

黄东璋,刘明生,王 健,等. 硒中毒对雏鹅免疫机能的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(2):218-220.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.071

硒中毒对雏鹅免疫机能的影响

黄东璋,刘明生,王 健,甘辉群,谭 菊
(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300)

摘要:为研究硒中毒对雏鹅免疫机能的影响,在基础日粮中按 2.0、5.0 mg/kg 添加亚硒酸钠(试验组),以饲喂基础日粮为对照组,并于试验开始后 7、14、21、28、35、42 d 每组随机抽取 6 羽鹅,分别空腹称体质量后自心脏采血 5 mL,用于 T 淋巴细胞转化率测定和血清中与自由基有关酶的测定,之后捕杀,摘取胸腺、脾脏、法氏囊,用于计算免疫器官指数。结果表明,硒中毒时雏鹅血清中 GSH-PX、SOD、CAT 活性, GSH 含量与对照组相比显著或极显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 MDA 的含量则显著或极显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),同时,试验组雏鹅的淋巴细胞转化率显著下降($P<0.05$),免疫器官指数显著或极显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。这表明硒中毒时雏鹅的免疫机能低下,抗病力降低,自由基产生增多,与自由基清除有关的酶活性降低,过氧化物产生增多,最后导致机体生长发育迟缓,甚至死亡。

关键词:雏鹅;硒中毒;血清酶;淋巴细胞转化率;免疫器官指数

中图分类号: S852.4⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0218-03

硒是动物必需的一种微量营养元素,参与许多重要的生物进程。硒具有很强的抗氧化能力,并且与维生素 E 具有协同作用,保护细胞及线粒体膜免受氧自由基的损害^[1]。现在一般认为,硒可能是作为免疫系统的非特异性刺激因子,参与调节免疫功能状态,以维持机体内环境的稳定。但生产实践中,在防治动物硒缺乏病时,由于补硒方法不当,如一次补硒过多,补硒时间过长,或硒与饲料混合不均匀等而发生硒中毒的事例也时有发生^[2]。目前国内外对畜禽硒中毒的研究报道较多,但主要集中在猪、鸡等动物的病理学和血清酶等方面^[3-6],而硒中毒对鹅免疫机能的影响还未见报道。本试验以健康苏牧 1 号白鹅为试验动物,研究硒中毒时对雏鹅免疫机能的影响,为临床防治鹅硒中毒提供试验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

XSP-4C 双目生物显微镜(上海炳宇光学仪器有限公司生产),紫外分光光度计(751GD,上海仪电分析仪器有限公司生产),低温超速离心机(TGL-16B,扬州科能电力电子有限公司生产),漩涡混匀搅拌器(XW-80A,上海精科实业有限公司生产),电热恒温水箱(TZL-5005,苏州珀西瓦尔实验设备有限公司生产),精密天平(UX220H,日本岛津有限公司生产)。

1.2 主要药品与试剂

亚硒酸钠($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$),分析纯,含量(以干基计)98.7%,含硒(以干基计)45.5%,由江苏倍康药业有限公司提供;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)试剂盒、超氧化物歧

化酶(SOD)试剂盒、谷胱甘肽(GSH)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所;PHA(植物血凝素),购自上海源叶生物科技有限公司;胎牛血清,购自上海拜力生物科技有限公司;RPMI1640 培养液,购自美国 CORNING 公司。

1.3 试验动物

1 日龄苏牧 1 号健康雏鹅 180 羽,由江苏畜牧科技示范园提供。

1.4 日粮的配制及日粮硒水平

试验采用玉米-饼粕型基础日粮,其营养组成除了硒之外,均参照苏牧 1 号白鹅营养需要进行配比(表 1),同时根据 GB/T 13883—2008 硒测定法测定基础日粮中硒的含量。

表 1 鹅基础的日粮组成

成分	含量 (%)	成分	含量 (%)	成分	含量 (%)
玉米	46	食盐	0.25	一水硫酸锰	0.035 3
豆粕	8	石粉	1.60	七水硫酸锌	0.035 6
菜粕	12	磷酸氢钙	0.30	五水硫酸铜	0.003 2
麦麸	15	植酸酶	0.05	碘化钾	0.004 2
DDGS	8	多维	0.50	L-赖氨酸盐	0.050 0
次粉	8	一水硫酸亚铁	0.06		

注:维生素以每 1 kg 日粮添加维生素 A 6 000 IU,维生素 D₃ 300 IU,维生素 E 60 IU,维生素 K 2.000 mg,维生素 B₁ 1.500 mg,核黄素 4.000 mg,维生素 B₆ 3.000 mg,生物素 0.100 mg,叶酸 1.000 mg,烟酸 65.000 mg,泛酸 15.000 mg,维生素 B₁₂ 0.015 mg,胆碱 600.000 mg。基础日粮中硒含量为(0.120±0.014)mg/kg($n=5$)。

1.5 试验方法

1.5.1 饲养方法与分组 将 1 日龄试验鹅预饲 1 周,然后将 180 羽健康无疾病试验鹅随机分为 3 组,每组 60 羽。其中 I 组为对照组,喂基础日粮;II 组、III 组为试验组,在基础日粮中分别添加亚硒酸钠 2.0、5.0 mg/kg。鹅自由采食和饮水,用

收稿日期:2014-04-08

作者简介:黄东璋(1981—),男,江苏射阳人,硕士,讲师,主要从事畜禽疫病防控研究。Tel:(0523) 86158007;E-mail:112571065@qq.com。

药和防疫按鹅场常规程序进行,连续饲喂,试验期 42 d。

1.5.2 样品的采集与处理 分别于试验开始后 7、14、21、28、35、42 d 每组随机抽取 6 羽鹅,分别空腹称质量后自心脏采血 5 mL,采血时间统一于 08:00—09:00 进行。所采血样分为 2 份,1 份用 EDTA - Na₂ 抗凝,用于 T 淋巴细胞转化率测定;另 1 份不加抗凝剂,常规分离血清,置于 4 ℃ 冰箱,用于血清中与自由基有关酶(GSH - PX、SOD、CAT、)活力及 GSH 含量、MDA 含量的测定。之后捕杀,摘取胸腺、脾脏、法氏囊,用于计算免疫器官指数。

1.5.3 主要检测指标及检测方法

1.5.3.1 血清酶测定 按试剂盒说明书方法进行,用紫外分光光度计进行测定。

1.5.3.2 T 淋巴细胞转化率测定 RPMI 1640 培养液,用前调至含胎牛血清 10%、青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 IU/mL,用 NaHCO₃ 调 pH 值至 7.2 ~ 7.4;PHA 用 RPMI 1640 基础培养液配成 1 mg/mL。取无菌肝素抗凝血 0.1 mL,加入 1.8 mL RPMI 1640 培养液中,同时加入 PHA 0.1 mL,将细胞置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 3 d,每天摇动 1 次。2 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,留 0.2 mL 沉淀细胞制片,迅速吹干。姬姆萨染色 10 ~ 20 min,水洗,干燥,油镜观察。顺序计数 200 个淋巴细胞,分别记录转化和未转化的淋巴细胞数,并计算淋巴细胞转化率:淋巴细胞转化率 = 转化的淋巴细胞数/200 个淋巴细胞 × 100%。

1.5.3.3 免疫器官指数测定 各组鹅分别于 7、14、21、28、35、42 d 扑杀,摘取法氏囊、脾脏、胸腺,并称其质量。免疫器

官指数 = 免疫器官鲜质量(g)/鹅宰前空腹质量。

1.6 数据处理

试验数据均以“平均值 ± 标准差”表示,采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 硒中毒对雏鹅血清酶的影响

由表 2 可知,试验组(Ⅱ和Ⅲ组)GSH - PX 活性与对照组(Ⅰ组)相比均减少,且于试验 21 d 时呈显著差异($P < 0.05$),28、35、42 d 时呈极显著差异($P < 0.01$),而试验组Ⅱ组和Ⅲ组之间,除 42 d 时差异显著外,其余均不显著($P > 0.05$);试验组(Ⅱ和Ⅲ组)SOD 活性与对照组相比均减少,且于试验 21、28 d 时呈显著差异($P < 0.05$),35、42 d 时呈极显著差异($P < 0.01$),试验组Ⅱ组和Ⅲ组之间,35、42 d 时差异极显著,其余均不显著($P > 0.05$);试验组(Ⅱ和Ⅲ组)GSH 值与对照组相比均减少,且于试验 21 d 时呈显著差异($P < 0.05$),28、35、42 d 时呈极显著差异($P < 0.01$),而试验组Ⅱ组和Ⅲ组之间,42 d 时差异极显著,其余均不显著($P > 0.05$);试验组(Ⅱ和Ⅲ组)CAT 值与对照组相比均减少,且于试验 28 d 时呈显著差异($P < 0.05$),35、42 d 时呈极显著差异($P < 0.01$),而试验组Ⅱ组和Ⅲ组之间,差异均不显著($P > 0.05$);试验组(Ⅱ和Ⅲ组)MDA 含量与对照组相比均增加,且于试验 7、14 d 时呈显著差异($P < 0.05$),21、28、35、42 d 时呈极显著差异($P < 0.01$),而试验组Ⅱ组和Ⅲ组之间,差异均不显著($P > 0.05$)。

表 2 硒中毒对雏鹅血清相关酶的影响

血清酶	组别	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
GSH - PX (U/mL)	Ⅰ	142.5 ± 12.1	140.4 ± 12.3	137.7 ± 11.5a	138.9 ± 12.3A	136.9 ± 11.8A	135.9 ± 12.6A
	Ⅱ	139.2 ± 11.5	134.8 ± 11.2	121.5 ± 10.2b	109.7 ± 8.8B	93.6 ± 7.9B	78.8 ± 7.4Ba
	Ⅲ	137.9 ± 11.7	132.5 ± 11.0	115.8 ± 10.5b	102.9 ± 9.4B	88.8 ± 7.5B	69.3 ± 7.5Bb
SOD (U/mL)	Ⅰ	181.4 ± 16.5	178.2 ± 15.6	178.9 ± 16.1a	176.1 ± 15.3a	174.5 ± 15.7A	173.4 ± 15.3A
	Ⅱ	182.1 ± 16.2	170.7 ± 14.8	156.3 ± 14.2b	143.3 ± 13.5b	126.7 ± 12.3B	101.8 ± 10.4B
	Ⅲ	180.7 ± 15.1	168.5 ± 14.3	152.9 ± 14.5b	141.4 ± 12.7b	120.5 ± 11.9C	89.8 ± 8.2C
GSH (mg/L)	Ⅰ	310.3 ± 26.5	312.5 ± 27.1	311.7 ± 26.8a	314.3 ± 27.6A	313.1 ± 25.8A	309.6 ± 25.8A
	Ⅱ	98.5 ± 25.3	292.7 ± 24.6	286.3 ± 24.7b	268.9 ± 22.6B	242.3 ± 20.6B	228.3 ± 19.5B
	Ⅲ	94.8 ± 25.7	288.3 ± 24.5	280.5 ± 23.9b	255.3 ± 22.1B	231.8 ± 20.2B	209.4 ± 18.8C
CAT (U/mL)	Ⅰ	9.42 ± 0.72	9.07 ± 0.66	9.02 ± 0.61	8.88 ± 0.59a	8.83 ± 0.52A	8.72 ± 0.55A
	Ⅱ	9.50 ± 0.74	8.92 ± 0.66	8.51 ± 0.62	7.93 ± 0.53b	7.25 ± 0.55B	6.12 ± 0.43B
	Ⅲ	9.56 ± 0.70	8.84 ± 0.63	8.31 ± 0.67	7.77 ± 0.58b	6.82 ± 0.51B	5.72 ± 0.46B
MDA (μmol/mL)	Ⅰ	5.76 ± 0.44a	5.98 ± 0.51a	6.03 ± 0.55A	6.08 ± 0.57A	6.26 ± 0.34A	6.33 ± 0.41A
	Ⅱ	7.08 ± 0.48b	7.58 ± 0.55b	8.50 ± 0.52B	9.26 ± 0.62B	9.39 ± 0.68B	9.62 ± 0.82B
	Ⅲ	7.27 ± 0.52b	7.78 ± 0.59b	8.90 ± 0.57B	9.44 ± 0.65B	9.89 ± 0.72B	9.93 ± 0.87B

注:同一列同一项目中,不同大小写字母分别表示差异极显著($P < 0.01$)和差异显著($P < 0.05$)。

2.2 硒中毒对雏鹅 T 淋巴细胞转化率的影响

试验组(Ⅱ和Ⅲ组)各日龄雏鹅淋巴细胞转化率与对照组相比,均呈下降趋势。其中,14 d 时,试验组(Ⅱ和Ⅲ组)雏鹅淋巴细胞转化率与对照组相比差异均显著($P < 0.05$);21、28、35、42 d 时日龄时,试验组与对照组相比,差异均极显著($P < 0.01$),而试验组Ⅱ组与Ⅲ组之间,除 28 d 时差异显著外,其余均不显著($P > 0.05$)(表 3)。

2.3 硒中毒对雏鹅免疫器官指数的影响

从表 4 可以看出,试验组(Ⅱ组、Ⅲ组)雏鹅法氏囊、脾脏和胸腺的器官指数较对照组均有不同程度的下降。其中,法

氏囊器官指数,21 d 和 42 d 时,2 个试验组与对照组相比,差异均显著($P < 0.05$),28 d 和 35 d 时,试验组与对照组相比,差异均极显著($P < 0.01$),而试验Ⅱ组与Ⅲ组之间,28 d 时差异极显著($P < 0.01$),42 d 时差异显著($P < 0.05$),其余均不显著($P > 0.05$);脾脏器官指数,21 d 时,2 个试验组与对照组相比均呈显著差异($P < 0.05$),28、35、42 d 时,试验组与对照组相比,差异极显著($P < 0.01$),而试验Ⅱ组与Ⅲ组之间,除 42 d 时,差异显著($P < 0.05$)外,其余均不显著;胸腺器官指数,14、21、28 d 时,2 个试验组与对照组相比,差异均显著($P < 0.05$),35 d 和 42 d 时,试验组与对照组相比,差异均极

表 3 硒中毒对雏鹅 T 淋巴细胞转化率的影响

组别	淋巴细胞转化率(%)					
	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
I	26.55 ± 2.85	28.32 ± 3.08a	31.28 ± 3.14A	31.24 ± 3.26A	33.55 ± 3.35A	31.24 ± 3.33A
II	23.46 ± 2.57	21.53 ± 2.26b	18.54 ± 2.01B	16.72 ± 1.83aB	15.28 ± 1.64B	13.36 ± 1.55B
III	23.22 ± 2.36	20.32 ± 2.17b	16.16 ± 1.97B	12.37 ± 1.12bB	13.40 ± 1.52B	11.78 ± 1.47B

注:同一列中,不同大小写字母分别表示差异极显著($P<0.01$)和差异显著($P<0.05$)。

表 4 硒中毒对雏鹅免疫器官指数的影响

免疫器官	组别	免疫器官指数					
		7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d
法氏囊	I	4.82 ± 0.36	5.67 ± 0.41	5.72 ± 0.53a	6.59 ± 0.56A	5.73 ± 0.57A	4.84 ± 0.42a
	II	4.75 ± 0.35	5.52 ± 0.42	4.53 ± 0.35b	4.25 ± 0.31B	3.37 ± 0.26B	3.25 ± 0.22b
	III	4.76 ± 0.34	5.02 ± 0.41	3.96 ± 0.32b	3.32 ± 0.28C	2.87 ± 0.21B	2.13 ± 0.18c
脾脏	I	0.92 ± 0.08	1.26 ± 0.12	2.33 ± 0.18a	3.84 ± 0.27A	5.48 ± 0.36A	5.20 ± 0.34A
	II	0.88 ± 0.08	1.14 ± 0.09	1.75 ± 0.15b	2.21 ± 0.25B	2.56 ± 0.28B	3.37 ± 0.31aB
	III	0.91 ± 0.08	1.15 ± 0.09	1.53 ± 0.12b	1.88 ± 0.16B	2.45 ± 0.22B	2.27 ± 0.21bB
胸腺	I	7.52 ± 0.63	7.73 ± 0.66a	7.61 ± 0.62a	7.27 ± 0.58A	8.19 ± 0.77A	7.55 ± 0.64A
	II	7.25 ± 0.64	6.36 ± 0.58b	5.62 ± 0.49b	4.74 ± 0.42aB	4.28 ± 0.38aB	3.45 ± 0.32B
	III	7.15 ± 0.62	5.82 ± 0.52b	5.17 ± 0.46b	3.86 ± 0.33bB	3.14 ± 0.31bB	2.86 ± 0.25B

注:同一列同一项目中,不同大小写字母分别表示差异极显著($P<0.01$)和差异显著($P<0.05$)。

显著($P<0.01$),而试验 II 组与 III 组之间,28、35 d 时差异显著($P<0.01$),其余均不显著($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 硒中毒对雏鹅血清与自由基有关酶的影响

自由基是机体进行生命活动时所产生的一种活性分子。当机体处于疾病状态时,都会引起自由基产生过量,而体内过多的自由基可引起蛋白质、核酸(DNA)变性,导致细胞和组织器官损伤,诱发各种疾病。

SOD 是广泛存在于需氧生物体内的一种金属酶,对机体的氧化与抗氧化起重要作用,能催化超氧阴离子(O_2^-)产生歧化反应,清除超氧阴离子(O_2^-)保护细胞免受损伤,SOD 活力的测定可间接反应机体清除自由基的能力。GSH-PX 是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶,是 H_2O_2 和 ROOH 的主要清除剂。它能特异地催化还原型谷胱甘肽(GSH)对过氧化氢的还原反应,可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。CAT 是一种酶类清除剂,又称为触酶,是以铁卟啉为辅基的结合酶。它可促使 H_2O_2 分解为分子氧和水,清除体内的过氧化氢,从而使细胞免于遭受 H_2O_2 的毒害,是生物防御体系的关键酶之一。MDA 是一种脂质过氧化物,是由生物体内自由基攻击生物膜产生的不饱和脂肪酸(PUFA)引起脂质过氧化作用而形成的,这种产物还可通过生物体内有机物反应的链式或链式支链放大活性氧的破坏作用,引起细胞代谢与功能障碍,甚至死亡。因此,测定机体中的 MDA 含量可反映机体内脂质过氧化程度,间接反映细胞受损伤的程度^[7]。本研究中硒中毒试验组雏鹅的 GSH-PX、SOD、CAT 等与自由基清除有关的酶的含量或活力与对照组相比均减少或降低,而 MDA 含量则增多,这与贺建忠等^[3]报道的猪硒中毒时体内自由基的变化和刘明生等^[7]报道的肉鸡硒中毒时体内自由基的变化结果一致。

4.2 硒中毒对雏鹅 T 淋巴细胞转化率的影响

T 淋巴细胞表面有多种受体,在体外培养中加入特异性

抗原或非特异性促有丝分裂原的刺激下,细胞代谢和形态可发生一系列变化,如能转化成体积较大的原淋巴细胞。转化细胞数量可反映机体细胞免疫功能,测定 T 淋巴细胞的应答能力,诊断细胞免疫缺陷性疾病。淋巴细胞转化率的高低常作为衡量机体免疫水平的指标。本试验硒中毒试验组中雏鹅的淋巴细胞转化率均降低,影响了机体的免疫功能。

4.3 硒中毒对雏鹅免疫器官指数的影响

免疫器官是动物执行免疫功能的组织机构,它们的发育状况直接影响到机体免疫力的高低。脏器指数又称脏体比,是动物某脏器的质量与其体质量之比值。正常时各脏器与体质量的比值比较恒定。脏器指数增大,表示脏器充血、水肿或增生肥大等;脏器指数减小,表示脏器萎缩及其他退行性改变。因此免疫器官脏器系数可作为评价禽类免疫状况的良好指标。本试验结果显示,硒中毒时,各免疫器官的脏器指数随试验期的延长明显减小,且与对照组相比,差异显著或极显著。关于硒中毒时免疫器官的组织及形态学的变化将有待于进一步研究。

参考文献:

[1]刘宗平. 现代动物营养代谢病学[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
[2]甘辉群,刘明生,吴敏秋,等. 雏鸡硒中毒的诊治[J]. 中国家禽, 2008,30(4):42.
[3]贺建忠,郭定宗,杨世锦,等. 硒中毒对猪血清自由基的影响[J]. 中国兽医学报,2009,29(12):1629-1631.
[4]任玉红,唐朝忠. 雏鸡实验性硒中毒的病理组织学研究[J]. 中国家禽,2006,28(1):19.
[5]刘田生,霍欣,刘鑫. 雏鸡实验性硒中毒临床及病理观察[J]. 中国家禽,2006,28(1):19.
[6]张守发,何希君,黄在植,等. 雏鸡硒中毒的临床及病理形态学观察[J]. 中国兽医科技,1997,27(1):27-28.
[7]刘明生,甘辉群,谭菊,等. 不同硒源对肉鸡血清中与自由基有关酶活力的影响研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2007(4):50-51.