

饲料中铅对鸡胚肝脏抗氧化能力的影响

赵立, 屠康*, 潘磊庆, 苏子鹏

(南京农业大学食品科学技术学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 将 80 只伊莎褐蛋种鸡随机分为 4 组, 在饲料中分别添加 15、30 和 60 mg · kg⁻¹ 铅, 以全价饲料 (铅含量为 3.55 mg · kg⁻¹) 为对照组, 研究种蛋中铅对鸡胚肝脏抗氧化能力的影响。收集饲喂第 25 天的种蛋进行孵化, 孵化 9、14 和 19 d 测定鸡胚肝脏的丙二醛含量和相关抗氧化酶活性。结果表明, 9 d 时仅有谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 随着铅含量的增加而显著降低 ($P < 0.05$), 14 d 时铅的添加量基本不影响各指标的变化, 当鸡胚生长到 19 d 时铅的添加显著降低了丙二醛含量, 过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 和 GST 活力显著下降, 但 19 d 时除 CAT 外其他指标的改变都与铅添加量无关。总之, 铅对鸡胚肝脏的损伤中, 脂质抗氧化作用并不是其主要原因, 主要是由于相关抗氧化酶活力改变所致, 同时饲料中铅在 60 mg · kg⁻¹ 以下时, 其含量对肝脏的抗氧化作用影响不显著。
关键词: 鸡; 铅; 胚龄; 肝脏; 抗氧化能力

中图分类号: S831 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2007) 02-0128-05

Effect of different Pb contents on the hepatic anti-oxidative capacity of chicken embryo

ZHAO Li, TU Kang*, PAN Lei-qing, SU Zi-peng

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this paper, a total of eighty 30-week-laying hen (ISA Brown) was randomly divided into 4 groups. Different contents of lead (Pb) (15, 30 and 60 mg · kg⁻¹) was added into feedstuffs with regular feedstuff as control group (3.55 mg · kg⁻¹). Hepatic anti-oxidative capacity of chicken embryos was studied. Eggs of the 25 th day were collected and hatched. The hepatic MDA and relative anti-oxidative enzymes of 9 d, 14 d and 19 d chicken embryos were detected. For the 9 d chicken embryos, only GST activity was significantly decreased with the increasing of Pb contents ($P < 0.05$); for 14 d embryos, various indexes were not influenced by Pb and its contents. Only for the 19 d embryos, the adding of Pb significantly reduced the production of MDA and the activities of CAT, SOD, GR and GST, whereas all indexes except for CAT were affected by the content of Pb. In a word, liver injury was resulted from the change of enzyme activities, but not from lipid peroxidation. At the same time, the content of Pb lower than 60 mg · kg⁻¹ in feedstuff did not significantly influence the anti-oxidative function of liver.

Key words: hen; Pb; embryo period; liver; anti-oxidative capacity

铅作为一种污染源倍受人们的关注, 一直以来, 重金属对水禽的影响已成为生态毒理学研究的一个最重要的课题。然而, 这些研究主要集中在对动物出生后期的研究^[1-4], 通常的研究都是利用从污染地获取的死亡或受伤的鸟类作为试验动物。铅能使成年动物和人体的生理、生化以及行为发生紊乱, 并对神经系统、造血系统、心血管系统、肾脏、肝脏以及生殖系统等造成损害^[5-6]。

有关铅对鸟类胚胎发育影响的研究一般是通过种蛋的浸泡、气室注射药物两种直接接触种蛋方式进行^[7-8], 这两种方式易引起胚胎死亡, 生长损伤或畸形。而通过母体污染种蛋的方式给毒更具有现实意义, 且报道较少。此种方式使重金属渗透到种蛋内, 干扰鸟类正常的发育和孵化, 从而对鸟类的肝脏产生毒性。

对家禽类而言, 饲料是一个重要的铅来源, 但是铅对胚期禽类的影响还未见系统性的研究。因此, 本研究采用饲料给铅的方式, 研究铅及其含量和胚龄对鸡胚肝脏脂质过氧化物及相关抗氧化酶的影响,

收稿日期: 2006-07-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371050)

作者简介: 赵立, 博士研究生。* 通讯作者: 屠康, 教授, 主要从事农产品检测、贮藏和加工方面的研究,

E-mail: kangtu@njau.edu.cn, Tel: 025-84399016。

以其揭示铅对鸡胚肝脏脂质过氧化物及抗氧化能力的影响规律, 为铅的毒理学研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验动物与分组

根据饲料有毒有害物质的标准 (标准号: NY5039—2001), 合格的常规全价饲料中铅的含量应小于 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。本研究以 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 为铅的来源, 将其添加入全价饲料 (青龙山养鸡场伊莎褐蛋种鸡常规全价饲料) 中, 使饲料中最终铅含量分别为 15、30 和 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 以全价饲料为对照组 (铅含量为 $3.55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。每个处理 20 只种鸡, 预饲期 3 d, 正式试验期 30 d, 每天饲喂 2 次, 正常饮水, 其他按常规饲养方法以及免疫操作。种鸡采用人工授精的方法, 以保证受精率在 90% 以上。分别取饲喂第 25 天的种蛋进行孵化^[9]。

1.2 鸡胚孵化及样品采集

伊莎褐鸡胚在 $37.8 \text{ }^\circ\text{C}$ 、相对湿度为 60% 条件下孵化, 分别在孵化 9、14 和 19 d 时取样。每组取 12 枚鸡胚, 在无菌条件下, 冰浴上解剖, 完整取下肝脏, 迅速置于液氮中, 然后置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中, 3 d 内所有指标全部测完。试验在南京青龙山养鸡场进行。

1.3 抗氧化能力指标测定

1.3.1 酶的提取 取组织块 $0.2 \sim 1.0 \text{ g}$ 在冰冷的生理盐水中漂洗, 除去血液, 滤纸拭干, 称质量, 直接放入玻璃匀浆管中。先用移液管取预冷的 $8.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的生理盐水进行匀浆, 将匀浆管放至盛有冰水混合物的器皿中, 充分研磨, 使组织匀浆化。将制备好的匀浆液以 $2\ 800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 $10 \sim 15 \text{ min}$, 取上清液。

1.3.2 酶活性的测定 总蛋白含量测定按文献 [10] 方法进行, 以牛血清蛋白为标准。MDA (丙二醛) 含量及 CAT (过氧化氢酶)、SOD (超氧化物歧化酶)、GST (谷胱甘肽-S-转移酶)、GR (谷胱甘肽还原酶) 活性和 T-AOC (总抗氧化能力) 的测定均按照南京建成生物制品研究所提供的试剂盒指导方法进行。

每毫克组织蛋白每秒分解 $1 \text{ } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 的量为一个 CAT 活力单位, 用 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 表示; 每毫克组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位, 用 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 表示; 每毫克组织蛋白在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 1 min 扣除非酶促反应, 使反应体系中 GSH 浓度降低 $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为一个 GST 酶活力单位, 用 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 表示; 每克组织蛋白每分钟使反应底物 NADPH 的浓度改变 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 所需的酶量为一个 GR 酶活力单位, 用 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 表示; 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, 每分钟每毫克组织蛋白使反应体系的吸光值每增加 0.01 时, 为一个 T-AOC 单位, 用 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 表示。

1.4 数据处理与统计分析

所有数据均用 $\bar{x} \pm SE$ 表示。数据统计分析采用 SPSS 11.0 进行显著性分析, Duncan's 新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 饲料中铅对不同龄鸡肝脏 MDA 含量和 CAT 活性的影响

由图 1-A 可见, 在各处理组, 鸡胚肝脏 MDA 含量由大到小依次为 9、14 和 19 d, 并且差异显著 ($P < 0.05$)。在 9 d 时, $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组肝脏 MDA 含量显著高于对照组和 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 ($P < 0.05$), 14 d 时各组间 MDA 含量差异不显著 ($P > 0.05$), 而在 19 d 时, 处理组 MDA 含量明显下降, 与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。

由图 1-B 可见, 各处理组除 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 14 d 和 19 d 鸡胚肝脏 CAT 活性差异不显著外, 其他各组鸡胚肝脏 CAT 酶活性大小依次为 19、14、9 d, 且差异显著 ($P < 0.05$), 说明随着鸡胚龄的增加, 肝脏形成日趋完善, CAT 活性逐渐增强。对照组 19 d 时肝脏 CAT 活性是 9 d 时的 3 倍多。当鸡胚龄达到 19 d 时, CAT 活性随铅含量的增加逐渐降低, 且差异显著 ($P < 0.05$)。

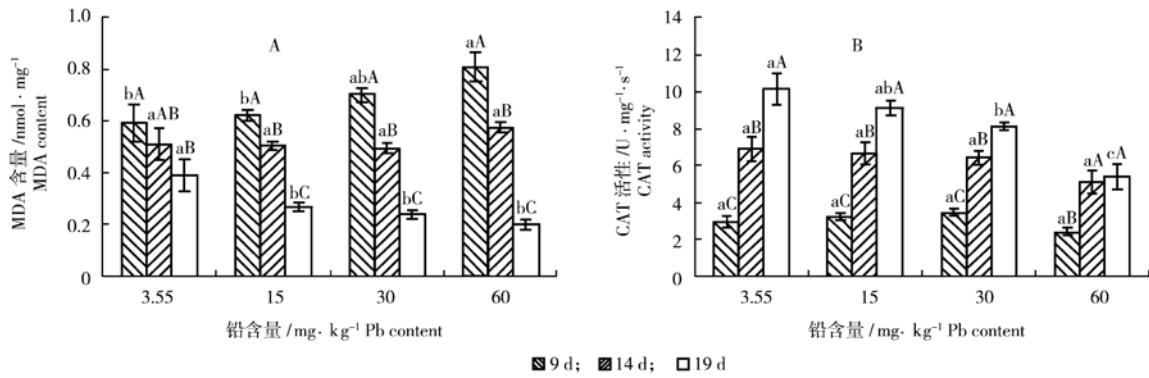


图 1 饲料中铅对不同胚龄鸡肝脏 MDA 含量 (A) 和 CAT 活性 (B) 的影响

Fig. 1 Effect of lead in feedstuff on hepatic MDA content (A) and CAT activity (B) in chicken embryos

不同大写字母表示胚龄间差异显著 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示含量间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different capital letters indicate the difference during growing periods ($P < 0.05$), and different small letters indicate the difference during contents ($P < 0.05$). The same as follows.

2.2 饲料中铅对不同胚龄鸡肝脏 SOD 和 GST 活性的影响

由图 2 - A 可见, 各处理组随着鸡胚龄的增加, SOD 活性均呈下降的趋势, 并且差异显著 ($P < 0.05$), 对照组由 9 d 时肝脏 SOD 活性为 $20.332 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 降至 19 d 时的 $14.320 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 9 d 时肝脏 SOD 活性为 $25.499 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 19 d 鸡胚肝脏的 SOD 活性为 $12.000 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 下降 1 倍多, 随铅含量的增加, 下降幅度越来越大。在鸡胚 9 d 时, 随着铅含量的增加, SOD 活性逐渐增加, $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组与对照组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。14 d 时, 各含量组间差异不显著 ($P > 0.05$), 但有增加趋势。当鸡胚生长到 19 d 时, 铅含量达到 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时 SOD 活性即显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

从图 2 - B 可见, 各处理组, 鸡胚肝脏 GST 活性大小顺序依次为 9、14、19 d, 除 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 9 d 和 14 d 差异不显著外, 其他各组间差异均显著 ($P < 0.05$)。对照组由 9 d 鸡胚肝脏 GST 活性 $121.706 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 下降至 19 d 时的 $46.986 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 下降 1.59 倍。而 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, 9 d 肝脏 GST 活性为 $75.759 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 19 d 时为 $32.505 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 下降 1.33 倍。在鸡胚为 9 d 时, 随着铅含量的增加, GST 活性在各组间显著下降, 说明在鸡胚 9 d 时铅含量显著影响了肝脏 GST 活性 ($P < 0.05$)。而鸡胚生长到 14 d 时, GST 活性反而不受铅含量的影响。19 d 时, 各处理组鸡胚肝脏 GST 活性显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

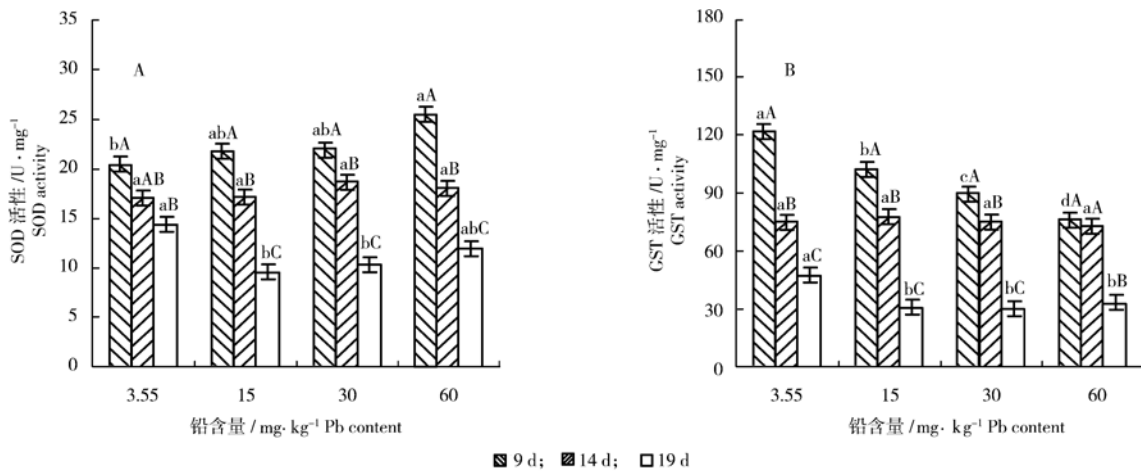


图 2 饲料中铅对不同胚龄鸡肝脏 SOD 活性 (A) 和 GST 活性 (B) 的影响

Fig. 2 Effect of lead in feedstuff on hepatic SOD activity (A) and GST activity (B) in chicken embryos

2.3 饲料中不同含量铅对不同胚龄鸡肝脏 GR 活性和 T-AOC 的影响

由图 3 - A 可见, 各处理组不同胚龄鸡肝脏 GR 活性从大到小依次为 19、14、9 d。对照组和 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组中, 19 d 鸡胚肝脏 GR 活性显著高于 9 d 和 14 d ($P < 0.05$)。而 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组, 14 d 和 19 d 鸡胚肝脏 GR 活性显著高于 9 d 组 ($P < 0.05$)。当鸡胚生长到 19 d 时, 各处理组鸡胚

肝脏 GR 活性显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

由图 3-B 可见, 在处理组中, 各胚龄 T-AOC 变化一致, 但对照组间差异不显著, 其他处理组间皆为 19 d 鸡肝脏 T-AOC 显著高于 9 d 和 14 d。随着鸡胚的生长处理组较对照组 T-AOC 增加趋势明显, 只有当鸡胚生长到 19 d 时, 处理组与对照组间差异显著 ($P < 0.05$), 而各处理组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

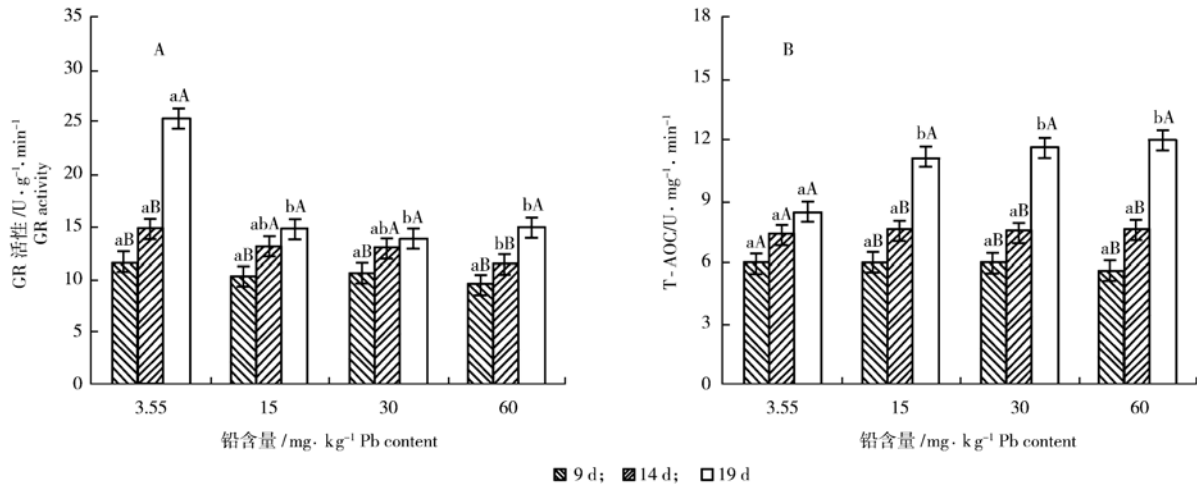


图 3 饲料中铅对不同胚龄鸡肝脏 GR 活性 (A) 和 T-AOC (B) 的影响

Fig. 3 Effect of lead in feedstuff on hepatic GR activity (A) and T-AOC (B) in chicken embryos

3 讨论

脂类过氧化物 (LPO) 是氧化损伤的最主要表现形式之一, 而且在许多外源毒素产生毒性的机理中发挥重要作用^[11]。机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基, 后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA), 引发脂质过氧化作用, 并因此形成脂质过氧化物, 如醛基 (丙二醛)、酮基、羟基及新的氧自由基等。过氧化脂质降解产物中的丙二醛可与硫代巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA) 缩合, 形成红色产物, 在 532 nm 处有最大吸收峰, 因此通常以丙二醛产生量来代表脂质过氧化物产生量。本研究中, 铅的脂质抗氧化作用显著受鸡胚龄的影响, 当鸡胚生长到第 9 天时, 随饲料中铅含量的增加, MDA 产生量逐渐增加, 这是因为细胞或机体在接受一次较少有害物质后会对随后的有害物质产生较强的抗性, 这也是一种适应性的诱导现象^[12]。Shafiq-ur-Rehman^[13] 研究指出, 随着铅含量的增加小鼠脑组织和肝脏中脂类过氧化物含量增加, 同样的影响也反映在肝脏组织。

铅对 CAT 和 SOD 的作用受多种金属因素的影响。本试验中, 随着鸡胚龄的增加, 肝脏形成日趋完善, CAT 活性逐渐增强。在相同铅含量处理组, 9 d 和 14 d CAT 活性差异不显著, 但有减小的趋势。当鸡胚龄达到 19 d 时, CAT 活性随铅含量的增加逐渐降低, 且差异显著。由此可见, 只有当鸡胚生长到 19 d 时铅含量才会对肝脏中的 CAT 活性产生显著的影响, 活力降低。不同胚龄肝脏 GR 活性大小顺序始终为 19 d、14 d、9 d, 差异显著。对于同一胚龄, 不同铅含量组, 9 d 和 14 d 鸡胚肝脏各铅含量组间差异均不显著, 只有当鸡胚生长到 19 d 时, 铅才会显著影响降低肝脏的 GR 活性, 这是由于在不同生长发育期, 主要产生 GR 的器官不同所致。SOD 是重要的抗氧化酶之一, 在清除游离氧中起重要作用。本试验中, 鸡胚 9 d、14 d 时, 随铅含量增加 SOD 有增加的趋势, 但差异不显著。只有当鸡胚生长到 19 d 时铅显著降低了 SOD 活性, 这与 Patra 等^[14] 结果一致。但有研究学者发现小鼠饮用醋酸铅试验组较对照组肾脏中 SOD 和 CAT 活性都明显增加^[15]。这一方面可能是由于试验动物和测定的器官不同, 另一方面是由于铅的含量不同。铅诱导动物使一些抗氧化酶活性得到正面调节是机体补偿反应的一种体现。然而并非全部的酶都可以发生这种补偿反应, 表明铅可以导致机体抗氧化系统的失衡。GST 是一种重要的含-SH 的抗氧化酶, 在不同铅含量组, 鸡胚肝脏 GST 活性大小顺序均为 9、14、19 d, 本试验中铅显著降低了 GST 活性。肝脏 T-AOC 随着鸡胚龄的增加而增加。随着铅含量的增加, 肝脏仅在鸡胚达到 19 d 时总抗氧化能力才增加。总体上肝脏 T-AOC 受铅影响较小。机体应有一个总抗氧化力或净抗氧化力,

它是处于稳态的, 由于机体的代偿作用, 很难通过改变个别抗氧化剂来改变总抗氧化力。

4 结论

在本研究范围内, 铅对鸡胚胎肝脏的损伤中, 脂质抗氧化作用并不是其主要原因, 主要是由于改变抗氧化酶活力所导致。肝脏脂质过氧化物的产生及各种抗氧化酶活性的大小显著地受鸡胚生长时期的影响。而铅的添加降低了 19 d 鸡胚抗氧化酶的活性, 但不同铅含量组间差异不显著。同时饲料中铅含量在 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以下时, 对肝脏的抗氧化作用影响不显著。

参考文献:

- [1] Lovvorn J R, Gillingham M P. A spatial energetic model of cadmium accumulation by diving ducks [J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1996, 30: 241 - 251
- [2] Heinz G H, Hoffman D J, Sileo L, et al. Toxicity of lead-contaminated sediment to mallards [J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1999, 36: 323 - 333
- [3] Spahn S A, Sherry T W. Cadmium and lead exposure associated with reduced growth rates, poorer fledging success of little blue heron chicks (*Egretta caerulea*) in south Louisiana wetlands [J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1999, 37: 377 - 384
- [4] Hoffman D J, Heinz G H, Sileo L, et al. Developmental toxicity in lead-contaminated sediment in Canada geese (*Branta canadensis*) [J]. J Toxicol Environ Health: Part A, 2000, 59: 235 - 252
- [5] de Silva P E. Determination of lead in plasma and studies on its relationship to lead in erythrocytes [J]. Br J Ind Med, 1981, 38: 209 - 217
- [6] Lancranjan I, Popescu H I, Gavenescu O, et al. Reproductive ability of workmen occupationally exposed to lead [J]. Arch Environ Health, 1975, 30: 396 - 401
- [7] Mas A, Arola L. Cadmium and lead toxicity effects on zinc, copper, nickel and iron distribution in the developing chick embryo [J]. Comp Biochem Phys Part C, 1985, 80: 185 - 188
- [8] Kertész V, Hlubik I. Plasma ALP activity and blood PCV value changes in chick fetuses due to exposure of the egg to different xenobiotics [J]. Environmental Pollution, 2002, 117: 323 - 327
- [9] 赵立, 屠康, 潘磊庆, 等. 饲料中不同含量铅在种蛋中的沉积及其影响 [J]. 江苏农业科学, 2006(5): 98 - 101
- [10] Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folin-phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265 - 275
- [11] Matés J M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology [J]. Toxicology, 2000, 153: 83 - 104
- [12] 郑荣梁, 黄中洋. 自由基医学与农学基础 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 50 - 51
- [13] Shafiq-Ur-Rehman. Lead-induced regional lipid peroxidation in brain [J]. Toxicol Lett, 1984, 21: 333 - 337
- [14] Patra R C, Swarup D. Effect of lead on erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxide level and thiol groups in calves [J]. Res Vet Sci, 2000, 68: 71 - 74
- [15] Farmand F, Ehdaie A, Roberts C K, et al. Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase [J]. Environmental Research, 2005, 98: 33 - 39

责任编辑: 沈 波