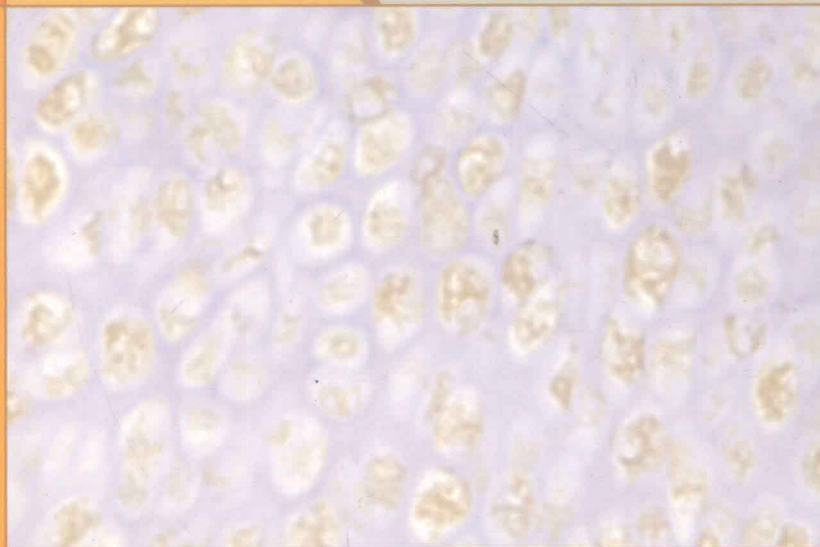


肉鸡胫骨软骨 发育不良的研究

◎ 田文霞 著



中国农业科学技术出版社

肉鸡胫骨软骨 发育不良的研究

◎ 田文霞 著

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

肉鸡胫骨软骨发育不良的研究 / 田文霞著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2011. 12

ISBN 978 - 7 - 5116 - 0786 - 7

I. ①肉… II. ①田… III. ①肉鸡 - 胫骨 - 发育异常 - 研究
②肉鸡 - 软骨 - 发育异常 - 研究 IV. ①S858.31

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 275950 号

责任编辑 朱 绯

责任校对 贾晓红

出 版 者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010)82106626 (编辑室) (010)82109704 (发行部)
(010)82109703 (读者服务部)

传 真 (010)82109707

网 址 <http://www.castp.cn>

经 销 者 各地新华书店

印 刷 者 北京科信印刷有限公司

开 本 880mm × 1 230mm 1/32

印 张 4.625

字 数 125 千字

版 次 2011 年 12 月第 1 版 2011 年 12 月第 1 次印刷

定 价 30.00 元

内容提要

肉鸡胫骨软骨发育不良 (Tibial Dyschondroplasia, TD) 是肉鸡常见的骨骼疾病之一, 以骺板成熟面形成不能血管化、不能矿化的软骨栓为特点。TD 的发生与生长速度、遗传选育、日粮调配、非营养因素等有关。目前, 肉鸡 TD 给世界肉鸡养殖业造成了巨大的经济损失。因此, 肉鸡 TD 的发病机理和防治研究仍是目前世界禽病研究的热点之一。本书共分 4 部分, 对肉鸡 TD 作了全面概述, 介绍了研究肉鸡 TD 常用的方法, 以福美双诱发肉鸡 TD 为模型, 描述了早期不同阶段临床症状、病理剖检特点、组织病理学变化、超微结构特征、抑制性消减杂交及基因芯片筛选的差异表达基因及其基因本体 (Gene Ontology, GO) 功能注释、聚类及生物学通路, 并对肉鸡 TD 发病的分子机理进行深入探讨, 希望本书能为相关领域工作者的工作和研究提供一些参考, 为抗 TD 肉鸡品种选育、治疗药物分子设计提供理论依据。

作者简介

田文霞，女，现任职于山西农业大学，作者在攻读博士学位期间，参与国家自然科学基金“肉鸡胫骨软骨发育不良差异表达基因的分离及其时序性表达研究”课题的研究（30571370），并完成了结题报告的撰写工作。2008年3月，作者进入华中农业大学博士后流动站后，继续从事肉鸡胫骨软骨发育不良（TD）的研究，并先后申请到第43批中国博士后科学基金面上二等资助（20080430984）、山西省自然科学基金面上项目（2009011043-1）、国家自然科学基金面上项目（31072179）以及山西农业大学博士启动基金，同时还指导大学生申请科技创新课题4项，其中一项获得省教育厅强校工程资助。作者多年的科学研究集中于肉鸡TD发病机理方面，在 *Avian Pathology*、《中国农业科学》、《畜牧兽医学报》、《中国兽医学报》等国内外核心期刊上发表论文20余篇。

前 言

近年来，养禽业突飞猛进，现代集约化生产得到普遍推广。家禽育种学采用现代的育种理论，不断推出新品种，遗传性能得到了不断优化，再加上高品质的日粮，充分发挥肉鸡的遗传潜力，并采用高密度的工厂化生产，以达到高投入高产出的目的。但这势必会出现一系列问题，近年来危害越来越严重的养鸡业三大疾病（即肉鸡猝死综合症、腿病和腹水症），给养禽业带来巨大的经济损失。

肉鸡胫骨软骨发育不良（Tibial dyschondroplasia, TD；以下简称 TD）的发生会引起肉鸡品质和产量的下降，严重影响养鸡业，已成为家禽学及禽病专家亟待解决的热点难点之一。它又作为人类及动物某些骨软骨疾病研究的动物模型，引起骨软骨病、Bniest 软骨病及 KashaniBeek 病研究者的关注。

目前，虽然对肉鸡 TD 发病原因和分子机理进行了广泛研究，但由于病因复杂，其致病机理仍然不清楚。研究参与调控肉鸡 TD 生长板软骨细胞发育的调节基因及其调节通路，对全面认识软骨内成骨机制、揭示肉鸡 TD 发病机理具有重要意义，为遗传选育消除机能紊乱和防治 TD 发生开辟了新的途径，同时也可为人及其他动物的骨发育障碍疾病的研究提供有科学价值的信息。

作者长期对肉鸡 TD 发病机制进行了高度关注和深刻思考，故积累了大量的 TD 研究资料，积淀了丰富的科研体会，作者参

考诸多相关文献，对多年来本领域的研究报道和自己近几年的科研成果进行整理，编著此书《肉鸡胫骨软骨发育不良的研究》。本书对肉鸡胫骨软骨发育不良的研究成果进行了全面系统地介绍，旨在与同行们切磋，给科研及临床工作者以参考，为推进肉鸡 TD 更深入的研究、肉鸡 TD 的有效防治及抗肉鸡 TD 品种的遗传选育提供理论指导。

在此，特别感谢国家自然科学基金、中国博士后科学基金、山西省自然科学基金以及山西农业大学博士启动基金对本书出版的资助。同时非常感谢我的指导老师毕丁仁教授、郭定宗教授、潘思轶教授等对我的精心培养，也感谢华中农业大学各位老师的热情帮助以及山西农业大学动物科技学院领导和老师的大力支持。谢谢大家！

本书稿由巩红霞等负责审校，在编写此书过程中，尽管在写作方面反复推敲、几经修改，也难免存在疏漏之处，敬请各位专家、读者批评指正！

著者

2011 年 12 月

缩略词表

缩写	英文名称	中文名称
ALP	alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
ATF - 2	activating transcription factor - 2	活化转录调控因子 - 2
BMP	bone morphogenetic protein	骨形态发生蛋白
bp	Base pair	碱基对
BSP	Bone sialoprotein	骨涎（唾液）蛋白
CA2	carbonic anhydrase II	碳酸酐酶 II
Cbfa1	core binding factor a1	核结合因子 a1
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	钙黏蛋白 1
CDH3	cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)	钙黏蛋白 3
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
ChM - I	Chondromodulin - I	血管生成抑制因子 - I
Col I	Type I collagen	I 型胶原
Col II	Type II collagen	II 型胶原
Col IX	Type IX collagen	IX 型胶原
Col X	Type X collagen	X 型胶原
Col XI	Type XI collagen	XI 型胶原
COMP	Cartilage oligomer matrix protein	软骨低聚物基质蛋白
CYCS	Cytochrome C, somatic	细胞色素 c
COX III	Cytochrome C oxidase III	细胞色素 c 氧化酶 III
cRNA	Complementary RNA	互补 RNA

(续表)

缩写	英文名称	中文名称
DEPC	diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DIG	Digoxigenin	地高辛
ECM	extracellular matrix	细胞外基质
ENO1	Enolase 1	烯醇酶 1
ENO2	Enolase 2	烯醇酶 2
EST	expression sequence tag	可表达序列标签
FGF	fibroblast growth factor	成纤维细胞生长因子
Fgfr	fibroblast growth factor receptor	成纤维细胞生长因子受体
GF	growth factor	生长因子
GO	Gene ontology	基因本体论
HIF-1 α	Hypoxia inducing factor-1 α	低氧诱导因子-1 α
HP	histopathology	组织病理学
Hsp25	heat shock protein 25	热休克蛋白 25
Hsp70	heat shock protein 70	热休克蛋白 70
Hsp90	heat shock protein 90	热休克蛋白 90
ID1	inhibitor of DNA binding 1	DNA 结合 1 抑制剂
IH	immunohistochemistry	免疫组织化学
IHH	Indian Hedgehog	
ILGF	insulin-like growth factor	胰岛素样生长因子
LRP11	low density lipoprotein receptor-related protein 11	低密度脂蛋白受体相关蛋白 11
ISH	In situ hybridization	原位杂交
KNT1	kinectin 1 (kinesin receptor)	动联蛋白 1 (驱动蛋白受体)
LDHA	lactate dehydrogenase A	乳酸脱氢酶 A
LOX	lysyl oxidase	赖氨酸氧化酶

(续表)

缩写	英文名称	中文名称
LOXL1	lysyl oxidase - like 1	赖氨酸氧化酶样 1
MATN3	Matrilin - 3	
MDH	malate dehydrogenase	苹果酸脱氢酶
mg	Milligram	毫克
MMP	matrix metalloproteinase	基质金属蛋白酶
min	Minute	分钟
mL	Milliliter	毫升
mRNA	messenger RNA	信使核糖核酸
MW	Molecular weight	分子量
NADH DH	NADH dehydrogenase	NADH 脱氢酶
NDUFA8	NADH dehydrogenase (ubiquinone)1 alpha-subcomplex, 8	NADH 脱氢酶 1 alpha 亚单位 8
nt	nucleotide	核苷酸
OD	optical density	光密度
OPN	osteopontin	骨桥蛋白
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PG	proteoglycans	蛋白聚糖
PG	prostaglandin	前列腺素
PKC	protein kinase	蛋白激酶 C
PTH	parathyroid hormone	甲状旁腺激素
PTHrP	parathyroid hormone related peptide	甲状旁腺激素相关肽
Rgs2	regulator of G - protein signaling 2	G 蛋白信号 2 调节因子
RNase	Ribonuclease	核糖核酸酶
RPS16	ribosomal protein S16	核糖体蛋白 S16

(续表)

缩写	英文名称	中文名称
RT - PCR	reverse transcription - PCR	逆转录 - 聚合酶链式反应
sqRT - PCR	semi - quantitative RT - PCR	半定量 RT - PCR
SDH	succinate dehydrogenase	琥珀酸脱氢酶
SFRP4	secreted frizzled - related protein 4	分泌型卷曲相关蛋白 4
SSH	suppression subtractive hybridization	抑制消减杂交
TD	Tibial dyschondroplasia	肉鸡胫骨软骨发育不良
TGF	transforming growth factor	转录生长因子
thiram	tetramethylthiuram disulphide	福美双
TRAP	tartrate - resistant acid phosphatase	酸性磷酸酶
VDR	Vitamin D receptor	维生素 D 受体
VEGF	vascular endothelial cell growth factor	血管内皮细胞的生长因子

目 录

缩略词表	I
第一部分 胫骨软骨发育不良基本知识	1
一、胫骨软骨发育不良的概念	1
二、正常胫骨软骨发育	2
三、胫骨软骨发育不良的原因	5
四、胫骨软骨发育不良的特征	8
五、胫骨软骨发育不良的研究历史	11
第二部分 胫骨软骨发育不良的研究方法	16
一、一般光学显微技术	16
二、电子显微技术	18
三、免疫细胞化学技术	19
四、原位杂交技术	21
五、半定量 PCR 技术	24
六、实时荧光定量 PCR 技术	26
七、差异显示技术	31
八、抑制性消减杂交技术	34
九、基因芯片技术	41
十、蛋白质组学技术	43

第三部分 动物模型建立 46

 一、短期饲喂福美双诱发肉鸡 TD 模型 47

 二、相同剂量福美双诱发肉鸡 TD 模型 48

 三、不同剂量福美双诱发肉鸡 TD 模型 55

第四部分 模型复制结果分析 58

 一、肉鸡胫骨软骨发育不良病理组织学分析 58

 二、肉鸡胫骨软骨发育不良超微结构变化 70

 三、胫骨软骨发育不良差异表达基因的筛选 77

 四、胫骨软骨发育不良分子机制 95

 五、胫骨软骨发育不良代谢途径..... 116

 六、胫骨软骨发育不良的预防..... 121

参考文献..... 123

第一部分 胫骨软骨发育不良基本知识

近年来，养禽业突飞猛进，现代集约化生产得到普遍推广。家禽育种学采用现代的育种理论，不断推出新品种，遗传性能得到了不断优化，再加上高品质的日粮，充分发挥肉鸡的遗传潜力，并采用高密度的工厂化生产，以达到高投入高产出的目的。但这势必会出现一系列问题，近年来危害越来越严重的养鸡业三大疾病（即肉鸡猝死综合症、腿病和腹水症），给养禽业带来巨大的经济损失。

肉鸡胫骨软骨发育不良的发生会引起肉鸡品质和产量的下降，严重影响养鸡业，已成为家禽学及禽病专家亟待解决的热点难点之一。它又作为人类及动物某些骨软骨疾病研究的动物模型，引起骨软骨病、Bniest 软骨病及 KashcniBeek 病研究者的关注。

一、胫骨软骨发育不良的概念

胫骨软骨发育不良（Tibial dyschondroplasia, TD；以下简称TD）是家禽胫跗骨近端生长板软骨细胞发育异常，导致运动障碍和站立困难的群发性疾病，表现为骺板成熟面形成不能血管化、矿化的软骨栓（Leach and Nesheim, 1965；Whitehead *et al.*, 1997；朱连德等，1996）。本病1965年由Leach和Nesheim首次发现，常见于生长速度快的肉鸡、火鸡和鸭，而生长缓慢的来航鸡不常见。在肉鸡中发病率达到40%~60%，相似的疾病也发

生在猪、牛、马、狗、兔、鼠及人类。据报道，自发或人工诱发胫骨软骨发育不良患鸡，发病时间最早在1~2周龄肉鸡和火鸡群中，高达30%的鸡有软骨发育异常的病变，但大多数病鸡并不显临床症状。TD病鸡伴发跛行发生率为1%~40%，亚临床病变发生率为26%~60%。病鸡胫骨的干骺区域脆弱，导致近跗跖骨弯曲，畸形和腓骨骨折增加。TD肉鸡4周龄，火鸡10周龄后常出现瘸腿，表现行走困难，步态呆板，重者不能站立行走。TD导致肉鸡抗病性能下降和生产性能降低，诱发胸部囊肿和骨髓炎，降低鸡肉的品质和等级。

二、正常胫骨软骨发育

1. 正常胫骨软骨生长板结构特点

骨骼的生长发生在特定的软骨区即生长板，位于所有长骨的两端。生长板呈半透明胶质状，负责骨的生长速率和骨的长度。其组成为软骨细胞和细胞外间质。细胞外间质分为4种主要组分，包括胶原蛋白、蛋白多糖、弹性蛋白和软骨黏接糖蛋白。生长板可以分为静止区、增生区和肥大区3部分。

静止区位于关节软骨下面，紧挨骺次级骨化中心。软骨细胞呈球形，大小与增生区相差不多。该区血管化程度、灰分和蛋白多糖含量很低。

增生区软骨细胞扁平，排列成长柱状。顶部细胞不断分裂增殖，保证了生长板的持续生长。该区血管丰富，血压较高，细胞贮存的糖原通过有氧氧化提供能量。

肥大区软骨细胞变为圆形，体积增大。基质中氧和养分供给愈来愈少，细胞采用无氧酵解。该区软骨细胞胶原酶分泌量和活性增加，碱性磷酸酶（ALP）合成增加。胶原酶降解基质使细胞不断扩大，降解胶原以有利于血管穿入（Blar, 1989）。另外，该区软骨细胞只合成X型胶原（Col X），Ⅱ型胶原（Col II）

和XI型胶原 (Col XI) 产量很少。Col X在基质矿化过程中起到重要作用。它能与 Col II 形成共价交联, 从而在纤维间点上直接产生矿化作用。该区软骨细胞还分泌内皮细胞刺激血管生成因子, 在体外能激活胶原酶, 它可能与体内其他因子一起参与血管的生成过程。距干骺端血管最近的软骨细胞氧化代谢能力强, 能够从血中转运钙 (Ca)、磷 (P) 离子进入基质中。在该区底部, 干骺端血管通过吞噬细胞 (如破软骨细胞和巨噬细胞) 及内皮细胞的作用, 穿过这些软骨细胞而进入软骨。成骨细胞在钙化的软骨上沉积骨组织。最后, 基质被吸收, 并被骨小梁取代 (图 1-1)。

2. 正常胫骨软骨发育特征

软骨生长的特征是生长板静止软骨细胞在精确时间和空间内增殖和分化为前肥大软骨细胞和肥大软骨细胞, 它们分泌细胞基质, 为骨骼的形成提供空间结构, 之后伴随着肥大软骨细胞矿化, 周围的毛细血管由骨膜侵入到矿化的组织区, 同时破骨细胞和成骨细胞分泌骨基质逐渐代替矿化的软骨基质完成钙化。软骨细胞的增殖、基质代谢以及软骨细胞形状和大小的改变是 3 个基本要素, 它们在骨干延伸期间受到精细地调控, 完成细胞和基质间快速、特异地交替。长骨的生长受控于生物力学因素和众多全身的、局部的生长因子, 它们之间相互作用调控软骨细胞生长板的活动。

复杂的调节因子和信号调节网络参与软骨细胞与细胞间、细胞与基质间的相互作用, 调节基因表达, 维持细胞正常有序的增殖、分化、肥大和凋亡过程。目前, 已经发现了许多调节长骨生长的蛋白分子家族包括: 生长因子, 如骨形态蛋白、成纤维细胞生长因子家族 (FGF)、胰岛素样生长因子 (ILGF)、G 蛋白信号 2 调节因子 (Rgs2) 等 (James *et al.*, 2005); 转录因子, 如 Sox9、核结合因子 a1 (Cbfa1) 和活化转录调控因子 2 (ATF-

2) 等。

禽类生长板的增殖区软骨细胞排列成柱状 (图 1-1), 与哺乳动物不同, 因密度大而且细胞外基质较少而不容易被区分 (Howlett, 1979)。在增殖区, 细胞呈扁球状, 鸡生长板分裂的软骨细胞约为 24% (Farquharson *et al.*, 1992a), 分裂停止后软骨细胞立即开始分化 (Breur *et al.*, 1994), 体积增大呈圆球状, 粗面内质网和高尔基体增多, 体现为基质的增多。胞浆膜 ALP 活性随之增强, Col X 合成, Col II 下调, 骨结合素和骨桥蛋白 (OPN) 被分泌, 维生素 D 受体 (VDR) 表达。软骨细胞从增殖到末端分化的时间因种属而异, 家兔需要 96h, 肉鸡大约需要 21h (Thorp, 1988), 而人和鼠生长板的增殖细胞的平均周期分别是 20d 和 2d (Kember *et al.*, 1976)。

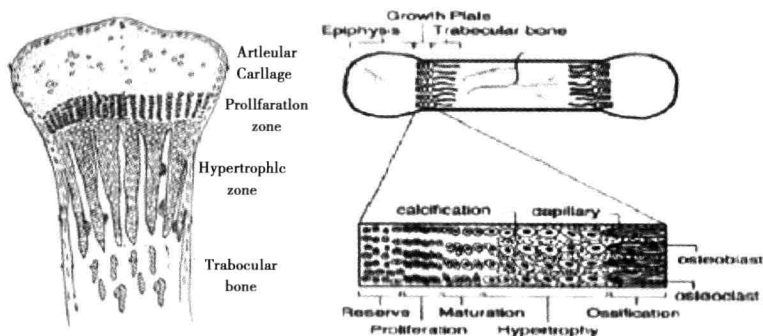


图 1-1 鸡胫骨软骨生长板图示 (Pines, 2005)

生长板软骨细胞包括静止、增殖、前肥大、肥大软骨细胞

外界因素的干扰、相关调节因子的表达紊乱、以及动物本身遗传缺陷都能够阻断生长板软骨细胞生长分化基因表达的时序性, 导致长骨的生长受损, 出现诸如骨关节炎、软骨症和异位骨形成等病理改变 (Radhakrishnan *et al.*, 2005; Pfander *et al.*,