

# 绵羊羔不同组织对中毒量硒的亲合性研究\*

王建华

Smyth J B A Barlow R M Humphreys D J

(西北农业大学兽医系, 陕西杨陵·712100)

(英国伦敦大学皇家兽医学院病理系)

**摘要** 用 Danscher 染色技术研究绵羊羔不同组织对中毒量硒的亲合性以及莫能菌素的影响, 结果表明: 该技术适用于研究硒中毒绵羊组织器官中的硒分布与组织病理学变化之间的关系, 特别是对那些用常规染色法不呈现特异性或很小变化的组织如辅助淋巴组织生发中心、心肌传导纤维、胰岛及胰腺细胞、肝及肾小管细胞等有明显的优越性; 组织中硒的分布和密度与损伤程度呈正比; 同时服用安全剂量的莫能菌素能增强硒的毒性作用。

**关键词** 绵羊羔, 硒, 莫能菌素, 硒中毒, 组织病理学, 组织化学, 组织染色

**中图分类号** S858.260.216.5, S858.260.232

对正常或硒缺乏的动物, 测定全血或红细胞 GSH-Px 活性, 可以较理想地评价机体内的硒水平<sup>[1,2]</sup>。对机体不同组织硒含量的测定, 可以采用荧光光度计法、原子吸收光谱法、气相色谱法、高压液相色谱法、中子活化分析法等<sup>[3]</sup>。这些方法均需要将湿组织进行消化处理, 除掉有机物质, 然后用不同溶剂提取出游离硒, 再做相应的处理和测定; 其结果仅供组织间硒含量的比较, 并不能提供硒在某一组织内分布规律的信息。

Danscher Moller-Madsen 等根据硒蛋白质的化学特性并借鉴前人经验, 用组织化学染色技术对给硒大白鼠的脑、脊髓、肝脏和肾脏组织进行处理后, 在光镜和电镜下间接地观察到硒的分布情况<sup>[4~6]</sup>。Thorlacius-Ussing 和 Rasmussen 用同样的方法证明了服硒大白鼠肾上腺细胞内硒分布的规律<sup>[7]</sup>。关于该染色技术在大动物, 尤其是在硒中毒的动物组织研究中的应用, 国内外未见报道。

本文用 Danscher 氏组织化学染色技术处理硒中毒绵羊羔的不同组织, 探讨组织内硒分布的规律, 目的在于揭示不同组织部位对硒的亲合性、组织中的硒分布与组织损伤之间的关系、不同给硒方法以及同时口服莫能菌素对组织硒分布的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物试验与组织采集

1.1.1 试验 I (慢性硒毒性试验) 16只8~10周龄的杂交绵羊, 随机分为4组。A组(Se)口服递增量亚硒酸钠溶液, 每周2次给予同样的剂量, 在第1~6周的内服剂量(以纯硒计算)分别为0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 1.6, 2.4 mg/kg 体重; B组(Mon)口服膜能菌素钠(sodium monensin)混悬液, 每周2次, 每次剂量为2 mg/kg; C组(Se+Mon)按A, B两组的剂量和间隔同时口服亚硒酸钠和膜能菌素钠; D组为对照羊, 口服蒸馏水。第六周末宰杀全部存活动物。

收稿日期: 1993-08-28.

\*系作者在伦敦大学所做的博士论文的部分内容。

1.1.2 试验Ⅰ(急性硒毒性试验) 8只12周龄杂交绵羊,分为2组。一组灌服亚硒酸钠溶液,剂量(以纯硒计)为5mg/kg;另一组经腹腔注射同样剂量的亚硒酸钠溶液。给硒60h后宰杀全部存活动物。

1.1.3 组织采集 对以上两试验期中死亡和试验末宰杀的全部动物,均进行详细的尸体剖检,同时采取心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胰脏、回肠、肠系膜和体表淋巴结、膈肌、背最长肌、半腱肌和大脑组织各两份,每份约0.5m<sup>3</sup>。各组织块分别经异戊烷萃冷,液氮中转运并于-70℃冷冻贮藏至切片染色。同一器官部位的另一份组织样品用10%甲醛溶液固定,切片染色和镜检。

## 1.2 试剂

全部购自美国西格玛公司或英国化学试剂公司。所有试剂和显色剂的配制同 Danscher 法<sup>[5]</sup>。

## 1.3 组织切片及染色

用10%甲醛溶液固定的组织样品,经常规处理,石蜡包埋,组织切片经 H-E 染色镜检。冷冻组织样品的处理程序如下①把冷冻组织样品移入-12℃的恒温切片机中,切取15μm的组织片,置于载玻片上;②用纯甲醇溶液固定30min,在蒸馏水中浸洗后加0.5%明胶溶液包埋组织切片,再置室温干燥1h;③将带有包埋组织的载玻放进染色缸,加入新鲜配制的显色剂,使浸没载玻片,加盖后放入26℃暗盒(水浴箱或恒温箱)内,染色2.5h;④用40℃流动温水轻轻冲洗染色后的组织片40min以上,以清除包埋组织的明胶;⑤在室温下,用5%硫酸钠溶液处理组织切片12min,用蒸馏水冲洗,再浸入1%苯甲胺蓝溶液重染色10~15s,经水冲洗,干燥后得清洁分明的组织标本。

# 2 结果

## 2.1 中毒死亡情况

试验Ⅰ的C组(Se+Son)4只羔羊中有2只分别在第4周和第6周中毒死亡,另一只和A(Se)组一只羔羊在第6周末均表现严重中毒和濒死状态;A,C组其他羊从4周开始仅表现慢性和轻微的临床症状,B组和对照组无异常。试验Ⅰ中口服亚硒酸钠组有2只绵羊分别在给硒后6和16h急性中毒死亡,另2只存活到60h;腹腔注射组有3只羊在给硒后1~2h内急性中毒死亡,另一只存活到60h。

## 2.2 临床症状

试验ⅠA,C组的羔羊中毒多呈现慢性过程,初期症状一般出现在口服硒后0.5~2h,表现为食欲减退,精神不振,呆立不动,目光凝视;较严重者表现多卧少立,饮食反刍停止,低头耷耳,双目半闭,肢体不灵,若能耐过常常在临床症状出现后4~8h,即恢复正常状态。试验Ⅰ中毒羔羊表现为急性或最急性症状,急性中毒者呈现心律加快或紊乱,呼吸困难,结膜发绀,口鼻周围附多量白色或淡红色泡沫,濒死期卧地不能自行站立,头贴伏地面或紧靠胸壁;最急性中毒者,在给硒后仅呈现轻微的不安或无任何表现而突然死亡。

## 2.3 剖检变化

慢性硒中毒死亡羔羊的特征剖检变化是肝脏充血肿大,肿囊充满胆汁,肺浆膜下呈现大量红色斑点和斑块,切面流出多量红色液体,气管和支气管内壁附有大量白色或淡红色

泡沫状液体,肠系膜血管明显充血。口服亚硒酸钠中毒死亡动物的胃肠粘膜多数呈现红色斑点和斑块,甚至粘膜脱落。腹腔注射亚硒酸钠致急性中毒死亡动物的腹水明显增加。

#### 2.4 组织学变化

**肝脏** 服硒羔羊 H-E 染色切片中,肝小叶中间带或中心带内呈现细胞水肿变性,经 Danscher 氏染色后可见两区带肝细胞质浓染呈黑色,同时服硒和莫能菌素的动物该区带的染色更浓。试验 I 两组羊肝小叶中央静脉周围的黑色沉淀物最多(图版1),几乎掩盖了肝细胞索的轮廓。对照组及单服莫能菌素的动物肝组织无变化,仅有轻微黑色沉淀(图版2)。

**肾脏** 服硒羔羊的皮质部肾小管上皮细胞有轻度变性。经 Danscher 氏法染色后,在皮质和髓质交界处的远端肾小管上皮细胞可见程度不同的黑色浓染物。

**心脏** 服硒羔羊心肌呈现区域纤维紊乱、细胞颗粒变性、断裂、皱缩或嗜酸性增强,尤其是左心室及室间隔较重(图版3);细胞间广泛性点状出血和水肿。心脏传导纤维肿胀,边缘模糊不清。经 Danscher 氏法染色后可见整个心肌均匀分布黑色斑点,传导纤维细胞浆内有更为浓染的黑色物质(图版4)。

**胰脏** 硒中毒死亡羊的胰脏有轻微胞浆凝集现象,滤泡细胞互相分离且从基底膜上脱落;Danscher 氏法染色后,在急性死亡羊可见胰岛细胞有大量黑色沉淀物(图版5),而在试验未宰杀的羊可见腺泡腔和腺泡细胞浆顶端有大量黑色沉淀物(图版6),沉淀物几乎掩盖了组织的微细结构。

**肺脏** 肺脏的损害程度随服硒量(尤其同时服莫能菌素)的增加而严重,支气管上皮和肺泡壁有少量黑色沉淀物。

**脾脏** 服硒羊脾脏和小肠集合淋巴结中,生发中心及滤泡淋巴细胞坏死,以试验 I 的 C 组羊较为严重,黑色沉淀物的密集度与病理程度呈正比。被检骨骼肌中,膈肌的损伤最严重,主要病变是广泛性纤维肿胀和肌束间水肿,有的伴随细胞溶解和肌纤维轻度萎缩。

### 3 讨论

#### 3.1 Danscher 氏组织化学染色法

Danscher 氏组织化学染色法的原理是根据在一定条件下组织硒与金属银离子相结合,经染色后,围绕在硒周围的银离子壳,在显微镜下呈现黑色沉淀物,从而间接显示出组织中硒分布的位置及其密度,进一步揭示不同组织器官或同一器官不同部位对硒的亲合性<sup>[5,6]</sup>。本试验参照这一技术并适当改进后,首次对硒中毒绵羊羔的不同器官组织切片进行染色,结果表明:在原操作工艺基础上,使组织切片厚度为15 $\mu\text{m}$ ,用纯甲醇固定30min,于26℃暗盒内染色150min,可得到较为理想的组织标本;原用于研究大白鼠的 Danscher 氏组织化学染色技术同样适用于绵羊硒中毒的研究,也可试用于其他高等动物硒中毒的研究;该染色方法较为简便,容易掌握,可作为动物硒中毒机理和诊断研究的一种切实可行的新方法。

#### 3.2 对不同组织内硒分布的观察

通过染色组织切片的显微观察,发现肝小叶中央及中间区细胞,肾髓质远曲小管上皮细胞、心脏传导纤维、胰岛和腺泡细胞、脾及回肠淋巴结的生发中心以及膈肌细胞等部位

有较多的黑色沉淀物质。在肝、肾、心、脾等实质器官中,黑色沉淀物的密度与该部位的组织病变程度呈正比,充分证明了上述组织部位对硒有较强的亲合性。更为有趣的是,那些用常规染色法不呈现特异性或很少变化的组织,如辅助淋巴组织生发中心、心肌传导纤维、肝细胞和肾小管上皮细胞等,也呈现较多的黑色沉淀物,为进一步研究硒在不同器官组织部位的分布、作用原理和代谢过程提供了新手段。

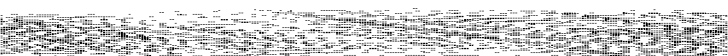
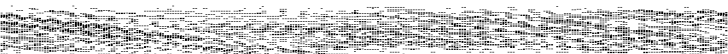
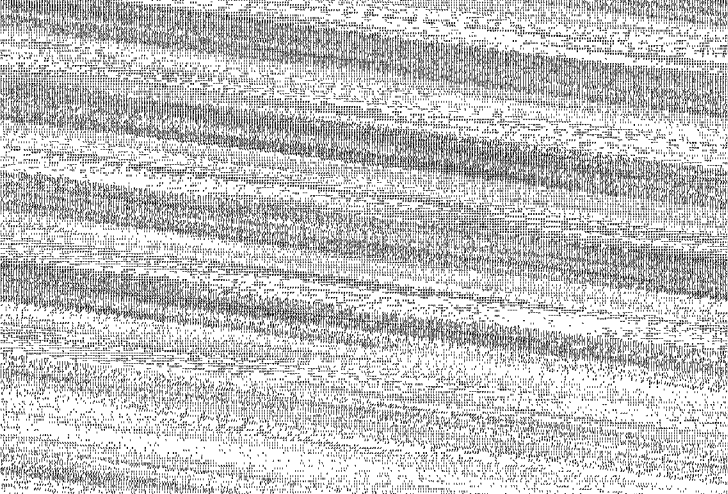
硒中毒动物组织的超薄切片,经染色后,是否用于电镜观察并揭示高等动物亚细胞结构内硒分布和代谢的规律(即不同细胞器官对硒的亲合性),从而在细胞和分子水平上研究硒的生理功能和毒理机制,尚待进一步证实。

### 3.3 莫能菌素对硒毒性的影响

试验 I 中,绵羊同时服用硒和莫能菌素与单独服硒相比,其临床症状、死亡率、组织病变程度均较严重,黑色沉淀物也较多。说明莫能菌素可增加组织器官对硒的吸收和储存。这一结论与 Anderson 等报道莫能菌素能增强缺硒羔羊的补硒效果相一致<sup>[8]</sup>,并且由作者的绵羊硒代谢动力学试验得到证实<sup>[9]</sup>。只服莫能菌素的绵羊没有发生临床变化,说明试验期内投服剂量无明显毒害作用,心肌和膈肌呈现的轻度肿胀可能是莫能菌素改变肌细胞的通透性所致<sup>[10-11]</sup>。

### 参 考 文 献

- 1 Thompson R H ,Bcmurray C H,Blanchflower W J. The levels of selenium and glutathione peroxidase activity in blood of sheep,cows and pigs. *Research for Veterinary Science*,1976(20):229~231
- 2 Combs G F Jr,Combs S B. The nutritional biochemistry of selenium. *Annuual Review of Nutrition*,1984(4):257~280
- 3 The internation programme on chemical safety(IPCS)(1987). *Environmental health criteria 58, Selenium*. Published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme,the International Labour Organization,and the World Health Organization. Geneva.
- 4 Danscher G. Histochemical demonstration of heavy metals;a revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electromicroscopy. *Histochemistry*,1981(71):1~16
- 5 Danscher G. Exogenous selenium in the brain;a histochemical technique for light and electron microscopical localization of catalytic selenium bonds. *Histochemistry*,1982(76):281~293
- 6 Danscher G,Moller-Madsen B. Silver amplification of mercury sulphide and selenide;a histochemical method for light and electron microscopic localization of mercury in tissue. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*,1985,33(3):219~228
- 7 Thorlacius-Ussing O,Rasmussen B L. Light and electromicroscopical visualization of selenium in adrenal glands from rats exposed to sodium Selenite. *Experimental and Molocular Pathology*,1986(45):59~67
- 8 Anderson P H,Berrett S,Catchpole J et al. Effect of monensin on Selenium status of sheep. *Veterinary Record*,1983(113):498
- 9 Wang J H,Middleton D J,Humphreys D J. Effects of monensin on the bioavailability and elemination of Selenium from blood in lambs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*,1990(12):378~385
- 10 Van Vleet J F,Amstutz H E,Weirich W E et al. Clinical clinicopathologic,and pathologic alterations of monensin toxicosis in swine . *American Journal of Veterinary Research*,1983(44):1460~1468
- 11 Van Vleet J F,Ferrans V J,Ultrastructural alterations in skeletal muscle of pigs with acute monensin toxicosis. *American Journal of Pathology*,1984(144):369~379



## The Affinity of Various Tissues to the Toxic Doses of Selenium in Lambs

**Wang Jian Hua**

*(The Northwestern Agricultural University, Shaanxi Yangling, 712100)*

**Smyth J B A Barlow R M Humphreys D J**

*(Department of Royal Veterinary College, London University)*

**Abstract** Danscher's staining technique was used to study the affinity of different tissues to the toxic doses of selenium and the effects of monensin on it in lambs. Results showed that the Danscher's technique is useful in demonstrating the relationship between the distribution of selenium and histopathological changes within tissues, especially those tissues such as lymphoid cells in germinal centres of the secondary lymphoid tissue. Conduction myofibres in the heart, liver and kidney cells, in which the gross and histopathological findings were non-specific or minimal. Concurrent administration of monensin sodium enhanced the toxicity of selenium.

**Key words** Lambs, selenium, monensin, selenium intoxication, histopathology, histochemistry, tissue staining