

硒中毒雏鸭血清和组织中 NO 含量 及 NOS 活性的研究

武 瑞, 康世良, 徐世文, 王 伟, 林洪金

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 密山 158308)

摘要: 为了探讨硒中毒的毒理机制, 选择健康雏鸭作实验动物, 通过饲料中添加 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的硒, 复制雏鸭硒中毒模型, 应用硝酸还原酶法测定血清和组织中 NO 含量及 NOS 活性的动态变化。试验结果表明, 与对照组相比, 中毒组雏鸭血清和组织中 NO 含量及 NOS 活性均显著升高 ($P < 0.05$), 且有时间—效应关系。从而提示硒中毒可诱导 NOS 活性增强, 致使机体内 NO 含量升高, 机体内源性 NO 水平过高, 则产生细胞毒性作用, 进而对机体的物质和能量代谢及组织细胞的结构和功能产生一系列的损伤。这可能是硒中毒的毒理机制之一。

关键词: 硒中毒; 雏鸭; 血清; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

Study on the NO Concentration and NOS Activity in the Serum and Tissues of Ducklings with Selenium Poisoning

WU Rui, KANG Shi-liang, XU Shi-wen, WANG Wei, LIN Hong-jin

(College of Animal Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Mishan 158308)

Abstract: In the study the toxicological mechanism of selenium poisoning, 100 healthy ducklings were divided into two groups randomly (control group and treatment group). The ducklings were fed feed added with selenium at the poisoning rate of $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Se}$, then the dynamic changes of NO concentration and NOS activity in the serum and tissues were determined by means of the method of nitric acid reductase. The results showed that the NO concentration and NOS activity in the serum and tissue in treatment group increased significantly ($P < 0.05$) and showed time-dependent. It suggested that the high concentration of selenium in bodies could increase the NOS activity and NO concentration, so it injured metabolism of the material and energy as well as structure and function of tissues and cells. These changes of NO concentration and NOS activity may be involved in the mechanism of selenium poisoning.

Key words: Selenium poisoning; Duckling; Serum; Nitric oxide; Nitric oxide synthase

硒广泛存在于自然界和动植物的组织细胞内, 是动物必需的一种微量营养元素。由于土壤和植物中的硒含量或其存在形式差别很大, 常常引起畜禽的硒缺乏病和硒中毒病。在缺硒地区, 因防治动物硒缺乏病时补硒过量而发生中毒的事例也经常发生。目前国内外对畜禽硒中毒的研究报道较多, 但主要集中在病理形态学和组织中硒分布 2 个方面^[2,3]。而硒中毒对一氧化氮(nitric oxide, NO)含量及一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)活性的

影响还未见报道。本试验以健康雏鸭为实验动物, 研究硒中毒对雏鸭血清和组织中 NO 含量及 NOS 活性的影响, 旨在从分子水平揭示硒的毒理机制。为临床硒中毒的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物与饲料 1日龄健康金定蛋鸭100只, 公母各半, 购自哈尔滨正立鸭场; 蛋鸭用全价饲

料 购自黑龙江哈尔滨大生饲料公司 经测定硒含量为 $0.15 \pm 0.023 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($n=5$)。

1.1.2 试验药品与仪器 亚硒酸钠($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 沈阳市试剂二厂生产(批号 930921);一氧化氮(NO)测定试剂盒;一氧化氮合酶(NOS)测定试剂盒,考马斯亮兰蛋白测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;7230G 可见光分光光度计,上海分析仪器厂;AvantiTM30 Centrifuge 型低温超速离心机,德国 Becman 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 试验动物的分组处理 选择1日龄健康雏鸭100只,自由采食和饮水,预饲1周后,随机分成2组,每组50只,公母各半。I组为对照组,饲喂全价日粮。II组为中毒组,饲喂含 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 硒的全价日粮。各组随机分成4批次,分别于试验期15、30、60、90 d 剖杀采样,每次10只。

1.2.2 试验样品的采集测定^[4] 动物心脏采血1ml,室温下静置分离血清,随后立即处死,迅速取心脏、肝脏、肾脏、脾脏、大脑、睾丸、肌肉,称重,按1:9(w/v)加入冷生理盐水,用玻璃匀浆器在冰浴中迅速研磨成10%的组织匀浆,3 000~4 000 r/min 离心取上清液,分别测定血清和组织中NO含量、NOS活性及匀浆上清液蛋白质含量。NO含量以硝酸还原酶法测定,NO含量用 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (血清), $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ (组织)表示。NOS活性用分光光度法测定,用每毫克组织蛋白每分钟催化生成1 nmol NO为1个酶活力单位($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Pr}$)。组织匀浆蛋白质含量以考马斯亮兰法测定。

1.2.3 试验数据的分析处理 采用 SAS 软件进行数据的分析处理。

2 结果与分析

2.1 硒中毒模型的复制

中毒组雏鸭早期无明显症状,与对照组相比,15 d 体重差异不显著($P > 0.05$),30 d 平均体重显著低于对照组($P < 0.05$),采食减少,发育不良;60 d 以后,体重与对照组相比差异极显著($P < 0.01$),并且开始出现临床症状,精神萎靡,被毛蓬乱、脱落,尖声鸣叫,排白色或黑色稀便,后期个别病例瘫痪、绝食、衰竭而死。病理剖检早期变化不明显,后期可见各组织器官出现慢性炎症变化,尤以肝、肾为主;脑及脑膜有不同程度的充血、出血和水肿,整个消化道广泛性水肿、充血、出血,严重病例发生溃疡甚至坏死。实验室检查:血硒 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,毛硒 $12.34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。以上试验结果说明,硒中毒模型复制成功。

2.2 硒中毒雏鸭血清和组织中NO含量及NOS活性的测定结果

从表1、2可见,中毒组与对照组相比,血清NO含量15 d 差异极显著($P < 0.01$),30、60、90 d 差异显著($P < 0.05$);心脏、睾丸NO含量15、30、60、90 d 差异极显著($P < 0.01$);肝脏NO含量15 d 差异显著($P < 0.05$),30、60、90 d 差异极显著($P < 0.01$);肾脏NO含量15、30 d 差异显著($P < 0.05$),60、90 d 差异极显著($P < 0.01$);脾脏、大脑NO含量15、30、60、90 d 差异显著($P < 0.05$);肌肉NO含量30 d 差异不显著($P > 0.05$),15、60、90 d 差异显著($P < 0.05$)。从表3、4可见,中毒组与对照组相比,血清NOS活性15、30、60、90 d 差异不显著($P > 0.05$);心脏NOS活性15 d 差异不显著($P > 0.05$),30、60、90 d 差异显著($P < 0.05$);肝脏NOS活性15、30、60、90 d 差异

表1 硒中毒雏鸭15、30日龄血清和组织中NO含量测定结果¹⁾

Table 1 The contents of serum and tissue-homogenate NO in each group of 15, 30-day old

样品 Sample	样本 Numbers	对照组 Control group		中毒组 Poisoning group	
		15 d	30 d	15 d	30 d
血清 Serum	10	40.78 ± 5.621	36.66 ± 4.502	89.51 ± 10.018**	56.84 ± 6.400*
心脏 Heart	10	30.52 ± 4.020	32.65 ± 4.301	49.55 ± 5.201**	58.00 ± 6.834**
肝脏 Liver	10	42.30 ± 6.021	46.02 ± 6.210	55.06 ± 5.238*	79.25 ± 8.366**
肾脏 Kidney	10	16.23 ± 2.305	18.56 ± 2.539	20.65 ± 3.201*	32.56 ± 4.158*
脾脏 Spleen	10	35.55 ± 4.201	32.14 ± 4.820	46.10 ± 4.302*	44.96 ± 5.362*
大脑 Cerebrum	10	60.25 ± 7.666	56.12 ± 6.585	74.32 ± 8.654*	79.56 ± 9.015*
睾丸 Testis	10	22.82 ± 3.256	25.16 ± 4.252	49.26 ± 5.685**	59.20 ± 7.018**
肌肉 Muscle	10	62.31 ± 7.567	71.02 ± 8.659	81.66 ± 9.987*	76.26 ± 8.564

¹⁾ 同行同日龄*表示差异显著($P < 0.05$),**表示差异极显著($P < 0.01$)。下同

* mean $P < 0.05$ on the same day, ** mean $P < 0.01$ on the same day. The same as bellow

表 2 硒中毒雏鸭 60、90 日龄血清和组织中 NO 含量测定结果

Table 2 The contents of serum and tissue-homogenate NO in each group of 60, 90-day old

样品 Sample	样本 Numbers	对照组 Control group		中毒组 Poisoning group	
		60 d	90 d	60 d	90 d
血清 Serum	10	35.68 ± 4.216	37.91 ± 4.010	45.29 ± 5.000*	49.45 ± 5.641*
心脏 Heart	10	30.87 ± 4.235	36.21 ± 5.012	50.45 ± 6.982**	61.25 ± 8.010**
肝脏 Liver	10	43.55 ± 5.890	40.26 ± 5.642	84.23 ± 9.260**	97.56 ± 10.203**
肾脏 Kidney	10	15.32 ± 2.301	17.50 ± 2.540	43.21 ± 5.298**	50.21 ± 6.325**
脾脏 Spleen	10	36.48 ± 5.031	38.21 ± 4.005	50.36 ± 6.301*	68.25 ± 8.300*
大脑 Cerebrum	10	59.23 ± 6.201	58.02 ± 6.250	83.25 ± 9.563*	94.58 ± 10.256*
睾丸 Testis	10	21.56 ± 3.560	25.36 ± 3.598	77.26 ± 9.265**	95.00 ± 10.230**
肌肉 Muscle	10	68.12 ± 7.530	68.25 ± 7.465	90.21 ± 10.255*	97.26 ± 11.247*

表 3 硒中毒雏鸭 15、30 日龄血清和组织中 NOS 活性测定结果

Table 3 The activity of serum and tissue-homogenate NOS in each group of 15, 30-day old

样品 Sample	样本 Numbers	对照组 Control group		中毒组 Poisoning group	
		15 d	30 d	15 d	30 d
血清 Serum	10	0.148 ± 0.021	0.123 ± 0.020	0.168 ± 0.025	0.153 ± 0.024
心脏 Heart	10	4.254 ± 0.478	4.613 ± 0.510	5.642 ± 0.612	6.720 ± 0.710*
肝脏 Liver	10	3.210 ± 0.410	4.265 ± 0.251	5.689 ± 0.621**	10.256 ± 1.023**
肾脏 Kidney	10	3.031 ± 0.321	2.998 ± 0.301	4.325 ± 0.421*	4.326 ± 0.510*
脾脏 Spleen	10	0.235 ± 0.012	0.254 ± 0.035	1.320 ± 0.210**	1.541 ± 0.164**
大脑 Cerebrum	10	1.432 ± 0.140	0.895 ± 0.094	2.654 ± 0.021**	2.651 ± 0.026**
睾丸 Testis	10	0.651 ± 0.054	0.215 ± 0.031	1.958 ± 0.203**	0.684 ± 0.053**
肌肉 Muscle	10	1.458 ± 0.165	1.911 ± 0.216	2.351 ± 0.210**	4.650 ± 0.521**

表 4 硒中毒雏鸭 60、90 日龄血清和组织中 NOS 活性测定结果

Table 4 The activity of serum and tissue-homogenate NOS in each group of 60, 90-day old

样品 Sample	样本 Numbers	对照组 Control group		中毒组 Poisoning group	
		60 d	90 d	60 d	90 d
血清 Serum	10	0.153 ± 0.025	0.195 ± 0.021	0.185 ± 0.021	0.234 ± 0.029
心脏 Heart	10	4.025 ± 0.510	5.021 ± 0.684	6.352 ± 0.710*	7.984 ± 0.752*
肝脏 Liver	10	3.684 ± 0.358	5.021 ± 0.510	11.356 ± 0.900**	14.250 ± 2.013**
肾脏 Kidney	10	4.612 ± 0.320	3.265 ± 0.402	7.024 ± 0.510**	7.952 ± 0.640**
脾脏 Spleen	10	0.541 ± 0.042	0.421 ± 0.051	1.654 ± 0.098**	1.589 ± 0.087**
大脑 Cerebrum	10	1.265 ± 0.021	1.695 ± 0.026	3.259 ± 0.362**	3.295 ± 0.042**
睾丸 Testis	10	0.589 ± 0.062	0.774 ± 0.081	2.056 ± 0.214**	2.950 ± 0.032**
肌肉 Muscle	10	1.537 ± 0.210	1.234 ± 0.201	7.578 ± 0.654**	8.258 ± 0.400**

极显著 ($P < 0.01$); 肾脏 NOS 活性 15、30 d 差异显著 ($P < 0.05$), 60、90 d 差异极显著 ($P < 0.01$); 脾脏、大脑、睾丸、肌肉 NOS 活性 15、30、60、90 d 差异极显著 ($P < 0.01$)。

3 分析与讨论

NO 是一种难溶于水、高脂溶性的小分子气体, 是典型的小分子自由基, 极易通过细胞膜扩散。它拥有额外电子, 化学反应能力强, 生物学半衰期为 3 ~ 5 s。体内 NO 是在辅酶 II (NADPH) 血红素、钙调蛋白等辅助因子的作用下, 由 NOS 以 L-精氨酸 (L-Arg) 和氧分子为底物, 催化 L-Arg 转化为 L-瓜氨酸时产生的^[5, 6]。NO 在生物体内的功能具有两面性。一方面, 当机体 NO 代谢正常时, 即内源性 NO 以 p

mol·L⁻¹ 或 fmol·L⁻¹ 浓度存在, 它发挥一系列重要的生理作用。另一方面, NO 代谢失衡即内源性 NO 以 nmol·L⁻¹ 浓度存在时, 它将通过与机体内蛋白质、脂肪、核酸等生物分子相互作用及其它途径与方式损伤组织细胞以及信息传递, 对机体产生多种病理作用^[7, 8]。

本试验结果表明, 中毒组与对照组相比, 血清 NOS 活性略有升高, 但组织中 NOS 活性显著升高。说明硒中毒可诱导血清、心脏、肝脏、肾脏、脾脏、大脑、睾丸、肌肉 NOS 活性增强, 其中肝脏变化最明显, 其次为大脑、脾脏、睾丸、肌肉、肾脏、心脏, 尽管血清 NOS 活性 15 d、30 d、60 d、90 d 差异不显著, 心脏 NOS 活性 15 d 差异不显著, 但相比较对照组也高。结果说明过量硒可引起血清和组织中 NOS 活

性增强,继而导致 NO 含量增加,因为 NOS 是 NO 合成的主要限速因子,所以,NO 含量必将同 NOS 活性的变化一致。

分析 NOS、NO 的变化可能是由于两方面原因造成。第一,硒中毒是通过硒化合物复杂反应诱发的活性氧对 DNA 破坏的结果^[9]。而 mRNA 是 NOS 活性的重要调节点^[9]。故 NOS 活性改变,进而 NO 含量改变。高浓度的 NO 又可诱发细胞毒性和损伤 DNA,导致基因突变和癌变。据报道,TK6 人成淋巴细胞接触 NO(5.5~22 mmol·L⁻¹)后,其 DNA 单链断裂并随着剂量增加和时间的延长而增加^[10]。第二,硒中毒导致细胞正常生化功能紊乱,其中钙代谢紊乱至关重要。因为 Ca²⁺ 对维持 NOS 活性是必需的。机体处于低钙状态,诱导型 NOS(iNOS)牢固地结合在钙调蛋白上,引起快通道的开放,生物电冲动快速经过 NOS 活化位点,电流从黄素蛋白转向血红素,启动 NOS 的合成,NOS 一旦诱导合成,即可持续产生大量的 NO,机体内 NO 含量过多,则对各器官系统产生一系列病理作用,造成组织细胞结构和功能的损伤。

至于对照组 NOS 活性测定结果出现不稳定,可能是由于试验误差所致。肝脏中 NOS 活性变化最大,因此导致肝脏的病理损害最重。因为肝脏是硒中毒损伤的主要靶器官之一。另外,大脑中 NOS 活性和 NO 含量的变化,说明硒中毒影响中枢神经系统的功能。已有报道中枢神经系统中 NO 以超氧亚硝酸(superoxgnitrite)形式促进乙酰胆碱、多巴胺的 γ -氨基丁酸等释放,这些递质对中枢神经功能都有重要的影响^[11]。因此推测,硒中毒情况下大脑中 NOS 活性和 NO 含量的变化,也可能是通过影响乙酰胆碱能神经递质释放而引起胆碱能神经功能异常,最终导致临床出现特征性神经症状。

综上所述,通过研究 NOS 活性和 NO 含量来揭示硒的毒理机制是一个全新的研究方向。对疾病的防治和新药的研发具有重要的意义。今后应开展 NOS 的分子生物学研究,包括 NOS 组织定位、提取纯化及分型、基因序列分析、检测 NOS mRNA、克隆 NOS 基因,通过载体使基因转入细胞,用于某些治疗目的等。

References

[1] 李家熙,张光第,葛晓立. 人体硒缺乏与过剩的地球化学环境特征及其预测. 北京:地质出版社,2000:1-3.

Li J X, Zhang G D, Ge X L. *Forecast and Environmental Character of Geography Chemistry in Human With Selenium Deficiency and Surplus*. Beijing: Geology Press, 2000:1-3. (in Chinese)

[2] 李国勤,王建华,曹光荣. 奶山羊硒中毒临床及病理学研究,西北农业大学学报. 1994,22(1):35-38.

Li G Q, Wang J H, Chao G R. Study on the clinic and pathology of selenium poisoning in milk goats. *Acta of Northwestern Agricultural University*, 1994, 22(1):35-38. (in Chinese)

[3] 侯江文,祁周约,刘斌峰. 山羊天然富硒饲料中毒时毛、血及组织中硒含量的变化. 畜牧兽医学报,1994,25(5):400-405.

Hou J W, Qi Z Y, Liu B F. The variation of selenium content in wool, blood and tissues after poisoned by feeding natural seleniferous feed stuffs to goats. *Acta of Veterinary and Zootechnology Science*, 1994, 25(5):400-405. (in Chinese)

[4] 杨勤,庄宗杰,程昊. 碘缺乏大鼠海马 NO 含量及 NOS 活性的研究. 中国地方病学杂志,2001,20(1):9-10.

Yang Q, Zhuang Z J, Cheng H. Study of NO and NOS in hippocampus of rats with iodine deficiency. *Chinese Journal of Endocrinology*, 2001, 20(1):9-10. (in Chinese)

[5] 武瑞,康世良,郭保民. 自由基与细胞凋亡及其生物学特性. 内蒙古畜牧科学,2001,22(2):23-24.

Wu R, Kang S L, Guo B M. Biology character of free radical and apoptosis. *Inner Mongolian Journal of Animal Science and Production*, 2001, 22(2):23-24. (in Chinese)

[6] 吴永魁,张立树,朱平. NO 在生物医学中的研究进展. 中国兽医学报,2001,21(5):529-532.

Wu Y K, Zhang L S, Zhu P. Progress of nitric oxide in biological medicine. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2001, 21(5):529-532. (in Chinese)

[7] Knowles R G, Palacios M, Palmer R M J. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86:5159-5168.

[8] Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S. Promoter analysis of human inducible nitric oxide synthase gene associated with cardiovascular homeostasis. *Biochemistry Biophysics Research Communication*, 1994, 200(2):802-807.

[9] Weiner C P, Liazoian I, Baylis S A. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(11):5212-5216.

[10] Guyen T, Burnson D, Crespi C L. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89:3030-3035.

[11] Kuriyama K, Ohkuma S. Role of nitric oxide in central synaptic transmitter release. *Journal of Pharmacology [Japan]*, 1995, 69:1.