

# 高铜对雏鸡淋巴细胞凋亡影响的研究

崔恒敏<sup>1,2</sup>,徐之勇<sup>1</sup>,彭西<sup>1</sup>,朱奎成<sup>1</sup>,邓俊良<sup>1</sup>

(1. 四川农业大学动物科技学院,雅安 625014;2. 四川农业大学都江堰分校,都江堰 611830)

**摘要:** 1日龄艾维茵肉鸡健雏420只,随机分为7组,分别喂以对照日粮(Cu 11 mg/kg)和高铜日粮(Cu 100 mg/kg,高铜I组;Cu 200 mg/kg,高铜II组;Cu 300 mg/kg,高铜III组;Cu 400 mg/kg,高铜IV组;Cu 500 mg/kg,高铜V组;Cu 600 mg/kg,高铜VI组)6周,以流式细胞术和透射电镜的方法观察研究了高铜对雏鸡免疫器官淋巴细胞凋亡的影响。电镜下观察,与对照组比较,高铜IV、V和VI组免疫器官淋巴细胞发生凋亡的频率明显增高。发生凋亡的淋巴细胞表现为染色质凝聚、边集,细胞核呈新月形、“C”形、花环状(或圆斑状)及花瓣状。流式细胞术测定显示,高铜IV、V和VI组免疫器官淋巴细胞凋亡百分率也明显高于对照组和高铜I、II、III组。上述研究结果表明,饲料铜含量超过300 mg/kg可以诱导淋巴细胞凋亡。

**关键词:** 高铜;淋巴细胞凋亡;超微结构;流式细胞术;雏鸡

中图分类号:S852.3

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2007)06-0601-07

## The Effect of High Copper on Lymphocyte Apoptosis of Lymphoid Organs in Chickens

CUI Heng-min<sup>1,2</sup>, XU Zhi-yong<sup>1</sup>, PENG Xi<sup>1</sup>, ZHU Kui-cheng<sup>1</sup>, DENG Jun-liang<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China; 2. Dujiangyan Campus, Sichuan Agricultural University, Dujiangyan 611830, China)

**Abstract:** The experiment was conducted with the objectives of examining the effect of dietary high copper on lymphocyte apoptosis of the lymphoid organs in the chicken by the methods of ultrastructural pathology and Flow Cytometry (FCM). 420 one-day-old Avian chickens were randomly divided into seven groups, and fed on diets as follows: control (Cu 11 mg/kg), and high copper (Cu 100 mg/kg, high copper group I; Cu 200 mg/kg, high copper group II; Cu 300 mg/kg, high copper group III; Cu 400 mg/kg, high copper group IV; Cu 500 mg/kg, high copper group V; Cu 600 mg/kg, high copper group VI) for six weeks. Ultrastructurally, the frequency of lymphocyte apoptosis was higher in high copper groups IV, V and VI than in control group and high copper groups I, II, III. The mitochondria of lymphocytes of lymphoid organs were swelled, and its crista were broken or/and disappeared. The apoptotic lymphocytes showed that the chromatin become condensed and marginated, and the shape of nuclei were crescent, C-shaped, dark round and petal-like. Also, the statistical analyses by FCM indicated that the percentage of apoptotic cells of the lymphoid organs was higher in high copper groups IV, V and VI than in control group and high copper groups I, II, III. The aforementioned results demonstrated that dietary copper in excess of 300 mg/kg diet could induce apoptosis in lymphocytes of lymphoid organs.

收稿日期:2006-06-01

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471304);四川省教育厅重点项目(2002A002);科技厅重点项目(03JY029-030-2)

作者简介:崔恒敏(1958-),男,陕西岐山人,博士,教授,博士生导师,主要从事禽病免疫病理学研究,E-mail:cui580420@sicau.edu.cn

**Key words:** dietary high copper; lymphocyte apoptosis; ultrastructural pathology; flow cytometry; chicken

铜是动物生长发育必需的微量元素之一,广泛分布于动物体内肝脏、肾脏、血液、骨骼和毛发等多种组织和器官,通过构成细胞色素氧化酶、铜-锌-超氧化物歧化酶、铜蓝蛋白等多种酶而发挥其生理生化作用<sup>[1~4]</sup>。自1945年Braude首次报道在生长猪饲料中添加250 mg/kg铜可明显提高猪的生长性能后<sup>[5]</sup>,日粮高铜的促生长作用一直是研究的热点。但在畜牧业生产中,盲目过量添加铜导致动物中毒时有发生,并对铜中毒剂量、临床表现、病理变化以及某些生化指标等内容进行了观察<sup>[6~10]</sup>。目前,国内外尚未见有不同梯度剂量的铜对雏鸡淋巴细胞凋亡影响的研究。本试验通过设立不同梯度剂量的高铜日粮,旨在研究高铜对肉鸡淋巴细胞凋亡的影响,为探讨铜中毒导致免疫功能受损的机理提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物与日粮

试验选用1日龄艾维茵健雏420只,随机分为7组,每组60只(其中20只用于全程观察),分别采食基础日粮和6种不同的高铜日粮。7组雏鸡分别饲养于木制试验禽笼内,饲养管理与常规育雏一致,自由饮水和采食。试验期6周。

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(铜除外)添加量均参照肉鸡NRC(1994)的营养标准,即CP 20.12%、ME(Mcal/kg) 3.016 9、Ca 0.879 6%、P 0.621 5%、Cu 11 mg/kg。基础日粮作为对照组日粮,在基础日粮中分别添加一定量铜构成高铜组日粮:Ⅰ组(Cu 100 mg/kg)、Ⅱ组(Cu 200 mg/kg)、Ⅲ组(Cu 300 mg/kg)、Ⅳ组(Cu 400 mg/kg)、Ⅴ组(Cu 500 mg/kg)、Ⅵ组(Cu 600 mg/kg)。铜源为CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O晶体。

### 1.2 透射电镜观察

试验结束时,每组随机抽取3只剖杀后立即取胸腺、脾脏和法氏囊1~2块,2.5%戊二醛固定,环氧树脂包埋,超薄切片,锇酸染色,在透射电镜下观察淋巴细胞凋亡情况。

### 1.3 免疫器官淋巴细胞凋亡的检测

试验的14、28、42 d 每组随机抽取5只剖杀后

立即取0.3 cm<sup>3</sup>的胸腺、脾脏和腔上囊组织块,制成细胞匀浆,用流式细胞术检测。方法:(1)细胞匀浆100目筛过滤,调整细胞浓度为1×10<sup>6</sup>/mL;(2)取1 mL细胞悬液,离心(1 200 r/min, 5 min)弃上清液后,加入1 mL染液(PI染液:5 μL/mL碘化丙啶,0.5% Tritonx-100, RNA酶)室温下染色20 min左右后,PBS离心洗涤1次;(3)加1 mL PBS重悬细胞,流式细胞测试仪检测,计算机分析后打印出检测结果。

### 1.4 数据统计与分析

所有数据均经SPSS11.0统计软件统计。各组数据均以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,并用 $t$ 检验分析试验组和对照组数据间差异的显著性。

## 2 结果

### 2.1 临床观察

试验第1、2周,高铜Ⅴ、Ⅵ组雏鸡采食量稍低于对照组,其余各组无变化。试验第3周,高铜Ⅵ组雏鸡生长发育落后于其他组,至第6周时,雏鸡缩头,羽毛粗乱,翅膀下垂,肛门周围染有污垢粪便,患鸡排淡红色或墨绿色粪便,严重者两肢麻痹,卧地不起或跛行,最后消瘦、衰竭而死,20只全程观察雏鸡中死亡2只,死亡率为10%。高铜Ⅴ组雏鸡精神萎靡,食欲轻度下降,生长发育受阻。其余各组临床症状不明显。体重变化详见表1。

### 2.2 淋巴细胞凋亡的形态学变化

与对照组比较(图1),高铜Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组未见明显的超微结构变化;高铜Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ组出现不同程度的超微结构改变,病变频率、程度与剂量和日龄增长呈正比。

2.2.1 法氏囊 淋巴细胞超微结构变化:线粒体显著肿胀,嵴断裂甚至溶解消失而呈空泡状(图2)。胞核变化表现为染色质凝聚成大小不等的团块堆积于核膜下或/和散在分布,电子密度升高;或沿核膜分布呈花环状、半圆形、新月形等,核仁消失,核中央电子密度降低,甚至核膜破裂(图3);细胞核中部凹陷而呈哑铃形(图4)。

淋巴细胞凋亡的形态学表现有4种形式:①核染色质凝聚呈新月形两侧对称贴附于核膜下,中央电子密度较低;②核染色质凝聚呈“C”形或半圆形

表 1 试验雏鸡体重变化情况

Table 1 The body weight of experimental chickens

g

组别 Groups	1 周 1 week	2 周 2 weeks	3 周 3 weeks	4 周 4 weeks	5 周 5 weeks	6 周 6 weeks
对照组	116.50±	287.80±	446.00±	648.20±	1 230.30±	1 677.80±
Control group	3.375 <sup>ABa</sup>	19.217 <sup>Aab</sup>	62.883 <sup>Aa</sup>	76.621 <sup>Aa</sup>	80.813 <sup>Cc</sup>	103.255 <sup>Bc</sup>
高铜 I 组	120.00±	304.90±	584.90±	968.70±	1 291.20±	1 977.50±
High Cu group I	3.464 <sup>ABab</sup>	21.377 <sup>ABb</sup>	44.908 <sup>CDcd</sup>	96.763 <sup>Ccd</sup>	75.903 <sup>CDc</sup>	116.259 <sup>Cd</sup>
高铜 II 组	128.90±	340.50±	625.70±	1 110.70±	1 438.30±	1 963.40±
High Cu group II	5.859 <sup>CDc</sup>	28.049 <sup>Cc</sup>	47.537 <sup>Dd</sup>	60.185 <sup>De</sup>	16.808 <sup>Ed</sup>	84.892 <sup>Cd</sup>
高铜 III 组	136.50±	338.80±	600.30±	1 028.40±	1 416.40±	1 759.00±
High Cu group III	3.808 <sup>Dd</sup>	20.264 <sup>Cc</sup>	28.00 <sup>CDcd</sup>	99.147 <sup>CDd</sup>	129.205 <sup>DEd</sup>	192.841 <sup>Bc</sup>
高铜 IV 组	124.70±	325.20±	563.00±	938.70±	1 218.80±	1 772.00±
High Cu group IV	10.100 <sup>BCbc</sup>	17.441 <sup>BCc</sup>	31.020 <sup>BCc</sup>	31.899 <sup>Cc</sup>	94.737 <sup>Cc</sup>	67.872 <sup>Bc</sup>
高铜 V 组	119.20±	293.60±	516.00±	832.10±	1 065.60±	1 495.00±
High Cu group V	6.630 <sup>ABab</sup>	20.278 <sup>Aab</sup>	39.285 <sup>Bb</sup>	61.224 <sup>Bb</sup>	143.702 <sup>Bb</sup>	194.12 <sup>Ab</sup>
高铜 VI 组	115.20±	283.40±	434.10±	624.20±	920.30±	1 322.30±
High Cu group VI	9.378 <sup>Aa</sup>	10.814 <sup>Aa</sup>	58.616 <sup>Aa</sup>	73.073 <sup>Aa</sup>	65.708 <sup>Aa</sup>	220.602 <sup>Aa</sup>

相同字母者差异不显著( $P>0.05$ );小写字母间差异显著( $P<0.05$ );大写字母及大、小写字母间差异极显著( $P<0.01$ ),下表同

Values within a column followed by capital letters or small and capital letters were significantly different ( $P<0.01$ ) between two groups; Values within a column followed by same small letters were different ( $P<0.05$ ) between two groups; Values within a column followed by same letters were not different ( $P>0.05$ ), The same as below

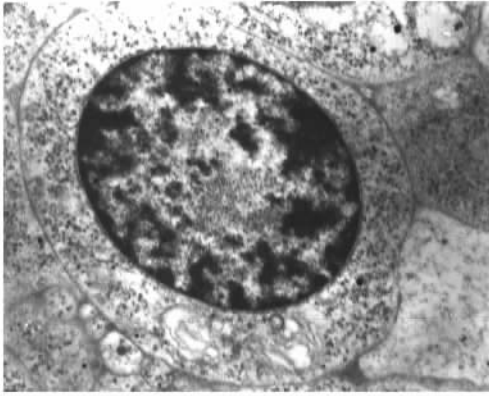


图 1 对照组雏鸡法氏囊淋巴细胞 ×8 000

Fig. 1 The lymphocytes in bursa of Fabricius of control group ×8 000

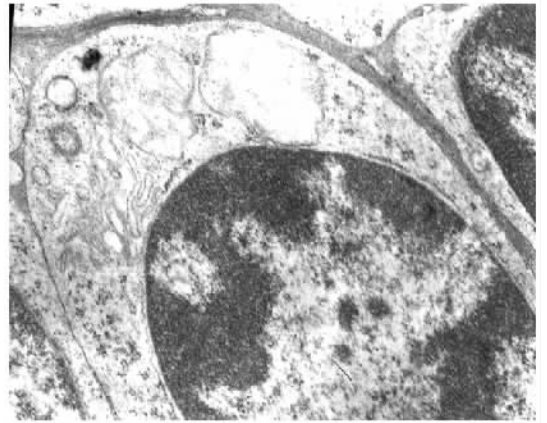


图 2 高铜 IV 组雏鸡法氏囊淋巴细胞,线粒体显著肿胀,嵴断裂消失 ×8 000

Fig. 2 The lymphocytes in bursa of Fabricius of high copper group IV. The mitochondria are swelled, and its crista are broken and disappeared ×8 000

贴附于核膜下(图 5),而核中央电子密度较低;③核缩小,染色质完全凝聚形成电子密度高的致密圆斑(图 6),或半圆形致密斑,分布于核的一侧(图 7),同时胞体缩小;④核染色质凝聚呈花环状贴附于核膜下(图 7),核中央电子密度较低。

2.2.2 胸腺 淋巴细胞超微结构变化:线粒体肿胀,嵴断裂或局部溶解消失,结构模糊;核染色质凝聚,沿核膜分布或呈大小不等的高密度团块,核膜结

构模糊或破裂。

淋巴细胞凋亡的形态学变化表现:一是核染色质凝聚呈新月形两侧对称贴附于核膜下(图 8),核中央电子密度较低;二是核染色质凝聚呈花环状贴附于核膜下(图 9),核中央电子密度较低,或染色质

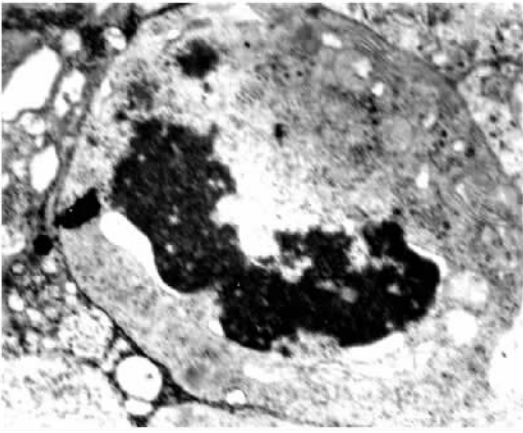


图 3 高铜 V 组雏鸡法氏囊淋巴细胞,核染色质凝聚,核膜消失  $\times 10\ 000$

Fig. 3 The lymphocytes in bursa of Fabricius of high copper group V. The chromatin is condensed, the nuclear membrane is broken and disappeared  $\times 10\ 000$

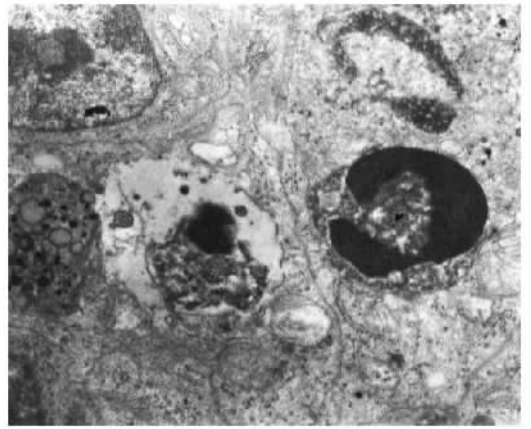


图 5 高铜 VI 组雏鸡法氏囊凋亡淋巴细胞,核染色质凝聚呈“C”形质块  $\times 5\ 000$

Fig. 5 The lymphocytes in bursa of Fabricius of high copper group VI. The condensed chromatin and the “C”-shaped nucleus are seen in apoptotic lymphocyte  $\times 5\ 000$



图 4 高铜 VI 组雏鸡法氏囊淋巴细胞,核变形呈“哑铃”形  $\times 8\ 000$

Fig. 4 The lymphocytes in bursa of Fabricius of high copper group VI. The nucleus shrinks and appears dumbbell-like  $\times 8\ 000$

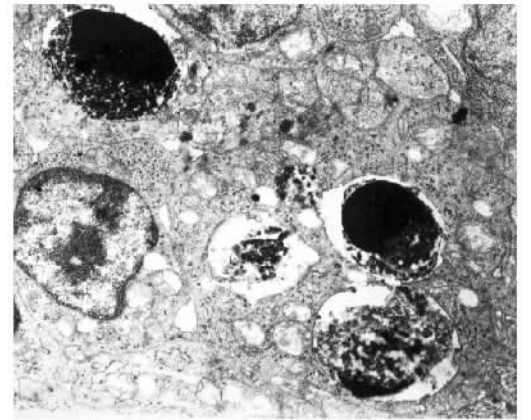


图 6 高铜 VI 组雏鸡法氏囊凋亡淋巴细胞,核染色质凝聚呈致密圆斑状  $\times 5\ 000$

Fig. 6 The apoptotic lymphocyte in bursa of Fabricius of high copper group VI. The chromatin is condensed and the nuclei appear dark round  $\times 5\ 000$

凝聚形成电子密度高的团块或/和致密圆斑(图 9)。

2.2.3 脾脏 淋巴细胞超微结构变化与胸腺淋巴细胞的变化相同。

淋巴细胞凋亡的形态学变化:一是核染色质凝聚呈半圆形或新月形贴附于核膜下,核的其余部分电子密度较低;二是核染色质凝聚,呈花瓣状贴附于核膜下(图 10),核中央电子密度极低。

### 2.3 免疫器官淋巴细胞凋亡百分率

2.3.1 脾脏 高铜 I、II、III 组淋巴细胞凋亡百分率与对照组比较差异不显著( $P > 0.05$ )。高铜 IV、

V、VI 组淋巴细胞凋亡百分率不同程度地高于对照组,其中高铜 IV、V 组在 2、4 周龄时与对照组比较差异不显著( $P > 0.05$ ),6 周龄时 IV 组差异显著( $P < 0.05$ ),高铜 V 组差异极显著( $P < 0.01$ );高铜 VI 组在 2 周龄时与对照组比较差异不显著( $P > 0.05$ ),4 周龄时差异显著( $P < 0.05$ ),6 周龄时差异极显著( $P < 0.01$ )。详见表 2。

2.3.2 胸腺 高铜 I、II、III 组淋巴细胞凋亡百分率与对照组比较差异不显著( $P > 0.05$ )。高铜 IV、

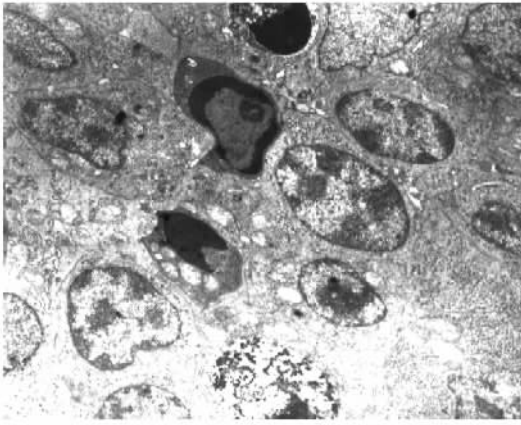


图 7 高铜Ⅵ组雏鸡法氏囊,示多个凋亡的淋巴细胞 ×5 000

Fig. 7 The bursa of Fabricius of high copper group Ⅵ. There are three apoptotic lymphocytes ×5 000

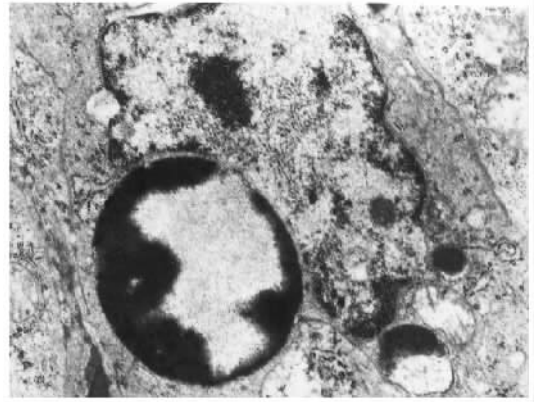


图 10 高铜Ⅵ组雏鸡脾脏凋亡淋巴细胞,核染色质凝聚呈花瓣状 ×8 000

Fig. 10 The apoptotic lymphocytes in spleen of high copper group Ⅵ. The chromatin is condensed and the nucleus appears petal-like ×8 000

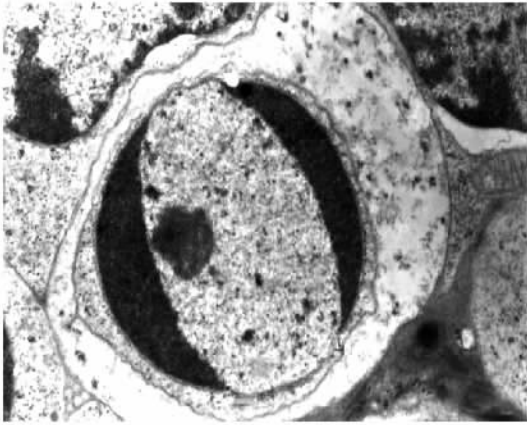


图 8 高铜Ⅵ组雏鸡胸腺凋亡淋巴细胞,核染色质凝聚呈“新月”形 ×8 000

Fig. 8 The apoptotic lymphocytes in thymus of high copper group Ⅵ. The chromatin condenses and the nucleus appears crescent ×8 000

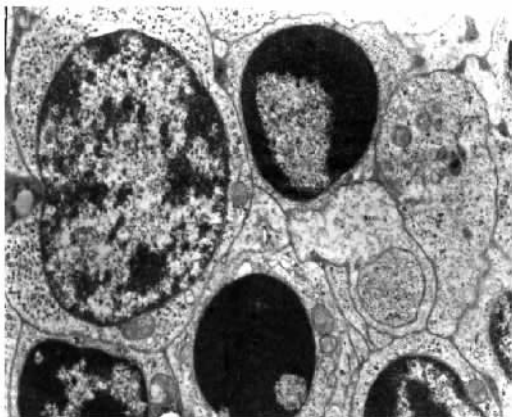


图 9 高铜Ⅵ组雏鸡胸腺凋亡淋巴细胞,示多个凋亡的淋巴细胞 ×8 000

Fig. 9 Thymus of high copper group Ⅵ. There are two apoptotic lymphocytes ×8 000

V、Ⅵ组淋巴细胞凋亡百分率不同程度地高于对照组,其中高铜Ⅳ、Ⅴ组在2周龄时与对照组比较差异不显著( $P>0.05$ ),4周龄时差异显著( $P<0.01$ ),6周龄时Ⅳ组差异显著( $P<0.01$ ),高铜Ⅴ组差异极显著( $P<0.01$ );高铜Ⅵ组除2周龄时与对照组比较差异显著( $P<0.05$ )外,4、6周龄差异极显著( $P<0.01$ )。详见表3。

2.3.3 法氏囊 高铜Ⅰ、Ⅱ组淋巴细胞凋亡百分率与对照组比较差异不显著( $P>0.05$ )。高铜Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ组淋巴细胞凋亡百分率不同程度地高于对照组,其中高铜Ⅲ、Ⅳ组与对照组比较,2、4周龄时差异不显著( $P>0.05$ ),6周龄时Ⅲ组差异显著( $P<0.05$ ),Ⅳ组差异极显著( $P<0.01$ );高铜Ⅴ组2周龄时不显著( $P>0.05$ ),4周龄时差异显著( $P<0.05$ ),6周龄时差异极显著( $P<0.01$ );高铜Ⅵ组2周龄时差异显著( $P<0.05$ ),4、6周龄时差异极显著( $P<0.01$ )。详见表4。

### 3 讨论

凋亡(Apoptosis)是活体单个细胞或小团细胞的死亡,其发生与胚胎发展、个体形成、器官的细胞平衡稳定等有密切关系,清除发育不正常的细胞、衰老的细胞以及有害的细胞,以防止疾病的发生。细胞遵循自身基因调控的程序,为维持内环境稳定,自己结束其生命,裂解为若干凋亡小体(Apoptotic body),进而被周围组织细胞吞噬。因此细胞凋亡是一种细胞程序性死亡(Programmed cell death,

表2 脾脏淋巴细胞凋亡百分率

Table 2 Percentage of apoptotic lymphocytes in the spleen

%

组别 Groups	2周 2 weeks	4周 4 weeks	6周 6 weeks
对照组 Control group	0.63±0.24 <sup>A</sup>	1.02±0.20 <sup>A</sup>	1.89±0.41 <sup>A</sup>
高铜 I 组 High Cu group I	0.70±0.21 <sup>A</sup>	1.09±0.16 <sup>A</sup>	1.98±0.41 <sup>A</sup>
高铜 II 组 High Cu group II	0.78±0.18 <sup>A</sup>	1.27±0.27 <sup>Aa</sup>	2.02±0.50 <sup>Aa</sup>
高铜 III 组 High Cu group III	0.93±0.12 <sup>A</sup>	1.46±0.47 <sup>Aa</sup>	2.32±0.33 <sup>Aa</sup>
高铜 IV 组 High Cu group IV	1.03±0.15 <sup>A</sup>	1.55±0.55 <sup>Aa</sup>	2.73±0.30 <sup>ab</sup>
高铜 V 组 High Cu group V	1.09±0.34 <sup>A</sup>	1.70±0.61 <sup>Aa</sup>	3.67±0.61 <sup>BC</sup>
高铜 VI 组 High Cu group VI	1.16±0.62 <sup>A</sup>	1.93±0.49 <sup>a</sup>	4.37±0.31 <sup>C</sup>

表3 胸腺淋巴细胞凋亡百分率

Table 3 Percentage of apoptotic lymphocytes in the thymus

%

组别 Groups	2周 2 weeks	4周 4 weeks	6周 6 weeks
对照组 Control group	0.57±0.27 <sup>A</sup>	0.98±0.31 <sup>A</sup>	1.88±0.31 <sup>A</sup>
高铜 I 组 High Cu group I	0.60±0.36 <sup>A</sup>	1.04±0.30 <sup>AB</sup>	1.99±0.91 <sup>Aa</sup>
高铜 II 组 High Cu group II	0.63±0.19 <sup>A</sup>	1.21±0.22 <sup>AB</sup>	2.27±0.27 <sup>Ac</sup>
高铜 III 组 High Cu group III	0.77±0.19 <sup>Aa</sup>	1.57±0.50 <sup>ABac</sup>	2.68±0.60 <sup>ACad</sup>
高铜 IV 组 High Cu group IV	0.87±0.31 <sup>Aa</sup>	1.93±0.45 <sup>BCa</sup>	3.01±0.10 <sup>CDa</sup>
高铜 V 组 High Cu group V	1.00±0.26 <sup>Aa</sup>	2.14±0.70 <sup>Ca</sup>	3.58±0.50 <sup>CD</sup>
高铜 VI 组 High Cu group VI	1.13±0.17 <sup>a</sup>	2.57±0.87 <sup>C</sup>	3.90±0.89 <sup>D</sup>

表4 法氏囊淋巴细胞凋亡百分率

Table 4 Percentage of apoptotic lymphocytes in the the bursa of Fabricius

%

组别 Groups	2周 2 weeks	4周 4 weeks	6周 6 weeks
对照组 Control group	1.40±0.40 <sup>A</sup>	2.14±0.11 <sup>A</sup>	2.40±0.20 <sup>A</sup>
高铜 I 组 High Cu group I	1.51±0.52 <sup>Aa</sup>	2.30±0.24 <sup>Aa</sup>	2.67±0.67 <sup>Ab</sup>
高铜 II 组 High Cu group II	1.58±0.43 <sup>Aa</sup>	2.40±0.41 <sup>Aa</sup>	2.85±0.41 <sup>ABac</sup>
高铜 III 组 High Cu group III	1.76±0.41 <sup>Aa</sup>	2.58±0.51 <sup>Aab</sup>	3.13±0.21 <sup>BCa</sup>
高铜 IV 组 High Cu group IV	1.81±0.80 <sup>Aa</sup>	2.71±0.70 <sup>Aab</sup>	3.43±0.44 <sup>BC</sup>
高铜 V 组 High Cu group V	2.09±0.09 <sup>Aa</sup>	2.83±0.20 <sup>Ba</sup>	3.70±0.35 <sup>Cd</sup>
高铜 VI 组 High Cu group VI	2.27±0.27 <sup>a</sup>	3.41±0.11 <sup>B</sup>	4.47±0.62 <sup>D</sup>

PCD)。它决定了生物体发育和组织平衡的一个重要机制,如果这个机制失衡,就会导致肿瘤、自身免疫病等一系列疾病<sup>[11]</sup>。许多物理(辐射、高温等)、化学和生物因素都可导致凋亡的增加<sup>[12]</sup>。因此,细胞凋亡近年来成为生命科学领域研究的热点。目前,仅见有雏鸭铜中毒(Cu 850、1 050 mg/kg)症免疫器官细胞凋亡的研究报道<sup>[13]</sup>,而高铜对雏鸡免疫器官淋巴细胞凋亡影响的研究国内外尚未见报道。本试验采用流式细胞术和超微病理学方法观察研究了高铜对雏鸡淋巴细胞凋亡的影响,结果表明饲料铜含量超过 300 mg/kg 可诱导淋巴细胞凋亡,研究结果不仅填补了这方面的空白,也为进一步探讨高铜对免疫功能的影响机理提供了理论依据。

关于细胞凋亡机理的探讨已有许多报道。铜在机体内主要通过调节氧化损伤机制来参与细胞凋亡过程,可能的方式如下:(1)通过铜锌超氧化物歧化酶(Zn-Cu-SOD)来消除 O<sub>2</sub><sup>-</sup>,避免细胞凋亡,反之则会诱导细胞凋亡,如多联苯(PCBs)可以抑制神经细胞 Zn-Cu-SOD 的功能从而导致细胞凋亡;(2)Cu<sup>2+</sup>可以氧化二硫化氨基甲酸盐(Dithiocarbamate)形成二硫化秋兰姆(Thiuram disulfide),后者可将谷胱甘肽还原生成亲代的二硫化氨基甲酸盐及氧化型的谷胱甘肽,导致机体的还原型储备耗竭,从而在不产生活性氧的情况下发生一系列的氧化还原作用并最终引起细胞凋亡;(3)产生活性氧,Cu<sup>2+</sup>复合物在抗坏血酸的催化下于常温即可生成羟基自由基(Hy-

choxy radical), 活性氧的积累也可导致线粒体膨大, 线粒体内膜非特异性孔道产生, 使一些启动细胞凋亡的物质流出到胞质中<sup>[14]</sup>。据 Zamzami 等报道<sup>[15]</sup>, 线粒体在淋巴细胞凋亡中起重要的作用, 而线粒体是细胞内自由基的主要来源之一, 自由基又是引起细胞凋亡的主要因素之一<sup>[14]</sup>。现已发现许多基因的表达与凋亡有关, 其中最主要的是凋亡抑制基因 *bcl-2*, 通过抑制细胞色素 C 自线粒体释放至胞质, 阻止细胞质细胞色素 C 对 Caspase-3 蛋白酶激活而实现<sup>[16]</sup>。*bcl-2* 的表达产物主要分布于线粒体内膜上<sup>[17]</sup>, 本试验电镜观察结果表明 300 mg/kg 以上的高铜日粮下雏鸡淋巴细胞线粒体受损明显(图 2 和图 3), 程度不同地影响了 *bcl-2* 的表达而诱导细胞凋亡。

#### 参考文献:

- [1] Bonham M, O'connor J M, Hannigan B M, *et al.* The immune system as a physiological indicator of marginal copper status[J]. *British Journal of Nutrition*, 2002, 87(3):393~403.
- [2] 柴春彦, 石发庆, 刘国艳, 等. 摇摆病奶牛体内铜状态及其与 NO 水平的关系[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2001, 7:1~3.
- [3] Stabel J R, Spears J W. Effect of copper on immune function and disease resistance[J]. *Advances Experimental Medicine and Biology*, 1989, 258(2):243~252.
- [4] Percival S S. Copper and immunity[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1998, 67(9):1 064s~1 068s.
- [5] Braude R. Some observation on the need for copper in the diet of fattening pigs [J]. *Journal of Agriculture Science*, 1945, 35:163~171.
- [6] Brewer N R. Comparative metabolism of copper[J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1987, 190(6):654~658.
- [7] Auza N J, Olson W G, Murphy M J, *et al.* Diagnosis and treatment of copper toxicosis in ruminants [J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1999, 214(11):1 624~1 628.
- [8] Pusilo G. 绵羊的铜中毒症[J]. *国外畜牧科技*, 2000, 27(1):48~49.
- [9] 刘成文, 张怀礼, 魏登山. 猪铜中毒的诊断[J]. *中国兽医杂志*, 2001, 37(3):53~54.
- [10] 王幼明, 王小龙. 高铜的应用对畜禽的慢性中毒作用及对环境生态的影响[J]. *中国兽医杂志*, 2001, 37(6):36~38.
- [11] 冯志博, 王 省. 细胞凋亡调控机制的研究进展[J]. *新乡医学院学报*, 1999, 16(1):89~91.
- [12] 李晓军, 武建国. 细胞凋亡检测的研究进展及其与疾病的关系[J]. *临床检验杂志*, 1999, 17(1):1~7.
- [13] 崔恒敏, 陈怀涛. 铜中毒对雏鸭免疫器官细胞凋亡影响的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(4):370~375.
- [14] 陆 怡, 潘华珍, 许彩民. 氧化与细胞凋亡 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1996, 23:118~121.
- [15] 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.
- [16] 明学志. 细胞凋亡调控及其进展[J]. *国外医学(肿瘤分册)*, 1998, 6:321~324.
- [17] 鱼咏涛, 贺福初. 细胞程序死亡与 *bcl-2* 基因[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1994, 6:495~497.