

高氟对雏鸡法氏囊形态结构、细胞周期和凋亡影响的研究

陈 涛, 龚 涛, 柏才敏, 彭 西, 崔恒敏*

(四川农业大学动物医学院, 雅安 625014)

摘 要: 为研究高氟对雏鸡法氏囊的影响, 选用 1 日龄 AA 肉鸡健雏 300 只, 随机分为 4 组, 分别饲以对照日粮(F 23 mg · kg⁻¹) 和高氟日粮(F 400 mg · kg⁻¹, 高氟 I 组; F 800 mg · kg⁻¹, 高氟 II 组; F 1 200 mg · kg⁻¹, 高氟 III 组) 42 d, 以实验病理学和流式细胞术的方法观察雏鸡法氏囊的变化。结果显示高氟 II 组和高氟 III 组法氏囊绝对质量和脏器指数显著低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 法氏囊淋巴细胞明显减少。经流式细胞仪测定, 高氟 I 组细胞周期与对照组相比差异不显著($P > 0.05$), 高氟 II 组和高氟 III 组则出现明显变化。14 日龄时高氟 II 组和高氟 III 组法氏囊淋巴细胞 G₀/G₁ 期显著升高($P < 0.05$), G₂ + M 期和增殖指数(PI)与对照组相比不同程度地降低; 28 日龄时高氟 II 组和高氟 III 组 S 期显著升高($P < 0.01$), 凋亡率也显著升高($P < 0.01$); 42 日龄时高氟 II 组和高氟 III 组 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($P < 0.01$)。电镜观察, 42 日龄时高氟 II 组和高氟 III 组法氏囊可见多量的凋亡淋巴细胞及淋巴细胞线粒体肿胀。结果表明, 日粮含氟达 800 及 1 200 mg · kg⁻¹ 时可引起法氏囊淋巴细胞增殖分化受阻, 凋亡细胞显著增多, 法氏囊生长发育受抑制, 机体体液免疫功能受损。

关键词: 高氟; 法氏囊; 病理变化; 细胞周期; 凋亡; 雏鸡

中图分类号: S859.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)08-1235-09

Effect of Dietary High Fluorine on the Morphologic Structure, Cell Cycle and Apoptosis of bursa of Fabricius in Broilers

CHEN Tao, GONG Tao, BAI Cai-min, PENG Xi, CUI Heng-min*

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

Abstract: The experiment was conducted to study the effects of high fluorine on the bursa of Fabricius in chickens by the methods of experimental pathology and flow cytometry (FCM). 300 one-day-old Avian broilers were divided into four groups and fed with Control diet(F 23 mg · kg⁻¹) or High fluorine diets(F 400 mg · kg⁻¹, High fluorine group I; F 800 mg · kg⁻¹, High fluorine group II; F 1 200 mg · kg⁻¹, High fluorine group III) for 6 weeks. The results showed that the weight and the relative weight of bursa of Fabricius were decreased($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and lymphocytes were histopathologically decreased in number in high fluorine group II and high fluorine group III. The G₀/G₁ phase of high fluorine groups II and III rised significantly($P < 0.05$), while the G₂ + M phase and the PI(Proliferating index) were decreased at 14 days of age. The S phase and apoptosis-rates of high fluorine groups II and III were abnormally increased($P < 0.01$) at 28 days of age. The G₀/G₁ phase was significantly increased($P < 0.01$) and S phase, G₂ + M phase and PI decreased($P < 0.01$) in high fluorine groups II and III at 42 days of age. Also, the percentage of cellular apoptosis was higher in high fluorine groups II and III than in control group at 42 days of age. Typical morphological changes of apoptotic cells and some swelled mitochondri-

收稿日期: 2008-10-21

基金项目: 四川省教育厅重点项目(2006A003); 四川省科技厅重点项目(07JY027-022)

作者简介: 陈 涛, 男, 四川都江堰人, 硕士, 主要从事畜禽病理学研究

* 通讯作者: 崔恒敏(1958-), E-mail: cui580420@sicau.edu.cn; hmcui@scfc.edu

a of the bursa of Fabricius in high fluorine group II and high fluorine group III were ultrastructurally observed. It is concluded that fluorine exceed 800 and 1 200 mg · kg⁻¹ in diet can cause differentiation and proliferation retardation of lymphocyte in the bursa of Fabricius and increased apoptotic cells, which leads to inhibition on the development of the bursa of Fabricius and impaired the function of humoral immunity in chickens.

Key words: high fluorine; bursa of Fabricius; lesion; cell cycle; apoptosis; chicken

自 1928 年 Jac 和 Reyneld 首次提出氟对动物的毒性作用以来,众多学者已在高氟的骨相损害上作了深入研究。近年来高氟对机体腺体以及生殖系统的毒害作用日益受到人们关注,大量文献报道不断涌现,然而高氟对禽类免疫毒性损害的研究仍较稀缺,也存在较大争议。业已证实,高氟能显著降低小鼠免疫器官脏器指数及 B 淋巴细胞生长率^[1]。郭晓英等^[2]采用不同浓度氟离子和促有丝分裂剂与淋巴细胞共同培养 72 h,发现高浓度的氟能显著降低淋巴细胞对促有丝分裂剂的反应。李术等^[3]研究发现,氟可引起白细胞介素 2(IL-2)、白细胞介素 6(IL-6)含量降低;肿瘤坏死因子(TNF)含量升高,表明氟对淋巴细胞增殖具有明显抑制作用。Jain 等^[4]用转铁蛋白对大白兔进行免疫,通过¹³¹I 标记的转铁蛋白对血浆中循环抗转铁蛋白抗体滴度进行评价,结果染毒组大白兔抗转铁蛋白抗体的产生显著低于对照组,证实高氟抑制兔抗体的产生。国内研究资料显示^[5],高剂量氟对大鼠 B 淋巴细胞的增殖分化具有明显的抑制作用。由上可见,高氟对体液免疫影响显著。法氏囊是禽类独有的免疫器官,与禽类体液免疫有着密切联系,它担负着 B 淋巴细胞发育、成熟与分化的重要作用。因而,研究高氟对禽类法氏囊的影响是评价高氟对禽类体液免疫影响的重要指标。作者以 AA 肉鸡为研究对象,研究不同水平高氟日粮对雏鸡法氏囊病理形态学、亚细胞结构以及淋巴细胞增殖分化与凋亡的动态影响,为进一步研究高氟对雏鸡的体液免疫毒性提供理论支持及动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物及日粮

选用 1 日龄 AA 肉鸡健雏 300 只,体质量(45±5)g,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 种不同梯度的高氟日粮,饲养管理与常规育雏一致,自由饮水和采食。试验期 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(氟除外)添加量均参照肉鸡 NRC(1994)的营养标准,即 CP 20.12%、ME 12.631 2 MJ · kg⁻¹、Ca 0.8796%、P 0.621 5%。以基础日粮(含 F 23 mg · kg⁻¹)作为对照组日粮,在基础日粮中分别添加 377、777、1 177 mg · kg⁻¹ 的氟构成高氟组日粮:高氟 I 组(400 mg · kg⁻¹, HF I)、高氟 II 组(800 mg · kg⁻¹, HF II)、高氟 III 组(1 200 mg · kg⁻¹ HF III)。氟源为 NaF。

1.2 试验方法

1.2.1 临床观察 每天观察、记录各组鸡只的生长情况以及发病鸡只的临床症状。每周称重 1 次。

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 只雏鸡,进行病理剖检,第 42 天将雏鸡全部剖杀,观察并记录法氏囊眼观变化。

1.2.2.1 组织学观察:尸检的同时,取法氏囊组织以 10%福尔马林固定,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 只剖杀后立即自相同部位取法氏囊 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 法氏囊生长指数 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。根据如下公式计算法氏囊指数:

$$\text{脏器指数} = \frac{\text{脏器净质量}}{\text{空腹体质量}} \times 100\%$$

1.2.4 法氏囊淋巴细胞生长周期的检测 试验的第 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 值 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 mL⁻¹,用 3 μL PI 染液(5 μL · 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 法氏囊淋巴细胞凋亡的检测 同上制备法氏囊的单细胞悬液,浓度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$;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。

1.3 数据统计与分析

数据均用 SPSS11.5 统计软件进行统计。结果以平均数(\bar{x}) \pm 标准误(s_x)表示,并用单因素方差分析各高氟组与对照组均数间差异的显著性。

表 1 实验雏鸡体重质量增长情况

Table 1 The body weight of experimental chicken

组别 Group	第 1 天 The 1 st day	第 7 天 The 7 th day	第 14 天 The 14 th day	第 21 天 The 21 st day	第 28 天 The 28 th day	第 35 天 The 35 th day	第 42 天 The 42 nd day
对照组 Control	42.30 \pm 1.69 ^A	106.50 \pm 9.13 ^A	281.25 \pm 12.49 ^A	543.25 \pm 30.16 ^A	934.99 \pm 32.17 ^A	1 402.70 \pm 56.80 ^A	2 064.30 \pm 120.22 ^A
高氟 I 组 HF I	42.30 \pm 1.75 ^A	102.75 \pm 6.58 ^A	268.00 \pm 10.21 ^A	515.25 \pm 22.38 ^A	847.50 \pm 26.54 ^A	1 203.00 \pm 45.87 ^a	1 870.26 \pm 87.80 ^a
高氟 II 组 HF II	42.05 \pm 1.57 ^A	84.75 \pm 7.93 ^B	197.22 \pm 9.73 ^B	426.39 \pm 12.51 ^B	597.94 \pm 13.21 ^B	858.75 \pm 30.88 ^B	1 284.64 \pm 75.39 ^B
高氟 III 组 HF III	42.05 \pm 1.61 ^A	73.42 \pm 3.47 ^C	128.82 \pm 7.67 ^C	226.25 \pm 10.45 ^C	318.00 \pm 17.40 ^C	473.33 \pm 22.32 ^C	665.71 \pm 26.93 ^C

组间比较,数据肩标字母不同者差异极显著($P < 0.01$);肩标字母大写和小写间差异显著($P < 0.05$);肩标字母相同者差异不显著($P > 0.05$)。下同

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 same letters were not different between two groups ($P > 0.05$). The same as below

2.2 法氏囊病理形态学变化

2.2.1 剖检变化 试验期间高氟 I 组未见有明显剖检变化。14 日龄开始,与对照组比较,高氟 II 组和高氟 III 组法氏囊出现肉眼可见变化,主要表现为体积缩小,囊壁变薄,皱褶减少(图 1a)。死亡雏鸡较定期剖杀雏鸡病变严重。

2.2.2 病理组织学变化 试验期间,高氟 I 组未见明显的组织学变化(图 1c)。高氟 II 组和高氟 III 组镜下变化趋势一致,并呈显著剂量效应关系。病变始于 14 日龄,高氟 II 组和高氟 III 组法氏囊淋巴滤泡淋巴细胞数量减少,髓质淋巴细胞排列稀疏,淋巴滤泡间质轻微增宽(图 1e)。28 日龄时,淋巴滤泡髓

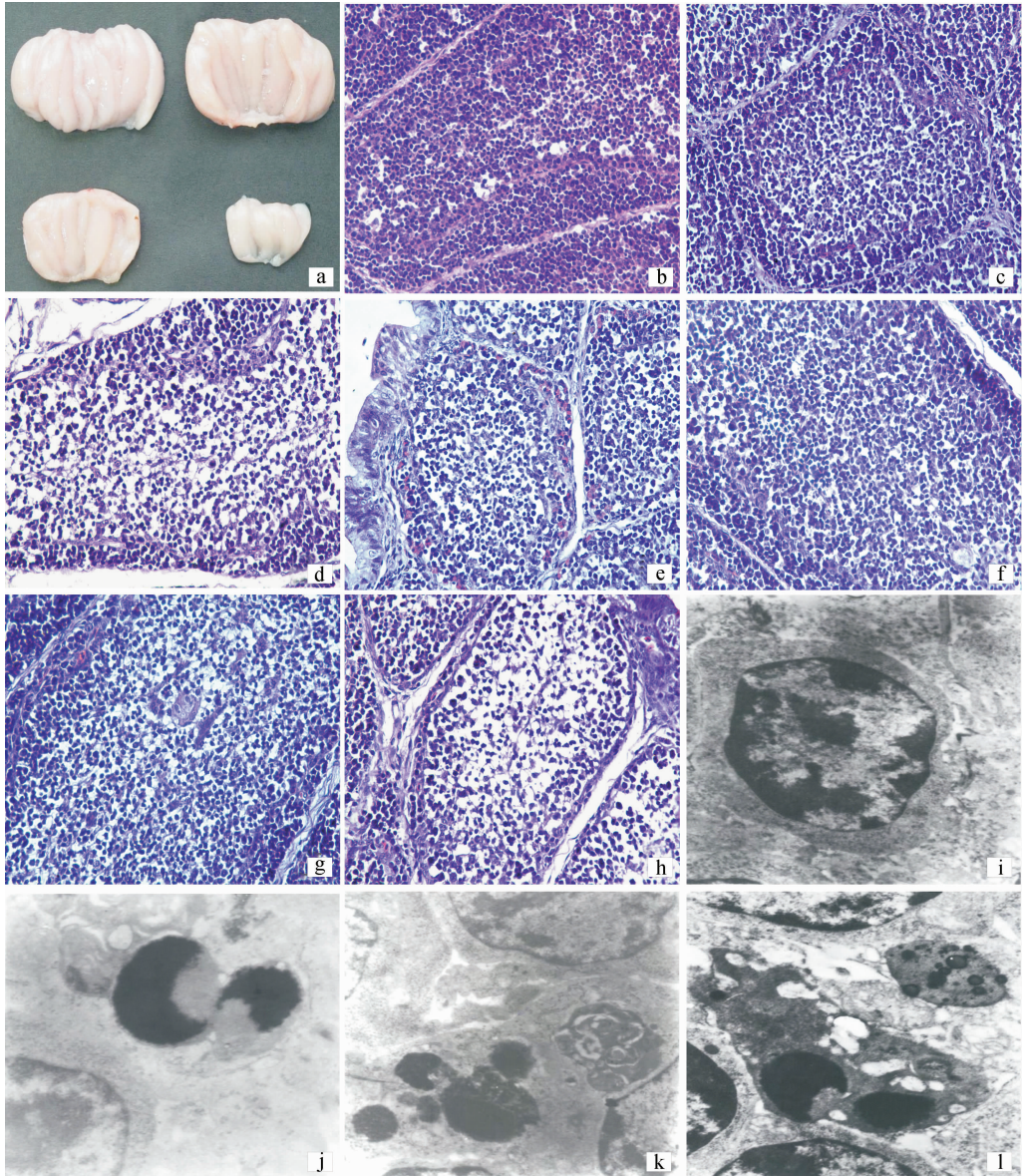
2 结果

2.1 临床观察

试验第 5 天,各高氟组采食量开始下降(与对照组比较),但饮水量无明显变化。第 7 天,鸡普遍精神萎靡,喜卧、嗜睡,个别鸡行走不稳,轻度跛行。第 11 天,高氟 II、III 组鸡行动障碍加剧,多数鸡站立不稳,跗关节肿大僵硬,驱赶时双翅张开不愿行走,个别鸡两腿外张,呈八字型,高氟 III 组出现严重行动障碍鸡,右腿无法自然卷曲回缩,运动时扑打双翅,以另侧腿为支点做转圈运动。第 18 天至试验结束,除上述症状外,还见高氟 II、III 组个别鸡食欲废绝,全身震颤。试验期间高氟 I 组无明显临床症状,高氟 II 组死亡 3 只,高氟 III 组死亡 7 只。42 日龄试验结束时,高氟 I、II、III 组体质量分别仅为对照组体质量的 87.55%、62.24% 和 32.25%,详情见表 1。

质区明显扩大,且淋巴细胞数量增多,皮质变薄,淋巴滤泡间质增宽(图 1f)。35 日龄时,髓质淋巴细胞数量明显减少(图 1g),皮质变薄。42 日龄时,髓质淋巴细胞数量显著减少,散在分布,且呈退行性变化,皮质几乎消失,淋巴滤泡间质显著增宽(图 1d,图 1h)。

2.2.3 超微病理结构变化 高氟 II 组和高氟 III 组凋亡淋巴细胞出现频率显著高于对照组和高氟 I 组。凋亡淋巴细胞主要表现为染色质沿核膜边聚,且呈“C”形、新月形(图 1j)或团块状,并见有凋亡小体(图 1h)。此外,还见淋巴细胞线粒体肿胀,线粒体嵴断裂或/和消失(图 1i),核膜破裂。



a. 42 日龄对照组(左上)及各高氟组法氏囊眼观变化。高氟I组(右上)法氏囊无显著变化;高氟II组(左下)和高氟III组(右下)法氏囊体积缩小,皱褶数量减少。b. 42 日龄对照组法氏囊,HE400×;c. 42 日龄高氟I组法氏囊,淋巴滤泡皮质髓质分界清晰,HE400×;d. 42 日龄高氟II组法氏囊。淋巴滤泡髓质淋巴细胞减少,皮质变薄,HE400×;e. 14 日龄高氟III组法氏囊,法氏囊淋巴滤泡皮质区淋巴细胞数量减少,髓质区淋巴细胞排列稀疏,HE400×;f. 28 日龄高氟III组法氏囊。淋巴滤泡髓质区扩大,淋巴细胞数量增多,皮-髓质分界不清,HE400×;g. 35 日龄高氟III组法氏囊,淋巴滤泡髓质区淋巴细胞减少,皮质变薄,HE400×;h. 42 日龄高氟III组法氏囊,髓质区淋巴细胞显著减少,皮质消失,淋巴滤泡间质增宽,HE400×;i. 42 日龄对照组法氏囊淋巴细胞,15 000×;j. 42 日龄高氟III组法氏囊,凋亡细胞染色质边聚呈“C”形,17 000×;k. 42 日龄高氟III组法氏囊,凋亡细胞染色质聚集呈致密团块及凋亡小体,10 000×;l. 42 日龄高氟III组法氏囊,凋亡细胞之线粒体肿胀,线粒体嵴消失呈空泡状,17 000×

a. The bursa of Fabricius in control group(Up left) and three high fluorine groups at 42 days of age. There is no obvious change in high fluorine group I(Up right). In high fluorine group II(Low left) and high fluorine group III(Low right), the size of the bursa as well as the reductus are diminished. b. The bursa of Fabricius in control group at 42 days of age (HE400×); c. The bursa of Fabricius in high fluorine group I at 42 days of age (HE400×); d. The bursa of Fabricius in high fluorine group II at 42 days of age. Lymphocytes are decreased in number in the medulla of lymphoid follicles with the narrow cortex (HE400×); e. The bursa of Fabricius in high fluorine group III at 14 days of age. Lymphocytes are decreased both in cortex and medulla and loosely arranged in the lymphoid follicles (HE400×); f. The bursa of Fabricius in high fluorine group III at 28 days of age. Lymphocytes are increased in number in the lymphoid follicles (HE400×); g. The bursa of Fabricius in high fluorine group III at 35 days of age. Lymphocytes are decreased in number in the medulla of lymphoid follicles with the narrow cortex (HE400×); h. The bursa of Fabricius in high fluorine group III at 42 days of age. Lymphocytes are obviously decreased in number in the medulla of lymphoid follicles, and the cortex is vanished (HE400×); i. Lymphocyte in the bursa of Fabricius in control group at 42 days of age (15 000×); j. The bursa of Fabricius in high fluorine group III at 42 days of age. Apoptotic lymphocyte has “C” shaped aggregated chromatin (17 000×); k. Apoptotic lymphocyte and apoptotic body are appeared in the bursa of Fabricius in high fluorine group III at 42 days of age (10 000×); l. The mitochondria are swelled in an apoptotic lymphocyte in high fluorine group III at 42 days of age (17 000×)

图1 各组雏鸡法氏囊病理变化

Fig. 1 Lesions of the bursa of Fabricius in chickens of different group

2.3 法氏囊的绝对质量及其脏器指数

高氟 I 组 7 日龄时法氏囊质量较对照组法氏囊质量极显著增高 ($P < 0.01$), 14 日龄至试验结束时与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。高氟 II 组 14 日龄时法氏囊质量较对照组法氏囊质量极显著降低 ($P < 0.01$), 21 日龄时, 与对照组差异不显著 ($P >$

0.05), 28 日龄至试验结束时极显著低于对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。高氟 III 组法氏囊质量显著低于对照组法氏囊质量, 7 日龄时差异显著 ($P < 0.05$), 14 日龄时差异极显著 ($P < 0.01$)。详情见表 2。

表 2 法氏囊绝对质量

Table 2 The weight of the bursa of Fabricius

组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天	第 42 天
Group	The 7 th day	The 14 th day	The 21 st day	The 28 th day	The 35 th day	The 42 nd day
对照组 Control	0.12±0.01 ^A	0.47±0.07 ^A	1.06±0.20 ^A	1.89±0.29 ^A	2.79±0.43 ^A	3.93±1.13 ^A
高氟 I 组 HF I	0.19±0.02 ^B	0.42±0.09 ^A	1.05±0.15 ^A	1.72±0.40 ^A	2.26±0.44 ^A	3.57±1.20 ^A
高氟 II 组 HF II	0.12±0.03 ^A	0.22±0.06 ^B	0.88±0.19 ^A	1.07±0.46 ^{AB}	1.00±0.15 ^B	1.80±0.55 ^B
高氟 III 组 HF III	0.08±0.02 ^a	0.19±0.03 ^B	0.24±0.18 ^B	0.97±0.51 ^B	1.01±0.32 ^B	0.65±0.33 ^C

高氟 I 组法氏囊脏器指数 7 日龄时较对照组法氏囊脏器指数极显著升高 ($P < 0.01$); 14 日龄至试验结束时, 与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。高氟 II 组法氏囊脏器指数 7 日龄时与对照组差异不显著 ($P > 0.05$); 14 日龄时极显著低于对照组 ($P < 0.01$); 21 日龄至 28 日龄时, 与对照组差异不显著 ($P > 0.05$); 35 日龄至试验结束时, 极显著低于对照

组 ($P < 0.01$)。高氟 III 组法氏囊脏器指数 7 日龄至 14 日龄时, 与对照组差异不显著 ($P > 0.05$); 21 日龄时极显著低于对照组 ($P < 0.01$); 至 28 日龄时极显著高于对照组 ($P < 0.01$); 35 日龄时与对照组差异不显著 ($P > 0.05$); 42 日龄时极显著低于对照组 ($P < 0.01$)。详情见表 3。

表 3 法氏囊脏器指数

Table 3 The relative weight of the bursa of Fabricius

组别	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天	第 42 天
Group	The 7 th day	The 14 th day	The 21 st day	The 28 th day	The 35 th day	The 42 nd day
对照组 Control	0.11±0.03 ^A	0.17±0.03 ^A	0.20±0.01 ^A	0.20±0.03 ^A	0.20±0.05 ^A	0.19±0.05 ^A
高氟 I 组 HF I	0.18±0.02 ^B	0.16±0.04 ^A	0.20±0.04 ^A	0.20±0.03 ^A	0.19±0.04 ^A	0.19±0.08 ^A
高氟 II 组 HF II	0.14±0.03 ^{Ab}	0.11±0.03 ^B	0.21±0.03 ^A	0.18±0.04 ^A	0.12±0.02 ^B	0.14±0.07 ^B
高氟 III 组 HF III	0.11±0.02 ^A	0.15±0.02 ^A	0.11±0.05 ^B	0.31±0.08 ^B	0.21±0.03 ^A	0.10±0.03 ^C

2.4 法氏囊淋巴细胞的生长周期

高氟 I 组各期淋巴细胞比例及 PI 指数与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。高氟 II 组和 III 组变化趋势相似, 14 日龄时 G_0/G_1 期淋巴细胞比例显著高于对照组 ($P < 0.05$), $G_2 + M$ 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; 28 日龄时高氟 II 组和 III 组 S 期淋巴细胞比

例较对照组极显著升高 ($P < 0.01$), 高氟 II 组 G_0/G_1 期淋巴细胞比例、 $G_2 + M$ 期淋巴细胞比例和 PI 指数与对照组相比差异不显著, 高氟 III 组 G_0/G_1 期淋巴细胞比例显著低于对照组 ($P < 0.05$), $G_2 + M$ 期淋巴细胞比例和 PI 指数显著或极显著高于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 42 日龄时高氟 II 组和 III 组 G_0/G_1 期淋巴细胞比例极显著高于对照组 ($P <$

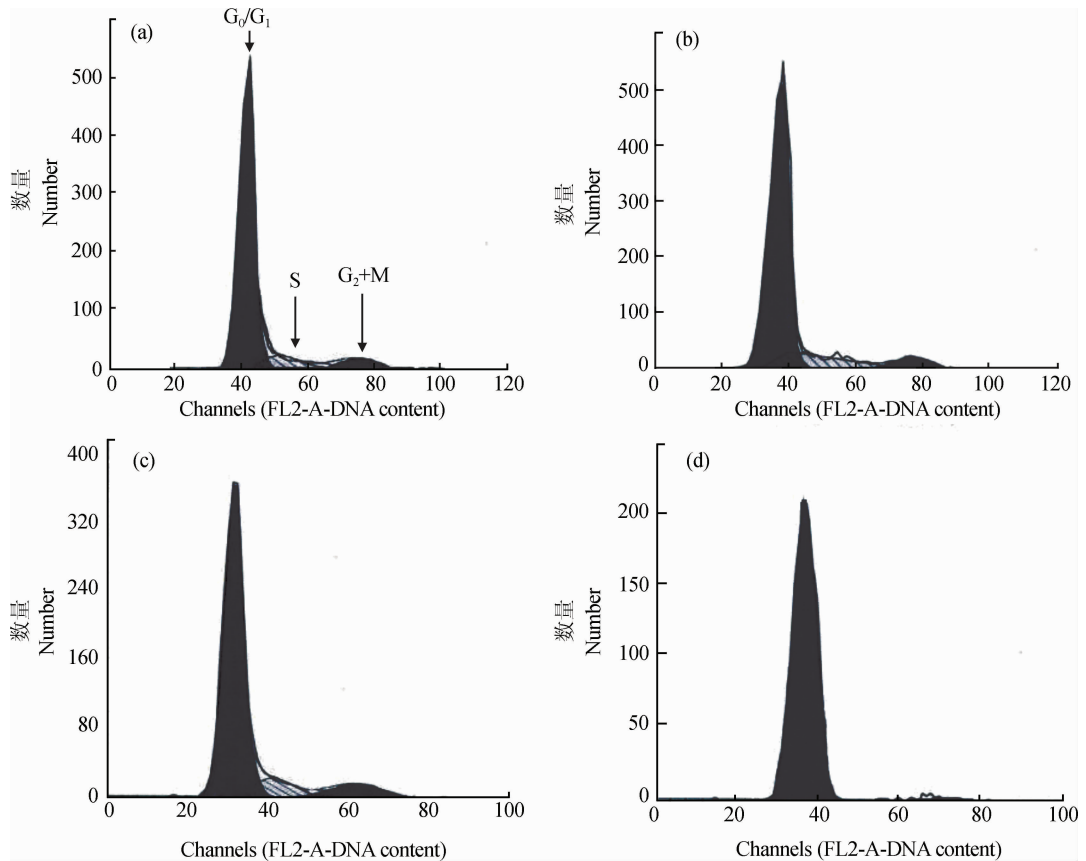
0.01), S 期、G₂ + M 期淋巴细胞比例和 PI 指数极显著低于对照组 ($P < 0.01$)。详情见表 4、图 2。

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	期 Phase	对照组 Control	高氟 I 组 HF I	高氟 II 组 HF II	高氟 III 组 HF III
第 14 天 The 14 th day	G ₀ /G ₁	88.97 ± 1.73 ^A	88.90 ± 1.26 ^A	91.77 ± 1.76 ^a	90.07 ± 2.46 ^a
	S	5.94 ± 1.36 ^A	5.50 ± 0.47 ^A	5.66 ± 0.35 ^A	4.72 ± 0.36 ^a
	G ₂ + M	5.10 ± 0.40 ^A	5.60 ± 0.79 ^A	3.57 ± 0.51 ^B	4.21 ± 0.33 ^{ab}
	PI	11.04 ± 0.56 ^A	11.10 ± 0.25 ^A	9.23 ± 0.44 ^B	8.93 ± 0.22 ^B
第 28 天 The 28 th day	G ₀ /G ₁	88.91 ± 1.83 ^A	87.92 ± 2.65 ^A	87.52 ± 1.26 ^A	84.70 ± 1.49 ^a
	S	6.08 ± 0.42 ^A	6.34 ± 0.13 ^A	7.15 ± 0.38 ^B	8.79 ± 0.24 ^C
	G ₂ + M	5.02 ± 0.51 ^A	5.74 ± 0.64 ^A	5.33 ± 0.21 ^A	6.51 ± 0.41 ^a
	PI	11.10 ± 0.35 ^A	12.08 ± 0.21 ^A	12.48 ± 0.39 ^A	15.30 ± 0.26 ^B
第 42 天 The 42 nd day	G ₀ /G ₁	87.27 ± 0.85 ^A	87.23 ± 1.31 ^A	96.57 ± 1.03 ^B	98.43 ± 0.62 ^B
	S	6.53 ± 0.59 ^A	6.81 ± 0.60 ^A	1.67 ± 0.68 ^B	0.73 ± 0.39 ^b
	G ₂ + M	6.21 ± 0.63 ^A	5.97 ± 0.71 ^A	1.76 ± 0.61 ^B	0.85 ± 0.29 ^b
	PI	12.74 ± 0.38 ^A	12.78 ± 0.27 ^A	3.43 ± 0.42 ^B	1.58 ± 0.04 ^C

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



a. 28 日龄对照组; b. 28 日龄高氟 III 组; c. 42 日龄对照组; d. 42 日龄高氟 III 组
a. Control group at 28 days of age; b. High fluorine group III at 28 days of age; c. Control group at 42 days of age; d. High fluorine group III at 42 days of age

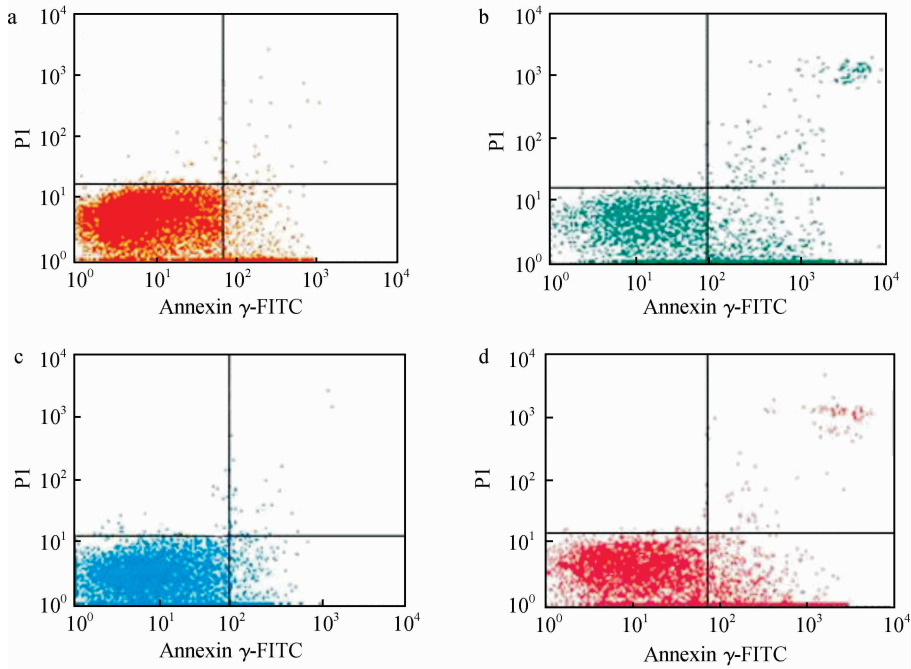
图 2 法氏囊淋巴细胞周期直方图

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

2.5 法氏囊淋巴细胞凋亡百分率

试验期间,高氟 I 组法氏囊淋巴细胞凋亡率与对照组法氏囊淋巴细胞凋亡率比较,无显著性差异 ($P>0.05$),高氟 II 组和 III 组较对照组极显著升高 ($P<0.01$),且高氟 III 组凋亡率显著或极显著高于 II 组同期凋亡率 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。从凋亡率

变化趋势来看,高氟 II 组和 III 组变化趋势一致,均于 28 日龄,凋亡率增幅达到最大,分别是对照组凋亡率的 292.70% 和 410.26%。详情见表 5。在凋亡点图(图 3)中,可以很直观地看出 28 日龄时,III 组凋亡细胞数量增幅最大。



a. 28 日龄对照组; b. 28 日龄高氟 III 组; c. 42 日龄对照组; d. 42 日龄高氟 III 组; 右上和右下 2 个象限中的细胞表示凋亡细胞

a. Control group at 28 days of age; b. High fluorine group III at 28 days of age; c. Control group at 42 days of age; d. High fluorine group III at 42 days of age. Apoptotic cells are presented in the right upper quadrant and right lower quadrant of the figures

图 3 法氏囊淋巴细胞凋亡点图

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

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	第 14 天 The 14 th day	第 28 天 The 28 th day	第 42 天 The 42 nd day
对照组 Control	5.35±0.74 ^A	5.75±0.60 ^A	6.41±0.87 ^A
高氟 I 组 HF I	5.72±1.31 ^A	6.32±1.16 ^A	7.55±0.59 ^A
高氟 II 组 HF II	11.41±0.88 ^B	16.83±1.53 ^B	14.08±1.54 ^B
高氟 III 组 HF III	14.69±2.00 ^b	23.59±0.98 ^C	19.75±0.52 ^C

3 讨论

3.1 高氟对雏鸡发病的影响

国际现行标准规定,生长阶段鸡日粮氟限量为

250 mg·kg⁻¹,产蛋鸡为 350 mg·kg⁻¹。本次试验结果,高氟 I 组未见有明显临床症状,高氟 II 组和高氟 III 组于 7 日龄时出现轻微症状,至 11 日龄时症状加剧,且与文献报道的氟中毒临床症状一致^[6-7];从

高氟Ⅱ组和Ⅲ组雏鸡发病日龄来看,与康世良^[8]、刘国艳^[9-10]等的试验结果相比略有提前,而与刘建中^[11]等的试验观察结果相比则有延后,表明发病日龄因日粮氟水平,动物种类、品种以及饲养条件的不同而各异。高氟Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组体质量分别为对照组体质量的87.55%、62.24%和32.25%,表明高氟能明显抑制雏鸡体质量增加,可能与高氟对蛋白质合成的抑制^[12]以及由采食量下降所致外源蛋白摄入不足有关。

3.2 高氟对法氏囊形态结构的影响

组织学观察结果显示,高氟Ⅰ组法氏囊结构和淋巴细胞数量与对照组比较无明显变化(图1c)。高氟Ⅱ组和Ⅲ组法氏囊淋巴细胞14日龄时出现减少(见图1e),但28日龄时法氏囊淋巴细胞出现增多(见图1f),随后逐渐减少,至42日龄时,法氏囊淋巴滤泡髓质淋巴细胞较对照组显著减少(见图1d,图1h)。表明高氟在一定时期内可能对法氏囊淋巴细胞增殖产生促进作用,而长期影响则会产生抑制。这与文献报道日粮含氟500 mg·kg⁻¹时可在短期内引发机体的应激性保护性反应,促使免疫器官功能短时间增强^[13]的结论类同。高氟短期内促进淋巴细胞分裂增殖的机理,可能与NaF增强了淋巴细胞对促细胞分裂素的敏感度有关^[14]。电镜下,高氟Ⅱ组和Ⅲ组凋亡细胞数量较对照组明显增多,部分凋亡细胞内线粒体肿胀,嵴消失(见图1g-i),表明高氟能引起法氏囊淋巴细胞凋亡数量增多,这是高氟长期作用下导致体液免疫功能受损的病理基础。

3.3 高氟对法氏囊淋巴细胞增殖分化的影响

细胞DNA合成和有丝分裂是细胞增殖的重要标志^[15]。作者采用流式细胞术研究了高氟日粮对雏鸡法氏囊淋巴细胞增殖分化的影响。结果显示,高氟Ⅰ组各期淋巴细胞比例及PI值与对照组相比差异不显著,且法氏囊脏指数也与对照组差异不显著,表明400 mg·kg⁻¹日粮氟对雏鸡法氏囊生长无显著影响,与文献报道的500 mg·kg⁻¹日粮氟对雏鸡法氏囊脏指数无显著影响^[13]的结果一致。高氟Ⅱ组和Ⅲ组法氏囊14日龄时静止期(G₀/G₁)淋巴细胞比例较对照组显著升高,而增殖期(S、G₂+M)淋巴细胞比例和PI值不同程度地低于对照组,表明法氏囊淋巴细胞分裂增殖能力在雏鸡发育早期即受高氟影响。28日龄时高氟Ⅱ组和Ⅲ组增殖期(S、G₂+M)淋巴细胞比例和PI值不同程度地高于对照组,而静止期(G₀/G₁)淋巴细胞比例较对

照组不同程度地降低,表明此时法氏囊淋巴细胞由静止期进入增殖期的数量增多,分裂增殖能力增强,是引起高氟Ⅱ组和Ⅲ组法氏囊脏指数升高的佐证,也与组织学观察结果一致。随着日龄的增长和氟摄入量的增多,42日龄时高氟Ⅱ组和Ⅲ组增殖期(S、G₂+M)淋巴细胞比例与PI极显著低于对照组,静止期(G₀/G₁)淋巴细胞比例极显著高于对照组,表明大量淋巴细胞阻滞于静止期,分裂增殖受阻,直接导致法氏囊淋巴细胞数量减少,法氏囊脏指数极显著降低,法氏囊发育迟缓。其机理可能与氟对DNA聚合酶的抑制作用有关^[4,6]。

3.4 高氟对法氏囊淋巴细胞凋亡的影响

国外资料显示,氟能显著诱导肺泡巨噬细胞凋亡^[16]。本试验采用流式细胞术研究了高氟日粮对雏鸡法氏囊淋巴细胞凋亡百分率的影响。结果显示,高氟Ⅰ组法氏囊淋巴细胞凋亡率较对照组略有升高,但差异不显著,表明400 mg·kg⁻¹日粮氟对雏鸡法氏囊淋巴细胞凋亡无明显影响。高氟Ⅱ组和Ⅲ组法氏囊淋巴细胞凋亡率较对照组极显著升高(表5,图3),与42日龄电镜下调亡淋巴细胞观察的结果一致,表明高氟能显著增加法氏囊淋巴细胞凋亡率。28日龄时该两组法氏囊淋巴细胞凋亡率达到最大增幅(见表5),可能与此时法氏囊S期淋巴细胞数量异常增多有关(见表4)。研究资料显示,S期细胞染色体对NaF诱导的突变和损害最敏感^[17-18],从而导致发育异常的淋巴细胞增多,达到一定比例时便启动了凋亡程序,这是机体在异常状态下清除发育异常细胞的一种途径和保护机制。

综合本试验结果和上述分析,日粮含氟400 mg·kg⁻¹对雏鸡法氏囊生长发育无显著影响;日粮含F 800和1 200 mg·kg⁻¹时能引起法氏囊淋巴细胞增殖分化受阻,凋亡细胞显著增多,法氏囊生长发育受抑,机体体液免疫功能受损。

参考文献:

- [1] 李杰. 氟化钠对小鼠巨噬细胞功能和免疫器官脏系数的影响[J]. 氟研究通讯, 1993, 8: 16-18.
- [2] 郭晓英, 孙贵范, 金亚平, 等. 氟对小鼠脾淋巴细胞增殖反应的影响[J]. 中国地方病学杂志, 2001, 20(1-1): 32-33.
- [3] 李术, 徐世文, 康世良. 氟病奶山羊血清细胞因子含量的变化[J]. 畜牧与兽医, 2003, 35(3): 9-11.
- [4] JAIN S K, SUSHEELA A K. An experimental study in fluoride rabbit [J]. *Experimental hematology*,

- 1991,19:59-63.
- [5] 张爱君,杨德民,柏树青. 氟化物的免疫毒性[J]. 中国地方病防治杂志, 2002,17(1):30-32.
- [6] 马学会,黄仁录. 家禽氟中毒[J]. 中国兽医杂志, 2004,40(8):50-51.
- [7] 刘田生,李建颖,宁艳春. 鸡氟中毒临床及病理学观察[J]. 中国家禽,2004,26(17):25-26.
- [8] 康世良,刘国艳,柴春彦. 氟对鸡体内总抗氧化能力的影响[J]. 中国兽医杂志,2001,37(12):15-16.
- [9] 刘国艳. 鸡氟中毒的毒理学研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2000.
- [10] 刘国艳,柴春彦,崔立,等. 氟化物对鸡甲状腺激素代谢的影响[J]. 中国兽医学报,2002,22(1):61-62.
- [11] 刘建中,辛朝安,张洁,等. 日粮中不同氟含量对 AA 肉鸡的影响[J]. 动物医学进展,1999,20(3):47-49.
- [12] 邵红,刘开泰,姚华,等. 氟中毒相关基因对患者蛋白质合成的影响[J]. 微量元素与健康研究,2005,22(4):1-4.
- [13] 冯军,李玉然. 氟化物对雏鸡免疫功能影响的研究[J]. 中国兽医科技,1999,29(5):5-8.
- [14] LOFTENIUS A, ANDERSSON B, BUTLER J E, et al. Fluoride augments the mitogenic and antigenic response of human blood lymphocytes *in vitro* [J]. *Caries Research*, 1999,33(2):148-155.
- [15] CUI H, FANG J, PENG X. Pathology of the thymus, spleen and bursa of Fabricius in zinc-deficient ducklings[J]. *Avian Pathology*, 2003, 32:257-262.
- [16] HIRANO S, ANDO M. Apoptotic cell death following exposure to fluoride in rat alveolar macrophages [J]. *Arch Toxicol*, 1996,70:249-251.
- [17] AARDEME M J, TSUTSUI T. Sodium fluoride-induced chromosome aberration different cell cycle stage [J]. *Mutat Res*, 1995,331:171-172.
- [18] HAYASHI N, TSUTSUI T. Cell cycle dependence of cytotoxicity and clastogenicity induced by treatment of synchronized human diploid fibroblasts with sodium fluoride[J]. *Mutat Res*, 1993,290(2):293-320.

动物疫情速递

智利发生蜜蜂欧洲幼虫腐臭病

2009年7月27日,智利 Ternicier Claudio 博士向 OIE 通报了蜜蜂欧洲幼虫腐臭病疫情。疫情始于2009年7月10日,于7月24日确诊。此次疫情是临床发病,病原是蜂房蜜蜂球菌(*Melissococcus plutonius*),依靠临床和实验室检测作出诊断。Lo Aguirre(国家实验室)的PCR结果呈阳性。疫区位于科金博省 Elqui 地区 Vicuña 的养蜂场,感染动物是蜜蜂,以蜂房为统计单位,涉及易感动物35箱,病例3箱,未出现死亡,未予销毁。智利已采取检疫措施,即将实行改良的扑杀,禁止免疫,未对动物进行治疗。这是智利首次发生蜜蜂欧洲幼虫腐臭病。

英国发生马传染性子宫炎

2009年7月30日,英国首席兽医官 Nigel Gibbens 博士向 OIE 通报了马传染性子宫炎疫情。疫情始于2009年7月22日,于7月29日确诊。此次疫情不是临床发病,依靠实验室检测作出诊断,病原是马生殖道泰勒氏菌(*Taylorella equigenitalis*),英国兽医实验所(OIE 参考实验室)的病原分离和PCR结果均呈阳性。疫区位于英格兰毕晓普斯托福德地区 Elsenham 的养殖场,感染群包括1匹种马和23匹性接触情况不详的马,未出现死亡,未予销毁。该种马1月前自欧洲大陆引入,临床健康,对出口前程序中所取的拭子样品进行马传染性子宫炎检测,结果呈阳性。从可考资料看,该种马在英国并未用于配种和采精。英国采取了检疫、国内限制移运和感染房舍/设施消毒措施,即将进行筛查,未禁止免疫,对动物进行了治疗。英国最近一次发生马传染性子宫炎是2008年3月27日。

(摘译自 OIE 网站)