

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

黃麴毒素及類胡蘿蔔素對鴨免疫反應 影響之研究(3/3)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號： NSC 89 - 2313 - B - 002 - 005

執行期間：88年8月1日至89年7月31日

計畫主持人：陳保基

共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學畜產學系

中華民國 90年 2月 20日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：89-2313-B-002-005

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主 持 人：陳保基 台灣大學畜產系

計畫參與人員：鄭永祥 宜蘭技術學院畜產系

一、中文摘要:

本實驗之目的為探討鴨隻腹腔巨噬細胞經黃麴毒素 B₁ (AFB₁)或混合功能氧化 (MFO)處理後之黃麴毒素 B₁，對巨噬細胞功能、細胞顯微形態及細胞凋亡之影響。

實驗一為鴨腹腔巨噬細胞以不同濃度 AFB₁ (0、5、10、20、50 或 100 μ g/ml) 攻毒 12 小時後，顯示在 5 及 10 μ g/ml 時，即使存活百分率顯著下降；而 AFB₁ 經混合功能氧化 代謝者，其下降程度大於單獨 AFB₁ 處理者。無論有無調理，吞噬能力均隨 AFB₁ 濃度升高而下降。在 50 及 100 μ g/ml AFB₁ 時，經 MFO 代謝之 AFB₁ 之吞噬能力百分率較單獨 AFB₁ 處理者低 2~3%。在形態學上之變化方面，亦可見 AFB₁ 含量增加，使細胞受損百分率上升，且以 MFO 代謝 AFB₁ 者之受損百分率高於單獨 AFB₁ 者。此外，在脂多醣(lipopolysaccharides; LPS)存在下，顯著提高 TNF- α 相似物質之分泌，且無論 AFB₁ 有無經 MFO 代謝，其細胞毒殺百分比均較無 LPS 存在下之其他 AFB₁ 劑量為高。在 LPS 刺激下，隨 AFB₁ 劑量升高，其細胞毒殺性下降。

實驗二之結果顯示，黃麴毒素(20 μ g/ml)濃度攻毒後，於 12 小時至 48 小時可發現其細胞顯微形態會有較多細胞由第一型及第二型轉向第三型。而以不同濃度 AFB₁ 0、5、10、20、50 或 100 μ g/ml 攻毒 12 小時後，除對照組外，AFB₁ 攻毒處理均可見 DNA 於瓊脂膠體電泳時，有階梯狀規則排列之片段出現。在凋亡細胞定量上，隨著 AFB₁ 濃度之提高，凋亡細胞之百分率呈直線性上升。

綜合結果顯示，單獨 AFB₁ 或經混合功能氧化 代謝之 AFB₁ 對鴨腹腔巨噬細胞功能，包括存活百分率及形態學變化均具有劑量反應的毒害作用，且以 AFB₁ 經 MFO 代謝者影響較大。無論有無經 MFO 代謝，隨著 AFB₁ 劑量之升高，對吞噬能力及 TNF- α 相似物質分泌亦會導致傷害。顯微形態上觀察，也顯示細胞會朝表面光滑成圓形化趨勢，甚至外觀崩潰，且凝膠電泳結果顯示，DNA 呈現階梯化(laddering)現象，顯見為細胞凋亡之結果。

關鍵詞：黃麴毒素 B₁、巨噬細胞、免疫功能、土番鴨

二、英文摘要:

The purpose of this study was to investigate the effects of AFB₁

treatments (0, 5, 10, 20, 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or treatments of AFB₁ being metabolized in mixed function oxidase (MFO) on the functions of duck peritoneal macrophages were evaluated.

The cell viability and morphology alterations were in dose-response detrimental manner as the concentration of AFB₁ increased, and a greater extent was noticed in MFO-metabolized AFB₁ treatments. Either phagocytotic ability or secretion of TNF- α like substance of macrophages was decreased with the elevation of the concentration of AFB₁. Ultra-structure observation morphology showed that macrophages tended to be smoothling and blebbing on surface, and even to have cellular rupture appearance. In agarose electrophoresis on DNA, it was shown that this ultra-structure morphology alteration probably due to process of apoptosis.

Key words: Aflatoxin B₁, macrophage, immune function, mule duck.

二、計畫緣由與目的

單核巨噬細胞為單核吞噬系統(mononuclear phagocytic system)的一支,且扮演禽畜體內對抗病原菌之第一線的免疫性防禦細胞(Skamene and Gros, 1983),雞隻巨噬細胞可執行各種免疫性功能,包括對外源性粒子之吞噬及細胞和腫瘤細胞的摧毀(Qureshi *et al.*, 1986; Qureshi and Miller; 1991),分泌前列腺素產生細胞激素,以調節淋巴細胞及其他巨噬細胞之活性(Kimball, 1990)。

黃麴毒素具有抑制多種特異性及非特異性免疫反應及細胞免疫功能之作用,如抑制鴨、豬及伴刀豆球蛋白(con A)之網狀內皮系統清除碳粒能力、週邊血液淋巴細胞轉型作用、降低阻礙雞血液單核球之趨化性及擾亂固著性及游走性吞噬細胞的吞噬作用,進而造成疾病抵抗能力下降,降低雞隻巨噬細胞之存活率及功能(Neldon-Ortiz and Qureshi, 1991)。

細胞凋亡(apoptosis)有時候可能是一種病理反應,有時候則為正常生理作用的過程,其功能與活體組織在生理上或病理上的細胞損耗相關,主要的機能在於維持正常組織細胞的恆定性,很顯然地和組織中細胞增殖及細胞分化的調節作用有關,並在控制細胞族群的穩定上扮演調整的功能(Kerr *et al.*, 1972; Wyllie, 1997)。

本試驗之目的為探討鴨隻腹腔巨噬細胞功能經黃麴毒素 B₁ (AFB₁)或混合功能氧化代謝之黃麴毒素 B₁ 處理後,對其細胞功能之影響及黃麴毒素對細胞顯微形態及細胞凋亡之誘發情形。

三、結果與討論

黃麴毒素 B₁ 對鴨腹腔巨噬細胞之細胞毒害作用之影響,結果如表 1。由表 1 中,可見單獨 AFB₁ 處理時隨著濃度之增高,其存活之巨噬細胞百分率隨之下降,在 5~10 μg 時,即顯著較對照組者為低($P < 0.05$),當濃度提高到 100 μg 時,僅為 67.1 \pm 4.9%。AFB₁ 經混合功能氧化代謝後,亦見隨濃度增高而存活百分率直線性下降,且下降之百分率更大於單獨 AFB₁ 處理者,在 100 μg 時,兩者相差

約達 20% (47.8 vs 67.1)。顯見 AFB₁ 在混合功能氧化 代謝後，可明顯增加其對巨噬細胞之毒殺能力。

鴨腹腔巨噬細胞暴露於黃麴毒素 B₁ 時對調理化後及未調理之白色鏈珠菌的吞噬作用影響，結果示於表 2 及表 3。由結果顯示，經調理作用者隨黃麴毒素 B₁ 濃度上升，具吞噬能力之巨噬細胞呈直線性下降；兩種處理均在 10 μg 濃度下，吞噬能力顯著低於對照組。在未經調理作用者，無論是 AFB₁ 或 AFB₁ 經 MFO 代謝者，其具吞噬能力之百分率均隨毒素濃度之上升而降低，濃度在 5 及 10 μg 時，即可見吞噬能力顯著較對照組為低之情形(59.5%和 57.8%)，而 50 及 100 μg 濃度時，更可發現 MFO 代謝 AFB₁ 之具吞噬能力百分率較單獨 AFB₁ 未經代謝者低約 2~3%。早期即已知 AFB₁ 會干擾雞隻血液單核球及火雞腹腔巨噬細胞趨化能力及吞噬能力(Chang and Hamilton, 1979 ; Neldon-Ortiz and Qureshi, 1991) ,

鴨腹腔巨噬細胞暴露於 AFB₁ 時，對形態學變化的影響示於表 4。AFB₁ 濃度上升受損之巨噬細胞即呈線性增加，當濃度在 10 μg 時，單獨 AFB₁ 及 MFO 代謝之 AFB₁，均顯著較對照組增加受損細胞百分率。但亦可發現自 20~100 μg 時，MFO 代謝 AFB₁ 所導致之受損細胞較單獨 AFB₁ 者，增加約 10 個百分率。顯然此一 MFO 代謝可直接提高 AFB₁ 對巨噬細胞之完整性傷害。受損巨噬細胞呈現之特徵有偽足萎縮，Giemsa 染色後細胞核呈顆粒化濃染之現象。

龐(1994)發現黃麴毒素 AFB₁ 可造成豬肺泡巨噬細胞表面的改變，包括有偽足收縮變短及顆粒化細胞膜表面有泡狀突起形成之現象，而此一結果類似自由基所引起之細胞損傷(Hinshaw *et al.*, 1986)。

黃麴毒素 B₁ 及脂多醣對鴨腹腔巨噬細胞分泌 TNF- 因子相似物質之影響，示於表 5。在單獨 AFB₁ 處理時，濃度在 5~50 μg/ml 時，TNF- 相似物質對 PK15 之毒殺約在 33~41%範圍間，但 5 μg/ml 比其他劑量組，有顯著較高之 TNF- 相似物質分泌，且 LPS 刺激時，細胞毒殺作用亦顯著較其他處理組及其他單獨 AFB₁ 劑量為高。LPS 存在下，AFB₁ 無論有無 MFO 代謝時，隨劑量之升高，細胞毒殺百分率並無隨之下降，經 MFO 代謝活化者，僅在 AFB₁ 濃度為 5 μg/ml 時之細胞毒殺百分率顯著高於未經 MFO 代謝活化者。

巨噬細胞在經由活化物質，如淋巴激素和 LPS 刺激而產生 TNF- 相似物質(Hamilton and Adams, 1987)。已知雞隻巨噬細胞株可產生低濃度之 TNF- 相似物質，不過在經 LPS 刺激後，TNF- 相似物質濃度可增加數倍之譜(Qureshi and Hagler., 1992)。在本試驗結果顯示，AFB₁ 處理會抑制 TNF- 相似物質之分泌，與先前之報告指出，AFB₁ 處理會抑制巨噬細胞之細胞激素產生的結果相似(Moon *et al.*, 1999)。

由電泳結果顯示，鴨腹腔巨噬細胞經黃麴毒素 5、10、20、50 或 100 μg/ml 攻毒 12 小時後，均可見到明顯之 DNA ladder 現象，而對照組則無。細胞凋亡反應的形態特徵為：細胞質中較少產生明顯變化，主要係在於細胞核內的變化，包含廣泛性地出現染色質凝塊(chromatin clumping)、核破裂(nuclear fragmentation)、細胞質濃縮及核膜出現如水泡般的突起等。以 DNA ladder 之觀察最為直接，由於發生細胞凋亡時細胞核內核酸 被活化，將位於 nucleosome

之間未與 histone 纏繞的 DNA 切割，可得到 185-200 bp 間隔，如同階梯一樣排列之電泳圖(Wyllie, 1980)。

在細胞凋亡之定量上，藉由 Annexin -V 染劑與 phosphatidylserine 呈特異性結合，可供辨識凋亡細胞(Vermes *et al.*, 1995)，再經由 propidium iodide 染色，可辨識壞死細胞(necrosis)。於螢光顯微鏡下，觀察到凋亡細胞呈綠色，而壞死細胞者，可同時染上述兩種染劑而呈黃綠色。鴨腹腔巨噬細胞暴露於不同濃度 0 (control), 5, 10, 20, 50 及 100 $\mu\text{g/ml}$ AFB₁，經 12 時後，細胞凋亡百分率變化。隨著 AFB₁ 濃度之提高，凋亡細胞之百分率直線性上升，分別為 4.0, 9.6, 34.5, 52.8, 61.2 及 86.7%，其中以 AFB₁ 濃度由 50 $\mu\text{g/ml}$ 增加至 100 $\mu\text{g/ml}$ 時，凋亡細胞百分率增加 25.5%為最高。AFB₁ 對細胞顯微形態變化之影響(表 3-6)，黃麴毒素(20 $\mu\text{g/ml}$)攻毒後，於 12 小時至 48 小時均可發現顯著($P < 0.01$)較對照組者，其細胞顯微形態有較多細胞由第一型及第二型轉向第三型。

綜合本試驗結果顯示，AFB₁ 或 AFB₁ 經 MFO 代謝後，對鴨隻巨噬細胞功能，包括存活率、形態學及吞噬能力均具有毒害作用。AFB₁ 經 MFO 代謝後，在存活率及形態學改變上，比未經代謝處理者有較明顯危害。無論有無 LPS 刺激，TNF- α 相似物質之分泌會因 AFB₁ 存在而下降，但無劑量反應現象。顯微形態上觀察也顯示細胞會朝表面光滑成圓形化趨勢，甚至外觀崩潰，且凝膠電泳結果顯示，DNA 呈現階梯化(laddering)現象，顯見為細胞凋亡之結果。

表 1. 黃麴毒素 B₁ 對鴨腹腔巨噬細胞之細胞毒害作用的影響(實驗一)

Table 1. Cytotoxic effect of aflatoxin AFB₁ (AFB₁) exposure on mule duck peritoneal macrophages(experiment 1)

Concentration of AFB ₁ ($\mu\text{g/ml}$)	Viability (%)		Significance level
	Without MFO* -activation	With MFO-activation	
0	100 \pm 0.0 ^a	100 \pm 0.0 ^a	NS
5	94.9 \pm 3.3 ^b	86.4 \pm 2.7 ^b	**
10	95.5 \pm 1.4 ^b	86.8 \pm 2.9 ^b	**
20	84.2 \pm 3.2 ^c	76.2 \pm 2.1 ^c	**
50	84.6 \pm 1.8 ^c	71.3 \pm 2.0 ^d	**
100	67.1 \pm 4.9 ^d	47.8 \pm 3.1 ^e	**

* MFO : 混合功能氧化 (mixed function oxidase)。

資料以平均值 \pm 標準偏差表示，為 3 次實驗，每次實驗每處理為 6 重複之結果。

Data presented as means \pm SD, there were 6 replicates per treatment, and the experiment were done for three times.

** 表示 AFB₁ 未經 MFO 活化處理與 AFB₁ 經 MFO 活化處理間具有顯著差異(P

< 0.01) , NS 表無顯著差異。

** There were significant difference between MFO-activation and without MFO-activation, NS: No significant difference.

a-e,同欄中具有不同上標者 , 表顯著差異(P < 0.05)。

a-e : Means in the same column without common superscripts differ significantly (P<0.05).

表 2.鴨腹腔巨噬細胞暴露於黃麴毒素 B1 時對調理化之白色鏈珠菌吞噬作用的影響(實驗一)

Table 2. Effect of Aflatoxin B1 exposure on the potential of phagocytosis on opsonized *Candida albicans* by duck peritoneal macrophages (experiment 1)

Concentration of AFB1 ($\mu\text{g/ml}$)	% of phagocytic macrophage		Significance level
	Without MFO*-activation	With MFO-activation	
0	62.3 \pm 1.3 ^a	62.3 \pm 1.4 ^a	NS
5	60.1 \pm 3.0 ^a	61.8 \pm 1.3 ^a	NS
10	56.4 \pm 1.6 ^b	56.3 \pm 2.6 ^b	NS
20	55.3 \pm 2.0 ^b	53.9 \pm 3.3 ^b	NS
50	36.9 \pm 1.1 ^c	35.3 \pm 1.7 ^c	NS
100	35.6 \pm 1.7 ^c	33.2 \pm 2.3 ^c	NS

* MFO : 混合功能氧化 (mixed function oxidase)。

資料以平均值 \pm 標準偏差表示 , 為 3 次實驗 , 每次實驗每處理為 6 重複之結果。
Data presented as means \pm SD, there were 6 replicates per treatment, and the experiment were done for three times.

NS 表無顯著差異。 NS: No significant difference.

a-c : 同欄中具有不同上標者 , 表顯著差異(P < 0.05)。

a-c : Means in the same column without common superscripts differ significantly (P<0.05).

表 3. 鴨腹腔巨噬細胞暴露於黃麴毒素 B1 時對未調理化之白色鏈珠菌吞

噬作用的影響(實驗一)

Table 3. Effect of Aflatoxin B1 exposure on phagocytosis of unopsonized *Candida albicans* by mule duck peritoneal macrophages(experiment 1)

Concentration of AFB1 ($\mu\text{g/ml}$)	% of phagocytic macrophage		Significance level
	Without MFO*-activation	With MFO-activation	
0	62.6 \pm 1.6 ^a	62.9 \pm 1.2 ^a	NS
5	59.5 \pm 0.9 ^b	60.8 \pm 1.1 ^{ab}	NS
10	56.4 \pm 1.9 ^c	57.8 \pm 2.0 ^{bc}	NS
20	56.5 \pm 0.8 ^c	56.6 \pm 1.3 ^c	NS
50	37.9 \pm 1.5 ^d	34.8 \pm 1.6 ^d	NS
100	35.8 \pm 1.0 ^d	33.7 \pm 3.8 ^d	NS

* MFO : 混合功能氧化 (mixed function oxidase)。

資料以平均值 \pm 標準偏差表示，為 3 次實驗，每次實驗每處理為 6 重複之結果。

Data presented as means \pm SD, there were 6 replicates per treatment, and the experiment were done for three times.

NS:表無顯著差異。NS: No significant difference.

a-d,同欄中具有不同上標者，表顯著差異(P < 0.05)。

a-d : Means in the same column without common superscripts differ significantly (P<0.05).

表 4.鴨腹腔巨噬細胞暴露於黃麴毒素 B1 時對形態學變化的影響(實驗一)

Table 4. Morphological alterations of mule duck peritoneal macrophages after exposure to aflatoxin B₁ (experiment 1)

Concentration of AFB ₁ (μg/ml)	Damaged macrophages [†] (%)		Significance level
	Without MFO*-activation	With MFO-activation	
0	3.1±0.4 ^d	3.4±0.2 ^e	NS
5	3.4±0.2 ^d	3.2±0.2 ^e	NS
10	6.6±0.3 ^c	7.4±0.9 ^d	NS
20	7.0±1.0 ^c	16.7±1.0 ^c	**
50	12.2±0.9 ^b	22.8±2.2 ^b	**
100	24.7±2.8 ^a	34.8±3.0 ^a	**

[†] 以不同濃度 AFB₁ 處理後之鴨腹腔巨噬細胞，經 Giemsa stain 染色後，逢機取 2 塊蓋玻片共 6 個視野，於 1000X 顯微鏡下觀察計數，以具有細胞核不完整及細胞質泡狀化(blebbing)者，視為受損之巨噬細胞。

* MFO : 混合功能氧化 (mixed function oxidase)。

資料以平均值±標準偏差表示，為 3 次實驗，每次實驗每處理為 6 重複之結果。

Data presented as means±SD, there were 6 replicates per treatment, and the experiment were done for three times.

** 表示 AFB₁ 未經 MFO 活化處理與 AFB₁ 經 MFO 活化處理間具有顯著差異(P < 0.01), NS:表無顯著差異。

** There were significant difference between MFO-activation and without MFO-activation, NS: No significant difference. NS: No significant difference. , NS: No significant difference.

a-e,同欄中具有不同上標者，表顯著差異(P < 0.05)。

a-e : Means in the same column without common superscripts differ significantly (P<0.05).

表 5.黃麴毒素 B₁ 及脂多醣對鴨腹腔巨噬細胞分泌 TNF 相似物質之影響(實驗一)

Table 5. Change of TNF-like substance secretion by duck peritoneal macrophage after exposure to aflatoxin B1 and lipopolysaccharides (LPS) (experiment 1)

Treatment		cytotoxicity (%)		Significance level
		Without MFO* -activation	With MFO-activation	
LPS (10 µg/ml)	AFB1 (µg/ml)			
----	0	----	----	----
----	5	41.4±4.8 ^c	40.8±3.3 ^c	NS
----	10	34.9±3.6 ^d	37.0±1.7 ^d	NS
----	20	35.9±2.6 ^d	35.4±1.8 ^d	NS
----	50	34.6±2.5 ^d	36.1±2.0 ^d	NS
----	100	33.2±3.0 ^d	34.6±2.4 ^d	NS
10	0	62.7±0.8 ^a	63.1±2.0 ^a	NS
10	5	53.1±2.4 ^b	62.4±2.5 ^a	**
10	10	54.0±2.8 ^b	55.6±2.6 ^b	NS
10	20	53.5±1.9 ^b	55.0±2.7 ^b	NS
10	50	53.0±2.6 ^b	55.4±1.8 ^b	NS
10	100	52.2±1.9 ^b	53.9±1.5 ^b	NS

* MFO : 混合功能氧化 (mixed function oxidase)。

資料以平均值±標準偏差表示，為 3 次實驗，每次實驗每處理為 6 重複之結果。
Data presented as means±SD, there were 6 replicates per treatment, and the experiment were done for three times.

** 表示 AFB1 未經 MFO 活化處理與 AFB1 經 MFO 活化處理間具有顯著差異(P < 0.01)，NS: 表無顯著差異。

** There were significant difference between MFO-activation and without MFO-activation, NS: No significant difference.

a-d, 同欄中具有不同上標者，表顯著差異(P < 0.05)。

a-d : Means in the same column without common superscripts differ significantly (P<0.05).

表 6. 鴨腹腔巨噬細胞經 AFB1 處理後對細胞顯微形態之變化(實驗二)

Table 6. The alteration of cellular ultrastructure in duck peritoneal macrophages after exposure to AFB₁(experiment 2)

暴露於 AFB ₁ 後 之時間 (hr)	Category (%)					
	Control DPM			AFB ₁ 20 μg/ml exposed DPM		
2	3.2±0.5	45.5±1.0	51.3±1.3	3.4±0.5	45.0±1.5	51.6±1.2
6	3.2±0.3	43.8±1.6	53.0±1.7	4.1±0.7	40.1±6.4	56.8±6.8
12 b	4.0±0.2	41.7±3.1	54.3±3.0	2.1±0.5	25.5±4.9	72.4±5.0
24 b	4.4±0.5	37.1±3.2	58.5±3.0	1.8±0.5	6.2±1.8	92.0±1.7
48 b	4.8±0.7	35.0±4.3	60.2±4.7	0.4±0.3	0.8±0.3	98.8±0.6

a 鴨腹腔巨噬細胞經培養於蓋玻片上，形成單層細胞後，再加入終濃度為 20 μg/ml 之 AFB₁ 行攻毒，對照組及攻毒組每一時間處理均為三重複，攻毒時間到時，將細胞以 2.5%戊二醇及 1%四氧化銻行固定，再經酒精脫水、臨界點乾燥及金離子覆膜等步驟，再於掃描式電子顯微鏡下觀察。每一蓋玻片均隨機選取 200 個 DPM 分別計算各範圍中細胞之形態出現比率。

b 表示該時間點下細胞形態變化及 AFB₁ 攻毒有關，且 AFB₁ 之暴露使 DPM 形態轉為第三級變化(P <0.01)。

: DPM 之偽足長而多，且完全伸展，形態健全。

: 細胞偽足較少且有皺縮，表面短小、葉片狀或球狀。

: 細胞偽足完全消失，細胞表面光滑成圓形化，甚至外觀崩潰。

四、計畫成果自評

本研究內容與原計畫相符，並達成探知黃麴毒素對鴨腹腔巨噬細胞之免疫毒害作用，本研究結果具有學術價值，並適合在學術期刊發表。由研究結果中顯示，AFB₁ 或 AFB₁ 經 MFO 代謝後，對鴨隻巨噬細胞功能，包括存活率、形態學及吞噬能力均具有毒害作用。AFB₁ 經 MFO 代謝後，在存活率及形態學改變上，比未經代謝處理者有較明顯危害。無論有無 LPS 刺激，TNF- 相似物質之分泌會因 AFB₁ 存在而下降，但無劑量反應現象。顯微形態上觀察也顯示細胞會朝表面光滑成圓形化趨勢，甚至外觀崩潰，且凝膠電泳結果發現，DNA 呈現階梯化(laddering)現象，顯見黃麴毒素所致之細胞凋亡，在干擾巨噬細胞功能及禽群免疫反應上扮演著重要之角色。

五、參考文獻

- 龐飛。1994。黃麴毒素對豬隻免疫力影響之研究。生命科學簡訊。8(3): 1-9。
- Chang, C. F., and P. B. Hamilton, 1979. Impaired phagocytosis by heterophils from chickens during aflatoxicosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 48: 459-466.
- Hamilton, T. A., and D. O. Adams, 1987. Molecular mechanisms of signal transduction in macrophages. *Immunol. Today* 8:151-158.
- Hinshaw, D. B., L. A. Sklar, B. Bohl, I. U. Schraufstatter, P. A. Hyslop, M. W. Rossi, R. G. Spragg, and C. G. Cochane, 1986. Cytoskeletal and morphological impact of cellular oxidant injury. *Am. J. Pathol.* 123:454-464.
- Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie, and A. R. Currie, 1972. Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British. J. Cancer.* 16 : 239-257.
- Kimball, J. W., 1990. Introduction to immunology. Macmillan. Publishing Co., New York ; NY.
- Moon, E. Y., D. K. Rhee, and S. Pyo, 1999. In vitro suppressive effect of aflatoxin B₁ on murine peritoneal macrophages functions. *Toxicol.* 171-179.
- Neldon-Ortiz, D.L., and M. A. Qureshi, 1991. Direct and microsomal activated aflatoxin B₁ exposure and its effects on turkey peritoneal macrophage functions in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 109: 432-442.
- Pang, V. F., 1994. The immunity effect of aflatoxin in pigs. *Life Sci. Newslett.* 8: 1-9.
- Qureshi, M. A., R. R. Dietert, and L. D. Bacon, 1986. Genetic Variation in the recruitment and activation of Chicken peritoneal macrophage. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 181: 560-566.
- Qureshi, M. A., and L. Miller, 1991. Signal requirements for the acquisition of tumoricidal competence by chicken peritoneal macrophages. *Poultry Sci.* 70: 530-538.
- Qureshi, M. A., and W. M. Hagler Jr., 1992. Effect of fumonisin-B₁ exposure on chicken macrophage function *in vitro*. *Poultry Sci.* 71:104-112.
- Skamene, E., and P. Gros, 1983. Role of macrophages in resistance against infectious diseases. *Clinics Immunol. Allergy* 3: 539-560.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger, 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein lablled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184:39-51.
- Wyllie, A. H., 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-556.
- Wyllie, A. H., 1997. Apoptosis: an overview. *British Med. Bull.* 53:451-465.