

AA肉鸡生长过程中血液 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺T 淋巴细胞亚群的变化规律

孙国庆, 王纯洁, 赵怀平

(内蒙古农业大学 动物科学与医学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 为了进一步了解 AA 肉鸡血液 T 淋巴细胞及其 CD4⁺、CD8⁺亚群所占比例的变化规律及对免疫系统中的作用, 使用流式细胞仪对 1、3、5、7、14、21、28、35、42、49 日龄 AA 肉鸡血液 CD3⁺T 淋巴细胞和 CD4⁺、CD8⁺T 细胞亚群比例进行检测。结果表明, 1~5 日龄 CD3⁺T 淋巴细胞含量逐渐升高, 7 日龄突然下降, 14~21 日龄急速升高, 并达到最高峰后急速下降至 28 日龄, 35~49 日龄时相对趋于平稳状态; CD4⁺T 细胞含量 1~3 日龄明显低于其余日龄, 3~5 日龄急速上升, 7~14 日龄增加缓慢, 21 日龄时达到最高峰后急速下降至 28 日龄, 35~49 日龄时基本趋于平稳状态; CD8⁺T 细胞含量 1~5 日龄缓慢上升, 5~7 日龄急速下降后, 再急速上升到 14 日龄, 14~28 日龄再下降, 此后直至 49 日龄均在此水平上处于平稳状态。CD4⁺/CD8⁺比例: 1~7 日龄缓慢增加, 7~14 日龄比例急速下降至最低, 14~21 日龄时比例增加到最高峰后急速下降至 28 日龄, 但比例数值高于前 1~7 日龄, 28~49 日龄比例趋于平稳状态。表明 AA 雏鸡在 1~7 日龄时其免疫功能逐渐提高, 14 日龄时细胞免疫功能明显减弱, 这可能与 CD8⁺T 淋巴细胞含量高有关, 21 日龄时机体细胞免疫水平达最高状态, 在 28 日龄后肉鸡细胞免疫功能基本保持稳定状态, 但仍需要加强饲养管理。

关键词: AA 肉鸡; 血液; CD3⁺T 淋巴细胞; CD4⁺T 淋巴细胞; CD8⁺T 淋巴细胞

中图分类号: S858.314 文献标识码: A 文章编号: 1007-0907(2007)03-0059-04

The Dynamic Changes of the Concentration of CD3⁺ cells and CD4⁺, CD8⁺ Subsets T Lymphocytes in Blood of Abor Aerec Flesh Chichen

SUN Guo-qin, WANG Chun-jie, ZHAO Huai-ping

(Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: In order to verify the dynamic changes of T lymphocyte and its subsets in Abor Aerec flesh fowl. Lymphocytes were separated from blood of chickens. Then the concentration of CD4⁺ and CD8⁺ subsets of T cells and CD3⁺T cells were checked with flow cytometry machine in different old days, respectively. As the results: The concentration of CD3⁺ T is in the highest level on 21 days old. But it was lower than others on 7 days old. The concentration of CD4⁺ T is in the highest level on 21 days old. But it was lower than others on 1, 3 days old. The concentration of CD8⁺T cell increased quickly on 1, 3, 5, 14 days old. The highest level was on 14 days old. The ratios of CD4⁺/CD8⁺ increased slowly from 1 to 7 days old, decreased on 14 days old. The highest level was on 21 days old. The others contain stable level. It showed that: The immune system of Abor Aerec flesh fowl became hyperfunction from 1 to 7 days-old gradually, and it became hypofunction on 14 days old distinctly. The immunity was at highest on 21 days old then became steady after 28 days-old. It showed that the immune system almost matured and advert to keep feeding.

Key words: Abor Aerec flesh chicken; Blood; CD3⁺T cell; CD4⁺T cell; CD8⁺T cell

收稿日期: 2007-03-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30160067)

作者简介: 孙国庆(1981-) 男(蒙古族), 内蒙古通辽人, 内蒙古农业大学硕士研究生, 研究方向为分子免疫学研究。

通讯作者: 王纯洁(1962-) 女(蒙古族), 内蒙古科右前旗人, 教授, 博士, 博导, 研究方向为动物生理学。

禽类 T 细胞在胚胎期来源于卵黄囊, 孵化后来源于骨髓的多能干细胞, 在胸腺中发育成熟。它参与细胞免疫并对 B 细胞进行调节^[1]。T 细胞膜表面分子基因主要以白细胞分化抗原 (cluster of differentiation, CD)、组织相容性抗原以及膜表面的受体等构成。CD3 分子能表达于全部 T 细胞上, 是 T 细胞共同的表面标志。CD3 可将 TCR(T cell receptor) 与抗原结合所产生的活化信号传递到细胞内部并激活细胞^[2]。根据 CD4 和 CD8 可将 T 细胞分成两个重要亚群。CD4 存在于辅助性 T 细胞 (TH) 表面, 而 CD8 主要存在于细胞毒性 T 细胞 (CTL) 表面。品种间最大的差异在于体循环中的 CD4 和 CD8 阳性 T 淋巴细胞的比例不同。CD4⁺T 细胞主要识别与 MHC Ⅱ类分子及其他共刺激分子结合的、被加工过的外源性抗原。外源性抗原活化 CD4⁺T 细胞后, 启动免疫反应。另外 CD4⁺T 细胞对其他免疫细胞, 如 NK 细胞和 CD8⁺T 细胞提供关键性的辅助作用, 然后这些细胞分化增殖, 参与免疫反应。CD4⁺T 细胞含量高时, 当外源性病原微生物侵入体内能很快启动免疫反应从而抵抗病原, 表明机体免疫功能强, 不易被感染疾病。CD8⁺T 淋巴细胞识别结合于 MHC Ⅰ分子上的内源性抗原。内化的抗原(如病毒)被蛋白酶复合物降解成小肽, 其肽段与 MHC Ⅰ分子结合。肽-MHC 复合物被转运到细胞表面, 供抗原特异性 CTL 识别。CD8⁺T 细胞主要功能是清除被病毒感染的细胞。由于效应细胞和靶细胞的 MHC 限制性, 对鸡 CD8⁺T 细胞体外定量很困难。尽管如此, 已证明, CD8⁺T 细胞对禽类的病毒性疾病和肿瘤疾病的发生有调节作用。CD8⁺T 细胞含量高, 能识别被感染的细胞越多, 表明机体本身的免疫功能降低, 需要外来疫苗来抵抗病原。显然, T 淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺亚群浓度与鸡的免疫防御密切相关。CD4⁺/CD8⁺比例高则机体自身免疫功能相对强, 低则相反。

目前国内大部分商品家禽的大型集约化饲养管理, 易感染病原。所以要保持禽群正常免疫功能, 主要以接种许多疫苗来完成。但是疫苗的保护效率取决于机体本身免疫系统对疫苗的反应强度, 若机体的免疫被抑制, 对疫苗反应差, 易感染传染病。因此选择适当日龄接种疫苗, 对提高免疫功能有十分重要意义。

为了研究 AA 肉鸡血液 CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺T

淋巴细胞含量变化规律及在免疫系统中的重要作用, 采用流式细胞术进行检测, 从而为饲养管理提供重要的免疫参考数据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 100 只爱拔益加肉鸡 (AA, Abor Aerec), 购自内蒙古农牧业科学院。生产状态下饲养, 并在 5 日龄和 21 日龄时分别注三联疫苗以提高免疫功能。

1.1.2 仪器与试剂 肝素钠抗凝剂; 淋巴细胞分层液 (1.077); 鸡抗小鼠的 CD3-FITC、R-PE 标记的 CD4、CD8 单抗 (Southern Biotech); 流式细胞仪, 型号为 FacsCalibur, 美国 BD 公司产品。

1.1.3 试验设计 于 1、3、5、7、14、21、28、35、42、49 日龄时取 AA 肉鸡各 10 只, 编号, 心脏采血约 1ml 抗凝血液, 制备淋巴细胞悬液, 流式细胞仪检测 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞。

1.2 试验方法

在心脏采好的肝素抗凝血中加入等体积的 PBS (0.01M, pH 值 7.2~7.4) 液稀释。混匀后轻悬在等体积的淋巴细胞分层液上, 离心。收集白细胞层用 PBS 液洗 2 次。然后将细胞配成 $1 \sim 2 \times 10^6$ 个/ml 浓度的悬浮液, 按说明进行 CD3-FITC/CD4-RPE、CD3-FITC/CD8-RPE 染色, 进行流式细胞仪检测, 检测 CD3⁺T 细胞占所圈门细胞的百分含量和 CD4⁺、CD8⁺亚群占 CD3⁺T 细胞的百分含量。利用 CELLQUEST 软件分析和处理流式细胞仪上获取的数据。使用 SPASS 软件统计。

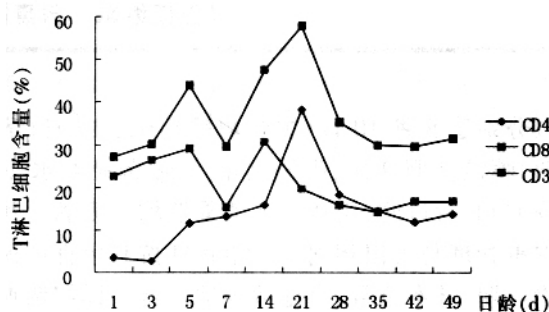
2 结果与分析

2.1 各日龄 AA 肉鸡血液 CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞含量的变化规律

1~5 日龄 CD3⁺T 淋巴细胞含量逐渐升高, 7 日龄突然下降, 14~21 日龄急速升高并达到最高峰后急速下降致 28 日龄, 35~49 日龄时相对趋于平稳状态; CD4⁺T 细胞含量 1~3 日龄明显低于其余日龄, 3~5 日龄急速上升, 7~14 日龄增加缓慢, 21 日龄时达到最高峰后急速下降至 28 日龄, 35~49 日龄时基本趋于平稳状态; CD8⁺T 细胞含量 1~5 日龄缓慢上升, 5~7 日龄急速下降后再急速上升到 14 日龄, 14~28 日龄再下降, 此后直至 49 日龄均在此水平上处于平稳状态。(表 1、图 1)。

表 1 各日龄 雏鸡 CD3⁺T 淋巴细胞和 CD4⁺、CD8⁺亚群含量的变化

分类	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD3 ⁺
1	3.63 ±0.12	22.55 ±0.38	27.18 ±0.15
3	2.69 ±0.17	26.32 ±0.36	30.00 ±0.32
5	11.59 ±0.37	29.18 ±0.37	43.78 ±0.21
7	13.22 ±0.27	15.28 ±0.27	29.50 ±0.28
14	15.80 ±0.26	30.70 ±0.26	47.50 ±0.34
21	38.11 ±0.39	19.67 ±0.36	57.98 ±0.26
28	18.37 ±0.36	15.88 ±0.35	35.24 ±0.36
35	14.49 ±0.20	14.37 ±0.23	29.87 ±0.18
42	11.82 ±0.16	16.77 ±0.35	29.59 ±0.32
49	13.82 ±0.23	16.64 ±0.21	31.46 ±0.22

图 1 AA 雏鸡血液 CD3⁺T 淋巴细胞及其 CD4⁺、CD8⁺亚群的变化规律

2.2 各日龄 AA 雏鸡血液 T 淋巴细胞 CD4⁺/CD8⁺比例的变化规律

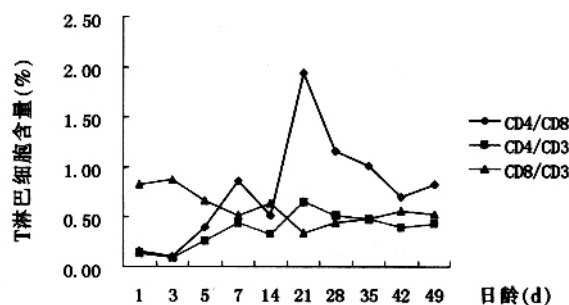
CD4⁺/CD8⁺比例:1~3日龄下降,5~7日龄快速增加,14日龄比例急速下降,21日龄时比例到达最高峰后急速下降致42日龄,但比例数值高于前1~7日龄,42~49日龄趋于平稳状态(表2、图2)。

3 讨论

研究发现1~5日龄 CD3⁺T 淋巴细胞含量逐渐升高,7日龄突然下降,14~21日龄急速升高并达到最高峰后急速下降至28日龄,35~49日龄时相对趋于平稳状态。表明1~5日龄机体成熟 T 淋

表 2 各日龄 雏鸡 T 淋巴细胞 CD4⁺/CD3⁺和 CD8⁺/CD3⁺及 CD4⁺/CD8⁺比例的变化

分类	CD4 ⁺ /CD3 ⁺	CD8 ⁺ /CD3 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
1	0.13 ±0.06	0.83 ±0.07	0.16 ±0.05
3	0.09 ±0.05	0.88 ±0.08	0.10 ±0.05
5	0.26 ±0.07	0.67 ±0.08	0.40 ±0.01
7	0.45 ±0.08	0.52 ±0.07	0.87 ±0.01
14	0.33 ±0.07	0.65 ±0.07	0.51 ±0.02
21	0.66 ±0.07	0.34 ±0.06	1.94 ±0.05
28	0.52 ±0.06	0.45 ±0.06	1.16 ±0.08
35	0.49 ±0.04	0.48 ±0.05	1.01 ±0.07
42	0.40 ±0.03	0.57 ±0.03	0.70 ±0.06
49	0.44 ±0.04	0.53 ±0.04	0.83 ±0.13

图 2 各日龄 AA 雏鸡血液 T 淋巴细胞 CD4⁺/CD8⁺比例的变化规律

巴细胞逐渐进入血液的含量增高,到7日龄时机体 T 细胞含量减少是由于注射过疫苗,7~21日龄时含量直达最高峰,由于第二次注射疫苗从而机体产生免疫能力,随着疫苗浓度的减少28日龄时 T 淋巴细胞含量快速回降,35日龄后机体 T 淋巴细胞基本发育成熟,数量变化幅度较低。这结果符合前人的研究^[4,5]。CD4⁺T 细胞含量1~3日龄明显低于其余日龄,3~5日龄急速上升,7~14日龄增加缓慢,21日龄时达到最高峰后急速下降至28日龄,35~49日龄时基本趋于平稳状态。说明1、3日龄时刚孵化的雏鸡主要依靠母源抗体来抵抗病原微生物;3、5日龄时 CD4⁺T 淋巴细胞开始增多,7到21日龄时免疫功能逐渐增强,一般情况下不易感染疾病,28日龄后机体本身的免疫功能基本趋于成熟状态。这与相关报道一致^[4]。CD8⁺T 细胞含量1~5日龄缓慢上升,5~7日龄急速下降后再急速上升到14日龄,14~28日龄再下降,此后直至49日龄均在此水平上处于平稳状态。表明7日龄时识别内源性抗原能力差,14日龄时机体虽识别内源性抗原的能力强,但识别外源性抗原的能力弱,因此自身免疫功能弱,所以接种外来疫苗来维持识别外来抗原。与王纯洁等研究的大体一致。CD4⁺/CD8⁺比例:1~3日龄下降,5~7日龄快速增加,14日龄比例急速下降,21日龄时比例到达最高峰后急速下降至42日龄,但比例数值高于前1~7日龄,42~49日龄趋于平稳状态。表明 AA 雏鸡在1~7日龄时其免疫功能逐渐提高,14日龄时细胞免疫功能明显减弱,这可能与 CD8⁺T 淋巴细胞含量高有关,21日龄时机体细胞免疫水平达最高状态。在28日龄后肉鸡细胞免疫功能基本保持稳定状态,但仍需要加强饲养管理。

4 结论

对不同日龄的 AA 肉鸡血液中 CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺T 浓度变化规律进行分析,得出:在 1~5 日龄含量均有上升趋势,表明 T 细胞逐渐进入血液参加细胞免疫,7 日龄时除了 CD4⁺T 细胞外均有含量下降到最低,表明 5 日龄注射的疫苗起防护作用,除了 CD8⁺T 细胞含量在 14 日龄达到最高峰以外其余含量均在 21 日龄时达到最高峰,表明第二次注射疫苗起免疫应答作用,28 日龄后这三类细胞含量下降到平稳水平状态,表明机体基本形成稳固的免疫防御系统,处于健康状态。

参考文献:

- [1] 金伯泉.细胞和分子免疫学[M].北京:世界图书出版公司,1998.48-52.
- [2] 阴天榜,刘兴友,等.家禽免疫学[M].北京:中国农业科技出版社,1999.10-25.
- [3] 姜国均,周帮会,等.增免散对鸡脾脏 T 淋巴细胞 CD4⁺和 CD8⁺亚群的影响[J].中国兽医科学,2006,36(2):157-161.
- [4] 王纯洁,斯日古楞,等.雏鸡淋巴细胞变化规律的流式细胞仪检测研究[J].畜牧兽医学报,2005,36(8):828-831.

(责任编辑 敦惠霞)

(上接 31 页)

带播种机条播深种磷酸二铵 15kg/667m²+毒谷 6.5kg/667m²,播前墒情良好。0~20cm 土层内养分情况是:有机质 19.5g/kg,全 N1.38g/kg,速效 N 82.9mg/kg,全 P 0.52 g/kg,有效 P 55.9mg/kg,速效 K75.8g/kg, pH 值 8.24,全盐 0.0658%。

1.2 试验材料及设计

试验指示品种为内麦 19 号;试验用肥农大哥高效复合生物菌肥由内蒙古自治区水利科学院苗宗义教授提供。试验采用简单对比法设计,为喷肥区和未喷肥区(ck),3 次重复,小区面积 7m²。

1.3 田间管理与喷肥情况

试验指示品种内麦 19 号于 3 月 29 号用四轮车带 9 行播种机条播,播种量为 20kg/667m²,随播种 667m²带种肥磷酸二铵 15kg。4 月 16 日出苗,18 日齐苗。分别于 5 月 6 日、5 月 20 日、6 月 7 日、6 月 26 日浇水,随头水 667m²追尿素 19kg。喷肥

区分别于 5 月 10 日(拔节初期)、5 月 25 日(孕穗期)喷洒菌肥 2 次,喷洒剂量是 5g 菌肥对水 2kg,浸泡 6h 后过滤,用背负式喷雾器均匀喷洒。其他农事管理与大田相同。全生育期按其生育进程对物候期、基本苗数、亩穗数等项进行了详细调查记载。成熟后按小区对角线取样风干后考种、计产。

2 结果与分析

2.1 对产量的影响

从表 1 可看出:喷洒生物菌肥的处理平均单产 538.12kg/667m²,比对照增产 25.71kg/667m²,增幅为 5.02%。

2.2 对经济性状的影响

从表 2 可以看出:喷洒生物菌肥处理的株高降低 1.0cm,穗长多 0.2cm,小穗数多 0.5 个,结实小穗多 0.3 个,不孕小穗少 0.1 个,穗粒数少 0.5 粒,千粒重高 1.6g,成穗数多 0.5 万/667m²。

表 1 生物菌肥喷洒试验产量结果

处理	小区产量(kg)				平均	单产(kg/667m ²)	比 ck ±(%)
喷肥	5.05	6.05	5.85	5.65	5.65	538.36	5.02
对照	5.25	5.35	5.55	5.38	5.38	512.64	

表 2 生物菌肥喷洒试验经济性状统计结果

处理	株高 (cm)	穗长 (cm)	小穗数 (个)	结实小穗 (个)	不孕小穗 (个)	穗粒数 (粒)	穗粒重 (g)	千粒重 (g)	基本苗 (万/667m ²)	成穗数 (万穗/667m ²)
喷肥	75.8	8.4	13.2	12.5	0.6	36.9	1.73	43.8	42.52	43.25
对照	76.8	8.2	12.7	12.2	0.7	37.4	1.7	42.2	42.56	42.75

3 讨论

生物菌肥具有固氮,活化土壤,培肥地力,提高肥料利用率,改善作物品质,提早成熟,增产增收之功效,是一种成本低、效益好的液态肥料。

如果要真正的摸清该菌肥的增产、增收机理需要今后进一步探讨,从而做出科学评价。

参考文献:

- [1] 李伟,李岩,林瑞蒙,等.有效微生物群(EM)对春小麦、春油菜的增产效应[J].内蒙古农业科技,2005(5):30-31.
- [2] 杜明华,刘文峰.叶面肥施用存在的问题及解决措施[J].内蒙古农业科技,2007,(1):87-88.

(责任编辑 侯旭光)