

网络出版时间:2016-12-26 11:04

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.02.009

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20161226.1104.018.html

DON 暴露对雏鸡神经递质及钙调蛋白含量的影响

耿芳芳,范梦雪,姜云晶,陈晓芳,朱电峰,

李 玉,冯士彬,吴金节,王希春

(安徽农业大学 动物科技学院,安徽 合肥 230036)

[摘要] **【目的】**通过 DON 暴露体内试验,根据雏鸡脑组织中神经递质含量及钙调蛋白(CAM)含量的变化,研究 DON 对雏鸡的神经毒性作用。**【方法】**选取 120 只健康 1 日龄海兰蛋鸡(公)预饲 1 周后,按单因素试验设计随机均分为 DON 低、中、高剂量组 and 对照组,对照组和试验组饲喂相同的全价日粮。DON 低剂量组、中剂量组和高剂量组分别按采食量中含 DON 0.27,1.68 和 12.21 mg/kg 的剂量灌胃,对照组灌服等量的生理盐水。试验从第 8 天开始,每隔 7 d 染毒 1 次,共染毒 5 次。试验期为 36 d。试验结束时,每组随机屠宰 20 只鸡,迅速取出脑组织,检测神经递质含量和 CAM 含量的变化。**【结果】**经高效液相色谱-荧光检测法(HPLC-FD)检测,雏鸡脑组织中未发现 5-羟色胺吲哚乙酸(5-HIAA);与对照组相比,DON 高剂量组雏鸡脑组织中去甲肾上腺素(NE)和 5-羟色胺(5-HT)含量显著升高($P<0.05$),而多巴胺(DA)含量显著降低($P<0.05$)。与对照组相比,DON 中、高剂量组雏鸡神经细胞内游离钙($[Ca^{2+}]_i$)浓度和脑组织中 CAM 含量显著降低($P<0.05$),不同 DON 剂量组 CAM mRNA 基因相对表达量均显著降低($P<0.05$)。**【结论】**DON 暴露可引起雏鸡神经钙稳态变化,并影响部分神经递质的分泌,对雏鸡具有一定的神经毒性作用。

[关键词] 脱氧雪腐镰刀菌烯醇;雏鸡;脑组织;神经递质;钙调蛋白

[中图分类号] S816.72

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2017)02-0056-07

Effects of deoxynivalenol exposure on neurotransmitter and calmodulin contents in chicken

GENG Fangfang, FAN Mengxue, JIANG Yunjing, CHEN Xiaofang, ZHU Dianfeng,
LI Yu, FENG Shibin, WU Jinjie, WANG Xichun

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: **【Objective】**The study investigated the nerve toxicological effects of deoxynivalenol (DON) on chicken based on changes of neurotransmitter and calmodulin (CAM) contents in brain tissues of chicken through in vivo DON exposure. **【Method】**A total of 120 Hailan chicken (male, 1 day old) were selected and equally divided into low, medium and high DON groups according to single factor experiment design after one week feeding. Chicken in control and treatment groups were fed the same diets. Chicken in low, medium and high dose groups were orally fed with DON solutions of 0.27, 1.68 and 12.21 mg/kg, respectively. Chicken in control group were fed with the same doses of sodium chloride solution. The trial last for 36 d. All chicken in treatment groups exposed to DON once every seven days for 5 times. At the end of the trial, 20 chicken from each group were slaughtered, and brain tissues were collected and weighed immediately to measure the changes of neurotransmitters and CAM. **【Result】**HPLC with fluorescence detection showed

[收稿日期] 2015-11-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31472250);安徽省教育厅重点项目(KJ2013A119)

[作者简介] 耿芳芳(1989—),女,安徽阜南人,硕士,主要从事畜禽真菌毒素中毒研究。E-mail:834682409@qq.com

[通信作者] 王希春(1978—),男,安徽利辛人,副教授,主要从事畜禽营养代谢与中毒研究。E-mail:wangxichun@ahau.edu.cn

that 5-HIAA was not found in chicken brain tissues. Compared with the control group, the concentrations of NE and 5-HT in brain tissues of high dose group increased significantly ($P < 0.05$), while the concentrations of DA decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with the control group, the contents of $[Ca^{2+}]_i$ in nerve cells and CAM in brain tissues of medium and high dose groups decreased significantly ($P < 0.05$), and the gene expression of CAM mRNA in treatment groups reduced significantly ($P < 0.05$). 【Conclusion】 DON exposure changed nerve calcium homeostasis and the secretions of neurotransmitters in brain tissues, indicating that DON had neurotoxin effects to chicken.

Key words: deoxynivalenol (DON); chicken; brain tissue; neurotransmitter; calmodulin

真菌毒素 (Mycotoxin) 是真菌在生长过程中产生的一类生物活性相似、具有毒性的次级代谢产物^[1-2]。它一方面直接造成农产品霉败变质、营养物质损失, 导致产品的品质降低等, 另一方面通过对人和动物机体内 DNA、RNA、蛋白质和各种酶类合成的抑制以及对细胞结构的破坏而引起真菌毒素中毒^[3-4]。脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, DON) 广泛存在于农作物及产品中, 是一种污染最为广泛的真菌毒素, 具有神经毒性、细胞毒性、免疫毒性及“三致”等多种毒性作用^[5-6]。由于 DON 容易在饲料中产生, 且含量有时比国家规定的限量标准高出好几倍, 甚至几十倍, 给养殖业造成巨大的经济损失^[7]。尽管有人认为, 成年家禽对 DON 有一定的耐受能力^[8], 但是 DON 对雏鸡的毒害作用却不容忽视, 尤其是对神经系统的损伤, 以及由此导致的食欲减退、生长迟滞和其他相关疾病。Agha 等^[9]研究发现, DON 能迅速在鸡的血脑屏障达到浓度高峰, 大部分被迅速代谢, 仅有不到 1% 被吸收。研究表明, DON 能够在猪的脑部不同部位引起去甲肾上腺素 (Norepinephrine, NE) 和 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 增加及多巴胺 (Dopamine, DA) 减少, 导致免疫应答迟滞^[10]。研究证明, DON 能够导致蛋雏鸡采食量降低、嗜睡、精神沉郁、生长迟滞^[11]。神经细胞钙稳态平衡对维持细胞功能及细胞间信息的传导都具有重要意义。研究发现, DON 能抑制人和动物体内蛋白质的合成, 并引起中枢神经系统的紊乱^[12-13]。细胞内钙减少影响细胞的正常代谢, DON 可抑制钙调蛋白 (CAM) 的合成, 这些都严重影响细胞钙稳态平衡。目前, 有关 DON 对禽类神经毒性的作用机理尚不清楚, 特别是 DON 对禽类神经递质的分泌及神经细胞钙稳态的影响, 国内外还没有报道, 需要进一步研究。基于以上研究现状, 本试验通过雏鸡 DON 暴露体内试验, 根据雏鸡脑组织中神经递质含量及钙稳态平衡的变化, 研究 DON 对雏鸡的神经毒性作用, 以期丰富和

完善 DON 毒性作用的理论, 为有效防治 DON 神经毒性的危害提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

120 只 1 日龄健康海兰蛋鸡 (公), 购于安徽省安禽禽业有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA)、5-羟色胺 (5-HT) 和 5-羟色胺吡啶乙酸 (5-HIAA) 标准品, 均购自美国 Sigma 公司; L-半胱氨酸 (分析纯), 北京索莱宝科技有限公司; TransZolTM 试剂、TransSmart® Top Green qPCR、TransScript® First-Strand cDNA SuperMix 试剂盒、Synthesis SuperMix 试剂盒, 北京全许式金生物技术有限公司; 钙测定试剂盒, 北京北检·新创源生物技术有限公司; 鸡 CAM ELISA 试剂盒, 南京森贝伽生物科技有限公司。BSD-100 振荡培养箱, 上海博讯实业有限公司; 高效液相色谱仪 (600 泵)、2475 荧光检测器、WatersC18 柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm), 美国 Waters 公司; GF-D200 型半自动生化分析仪, 山东高密虹分析仪器有限公司; Multiskan Mk3 型酶标仪, 赛默飞世尔 (上海) 仪器有限公司; MX3000p 荧光定量 PCR 检测系统, 美国 ABI 公司。

1.3 试验动物的选择与分组

120 只 1 日龄健康海兰蛋鸡 (公) 预饲 1 周后, 按单因素试验设计随机均分为 DON 低、中、高剂量组和对照组。DON 低剂量组、中剂量组和高剂量组参照 Yunus 等^[14]的试验报道, 分别按采食量中含 DON 0.27、1.68 和 12.21 mg/kg 的剂量灌胃, 对照组灌服与试验组等量的生理盐水。从第 8 天开始对试验组鸡进行灌胃染毒, 每隔 7 d 染毒 1 次, 共染毒 5 次。对照组和试验组饲喂相同全价日粮, 饲料配方及营养成分见表 1。

表 1 基础日粮配方及营养成分
Table 1 Ingredients and nutrient composition in basal diets

项目 Item	含量 Content	项目 Item	含量 Content
配方 Ingredient		添加剂/(g·kg ⁻¹) Additives	14.50
玉米/(g·kg ⁻¹) Corn	580.00	营养指标 Nutrition index	
豆粕/(g·kg ⁻¹) Soybean meal	240.00	消化能/(MJ·kg ⁻¹) Digestible energy	13.27
鱼粉/(g·kg ⁻¹) Fish meal	120.00	粗蛋白/(g·kg ⁻¹) Crud protein	229.50
植物油/(g·kg ⁻¹) Vegetable oil	30.00	钙/(g·kg ⁻¹) Ca	10.00
L-赖氨酸/(g·kg ⁻¹) L-Lysine	1.50	磷/(g·kg ⁻¹) P	5.00
DL-蛋氨酸/(g·kg ⁻¹) DL-Methionine	2.00	赖氨酸/(g·kg ⁻¹) Lysine	15.20
石粉/(g·kg ⁻¹) Limestone	8.50	蛋氨酸/(g·kg ⁻¹) Methionine	6.00
磷酸氢钙/(g·kg ⁻¹) CaHPO ₄	3.50	胱氨酸/(g·kg ⁻¹) Cystine	2.50

1.4 饲养管理

试验鸡自由采食和饮水,采用阶梯式笼养方式,严格按照雏鸡的饲养标准和免疫程序进行饲养管理,观察记录染毒期间雏鸡的临床表现和生长情况,第 5 次染毒后,所有鸡均继续正常饲喂日粮 1 d,即第 36 天进行样品采集。

1.5 样品的采集与处理

试验结束时,每组随机剖杀 20 只鸡,迅速取脑组织。将脑组织一部分装入冻存管,于液氮中保存用于 CAM mRNA 表达量的检测;一部分加入 PBS 进行快速匀浆,将匀浆液以 10 000 r/min 离心 30 min,取上清液保存于-20℃冰箱内,用于[Ca²⁺]_i和 CAM 含量的测定;另一部分脑组织加入组织裂解液进行快速匀浆,将匀浆液以 10 000 r/min 离心 30 min,取上清液置于-80℃冰箱内保存,用于神经递质的检测。

1.6 脑组织中神经递质的检测

1.6.1 检测方法的建立 1)标准曲线的建立。精确称取 NE、DA、5-HT 和 5-HIAA 4 种神经递质标准品,分别配制成质量浓度为 0.10 mg/mL 的标准储备液,于 4℃冰箱中保存。使用时用标准品溶剂将 4 种神经递质混合稀释至 5.0 μg/mL,然后逐级稀释至 2.5,1.25,0.625,0.312 50,0.156 25,0.078,0.039 和 0.031 2 μg/mL 的混合标准工作液。采用赵燕燕等^[15]报道的高效液相色谱-荧光(HPLC-FD)检测方法对不同质量浓度神经递质混合标准工作液进行检测,重复 3 次,取平均值。以峰面积为纵坐标,神经递质的质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,建立回归方程,计算相关系数。

2)检测限与定量限的确定。配制上述不同质量浓度标准品溶液,添加到对照样品中,提取净化,检测分析。以信噪比 3:1 作为检测限,信噪比 10:1 作为定量限。

1.6.2 样品的检测 1)样品的处理。取出经过预

处理保存于-80℃冰箱中的脑组织匀浆上清液,首先进行低温解冻,然后取 1 mL 上清液,加入等体积的高氯酸沉淀剂,在冰浴中放置 10 min 后,4℃条件下 10 000 r/min 离心 20 min,取上清液供分析。

2)样品的检测分析。将处理好的样品,经 0.22 μm 的针式滤器过滤,按照 1.6.1 中色谱条件和荧光参数进行 HPLC-FD 检测。利用标准曲线和回归方程计算出样品中 4 种神经递质的含量。

1.7 神经细胞内[Ca²⁺]_i和脑组织中 CAM 含量的检测

1.7.1 样品处理及要求 将保存于-20℃冰箱内的脑组织匀浆液的上清液解冻恢复至常温,如出现沉淀,应再次离心。

1.7.2 检测方法 神经细胞内[Ca²⁺]_i的测定采用钙测定试剂盒,脑组织中 CAM 含量的测定采用鸡 CAM ELISA 试剂盒,分别按试剂盒说明书进行操作。

1.8 鸡脑组织中 CAM mRNA 表达量的检测

1.8.1 引物设计 在 GenBank 上查找鸡 CAM mRNA 基因序列(GenBank 登录号:NM_2050 05.1),用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对引物,用于扩增长度为 124 bp 的片段。上游引物 CAM-F:5'-GAAGTAGACGCTGATGGCAA-3',下游引物 CAM-R:5'-CCTTGTCAAACACACGGAAC-3'。以 *Gal-lus* 基因为内参基因,根据 GenBank 中鸡 *Gallus* 基因序列(GenBank 登录号:XP_417079.2)设计 1 对引物,用于扩增长度为 282 bp 的 *Gallus* 基因,上游引物 *Gallus*-F:5'-ACGTCGCACTGGATTTCGAG-3';下游引物 *Gallus*-R:5'-TGTCAGCAATGCCAGGGTAC-3'。引物由华大基因公司合成。

1.8.2 CAM mRNA 的扩增 1)总 RNA 的提取。采用 Trizol 法提取样品总 RNA,并使用琼脂糖凝胶电泳法进行总 RNA 的鉴定。

2)cDNA 的合成。取 0.2 mL PCR 管(经过灭菌

处理,且无核酸酶),加 500 ng 总 RNA、1 μL 引物和 6 μL RNase-free Water 混匀,65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min 后,冰浴 2 min,再加入 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Anchored Oligo(dT)₁₈ 1 μL 、2 $\times$ TS Reaction Mix 10 μL 、TransScript RT/RI Enzyme Mix 1 μL 、gDNA Remover 1 μL ,轻轻混匀,42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,然后 85 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 失活 TransScript[®] RT,将全长 mRNA 反转录成 cDNA。

3)扩增。取反转录产物 20 μL ,加 ddH₂O 80 μL 、Template+ddH₂O 8.8 μL 、上下游引物各 0.8 μL 、Passive Reference Dye (50 $\times$) II 0.4 μL 、2 $\times$ TransStart[®] Top Green qPCR SuperMix 10 μL 充分混匀。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

1.8.3 扩增曲线的建立 在 PCR 过程中,为了验证样本的可重复性,每种基因样本分别进行了 3 次重复,以循环数为横坐标,以反应过程中的实时荧光强度为纵坐标建立扩增曲线。

1.8.4 溶解曲线分析 为了减少或避免 PCR 过程中可能会形成引物二聚体或者出现非特异性扩增产物,在 PCR 结束后以每 5 s 升高 0.3 $^{\circ}\text{C}$ 的升温速率从 60 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢递增至 95 $^{\circ}\text{C}$,以此获得溶解曲线并进行分析。

1.8.5 实时荧光定量 PCR 检测 按照上述优化后

的反应体系与反应条件进行实时荧光定量 PCR 反应,样品以 *Gallus* 为内参照,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 CAM 基因的相对表达量,其中 $\Delta\Delta C_t$ 的计算公式为: $\Delta\Delta C_t = (\text{试验组 CAM 基因的 } C_t - \text{试验组 } Gallus \text{ 基因的 } C_t) - (\text{对照组 CAM 基因的 } C_t - \text{对照组 } Gallus \text{ 基因的 } C_t)$ 。

1.9 数据统计与分析

试验数据均以“平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)”表示,采用 SPSS 17.0 统计软件中的 ANOVA 过程进行方差分析,多重比较采用 Duncan’s 法。

2 结果与分析

2.1 DON 暴露对雏鸡生长状态的影响

饲养期间对照组雏鸡生长良好,饮食正常,精神状态良好,个体差异小。从第 2 次灌胃开始,试验组雏鸡出现精神沉郁,食欲减退,个体差异大,有少量呈淡绿色稀粪,偶有血便,且症状随着染毒剂量的增加而加重。到试验结束时,各组试验鸡无死亡现象。

2.2 神经递质标准曲线的建立

4 种神经递质的标准曲线见图 1。由图 1 可见,在质量浓度为 0.031 2~5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时各标准方程的线性关系良好。

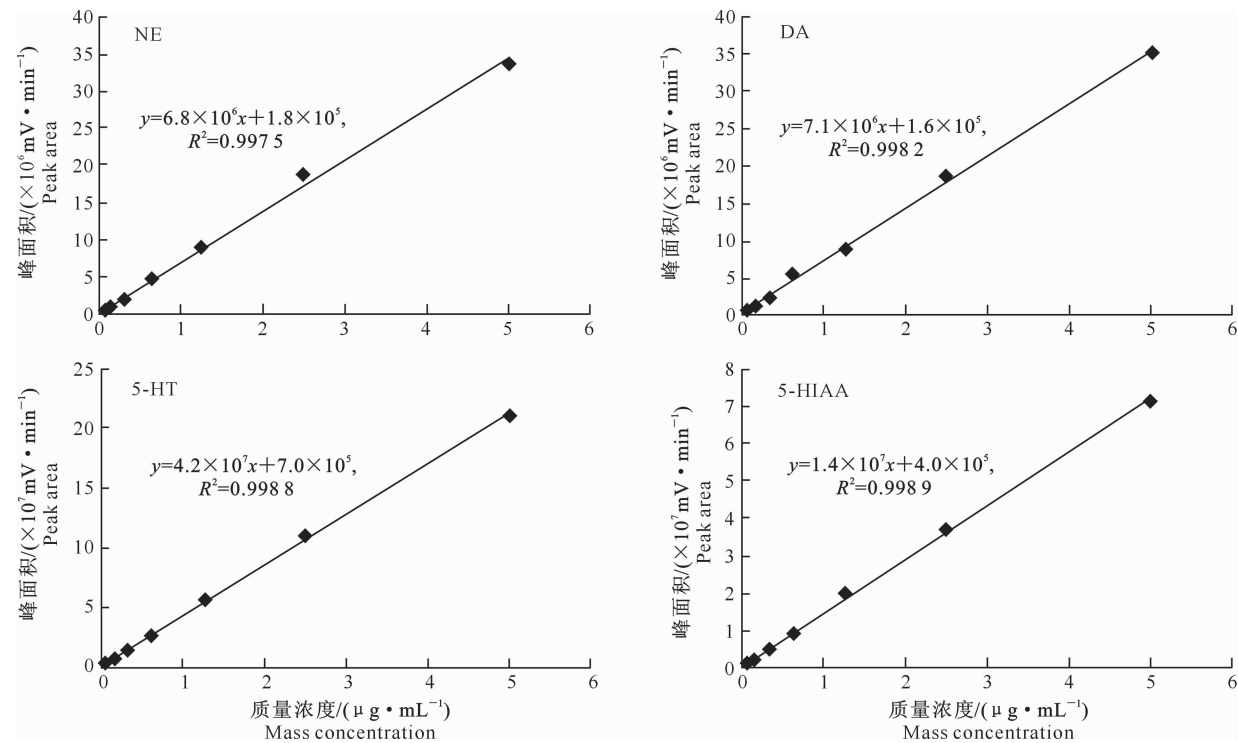


图 1 4 种神经递质的标准曲线

Fig. 1 Standard curves of four neurotransmitters

由图 1 可知,NE 标准曲线的线性回归方程为:
 $y=6.8\times10^6x+1.8\times10^5$,相关系数 $R^2=0.997\ 5$,
检测限是 2.5 ng/mL,定量限是 8.2 ng/mL;DA 标
准曲线的线性回归方程为: $y=7.1\times10^6x+1.6\times$
 10^5 , $R^2=0.998\ 2$,检测限是 4.3 ng/mL,定量限是
14.2 ng/mL;5-HT 标准曲线的线性回归方程为:
 $y=4.2\times10^7x+7.0\times10^5$,相关系数 $R^2=0.998\ 8$,
检测限是 1.8 ng/mL,定量限是 6.02 ng/mL;5-
HIAA 标准曲线的线性回归方程为: $y=1.4\times$

$10^7x+4.0\times10^5$,相关系数 $R^2=0.998\ 9$,检测限是
6.1 ng/mL,定量限是 20.4 ng/mL。

2.3 DON 暴露对雏鸡脑组织中神经递质含量的影响
由表 2 可知,鸡脑组织中不含有神经递质 5-
HIAA,与对照组相比,DON 低、中剂量组神经递质
NE、5-HT 和 DA 含量差异不显著($P>0.05$);DON
高剂量组神经递质 NE 和 5-HT 含量显著升高($P<$
 0.05),而 DA 含量显著降低($P<0.05$)。

表 2 DON 暴露对雏鸡脑组织中神经递质含量的影响

Table 2 Effect of DON on concentrations of neurotransmitters in brain tissues of chicken				$\mu\text{g/mL}$
组别 Group	NE	DA	5-HT	5-HIAA
对照组 Control group	$0.269\pm0.136\ \text{a}$	$0.216\pm0.046\ \text{a}$	$0.008\pm0.001\ \text{a}$	—
DON 低剂量组 DON low dose group	$0.290\pm0.107\ \text{a}$	$0.205\pm0.012\ \text{a}$	$0.008\pm0.014\ \text{a}$	—
DON 中剂量组 DON medium dose group	$0.291\pm0.117\ \text{a}$	$0.176\pm0.064\ \text{a}$	$0.011\pm0.006\ \text{a}$	—
DON 高剂量组 DON high dose group	$0.302\pm0.059\ \text{b}$	$0.160\pm0.007\ \text{b}$	$0.017\pm0.006\ \text{b}$	—

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。表 3 同。“—”表示无。
Note:Different lowercase letters indicate significant difference among treatments at 0.05 level. The same for table 3. “—” indicate without result.

2.4 DON 暴露对雏鸡神经细胞中 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ 和脑组
织中 CAM 含量的影响
由表 3 可知,与对照组相比,DON 中剂量组和

高剂量组神经细胞中 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ 和脑组织中 CAM 含
量显著降低($P<0.05$),而低剂量组两项指标差异
不显著($P>0.05$)。

表 3 DON 暴露对雏鸡神经细胞中 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ 和脑组织中 CAM 含量的影响

Table 3 Effect of DON on concentrations of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ in nerve cells of chicken and CAM in brain tissues of chicken		
组别 Group	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	CAM/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$
对照组 Control group	$0.805\pm0.279\ \text{a}$	$74.702\pm8.486\ \text{a}$
DON 低剂量组 DON low dose group	$0.726\pm0.152\ \text{a}$	$65.224\pm4.784\ \text{a}$
DON 中剂量组 DON medium dose group	$0.444\pm0.094\ \text{b}$	$52.586\pm15.808\ \text{b}$
DON 高剂量组 DON high dose group	$0.424\pm0.220\ \text{b}$	$50.888\pm7.312\ \text{b}$

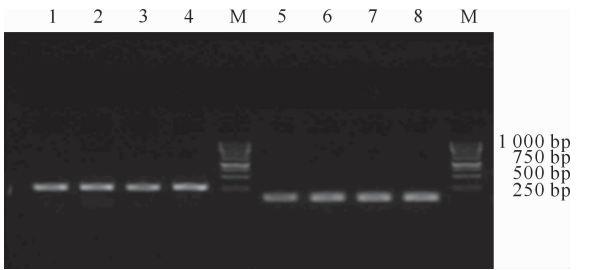
2.5 DON 暴露对雏鸡脑组织中 CAM mRNA 表达
量的影响

2.5.1 总 RNA 鉴定和 PCR 产物凝胶电泳 经琼
脂糖凝胶电泳鉴定,出现了预期的 RNA 条带,说明
提取的 RNA 满足试验要求,可进行下一步试验。
PCR 产物经过凝胶电泳后,*Gallus* 和 CAM 基因引
物分别扩增出 282 和 124 bp 的片段(图 2),与预期
结果一致,并未出现非特异性条带。

2.5.2 扩增曲线分析 扩增曲线结果显示,*Gallus*
和 CAM 基因引物扩增曲线拐点清晰,样本扩增曲
线指数期明显且指数期斜率与扩增斜率成正比,扩
增曲线整体平行性较好,基线平且无上扬趋势,各管
样本的扩增曲线平行性较好,说明各样本的扩增效
率相近,样本无污染。

2.5.3 熔解曲线分析 在 RT-PCR 反应结束之后
进行熔解曲线分析,结果显示 *Gallus* 和 CAM 基因
熔解曲线只出现 1 个峰,熔解温度(T_{m})分别为 87

和 82 $^{\circ}\text{C}$,说明在 RT-PCR 反应中没有产生引物二
聚体,同时也无非特异性扩增,证明引物设计合理,
反应体系和反应条件得到了很好的优化。

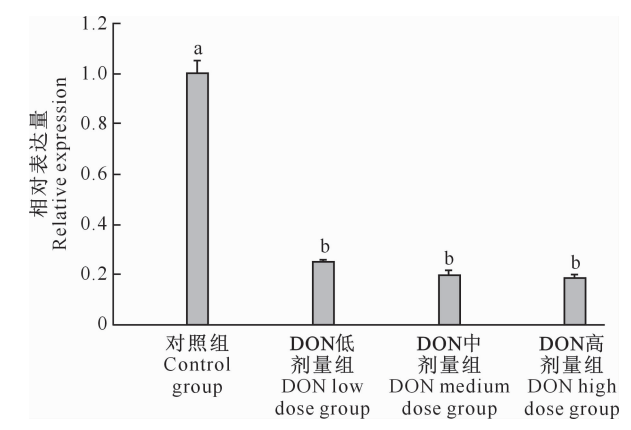


1~4. *Gallus* 基因扩增产物;5~8. CAM 基因
扩增产物;M. DNA Marker
1—4. Amplification products of *Gallus* genes;5—8. Amplification
products of CAM genes;M. DNA Marker

图 2 PCR 产物凝胶电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis of RNA and PCR production
2.5.4 脑组织中 CAM mRNA 相对表达量 由图

3 可见,灌服 DON 能抑制雏鸡脑组织中 CAM mRNA 基因的表达,与对照组相比,DON 低、中、高剂量组 CAM mRNA 基因相对表达量均显著降低 ($P<0.05$),随着攻毒剂量的增加,CAM mRNA 基因相对表达量逐渐降低,但各试验组之间差异不显著 ($P>0.05$)。



图柱上不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)
Different lowercase letters indicate the different was significant ($P<0.05$)

图 3 DON 暴露对雏鸡脑组织 CAM mRNA 的相对表达量的影响

Fig. 3 Effect of DON on relative expression of CAM mRNA in brain tissues of chicken

3 讨 论

DON 的神经毒性作用机制一直是国内外学者研究的热点之一。DON 可影响大脑神经递质的分泌,最常见的是引起脑部 5-HT 浓度升高^[9]。DON 还可导致脑部其他神经递质水平发生变化,Swamy 等^[16]报道,给断奶仔猪饲喂被 DON 污染的饲料导致脑桥 NE 水平减少,下丘脑和脑桥 5-HIAA 的比例升高,引起仔猪采食量下降,生长缓慢。Swamy 等^[17]还发现,脑部 5-HT 浓度升高可导致断奶仔猪出现拒食现象,而相同日粮饲喂肉鸡却没有出现拒食现象,这可能是因为脑组织升高的 5-HT 水平被升高的 NE 水平所中和。Girish 等^[18]在给火鸡饲喂以 DON 为主要毒素的污染饲料时,发现火鸡脑中 5-HT 等神经递质分泌增加,导致鸡拒食,生长缓慢。李佳荣等^[19]研究也证明,DON 能够导致蛋雏鸡采食量降低、嗜睡、精神沉郁、生长迟滞。本试验中,从灌服 DON 第 2 周开始,试验组雏鸡表现出精神沉郁,食欲减退,个体差异大,有少量呈淡绿色稀粪,偶有血便,且临床症状随着染毒剂量的增加而加重,其原因可能是鸡的日龄较低,一次性灌服该剂量

的 DON 造成了雏鸡急性中毒。同时,本试验还发现,与对照组相比,DON 中、低剂量组脑组织中神经递质 NE 和 5-HT 含量虽有升高趋势,DA 虽有降低趋势但差异不显著,而高剂量 DON 可显著提高神经递质 NE 和 5-HT 分泌,显著降低 DA 含量,也表明了升高的 5-HT 等神经递质影响了雏鸡的采食量及精神状态,这与上述报道是一致的。另外,与其他报道不同的是,在雏鸡脑组织中未检测到神经递质 5-HIAA,其原因还需要进一步研究。

突触传递、递质释放、酶的活力和学习记忆的形成等均与钙离子浓度密切相关^[20-21]。彭双清等^[22-23]认为,DON 质量浓度达到 1 mg/mL 时,大鼠心肌细胞 B、L、T 三型 Ca^{2+} 通道均受到明显的阻滞。而细胞内钙离子减少可影响细胞的正常代谢,DON 还具有抑制 CAM 合成的作用,这些都严重影响细胞钙稳态平衡。本试验中,与对照组相比,DON 中、高剂量组雏鸡神经细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 和脑组织中 CAM 含量显著降低,各剂量组 CAM mRNA 基因相对表达量亦显著降低。由试验结果可看出,虽然 DON 对 CAM mRNA 基因相对表达量的影响与对神经细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 和脑组织中 CAM 含量的影响不相同,但均表现出随着攻毒剂量的增加,3 个指标均降低的现象。出现该现象的原因可能是 DON 抑制了神经细胞内 Ca^{2+} 通道和 CAM 的合成,降低了 CAM mRNA 基因的相对表达量,从而降低了 $[Ca^{2+}]_i$ 含量。

综上所述,通过体内暴露试验,DON 可影响雏鸡脑组织中神经递质 5-HT、NE 和 DA 的分泌,升高的 5-HT 等通过神经调控降低了雏鸡的食欲及采食量。同时 DON 降低了神经细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 和组织中 CAM 含量以及 CAM mRNA 基因的相对表达量,改变了雏鸡的神经钙稳态,表明 DON 暴露可对雏鸡产生一定的神经毒性。

[参考文献]

[1] Jeffrey M B, Hussein S H. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals [J]. Toxicology, 2001, 167 (2): 101-134.

[2] Ren Z H, Wang Y C, Deng H D, et al. Deoxynivalenol induces apoptosis in chicken splenic lymphocytes via the reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2015, 39: 339-346.

[3] He C H, Fan Y H, Wang Y, et al. The individual and combined effects of deoxynivalenol and aflatoxin B1 on primary hepatocytes of *Cyprinus carpio* [J]. International Journal of Molecular Science, 2010, 11: 3760-3768.

- [4] Ma Y N, Zhang A H, Shi Z Y, et al. A mitochondria-mediated apoptotic pathway induced by deoxynivalenol in human colon cancer cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 2012, 26(3): 414-420.
- [5] Ebrahem M, Kersten S, Valenta H, et al. Effects of feeding deoxynivalenol (DON)-contaminated wheat to laying hens and roosters of different genetic background on the reproductive performance and health of the newly hatched chicks [J]. *Mycotoxin Research*, 2014, 30(3): 131-140.
- [6] Ren Z H, Wang Y C, Deng H D, et al. Deoxynivalenol-induced cytokines and related genes in concanavalin A-stimulated primary chicken splenic lymphocytes [J]. *Toxicology in Vitro*, 2015, 29(3): 558-563.
- [7] Schulz A K, Kersten S, Danicke S, et al. Effects of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat on feed intake and health status of horses [J]. *Mycotoxin Research*, 2015, 31(4): 209-216.
- [8] Ghareeb K, Awad W A, Sid-Ahmed O E. Insights on the host stress, fear and growth responses to the deoxynivalenol feed contaminant in broiler chickens [J]. *PloS One*, 2014, 9(1): 1-7.
- [9] Agha W Y, Hana V, Sherif M R, et al. Blood plasma levels of deoxynivalenol and its de-epoxy metabolite in broilers after a single oral dose of the toxin [J]. *Mycotoxin Research*, 2010, 26(4): 217-220.
- [10] Prelusky D B, Yeung J M, Thompson B K, et al. Effect of deoxynivalenol on neurotransmitters in discrete regions of swine brain [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1992, 22(1): 36-40.
- [11] 耿芳芳, 许伟, 郭利伟, 等. 复合吸附剂对 AFB₁ 和 DON 暴露鸡血清生化指标的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2015, 35(3): 507-511.
- Geng F F, Xu W, Guo L W, et al. Effects of composite adsorbent on serum biochemistry index in chicken exposed by AFB₁ and DON [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2015, 35(3): 507-511.
- [12] Pralatnet S, Poapolathep S, Imsilp K, et al. The fate and tissue disposition of deoxynivalenol in broiler chickens [J]. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 2015, 77(9): 1151-1155.
- [13] Lessard M, Savard C, Deschene K, et al. Impact of deoxynivalenol (DON) contaminated feed on intestinal integrity and immune response in swine [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2015, 80: 7-16.
- [14] Yunus A W, Ghareeb K, Twaruzek M, et al. Deoxynivalenol as a contaminant of broiler feed: effects on bird performance and response to common vaccines [J]. *Poultry Science*, 2012, 91(4): 844-851.
- [15] 赵燕燕, 刘丽艳, 韩媛媛, 等. 高效液相色谱-荧光检测法同时测定大鼠不同脑区中的 8 种单胺类神经递质 [J]. *色谱*, 2011, 29(2): 146-151.
- Zhao Y Y, Liu L Y, Han Y Y, et al. Simultaneous detection of 8 monoamine neurotransmitters in the different sections of mouse brains by high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2011, 29(2): 146-151.
- [16] Swamy H V L N, Smith T K, MacDonald E J, et al. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on swine performance, brain regional neurochemistry, and serum chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxins adsorbent [J]. *Journal of Animal Science*, 2002, 80(12): 3257-3267.
- [17] Swamy H V L N, Smith T K, MacDonald E J. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on brain regional neurochemistry of starter pigs and broiler chickens [J]. *Journal of Animal Science*, 2004, 82(7): 2131-2139.
- [18] Girish C K, MacDonald E J, Scheinin M, et al. Effects of feed-borne *Fusarium mycotoxins* on brain regional neurochemistry of turkeys [J]. *Poultry Science*, 2008, 87(7): 1295-1302.
- [19] 李荣佳, 李治忠, 周 闯, 等. 新型复合吸附剂 HG 对黄曲霉毒素 B₁ 和呕吐毒素的吸附脱毒研究 [J]. *南京农业大学学报*, 2015, 38(1): 113-119.
- Li R J, Li Z Z, Zhou C, et al. Detoxification of aflatoxin B₁ and deoxynivalenol by new compound adsorbent HG [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2015, 38(1): 113-119.
- [20] 常 晶, 陆 茵, 于布为. 全麻机制研究-细胞内钙离子信号通路研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(1): 11-14.
- Chang J, Lu H, Yu B W. Role of calcium signaling in mechanism of general anesthetics [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2013, 29(1): 11-14.
- [21] 周苏娅, 夏 强. 海马 CA1 区锥体细胞内钙离子释放与突触传递的可塑性 [J]. *神经解剖学杂志*, 2003, 19(1): 11-16.
- Zhou S Y, Xia Q. The relationship between calcium release from CA1 pyramidal neuron induced by synaptic stimulation and plasticity of synaptic transmission in hippocampus [J]. *Chinese Journal of Neuroanatomy*, 2003, 19(1): 11-16.
- [22] 彭双清, 杨进生. 镰刀菌毒素 DON 对心肌细胞膜电位的影响及硒的保护效应 [J]. *中华预防医学杂志*, 2003, 37(6): 423-425.
- Peng S Q, Yang J S. Effect of deoxynivalenol on action potentials of cultured cardiomyocytes and the protective effects of selenium [J]. *Chinese Journal Prevention Medicine*, 2003, 37(6): 423-425.
- [23] 彭双清, 杨进生. 镰刀菌毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇对心肌细胞 Ca²⁺ 通道的阻滞作用 [J]. *中国预防医学杂志*, 2004, 5(4): 241-243.
- Peng S Q, Yang J S. Blocking effect of doxynivalenol (DON) on calcium channels in cultured cardiomyocytes of rats [J]. *Chinese Prevention Medicine*, 2004, 5(4): 241-243.