

妊娠后期胎儿宫内生长受限对初生羔羊 免疫能力影响的初步研究*

高峰 侯先志** 刘迎春 赵志恭

内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018

摘要 选择经同期发情且同期受孕, 在妊娠 90 d 时健康的蒙古绵羊 100 只, 分为 0.175 MJME · kg^{-0.75} · d⁻¹(RG1), 0.33 MJME · kg^{-0.75} · d⁻¹(RG2) 以及自由采食组(CG) 3 个营养水平处理组, 研究妊娠后期绵羊胎儿宫内生长受限对初生羔羊免疫能力的影响。结果表明: 妊娠后期不同营养水平限饲母羊, RG1 和 RG2 组随着限制与妊娠期的同步延长, 其体重均低于对照组, 差异极显著 ($p < 0.01$)。这严重影响了其 RG1 ($p < 0.01$), RG2 ($p < 0.05$) 组羔羊平均初生重。脾脏重、脾脏指数 RG1 和 RG2 组极显著低于对照组 ($p < 0.01$)。胸腺重及胸腺指数, RG1 组低于 RG2 组、对照组, 差异显著 ($p < 0.05$)。随着营养水平的降低, 各组羔羊血中 CD3 依次表现出降低的趋势, 其中 RG1 组与对照组差异显著 ($p < 0.05$)。而 CD14, CD21 各组差异不显著 ($p > 0.05$)。

关键词 妊娠后期 胎儿宫内生长受限 新生羔羊 初生重 免疫能力

营养不良是导致免疫缺陷的最常见原因, 尤其对细胞免疫、细胞吞噬作用及补体系统最明显。营养不良的程度和持续时间不同对免疫系统的影响也不同, 可以是可逆的影响, 也可以是不可逆的影响。胎儿处在个体发育的特殊阶段, 在此期间如果营养供应不足, 将可能招致胎儿生长发育的停滞和缺陷, 称为胎儿宫内生长限制(IUGR)。已有研究表明 IUGR 胎儿表现出脾脏失重^[1]、胸腺萎缩^[2]。营养对免疫器官的影响可能破坏其免疫能力而影响了动物对疾病的抵抗力和恢复力^[3]。我国北方地区草原畜牧业受季节性影响严重, 放牧家畜从枯草期到返青期失重 20%—30%, 尤其在冬春母羊繁殖季节, 饲草质量降低、数量缺乏, 此时也正是妊娠母羊营养需求的高峰期, 妊娠母羊的高营养需求与草场的低营养供给的尖锐矛盾严重限制了胎儿的生长发育。另外, 母羊分娩后的春夏季又是呼吸道疾病等重大疾病爆发期, 新生仔畜低的免疫能力可能导

致疫病的发生和蔓延。动物健康状况依赖于动物免疫系统的功能状况, 为了保障动物的健康和最大限度发挥其生产潜力, 了解不同营养状态下动物免疫能力的规律非常必要。

因此, 对经历了宫内生长限制的新生仔畜免疫能力的研究是北方草原地区畜牧业可持续发展的重要内容。为了进一步研究不同营养水平对反刍动物免疫能力的影响, 本实验拟从病理组织学、分子免疫学角度出发, 研究妊娠后期不同营养水平对新生羔羊免疫器官及 CD3, CD21 和 CD14 的影响, 旨在研究不同营养水平对其免疫能力的影响, 为草原畜牧业的良性发展及建立北方草原地区冬春季节科学的饲养管理方式提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验设计

1.1.1 限制期的确定 基于胎儿生长发育的

2005-11-22 收稿, 2006-02-21 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 30360074)

** 通讯作者, E-mail: houxz@public.hh.nm.cn

70%—80%在妊娠期最后两个月内完成的事实,在妊娠期90d时开始对试验羊进行不同营养水平的饲养,母羊分娩后限制饲养试验结束。

1.1.2 营养水平的设定 参照吴庶青等^[4]、高峰等^[5]研究确定的不影响蒙古绵羊所产羔羊补偿生长能力的最低营养供给值 $0.33 \text{ MJME} \cdot \text{kg}^{-0.75} \cdot \text{d}^{-1}$ (阈值), 设定低于该“阈值”水平组 $0.175 \text{ MJME} \cdot \text{kg}^{-0.75} \cdot \text{d}^{-1}$ (RG1)、“阈值”水平组 $0.33 \text{ MJME} \cdot \text{kg}^{-0.75} \cdot \text{d}^{-1}$ (RG2)以及自由采食组(CG) 3个营养水平处理组。

1.2 实验动物及饲养

选择经同期发情、且同期受孕(妊娠40d时采用内蒙古农业大学动物医院B超(Medison-SA-600)分析确定),胎次为2—3次,健康的蒙古绵羊100

只。实验组采用人工套袋法饲喂,实验开始前,将装有2—3cm青干草的自制套袋罩在各限制组母羊嘴部供其采食,经过1周的适应期后,维持设定营养水平饲草供给量不变。实验羊分别于上午8:30和下午16:00两次饲喂;对照组自由采食,为保证对照组充分采食,中午11:00加喂一次。各组自由饮水;自由舔食盐砖。每天采集饲草、对照组剩草样。最后将整个实验期草样分别混和,供营养成分分析。实验期各组营养水平、采食饲草量及饲草营养成分见表1和表2。

表1 实验期(妊娠后期)各组营养水平

营养成分	CG	RG2	RG1
日饲草平均摄入量/(g·d ⁻¹)	1332.52	719.33	383.99
日粗蛋白平均摄入量/(g·d ⁻¹)	113.13	61.07	32.60
日能量水平/(MJME·kg ^{-0.75} ·d ⁻¹)	0.61	0.33	0.175

表2 实验期(妊娠后期)饲草及剩草营养成分

	代谢能/(MJ·kg ⁻¹)	干物质/%	粗蛋白/%	粗脂肪/%	中洗纤维/%	酸洗纤维/%	粗灰分/%	钙/%	磷/%
限制期采食饲草	8.79	85.89	8.49	2.59	76.20	49.43	5.23	0.56	1.09
对照组采食剩草	—	82.60	6.45	1.83	81.75	56.03	5.79	0.56	1.09

1.3 称重记录

限制期,分别在妊娠90,100,120,140d测定母羊体重。羔羊出生后在吮乳前且羊毛手感干燥后,测定其初生重。

1.4 草样营养成分分析

草样(包括饲草、剩草)成分分析采用文献^[6]所示方法。

1.5 屠宰实验和血样采集

实验开始(妊娠90d)选择4只体重与总体平均体重接近的母羊进行屠宰,其余按体重随机分配到3个营养水平处理组。待分娩后,各组分别选择营养限制前、后体重接近各组平均体重的母羊同日所生羔羊4只(CG组仅有3只符合要求),立即进行屠宰,测定宰前活重。屠宰时尽量减少挤压,充分放血,称放出血重。沿腹中线开膛,取出所有内脏并称重。快速剪取各内脏部分组织样,福尔马林固定,HE染色进行组织切片观察。测定免疫器官重及免疫器官指数:免疫器官与活体重比(g/kg)。

羔羊出生后,各组立即选择同日出生羔羊4只,每只采血1mL,肝素抗凝。

1.6 CD标志分析测定

抗凝血经溶血素溶解至透明,PBS液洗白细胞两次,按照产品说明书方法分别依次加入一抗(CD3, abcom公司产品,CD14和CD21, Serotec公司产品)、二抗(分别为羊抗鼠或兔抗小鼠IgG),各避光冰浴孵育30min后,流式细胞仪(BD)分析。

1.7 数据处理

所有数据采用SAS8.01一般线性模型统计分析,Duncan法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 妊娠后期不同营养水平饲养母羊对其体重的影响

营养限制期各组妊娠母羊体重变化见表3。由表可知,妊娠90—100d,CG组母羊体重略有提高,以后基本维持在同一水平;但是,RG2组母羊整个限制期体重呈线性趋势缓慢下降,而RG1组母羊体重限制期迅速下降。而且随着限制与妊娠期的同步延长,其体重均显著低于对照组($p < 0.01$)。

表3 限制饲养期(妊娠后期)各组母羊体重变化

	妊娠时间/d			
	90	100	120	140
CG	43.21±5.63 ^a	45.64±6.13 ^a	45.29±5.38 ^a	45.52±5.45 ^a
RG2	42.11±4.05 ^a	40.58±4.03 ^c	39.18±4.15 ^c	38.43±4.23 ^c
RG1	42.25±4.90 ^a	37.17±4.31 ^e	33.45±4.13 ^e	32.34±3.76 ^e

注:表中同一列数据有相同字母表示差异不显著($p>0.05$),相邻字母差异显著($p<0.05$),相间字母差异极显著($p<0.01$).

2.2 妊娠后期胎儿宫内生长受限对羔羊初生重的影响

妊娠后期胎儿宫内生长受限对羔羊初生重的影响见表4.由表可知,随着营养水平的降低,RG2($p<0.05$)、RG1组($p<0.01$)羔羊初生重显著低于对照组.另外,RG1组羔羊平均初生重亦极显著低于RG2组($p<0.01$).

2.3 妊娠后期胎儿宫内生长受限对初生羔羊免疫器官重及免疫器官指数的影响

妊娠后期胎儿宫内生长受限对新生羔羊免疫器官重及免疫器官指数的影响见表4.由表可知,随着营养水平的降低,各组脾脏重依次表现出降低的趋势,RG1和RG2组脾脏重与对照组差异极显著($p<0.01$).同时脾脏指数也表现出随营养水平降低而降低的规律,RG1和RG2组脾脏指数极显著低于对照组($p<0.01$).另外,RG1组羔羊脾脏重与脾脏指数亦显著低于RG2组($p<0.05$).而胸腺

重及胸腺指数, RG1组低于RG2组与对照组,差异显著($p<0.05$).这表明,妊娠后期胎儿宫内生长受限严重限制了新生羔羊胸腺、脾脏重及其免疫器官指数,并且,随着营养水平的降低,限制的程度也逐步加深.

表4 胎儿宫内生长受限对初生羔羊重及免疫器官的影响

	CG	RG2	RG1
羔羊平均初生重/kg	3.61±0.51 ^a	3.36±0.39 ^b	2.80±0.30 ^d
免疫器官重			
脾脏/g	6.21±0.90 ^a	3.70±0.73 ^c	2.27±0.39 ^d
胸腺/g	7.77±1.74 ^a	8.40±1.66 ^a	3.92±1.46 ^b
免疫器官指数			
脾脏指数/(g·kg ⁻¹)	1.63±0.047 ^a	1.19±0.18 ^c	0.89±0.13 ^d
胸腺指数/(g·kg ⁻¹)	2.03±0.28 ^{ab}	2.58±0.32 ^a	1.52±0.49 ^b

注:表中同一行数据有相同小写字母表示差异不显著($p>0.05$),相邻字母差异显著($p<0.05$),相间字母差异极显著($p<0.01$).

2.4 妊娠后期胎儿宫内生长受限对初生羔羊免疫器官组织结构的影响

妊娠后期胎儿宫内生长受限对新生羔羊胸腺、脾脏组织结构的影响见图1.由图可见,随着营养水平的降低, RG2和RG1组部分胸腺皮质、髓质萎缩,而且部分胸腺表现出皮质内未成熟淋巴细胞的代偿性增生,并向髓质浸润,致使皮质变厚,髓质缩小,尤其RG1组,皮髓质界限不清(图1(b),(c)).对脾脏的观察发现, RG2和RG1组羔羊脾

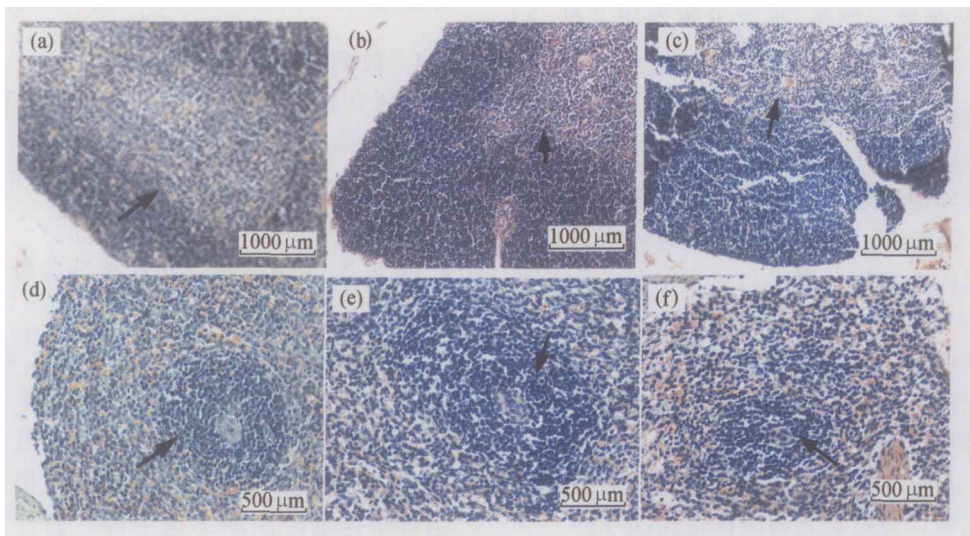


图1 初生羔羊免疫器官形态结构

(a) CG组胸腺, (b) RG2组胸腺, (c) RG1组胸腺, (d) CG组脾脏, (e) RG2组脾脏, (f) RG1组脾脏.
(a)~(c)中箭头示胸腺皮质和髓质分界, (d)~(f)中箭头示脾脏动脉周围淋巴鞘

脏有不同程度的萎缩且动脉周围淋巴鞘内的淋巴细胞(主要是T细胞)随着营养水平的降低数量越来越少,而且密度也逐渐降低(图1(e),(f)).从组织结构上表明,胎儿期受限制初生羔羊的胸腺和脾脏都存在不同程度的病理性萎缩,而且萎缩可能对T淋巴细胞的成熟影响较大.但是,在本实验中各组均未观测到由于营养应激而可能造成的如纤维化等不可逆的病理现象.

2.5 妊娠后期胎儿宫内生长受限对初生羔羊血中白细胞CD3, CD21和CD14表达的影响

妊娠后期胎儿宫内生长受限对初生羔羊血中白细胞CD3, CD21和CD14的表达影响见表5.随着营养水平的降低,各组羔羊血中CD3依次表现出降低的趋势,其中RG1组与对照组差异显著($p < 0.05$).而各组羔羊CD14, CD21基本维持在相近水平,各组差异不显著($p > 0.05$).

表5 妊娠后期胎儿宫内生长受限对初生羔羊血中白细胞CD3, CD21和CD14表达的影响

	CG	RG2	RG1
CD ₃	35.72±8.51 ^a	28.96±5.68 ^{ab}	21.79±10.54 ^b
CD ₂₁	8.66±2.33 ^a	8.19±1.59 ^a	9.49±3.51 ^a
CD ₁₄	29.24±2.84 ^a	26.32±7.01 ^a	29.61±9.22 ^a

注:表中同一行数据有相同字母表示差异不显著($p > 0.05$),相邻字母差异显著($p < 0.05$),相同字母差异极显著($p < 0.01$).

3 讨论

免疫系统是在生物体生长发育过程中逐步建立起来的,由免疫器官和免疫细胞组成.

胸腺是重要的中枢免疫器官,是诱导淋巴细胞增殖分化为免疫活性T细胞的场所,因而T细胞亦称胸腺依赖性淋巴细胞.因此,胸腺生长发育的受阻会直接影响T细胞的分化与成熟,而影响动物机体的细胞免疫能力.脾脏作为重要的外周免疫器官也是机体内最大的免疫器官,是成熟T细胞和B细胞定居并同抗原发生特异性免疫应答与之对抗的场所.

在本实验中,妊娠后期母体营养供应不足,动物的基本营养需求不能得到合适的满足,它们将动员体贮供能,导致机体失重,体况下降.这严重限制了RG1, RG2组羔羊平均初生重,造成了胎儿宫

内生长发育的严重限制.对于免疫器官,随着营养水平的降低, RG1, RG2组脾脏重、脾脏指数都极显著低于对照组($p < 0.01$),而且RG1组羔羊脾脏重与脾脏指数亦显著低于RG2组($p < 0.05$).这与Coulter等的研究结果相一致^[1].本实验中,胸腺重及胸腺指数, RG1组显著低于RG2组与对照组($p < 0.05$),这与在人类的研究中发现营养不良导致胸腺萎缩的结果相一致^[7].母体低营养也可以影响绵羊胎儿胸腺的生长发育^[8].Osgerby等在对威尔士羊胎儿生长发育的研究中也发现母体低营养严重限制了胎儿胸腺重($p < 0.05$),胸腺指数亦显著低于对照组($p < 0.01$)^[2].Amiel-Tison等认为子宫不良环境造成的应激使胎儿表现出不同程度的适应性.其中,营养不良是一种常见因素^[9].动物在强烈应激刺激后胸腺、脾脏、淋巴结发生明显萎缩,周围淋巴细胞的数量显著减少,表明应激对免疫系统有深刻的影响^[10].在本实验条件下,妊娠后期母体营养供应不足,本身就使胎儿处于一种应激状态,营养不良应激造成的胎儿免疫器官生长发育受阻,很可能损害新生羔羊的免疫能力甚至免疫系统.这也可能部分解释了出生后羔羊高发病率和死亡率的原因.另外,本实验条件下,妊娠后期限饲母羊不仅严重限制了其初生羔羊的脾脏和胸腺的生长发育,并且随着母体营养水平的降低,从中枢免疫器官到外周免疫器官的受影响范围和程度也逐步扩大.免疫器官对营养水平的敏感性不同,从免疫系统角度出发,中枢免疫器官作为免疫细胞分化成熟的场所,有利用营养物质的优先权,相对不易受到营养水平的影响,而以牺牲外周免疫器官为代价得到保护的目.

胸腺是由皮质和髓质构成的实体性器官.进入胸腺的淋巴细胞在从皮质浅层向深层迁移并逐渐分化,只有少数成熟而进入髓质,经毛细血管迁至周围淋巴器官.本实验中,萎缩造成的各组羔羊胸腺皮质变厚,髓质缩小,影响了T淋巴细胞的分化成熟,导致迁移到脾脏动脉周围淋巴鞘T淋巴细胞数量越来越少,密度逐渐降低.而RG2组胸腺略有增大是对胸腺功能低下的部分代偿.Amiel-Tison等认为在一定的限度下,子宫不良环境应激造成胎儿的组织器官发育加速,如肺脏和脑等.但当应激超过一定的阈值水平,胎儿的不良症状将表现出来.

这也是本实验中 RG1, RG2 组胸腺受限制程度不同的又一原因^[9].

CD3 与 T 细胞受体非共价连接, 组成 T 淋巴细胞识别抗原受体复合体 (TCR/ CD3), 是 T 淋巴细胞的主要表面标志. CD3 与 TCR 在表达和功能方面是相互依赖的, TCR 识别抗原后刺激信号是通过 CD3 分子传递的. 在血液中, CD21 主要分布于 B 细胞, 是反映机体体液免疫的重要指标之一. CD14 是单核细胞的标志性抗原, 单核细胞体现着机体的非特异性免疫状况. 在本实验中, 随着营养水平的降低, RG1, RG2 及 CG 组羔羊血中 CD3 依次表现出降低的趋势, 其中 RG1 组与对照组差异显著 ($p < 0.05$). 而 CD14, CD21 水平各组差异不显著 ($p > 0.05$). CD3 是检测机体细胞免疫功能的重要指标之一, 因母体营养限制而导致的 RG1 组初生羔羊 CD3 水平的降低, 反映出其细胞免疫受到影响, 而机体的体液免疫、非特异性免疫状况受影响不显著.

总之, 妊娠后期胎儿宫内生长受限严重影响了新生羔羊脾脏和胸腺的生长发育, 限制了羔羊的细胞免疫能力. 然而, 营养限制是否对羔羊的免疫系统造成不可逆的影响而导致今后免疫能力的减弱, 需通过胎儿期受营养限制羔羊的营养恢复实验进一步研究.

致谢 本实验中得到了内蒙古农业大学动物科学学院的荀崇文、王纯洁教授、王秀梅高级实验师和王凤龙教授的大力支持与帮助, 在此表示衷心的感谢.

感谢.

参 考 文 献

- 1 Coulter C L, McMillen I C, Bird I M, et al. Steroidogenic acute regulatory protein expression is decreased in the adrenal gland of the growth restricted sheep fetus during late gestation. *Biology of Reproduction*, 2002, 67: 584—590
- 2 Osgerby J C, Wathes D C, Howard D, et al. The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. *Journal of Endocrinology*, 2002, 173: 131—141
- 3 Kramer M S, Olivier M, McLean F H, et al. Impact of intrauterine growth retardation and body proportionality on fetal and neonatal outcome. *Pediatrics*, 1990, 86: 707—713
- 4 吴庶青, 侯先志, 赵志恭, 等. 苏尼特羊妊娠后期限制饲养对其羔羊初生重的影响. *动物营养学报*, 2003, 15: 59—62
- 5 高峰, 侯先志, 吴庶青, 等. 妊娠后期限制饲养母羊所产羔羊补偿生长的研究. *内蒙古农业大学学报*, 2002, 4: 18—22
- 6 杨 胜. 饲料分析及质量检测技术. 北京: 北京农业大学出版社, 1993
- 7 Beisel W R. History of nutritional immunology: Introduction and overview. *Journal of Nutrition*, 1992, 122, 591—596.
- 8 Bauer M K, Breier B H, Harding J E, et al. The fetal somatotropic axis during long term maternal undernutrition in sheep: Evidence for nutritional regulation in utero. *Endocrinology*, 1995, 136: 1250—1257
- 9 Amiel-Tison C, Cabrol D, Denver R, et al. Fetal adaptation to stress Part I: Acceleration of fetal maturation and earlier birth triggered by placental insufficiency in humans. *Early Hum Dev*, 2004, 78: 15—27
- 10 林静竹. 宫内发育迟缓. 北京: 人民卫生出版社, 1989, 146—149