著升高, 而增殖期 (S/G_2+M) 比例和 PI 值则不同程度低于对照组, 表明日粮钼含量达到 1 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及以上时, 法氏囊淋巴细胞由静止期进入 S 期受阻, 从而导致法氏囊淋巴细胞数量减少, 法氏囊脏器指数降低, 法氏囊发育受抑, 并与 28~42 日龄法氏囊的病理组织学变化相一致。钼对法氏囊淋巴细胞周期影响的机理可能与核酸代谢异常有关。钼是黄嘌呤氧化酶 (XO) 的组成成分, XO 是生物体内核酸代谢过程中的重要酶类^[9-10], 高钼可显著降低血液和肝脏中 XO 活力^[11-12], 引起核酸代谢紊乱从而导致法氏囊淋巴细胞增殖分化受阻。

3.3 高钼对法氏囊淋巴细胞凋亡的影响

凋亡是基因调控的细胞程序性死亡, 在机体发育、维持组织稳态、去除衰老或受损伤细胞等过程中发挥重要作用^[13]。本试验采用流式细胞术、

TUNEL 染色法及透射电镜检测高钼对法氏囊细胞凋亡的影响。结果显示, 高钼 I 组法氏囊淋巴细胞凋亡率与对照组比较差异不显著, 表明 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 日粮钼对雏鸡法氏囊淋巴细胞凋亡无明显影响。高钼 II 组和高钼 III 组法氏囊淋巴细胞凋亡率较对照组极显著升高, 与 42 日龄 TUNEL 染色和电镜下凋亡淋巴细胞观察的结果一致, 表明高钼能显著增加法氏囊淋巴细胞凋亡率。其机理可能是: ①与自由基蓄积有关。自由基是引起细胞凋亡的主要因素之一^[14]。超氧化物歧化酶歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 在机体自由基清除的过程中起重要作用, 而钼中毒动物血液和组织中 SOD 和 GSH-Px 活力显著降低^[11, 15], 使大量自由基异常蓄积引起细胞凋亡增多。②与线粒体受损有关。线粒体在调节凋亡机制平衡方面有重要的作用, 凋亡抑制基因 *bcl-2* 的表达产物主要分布于线粒体内膜上。本试验电镜观察证实, 当日粮钼含量达 1 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及其以上时, 法氏囊淋巴细胞线粒体受损明显, 可导致凋亡抑制基因 *bcl-2* 表达受阻、细胞色素 C 自线粒体释放至胞质, 并激活 Caspase-3 蛋白酶而诱导凋亡^[16]。③与细胞周期阻滞有关。本试验中周期检测显示, 日粮钼含量达 1 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上时, 法氏囊细胞周期被阻滞在 G_0/G_1 期, 不能顺利进入 S 期, 达到一定比例时便启动凋亡程序^[17]。

参考文献:

[1] BARCELOUX D G, BARCELOUX D. Molybdenum

- [J]. *Clinical Toxicology*, 1999, 37(2): 231-237.
- [2] 杨自军, 龙塔, 冉林武, 等. 钼的生物学功能及其在动物生产中的作用[J]. 河南科技大学学报, 2004, 24(2): 40-43.
- [3] 黄淑云, 刘尧服, 何顺华, 等. 微量元素钼对小鼠及家兔免疫反应影响的初步探讨[J]. 江西医学院学报, 1987, 27(1): 31-36.
- [4] 王婷, 龙塔, 杨自军, 等. 钼对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(2): 21-22.
- [5] COMPERE R, BURNY A, RIGA A. Copper in the Treatment of molybdenosis in the rat; determination of the dose of the antidote[J]. *The Journal of Nutrition*, 1965, 87(4): 412-418.
- [6] 杨自军, 冉林武, 王婷, 等. 锌、铜对钼中毒绵羊免疫功能的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 29(2): 207-209.
- [7] 陈涛, 龚涛, 柏才敏, 等. 高氟对雏鸡法氏囊形态结构、细胞周期和凋亡影响的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 8: 1235-1243.
- [8] CUI H M, FANG J, PENG X. Pathology of the thymus, spleen and bursa of Fabricius in zinc-deficient ducklings[J]. *Avian Pathology*, 2003, 32: 257-262.
- [9] BRAY R C, PALMER G, BEINERT H. Direct studies on the electron transfer sequence in xanthine oxidase by electron paramagnetic resonance spectroscopy II [J]. *Kinetic Studies Employing Rapid Freezing*, 1964(239): 2667-2676.
- [10] 胡相红. 微量元素钼与人类健康[J]. 现代预防医学, 2001, 28(3): 353-355.
- [11] MERL F R, ROGER S S, MICHAEL A S. Modest copper supplementation blocks molybdenosis in cattle [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2006, 18: 566-572.
- [12] GRAY L F, DANIEL L J. Effect of the copper status of the rat on the copper-molybdenum-sulfate interaction[J]. *The Journal of Nutrition*, 1964, 84: 31-37.
- [13] TOMPSON C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. *Science*, 1995, 267: 1456-1462.
- [14] ZAMZAMI N, MARCHETTI P, CASTEDO M. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 1995, 181: 161.
- [15] 李三强, 龙晶. 饮用天然高钼水诱发的钼中毒耕牛主要生物酶测定[J]. 动物营养学报, 1998, 10(1): 29-33.
- [16] ROSET R, ORTET L, GIL G, et al. Role of Bcl-2 family members on apoptosis; what we have learned from knock-out mice [J]. *FrontBiosci*, 2007, 12(20): 4722-4730.
- [17] 崔恒敏, 陈怀涛. 铜中毒对雏鸭免疫器官细胞凋亡影响的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(4): 370-375.

(编辑 朱绯)