

环磷酰胺诱导黄羽肉鸡免疫抑制的研究

朱晓彤¹, 江青艳¹, 王丙云², 李柳茂¹, 曾 艳¹

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 佛山科技学院 农牧分院, 广东 佛山 528531)

摘要: 180只墟岗黄雏鸡随机分为4组, 第1组为对照组, 第2至4组为处理组, 10日龄开始, 对照组胸肌注射0.5 mL的生理盐水, 第2至4组分别按40、80和160 mg/kg的剂量, 同部位注射用生理盐水稀释的环磷酰胺(cyclophosphamide, CY) 0.5 mL; 1次/d, 连续注射3 d. 21、35、56日龄时每组随机抽取10只鸡进行屠宰取样, 测定各组鸡的器官指数. 另取3只鸡, 测定脾脏淋巴细胞增殖转化和脾脏抗体形成细胞的数量. 试验结果表明: 一定剂量的环磷酰胺能显著降低墟岗黄鸡早期的体质量, 且效果与注射剂量呈依赖关系; 降低鸡早期脾脏指数和法氏囊指数; 显著减少由ConA诱导的脾脏淋巴细胞的增殖转化; 减少鸡早期脾脏抗体形成细胞的数量.

关键词: 环磷酰胺; 黄羽肉鸡; 免疫抑制

中图分类号: S831.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)04-0060-04

免疫抑制是由于免疫系统受到损害, 导致机体对抗原的应答能力下降, 对疾病的敏感性增强的一种免疫异常状态. 环磷酰胺是一种细胞毒性药物, 一定剂量的环磷酰胺常可诱导动物产生免疫抑制. Lo等^[1]的研究发现: 用环孢菌素和环磷酰胺处理火鸡后, 淋巴细胞对由T细胞分裂素和ConA诱导的增殖转化率降低了2~3倍, 用环磷酰胺处理7 d后, 处理组火鸡的体质量显著低于对照组($P < 0.05$); 且对绵羊红细胞产生的应答反应明显降低. 同时, Carrier等^[2]的研究也发现: 给鸡注射地塞米松、环孢菌素和环磷酰胺后, 各处理组鸡的法氏囊质量显著低于对照组, 并且有丝分裂产生的T、B淋巴细胞的胚细胞转变减少. 试验中常采用环磷酰胺作为复制免疫失衡动物模型的化学物质^[3~5]. 但是, 由于其药理功效较为复杂, 其毒作用剂量、毒作用点和毒作用程度可能不尽相同^[6,7], 给复制出具有适度而稳定的免疫抑制状态的动物模型增加了困难. 本试验的目的在于采用不同剂量的环磷酰胺诱导黄羽肉鸡的免疫抑制, 通过观察鸡脾脏、法氏囊和胸腺的萎缩程度, 检测脾脏淋巴细胞增殖转化率的变化, 检测脾脏抗体形成细胞的变化, 寻找出环磷酰胺诱导墟岗黄羽肉鸡免疫抑制的适宜用量, 为进一步开展鸡免疫增强剂的研究提供试验模型.

1 材料与方法

1.1 试验动物

选自佛山墟岗鸡场生产的1日龄墟岗黄羽肉鸡母苗180只.

1.2 免疫抑制剂

环磷酰胺购自中山医科大学附属第三医院, 由江苏恒瑞医药股份有限公司生产. 环磷酰胺为白色结晶粉末, 每盒5瓶, 每瓶0.2 g. 批号为: 苏卫药准字(1996)第403501号.

1.3 基础日粮及营养水平

基础日粮为广东恒昌实业股份有限公司属下九江饲料厂生产的“家乐牌”161AA肉小鸡配合饲料和152肉中鸡配合饲料. 小鸡料的粗蛋白水平(w) $\geq 21\%$, 中鸡料的粗蛋白水平(w) $\geq 19\%$. 1~21日龄饲喂小鸡料, 22~56日龄饲喂中鸡料.

1.4 试验动物的饲养管理

试验过程中, 试验各组鸡采用单笼饲养于环境条件一致的鸡舍内, 按常规饲养方法育雏. 鸡群自由采食、饮水, 全日光照. 每天观察鸡群的采食、饮水及发病死亡情况. 全期饲养试验共56 d.

1.5 试验动物的分组与处理

1日龄开始分组, 随机方法把180只雏鸡分成4组, 每组45只, 试验开始时, 各组鸡的平均体质量差异不显著. 第1组为对照组, 第2至4组分别为低剂量、中剂量和高剂量的环磷酰胺处理组.

10日龄时开始处理. 对照组胸肌注射生理盐水0.5 mL, 其余各处理组分别按40、80和160 mg/kg的剂量, 同部位注射用生理盐水稀释的环磷酰胺0.5 mL; 1次/d, 连续注射3 d. 21、35、56日龄时每组分别随机抽取10只鸡进行屠宰取样. 从各组中另取3只鸡取脾脏, 分离淋巴细胞用于检测脾脏淋巴细胞增殖转化率和抗体形成细胞的数量.

1.6 试验检测指标

平均体质量; 死亡率; 免疫器官指数(在 21 日龄、35 日龄和 56 日龄每组随机抽取 10 只鸡取胸腺、脾脏和法氏囊称质量, 计算免疫器官指数); 脾脏淋巴细胞增殖、转化(采用 MTT 法^[8]测定); 脾脏抗体形成细胞的数量的测定(采用微量溶血分光光度法检测^[9]).

1.7 数据处理

所得数据采用 MINITAB 软件进行处理, 结果用

平均数 ± 标准误表示.

2 结果与分析

2.1 环磷酰胺对试验鸡体质量的影响

表 1 表明: 在 7 日龄时(处理前)各组鸡平均体质量无显著性差异($P>0.05$). 但是在 10~12 日龄连续 3 日注射环磷酰胺后, 21 日龄, 35 日龄各处理组鸡平均体质量显著低于对照组($P<0.05$), 并且注射

表 1 不同剂量的环磷酰胺对墟岗黄鸡平均体质量的影响

Tab. 1 Effect of different dosages of cyclophosphamide on body mass of Xugang yellow-feathered broilers					g
剂量 dosages/(mg·kg ⁻¹)	7 日龄 7 d	21 日龄 21 d	35 日龄 35 d	56 日龄 56 d	
对照 control	107.88±8.80	375.29±32.79 ^a	810.28±71.13 ^a	1 310.2±169.6 ^a	
40	107.06±8.23	360.81±27.60 ^b	746.93±39.49 ^b	1 129.6±95.9 ^b	
80	108.48±7.38	337.95±32.77 ^c	730.37±79.41 ^b	1 190.5±163.5 ^{ab}	
160	108.89±9.26	263.21±41.57 ^d	629.62±92.14 ^c	1 147.0±205.1 ^b	

1) 同列数字后有不同字母者表示在 0.05 水平上差异显著, 有相同字母或不标注者为差异不显著

剂量越大, 体质量减轻越明显. 至 56 日龄, 除中剂量组外, 其余两处理组平均体质量显著低于对照组($P<0.05$).

2.2 环磷酰胺对试验鸡死亡率的影响

除低剂量组外, 注射中、高剂量环磷酰胺在 2 周内引起鸡死亡, 死亡数分别为 1 和 7 只; 且死亡率分别为 2.17%和 15.22%, 与剂量呈依赖关系.

2.3 环磷酰胺对试验鸡的脏器指数的影响

由表 2 显示: 全期试验中, 低剂量组的器官指数与对照组相比无显著性差异($P>0.05$). 21 日龄时, 中剂量处理组脾脏指数和法氏囊指数显著低于对照组($P<0.05$), 35 日龄时, 除法氏囊指数外, 其余各项指标与对照组相比, 差异不显著($P>0.05$); 56 日龄时, 中剂量组的各项器官指数与对照组相比, 无显著差异($P>0.05$). 而在整个试验阶段, 高剂量组鸡的

脾脏指数与对照组相比无显著差异($P>0.05$); 法氏囊指数显著低于对照组($P<0.05$); 胸腺指数在 21 日龄时显著低于对照组($P<0.05$); 其余阶段无显著差异($P>0.05$).

2.4 环磷酰胺对试验鸡脾脏淋巴细胞增殖转换的影响

由表 3 可知: 21 日龄, 与对照相比, 注射中剂量和高剂量环磷酰胺能显著降低由 ConA 诱导的脾脏淋巴细胞增殖转化率($P<0.05$), 且抑制率分别为 43%和 62%. 但低剂量无显著的抑制作用($P>0.05$). 35 日龄时, 各处理组与对照组相比, 淋巴细胞增殖转化率均显著低于对照组($P<0.05$), 且抑制率分别为: 61%、67% 和 15%. 但是, 至 56 日龄时, 只有高剂量组仍显著低于对照组($P<0.05$), 抑制率为 18.8%.

表 2 不同剂量的环磷酰胺对墟岗黄鸡脾脏指数、法氏囊指数和胸腺指数的影响

Tab. 2 Effect of different dosages of cyclophosphamide on spleen bursa of fabricius and thymus gland indices of Xugang yellow-feathered broilers										(n=10)
剂量 dosages/ (mg·kg ⁻¹)	脾脏指数			法氏囊指数			胸腺指数 thymus gland indices			
	spleen indices			bursa of fabricius indices						
	21 日龄 21 d	35 日龄 35 d	56 日龄 56 d	21 日龄 21 d	35 日龄 35 d	56 日龄 56 d	21 日龄 21 d	35 日龄 35 d	56 日龄 56 d	
对照 control	0.176±0.034 ^a	0.173±0.056	0.211±0.046	0.202±0.147 ^a	0.130±0.068 ^a	0.074±0.036 ^a	0.413±0.051 ^a	0.446±0.124	0.389±0.010	
40	0.177±0.059 ^a	0.173±0.036	0.193±0.058	0.140±0.080 ^a	0.152±0.070 ^a	0.077±0.040 ^a	0.485±0.138 ^a	0.420±0.184	0.341±0.091	
80	0.132±0.039 ^b	0.191±0.050	0.201±0.043	0.068±0.024 ^b	0.073±0.042 ^b	0.064±0.052 ^a	0.397±0.110 ^a	0.390±0.150	0.430±0.219	
160	0.153±0.06 ^{ab}	0.189±0.055	0.170±0.071	0.054±0.018 ^b	0.050±0.007 ^b	0.033±0.006 ^b	0.244±0.131 ^b	0.487±0.138	0.407±0.145	

1) 同列数字后有不同字母者表示在 0.05 水平上差异显著, 有相同字母或不标注者为差异不显著

表 3 不同剂量的环磷酰胺对墟岗黄鸡脾脏淋巴细胞增殖转化率的影响

Tab. 3 Effect of different dosages of cyclophosphamide on lymphocyte proliferation conversion in spleen of Xugang yellow-feathered broilers (n=18)

剂量 dosages/ (mg·kg ⁻¹)	21 日龄 21 d		35 日龄 35 d		56 日龄 56 d	
	细胞增殖转化能力	抑制率	细胞增殖转化能力	抑制率	细胞增殖转化能力	抑制率
	lymphocyte proliferation conversion (D _{560 nm})	inhibit ratio/ %	lymphocyte proliferation conversion (D _{560 nm})	inhibit ratio/ %	lymphocyte proliferation conversion (D _{560 nm})	inhibit ratio/ %
对照 control	0. 268±0. 07 ^a		0. 137±0. 01 ^a		0. 069±0. 02 ^a	
40	0. 313±0. 07 ^a		0. 053±0. 01 ^b	61	0. 086±0. 03 ^b	
80	0. 153±0. 05 ^b	43	0. 045±0. 01 ^b	67	0. 071±0. 02 ^{ab}	
160	0. 101±0. 09 ^c	62	0. 116±0. 02 ^c	15	0. 056±0. 02 ^c	18. 8

1) 同列数字后有不同字母者表示在 0.05 水平上差异显著,有相同字母或不标注者为差异不显著

2.5 环磷酰胺对试验鸡脾脏中抗体形成细胞数量的影响

表 4 显示:在 21 日龄,各处理组脾脏中抗体形成细胞的数量均少于对照组,且减少率分别为 12.9%、52.2%和 9.3%。其中低剂量组和中剂量组显著低于对照组($P<0.05$)。35 日龄,与对照组相比,低剂量

组的抗体形成细胞数量显著低于对照组($P<0.05$)。高剂量组显著高于低剂量组和中剂量组($P<0.05$)。到 56 日龄,高剂量组脾脏中抗体形成细胞的数量显著低于对照组($P<0.05$),且中剂量组显著高于对照组($P<0.05$)。

表 4 不同剂量的环磷酰胺对墟岗黄鸡脾脏中抗体形成细胞数量的影响

Tab. 4 Effect of different dosages of cyclophosphamide on antibody formation cell in spleen of Xugang yellow-feathered broilers (n=8)

剂量 dosages/ (mg·kg ⁻¹)	21 日龄 21 d		35 日龄 35 d		56 日龄 56 d	
	抗体形成细胞	减少率	抗体形成细胞	减少率	抗体形成细胞	减少率
	antibody fomation cell(D _{560 nm})	reduce ratio/ %	antibody fomation cell(D _{560 nm})	reduce ratio/ %	antibody fomation cell(D _{560 nm})	reduce ratio/ %
对照 control	0. 224±0. 048 ^a		0. 196±0. 007 ^{ac}		0. 290±0. 007 ^a	
40	0. 195±0. 022 ^b	12. 9	0. 189±0. 007 ^b	3. 5	0. 296±0. 008 ^{ab}	
80	0. 107±0. 004 ^c	52. 2	0. 191±0. 010 ^{ab}	2. 5	0. 298±0. 011 ^b	
160	0. 203±0. 005 ^{ab}	9. 3	0. 201±0. 012 ^c		0. 283±0. 012 ^c	2. 4

1) 同列数字后有不同字母者表示在 0.05 水平上差异显著,有相同字母或不标注者为差异不显著

3 讨论

环磷酰胺是医学上常用的抗癌药,也是一种免疫抑制剂,对动物体的免疫系统具有很大的影响。由于给药剂量不同,环磷酰胺的免疫药理作用出现明显差异,低剂量的环磷酰胺具有免疫增强作用,能够抑制 T 细胞封闭因子,使 T 细胞发挥抗肿瘤作用。张海英等^[10, 11]的研究表明:给小鼠腹腔注射 0.2 mg/kg 的环磷酰胺可以增强小鼠的免疫能力;并且使肿瘤的发生率降低,但 100 mg/kg 的环磷酰胺对机体的造血和免疫系统有广泛的抑制作用,可造成免疫和造血功能的缺陷。本试验发现:给鸡注射不同剂量的环磷酰胺可显著抑制鸡体质量的增加,且与剂量呈依赖关系。同时发现:中剂量的环磷酰胺可显著降低鸡早期脾脏指数和法氏囊指数,对胸腺指数的影响效果不显著。高剂量的环磷酰胺可显著降低鸡早期胸

腺指数和法氏囊指数,对脾脏指数的影响不明显。低剂量的环磷酰胺对鸡群的器官指数无显著影响。35 日龄以后,环磷酰胺对鸡群造成的影响明显减弱,鸡群逐渐恢复正常。脾脏淋巴细胞增殖转化率和抗体形成细胞数量的测定结果显示:21 日龄时,中剂量和高剂量的环磷酰胺可显著降低由 ConA 诱导的脾脏淋巴细胞增殖转化率,且效果持续至 35 日龄,35 日龄后影响减轻。并且低剂量和中剂量的环磷酰胺可显著减少 21 日龄脾脏抗体形成细胞的数量,35 日龄后低剂量组的抗体形成细胞的数量仍显著低于对照组,但是,中剂量组与对照组相比差异不显著,56 日龄后,除高剂量组外,各组鸡的抗体形成细胞数量有所上升,中剂量组显著高于对照组。以上试验结果可初步断定:环磷酰胺对鸡免疫抑制主要通过抑制法氏囊功能实现的,对胸腺和脾脏也有不同程度的抑制作用;并且环磷酰胺诱导的免疫抑制在给药后的

10 d 中效果较为明显,随着时间的延长,抑制作用渐渐消失,鸡群逐步恢复正常,这个试验结果与环磷酰胺诱导小鼠免疫抑制的作用相似^[12]。其中环磷酰胺的用量以 80 mg/kg 的效果较好。

致谢: 本试验过程中,得到了傅伟龙、高萍、刘丽、邱月娥、杨玉存、田光洪、陈胜锋、张棋等老师和同学的支持及帮助,特此致谢!同时还衷心感谢动物细胞工程室高淑静老师的大力支持!

参考文献:

[1] LOA C C, LIN T L, WU C C, et al The effect of immunosuppression on protective immunity of turkey poult against infection with turkey coronavirus[J] . Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 2002, 25, 127—138.

[2] CORRIER D E, ELISSALDE M H, ZIPRIN R L, et al Effect of immunosuppression with cyclophosphamide, cyclosporin, or dexamthasone on salmonella colonization of broiler chicks[J] . Avian Disease, 1991, 35(1): 40—45.

[3] 朱新华, 后文俊, 沈 凌, 等. 实验性免疫抑制动物模型的稳定性探讨[J] . 云南大学学报, 1998, 20(2): 142—144.

[4] 唐超明, 李汉贤. 环磷酰胺免疫抑制小鼠模型的建立及其在肾包膜下移植中的应用[J] . 山西临床医药杂志, 2000, 9(9): 685—687.

[5] 李业鹏, 计 融, 韩春卉, 等. 建立小鼠免疫抑制低下模型的初步研究[J] . 中国食品卫生杂志, 2001, 13(6): 7—10.

[6] 马 琳, 王红梅, 向 东, 等. 免疫失衡动物模型复制初探[J] . 中国食品卫生杂志, 2001, 13(6): 11—13.

[7] 张海英, 朴春姬, 刘 晶, 等. 低剂量环磷酰胺预先作用的抗肿瘤效应[J] . 中国公共卫生, 2000, 16(3): 202—203.

[8] 徐淑云. 药理实验方法学[M] . 第2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 1 221—1 222.

[9] 李康生, 董 菁. 微量溶血分光光度法测定抗体形成细胞[J] . 中国免疫学杂志, 1999, 4: 179.

[10] 张海英, 高 峰, 王献理. 低剂量环磷酰胺对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J] . 白求恩医科大学学报, 1998, 24(1): 24—26.

[11] 韦鹏涯, 王 坤, 傅瑞金, 等. 绿素酞对免疫抑制小鼠细胞免疫功能的调节作用[J] . 右江民族医学院学报, 2001, 23(4): 518—519.

[12] 徐海帆, 李汉贤. 免疫抑制小鼠不同时间环磷酰胺的血药浓度与免疫功能[J] . 南华大学学报(医学版), 2001, 29(6): 562—564.

Immunosuppression Induced by Cyclophosphamide in Yellow-Feathered Indigenous Broilers

ZHU Xiao-tong¹, JIANG Qing-yan¹, WANG Bing-yun², LI Liu-mao¹, ZEN Yan¹
(1 College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;
2 Foshan Science and Technology College, Foshan 528231, China)

Abstract: One hundred and eighty one-day-old Xugang broilers were randomly divided into 4 groups. The birds in group I were injected with 0.5 mL NaCl, while the birds in group II, III and IV were injected with cyclophosphamide at 40, 80 and 160 mg/kg respectively. Ten broilers from each group were slaughtered at 21, 35 and 56-day-old, the body masses and the mass of spleen, thymus and bursa of fabricius were recorded, and lymphocytes from spleen, thymus and bursa of fabricius were assayed. It was shown that, injection of cyclophosphamide decreased body mass gain of the broilers, and inhibited the growth and development of spleen and bursa of fabricius as well as the growth and maturation of lymphocytes in the spleen .

Key words: cyclophosphamide; yellow-feathered broil; immuno-suppression

【责任编辑 柴 焰】