

小花棘豆中毒对大鼠卵巢 α -甘露糖苷酶的影响

王 帅, 贾琦珍, 邓 利, 陈根元*

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

摘 要:探讨小花棘豆对大鼠卵巢 α -甘露糖苷酶(AMA)的影响,进一步揭示小花棘豆的毒性作用机理。将72只雌性大鼠随机分为4组,即对照组和试验I、II、III组。分别饲喂低、中、高3个剂量的小花棘豆至典型临床症状出现,攻毒后每7d每组随机采集2只大鼠的卵巢,检测大鼠卵巢AMA活性及表达的变化。在63d的试验过程中,试验组及对照组大鼠卵巢高尔基体 α -甘露糖苷酶II(AMA1)和溶酶体 α -甘露糖苷酶(AMA2)均有表达,但各试验组表达转录水平与对照组差异显著,试验I组大鼠AMA1和AMA2的表达及活性均与对照组差异不显著($P > 0.05$),试验第63天时试验II组和试验III组AMA的活性及AMA1的表达均极显著低于对照($P < 0.01$),试验III组AMA2的表达显著低于对照($P < 0.05$),但试验II组AMA2的表达与对照组差异不显著($P > 0.05$)。结果表明小花棘豆中毒可影响大鼠卵巢AMA的活性及其基因的转录表达,且具有一定的时间效应和剂量效应关系。

关键词:小花棘豆;苦马豆素; α -甘露糖苷酶;卵巢;大鼠

中图分类号:S856.9

文献标识码:A

文章编号:1003-8701(2016)01-0095-05

Effects of *Oxytropis glabra* Poisoning on α -mannosidase in Rat Ovary

WANG Shuai, JIA Qizhen, DENG Li, CHEN Genyuan*

(Key Laboratory of Tarim Animal Husbandry Science and Technology/College of Animal Science, Tarim University, Alar, 843300, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of *Oxytropis glabra* DC. poisoning on α -mannosidase (AMA) in rat ovary, and further reveal the toxicity mechanism of *O. glabra* DC. 72 female rats were randomly and equally divided into 4 groups (the control group and experimental group I, II, III), different doses of dried plant of *O. glabra* DC. were mixed with the feeds in the three experimental groups. The rats consumed the forages freely until typical symptoms were observed. 2 rats were selected randomly from each group every week respectively, the ovary was collected and the contents of AMA and its mRNA expression in different encephalic regions were measured. In 63 days test period, it was found that AMA in golgi and lysosomal expressed in ovary of all experimental groups, *O. glabra* DC. inhibited the expression of ovary AMA1 and AMA2 mRNA, and the difference was significant. The difference were not significant in experimental group I and control group ($P > 0.05$), the content of AMA and expression of AMA1 mRNA in experimental group II, III were very significant lower than in control group ($P < 0.01$), the expression of AMA2 mRNA in experimental group III were significant lower than control group ($P < 0.05$), but the difference of expression of AMA2 mRNA were not significant between experimental group II and control group ($P > 0.05$). The results showed that *O. glabra* DC. has remarkable effects on content and transcriptional expression of AMA in rat ovary, in a time-effect as a dose-effect relationship.

Key words: *Oxytropis glabra* DC.; Swainsonine; α -mannosidase; Ovary; Rat

收稿日期:2015-08-28

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

作者简介:王 帅(1984-),男,实验师,硕士,主要从事动物中毒病与毒理学方面的研究。

通讯作者:陈根元,男,硕士,副研究员,E-mail: cgygood207@163.com

小花棘豆(*Oxytropis glabra* DC.)广泛分布于新疆和田、阿克苏等地区,具有根系发达,繁殖系数高,耐旱,耐贫瘠,返青早,多种籽,生命力强等特性,现已严重危害新疆草原畜牧业的发展^[1]。据不完全统计,仅阿克苏地区的271.97万 hm^2 天然草场中广泛丛生小花棘豆的面积已超过40万 hm^2 ,每年因采食小花棘豆而中毒的家畜占放牧家

畜总数的5%~10%,中毒动物表现为机体的广泛性损伤,其中尤以神经系统和繁殖系统损伤最为明显^[2]。研究发现,苦马豆素(swainsonine, SW)是小花棘豆的主要毒性成分^[3],可通过抑制 α -甘露糖苷酶(AMA)活性,导致机体甘露糖代谢发生异常而发挥毒性作用^[4-5]。研究表明AMA是动物小花棘豆中毒特异性最强的指标^[6-7],小花棘豆中毒动物的AMA活性受到显著抑制,但对其转录、翻译、加工修饰等的影响尚不清楚。目前,动物小花棘豆中毒对其繁殖性能影响的报道较多,但主要集中在病理变化及防治方法方面,对其中毒机制的研究较少,中毒动物繁殖器官AMA的变化未见报道^[8]。本试验通过ELISA、免疫组化和荧光实时定量PCR法,以南疆地区小花棘豆为毒源,研究小花棘豆中毒对大鼠卵巢AMA活性及分布、表达的影响,为小花棘豆中毒机制的研究提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

小花棘豆由塔里木大学动物科学学院草业科学学科组提供,采自新疆阿克苏市乌什县亚科瑞克乡,样品为风干样。

AMA检测试剂盒,南京建成生物技术有限公司;S-P超敏组化试剂盒,福州迈新生物技术有限公司;AMA抗体及抗体免疫组化稀释液,Abcam(上海)贸易有限公司;总RNA提取试剂(D9108),反转录试剂盒(DRR047A),实时荧光定量PCR试剂盒(DRR081),均为TAKARA宝生物工程(大连)有限公司;其余试剂均为国产分析纯,实验室用水为超纯水。

5331型PCR仪,Realplex2型实时荧光定量PCR仪,德国Eppendorf公司;DYY-II型电泳仪,北京六一仪器厂;PRO250型组织匀浆仪,美国Pro Scientific公司;GELDOC-IT型凝胶成像分析仪,美国UVP公司;MR231型高速冷冻离心机,法国Jouan公司;Direct-Q3型超纯水系统,美国Millipore公司。

1.2 试验动物

3月龄SPF级雌性Wistar大鼠72只,体质量(200±15)g,购自塔里木大学动物科学学院实验站。

1.3 试验设计

随机分为对照组、试验I组、试验II组和试验III组,每组18只。分笼饲养,自由采食和饮水。对照组饲喂大鼠饲料,其组成为:面粉300 g/kg,玉米粉290 g/kg,豆饼200 g/kg,麸皮100 g/kg,鱼粉50 g/kg,酵母粉10 g/kg,植物油10 g/kg,鱼肝油10 g/kg,食盐10 g/kg,骨粉10 g/kg,矿物质添加剂9 g/kg。维生素添加剂1 g/kg^[3];试验I组、试验II组和试验III组分别饲喂小花棘豆质量分数为150、300和450 g/kg的混合饲料。根据气相色谱法测定结果^[9],相当于SW添加量为30 mg/kg、60 mg/kg和90 mg/kg。试验期63 d,其中各试验组大鼠均出现嗜睡、站立不稳等典型中毒症状。攻毒后每7 d每组随机取2只大鼠,剖杀后取卵巢,部分进行免疫组化染色分析,部分利用冰生理盐水制备100 g/L的组织匀浆液用于检测AMA活性,部分组织液氮保存用于检测mRNA水平表达的影响。所有解剖工具及冻存管均预先用DEPC水处理。

1.4 AMA在小花棘豆中毒大鼠卵巢组织中分布的测定

大鼠卵巢使用40 mL/L多聚甲醛固定,梯度酒精脱水,二甲苯透明后进行石蜡包埋。包埋组织进行连续切片,片厚6 μ m,二甲苯脱蜡,梯度酒精复水,然后按照试剂盒说明操作,其中抗体稀释比为1:100,DAB显色,使用PBS为阴性对照。常规脱水,透明,封片,光镜下观察组织病理学变化,采用Image-Pro Plus 6.0软件对免疫组化获得照片进行分析。

1.5 小花棘豆中毒大鼠卵巢AMA在mRNA表达水平的测定

1.5.1 引物设计与合成

根据GenBank中大鼠高尔基体 α -甘露糖苷酶II(AMA1)、溶酶体 α -甘露糖苷酶(AMA2)和

表1 引物设计

项目	引物和探针序列(5'-3')	产物大小(bp)	GenBank编号
AMA1	上游:TCAGCTACCCTTCCCTCCTC	189	NM_012979.2
	下游:TGCCACCTTTGACTGTATT		NP_037111.2
AMA2	上游:AAAGACCTGTGCTGGGATG	120	NM_199404.1
	下游:TTTCTGGGAAGAGCGAG		NP_955436.1
β -actin	上游:GACAGGATGCAGAAGGAGATTACT	104	NM_007393.2
	下游:ATAGAGCCACCAATCCACACAG		NP_031419.1

β -actin 基因的核苷酸序列,采用 Beacon Designer 软件设计引物,引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。引物信息见表1。

1.5.2 总RNA提取与cDNA合成

参照 TAKARA 公司说明书提取大鼠卵巢总 RNA,然后用核酸蛋白检测仪测定其 OD₂₆₀ 和 RNA 浓度,用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。将合格 RNA 利用 gDNA Eraser 去除基因组 DNA,反应条件:42°C, 2 min。以除去基因组 DNA 的 RNA 为模板采用两步法进行反转录,反应体系如下:5×Prime Script® Buffer 4.0 μ L, Prime Script® RT Enzyme Mix I 1.0 μ L, RT Primer Mix 1.0 μ L, 去除 DNA 的 RNA 液 10.0 μ L, RNase Free dH₂O 4.0 μ L, 总体积 20.0 μ L, 以上步骤均在冰上进行。反应条件:37°C 15 min, 85°C 5 s, -20°C 保存。

1.5.3 实时荧光定量PCR检测大鼠睾丸中AMA的相对表达

采用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 进行实时荧光定量 PCR 操作,反应体系如下:SYBR® Premix Ex Taq™ (2 \times) 10.0 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.8 μ L, ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μ L, 1.5.2 所得 cDNA 溶液 2.0 μ L, RNase Free dH₂O 6.0 μ L, 总体积 25.0 μ L, 以上步骤均在冰上进行。反应条件:95°C 预变性 30 s, 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 34 s, 反应 40 个循环,PCR 扩增反应结束。按反应体系及反应条件进行实时荧光定量 PCR,得到各部分 Ct 值,采用双标准曲线法对所得实时荧光定量 PCR 结果进行分析。

1.6 数据分析

试验数据使用 SPSS 16.0 软件中 One-Way ANOVA 方法进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 AMA在大鼠卵巢组织中的分布

AMA 在大鼠卵巢上皮细胞、绒毛细胞、颗粒层细胞等均有分布,其中在颗粒层细胞的分布较为明显(图 1A)。小花棘豆攻毒大鼠卵巢组织中 AMA 的染色变淡,但试验 I 组与对照组差异不显著(图 1B),试验 II 组和试验 III 组下降明显,其中试验 III 组在攻毒第 35 天后 AMA 免疫组化染色极淡,表明其已经几乎不表达(图 1C、D)。

2.2 引物的可靠性验证

由图 2 可知, β -actin 在 100 bp 左右出现条带,AMA1 和 AMA2 基因分别在 100 bp 和 200 bp 间出现 2 条清晰条带,与试验设计的目的条带大小相

符,表明引物设计良好。

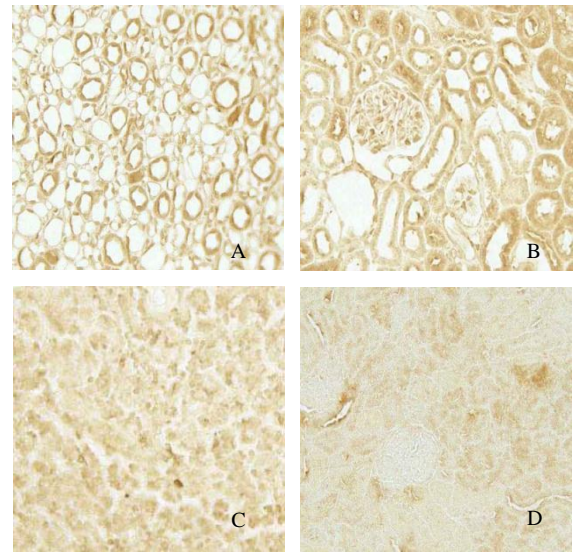


图 1 AMA 在对照组(A)与试验组(B、C、D)大鼠卵巢的分布(IHC \times 400)

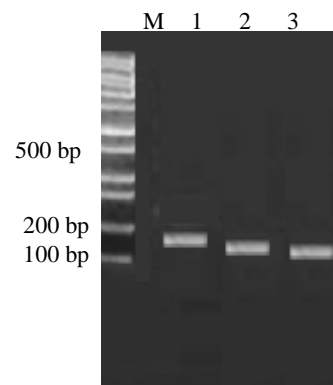


图 2 引物 PCR 电泳图

注:M. Marker; 1. AMA1 引物; 2. AMA2 引物; 3. β -actin 引物

2.3 大鼠卵巢 AMA 活性的变化

在整个试验期内对照组大鼠卵巢 AMA 活性

表 2 试验期内大鼠卵巢组织 AMA 活性的变化

时间(d)	nmol \cdot S ⁻¹ \cdot L ⁻¹			
	对照组	试验 I 组	试验 II 组	试验 III 组
7	13.48 \pm 2.15	13.01 \pm 2.71	12.64 \pm 2.55	11.03 \pm 2.76
14	14.17 \pm 2.09 ^a	13.12 \pm 2.96 ^a	11.19 \pm 2.37 ^{ab}	10.02 \pm 1.99 ^b
21	14.31 \pm 2.17 ^a	12.86 \pm 2.35 ^{ab}	10.25 \pm 2.37 ^{ab}	9.86 \pm 2.06 ^b
28	14.18 \pm 2.63 ^a	12.37 \pm 2.87 ^{ab}	9.73 \pm 1.85 ^b	9.07 \pm 1.76 ^b
35	14.01 \pm 2.42 ^{ab}	12.14 \pm 3.14 ^{ab}	7.04 \pm 1.32 ^{bb}	5.62 \pm 1.17 ^{bb}
42	13.93 \pm 2.33 ^{ab}	12.02 \pm 3.32 ^{ab}	6.85 \pm 1.12 ^{bb}	4.37 \pm 0.96 ^{bc}
49	13.64 \pm 3.02 ^{ab}	11.78 \pm 2.86 ^{ab}	7.00 \pm 1.54 ^{bb}	4.03 \pm 1.04 ^{bc}
56	14.36 \pm 2.75 ^{ab}	11.34 \pm 2.59 ^{ab}	6.19 \pm 1.08 ^{bb}	3.72 \pm 0.88 ^{bc}
63	13.87 \pm 2.59 ^{ab}	10.88 \pm 2.43 ^{ab}	6.25 \pm 1.21 ^b	3.05 \pm 0.76 ^c

注:同行数据右上角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($P < 0.01$),下同