

喹乙醇对小鼠免疫器官及红细胞免疫功能的影响

尹荣焕 白文林 吴长德 潘对德 刘丽霞 张文亮 (沈阳农业大学畜牧兽医学院, 辽宁沈阳110161)

摘要 给小鼠灌喂不同剂量喹乙醇, 探讨喹乙醇对小鼠胸腺、脾脏及红细胞免疫功能的影响。结果表明: 随着喹乙醇剂量的增加 C3b 受体花环率逐渐减少 ($P > 0.05$), IC 花环率则升高 ($P > 0.05$), 推测大剂量喹乙醇可能会抑制机体的红细胞免疫功能; 小鼠的胸腺指数和脾脏指数随着喹乙醇剂量的增大均不同程度降低, 1/5LD₅₀ 组的胸腺指数降低显著 ($P < 0.05$), 说明大量使用喹乙醇可能会抑制胸腺的发育, 对脾脏的重量也有一定影响, 致使小鼠的免疫机能下降。

关键词 喹乙醇; 鼠; 免疫器官; 红细胞免疫

中图分类号 Q956 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)03-00717-02

喹乙醇 (Ciaquindoxl) 是一种化学合成抗菌促生长剂, 其化学结构为 2-[N(2-羟基乙基)-氨基甲酰]-3-甲基喹恶啉 1,4-二氧化物。从 20 世纪 70 年代开始, 欧洲经济共同体、澳大利亚、巴西、中国、日本、韩国等陆续批准将喹乙醇作为一种饲料添加剂使用。近年来, 随着动物饲喂过程中中毒事件的增多, 学者们对喹乙醇的毒性及残留重新作出系列研究与评价, 有人认为, 喹乙醇是一种基因毒剂和生殖腺诱变剂, 有致突变、致畸和致癌性, 畜产品中残留的喹乙醇可致染色体断裂, 而诱发机体细胞突变^[1]。美国食品与药物管理局 (FDA) 一直未批准使用喹乙醇, 欧盟在 1998 年底决定禁止使用喹乙醇。农业部在 1997 年 9 月发布的《允许作饲料药物添加剂使用的兽药品种及使用规定》中删除了喹乙醇可作为鸡饲料添加剂使用的规定, 即喹乙醇不能再用于鸡^[2]。2000 年版《中国兽药典》和农业部 2001 年 9 月制订的《饲料药物添加剂使用规范》中规定喹乙醇预混剂只能用于幼猪促生长, 禁止用于禽和体重超过 35 kg 的猪, 而且动物屠宰或上市前必须停药 35 d。同时喹乙醇已被广泛用于水产养殖业^[3]。现在, 关于喹乙醇的遗传毒性已被证实, 而关于喹乙醇对动物机体免疫系统的影响至今却鲜有报道。笔者研究了喹乙醇对动物免疫器官重量和红细胞免疫功能的影响。

1 材料与方 法

1.1 药品及试剂 喹乙醇 (纯度 98.5%, 批号 040217, 购自上海嘉辰化工有限公司), 羧甲基纤维素钠 (购自中国医药集团上海化学试剂公司, 批号 F20011128) 配成 2% 的羧甲基纤维素钠生理盐水溶液, 吉姆萨 (Gensa) 染液, 二甲苯, 酵母试剂, 豚鼠血清, Hank's 液, 2.5% 的戊二醛溶液, 肝素等。

1.2 试验动物及分组处理 选取健康昆明小鼠 72 只, 体重 20~30 g, 雌雄各半, 购自辽宁省中医学院。随机分成 6 组, 见表 1, 每组 12 只, 分笼饲养, 30 d 后检测各项指标。

1.3 胸腺、脾脏指数测定 用分析天平称得小鼠的宰前体重, 小鼠经眼球采血后剖杀, 取其胸腺和脾脏, 称取重量, 按公式计算胸腺指数和脾脏指数, 所得数据经统计分析得到各自的变化曲线。

1.4 红细胞 C3b 受体酵母花环试验^[4]

1.4.1 C3b 致敏酵母悬液制备。 将酵母试剂用 Hank's 液 (含钙、镁, pH 值 7.2, 下同) 洗 1 次 (1 000 r/min, 10 min), 配成

含酵母细胞 1×10^8 / ml 的悬液, 然后加等量新鲜豚鼠血清, 混匀, 37℃ 水浴 20 min, 然后再以 Hank's 液洗 2 次, 恢复原浓度, 即为 C3b 致敏酵母细胞悬液。酵母试剂用 Hank's 液洗涤后, 配成 1×10^8 / ml 浓度, 即为非致敏酵母悬液。

表 1 试验动物的分组及处理

序号	组别	动物数	喹乙醇灌喂剂量 ng (kg·d)	2% 羧甲基纤 维素钠 ml
1	正常组	12	0	0
2	阴性组	12	0	0.5
3	1/30 LD ₅₀ 组	12	80	0.03
4	1/20 LD ₅₀ 组	12	120	0.05
5	1/10 LD ₅₀ 组	12	240	0.1
6	1/5 LD ₅₀ 组	12	480	0.2

1.4.2 红细胞悬液制备。 取各试验组小鼠的肝素抗凝血, 用 Hank's 液洗 3 次 (每次以 2 000 r/min 离心 5 min), 最后将红细胞用 Hank's 液稀释成浓度 1.25×10^7 / ml 的悬液。

1.4.3 检测方法。 取 C3b 致敏酵母悬液和红细胞悬液各 50 μl, 混匀, 于 37℃ 水浴 40 min 后取出, 轻轻摇起, 加 0.25% 戊二醛溶液 20 μl 固定 5 min, 用适量 Hank's 液稀释、涂片、干燥、甲醇固定, 姬姆萨氏染液染色, 高倍镜检查, 以 1 个红细胞黏附 2 个或 2 个以上酵母细胞为 1 个花环, 计数 200 个红细胞, 求出花环率。

1.5 红细胞 IC 酵母花环试验 除酵母细胞不致敏外, 其余同红细胞 C3bR 花环试验。

1.6 统计分析 试验数据经 SPSS11.0 软件包统计分析, 组间比较采用方差分析 (ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 喹乙醇对小鼠胸腺、脾脏重量的影响 小鼠胸腺指数和脾脏指数见表 2, 因在灌胃过程中有动物死亡, 故表中动物数减少。

表 2 各试验组小鼠的胸腺、脾脏指数

分组	动物数	胸腺指数	脾脏指数
正常组	12	8.31 ± 0.42	4.92 ± 0.35
阴性组	12	9.10 ± 0.52	4.99 ± 0.78
1/30LD ₅₀ 组	10	9.04 ± 0.18	4.72 ± 0.17
1/20LD ₅₀ 组	11	8.67 ± 0.72	4.50 ± 0.45
1/10LD ₅₀ 组	8	8.08 ± 0.34	4.32 ± 0.43
1/5LD ₅₀ 组	9	6.78 ± 0.44*	3.80 ± 0.85

注: * 与阴性组比较差异显著。

与阴性组比较, 各试验组小鼠的胸腺指数均降低, 并随着喹乙醇剂量的增大而呈稳定递减趋势 (图 1), 其中 1/5 LD₅₀ 组与阴性组比较存在显著差异 ($P < 0.05$)。而各组的脾脏指

项目基金 辽宁省教育厅青年基金资助项目 (05L404)。

作者简介 尹荣焕 (1976-), 女, 河北安国人, 在读博士, 讲师, 从事动物性食品安全与中药免疫研究。

收稿日期 2006-10-10

数没有明显差异,但与正常组和阴性组比较,各试验组小鼠的脾脏指数亦降低(图2),并随着喹乙醇剂量的增大而减少。

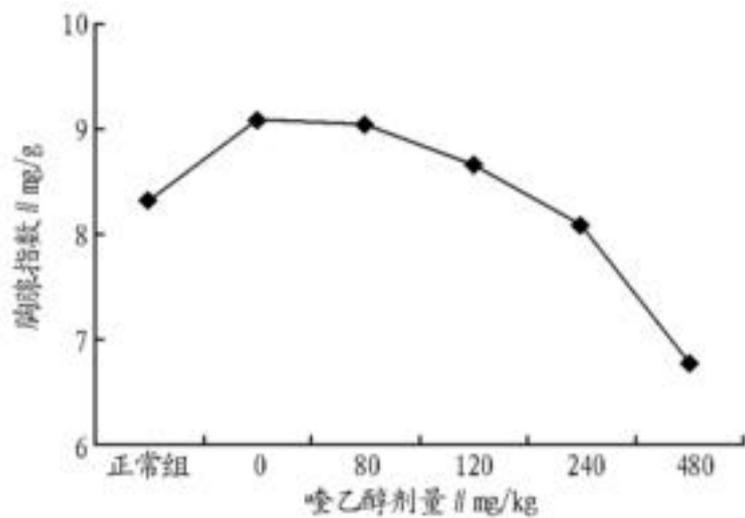


图1 小鼠胸腺指数变化曲线

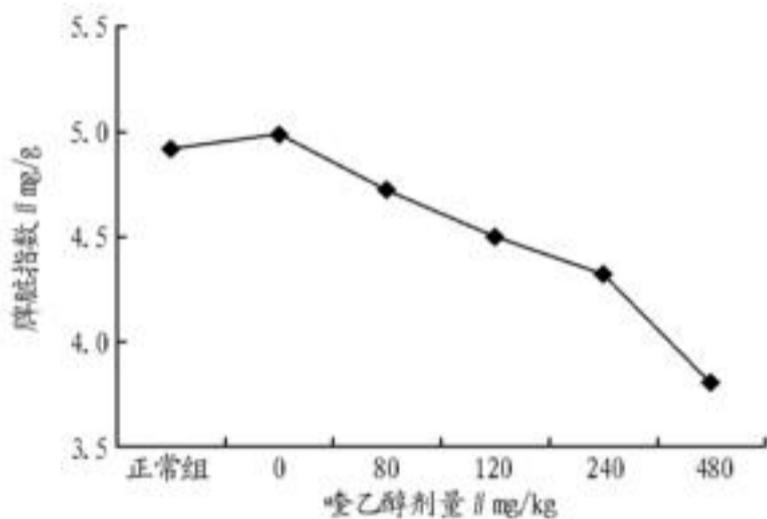


图2 小鼠脾脏指数变化曲线

2.2 红细胞免疫功能的测定结果 如图3、4,一个红细胞黏附2个或2个以上的酵母细胞成为一个花环,2个试验均看到在红细胞周围黏附几个酵母细胞形成的花环,且红细胞C3b受体花环率大大高于红细胞IC酵母花环率。

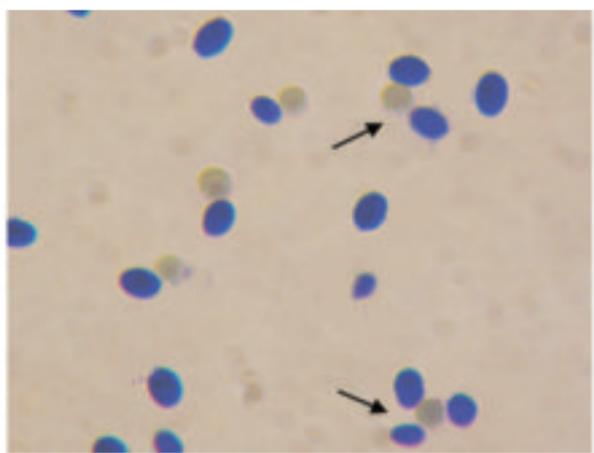


图3 C3b受体花环

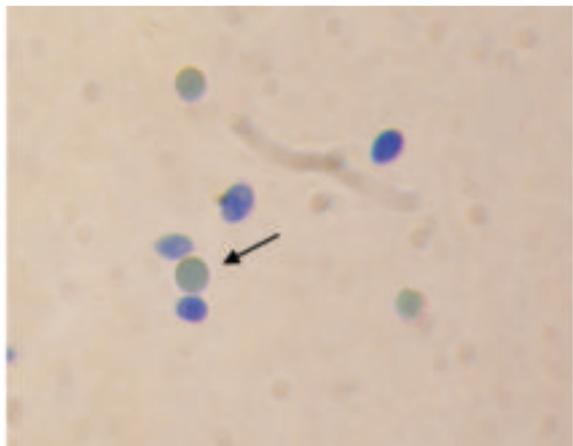


图4 IC花环

小鼠红细胞免疫的测定结果见表3,由表中可以看出,1/30LD₅₀喹乙醇剂量C3b花环率为10.02%,高于正常和阴性组,与正常组和阴性组比较,喹乙醇各试验组红细胞C3b受体花环率和IC花环率均不存在显著性差异($P > 0.05$),但随

着剂量的升高C3b花环率有下降趋势,而且有明显的剂量效应,120、240、480 ng/(kg·d)剂量组IC花环率虽高于正常和阴性组,但无剂量效应。

表3 各试验组小鼠红细胞免疫功能的测定结果

组别	动物数	C3b花环率 %	IC花环率 %
正常组	12	8.67 ± 0.49	3.25 ± 0.24
阴性组	12	9.13 ± 0.31	3.75 ± 0.27
1/30 LD ₅₀ 组	10	10.02 ± 0.43	2.92 ± 0.42
1/20 LD ₅₀ 组	11	8.17 ± 0.23	4.15 ± 0.52
1/10 LD ₅₀ 组	8	7.50 ± 0.56	3.95 ± 0.28
1/5 LD ₅₀ 组	9	7.08 ± 0.64	4.36 ± 0.37

3 讨论

人及多种动物红细胞与白细胞一样,也具有重要的免疫功能。红细胞可通过其表面的C3b受体,发挥清除免疫复合物(IC)、促进吞噬、提呈抗原及激活补体等多种作用。血液循环中95%以上的C3bR分布在红细胞膜上,而且单位体积血液中的红细胞数远远大于白细胞数,所以红细胞在清除机体的免疫复合物中起主导作用^[5-6]。红细胞在体内广泛参与非特异性和特异性免疫反应,红细胞免疫功能的增强会大大提高机体免疫力和抗病能力^[7]。

C3b花环率形成的机制是红细胞表面的C3b受体(CR1)连接补体致敏的酵母菌,红细胞表面CR1的多少以及C3b免疫黏附功能的状况都直接体现着红细胞免疫功能的高低。该试验中C3b花环率与阴性组和正常组比较差异不显著,但随着喹乙醇剂量的升高C3b花环率逐渐减少,说明大剂量喹乙醇可能会抑制机体的红细胞免疫功能,从而降低机体的非特异性免疫功能,即当受外界感染时,红细胞与免疫复合物结合、清除病原的能力下降。而IC花环率显示了结合状态的CR1数目。CR1是先通过C3b与IC结合,处于结合状态之后,连接于CR1的C3b再与酵母菌黏连形成ICR。该试验中喹乙醇浓度超过120 ng/(kg·d)时,IC花环率均高于阴性和正常对照组,1/20 LD₅₀组和1/5 LD₅₀组分别达到4.15%和4.36%,虽差异不显著,也不呈明显的剂量关系,但正符合了此消彼长的关系。

胸腺属于重要的中枢免疫器官,骨髓中的前T细胞随血流进入胸腺,在此分化增殖成具有不同功能的T淋巴细胞亚群,参与机体的细胞免疫。胸腺对各种刺激非常敏感,一些药物甚至应激反应、激素及各种疾病等因素均可导致其迅速退化,而胸腺萎缩可降低胸腺激素活性及T淋巴细胞活性。该试验中,小鼠的胸腺指数随着喹乙醇剂量的增大而降低,1/5 LD₅₀组降低显著,说明大量使用喹乙醇可能会抑制胸腺的发育。脾脏属于外周免疫器官,是机体最大的淋巴器官,免疫活性细胞移行于此,因受免疫过程中异物抗原刺激而进一步增殖分化,产生T淋巴细胞和B淋巴细胞,还有巨噬细胞,与体液免疫、细胞免疫有密切关系^[8]。该试验各剂量组的脾脏指数降低呈明显的剂量关系,说明喹乙醇对脾脏的重量也有一定影响,喹乙醇使用剂量越大,脾脏的重量越小,但在该试验条件下没有呈现显著性差异。

参考文献

- [1] 邓云波,段苏华,陈启友.喹乙醇的特性及其合理使用[J].湖南饲料,2004(1):15-16.

(上接第718 页)

- [2] 谢麟. 喹乙醇的安全性毒理学评价与合理应用[J]. 兽药与饲料添加剂, 1999, 4(2) :26- 28.
- [3] 杨波, 陈吉红. 喹乙醇在水产动物中的应用及其安全性评价[J]. 兽药与饲料添加剂, 2006, 11(2) :13- 15.
- [4] 王世若, 王兴龙, 韩文瑜. 现代动物免疫学 M. 长春: 吉林科学技术出版社, 2001 :532- 533.

- [5] HEBERTI A, COSIO F G, BIRMINGHAM DJ, et al .Biologic significance of the erythrocyte complement receptor :a pinate perquisite[J] .J Lab Clin Med, 1991, 118(4) :301- 308.
- [6] 龚非力. 基础免疫学 M. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998 :48- 49.
- [7] 杨鸿, 陈杖榴, 邓桦, 等. 加味玉屏风散对鸡红细胞免疫和自由基的影响[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(1) :70- 73.
- [8] 孙创斌, 缪士平, 王明, 等. 花虫胶囊对小鼠免疫器官胸腺和脾脏的影响[J]. 西藏医药杂志, 2005, 26(3) :23- 24.