

高钼对雏鸡肝脏和脾脏抗氧化功能的影响

肖杰, 杨帆, 崔恒敏*, 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: 本文旨在观察日粮高钼(Mo)对雏鸡肝脏和脾脏抗氧化功能的影响。300只1日龄Avian肉鸡健雏随机分为4组, 分别喂以对照日粮(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)42 d。与对照组比较, 高钼II组、III组雏鸡肝脏和脾脏超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和黄嘌呤氧化酶(XOD)活性显著下降($P < 0.01$), 丙二醛(MDA)含量显著升高($P < 0.01$); 血清中相应酶活性和丙二醛含量变化与肝脏和脾脏中的一致。病理形态学观察, 高钼组雏鸡肝细胞呈现不同程度的颗粒变性和空泡变性。流式细胞仪测定, 高钼II、III组雏鸡脾脏细胞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($P < 0.01$)。结果表明, 日粮钼含量1 000 mg·kg⁻¹及其以上可引起肝脏和脾脏抗氧化功能降低, 脾脏细胞增殖受阻。

关键词: 高钼; 肝脏; 脾脏; 抗氧化功能; 雏鸡

中图分类号: S859.8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)07-0883-08

Effect of High Molybdenum on the Antioxidant's Function of Liver and Spleen in Broilers

XIAO Jie, YANG Fan, CUI Heng-min*, 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 to examine the effect of dietary high molybdenum(Mo) on the antioxidant's function of liver and spleen in broilers. 300 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 superoxide dismutase (SOD), glutathion peroxidase (GSH-Px) and xanthine oxidase (XOD) activities were lower ($P < 0.01$) and the malondialdehyde(MDA) contents were higher($P < 0.01$) in liver and spleen in high Mo groups II and III than that in control group. Changes of the above mentioned enzymes activities and MDA contents in serum were consistent with those of liver and spleen. Pathologically, hepatocytes in high Mo groups showed granular degeneration and vacuolar degeneration. 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 spleen in high molybdenum groups II and III. The results showed that dietary molybde-

收稿日期: 2009-12-25

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: 肖杰(1983-), 男, 湖南长沙人, 硕士, 主要从事畜禽病理学方向研究, E-mail: xjly7302237@163.com; 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; 肖杰和杨帆同为第一作者

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

num in excess of 1 000 mg · kg⁻¹ impaired antioxidant's function in liver and spleen, inhibit the development of the spleen.

Key words: high molybdenum; liver; spleen; antioxidant's function; broilers

钼(Molybdenum, Mo)是一种过渡元素,主要以四价和六价的形式存在,是动物必需的微量元素。但过量的钼可导致动物中毒,不同种类动物对钼的耐受性有明显的差异,牛、羊对钼敏感,猪对钼的耐受性最强^[1]。有报道称耕牛钼中毒时血浆和组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和黄嘌呤氧化酶(XOD)活性均随着钼中毒的加重而下降^[2]。肝脏是动物机体重要的解毒器官,血液流经肝脏时,一些有害物质可被肝脏产生的酶分解。有报道表明,高钼对肝脏有损害作用^[3-4]。王婷等研究发现,高剂量钼导致小鼠脾脏初期充血出血,后期逐渐萎缩,脾内淋巴细胞数量减少,实质细胞萎缩,生长指数显著降低^[5]。脾脏是外周最大的免疫器官,在体液免疫和细胞免疫中发挥重要作用。高钼对禽类抗氧化功能的影响目前尚未有系统的报道。本试验以 1 日龄 Avian 肉鸡健雏为研究对象,通过饲喂 500、1 000、1 500 mg · kg⁻¹ 3 个梯度的高钼日粮,研究高钼日粮下雏鸡血清、肝脏和脾脏抗氧化酶活性的变化,以及脾脏淋巴细胞增殖分化的动态影响,旨在探讨摄入过量钼对雏鸡肝脏和脾脏抗氧化功能损伤机理,为钼中毒病理学研究提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验动物与日粮

试验选用 1 日龄 Avian 肉鸡健雏 300 只,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 种不同梯度的高钼日粮,饲养管理与常规育雏一致,自由饮水和采食。试验期为 42 d。

基础日粮以玉米、豆粕为主配制而成,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,即 CP 20.12%、ME (MJ · kg⁻¹) 12.611、Ca 0.879 6%、P 0.621 5%。以基础日粮(含 Mo 13 mg · kg⁻¹)作为对照组日粮,在基础日粮中分别添加 487、987、1 487 mg · kg⁻¹的钼构成高钼组日粮:高钼 I 组(Mo 500 mg · kg⁻¹)、高钼 II 组(Mo 1 000 mg · kg⁻¹)、高钼 III 组(Mo 1 500 mg · kg⁻¹)。钼源为 Na₂MoO₄ · 2H₂O(分析

纯)。

1.2 肝脏病理学观察

试验期间每天观察记录鸡只的精神状况、食欲、发病和死亡情况。

1.2.1 剖检观察 试验的第 7、14、21、28、35、42 天每组随机抽取 5 只雏鸡剖杀,42 d 后全部剖杀,观察并记录肝脏的肉眼变化。

1.2.2 肝脏病理组织学观察 在剖检的同时,取适量肝脏在 10% 中性福尔马林中固定,脱水,石蜡包埋,4 μm 厚度连续切片,HE 常规染色,显微镜下观察并记录病理组织学变化。

1.3 血清抗氧化指标检测

试验的第 14、28、42 天,每组随机抽取 5 只雏鸡颈静脉采血,分离血清,用于血清 GSH-Px、SOD、XOD 活性和 MDA 含量的测定。检测试剂盒购自南京建成生物工程公司。

1.4 肝脏和脾脏抗氧化指标检测

试验的第 14、28、42 天,每组随机抽取 5 只雏鸡剖杀后取肝脏和脾脏各 1.0 g 于冰生理盐水中,制成 10% 组织匀浆,3 500 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上清液用于超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性、黄嘌呤氧化酶(XOD)和丙二醛(MDA)含量的测定。检测试剂盒同上。

1.5 脾脏细胞生长周期检测

试验第 14、28、42 天每组随机抽取 5 只雏鸡,剖杀后立即取适量脾脏组织块,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 × 10⁶ 个 · mL⁻¹ 用 PI 染液(5 μL · mL⁻¹ 碘化丙啶,0.5% Triton-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。

1.6 数据处理

用 SPSS16.0 分析软件进行数据统计、分析,单因素方差分析法进行显著性检验。

2 结果

2.1 临床症状观察

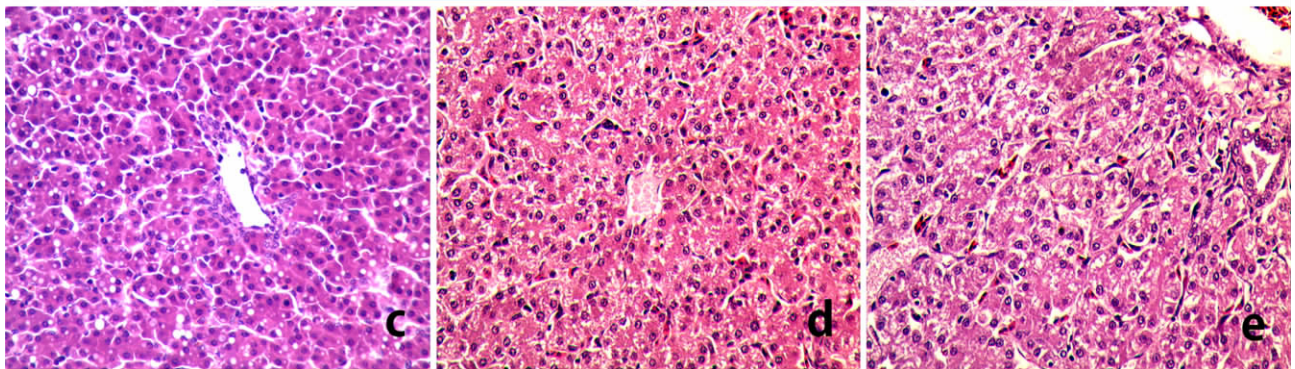
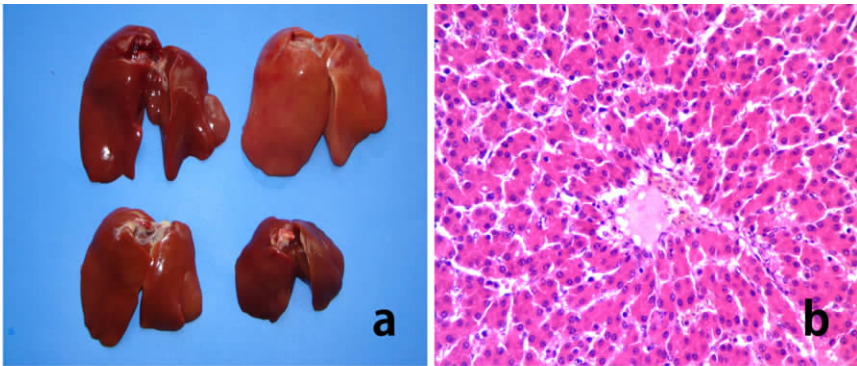
试验第 3 天,各高钼组雏鸡采食量与对照组比较,均出现不同程度的下降,全群鸡只喜卧,嗜睡。第 11 天,各高钼组雏鸡与对照组比较,精神委顿,食欲下降。试验第 28 天,高钼 I 组雏鸡采食量有所回升,高钼 II、III 组个别鸡只出现轻微运动障碍,表现为站立不稳,被驱赶时,伏卧不动或卧行,但关节无肿胀变形。高钼 III 组部分雏鸡兴奋性升高,表现为对声音和光线的敏感性较其他组高,被惊动后常高飞。试验第 30 天,高钼 II、III 组个别雏鸡出现腹泻,肛周羽毛粘连棕黑色粪便,至试验结束时,腹泻鸡只有所增多。试验期间各高钼组均无死亡发生。

2.2 肝脏病理学观察结果

2.2.1 剖检变化 高钼组雏鸡肝脏呈现不同程

度的肉眼变化。7 日龄时,高钼 I、II、III 组雏鸡肝脏体积略小于对照组。至试验结束时,高钼组肝脏不同程度的肿胀,被膜紧张,边缘钝圆,色泽变黄、质地变脆(图 1a),且呈现明显的剂量—时间效应关系。

2.2.2 肝脏病理组织学变化 与对照组比较,7 日龄时,各高钼组雏鸡肝细胞未见明显病变。14 日龄时,高钼 III 组雏鸡肝细胞呈现轻度的颗粒变性。21 日龄至 42 日龄高钼 I 组肝细胞轻度空泡变性,高钼 II、III 组雏鸡肝细胞肿胀空泡变性,胞浆内出现数量不等、大小不一的空泡,细胞结构模糊,但细胞核无明显病变。雏鸡肝脏组织的损伤程度与日粮中钼添加量有明显的剂量—时间效应关系,以 42 日龄病变最严重(图 1c、1d、1e)。对照组肝脏未见异常(图 1b)。



a. 从左到右,上排为对照组和高钼 I 组,下排为高钼 II 组和高钼 III 组。示肝脏肿胀,色泽变黄;b. 对照组肝脏;c. 高钼 I 组肝脏。肝细胞轻度空泡变性;d. 高钼 II 组肝脏。肝细胞颗粒变性和空泡变性;e. 高钼 III 组肝脏。肝细胞肿大空泡变性

a. The first rank are control group and high Mo group I from left to right respectively, the second rank are high Mo group II and III from left to right. Showed the liver swollen and yellow. b. The hepatocytes in control group;c. The hepatocytes show vacuoles degeneration in high Mo group I;d. The hepatocytes show granular degeneration and vacuolar degeneration in high Mo group II; e. The hepatocytes in high Mo group III have the same lesions but more severity than that in Mo group II

图 1 42 日龄雏鸡肝脏(b~e HE 400×)

Fig. 1 The livers of chickens at 42 days of age(b-e HE 400×)

2.3 血清抗氧化指标和 XOD 活性的变化

由表 1 可知,高钼 I 组血清 SOD 活性与对照组比较差异不显著($P>0.05$);GSH-Px 活性在 14 日龄和 42 日龄时,与对照组比较无显著差异($P>0.05$),28 日龄时显著降低($P<0.05$);XOD 活性 14 日龄时极显著低于对照组($P<0.01$),28 日龄和 42 日龄时与对照组差异不显著($P>0.05$)。高钼 II 组血清 SOD 和 XOD 活性在 14~42 日龄时均显著或极显著低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);GSH-Px 活性 14 日龄时与对照组比较差异不显著($P>$

0.05),28 日龄和 42 日龄时极显著低于对照组($P<0.01$)。14~42 日龄,高钼 III 组血清 SOD、GSH-Px 和 XOD 活性均极显著低于对照组($P<0.01$)。

高钼 I 组血清 MDA 含量与对照组比较差异不显著($P>0.05$);高钼 II 组血清 MDA 含量在 14 日龄时与对照组比较差异不显著($P>0.05$),28 日龄和 42 日龄时,极显著高于对照组($P<0.01$);高钼 III 组 MDA 含量在 14~42 日龄时,显著或极显著高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详情见表 1。

表 1 血清抗氧化指标和 XOD 活性的变化

Table 1 Changes of the serum antioxidant function and the activity of splenic XOD

| | 组别 Group | 14 天 14 d | 28 天 28 d | 42 天 42 d |
|---|------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 血清 SOD 活性/(U·mg ⁻¹ prot) Serum SOD activity | 对照组 Control | 184.45±6.39 ^A | 193.66±10.10 ^A | 180.98±1.64 ^A |
| | 高钼 I 组 HMo I | 173.83±7.24 ^A | 189.47±2.51 ^A | 177.57±2.57 ^{AC} |
| | 高钼 II 组 HMo II | 172.02±7.41 ^{Ab} | 172.68±1.34 ^{BC} | 170.65±6.46 ^{abC} |
| | 高钼 III 组 HMo III | 155.53±9.33 ^B | 165.59±2.13 ^C | 162.48±7.05 ^B |
| 血清 GSH-Px 活性/(U·mg ⁻¹ prot) Serum GSH-Px activity | 对照组 Control | 3 130.17±97.18 ^A | 3 821.35±105.10 ^A | 4 668.53±73.48 ^A |
| | 高钼 I 组 HMo I | 3 086.21±60.32 ^{Ab} | 3 646.07±61.30 ^{ab} | 4 658.04±63.31 ^A |
| | 高钼 II 组 HMo II | 3 078.45±131.77 ^{Ab} | 3 444.94±123.82 ^B | 4 270.73±77.73 ^B |
| | 高钼 III 组 HMo III | 2 860.34±143.47 ^B | 2 944.10±96.90 ^C | 3 816.43±127.54 ^C |
| 血清 MDA 含量/(nmol·mg ⁻¹ prot) Content of serum MDA | 对照组 Control | 4.23±0.37 ^A | 5.00±0.64 ^A | 7.32±0.44 ^A |
| | 高钼 I 组 HMo I | 4.81±0.60 ^{AB} | 5.42±1.09 ^{Ab} | 7.49±0.19 ^A |
| | 高钼 II 组 HMo II | 4.73±0.71 ^{AB} | 6.79±0.23 ^{BC} | 8.76±0.12 ^{BC} |
| | 高钼 III 组 HMo III | 5.52±1.00 ^{ab} | 7.08±0.78 ^C | 9.22±0.37 ^C |
| 血清 XOD 活性/(U·mg ⁻¹ prot) Serum XOD activity | 对照组 Control | 8.93±1.08 ^A | 5.29±1.00 ^A | 9.70±0.79 ^A |
| | 高钼 I 组 HMo I | 7.03±0.70 ^B | 4.40±0.31 ^{AB} | 9.08±1.31 ^{Ab} |
| | 高钼 II 组 HMo II | 6.87±0.45 ^{BC} | 4.25±0.27 ^{ab} | 6.38±1.98 ^{BC} |
| | 高钼 III 组 HMo III | 6.68±0.37 ^{BD} | 3.94±0.52 ^B | 5.48±1.52 ^C |

标有不同字母的数据之间差异极显著($P<0.01$);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 letter was not different between two groups ($P>0.05$). The same as below

2.4 肝脏抗氧化指标和黄嘌呤氧化酶(XOD)活性的变化

由表 2 可知,高钼 I 组肝脏 SOD 活性 14 日龄时与对照组比较差异不显著($P>0.05$),28 和 42 日龄时显著或极显著低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),GSH-Px 活性在 14 和 28 日龄时,极显著低于对照组($P<0.01$),42 日龄时活性降低,但差异不显著($P>0.05$),XOD 活性从试验开始至结束无明显变化($P>0.05$)。高钼 II、III 组雏鸡肝脏 SOD 活性和 GSH-Px 活性在 14~42 日龄时均显著或极显

著低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);XOD 活性 14 和 42 日龄时显著或极显著低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),28 日龄时差异不显著($P>0.05$)。

高钼 I 组肝脏 MDA 含量 14 日龄时与对照组比较差异不显著($P>0.05$),28 和 42 日龄时显著或极显著高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);高钼 II 组和高钼 III 组肝脏 GSH-Px 活性在 14~42 日龄时,均极显著高于对照组($P<0.01$),详情见表 2。

2.5 脾脏抗氧化指标和 XOD 活性的变化

14 日龄至试验结束时,高钼 I 组雏鸡脾脏

SOD、GSH-Px 和 XOD 活性与对照组比较差异不显著 ($P > 0.05$); 高铅 II、III 组雏鸡脾脏 SOD、GSH-Px 和 XOD 活性显著或极显著低于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

14~42 日龄, 高铅 I 组雏鸡脾脏 MDA 含量与对照组比较升高, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 高铅 II、III 组雏鸡脾脏 MDA 含量极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 详情见表 3。

表 2 肝脏抗氧化指标和 XOD 活性的变化

Table 2 Changes of the hepatic antioxidant function and the activity of splenic XOD

| | 组别 Group | 14 天 14 d | 28 天 28 d | 42 天 42 d |
|--|------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 肝脏 SOD 活性/(U · mg ⁻¹ prot) | 对照组 Control | 257.89 ± 17.95 ^A | 286.66 ± 18.98 ^A | 314.71 ± 11.74 ^A |
| | 高铅 I 组 HMo I | 236.81 ± 24.27 ^A | 260.36 ± 8.36 ^a | 282.18 ± 17.16 ^{BC} |
| | 高铅 II 组 HMo II | 183.91 ± 7.65 ^{BC} | 205.30 ± 12.38 ^B | 290.78 ± 4.25 ^{ab} |
| | 高铅 III 组 HMo III | 181.28 ± 23.46 ^C | 172.46 ± 16.19 ^C | 265.45 ± 15.17 ^{BC} |
| 肝脏 GSH-Px 活性/(U · mg ⁻¹ prot) | 对照组 Control | 34.53 ± 1.68 ^A | 44.74 ± 5.28 ^A | 58.04 ± 6.97 ^A |
| | 高铅 I 组 HMo I | 27.25 ± 5.26 ^B | 33.42 ± 3.29 ^{Bc} | 53.23 ± 7.45 ^{AB} |
| | 高铅 II 组 HMo II | 18.23 ± 1.10 ^{CD} | 26.68 ± 1.93 ^{CD} | 46.38 ± 1.77 ^{Bc} |
| | 高铅 III 组 HMo III | 14.86 ± 1.18 ^D | 22.81 ± 3.66 ^D | 36.16 ± 0.72 ^C |
| 肝脏 MDA 含量/(nmol · mg ⁻¹ prot) | 对照组 Control | 0.69 ± 0.03 ^A | 1.34 ± 0.91 ^A | 1.95 ± 0.10 ^A |
| | 高铅 I 组 HMo I | 0.77 ± 0.09 ^{Ab} | 1.74 ± 0.19 ^B | 2.16 ± 0.17 ^a |
| | 高铅 II 组 HMo II | 1.05 ± 0.22 ^{Bc} | 1.90 ± 0.16 ^B | 2.45 ± 0.33 ^B |
| | 高铅 III 组 HMo III | 1.17 ± 0.09 ^C | 2.39 ± 0.16 ^C | 2.67 ± 0.89 ^b |
| 肝脏 XOD 活性/(U · mg ⁻¹ prot) | 对照组 Control | 4.25 ± 0.81 ^A | 4.08 ± 0.48 ^A | 4.08 ± 0.20 ^A |
| | 高铅 I 组 HMo I | 3.55 ± 0.38 ^{AB} | 3.95 ± 0.34 ^A | 3.67 ± 0.11 ^{Ab} |
| | 高铅 II 组 HMo II | 3.21 ± 0.14 ^{ab} | 3.63 ± 0.33 ^A | 3.12 ± 0.55 ^{BC} |
| | 高铅 III 组 HMo III | 3.47 ± 0.36 ^{ab} | 3.79 ± 0.51 ^A | 3.42 ± 0.38 ^{abC} |

表 3 脾脏抗氧化指标和 XOD 活性的变化

Table 3 Changes of the splenic antioxidant function and the activity of splenic XOD

| | 组别/ group | 14 天 14 d | 28 天 28 d | 42 天 42 d |
|--|------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 脾脏 SOD 活性/(U · mg ⁻¹ prot) | 对照组 Control | 83.13 ± 2.89 ^A | 85.01 ± 4.97 ^A | 82.91 ± 5.87 ^A |
| | 高铅 I 组 HMo I | 80.13 ± 6.24 ^{Ab} | 82.63 ± 3.12 ^A | 83.31 ± 4.15 ^A |
| | 高铅 II 组 HMo II | 72.63 ± 2.67 ^{Bc} | 50.88 ± 4.29 ^B | 52.56 ± 3.01 ^B |
| | 高铅 III 组 HMo III | 64.81 ± 5.19 ^C | 48.24 ± 3.78 ^B | 41.58 ± 3.30 ^C |
| 脾脏 GSH-Px 活性/(U · mg ⁻¹ prot) | 对照组 Control | 20.95 ± 1.95 ^A | 22.18 ± 2.37 ^A | 21.45 ± 3.78 ^A |
| | 高铅 I 组 HMo I | 21.92 ± 3.48 ^A | 19.27 ± 2.67 ^{AB} | 19.00 ± 1.24 ^{AB} |
| | 高铅 II 组 HMo II | 16.38 ± 1.01 ^{ab} | 18.31 ± 1.44 ^{ab} | 17.74 ± 1.63 ^{ab} |
| | 高铅 III 组 HMo III | 14.05 ± 1.65 ^B | 15.62 ± 2.64 ^B | 15.95 ± 0.81 ^B |
| 脾脏 MDA 含量/(nmol · mg ⁻¹ prot) | 对照组 Control | 0.36 ± 0.03 ^A | 0.44 ± 0.04 ^A | 0.36 ± 0.08 ^A |
| | 高铅 I 组 HMo I | 0.44 ± 0.07 ^{AB} | 0.53 ± 0.09 ^{Ac} | 0.41 ± 0.06 ^A |
| | 高铅 II 组 HMo II | 0.51 ± 0.06 ^B | 0.62 ± 0.09 ^{BC} | 0.58 ± 0.06 ^B |
| | 高铅 III 组 HMo III | 0.63 ± 0.05 ^C | 0.66 ± 0.03 ^B | 0.75 ± 0.08 ^C |
| 脾脏 XOD 活性/(U · mg ⁻¹ prot t) | 对照组 Control | 4.92 ± 0.19 ^A | 4.95 ± 0.77 ^A | 5.21 ± 0.65 ^A |
| | 高铅 I 组 HMo I | 5.08 ± 0.59 ^A | 4.57 ± 0.75 ^{Ab} | 5.07 ± 0.27 ^{Ac} |
| | 高铅 II 组 HMo II | 4.03 ± 0.58 ^{ab} | 3.84 ± 0.29 ^{ab} | 3.80 ± 0.88 ^{BC} |
| | 高铅 III 组 HMo III | 3.43 ± 0.67 ^B | 3.12 ± 0.86 ^B | 3.29 ± 0.64 ^B |

2.6 脾脏细胞周期的变化

高铅 I 组雏鸡 14 日龄和 28 日龄时, 脾脏细胞分裂各期与对照组比较差异不显著 ($P > 0.05$), 42 日龄时, G_0/G_1 期细胞百分率显著升高, $G_2 + M$ 期细胞百分率和 PI 值显著降低 ($P < 0.05$), S 期细胞

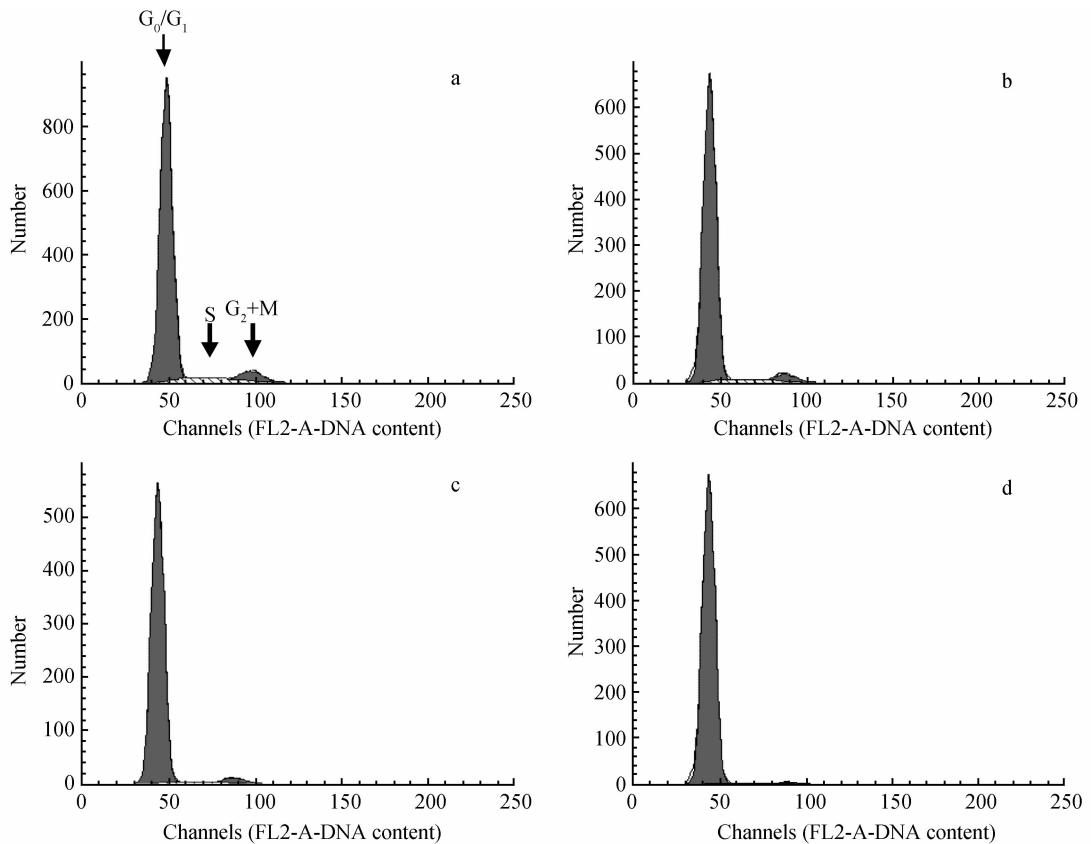
百分率降低, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。高铅 II、III 组变化趋势相似, 14 日龄至试验结束, G_0/G_1 期细胞百分率极显著高于对照组 ($P < 0.01$), $G_2 + M$ 期、S 期细胞百分率和 PI 指数极显著低于对照组 ($P < 0.01$), 详情见表 4 和图 2。

表 4 脾脏细胞周期变化

Table 4 Cell cycle of the splenic cell

| 时间/Time | 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 d | G ₀ /G ₁ | 87.13±1.52 ^A | 88.86±0.54 ^{AB} | 90.78±1.46 ^B | 93.95±1.30 ^C |
| | S | 6.39±0.74 ^A | 5.67±0.42 ^{AB} | 4.77±0.82 ^B | 2.75±0.77 ^C |
| | G ₂ +M | 6.47±0.79 ^A | 5.47±0.44 ^{AB} | 4.45±0.99 ^{BC} | 3.30±0.78 ^C |
| | PI | 12.86±1.52 ^A | 11.13±0.55 ^{AB} | 9.22±1.46 ^B | 6.05±1.29 ^C |
| 28 天 28 d | G ₀ /G ₁ | 87.32±0.88 ^A | 88.09±1.76 ^A | 93.20±0.81 ^B | 94.75±1.00 ^B |
| | S | 6.26±0.99 ^A | 5.96±0.87 ^A | 3.11±0.80 ^B | 2.6±0.45 ^B |
| | G ₂ +M | 6.43±0.84 ^A | 5.96±0.95 ^A | 3.70±0.17 ^B | 2.65±0.59 ^B |
| | PI | 12.69±0.86 ^A | 11.92±1.56 ^A | 6.80±0.82 ^B | 5.25±0.99 ^B |
| 42 天 42 d | G ₀ /G ₁ | 87.10±1.08 ^A | 89.70±2.69 ^a | 94.16±1.07 ^B | 95.42±1.06 ^B |
| | S | 6.47±0.81 ^A | 5.18±0.99 ^A | 2.97±0.52 ^B | 2.27±0.55 ^B |
| | G ₂ +M | 6.44±0.55 ^A | 5.11±0.98 ^a | 2.88±0.56 ^B | 2.31±0.58 ^B |
| | PI | 12.91±1.08 ^A | 10.30±1.92 ^a | 5.85±0.98 ^B | 4.58±0.99 ^B |

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



与对照组(a)比较,高钼 I 组(b)、高钼 II 组(c)和高钼 III 组(d)的 G₀/G₁ 期细胞百分率升高,S 期和 G₂+M 期细胞百分率降低

G₀/G₁, S and G₂+M phase distribution of the splenic cells. The percentage of G₀/G₁ phase is higher, and the percentages of S phase G₂+M phase are lower in high Mo groups I (b), II (c) and III (d) than that in control group(a)

图 2 脾脏细胞流式周期直方图

Fig. 2 Histograms show the cell cycle progression

3 讨论与结论

3.1 本试验用 3 个水平的高钼日粮饲喂 1 日龄雏

鸡,高钼组雏鸡采食量有所下降,精神委顿,生长抑制比较明显,但至试验结束时,高钼组雏鸡未见死亡。剖检发现,高钼组雏鸡肝脏有不同程度的肿胀;

病理组织切片发现,各高铅组肝脏从 21 日龄开始(高铅Ⅲ组从 14 日龄开始)出现不同程度的病理变化,肝细胞肿胀颗粒变性和空泡变性,且与日粮铅水平有明显的剂量—时间效应关系。肝脏病理损伤与高铅在体内的吸收、分布和排泄的特点有关,铅被吸收后集中在肝脏和肾脏中,最终在尿液和胆汁中排泄^[6]。铅进入肝脏后,可能损伤肝细胞膜的结构,破坏线粒体的氧化酶系统,使三羧酸循环和氧化磷酸化发生障碍^[7],从而出现上述临床病理特征。本试验结果表明日粮铅含量在 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及以上时,可引起雏鸡肝细胞病理损伤,肝细胞功能受损。

3.2 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解的酶,它特异性地催化还原型谷胱甘肽(GSH)对脂质过氧化物(H_2O_2)的还原反应。生物体内产生的自由基主要是 $\text{O}_2^- \cdot$, $\text{O}_2^- \cdot$ 还可进一步衍生为 $\cdot\text{OH}$ 和 H_2O_2 。它们化学性质活泼,可作用于体内蛋白质、核酸、脂类等生物分子,造成细胞结构和功能受损,加速组织的衰老过程,并导致体内代谢紊乱而引起疾病。机体对 $\text{O}_2^- \cdot$ 的清除主要依靠超氧化物歧化酶(SOD)。有研究表明,随铅中毒的加重,血浆和组织中 GSH-Px 和 SOD 活性显著降低,说明铅中毒造成的全身代谢紊乱对该酶的活性影响较大^[8]。本试验中,肝脏、脾脏和血清中的 GSH-Px 和 SOD 活性都随日粮中铅水平的升高而下降,且有明显的剂量—效应关系。肝脏是抗脂质过氧化损伤的中心器官,又是 SOD、GSH-Px 含量最高的器官^[9]。故血清和脾脏中 GSH-Px 和 SOD 活性降低的显著性差异不如肝脏中的明显(表 1, 5)。肝脏、脾脏和血清中的 GSH-Px 和 SOD 活性降低的原因,推测可能有:①高铅使机体细胞受损,自由基和脂质过氧化产物含量增加,使得 GSH-Px 和 SOD 的消耗增多,因而活性降低。② Mo 和 Cu 在机体代谢过程中存在很明显的颞颥关系^[10],而 SOD 是以 Cu、Zn 等为辅助因子的,当机体内 Cu 增加时,SOD 活力会明显升高^[11]。铅中毒时会使机体内 Cu 损耗,从而使合成 SOD 的辅助因子 Cu 不足,最终导致体内 SOD 活力下降。

丙二醛(MDA)对线粒体呼吸功能、丙酮酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶等具有显著的抑制作用^[12],它还可以与 DNA 交联影响 DNA 的复制。MDA 是体内脂质过氧化的产物,当体内自由基增多时,MDA 含量升高。因而测定 MDA 含量常常可以反

映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映出细胞损伤程度的严重性^[13-14]。本试验结果表明,肝脏、脾脏和血清中 MDA 含量随日粮铅添加量的增加而升高。当添加量达到 $1\ 000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上时,MDA 含量极显著增高,说明日粮铅含量的增加与对机体损伤的程度成正相关,也与肝脏、脾脏和血清中 GSH-Px 和 SOD 活性下降的趋势相一致。MDA 含量的升高,表明饲料中铅过量会增强机体脂质过氧化反应的程度,过氧化物和自由基生成过多并在体内蓄积,进而引起肝细胞和脾脏细胞的损伤。

黄嘌呤氧化酶(XOD)是一种需氧脱氢酶类,是核苷酸的分解代谢酶。它是一种氧化还原酶类,可以将黄嘌呤、次黄嘌呤氧化成尿酸;把脂肪族、芳香族醛氧化成羧酸;还能氧化嘧啶类、嘌呤类、蝶啶类物质及 NADPH^[15]。肝细胞损伤时,此酶早于血清丙氨酸氨基转氨酶(ALT)释放于血清中^[16],故血清 XOD 的测定对肝细胞的损伤具有特异性的诊断意义,优于肝功能检测的其他酶类如 ALT 等^[17]。本试验中,肝脏、脾脏和血清中的 XOD 活性随日粮铅含量的升高而降低,这与 Cox 等给小鼠饲喂高铅日粮导致肝脏黄嘌呤氧化酶活性降低的研究结果一致^[18]。作者认为 XOD 的降低可能与 XOD 本身的组成及其结构有关。XOD 是核酸代谢的重要酶类,同工酶测定 XOD 不仅含有铅和铁,还含有铜。日粮中高铅含量使机体内铜储备损耗,导致 XOD 活性下降^[2];同时 XOD 产生于肝脏中,高水平日粮铅含量使肝细胞受损,这也是 XOD 活性下降的一个原因。

3.3 本试验采用流式细胞术研究了铅添加水平对雏鸡脾脏细胞增殖分化的影响。结果显示,日粮铅含量达 $1\ 000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及其以上时,脾脏静止期(G_0/G_1)细胞百分率显著升高,增殖期($S, G_2 + M$)细胞百分率明显减少,增殖指数(PI)显著降低,脾脏细胞由静止期进入增殖期的过程受抑,大量细胞停滞于静止期,进入合成期和分裂期的细胞比例降低,成熟和活性淋巴细胞数量减少,免疫功能受损。脾脏细胞分裂增殖受抑的机理可能是:①与自由基蓄积有关。本试验结果显示,高铅使脾脏抗氧化酶活性降低,脂质过氧化产物和自由基产生过多并在脾脏中蓄积,损伤生物膜系统,细胞的完整性发生改变或遭受破坏,同时自由基(如 $\text{O}_2^- \cdot$ 和 $\text{OH}^- \cdot$)也对 DNA 造成损伤。研究表明,自由基中的 $\text{O}_2^- \cdot$ 和 $\text{OH}^- \cdot$ 等可以引起 DNA 链断裂,其中 $\text{OH}^- \cdot$ 的作

用较为突出,易与亲核性的 DNA 分子结合,引起 DNA 复制时碱基配对及编码错误,导致 DNA 损伤^[19]。②与含钼酶活性的降低有关。本试验结果显示,脾脏 XOD 活性显著降低,可引起核酸代谢紊乱,因为 XOD 是生物体内核酸代谢过程中的重要酶类。另有研究表明,钼中毒时动物血液中另一种含钼酶——亚硫酸盐氧化酶(SO)活性显著降低,SO 可以将蛋白质代谢中半胱氨酸产生的 SO_3^{2-} 氧化为 SO_4^{2-} 从尿中排出,如 SO_3^{2-} 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^[20],间接影响核酸代谢。本试验结果中高钼导致的 G_0/G_1 期阻滞可能是由于上述 2 种原因所造成的 DNA 损伤增加了野生型 p53 基因的表达。该基因监控细胞的生长,在 DNA 损伤时会诱导细胞发生 G_1 期阻滞,以便有足够的时间修复受损的 DNA^[21-22]。

参考文献:

- [1] 杨顺江. 动物微量元素营养学[M]. 武汉:湖北科技出版社,1989.
- [2] 李三强,龙 晶. 饮用天然高钼水诱发的钼中毒牛主要生物酶测定[J]. 动物营养学报,1998,10(1):29-33.
- [3] 田欣田,孙晓燕. 实验性绵羊钼中毒的病理形态学观察[J]. 中国兽医科技,1990,(1):7-8.
- [4] 杨自军,冉林武,王 婷,等. 钼对羊的中毒性试验[J]. 畜牧与兽医,2005,37(3):16-18.
- [5] 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.
- [6] HASCHEK W M, ROUSSEAU C C, WALLIG M A. Handbook of toxicologic pathology[M]. 2nd edition. San Francisco, New York: Academic Press, 2002:595-625.
- [7] 林 曦. 家畜病理学[M]. 北京:中国农业出版社,1997:50-58.
- [8] 王自良. 微量元素钼在养鸡生产中的应用[J]. 中国家禽,1999,21(9):37-40.
- [9] 陈 瑗,周 枚. 自由基医学[M]. 北京:人民军医出

版社,1991:58-61.

- [10] 王宗元,曹光辛,胡在朝,等. 动物矿物质营养代谢与疾病[M]. 上海:上海科学技术出版社,1995.
- [11] ROBERFROID M B. Free radicals and oxidation phenomena in biological system [M]. New York: M Dekker, 1995.
- [12] 龙建纲,王学敏,高宏翔,等. 丙二醛对大鼠肝线粒体呼吸功能及相关脱氢酶活性影响[J]. 第二军医大学学报,2005,26(10):1131-1135.
- [13] ZHOU J F, CHEN P, ZHOU Y H, et al. 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA) abuse may cause oxidative stress and potential free radical damage [J]. *Free Radic Res*, 2003,37(5):491-497.
- [14] DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function [J]. *Physiol Rev*, 2002,82:47-95.
- [15] 方北曙,李翠莲,黄中培,等. 牛乳中黄嘌呤氧化酶研究综述[J]. 专论与综述,2006,22(1):93-96.
- [16] CILER S, SPERLING D, BROSH S, et al. The diagnostic value of xanthine-oxidase activity in serum of hepatic patients[J]. *Harefuch*, 1977,93(10):309.
- [17] 张一兵,张淑芹,徐 刚,等. 黄嘌呤氧化酶动力学法测定及对肝病的诊断意义[J]. 中国实验诊断学,2002,6(3):148-149.
- [18] 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.
- [19] 胡大林,廖建坤,吴校连,等. 自由基与 DNA 的氧化损伤[J]. 国外医学·卫生学分册,2002,29(5):261-263.
- [20] 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.
- [21] 崔 伟,李 敏,彭 西,等. 高钼对雏鸡脾抗氧化功能的影响及其病理损伤观察[J]. 中国兽医科学,2009,39(4):338-343.
- [22] FISHER D E. The p53 tumor suppressor: critical regulator of life & death in cancer [J]. *Apoptosis*, 2001,6(1/2):7-15.

(编辑 朱绯)