

高铜对雏鸭肾脏细胞周期和凋亡影响的研究

崔伟, 彭西, 赵丽, 杨帆, 崔恒敏*

(四川农业大学动物医学院, 雅安 625014)

摘要: 360只1日龄天府肉鸭随机分为6组,分别喂以对照日粮(Cu 8 mg/kg)和高铜日粮(Cu 100 mg/kg,高铜I组;Cu 200 mg/kg,高铜II组;Cu 400 mg/kg,高铜III组;Cu 600 mg/kg,高铜IV组;Cu 800 mg/kg,高铜V组)6周,以流式细胞术研究高铜对雏鸭肾脏细胞周期和凋亡的影响。结果显示,肾脏细胞的凋亡比例随日粮铜水平的升高而升高,当日粮铜水平达到400 mg/kg以上时,肾脏细胞凋亡比例与对照组比较差异极显著($P < 0.01$)。日粮铜水平达到400 mg/kg以上时,肾脏细胞的增殖指数(PD)极显著低于对照组($P < 0.01$)。结果表明日粮铜水平达到400 mg/kg以上时会引起肾脏受损,肾脏细胞的增殖分化严重受阻,肾脏细胞凋亡大量增加。

关键词: 高铜;肾脏;流式细胞术;细胞凋亡;细胞周期;雏鸭

中图分类号:S856.9;S852.3

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2008)07-0980-05

Effect of Dietary High Copper on the Cell Cycle and Apoptosis of Kidney in Ducklings

CUI Wei, PENG Xi, ZHAO Li, YANG Fan, CUI Heng-min*

(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China)

Abstract: The experiment was conducted with the objective of examining the effect of dietary high copper on the cell cycle and apoptosis of kidney in ducklings by the methods of flow cytometry (FCM). 360 one-day-old Tianfu meat ducklings were randomly divided into six groups and fed on diets as follows: Control (Cu 8 mg/kg) and high copper (Cu 100 mg/kg, high copper group I; Cu 200 mg/kg, high copper group II; Cu 400 mg/kg, high copper group III; Cu 600 mg/kg, high copper group IV; Cu 800 mg/kg, high copper group V) for six weeks. Kidney samples were collected, then the cell cycle and apoptosis were tested by FCM. The results showed that the percentage of renal cell apoptosis was increased in high copper groups III, IV and V when compared with that of control group. The G_0/G_1 phase of cell cycle of renal cell was lower, and S, $G_2 + M$ phase was higher in high copper groups I and II than that in control group. The G_0/G_1 phase of cell cycle of renal cell was much higher, and S, $G_2 + M$ phase was lower in high copper groups III, IV and V than that in control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). It is concluded that dietary copper in excess of 400 mg/kg diet impaired the progression of renal cells from G_0/G_1 phase to S phase obviously and induced renal cell apoptosis.

Key words: high copper; kidney; flow cytometry(FCM); apoptosis; cell cycle; duckling

铜是动物必需的微量元素,通过酶辅助因子的形式参与体内30多种酶的组成和活化,并能促进动物垂体释放生长激素(GH)、促甲状腺释放激素

(TSH)、胰岛素样生长因子(IGF),对动物的造血、消化、生长、繁殖、免疫等生理功能具有重要作用^[1]。1945年Braude首次发现生长猪饲料中添加250

收稿日期:2007-06-25

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471304);四川省教育厅资助项目(2002A002);科技厅资助项目(035Y029-030-2)

作者简介:崔伟(1981-),男,四川自贡人,硕士,主要从事动物病理学研究,E-mail:yonex_1981@163.com

* 通讯作者:崔恒敏,博士,教授,主要从事禽病发病机理研究,E-mail:cui580420@sicau.edu.cn;hmcui@scfc.edu

mg/kg 铜能显著提高其生产性能,大量的研究也证实了日粮中添加高铜具有促生长作用。但高铜作为促生长剂被广泛应用于畜禽饲料中,生产上时有铜中毒发生,除了肝脏是主要的储铜器官和中毒靶器官外,也有学者认为肾脏是铜主要的中毒靶器官^[2],而目前尚未见有过量铜对肾脏损伤的系统研究报告。本试验以 1 日龄的天府肉鸭为研究对象,饲以梯度剂量的高铜日粮,采用流式细胞术研究其对雏鸭肾脏细胞的细胞周期、增殖指数和凋亡率的动态变化,旨在探讨高铜对肾脏的损伤机理,为系统研究高铜对雏鸭肾脏的影响提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物与日粮

试验选用 1 日龄天府肉鸭 360 只,随机分为 6 组,每组 60 只(其中 15 只用于全程观察),分别采食基础日粮和 5 种不同的高铜日粮。6 组雏鸭分别饲养于木制试验禽笼内,饲养管理与常规育雏一致,自由饮水和采食。试验期 6 周。

以玉米、豆粕为主配制基础日粮,其中蛋白质含量、能量以及维生素和微量元素添加量均参照肉鸡 NRC(1994)的营养标准。基础日粮作为对照组日粮(Cu 8 mg/kg),在对照组日粮中分别添加 92、192、392、592、792 mg/kg 铜构成高铜组日粮:高铜 I 组(Cu 100 mg/kg)、高铜 II 组(Cu 200 mg/kg)、高铜 III 组(Cu 400 mg/kg)、高铜 IV 组(Cu 600 mg/kg)、高铜 V 组(Cu 800 mg/kg)。铜源为 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (分析纯)。

1.2 肾脏细胞凋亡的检测

试验第 14、28、42 天时,每组随机剖杀 5 只,立即取 0.3 cm^3 的肾脏组织块,制成细胞匀浆,用流式细胞术检测。方法:(1)细胞匀浆用冰 PBS 洗 2 遍,100 目筛过滤,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$;(2)取 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液于流式管中,加入 $5 \mu\text{L}$ 膜联蛋白 V-FITC 和 $5 \mu\text{L}$ PI,轻微振荡混匀,室温避光静置 15 min;(3)加入 $400 \mu\text{L}$ 缓冲液,混匀,流式细胞测试仪检测,CellQuest 软件分析后打印出检验结果。

1.3 肾脏细胞周期的检测

取上述方法制成的肾脏细胞匀浆,用流式细胞术检测。方法:(1)细胞匀浆过 100 目筛,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$;(2)取 1 mL 细胞悬液,离心($1\ 200 \text{ r/min}$,5 min)弃去上清液后,加入 PI 试剂(5

$\mu\text{L}/\text{mL}$ 碘化丙啶,0.5% Tritonx-100,RAN 酶)室温下染色 20 min 左右,PBS 离心洗涤 1 次;(3)加 PBS 缓冲液 1 mL 重新悬浮细胞,流式细胞测试仪检测,Modifit 软件分析后打印出检验结果。

细胞增殖指数(Proliferating index,PI) =

$$\frac{S+(G_2+M)}{G_0/G_1+S+(G_2+M)} \times 100\%$$

1.4 数据分析

用 SPSS11.0 分析软件进行数据统计、分析,一维方差分析法进行显著性检验。

2 结果

2.1 临床观察

自试验第 3 周,高铜 III 组、高铜 IV 组和高铜 V 组雏鸭生长发育落后于其他各组,食欲轻度下降,可见深绿色或煤焦油样粪便。第 5 周时,高铜 IV 组和高铜 V 组雏鸭表现为精神沉郁,食欲明显下降。其他各组变化不明显。试验结束时,高铜 V 组雏鸭发病 5 只,发病率为 33.33%,但未见死亡。

2.2 肾脏细胞凋亡比例

高铜组肾脏细胞的凋亡率呈不同程度的升高,且有明显的时间—剂量效应。2 周龄时高铜 IV 组和 V 组极显著高于对照组($P < 0.01$);4 周龄时高铜 III 组、IV 组和 V 组极显著高于对照组($P < 0.01$),高铜 I 组、II 组高于对照组,差异不显著或显著($P > 0.05$ 或 $P < 0.05$);6 周龄时,各高铜组均极显著高于对照组($P < 0.01$),且高铜 III 组、IV 组和 V 组间两两差异极显著($P < 0.01$)。详情见表 1 和图 1。

2.3 肾脏细胞周期的变化

2 周龄时,高铜 IV 组和 V 组 G_0/G_1 期极显著高于对照组、高铜 I 组和 II 组($P < 0.01$),S 期低于对照组,差异显著或极显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);高铜 V 组 G_2+M 期显著低于对照组($P < 0.05$),对照组、高铜 I 组、II 组、III 组和 IV 组 5 个组两两间差异不显著($P > 0.05$)。高铜 V 组的增殖指数(PI)低于对照组、高铜 I 组、II 组、III 组和 IV 组,差异显著或极显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。4 周龄时,高铜 IV 组和 V 组 G_0/G_1 期极显著高于对照组、高铜 I 组、II 组和 III 组($P < 0.01$),S 期极显著低于对照组、高铜 I 组和 II 组($P < 0.01$), G_2+M 期低于对照组、高铜 I 组、II 组和 III 组,差异显著或极显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。高铜 IV 组、V 组 PI 极显著低于对照组

表 1 肾脏细胞凋亡百分率
Table 1 The percentage of renal cell apoptosis

组别 Group	2 周龄 2 weeks	4 周龄 4 weeks	6 周龄 6 weeks
对照组 Control group	2.60±0.57 ^A	3.25±0.92 ^{Ab}	5.64±0.15 ^A
高铜 I 组 High copper group I	3.23±0.43 ^{Ab}	4.12±0.058 ^{AC}	8.04±0.28 ^B
高铜 II 组 High copper group II	3.95±2.49 ^{AC}	5.22±0.38 ^{BC}	8.76±0.41 ^B
高铜 III 组 High copper group III	5.14±0.50 ^{BC}	7.87±1.17 ^D	11.27±1.48 ^C
高铜 IV 组 High copper group IV	8.44±0.73 ^D	9.26±1.02 ^{DE}	13.08±1.30 ^D
高铜 V 组 High copper group V	10.74±0.99 ^d	10.18±1.72 ^E	15.35±0.13 ^E

肩标字母相同者差异不显著($P>0.05$);同一字母大、小写间差异显著($P<0.05$);不同大写字母及小写字母间差异极显著($P<0.01$)。下列各表同

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

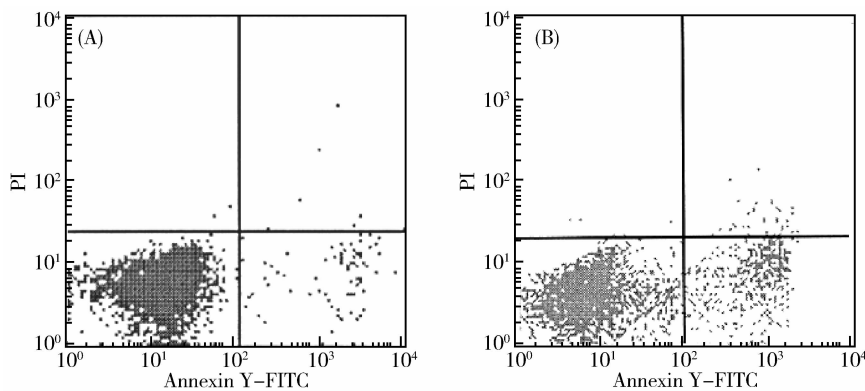


图 1 4 周龄对照组(A)和高铜 V 组(B)肾脏细胞凋亡点图
Fig. 1 Scattergram of renal cell apoptosis control group (A) and high copper group V (B) at 4 weeks of age

($P<0.01$)。6 周龄时,高铜 IV 组、V 组 G_0/G_1 期极显著高于对照组、高铜 I 组和 II 组($P<0.01$),S 期极显著低于对照组、高铜 I 组、II 组和 III 组($P<0.01$), G_2+M 期低于对照组、高铜 I 组和 II 组,差异显著或极显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。高铜 III 组和 IV、高铜 V 组 PI 低于对照组,差异显著或极显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。详情见表 2 和图 2。

3 讨论与结论

3.1 高铜对肾脏细胞凋亡的影响

细胞凋亡(Apoptosis)^[3]是生物体发育和组织平衡的一个重要机制,许多物理、化学和生物因素都可以引起凋亡增加^[3-4],使这一平衡被打破,从而导致肿瘤、自身免疫病等诸多疾病,细胞凋亡近年来成为生命科学领域的研究热点。目前,仅见有高铜对

肝脏和免疫器官凋亡影响的报道,而未见有高铜对雏鸭肾脏凋亡影响的报道。本试验采用流式细胞术检测高铜对雏鸭肾脏凋亡的影响,结果显示当日粮铜水平达到 400 mg/kg 以上时,肾脏细胞的凋亡率随日粮铜水平的升高而升高,并且随饲喂的时间增长而升高。这与崔恒敏报道的高铜对肝细胞凋亡影响的结果相一致^[5]。该结果从一方面证实肾脏为铜的中毒靶器官,也为系统研究高铜对雏鸭肾脏的影响提供了理论依据。

笔者认为,一方面铜是铜锌超氧化物歧化酶(CuZn-SOD)、铜蓝蛋白(CP)等抗氧化酶的辅基,有报道高剂量铜能使血清和组织中 CuZn-SOD 和 CP 的活性降低^[6-7],导致自由基蓄积,引起细胞凋亡^[8-9],其中的氧自由基损伤细胞的 DNA^[8],影响 bax、bcl-2 等凋亡控制基因的表达,促进肾脏细胞的

表 2 肾脏细胞的生长周期的变化

Table 2 The cell cycle of the kidney

周龄 Age	项目 Items	对照组 Control group	高铜 I 组 High copper group I	高铜 II 组 High copper group II	高铜 III 组 High copper group III	高铜 IV 组 High copper group IV	高铜 V 组 High copper group V
2 周龄 2 weeks	G ₀ /G ₁	78.58±2.02 ^{AB}	76.13±2.36 ^A	76.89±1.14 ^A	81.89±2.48 ^{BC}	85.13±1.60 ^{Cd}	89.10±1.79 ^D
	S	11.98±1.81 ^{ABc}	14.89±2.43 ^A	14.21±2.20 ^A	8.91±2.72 ^{BD}	7.12±2.12 ^{CDE}	3.73±0.29 ^E
	G ₂ +M	9.44±0.36 ^A	8.98±0.57 ^{AB}	8.90±2.44 ^{AB}	9.20±0.46 ^{AB}	7.75±0.56 ^{AB}	7.17±1.51 ^{AB}
	PI	21.42±2.02 ^{AB}	23.87±2.36 ^A	23.11±1.14 ^A	18.11±2.48 ^{BC}	14.87±1.60 ^{Cd}	10.90±1.79 ^D
4 周龄 4 weeks	G ₀ /G ₁	80.67±0.33 ^{AB}	78.14±1.69 ^{ab}	80.07±1.01 ^B	85.14±2.06 ^C	89.08±2.59 ^{DE}	89.93±1.09 ^E
	S	9.92±0.64 ^A	11.06±1.78 ^A	9.46±1.91 ^A	5.42±0.79 ^B	3.98±2.31 ^B	3.76±1.05 ^B
	G ₂ +M	9.41±0.64 ^{Ab}	10.80±0.84 ^A	10.47±2.11 ^A	9.44±1.47 ^{Ac}	6.94±1.91 ^{BCD}	6.31±1.41 ^D
	PI	19.33±0.33 ^{AB}	21.86±1.69 ^{ab}	19.93±1.01 ^B	14.86±2.06 ^C	10.92±2.59 ^D	10.07±1.09 ^D
6 周龄 6 weeks	G ₀ /G ₁	80.73±0.41 ^{Ab}	77.98±1.55 ^a	80.45±0.25 ^{Ac}	82.91±1.44 ^{BC}	88.08±2.48 ^D	90.56±0.66 ^d
	S	9.84±1.18 ^{Ab}	11.90±1.81 ^a	9.23±0.22 ^{AB}	7.71±1.45 ^B	3.80±2.08 ^C	1.58±0.17 ^c
	G ₂ +M	9.43±0.98 ^{Abc}	10.12±0.84 ^A	10.32±0.20 ^A	9.38±1.35 ^{ABc}	8.12±0.88 ^{BD}	7.86±0.51 ^{CD}
	PI	19.27±0.41 ^{Ab}	22.02±1.55 ^a	19.55±0.25 ^{Ac}	17.09±1.44 ^{BC}	11.92±2.48 ^D	9.44±0.66 ^d

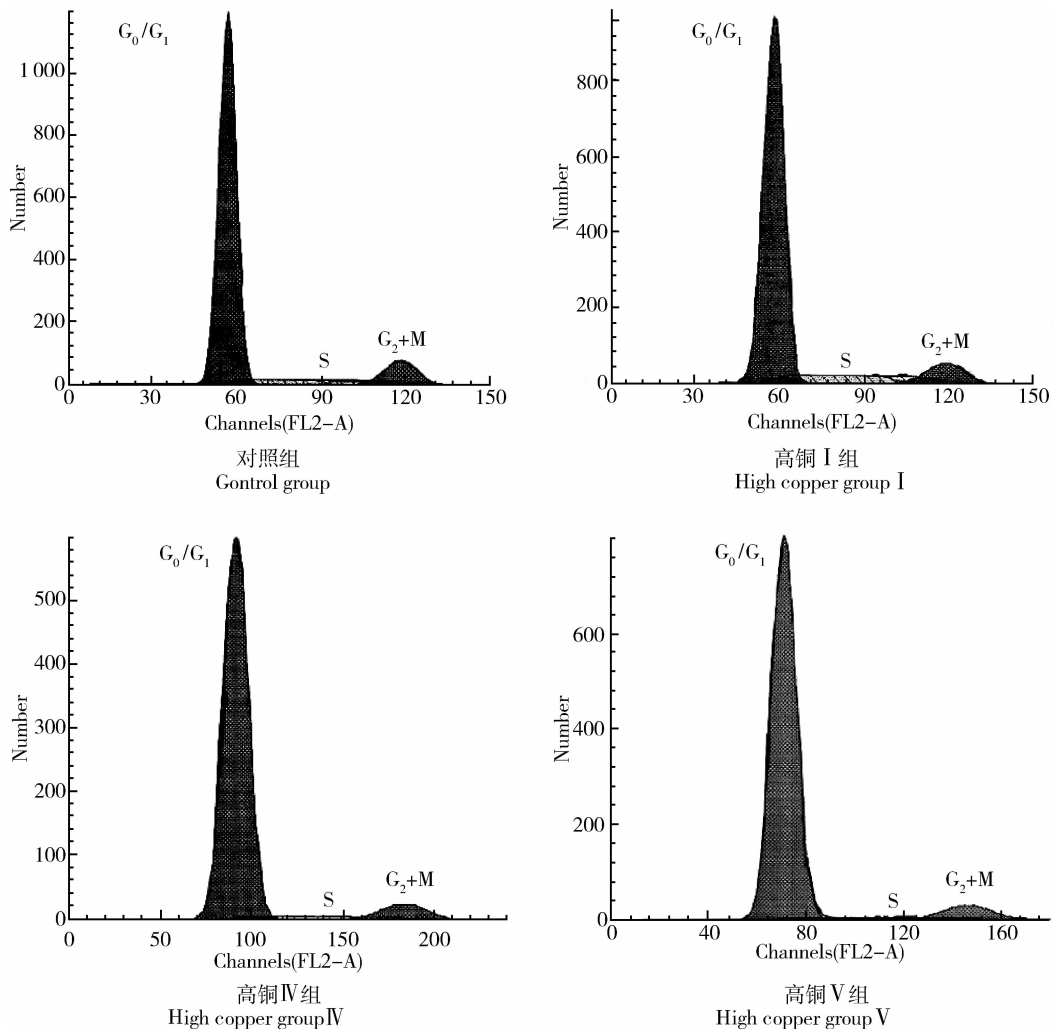


图 2 各组 4 周龄肾脏细胞周期的 DNA 直方图

Fig. 2 DNA histogram of renal cell cycle in different groups at 4 weeks of age

凋亡^[10];另一方面,梁明振等报道高剂量铜能造成肾脏细胞线粒体损伤^[11],线粒体受损时会释放能激活凋亡蛋白酶(caspases)的蛋白,caspases能分解细胞蛋白,起凋亡执行器的作用,从而促进肾脏细胞的凋亡^[-9,12]。

3.2 高铜对肾脏细胞生长周期的影响

本试验结果显示日粮铜含量达到400 mg/kg以上时,雏鸭肾脏细胞静止期(G_0/G_1)显著增高,且增殖指数显著降低,日粮铜含量在400 mg/kg以下时,各期变化与对照组比较差异不显著。表明日粮铜含量达到400 mg/kg以上时,肾脏细胞由静止期进入增殖期受到严重阻滞;低剂量的铜对肾脏细胞的增殖分化有一定的促进作用,但不明显。

本试验结果还表明,日粮达到400 mg/kg时,肾脏细胞静止期(G_0/G_1)阻滞,并且与细胞凋亡呈正相关,这与崔恒敏等报道的高铜对鸡肝细胞周期的研究结果一致^[5]。因此,笔者认为高剂量铜使肾脏组织抗氧化能力下降^[6],导致大量的自由基积累,造成了肾脏细胞DNA损伤^[8],从而增加野生型p53基因的表达。该基因监控细胞的生长,在DNA损伤时,其会诱导细胞发生 G_1 期的阻滞,以便有足够的时间修复受损的DNA^[13]。当DNA损伤过重无法修复时,p53则诱导细胞进入凋亡程序^[10,14],本试验中肾脏细胞凋亡的变化情况也印证了这一观点。

参考文献:

- [1] 张苏江,王哲,张光圣,等.高铜对生长猪生长性能、血清激素水平及酶活性的影响[J].中国兽医学报,2003,23(2):199-203.
- [2] 崔恒敏,陈怀涛,邓俊良,等.实验性雏鸭铜中毒症的病理学研究[J].畜牧兽医学报,2005,36(7):715-721.
- [3] KREE J F R, WYLLIE A H, CURRIE A R. Apoptosis: a basic phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics[J]. *Hr J Cancer*, 1972, 26: 239.
- [4] 冯志博,王省.细胞凋亡调控机制的研究进展[J].新乡医学院学报,1999,16(1):89-91.
- [5] 崔恒敏,朱奎成,彭西,等.高铜对雏鸡肝细胞周期和凋亡影响的研究[J].畜牧兽医学报,2006,37(9):908-913.
- [6] 崔恒敏,陈怀涛.铜中毒对雏鸭某些血液指标的影响[J].中国兽医学报,2005,25(3):311-313.
- [7] 马得莹,单安山.铜对动物体内自由基防御系统酶活性及其基因表达的影响[J].中国畜牧兽医,2003,30(5):27-29.
- [8] 陆怡,潘华珍,许彩民.氧化与细胞凋亡[J].生物化学与生物物理进展,1996,23:118-121.
- [9] 胡洁,蔡真.细胞器相关凋亡途径研究进展[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2005,12(2):152-154.
- [10] FRIDMAN J S, LOWE S W. Control of apoptosis by p53[J]. *Oncogene*, 2003, 22(56): 9 030-9 040.
- [11] 梁明振,谢梅冬,梁贤威,等.高铜饲料对生长育肥猪心脏和肾脏组织的影响[J].饲料工业,2004,25(10):28-30.
- [12] PALMER A M, GREENGRASS P M, CAVALLA D. The role of mitochondria in apoptosis[J]. *Drug News Perspect*, 2000, 13(6): 378-384.
- [13] FISHER D E. The p53 tumor suppressor: critical regulator of life&-death in cancer[J]. *Apoptosis*, 2001, 6(1-2): 7-15.
- [14] AOKI E, UCHIDA T, OHASHI H. Methylation status of the p15^{ink4B} gene in hematopoietic syndromes in frequent and acquired during diseases progression[J]. *Blood*, 1998, 91: 2 985-2 990.