

王倩倩, 陈大伟. 镉暴露对蛋鸡卵巢的毒性损伤及酵母硒的保护效应[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(10): 278–280.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.077

镉暴露对蛋鸡卵巢的毒性损伤及酵母硒的保护效应

王倩倩¹, 陈大伟²

(1. 江苏省扬州市畜牧兽医站, 江苏扬州 225125; 2. 江苏省家禽科学研究所, 江苏扬州 225125)

摘要:将 90 羽 40 周龄海兰褐蛋鸡随机分为 3 组, 每组 30 羽, 每组设 3 个重复, 每个重复 10 羽。采用饮水染毒方式对蛋鸡进行 Cd 暴露 (50 mg/L) 和酵母硒保护试验 (饲料中添加 3% 酵母硒), 试验周期为 8 周。结果表明: 与对照组比较, Cd 组血清 E_2 、 P_4 含量呈类似变化, 分别自第 2、4 周显著下降 ($P < 0.05$); 卵巢组织中 SOD 活性、GSH-Px 活性、GSH 含量均显著或极显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), MDA 含量极显著升高 ($P < 0.01$); Cd 组 SOD 活性下降了 32.45% ($P < 0.01$), GSH-Px 活性下降了 26.26% ($P < 0.01$), GSH 含量下降了 19.83% ($P < 0.01$), MDA 含量升高了 37.03% ($P < 0.01$); 卵巢 Cd 含量极显著升高。超微结构观察发现 Cd 组卵巢颗粒细胞染色质边集、线粒体嵴断裂、空泡化、微绒毛断裂等损伤变化。与 Cd 组相比, Se 保护组血清 E_2 、 P_4 含量自第 6 周显著升高, 卵巢 SOD 活性、GSH 含量均显著升高 ($P < 0.05$), MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$)。卵巢硒含量极显著升高, Cd 含量差异不显著, 卵巢微绒毛、线粒体、细胞核等损伤变化轻于 Cd 组。综上所述, Cd 引起的氧化应激是 Cd 致蛋鸡卵巢损伤的重要原因, 氧化应激引起的卵巢颗粒细胞凋亡可能是造成蛋鸡血清雌激素水平下降的原因之一。酵母硒通过缓解卵巢组织脂质过氧化损伤, 减轻 Cd 对卵巢细胞微绒毛及线粒体的损伤, 对蛋鸡 Cd 暴露引起的卵巢损伤具有一定缓解作用。

关键词: 蛋鸡; 镉暴露; 酵母硒; 卵巢; 保护效应

中图分类号: S858.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0278-03

镉 (cadmium, Cd) 是一种毒性很强的有色重金属元素, 少量 Cd 持续进入体内便可能引发严重的中毒症状, 各种动物均能发生 Cd 中毒。有关 Cd 对肝脏、肾脏、睾丸等器官的毒性研究报道^[1-4] 较多, 但 Cd 对雌性家禽生殖毒性的研究报道相对较少。Cd 作为一种高度可疑的环境内分泌干扰物, 已引起人们的广泛关注。体外试验表明, Cd 可降低大鼠血清中孕酮、雌二醇水平, 抑制类固醇合成, 可能直接影响颗粒细胞和黄体细胞的功能^[5-6]。

硒是动物必需的一种微量营养物质, 在体内发挥着多种生物学效应, 作为硒蛋白、含硒酶的必要成分在机体内发挥抗氧化作用, 抑制脂质过氧化, 消除过多自由基, 从而保护生物体的膜结构与功能。近年来研究发现, 硒还具有抗应激、提高免疫力、促生长、改善肉质、提高动物繁殖能力等重要作用^[7-8]。目前应用于畜禽生产的硒主要为亚硒酸钠等无机硒, 而无机硒的使用会带来诸多弊端。与无机硒相比, 来源于植物或富硒酵母的有机硒具有很多优势, 在饲料中添加应用毒性较小, 具有抗氧化特性及较高的组织沉积率、生物利用率, 从而减少对环境污染^[9], 因此提倡在饲料中添加应用有机硒源的硒。而关于有机硒源对蛋鸡 Cd 暴露后卵巢保护效应的研究尚未见报道。

本研究通过饮水染毒进行 Cd 暴露, 同时在饲料中添加酵母硒, 探讨有机硒对 Cd 暴露蛋鸡体内激素、卵巢脂质过氧

化水平及超微结构、Cd 蓄积的影响, 旨在观察 Cd 对产蛋鸡的生殖毒性特点, 并为以有机硒为主的环保型 Cd 拮抗剂在蛋鸡生产中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

氯化镉 ($CdCl_2$) 购自国药集团, 分析纯, 含量大于 99%; 酵母硒 (拉曼硒)。试验于农业部家禽品质监督检验测试中心 (扬州) 生产性能测定站进行, 试验动物为商品海兰褐壳蛋鸡。

1.2 试验设计

将 90 羽体质量生产性能基本一致的 40 周龄海兰褐壳蛋鸡随机分为 3 组, 每组 3 个重复, 每个重复 10 羽鸡。Cd 组在饮水中添加 Cd 50 mg/L; 硒保护组在饮水中添加 Cd 50 mg/L, 同时在饲料中添加 3% 的酵母硒 (Cd 添加质量浓度参考 GB 5749—2006《饮用水水质标准》, $Cd \leq 0.05$ mg/L, 在此限量标准的基础上提高 1 000 倍); 对照组饮用纯净水。根据 NY/T 33—2004《鸡饲养标准》中蛋鸡的营养需要配制常规玉米-豆粕型饲料, 作为试验基础饲料。经测定, 该饲料中 Cd 含量为 (0.065 ± 0.003) mg/kg, 酵母硒中硒含量为 (2.004 ± 1.24) mg/kg。采用 3 层全阶梯笼养, 自由采食和饮水, 预试验期为 1 周, 正式试验期为 8 周。

1.3 指标及测定方法

1.3.1 性腺激素含量的测定 分别于试验第 2、4、6、8 周末进行翅静脉采血, 分离血清, 采用化学发光法测定血清中 E_2 、 P_4 含量。化学发光测定试剂盒购自深圳新产业生物医学工程有限公司。

1.3.2 卵巢抗氧化指标的测定 染毒结束后, 将蛋鸡颈动脉放血处死; 摘取双侧卵巢, 去除蛋黄, 准确称取 0.2 g 卵巢组

收稿日期: 2015-12-09

基金项目: 江苏省家禽科学研究所博士基金 (编号: JQ201201); 江苏省自然科学基金 (编号: BK20131235)。

作者简介: 王倩倩 (1984—), 女, 江苏南通人, 兽医师, 主要从事畜禽疾病防控。E-mail: 158373585@qq.com。

通信作者: 陈大伟, 助理研究员。E-mail: ydcdw83@sina.com。

织,加入 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液,于冰浴条件下采用高速电动匀浆机制备 10% 组织匀浆;将匀浆液以 3 000 r/min 离心 20 min 后取上清。主要测定超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量、还原型谷胱甘肽(GSH)含量、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,试剂配制和试验操作均按说明书进行。

1.3.3 卵巢超微结构观察 迅速采集刚处死蛋鸡的卵巢组织,将其切为约 1 mm³ 的小块,采用新鲜配制的 25 g/L 戊二醛溶液固定后,常规制备超薄切片。采用 JEM-100CX II 型透射电镜(Philips 公司)观察并拍照。

1.3.4 卵巢中 Cd、硒含量的测定 试验结束后,以颈动脉放血处死鸡并采集卵巢。采用微波消解法处理制备样品,采用 ICP-MS(Xseries II,美国 Thermo scientific)法测定样品中的硒、Cd 含量。

1.4 数据处理

试验数据均以“平均值±标准误”表示。采用 SPSS 17.0

软件对试验数据进行单因子方差分析,采用 LSD 及 Duncan's 多重比较对各处理间的平均值进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 血清中性腺激素含量

由表 1 可知,与对照组相比,Cd 组 E₂ 含量自第 4 周显著或极显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),保护组自第 6 周显著降低($P<0.05$)。与对照组相比,Cd 组 E₂ 含量分别降低了 6.28%、12.48%、15.30%、17.69%,硒保护组分别降低了 5.05%、9.70%、10.59%、12.91%。血清中 P₄ 含量的变化与 E₂ 相似,与对照组相比,Cd 组自第 4 周显著或极显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),保护组自第 6 周显著降低($P<0.05$)。与对照组相比,Cd 组 P₄ 含量分别降低了 8.82%、13.36%、20.94%、20.71%,硒保护组分别降低了 7.14%、7.69%、12.82%、13.63%。添加酵母硒一定程度上恢复了 Cd 引起的血清 E₂ 和 P₄ 水平的下降。

表 1 血清中 E₂、P₄ 含量变化

组别	E ₂ (pg/mL)				P ₄ (ng/mL)			
	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周
Control	2 374 ± 106aA	2 164 ± 94aA	1 869 ± 102aA	1 758 ± 59aA	2.38 ± 0.02aA	2.47 ± 0.02aA	2.34 ± 0.02aA	1.98 ± 0.01aA
Cd	2 225 ± 104aA	1 894 ± 68bA	1 583 ± 79cB	1 447 ± 82cB	2.17 ± 0.02aA	2.14 ± 0.02bA	1.85 ± 0.01cB	1.57 ± 0.01cB
Cd + Se	2 254 ± 154aA	1 954 ± 68aA	1 671 ± 105bAB	1 531 ± 114bAB	2.21 ± 0.02aA	2.28 ± 0.02aA	2.04 ± 0.14bAB	1.71 ± 0.09bAB

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。

2.2 卵巢组织抗氧化指标

由表 2 可知,与对照组相比,染 Cd 组和酵母硒保护组的 SOD 活性、GSH-Px 活性、GSH 含量均显著或极显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),MDA 含量显著或极显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与染 Cd 组相比,酵母硒保护组的 SOD 活性、GSH 含量均显著升高($P<0.05$),MDA 含量显著降低($P<0.05$)。其中,Cd 组和保护组的 SOD 活性分别低于对照组 32.45%、16.81%,GSH-Px 活性分别低于对照组 26.26%、16.07%,GSH 含量分别低于对照组 19.83%、8.51%,MDA 含量分别高于对照组 37.03%、17.07%。可见,Cd 染毒使卵巢发生脂质过氧化反应,酵母硒通过增强抗氧化酶活性、减少脂质过氧化物的产生缓解 Cd 对蛋鸡卵巢的氧化损伤。

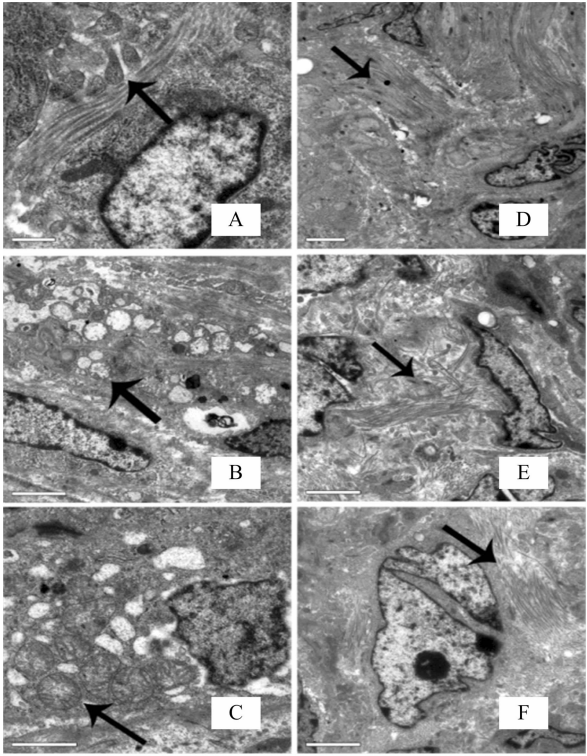
表 2 卵巢组织中抗氧化指标的变化

组别	SOD 活性 (U/mL)	GSH-Px 活性 (U/mL)	GSH 含量 (mg/mL)	MDA 含量 (nmol/g)
对照组	6.78 ± 0.54aA	22.47 ± 1.62aA	35.49 ± 2.53aA	0.34 ± 0.01aA
Cd + Se 组	5.64 ± 0.12bB	18.86 ± 0.08bB	32.47 ± 3.01bAB	0.41 ± 0.02bAB
Cd 组	4.58 ± 0.86cAB	16.57 ± 0.56bB	28.45 ± 1.14cB	0.54 ± 0.01cB

注同表 1。

2.3 卵巢超微结构变化

超微结构观察发现,对照组卵巢细胞结构完整,线粒体结构清晰完整,卵母细胞微绒毛排列紧密、结构完整(图 1-A、图 1-D)。Cd 组部分卵母细胞微绒毛散乱、稀疏、断裂,颗粒细胞染色质团集,线粒体膜不完整,部分嵴断裂空泡化(图 1-B、图 1-E)。硒保护组线粒体结构基本完整,微绒毛排列略稀疏,但排列整齐,且较少断裂(图 1-C、图 1-F)。可见,硒保护组的损伤程度低于 Cd 染毒组(图 1 中“↑”所示)。



A、D—对照组; B、E—Cd 组; C、F—硒保护组

图 1 卵巢细胞超微结构变化

2.4 卵巢中 Cd 和硒含量

由表 3 可知,与对照组相比,Cd 组卵巢中 Cd 含量极显著升高,硒含量无显著差异;硒保护组硒含量极显著升高。与 Cd 组相比,硒保护组 Cd 含量略有升高,但差异不显著,硒含量极显著升高。添加酵母硒提高了卵巢中硒含量,可能促进

含硒抗氧化酶活性的提高,但不能减轻 Cd 在卵巢中的沉积。

表 3 卵巢中 Cd 和硒含量

组别	Cd(μg/kg)	Se(μg/kg)
对照组	0.18±0.01aA	0.33±0.01aA
Cd 组	10.94±0.87bB	0.37±0.02aA
Cd+Se 组	11.22±0.64bB	3.35±0.12bB

注同表 1。

3 结论与讨论

近年来,Cd 的生殖内分泌干扰作用引起了人们的广泛关注。其中,Cd 对孕激素合成的影响已成为研究热点之一。Cd 可降低血清中 E₂ 和 P₄ 浓度。Paksy 等在体外培养颗粒细胞和黄体细胞,向培养液中加入不同浓度的 CdCl₂ 溶液,观察 CdCl₂ 对 E₂ 和 P₄ 的影响;结果表明,体外给予 CdCl₂ 可抑制颗粒细胞和黄体细胞合成 E₂ 和 P₄^[5]。在体试验也表明,Cd 可降低大鼠血清内 E₂ 和 P₄ 浓度,并存在剂量效应^[10-11]。本试验结果表明,Cd 组血清中 E₂、P₄ 浓度均降低,且随着染 Cd 时间的延长呈明显时间效应,这与以往报道基本一致。

氧化应激是介导 Cd 毒性损伤作用的主要原因之一^[12-14]。本研究发现,蛋鸡 Cd 暴露后卵巢组织的 MDA 含量增加,抗氧化酶 SOD 活性、GSH-Px 活性均降低,抗氧化物 GSH 含量下降,表明 Cd 引起的蛋鸡卵巢损伤同样与脂质过氧化密切相关。添加酵母硒对 Cd 引起的卵巢氧化损伤具有一定改善作用,这与在大鼠肝脏中的研究结果一致,硒通过降低 MDA 水平、增加抗氧化酶活性来拮抗 Cd 的毒性损伤^[15]。硒保护组卵巢中硒含量增加,Cd 含量与 Cd 暴露组相当,表明同时饲喂酵母不能减少 Cd 在卵巢中的蓄积;而硒保护组 GSH-Px 活性的升高与补硒直接相关,表明补硒能通过增强组织中 GSH-Px 活性清除自由基来拮抗 Cd 的毒性损伤。

进一步通过超微结构观察发现,卵泡颗粒细胞出现以凋亡为主的形态变化。笔者推断,血清中 E₂、P₄ 含量变化可能的原因为 Cd 损伤卵巢组织,抑制卵泡发育,使卵泡闭锁增加,卵泡内膜细胞、卵泡颗粒细胞的形态结构均受到损伤。Cd 可在卵巢组织中蓄积,可能通过与雌激素受体、孕酮受体等类固醇激素受体结合介导发挥其毒性作用,使血清中 E₂、P₄ 水平降低^[16]。

超微结构研究显示,卵巢组织结构受损,其中微绒毛的变化最为明显。卵泡中各微细结构的生理功能及其变化与卵泡发育存在密切关系。微绒毛是细胞表面的特定结构,是细胞膜和细胞质向细胞表面伸出的指状凸起,能够使细胞的表面积增加几十倍。卵母细胞通过微绒毛结构与卵泡颗粒细胞发生联系,从而进行物质交换和信息传递,获得养分和信息因子。在发育阶段,卵母细胞代谢旺盛,微绒毛较多,以便更多吸收颗粒细胞输送来的营养物质;同时,对来自颗粒细胞的各种信息因子也最为敏感。如果卵泡细胞激素分泌发生变动或营养供应受阻,卵泡颗粒细胞先行退化,随之微绒毛退化,从而引起卵母细胞闭锁^[17]。Cd 组微绒毛散乱、稀疏,部分断裂,卵泡颗粒细胞形态结构均受到损伤,直接影响 E₂、P₂ 的分泌;结合线粒体的结构变化,进一步证明氧化应激是 Cd 暴露引起卵母细胞损伤的主要原因。

添加酵母硒可缓解 Cd 暴露引起的产蛋率下降,有效降

低 Cd 暴露引起的卵巢组织脂质过氧化损伤,同时提升血清中 E₂、P₄ 的含量水平,有效改善 Cd 暴露引起的卵巢细胞微绒毛、线粒体等超微结构的损伤。可见,酵母硒可通过减缓 Cd 暴露所致的脂质过氧化反应来拮抗 Cd 对蛋鸡卵巢的毒性损伤,饲料中添加酵母硒对 Cd 所致蛋鸡卵巢毒性损伤具有一定的保护效果。

参考文献:

[1] Weidner W J, Sillman A J. Low levels of cadmium chloride damage the corneal endothelium[J]. Archives of Toxicology, 1997, 71(7): 455-460.

[2] Shaikh Z A, Vu T T, Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1999, 154(3): 256-263.

[3] Pillai A, Priya L, Gupta S. Effects of combined exposure to lead and cadmium on the hypothalamic-pituitary axis function in proestrous rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2003, 41(3): 379-384.

[4] Saygi S, Deniz G, Kutsa O, et al. Chronic effects of cadmium on kidney, tility of male rats[J]. Biological Trace Element Research, 1991, 31(3): 209-214.

[5] Paksy K, Rajczy K, Forga C Z. Cadmium interferes with with steroid biosynthesis in rat granulosa and luteal cells *in vitro*[J]. BioMetals, 1992, 5(4): 245-250.

[6] 黄雅卿, 夏品苍, 李 宏, 等. Cd 在不同动情周期对卵巢切碎组织分泌性激素的影响[J]. 中国职业医学, 2005, 32(6): 19-20.

[7] 彭 西, 柏才敏, 李 敏, 等. 高硒对雏鸡红细胞免疫功能红细胞总数及血红蛋白含量的影响[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(6): 535-539.

[8] 宋美娥, 李 奎. 硒的生物学特性及机制研究[J]. 饲料研究, 2011(4): 45-46.

[9] Wang C, Lovell R T. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite. in diets for channel catfish (*Zctalurus punctatus*) [J]. Aquaculture, 1997, 152: 223-234.

[10] 李煌元, 吴思英, 张文昌, 等. Cd 的雌性性腺生殖毒性研究现状 [J]. 中国公共卫生, 2002, 18(3): 379-381.

[11] 张文昌, 闫 平, 黄雅卿, 等. Cd 对大鼠卵巢性激素分泌功能的影响[J]. 毒理学杂志, 2005, 19(3): 232.

[12] Zhang H J, Cai C C, Shi C L, et al. Cadmium-induced oxidative stress and apoptosis in the testes of frog *Rana limnocharis* [J]. Aquatic Toxicology, 2012, 122/123: 67-74.

[13] Macías M D, Laiz I, Moreno G I, et al. Is oxidative stress related to cadmium accumulation in the Mollusc *Crassostrea angulata*? [J]. Aquatic Toxicology, 2015, 161: 231-241.

[14] Matovi C V, Buha A, AukiC - CosiC D, et al. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys[J]. Food and Chemical Toxicology, 2015, 78: 130-140.

[15] Newairy A A, El - Sharaky A S, Badredeen M M, et al. The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats[J]. Toxicology, 2007, 242: 23-30.

[16] 李煌元, 张文昌, 林 炜, 等. 低剂量染 Cd 对大鼠生殖机能及胚胎毒性的影响[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(8): 955-956.

[17] 李 籍, 杨利屋. 卵母细胞微绒毛形态与机理研究进展[J]. 黑龙江畜牧科技, 1998(4): 31-32.