

廖秋萍,陈根元,贾琦珍,等.小花棘豆中毒和田羊丘脑-垂体-睾丸轴的病理学观察[J].江苏农业科学,2018,46(3):151-154.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.03.039

小花棘豆中毒和田羊丘脑-垂体-睾丸轴的病理学观察

廖秋萍,陈根元,贾琦珍,王 帅

(塔里木大学动物科学学院/新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室,新疆阿拉尔 843300)

摘要:以小花棘豆中毒和田羊为研究对象,屠宰后采集试验羊的丘脑、垂体和睾丸组织,测定其脏器指数后检测其显微及超微结构的变化。探讨小花棘豆中毒对雄性和田羊丘脑-垂体-睾丸轴(hypothalamus-pituitary-testis axis, HPTA)形态学的影响,进一步探讨小花棘豆的中毒机理。结果显示,小花棘豆中毒可导致和田羊丘脑、垂体和睾丸指数极显著升高($P < 0.01$),HE染色表明丘脑神经元细胞固缩、浓染;垂体中细胞核变形、浓染,胞浆减少;睾丸曲精细管细胞排列紊乱,管壁变薄,管腔内精子数量减少,睾丸支持细胞和间质细胞均出现明显空泡。透射电镜结果显示,小花棘豆中毒和田羊丘脑中神经元细胞核染色质聚集,线粒体嵴断裂,神经髓鞘端板层离散;垂体中促性腺激素细胞核染色质聚集,线粒体肿胀呈空泡状,内质网扩张;睾丸中精原细胞和精母细胞胞质内线粒体肿胀形成空泡,精子细胞核膜破裂,胞质内线粒体肿胀形成空泡,嵴断裂,部分精子细胞缺少顶体颗粒。小花棘豆中毒可造成雄性和田羊丘脑、垂体及睾丸组织显微和超微结构的改变,表明小花棘豆可通过HPTA影响雄性生殖系统。

关键词:小花棘豆;和田羊;丘脑-垂体-睾丸轴;显微结构;超微结构

中图分类号: S856.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)03-0151-03

小花棘豆(*Oxytropis glabra* DC.)是疯草的一种,在新疆天然草地中广泛分布,据不完全统计仅新疆阿克苏地区天然草场中广泛丛生小花棘豆的面积已超过20%。目前放牧家畜小花棘豆中毒对新疆草原畜牧业的发展危害严重,每年中毒的家畜占放牧总数的5%~10%,其中50%左右的中毒家畜死亡^[1]。国内外研究发现,小花棘豆中毒对动物的繁殖机能影响极为明显,可导致公畜性欲下降,精子活力降低^[2],母畜不孕、流产、难产,甚至幼畜死亡^[3]。目前,研究认为动物体内的内分泌系统包括丘脑-垂体-甲状腺轴、丘脑-垂体-肾上腺轴和丘脑-垂体-性腺轴3大系统,而动物的生殖功能依赖于内分泌腺与神经系统的调节,在生殖内分泌系统中,丘脑-垂体-性腺轴通过调节动物的性激素水平维系动物的生殖功能^[4]。在雄性动物中,丘脑-垂体-性腺轴由丘脑、垂体和睾丸构成。王帅等研究发现小花棘豆中毒家兔脑组织和生殖器官均发生以空泡变性为主要特征的病理学变化,而且与小花棘豆摄入量有明显的时间-剂量效应^[5]。进一步研究发现小花棘豆中毒可通过影响绵羊丘脑-垂体-性腺轴中 α -甘露糖苷酶的活性与表达,从而导致绵羊繁殖机能障碍^[6]。

和田羊是新疆南疆地区的主要放牧品种,在该地区畜牧业中占有重要地位,占该地区绵羊存栏数的70.97%。近年来,和田羊小花棘豆中毒已成为该地区畜牧业发展面临的严重问题^[7]。本试验通过制备小花棘豆中毒和田羊丘脑、垂体、睾丸的组织切片,利用HE染色及电子显微镜分别对中毒和田羊丘脑、垂体和睾丸组织的病理结构以及细胞的超微结构进行观察,分析小花棘豆毒性成分对和田羊生殖内分泌的影响,进一步探讨动物小花棘豆中毒的机理,为小花棘豆中毒的防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料、试剂与仪器

小花棘豆(*Oxytropis glabra* DC.)样品采自新疆和田市策勒县恰哈乡,由塔里木大学动物科学学院草业科学教研室鉴定,取植株的地上部分,风干后备用。

伊红、苏木精、苦味酸、乙醇、甲醛、二甲苯等试剂均为国产分析纯。

CX41型生物显微镜,日本Olympus;HT7700型透射电子显微镜,日本Hitachi;RM2235型轮转式切片机,德国Leica;TB-718型分体式生物组织包埋机,湖北泰维科技实业有限公司;YT-7C型生物组织摊烤片机,湖北孝感市亚光医用电子技术有限公司。

1.2 试验动物

雄性和田羊6只,体质量(32 ± 1.4 kg),购自兵团第十四师一牧场,其中对照羊1只,小花棘豆攻毒羊5只。对照羊自由采食青干草,每日补饲精料300 g,试验组饲喂小花棘豆粉,每天按20 g/kg的剂量与300 g精料加水混匀,每天饲喂3次,即08:00—09:00、14:00—15:00、19:00—20:00,自行采食

收稿日期:2016-10-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31460678);国家星火计划(编号:2015GA891015);新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室开放课题(编号:HS201409)。

作者简介:廖秋萍(1965—),女,新疆阿拉尔人,实验师,研究方向为动物病理学。E-mail:1206538677@qq.com。

通信作者:王 帅,硕士,高级实验师,主要从事动物中毒病及毒理学方面的研究。E-mail:wangshuidky@126.com。

完后饲喂青干草,自由饮水。待试验组均出现喜卧、站立不稳、以手提耳即出现摇头、易突然倒地等典型临床症状后进行屠宰,试验期 35 d。

1.3 和田羊丘脑、垂体和睾丸病理组织结构的观察

取对照和田羊与中毒和田羊的丘脑、垂体和睾丸组织,分别称取质量,再除以羊宰前体质量,即得各器官指数。然后取部分组织使用 Bouin's 液(饱和苦味酸溶液 75 mL,40% 甲醛溶液 25 mL,冰乙酸 5 mL)固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明后常规步骤石蜡包埋。包埋组织进行连续切片,片厚 6 μm ,摊片、烤片后,常规 HE 染色方法染色,镜检观察。

1.4 和田羊丘脑、垂体和睾丸超微结构的观察

分别取对照和田羊与中毒和田羊的丘脑、垂体和睾丸组织,部分组织切成 1 mm^2 左右的组织块后使用 2.5% 戊二醛固定,经过脱水、渗透、包埋、聚合、切片、染色等步骤后使用透射电子显微镜在 80 kV 电压下,观察各组织的超微结构的变化。

2 结果与分析

2.1 小花棘豆中毒对和田羊丘脑、垂体和睾丸指数的影响

由表 1 可知,中毒和田羊丘脑指数、垂体指数和睾丸指数

均极显著高于对照组($P < 0.01$),表明饲喂小花棘豆对和田羊实质性脏器有较大的损伤。

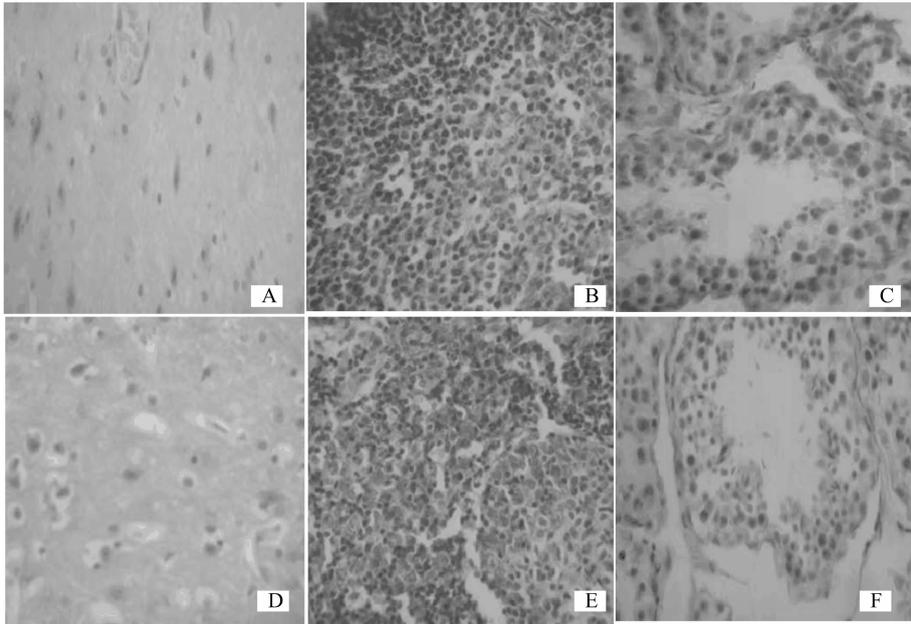
表 1 小花棘豆中毒对和田羊丘脑、垂体和睾丸指数的影响

项目	丘脑指数	垂体指数	睾丸指数
对照组	0.447 \pm 0.038bB	0.003 5 \pm 0.000 3bB	0.08 \pm 0.008bB
中毒组	0.682 \pm 0.057aA	0.005 7 \pm 0.000 5aA	0.12 \pm 0.007aA

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

2.2 小花棘豆中毒和田羊丘脑、垂体和睾丸病理组织结构的观察

小花棘豆中毒和田羊病理剖检可见脑膜血管充血,其他脏器无明显肉眼可见变化。HE 染色结果(图 1)表明,与对照羊相比,小花棘豆中毒和田羊丘脑神经元细胞、神经胶质细胞的胞体均发生固缩,胞质中充满颗粒状尼氏体或深紫色小块,胞核发生碎裂、浓染;垂体中可见嗜碱性细胞、嗜酸性细胞和嫌色细胞,其细胞核多发生变形、浓染,胞浆减少;睾丸中各级生精细胞排列紊乱,层数减少,管腔中的成熟精子数也明显降低,生精小管周围间隙变宽,睾丸支持细胞和间质细胞出现明显空泡。



A、B、C 分别为对照和田羊的丘脑、垂体、睾丸组织切片图, D、E、F 分别为中毒和田羊的丘脑、垂体、睾丸组织切片图。图 2 同

图 1 对照和田羊与小花棘豆中毒和田羊丘脑、垂体和睾丸病理组织结构的观察

2.3 小花棘豆中毒和田羊丘脑、垂体和睾丸超微结构的观察

经透射电镜检查,对照和田羊丘脑中神经细胞染色质分布均匀,核膜完整,线粒体内嵴清晰,神经髓鞘排列紧密,呈层状结构(图 2-A);垂体中可见促性腺激素细胞,其胞质中分泌颗粒大小不一,胞浆中线粒体、高尔基体、粗面内质网等细胞器均清晰可见(图 2-B);睾丸中精原细胞、精母细胞、间质细胞、支持细胞和精子细胞均正常(图 2-C)。小花棘豆中毒和田羊丘脑中神经细胞染色质聚集成块,细胞核肿胀、破裂,线粒体嵴发生断裂,神经髓鞘排列模糊不清,板层结构离散,有些发生断裂,另并有髓鞘球产生(图 2-D);垂体细胞中染色质聚集,胞核碎裂,线粒体肿胀、空泡化,嵴断裂,并可见内

质网扩张(图 2-E);睾丸中精原细胞和精母细胞均可见细胞核中染色质聚集,胞浆中的线粒体肿胀、空泡化,嵴断裂,支持细胞和间质细胞中细胞核局部核膜不完整,成分裂状,线粒体嵴断裂,空泡增多,胞浆减少,精子细胞顶体膜和核膜破裂、不完整,胞质内线粒体形成空泡,染色质聚集(图 2-F)。试验结果表明小花棘豆攻毒后和田羊丘脑、垂体和睾丸细胞的超微结构变化明显。

3 结论与讨论

脏器指数可直观地反映毒性物质对动物内脏器官的影响,其变化可用于初步判断毒性物质对动物内脏器官的损害

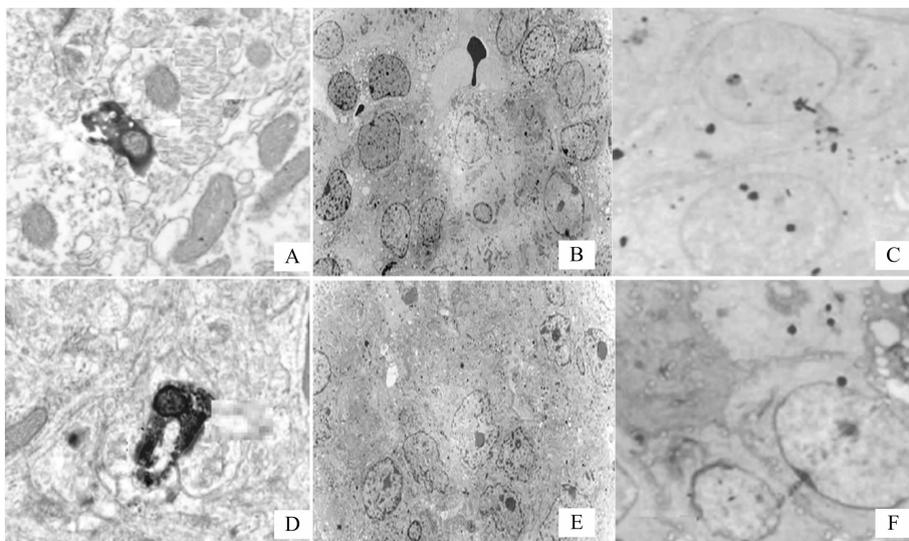


图2 对照和田羊与小花棘豆中毒和田羊丘脑、垂体和睾丸超微结构的观察

程度。丘脑、垂体和睾丸是雄性动物繁殖系统的重要器官,其中垂体是家畜分泌激素调控中心,睾丸是多种垂体激素的作用受体。本试验中小花棘豆中毒和田羊丘脑指数、垂体指数和睾丸指数均极显著高于对照组($P < 0.01$),与邓利等的研究结果^[8]一致。试验结果表明,小花棘豆毒性成分对和田羊丘脑、垂体和睾丸组织均有较大程度的损伤,其对中毒动物繁殖机能的影响可能与丘脑-垂体-睾丸轴损伤有关。

丘脑是调节内脏活动和内分泌活动的较高级神经中枢所在,可分为弓状核、视交叉上核、视上核、室旁核等部分;垂体包括腺垂体和神经垂体,主要由嗜碱性细胞、嗜酸性细胞和嫌色细胞组成,其中嗜碱性细胞包括促性腺激素细胞、促甲状腺激素细胞和促肾上腺皮质细胞,嗜酸性细胞包括生长激素细胞和催乳素细胞;睾丸组织主要由支持细胞、间质细胞和各级生精细胞组成。本试验中,小花棘豆中毒和田羊丘脑神经元细胞和神经胶质细胞均发生固缩、胞核碎裂、浓染;垂体中细胞多发生胞核变形、浓染,胞浆减少;睾丸中各级生精细胞排列紊乱,层数减少,管腔中的成熟精子数也明显降低,生精小管周围间隙变宽,睾丸支持细胞和间质细胞出现明显空泡。贾琦珍等的研究发现小花棘豆中毒可显著影响家兔丘脑中 α -甘露糖苷酶的活性与表达,并可导致家兔丘脑细胞损伤^[9];丁伯良等的研究认为甘肃棘豆(主要毒性成分为苦马豆素,与小花棘豆一致)中毒山羊睾丸的曲细精管及生精上皮细胞明显损伤^[10]。本试验结果均与之一致,结果表明小花棘豆毒性成分可作用于和田羊丘脑-垂体-睾丸轴,导致其激素分泌受阻,精子无法正常发生,直接影响精子质量,从而影响雄性和田羊的生殖功能。

丘脑中的神经元多为内分泌神经元,主要调节神经内分泌系统,其中与动物生殖功能密切相关的为促性腺激素释放激素神经元。垂体可控制动物机体中与生长、代谢、发育和繁殖等功能相关的激素分泌,但这些激素分泌依赖于相应的分泌细胞。睾丸是雄性动物主要的生殖器官,其主要功能是分泌雄性激素,产生精子。其精子发生的过程是由相对不分化的精原细胞逐渐发育为高度分化的成熟精子。本试验结果表明,小花棘豆中毒和田羊丘脑中神经细胞染色质聚集成块,细

胞核肿胀、破裂,线粒体嵴发生断裂,神经髓鞘排列模糊不清,板层结构离散,有些发生断裂,另并有髓鞘球产生。髓鞘可以提高神经冲动传导的速度,保护轴突,在维持脑功能中起着重要的作用^[11]。髓鞘结构的紊乱会降低神经冲动的传导效率,小花棘豆毒性成分可能借此影响动物的丘脑功能。中毒羊垂体细胞中染色质聚集,胞核碎裂,线粒体肿胀、空泡化,嵴断裂,并可见内质网扩张。线粒体可为细胞提供生命活动所必需的能量,在细胞代谢中占有重要地位。因此,细胞内线粒体超微结构的改变可能会直接影响细胞的功能,如激素的分泌和释放等。睾丸中精原细胞和精母细胞均可见细胞核中染色质聚集,胞浆中的线粒体肿胀、空泡化,嵴断裂,支持细胞和间质细胞中细胞核局部核膜不完整,成分裂状,线粒体嵴断裂,空泡增多,胞浆减少,精子细胞顶体膜和核膜破裂、不完整,胞质内线粒体形成空泡,染色质聚集。支持细胞是雄性动物生殖系统的重要组成部分,作为生精上皮中的唯一体细胞,对生殖细胞具有支持和营养的作用,间质细胞主要合成和分泌睾酮,具有促进生殖器官发育,维持正常性欲及动物第二性征等作用,并可调节生精上皮的生精过程^[12]。小花棘豆毒性成分可显著影响雄性和田羊支持细胞和间质细胞的超微结构变,可能会对雄性激素的分泌与生精过程产生直接影响,进而影响精子形成的其它环节,从而影响雄性动物的生殖功能。

小花棘豆攻毒可导致雄性和田羊丘脑、垂体和睾丸的组织形态结构发生明显的病理变化,其中中毒和田羊丘脑指数、垂体指数和睾丸指数均极显著升高($P < 0.01$),丘脑神经元细胞固缩、浓染;垂体中细胞核变形、浓染,胞浆减少;睾丸曲细精管细胞排列紊乱,管壁变薄,管腔内精子数量减少,睾丸支持细胞和间质细胞出现明显空泡。透射电镜结果显示,小花棘豆中毒和田羊丘脑中神经元细胞核染色质聚集,线粒体嵴断裂,神经髓鞘端板层离散;垂体中促性腺激素细胞核染色质聚集,线粒体肿胀呈空泡状,内质网扩张;睾丸中精原细胞和精母细胞胞质内线粒体肿胀形成空泡,精子细胞核膜破裂,胞质内线粒体肿胀形成空泡,嵴断裂,部分精子细胞缺少顶体颗粒。小花棘豆中毒可造成雄性和田羊丘脑、垂体及睾丸组织显微和超微结构的改变,从而影响其繁殖机能。

王敏,田孟丹,范耘硕,等. 不同营养盐水平对威氏海链藻生长特性的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(3):154-159.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.03.040

不同营养盐水平对威氏海链藻生长特性的影响

王敏^{1,2}, 田孟丹¹, 范耘硕¹, 高金伟¹

(1. 天津农学院水产学院/天津市水产生态与养殖重点实验室, 天津 300380; 2. 大连海洋大学, 辽宁大连 116023)

摘要:以生物量、吸光度($D_{680\text{nm}}$)和叶绿素含量为观察指标,利用试验生态学的方法研究氮磷比、钾钠比、硅浓度、铁浓度对威氏海链藻生长的影响。结果表明,氮磷比为16:1时,威氏海链藻为指数增长,其他试验组藻生长曲线波动性较大;钾钠比为1:3时生长情况均明显好于1:1、3:1的试验组;在硅含量为0.0、4.0 mg/L的培养液中,所测得威氏海链藻的生物量、吸光度和叶绿素含量均比0.5、1.2 mg/L时低;添加铁元素2.0 mg/L时藻的吸光度和叶绿素含量最高,没有铁的培养基中测得的威氏海链藻各生长指标均处于最低。

关键词:威氏海链藻;营养盐;生物量;叶绿素含量;吸光度;生态学法;生长特性

中图分类号: S968.43⁺⁹ **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)03-0154-06

威氏海链藻(*Thalassiosira weissflogii*)是一种典型的中心纲(Centricae)浮游硅藻,硅质化程度高,生存能力强^[1-2],细胞由无定型二氧化硅组成,具有精致而独特的微纳米分级结构。这种壳体具有多孔、比表面积大、机械性能良好、光学性能优异等特点^[3-4],在制备新型纳米材料和器件(如微型传感器、微过滤器、生物载体等)时具有独特的优势^[5-6]。硅藻生长速度快、营养需求低、遗传性状稳定,实现硅藻的大规模培养可为今后制备新型纳米材料提供丰富的原料^[7]。

微量元素在海水藻的生长过程中不可缺少,一方面是由于有些微量元素是细胞本身组成不可缺少的元素^[8],另一方面是由于有些微量元素是酶活性基团的组成部分^[9]。因此,在海水单胞藻培养过程中,必须使用微量元素,否则随着常量元素氮(N)、磷(P)等的消耗,微量元素将会限制海水单胞藻的生长。一般认为铁(Fe)、铜(Cu)、锌(Zn)、锰(Mn)、钼(Mo)、钴(Co)等是海洋浮游植物必需微量元素,通常以无机离子形式将上述微量元素加入单胞藻培养液中^[10]。本研究除选取培养试验研究较少的因子,钾钠比(K:Na)、硅(Si)、氮磷比(N:P)及微量元素铁(Fe)外,也研究了不同N:P对威氏海链藻生长的影响,为今后威氏海链藻大规模培养以及研究其形成赤潮的机理提供依据。

收稿日期:2016-09-19

基金项目:天津农学院大学生创新创业训练计划(编号:201510061048);卫星海洋环境动力学国家重点实验室开放课题(编号:SOED1419);天津农学院科学研究发展计划(编号:2014N11)。

作者简介:王敏(1992—),女,江苏泰州人,硕士研究生。E-mail:591716562@qq.com。

通信作者:高金伟,女,博士研究生,实验师,主要从事功能性饵料微藻研究。E-mail:gaojinwei@tjau.edu.cn。

1 材料与amp;方法

1.1 试验藻种

本试验所用威氏海链藻由国家海洋局第二海洋研究所提供。

(23):59-62.

参考文献:

- [1] 严杜建,周启武,路浩,等. 新疆天然草地毒草灾害分布与防控对策[J]. 中国农业科学,2015,48(3):566-583.
- [2] 王帅,贾琦珍,陈根元,等. 小花棘豆中毒对家兔生精细胞p53、Bcl-2和Bax表达的影响[J]. 基因组学与应用生物学,2016,35(5):1115-1122.
- [3] 王帅,贾琦珍,陈根元,等. 小花棘豆中毒对大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴 α -甘露糖苷酶的影响[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2016,45(1):70-76.
- [4] 王帅,陈根元,贾琦珍,等. 小花棘豆中毒对家兔丘脑-垂体-性腺轴 α -甘露糖苷酶的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2016,44(8):41-48.
- [5] 王帅,胡建军,陈根元,等. 小花棘豆中毒家兔的病理形态学观察[J]. 江苏农业科学,2014,42(6):175-177,178.
- [6] 王帅,廖秋萍,贾琦珍,等. 小花棘豆中毒对和田羊丘脑-垂体-性腺轴 α -甘露糖苷酶的影响[J]. 中国畜牧杂志,2015,51(23):59-62.
- [7] 陈根元,贾琦珍,王帅. 小花棘豆中毒对绵羊运氧能力和抗氧化损伤的研究[J]. 湖北农业科学,2015,54(13):3193-3196.
- [8] 邓利,白万胜,陶大勇,等. 小花棘豆中毒对和田羊脏器指标的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):271-273.
- [9] 贾琦珍,王帅,张玲,等. 小花棘豆中毒对家兔脑组织 α -甘露糖苷酶的影响[J]. 塔里木大学学报,2015,27(1):18-23.
- [10] 丁伯良,王建辰,薛登民,等. 山羊甘肃棘豆中毒睾丸、附睾的病理学研究[J]. 畜牧兽医学报,1994,25(4):368-374.
- [11] Han H, Sun Z, Luo G, et al. Fluoride exposure changed the structure and the expressions of reproductive related genes in the hypothalamus-pituitary-testicular axis of male mice [J]. Chemosphere, 2015, 135: 297-303.
- [12] Chimento A, Sirianni R, Casaburi I, et al. Role of estrogen receptors and g protein-coupled estrogen receptor in regulation of hypothalamus-pituitary-testis axis and spermatogenesis [J]. Frontiers in Endocrinology, 2014, 5: 1-8.