

单色光对脂多糖应激后肉鸡脾脏组织结构及脾细胞免疫功能的影响

谢电¹ 陈耀星¹ 王子旭¹ 李俊英² 曹静¹ 贾六军¹

(1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 2. 中国农业大学 动物科学技术学院, 北京 100094)

摘要 本试验研究了以单色光为光源,对饲养在不同单色光下的肉鸡注射脂多糖(LPS)后,肉鸡脾脏组织结构及脾细胞免疫功能的变化。结果表明:蓝光组的脾小节直径和脾动脉周围淋巴鞘面积比红光组分别显著增加 62.4%和 49.1% ($P < 0.05$);蓝光可以抑制免疫应激造成的细胞因子 IL-1 水平升高,与白光组相比显著降低 178.4% ($P < 0.05$);并可显著提高脾淋巴细胞对 ConA 和 LPS 的增殖反应,与红光组相比分别高出 96.6%和 76.3% ($P < 0.05$)。结果显示蓝光可以明显改善肉鸡的免疫功能,并对免疫应激反应具有缓解作用。

关键词 单色光; 肉鸡; 脾脏; 脂多糖; 组织结构; 免疫功能

中图分类号 S 852.3

文章编号 1007-4333(2007)01-0013-04

文献标识码 A

Effects of monochromatic light on spleen histology and splenocyte immune function in broilers injected with lipopolysaccharide

Xie Dian¹, Chen Yaoxing¹, Wang Zixu¹, Li Junying², Cao Jing¹, Jia LiuJun¹

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract This experiment was conducted to study the effects of various monochromatic lights using a Light Emitting Diode lighting (LED) system, on spleen histology and splenocyte immune function in broilers injected with lipopolysaccharide (LPS). The results showed that Blue light: 1) significantly ($P < 0.05$) increased the diameter of spleen node by 62.4% and area of periarterial lymphatic sheath by 49.1% compared with red light. 2) inhibited the elevation of IL-1 and significantly ($P < 0.05$) decreased its concentrations in splenocyte by 178.4% compared with white light. 3) enhanced spleen lymphocytes proliferation in response to ConA and LPS by 96.6% and 76.3%, respectively ($P < 0.05$), compared to RL. These results imply that immune competence could be increased in broilers reared under blue light, with an observable alleviation of immune stress.

Key words monochromatic light; broilers; spleen; LPS; histology; immune function

脾脏作为家禽体内最大的淋巴器官^[1],其对机体的免疫调节作用一直为人们所关注。脾脏含有大量的免疫活性细胞,是机体细胞免疫和体液免疫的中心。脾脏拥有全身循环 T 淋巴细胞的 25%,直接参与细胞免疫,并对外周血中 T 细胞亚群的分布有重要调节作用。B 淋巴细胞约占脾内淋巴细胞总数的 55%,在抗原刺激下转化为浆细胞,继而分泌特

异性的免疫球蛋白 IgG,且具有抗原递呈能力^[2]。

根据禽类视觉处理光信息的特殊性,光信息是影响鸡生产力表现的主要因素之一^[3]。前期实验发现光波长对肉鸡和蛋鸡的生产性能有影响,前人对哺乳动物的研究也发现紫外光能抑制小鼠的免疫功能^[4],也可抑制豚鼠的免疫功能^[5-6],但有关不同波长光对家禽免疫功能的影响未见报道。为此,本

收稿日期: 2006-06-21

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(6032014);高等学校博士科学点专项科研基金项目(2004019002);新世纪优秀人才支持计划资助(NCET-04-0126)

作者简介: 谢电,博士研究生, E-mail: dianxie2004@126.com;陈耀星,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事生殖免疫学和神经生物学研究, E-mail: yxchen@cau.edu.cn

试验通过脂多糖诱导免疫应激,研究饲养在不同单色光环境下肉鸡脾脏形态学上的变化以及脾淋巴细胞免疫功能的差异,探讨单色光影响家禽免疫功能的机理。

1 材料与方法

1.1 试验动物及试验设计

选用刚出壳 AA 雄性肉鸡 160 只,购自北京爱拔益加家禽育种有限公司,随机分为 4 个组,每组 4 个重复,每个重复 10 只鸡,饲养期为 49 d。试验采用 4 × 2 因子设计,即 4 个光源处理与 2 个免疫应激处理。光源处理:蓝光(480 nm)、绿光(560 nm)、红光(660 nm)和白光(400 ~ 700 nm,对照)。光源为发光二极管(LED,中山市晶明光电科技有限公司制造),光照强度为 15 lx,光照时间为 23 h(0:00 ~ 23:00)。免疫应激处理:注射脂多糖(LPS)或生理盐水。于 48 日龄分别给各组的试验鸡(20 只)腹膜内注射脂多糖 LPS(Sigma 公司产品)(每 kg 体重 0.25 mg,溶于 5 mL 生理盐水),对照为等量的生理盐水。其他饲养管理相同,均参照北京爱拔益加家禽育种有限公司肉鸡饲养管理手册配制日粮,自由采食与饮水,常规免疫,鸡舍人工控温。

1.2 检测指标及检测方法

1) 肉鸡脾脏采集及组织学结构观察。从脂多糖处理的每个重复中随机选取 3 只肉鸡,放血处死,剖开腹腔,迅速取出脾脏,用新配制的生理盐水冲洗干净,放入 40 g/L 多聚甲醛磷酸缓冲液(pH7.4)中固定 48 h,常规石蜡包埋,连续切片厚 6 μm,HE 染色,Olympus 光镜检查,应用 Moditec 照相处理软件照相与测量。每张切片测量 10 个最长脾小节直径和 10 个最大脾动脉周围淋巴鞘面积,各指标取平均数作为测定数据。

2) 肉鸡脾淋巴细胞体外培养。于 48 日龄注射 LPS 或生理盐水 24 h 后,从各个重复组中随机选取 3 只肉鸡,迫杀致死,无菌取脾,用尼龙网(200 目)研磨挤压制成单细胞悬液,细胞悬浮于 RPMI1640 完全培养液中。继以淋巴细胞分离液密度梯度离心法(3 000 r/min,30 min)分离脾脏淋巴细胞,再用 RPMI1640 完全培养液离心洗涤(1 000 r/min,10 min)淋巴细胞 3 次,用台盼蓝染色计数活细胞数(应在 > 95 % 以上),同时进行细胞计数。将淋巴细胞用 RPMI1640 完全培养液调整细胞终浓度至 1×10^7 个/mL。于 24 孔细胞培养板每孔加入 1×10^7 个/mL

的单细胞悬液 1 mL,送 5 % (体积分数) CO₂、40 °C 细胞培养箱静置培养 24 h,取出培养板,无菌收取上清液, - 20 °C 冻存,供 IL-1 含量测定。

3) 肉鸡脾淋巴细胞悬液 IL-1 含量的测定。IL-1 采用鸡的 IL-1 ELISA 试剂盒(美国 BioSource International Inc),按照说明书测定。

4) 肉鸡脾淋巴细胞增殖试验。于 48 日龄注射 LPS 或生理盐水 24 h 后,从各个重复组中随机选取 3 只试验鸡,迫杀致死,无菌取脾。按以上方法制备单细胞悬液。于 96 孔细胞培养板中 48 孔加入 1×10^7 mL 单细胞悬液 190 μL 和 45 μg/mL ConA 溶液(Sigma 公司产品) 10 μL,另 48 孔加入单细胞悬液 190 μL 和 25 μg/mL LPS 溶液(Sigma 公司产品) 10 μL,每样品均设 3 个重复孔。同时设置完全培养液空白对照。送 5 % (体积分数) CO₂、40 °C 细胞培养箱静置培养 72 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液(Sigma 公司产品) 10 μL,再继续培养 4 h,取出培养板,每孔加 10 % (质量分数) SDS 溶液 100 μL,放入培养箱 2 h,取出培养板,室温放置 20 min,最后用 ELISA 免疫检测仪,以 570 nm 波长测定光密度值。

1.3 统计分析

试验数据用 SAS9.0 统计软件进行方差分析和多重比较。

2 结果

2.1 肉鸡脾小节和脾动脉周围淋巴鞘的变化

结果见表 1。从比较各单色光组的脾小节直径长短看,蓝光组的最长(186.8 ± 8.1) μm,红光组的最短(115.0 ± 4.2) μm,蓝光组比红光组显著增加 62.4 % ($P < 0.05$);其他各组间比较差异显著($P <$

表 1 单色光对脂多糖刺激的肉鸡脾小节直径和脾动脉周围淋巴鞘面积的影响

Table 1 Effects of various monochromatic lights on diameter of spleen node and area of periaarterial lymphatic sheath in broilers after lipopolysaccharide injection

光源	脾小节直径/μm	动脉周围淋巴鞘面积/μm ²
白光	128.5 ± 5.2 c	26 966.7 ± 4 573.7 a
红光	115.0 ± 4.2 d	17 184.3 ± 3 671.5 d
绿光	138.7 ± 11.8 b	22 102.1 ± 1 696.5 c
蓝光	186.8 ± 8.1 a	25 625.5 ± 3 038.0 ab

注:同列数据不同字母者表示差异显著($P < 0.05$)

0.05)。49 日龄肉鸡脾动脉周围淋巴鞘面积白光组最大($26\,966.7 \pm 4\,573.7$) μm^2 ,与红光和绿光组比较差异显著($P < 0.05$),但与蓝光组比较差异不显著($P > 0.05$);红光组最小($17\,184.3 \pm 3\,671.5$) μm^2 ,蓝光组比红光组大 49.1%,红光组和其他各组间比较差异显著($P < 0.05$)。

2.2 肉鸡脾淋巴细胞增殖的变化

从二因子方差分析结果(表 2)可以看出,光源

作为主效应,白光和蓝光均可显著提高肉鸡 T 淋巴细胞的转化率,而在促进 B 淋巴细胞增值方面主要是蓝光,这种明显的促进作用主要表现在 LPS 刺激条件下;从多重比较结果看,在 LPS 刺激 24 h 后,白光和蓝光组肉鸡的 T 淋巴细胞转化率要比红光组分别高出 70.1%和 29.4%;蓝光组的 B 淋巴细胞转化率要比红光组高出 76.3%。此外,光源和 LPS 之间也表现出极显著的互作关系($P < 0.001$)。

表 2 单色光对脂多糖刺激的肉鸡脾淋巴细胞增殖的影响

Table 2 Effects of various monochromatic light treatments on the proliferation of splenocyte in broiler chickens after lipopolysaccharide injection

溶液	生理盐水				LPS				SEM	P		
	白光	红光	绿光	蓝光	白光	红光	绿光	蓝光		光源	LPS	互作
ConA	1.211	0.712	0.779	0.921	1.357	0.642	1.156	1.262	0.039	<0.001	<0.001	<0.001
LPS	0.878	0.839	1.021	1.311	1.297	0.806	1.365	1.421	0.036	<0.001	<0.001	<0.001

注:表中数值为测试孔的光密度。SEM 表示平均数的标准差, $P < 0.05$ 差异显著, $P < 0.001$ 差异极显著,下同。

2.3 肉鸡脾淋巴细胞悬液 IL-1 含量的变化

体外培养脾淋巴细胞中细胞因子 IL-1 含量测定结果(表 3)显示:无论是光源作为主效应还是免疫应激注射 LPS 作为主效应,均能极显著提高 IL-1 水平($P < 0.001$),而这种明显的促进作用主要体

现在 LPS 刺激条件下;从多重比较结果看,在 LPS 刺激 24 h 后,白光组细胞因子 IL-1 水平的增加幅度要比蓝光组的高出 70.40%。此外,光源和 LPS 之间表现出极显著的互作关系($P < 0.001$)。

表 3 单色光对脂多糖刺激的肉鸡脾淋巴细胞悬液 IL-1 的影响

Table 3 Effects of various monochromatic light treatments on interleukin 1 (IL-1) production in broiler chickens after lipopolysaccharide injection

细胞悬液	生理盐水				LPS				SEM	P		
	白光	红光	绿光	蓝光	白光	红光	绿光	蓝光		光源	LPS	互作
IL-1 / (pg/mL)	232.20	213.92	153.99	114.03	589.65	461.93	322.10	211.79	39.39	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨 论

3.1 单色光与脂多糖刺激对脾脏组织结构变化的影响

家禽脾脏的基本结构与哺乳动物相似。健康的动物脾小结数量较少,体积较小,当发生体液免疫应答时,数量增多,体积增大。动脉周围淋巴鞘主要由密集的 T 淋巴细胞、散在的巨嗜细胞和交错突细胞等环绕动脉而成,动脉周围淋巴鞘属胸腺依赖区,当发生细胞免疫应答时,此区明显增厚^[7]。脾脏的良好发育对提高肉鸡的免疫功能起着重要作用。从表 1 结果可以看出,蓝光组的脾小节直径最长,说明蓝光能够明显地促进体液免疫应答;脾动脉周围淋巴

鞘面积,白光和蓝光组较其他光色组大,说明白光和蓝光可明显提高肉鸡脾脏淋巴细胞的免疫功能。

3.2 单色光与脂多糖刺激对脾淋巴细胞增殖的影响

检测淋巴细胞转化率是细胞免疫研究的常用方法,T、B 淋巴细胞分别是参与细胞免疫和体液免疫的功能细胞。当 T、B 细胞在体外培养时,受到非特异性有丝分裂原如 ConA 和 LPS 刺激后,能转化为淋巴母细胞,随后淋巴母细胞可发生分裂增殖。根据 T、B 细胞的转化率可判断机体的细胞免疫和体液免疫水平^[8]。注射 LPS 24 h 后(表 2),白光和蓝光均会显著提高 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖,细胞免疫水平显著高于其他光色组,且白光组的增幅

要比蓝光组高出 24.9%,说明免疫应激时,白光组肉鸡的细胞免疫系统被迅速激活;而体液免疫应答,蓝光显著提高 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖,说明免疫刺激时,蓝光可发挥出更加明显的体液免疫促进作用,但其确切的作用机制还有待于进一步研究。

3.3 单色光与脂多糖刺激对体外培养 IL-1 产生的影响

炎性细胞因子是由巨噬细胞系统在感染和免疫早期合成与分泌产生的,主要包括 IL-1、TNF 和 IL-6 等^[9],这些细胞因子在免疫应激的过程中起着十分重要的作用。IL-1 作为重要促炎症细胞因子,是衡量机体应激反应强弱的重要指标,其含量越高,说明机体的应激反应越强。注射 LPS 24 h 后(表 3),白光使肉鸡的 IL-1 水平上升,免疫系统处于激活状态,产生免疫应激反应,导致动物机体生理功能上发生了改变,使得机体处于高度激活的免疫状态。因此,本试验中 LPS 刺激引起肉鸡的脾动脉周围淋巴鞘面积增大,显著提高 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖,这都可能与 IL-1 在 LPS 刺激后大量产生密切相关。

本试验还发现,蓝光组 T 淋巴细胞转化率要显著高于红光和绿光组的转化水平,而且能显著降低 IL-1 的产生,说明蓝光能够维持较佳的细胞免疫水平。同时,蓝光组的脾小节直径最长,这与蓝光能够显著提高 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖,明显地促进体液免疫应答的结果是相一致的。由此可见,蓝光可在一定程度上减弱免疫应激的不良影响。

4 小 结

本试验结果显示,在光强度为 15 lx 的条件下,

对饲养在单色光环境下的肉鸡注射脂多糖(LPS)后,蓝光(660 nm)可明显增加肉鸡脾小节直径和脾动脉周围淋巴鞘面积,改善机体的体液免疫功能和细胞免疫功能,并且具有降低炎性细胞因子 IL-1 的水平,缓解免疫应激发生的作用。

参 考 文 献

- [1] 沈霞芬. 家畜组织学与胚胎学[M]. 第 3 版. 北京:中国农业出版社,2000:121~124
- [2] 王福传. 复方中草药免疫增强剂对鸡免疫器官组织形态学影响的研究[J]. 畜牧兽医学报,2001,(11):419~420
- [3] 杨宁. 现代养鸡生产[M]. 北京:北京农业大学出版社,1994
- [4] Kripke M L. Immunological unresponsiveness induced by ultraviolet radiation[J]. Immunol Rev Sci, 1984, 70: 2375~2378
- [5] Ferguson T A, Hayashi J D, Kaplan H J. Regulation of the systemic immune response by visible light and the eye[J]. FASEB J, 1988, 2:3017~3021
- [6] Ferguson T A, Mahendra A L, Hooper P, et al. The wavelength of light governing intraocular immune reactions[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992, 33:1788~1795
- [7] 马仲华. 家畜解剖学及组织胚胎学[M]. 第 3 版. 北京:中国农业出版社,2001
- [8] 李红军, 邹晓庭. 那西肽(Nosiheptide)对肉仔鸡免疫功能的影响[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(5): 534~535
- [9] Klasing K C. Avian inflammatory response: Mediation by macrophages[J]. Poult Sci, 1991, 70:1176~1186