

高钼对艾维茵肉鸡胸腺细胞周期和凋亡影响的研究

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: 本文旨在研究高钼对肉雏鸡胸腺的影响。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研究雏鸡胸腺变化。与对照组比较, 高钼I、II、III组胸腺淋巴细胞减少, 胸腺小体增大增多, 肌样细胞增多; 胸腺绝对质量和脏器指数显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 流式细胞仪测定, 高钼I、II、III组胸腺细胞G₀/G₁期显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), S期、G₂+M期和增殖指数(PI)显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 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500 mg·kg⁻¹及其以上可抑制胸腺的生长发育, 导致雏鸡细胞免疫功能受损。

关键词: 高钼; 胸腺; 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)06-0761-08

Effect of Dietary High Molybdenum on the Cell Cycle and Apoptosis of Thymus 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 thymus in the broilers by the methods of experimental pathology and flow cytometry(FCM). 360 one-day-old Avian broilers were randomly divided into four groups, and fed on diets as follows: 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 results showed that decreased lymphocytes, enlarged Hassall's corpuscles and increased myoid cells were observed in high molybdenum groups I, II and III in comparison with those of control group histopathologically. The weight and the relative weight of thymus were decreased. The statistical analyses by FCM indicated that the G₀/G₁ phase of thymocyte was increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and the G₂+M phase, S phase of thymocyte and the PI (Proliferating index) were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in high molybdenum groups I, II and III. Meanwhile, the percentage of cellular apoptosis was higher in high molybdenum groups I, II and III than that in control group. Also, the TUNEL staining was consistent with the result of FCM. It was concluded that dietary molybde-

收稿日期: 2009-12-16

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; 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方向研究, E-mail: yangfan0867@126.com

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

num in excess of $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ inhibited the development of thymus, caused pathological changes in the thymus and impaired the function of cellular immunity in broilers.

Key words: high molybdenum; thymus; cell cycle; apoptosis; broilers

钼是动物机体黄嘌呤氧化酶、醛氧化酶、亚硫酸盐氧化酶的组成成分,并参与电子传递及铁的释放与运输,影响多种物质的代谢^[1]。适量的钼可减少心血管疾病、食道癌及乳腺癌的发生,具有抗氧化、增强机体免疫力的作用^[2-4]。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^[5]。王婷和杨自军等研究发现,微量的钼可促进动物外周血T淋巴细胞酸性 α -醋酸萘酯酶(ANAE)阳性率升高,高剂量的钼则造成免疫器官病理学损伤并抑制T淋巴细胞功能^[2,6]。胸腺是T淋巴细胞发育、成熟及分化的重要场所,与细胞免疫功能密切相关。目前尚未见高钼对禽类胸腺发育影响的研究报道。本试验以艾维茵肉鸡为研究对象,研究不同水平日粮高钼对雏鸡胸腺病理形态学、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细胞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·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 mg·kg⁻¹构成高钼组日粮:高钼I组(Mo 500 mg·kg⁻¹)、高钼II组(Mo 1 000 mg·kg⁻¹)和高钼III组(Mo 1 500 mg·kg⁻¹)。钼源为Na₂MoO₄。

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,观察并记录胸腺肉眼变化。

1.2.2.1 病理组织学观察:剖杀雏鸡同时,取胸腺组织以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只剖杀后立即取胸腺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 胸腺脏器指数的检测 试验第7、14、21、28、35、42天每组随机抽取5只,空腹称重,剖杀后取胸腺去脂肪、结缔组织等称其净质量,分别记录。胸腺的脏器指数为其净质量与对应空腹体质量的比值。

1.2.4 胸腺细胞生长周期的检测 试验的14、28和42天每组随机抽取5只剖杀后立即取适量胸腺组织块,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 r·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·mL⁻¹,用PI染液($5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 碘化丙啶,0.5% Triton X-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(G₀/G₁期),DNA合成期(S期)及分裂期(G₂+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 胸腺细胞凋亡的检测

1.2.5.1 流式细胞术:同上方法制作胸腺的单细胞悬液,浓度为 1×10^6 个·mL⁻¹;取100 μL 细胞悬液于流式管中,加入5 μL 膜联蛋白V-FITC和5 μL PI,轻微振荡混匀,室温避光静置15 min;加入400 μL 结合缓冲液,振荡混匀,流式细胞仪检测,Cell quest软件分析凋亡细胞百分率。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

取胸腺 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 °C 孵育 60 min 后 PBS 冲洗 3 次;加入转化剂 POD,37 °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(s)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。

表 1 胸腺绝对质量

Table 1 The weight of the thymus

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	g
对照组 Control	0.54±0.18 ^A	1.98±0.35 ^A	2.95±0.22 ^A	5.96±0.72 ^A	8.81±0.50 ^A	9.67±0.78 ^A	
高钼 I 组 HMo I	0.29±0.08 ^B	1.27±0.06 ^B	2.16±0.26 ^{ab}	3.32±0.59 ^B	7.05±0.50 ^B	7.64±0.91 ^B	
高钼 II 组 HMo II	0.27±0.03 ^B	0.86±0.07 ^C	1.95±0.36 ^B	3.33±0.75 ^B	3.24±0.60 ^C	5.32±0.36 ^C	
高钼 III 组 HMo III	0.16±0.05 ^B	0.39±0.04 ^D	1.01±0.22 ^b	1.54±0.24 ^C	2.46±0.31 ^C	2.61±0.42 ^D	

同行肩注相同字母表示差异不显著($P>0.05$),肩注不同小写字母差异显著($P<0.05$),肩注不同大写字母差异极显著($P<0.01$)。下同

Within a row, the same superscript means no significant difference ($P>0.05$), the different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), and the different capital letter superscripts mean highly significant differences ($P<0.01$). The same as below

2.3.2 胸腺脏器指数 高钼 I 组雏鸡胸腺脏器指数 7、28 和 42 日龄时显著或极显著低于对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其余日龄与对照组比较差

高钼 I、II、III 组雏鸡的生长发育迟缓,与对照组比较,体质量降低,体形小。

2.2 胸腺病理形态学变化

2.2.1 剖检变化 7 日龄时,高钼 I、II、III 组雏鸡胸腺体积略小于对照组。随试验期延长,病变更明显。至试验结束时,各高钼组雏鸡胸腺体积显著小于对照组,且呈现明显的剂量效应关系(图 1a)。

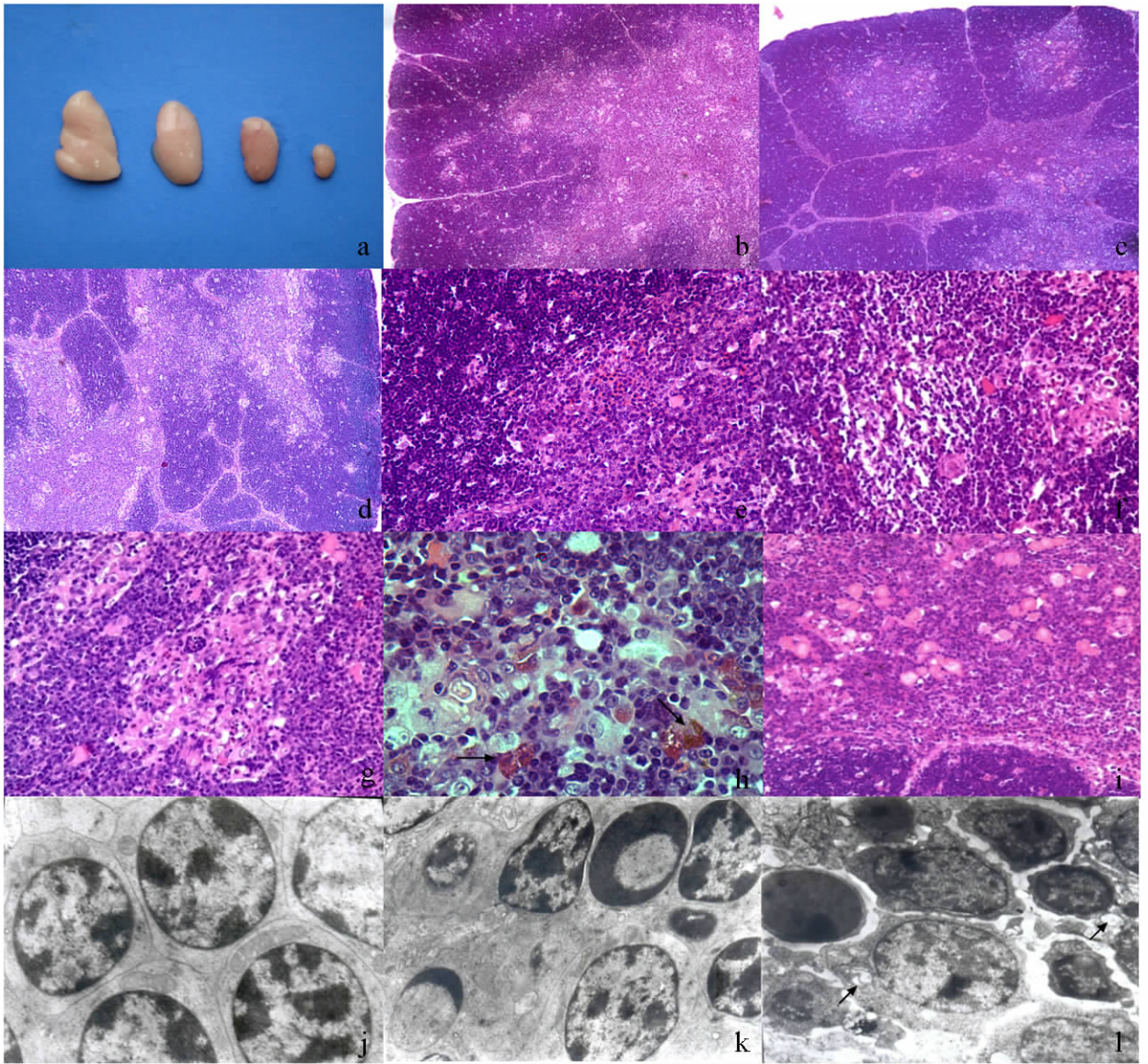
2.2.2 病理组织学变化 7~14 日龄时,高钼 I、II、III 组胸腺小叶髓质程度不同的充血,淋巴细胞减少。21 日龄至试验结束时,胸腺小叶体积与对照组比较明显缩小(图 1c),髓质区扩大(图 1d),皮质髓质淋巴细胞程度不同地减少(图 1f);胸腺小体数量增多、体积增大(图 1g),网状细胞变性坏死或见网状细胞胞浆出现红棕色颗粒(图 1h),髓质肌样细胞增生增多(图 1i)。

2.2.3 超微病理结构变化 高钼 I、II、III 组凋亡细胞数量与对照组相比明显增多,凋亡淋巴细胞核染色质浓缩呈致密圆斑状或边集呈“C”形(图 1k)、团块状。淋巴细胞线粒体嵴排列紊乱,断裂甚至消失,线粒体呈空泡状(图 1l)。细胞间隙增宽。

2.3 胸腺的绝对质量及脏器指数

2.3.1 胸腺绝对质量 7~42 日龄试验结束,高钼 I 组雏鸡胸腺绝对质量显著或极显著低于对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。高钼 II、III 组雏鸡胸腺绝对质量均极显著低于对照组。详情见表 1。

异不显著($P>0.05$)。高钼 II、III 组雏鸡胸腺脏器指数 7~42 日龄时均显著或极显著低于对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。详情见表 2。



a. 42日龄雏鸡胸腺,从左至右依次为对照组,高钼I、II、III组。示高钼I组胸腺无显著变化;高钼II组和高钼III组胸腺体积缩小;b. 21日龄对照组胸腺;c. 21日龄高钼III组胸腺。胸腺小叶缩小;d. 42日龄高钼III组胸腺。胸腺小叶髓质区扩大;e. 42日龄对照组胸腺;f. 42日龄高钼III组胸腺。髓质淋巴细胞减少、排列稀疏;g. 42日龄高钼III组胸腺。胸腺小体体积增大;h. 42日龄高钼III组胸腺。网状细胞胞浆出现红棕色颗粒(↑);i. 42日龄高钼III组胸腺。髓质肌样细胞增生;j. 42日龄对照组胸腺细胞;k. 42日龄高钼II组胸腺细胞。凋亡细胞染色质边集“C”形;l. 42日龄高钼III组胸腺细胞,凋亡细胞染色质浓缩呈致密斑块状,淋巴细胞线粒体肿胀(↑),细胞间隙增宽

a. The thymus of chickens at 42 days of age in control group, high Mo groups I, II and III from left to right respectively. The size of thymus is diminished in high Mo group II and high Mo group III; b. Thymus in control group at 21 days of age; c. Thymus in high Mo group III at 21 days of age. Thymus lobule is small in size; d. Thymus in high Mo group III at 42 days of age. The medulla of thymus lobule is enlarged; e. Thymus in control group at 42 days of age; f. Thymus in high Mo group III at 42 days of age. Lymphocytes are decreased in medulla and loosely arranged; g. The enlarged Hassall's corpuscle in thymus in high Mo group III at 42 days of age; h. Thymus in high Mo group III at 42 days of age. There are red-brown granules in cytoplasm of reticular cells (↑); i. Thymus in high Mo group III at 42 days of age. Myoid cell are increased in number; j. Lymphocyte in control group at 42 days of age; k. The apoptotic lymphocyte in thymus of high Mo group II at 42 days of age. Apoptotic lymphocytes have "C" shaped aggregated chromatin; l. The apoptotic lymphocyte in thymus of high Mo group III at 42 days of age, the chromatin of apoptotic lymphocyte is condensed and nuclei appear dark round. The mitochondria (↑) are swelled in lymphocyte and the intercellular space of thymocytes is dilated

图1 高钼对胸腺组织结构变化的影响(b~d, HE×100;e~g, I, HE×400;h, HE×1 000;j, TEM×12 000;k, I, TEM×8 000)

Fig.1 Effects of high Mo on the thymus(b~d, HE×100;e-g, I, HE×400;h, HE×1 000;j, TEM×12 000;k, I, TEM×8 000)

表 2 胸腺脏器指数

Table 2 The relative weight of the thymus

%

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	0.340±0.099 ^A	0.464±0.072 ^A	0.444±0.033 ^A	0.488±0.072 ^A	0.467±0.058 ^A	0.480±0.066 ^A
高钼 I 组 HMo I	0.219±0.051 ^{ab}	0.442±0.071 ^A	0.402±0.036 ^A	0.351±0.028 ^B	0.479±0.070 ^A	0.374±0.030 ^{ab}
高钼 II 组 HMo II	0.226±0.031 ^{ab}	0.276±0.042 ^B	0.297±0.024 ^B	0.371±0.046 ^B	0.324±0.055 ^B	0.328±0.070 ^B
高钼 III 组 HMo III	0.188±0.054 ^B	0.207±0.053 ^B	0.254±0.039 ^B	0.279±0.032 ^b	0.305±0.039 ^B	0.256±0.075 ^B

2.4 胸腺细胞的生长周期

14 日龄时,高钼 I 组雏鸡胸腺细胞 G₀/G₁ 期与对照组比较差异不显著,S 期、G₂+M 期及 PI 值显著低于对照组 ($P<0.05$),高钼 II、III 组胸腺细胞 G₀/G₁ 期与对照组比较极显著升高 ($P<0.01$),S

期、G₂+M 期及 PI 值极显著低于对照组 ($P<0.01$);28 日龄和 42 日龄时,高钼 I、II、III 组胸腺细胞 G₀/G₁ 期极显著高于对照组 ($P<0.01$),S 期、G₂+M 期及 PI 值极显著低于对照组 ($P<0.01$)。详情见表 3、图 2。

表 3 胸腺细胞周期变化

Table 3 Cell cycle of the thymocyte

时间 Time	时期 Phase	对照组 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	89.50±0.58 ^A	90.92±0.77 ^A	93.12±0.45 ^B	96.19±0.86 ^C
	S	5.18±0.71 ^A	4.46±0.42 ^a	3.40±0.23 ^B	1.92±0.34 ^C
	G ₂ +M	5.32±0.34 ^A	4.61±0.46 ^a	3.48±0.34 ^B	1.89±0.52 ^C
	PI	10.50±0.58 ^A	9.07±0.77 ^A	6.88±0.46 ^B	3.81±0.86 ^C
28 天 28 day	G ₀ /G ₁	88.54±0.85 ^A	92.27±1.11 ^B	93.05±0.72 ^B	95.92±0.78 ^C
	S	5.79±0.29 ^A	3.81±0.53 ^B	3.40±0.31 ^B	1.94±0.29 ^C
	G ₂ +M	5.67±0.62 ^A	3.92±0.64 ^B	3.62±0.55 ^B	2.14±0.52 ^C
	PI	11.46±0.85 ^A	7.73±1.11 ^B	7.02±0.84 ^B	4.09±0.78 ^C
42 天 42 day	G ₀ /G ₁	88.27±0.72 ^A	91.99±1.24 ^B	93.01±0.66 ^B	95.64±1.06 ^C
	S	5.72±0.36 ^A	4.11±0.52 ^B	3.38±0.34 ^B	2.18±0.44 ^C
	G ₂ +M	6.02±0.47 ^A	3.91±0.73 ^B	3.68±0.49 ^B	2.17±0.69 ^C
	PI	11.73±0.72 ^A	8.01±1.24 ^B	7.06±0.80 ^B	4.36±1.06 ^C

2.5 胸腺细胞凋亡率

2.5.1 流式细胞术检测结果 14 日龄时,高钼 I 组雏鸡胸腺细胞凋亡率与对照组比较差异不显著 ($P>0.05$),28 和 42 日龄时极显著高于对照组 (P

<0.01)。高钼 II、III 组雏鸡胸腺细胞凋亡率 14 日龄至试验结束极显著高于对照组 ($P<0.01$)。详情见表 4、图 3。

表 4 胸腺细胞凋亡率

Table 4 Percentage of apoptotic thymocyte

%

组别 Group	14 天 14 day	28 天 28 day	42 天 42 day
对照组 Control	5.93±0.59 ^A	4.79±0.48 ^A	4.05±0.84 ^A
高钼 I 组 HMo I	7.71±0.71 ^A	8.16±0.34 ^B	8.54±0.36 ^B
高钼 II 组 HMo II	12.78±1.47 ^B	8.93±0.49 ^B	9.67±0.73 ^B
高钼 III 组 HMo III	13.86±0.85 ^B	10.65±1.37 ^C	12.24±1.01 ^C

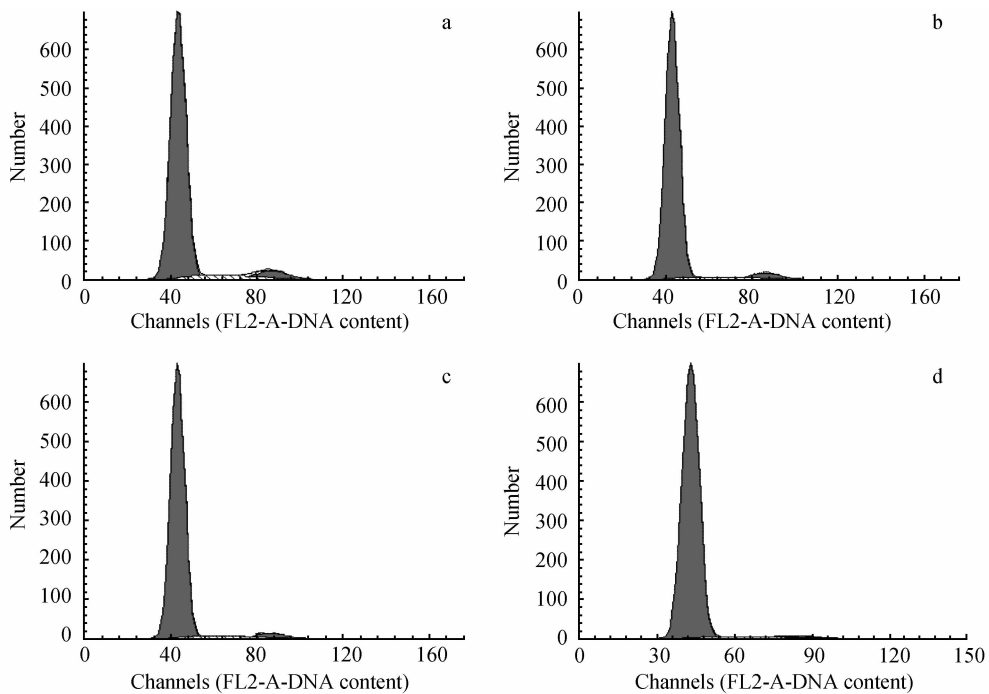
2.5.2 TUNEL 法检测结果 TUNEL 染色结果显示,凋亡细胞核呈棕褐色,并有核浓缩,核形状不规则等形态变化,主要分布在胸腺皮质及皮质髓质交界处。42 日龄时,对照组胸腺阳性细胞数量少,高钼 I 组与对照组比较无明显差异,高钼 II、III

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 高钼对胸腺形态结构的影响

胸腺为中枢免疫器官,是 T 淋巴细胞成熟分化



与对照组(a)比较,高钼 I 组(b)、高钼 II 组(c)和高钼 III 组(d)的 G_0/G_1 期细胞百分率升高, S 和 $G_2 + M$ 期细胞百分率减小 G_0/G_1 , S and $G_2 + M$ phase distribution of the thymic cells. The percentage of G_0/G_1 phase is higher, and the percentages of $G_2 + M$ phase are lower in high Mo group I (b), high Mo group II (c) and high Mo group III (d) than that in control group (a)

图 2 胸腺细胞流式周期直方图

Fig. 2 Histograms show the cell cycle progression

的场所^[7]。病理形态学动态观察发现,日粮钼含量达 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,雏鸡胸腺出现不同程度的充血出血,淋巴细胞数量减少,胸腺小体数量增多,体积增大,肌样细胞增生等,病变表现出明显的剂量效应关系。其中充血出血的病变自 28 日龄开始缓和,其余病变随试验期延长更加严重。42 日龄胸腺电镜观察显示,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。试验结果表明,日粮钼含量 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及其以上可引起雏鸡胸腺的病理损伤,细胞免疫功能受损。

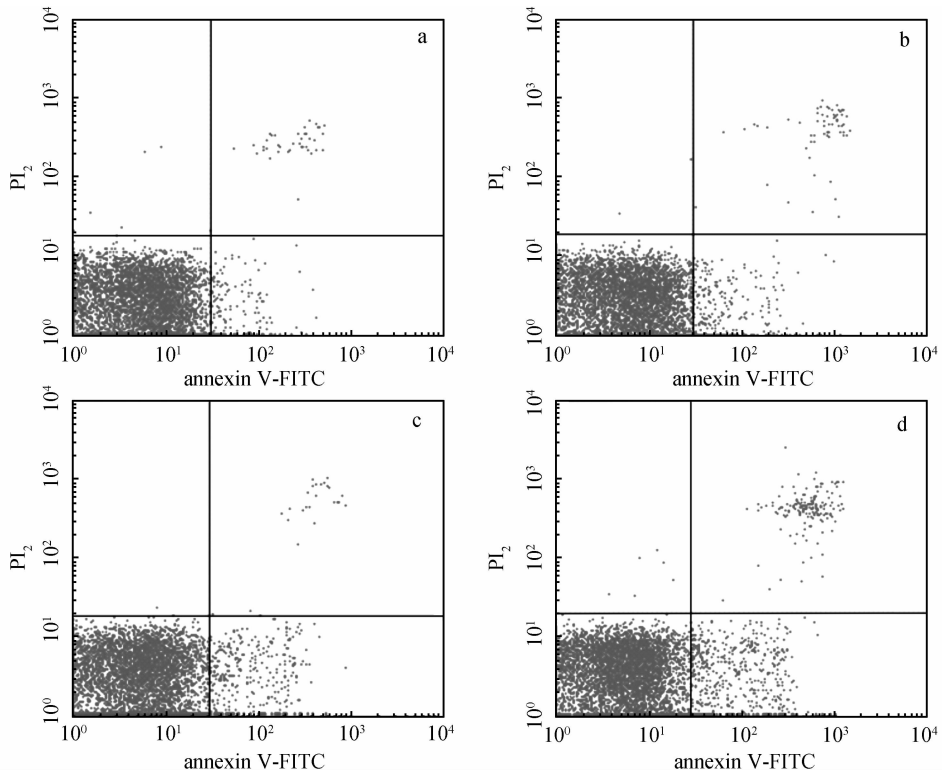
3.2 高钼对胸腺细胞周期的影响

本试验采用流式细胞术检测胸腺细胞周期的结果显示,各高钼组雏鸡胸腺静止期(G_0/G_1)细胞显著升高,增殖期胸腺细胞(S, $G_2 + M$)明显减少,增值指数(PI)显著降低。表明日粮钼含量达 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及其以上时,胸腺淋巴细胞由 G 期进入 S 期受阻,使大量淋巴细胞阻滞于静止期,进入合成期和分裂期的细胞减少,从而导致胸腺细胞数量减少,胸腺脏器指数降低,发育受抑。作者认为高钼对胸腺细胞增殖影响的机理可能与含钼酶活性的降低有

关,有资料表明,钼中毒动物血液黄嘌呤氧化酶和亚硫酸盐氧化酶活性显著降低^[8-10]。黄嘌呤氧化酶可将次黄嘌呤和黄嘌呤氧化为尿酸,是核酸嘌呤衍生物降解通道的后期酶并承担嘌呤代谢中的限速阶段^[3];亚硫酸盐氧化酶可以将蛋白质代谢中半胱氨酸产生的 SO_3^- 氧化为 SO_4^- 从尿中排出,如 SO_3^- 过多,可与 RNA 中的尿嘧啶和胞嘧啶以及 DNA 中的胸腺嘧啶反应,使细胞突变率上升^[11]。这两种含钼酶活性的降低可直接或间接的影响核酸代谢从而导致胸腺细胞周期紊乱。

3.3 高钼对胸腺细胞凋亡的影响

本试验采用流式细胞术、TUNEL 染色法及透射电镜检测高钼对胸腺细胞凋亡的影响。表明 3 个高钼组雏鸡胸腺细胞凋亡率与对照组比较显著升高,与 42 日龄 TUNEL 染色和电镜下调亡淋巴细胞观察的结果一致。流式细胞仪检测,结果表明日粮钼含量达 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及其以上时可导致胸腺内凋亡细胞数量增多。结合本试验组织学和细胞周期观察结果,作者认为其机理可能是:一与肌样细胞增生有关。胸腺肌样细胞可产生与胸腺发育有关的细

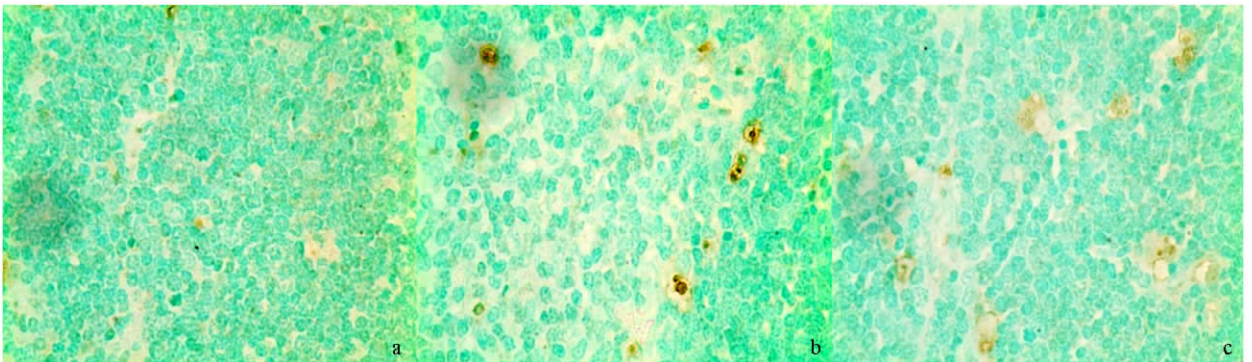


与对照组凋亡图(a)比较,高钼 I 组、高钼 II 组和高钼 III 组(分别为 b、c 和 d)的凋亡细胞数量明显增多

Quadrantal diagrams show that minor percentage of cells in thymus of control group are undergoing apoptosis (a), and increased percentage of cells in high Mo groups I, II and III (b, c and d) are undergoing apoptosis

图 3 雏鸡胸腺流式凋亡散点象限图

Fig. 3 Quadrantal diagrams show that minor percentage of cells in thymus



a. 42 日龄对照组胸腺, 见有极少量凋亡细胞。b. 42 日龄高钼 II 组胸腺, 凋亡细胞数量增多。c. 42 日龄高钼 III 组胸腺, 凋亡细胞数量增多

a. Few apoptotic cells in control group at 42 days of age. b, c. The number of apoptotic cells is higher in high Mo groups II and III than that in control group at 42 days of age

图 4 42 日龄雏鸡胸腺 TUNEL 法检测结果 1 000×

Fig. 4 The results of TUNEL at 42 days of age 1 000×

胞因子和炎症趋化因子类。有试验表明,正常胸腺组织内肌样细胞可抑制胸腺淋巴细胞的凋亡,其机制尚不清楚^[12],但可表明肌样细胞与胸腺淋巴细胞

的凋亡密切相关。同时,肌样细胞也显肾上腺皮质激素释放因子(CRF)免疫反应强阳性^[13]。因而推测肌样细胞增生可能导致胸腺内肾上腺皮质激素

水平升高,其中的糖皮质激素可诱导细胞发生凋亡^[14]。本试验病理形态学观察见胸腺小叶髓质中肌样细胞的异常增生、数量增多,从形态学方面提供了胸腺凋亡细胞增多的佐证,但又与正常胸腺组织肌样细胞抑制淋巴细胞凋亡的报道^[12]不一致,其原因有待进一步的研究探讨。二与线粒体受损有关。本试验电镜观察证实,当日粮钼含量达 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及其以上时,胸腺淋巴细胞线粒体受损明显,导致线粒体内膜上的凋亡抑制基因 *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^[15]。三与细胞周期阻滞有关。本试验结果显示日粮钼含量达 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及其以上时,胸腺细胞由 G 期进入 S 期的时间延长,若损伤不能修复,细胞则停滞于 G 期并通过凋亡机制自杀^[16]。除上述原因外,胸腺细胞凋亡率增加还可能与自由基蓄积有关,高钼可导致血液和组织中部分抗氧化酶活性的降低从而引起自由基蓄积诱导凋亡^[9,17-18]。

参考文献:

- [1] 王自良,张海棠,赵 坤. 微量元素钼在养鸡生产中的应用[J]. 中国家禽,1999,21(9):37-39.
- [2] 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.
- [3] KOMADA H, KISE Y, NAKAGAWA M, et al. Effect of dietary molybdenum on esophageal carcinogenesis in rats induced by N-Methyl-N-benzyl nitrosamine [J]. *Cancer Research*, 1990, 50: 2418-2422.
- [4] SIEVERS E. Nutrient requirements for preterm infant formulas-molybdenum [J]. *The Journal of Nutrition*, 2003, 133(10): 236-237.
- [5] 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(农学版),2004,24(2):40-43.
- [6] 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.
- [7] 王铁恒. 动物组织学与胚胎学[M]. 长春: 中国人民解放军兽医大学出版社,1989:188-191.
- [8] COX D H, DAVIS G K, SHIRLEY R L, et al. Influence of excess dietary molybdenum on rat and calf liver and heart enzymes[J]. *The Journal of Nutrition*, 1960, 70: 63-68.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 胡向红. 微量元素钼与人类健康[J]. 现代预防医学,2001,28(3):353-355.
- [12] ABDEL W, SANDRINE P, ERIC C, et al. Establishment of a human thymic myoid cell line phenotypic and functional characteristics[J]. *American Journal of Pathology*, 1999,155, (4):1229-1240.
- [13] 陆宇燕,李丕鹏. 蛇胸腺肌样细胞呈 CRF 和 Mot 免疫反应阳性[J]. 动物学杂志,1998,33(4):58.
- [14] 郑 琳,周瑞祥. 胸腺细胞分化发育的凋亡调控[J]. 解剖科学进展,2008,14(1):105-110.
- [15] 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.
- [16] AOKI E, UCHIDA T, OHASHI H. Methylation status of the *p15* gene in hematopoietic syndromes in frequent and acquired during diseases progression [J]. *Blood*, 1998, 91:2985-2990.
- [17] 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.
- [18] 李三强,牛映斗. 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.

(编辑 朱绯)