

山羊小肠内 AchE 和 NOS 阳性神经元数量分布的比较

刘云芳^{1,2} 陈耀星¹ 王子旭¹

(1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 2. 石河子大学 动物科技学院, 新疆 石河子 832003)

摘要 应用乙酰胆碱酯酶(AchE)和 NADPH 黄递酶组织化学方法,研究了 15 日龄、4 月龄和 12 月龄山羊小肠中胆碱能神经元和 NO 能神经元的数量分布变化。结果显示:1)肌间神经丛和黏膜下神经丛含有丰富的 AchE 阳性神经元,神经元聚集成神经节,并由节间支连成网状。2) NOS(一氧化氮合成酶)阳性神经元主要分布于肌间神经丛,神经元构成的神经节也连成网状;黏膜下神经丛内 NOS 阳性神经元稀疏,散在分布。3)小肠肌间神经丛中,12 月龄的 AchE 和 NOS 阳性神经元总数比 15 日龄的增加 163%和 137%,但阳性神经元密度降低 39%(AchE)和 40%(NOS)。4)比较各肠段,AchE 和 NOS 阳性神经元密度在回肠中最高,但神经元总数以空肠最多。结果表明山羊小肠中分布有丰富的胆碱能和 NO 能神经元,但黏膜下神经丛中胆碱能神经元多于 NO 能神经元;随着山羊小肠的发育,胆碱能和 NO 能神经元的数量逐渐增多而密度却下降。

关键词 山羊; 肠道神经系统; 肌间神经丛; 乙酰胆碱酯酶; NADPH 黄递酶; 一氧化氮合成酶

中图分类号 S 852.1

文章编号 1007-4333(2007)02-0010-05

文献标识码 A

Differences of AchE and NOS-positive neuron number and distribution in goat small intestine

Liu Yunfang^{1,2}, Chen Yaoxing¹, Wang Zixu¹

(1. College of Animal Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract The changes in distribution and number of acetylcholinesterase (AchE) and nitric oxide synthase (NOS) positive neurons were studied in enteric nervous system of goat small intestine at 15 days, 4 months and 12 months of age using by using histochemistry. The results showed that 1) a lot of AchE-positive neurons were observed in submucosa and myenteric plexuses. These neurons gathered in ganglia and formed a net. 2) The NOS-positive neurons were mainly located in the myenteric plexus, but very few NOS-positive neurons were observed in the submucous plexus. 3) In myenteric plexus, the total number of AchE and NOS positive neurons was increased 163% and 137% in 12 months of age than that of 15 days of age, respectively. However, the neuron density decreased by 39% (AchE) and 40% (NOS) in 12 months of age comparing with that of 15 days of age. 4) The total numbers of AchE and NOS positive neurons were the largest in the jejunum, whereas the neuron density was the highest in the ileum, compared with that in other sections of small intestine. In addition, the number of cholinergic neurons was more than those of NO neurons in the submucous plexus. In the duration of small intestine development, the increase in the cholinergic and NO neurons was accompanied by the decline of NO neuron, while the density.

Key words goat; enteric nervous system; myenteric plexus; acetylcholinesterase; NADPH diaphorase; nitric oxide synthase

自 1921 年 Langley 在研究哺乳动物胃肠道神经支配时提出“肠道神经系统”(enteric nervous sys-

tem, ENS) 概念以来,关于肠道神经系统对肠道运动控制和功能调节的研究已有发展。胃肠道中存在

收稿日期: 2006-12-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471247;30671514)

作者简介: 刘云芳,讲师,博士研究生,E-mail:lyf_6@yahoo.com.cn; 陈耀星,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事神经生物学与生殖免疫学研究,E-mail:yxchen@cau.edu.cn.

乙酰胆碱(Ach)、去甲肾上腺素(NA)、5-羟色胺(5-HT)、一氧化氮(NO)以及多种脑肠肽等神经递质,其中 Ach 作为主要的兴奋性神经递质,可兴奋胃肠平滑肌诱导胃肠平滑肌的收缩运动,而 NO 是主要的抑制性递质,能抑制平滑肌收缩,引起胃肠道平滑肌松弛,从而使血管扩张;胃肠道 Ach 和 NO 之间存在复杂而精细的平衡,相互协调制约。释放 Ach 和 NO 的神经元,即乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AchE)和一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS) 阳性神经元遍布于整个消化道。国内外学者对 AchE 和 NOS 阳性神经元在 ENS 中的数量及分布等做了广泛而深入的研究。但多数研究以大鼠、小鼠等实验动物为材料,在家畜中也有一些关于绵羊、猪的报道^[1-3]。从现有资料看,山羊的研究很少^[4]。本试验旨在了解山羊小肠 ENS 中胆碱能神经元和 NO 能神经元的发育及数量分布变化规律,为山羊肠神经系统的发育提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验动物和组织标本制备

选用 15 日龄、4 和 12 月龄雄性奶山羊,购自北京农业职业学院畜牧场。动物经颈动脉放血处死,迅速打开腹腔,沿肠系膜分离出整个小肠,浸入新配制的生理盐水中。按解剖位置用棉线沿肠系膜测得十二指肠、空肠、回肠长度及其周长。然后分别取其中段,每段各取 5 cm,用生理盐水洗净内容物,置于 40 g/L 多聚甲醛磷酸缓冲溶液(pH7.4)中固定 2~3 h。

每段肠管分别取 1 cm,用镊子沿肠管纵轴划痕,用镊尖沿划痕轻轻剥离纵形肌层,将剥离的纵形肌层浆膜面向下放在载玻片上。在解剖显微镜下,用镊尖轻挑去附于神经丛上的环形肌层,即得到纵、环肌之间的肌间神经丛。再将余下的肠管沿系膜处剪开,黏膜面向上,刮去上皮层和黏膜层,即可暴露黏膜下层的黏膜下神经丛。将肌间神经丛和黏膜下神经丛放入 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4)中,待染。

此外,各段肠管另取 0.5 cm,分别浸入 100~300 g/L 蔗糖缓冲液中,并制做冰冻切片,厚 15 μm。

1.2 乙酰胆碱酯酶组织化学染色

组织铺片和切片入 AchE 孵育液,室温,2 h。孵育液配方:碘化乙酰硫代胆碱 5 mg (Sigma 公司生产),磷酸盐缓冲溶液(0.1 mol/L, pH7.4) 6.5 mL,

柠檬酸钠(0.1 mol/L)0.5 mL,硫酸铜(30 mmol/L) 1 mL,铁氰化钾(5 mmol/L) 1 mL, iso-OMPA (5 mmol/L)0.2 mL,加蒸馏水至 10 mL。

1.3 NADPH 黄递酶组织化学染色^[5]

将组织铺片和切片放入 NADPH 黄递酶孵育液中,其中含有 NADPH 1 mg/mL (Roche 公司生产)、NBT 0.5 mg/mL (Amresco 公司生产)、Triton X-100 3 ml/L 和 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH7.4)。37 °C 孵育 50 min,磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH7.4)终止反应。

标本经以上染色后,梯度酒精逐级脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,镜检,显微照相。

1.4 阳性神经元数量和密度测定

在光镜下,AchE 染色显示阳性神经元胞浆为棕色,胞核不着色或淡染;而 NADPH 黄递酶染色显示 NOS 阳性神经元胞质蓝紫色,胞核不着色或淡染。选取染色良好的标本,4 倍镜下照相,统计 AchE 和 NOS 阳性神经元数量,每张铺片连续统计 40 mm² 以上,计算出肌间神经丛中神经元的密度。

由测量的十二指肠、空肠和回肠的长度乘以其周长计算出各段肠的表面积,然后再用表面积与神经元密度的乘积得出各段肠 AchE 和 NOS 阳性神经元总数。

结果用平均值 ±标准误表示,用 SPSS11.0 统计软件进行 One-Way-ANOVA 分析。

2 结果

2.1 山羊小肠 AchE 和 NOS 阳性神经元的形态与分布

2.1.1 AchE 阳性神经元 山羊小肠切片中可见 AChE 阳性神经元在肌间神经丛和黏膜下神经丛内均有分布,AChE 阳性神经纤维和末梢广泛分布于肠壁各层。肌间神经丛中,AChE 阳性神经元多聚集在一起构成神经节,神经节多为长梭形,与纵行肌垂直,阳性神经纤维由阳性神经元发出,总体走向与纵肌纤维一致,呈束状分布,并不断分支,相互连接构成神经网络;在黏膜下层,AChE 阳性纤维也形成网络,神经节中阳性神经元较密集。AChE 阳性神经元在神经节中随机分布,胞体多为表面光滑的卵圆形或三角形,胞核都为圆形,往往靠近胞浆的一侧,且细胞突起不明显,同一神经节中胆碱能神经元大小形态不一(图 1-1~3)。

2.1.2 NOS 阳性神经元 山羊小肠中分布有丰富

的 NOS 阳性神经元,主要分布在肌间神经丛,黏膜下层少量存在。在肌间神经丛中,神经节及节间束的神经网络结构清楚;黏膜下神经丛内仅见到稀疏的阳性纤维,不形成规则的神经网络,偶有少量 NOS 阳性神经元,或组成细胞群或散在分布。NOS

阳性神经元的胞体大小不等,形态呈多样,如卵圆形、长梭形、不规则形等,NOS 阳性神经元多位于神经节的周边,常靠近于节间束,节间纤维中也有单个阳性神经元分布,突起明显,神经节内有些阳性神经元的突起相互接触(图 1-4~6)。

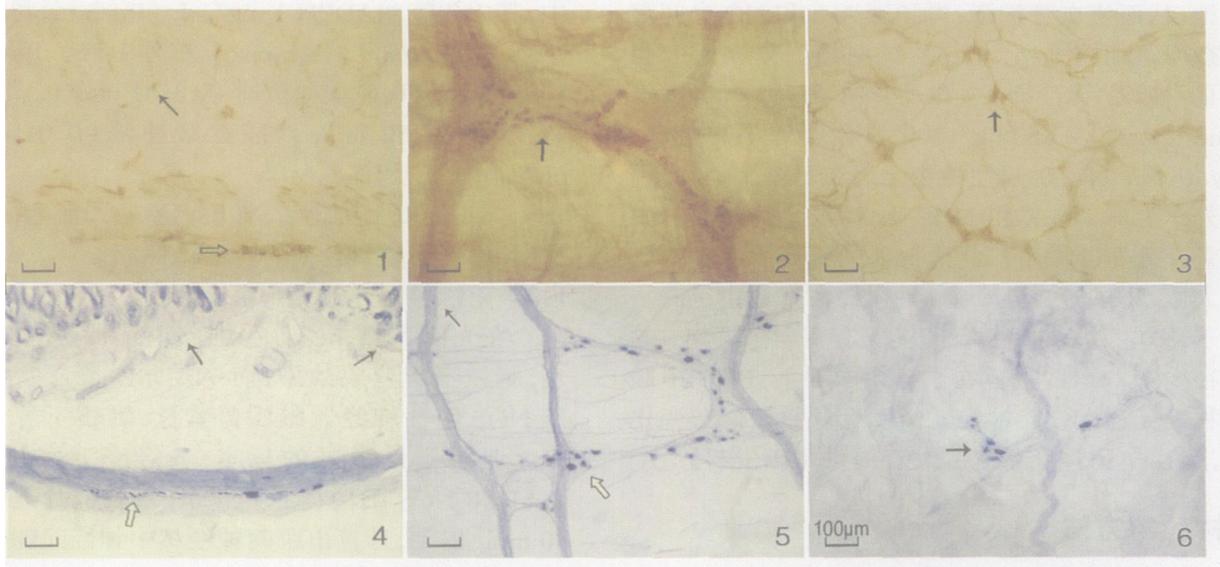


图 1 山羊小肠 AchE(1、2、3)和 NOS(4、5、6)阳性神经元的分布

Fig. 1 AchE and NOS-positive neurons of the goat small intestine

1. 肌间神经丛(⇔)位于纵行肌与环形肌之间,黏膜下层有许多阳性神经元(),4月龄山羊回肠冰冻切片;
2. 15日龄山羊空肠肌间神经节(),大量 AchE 阳性神经元充满其中,铺片;
3. 15日龄山羊空肠黏膜下神经丛,神经节中密集着阳性神经元(),并通过阳性纤维形成网络,铺片;
4. 肌间神经丛(⇔)位于纵行肌与环形肌之间,靠近肠腺阳性神经元聚集形成黏膜下神经丛(),15日龄山羊十二指肠冰冻切片;
5. 15日龄山羊回肠肌间神经丛,NOS 阳性神经元聚集形成神经节(⇔),节间纤维中偶见有单个神经元(),铺片;
6. 15日龄山羊空肠黏膜下神经丛,有少量 NOS 阳性神经元组成细胞群(),铺片。

2.2 小肠肌间神经丛 AChE 和 NOS 阳性神经元的密度及总数

2.2.1 AchE 和 NOS 阳性神经元的密度 从 15 日龄到 12 月龄山羊小肠肌间神经丛,AChE 阳性神经元的平均密度分别为 28.45、23.55 和 17.28 个/

mm²,且差异显著($P < 0.05$);NOS 阳性神经元平均密度为 27.07、20.80 和 16.18 个/mm²,4月龄与 12月龄之间差异不显著($P > 0.05$)。小肠不同部位的神经元密度,在各个年龄均以回肠最高(表 1)。

表 1 山羊小肠肌间神经丛 AChE、NOS 阳性神经元的密度

Table 1 Density of AchE and NOS-positive neurons in myenteric plexus of goat small intestine

个/mm²

神经元	年龄	小 肠	十二指肠	空 肠	回 肠
AChE	15 日龄	28.45 ±0.76 A	24.29 ±0.33 A	28.24 ±0.27 A	32.80 ±1.17 A
	4 月龄	23.55 ±0.56 B	21.47 ±0.64 B	22.64 ±0.83 B	26.56 ±0.54 B
	12 月龄	17.28 ±0.66 C	15.56 ±0.87 C	18.00 ±0.87 C	18.31 ±0.67 C
NOS	15 日龄	27.07 ±0.84 A	26.38 ±1.20 A	23.31 ±0.67 A	31.51 ±0.78 A
	4 月龄	20.80 ±0.91 B	20.79 ±0.77 B	16.77 ±1.26 B	24.83 ±2.30 B
	12 月龄	16.18 ±0.65 B	12.49 ±0.54 C	15.23 ±0.65 B	20.83 ±0.49 B

注:字母不同表示差异显著($P < 0.05$),A、B、C 代表同一神经元在相同肠段不同月龄之间比较。

2.2.2 AchE 和 NOS 阳性神经元的总数 15 日龄、4 月龄、12 月龄 AchE 阳性神经元总数分别为 1.96×10^6 、 4.79×10^6 和 5.14×10^6 个, NOS 阳性神经元总数分别为 1.86×10^6 、 4.06×10^6 和 4.41×10^6 个。在不同月龄小肠的 AchE 和 NOS 阳性神经元总数以空肠最多(图 2)。

2.3 不同月龄山羊小肠 AchE 和 NOS 阳性神经元的分布变化

15 日龄山羊小肠肌间神经丛中神经节、节间束明显,已经形成规则的神经网络,AchE、NOS 阳性神

元数目较多,随着小肠发育,神经元及神经节逐渐增大,节间束变粗,阳性纤维密集,AchE 和 NOS 神经元的数量增加,密度降低,12 月龄的 AchE 和 NOS 阳性神经元总数比 15 日龄的增加了 163% 和 137%,但阳性神经元密度分别降低了 39% 和 40%。其中 AchE 和 NOS 阳性神经元总数的增加主要是在 15 日龄到 4 月龄期间,分别为 145% 和 116%。AchE 阳性神经元密度 4 月龄比 15 日龄降低 17%,12 月龄比 4 月龄降低 27%;NOS 阳性神经元密度 4 月龄比 15 日龄降低 23%,12 月龄比 4 月龄降低 22%。

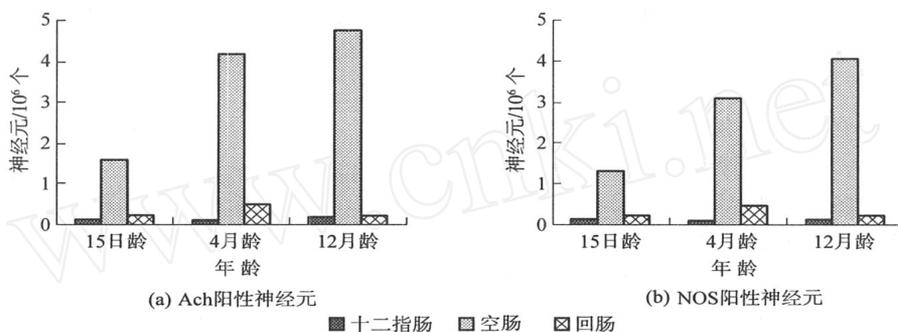


图2 山羊小肠肌间神经丛 AchE 和 NOS 阳性神经元的数量分布

Fig. 2 Numbers of AchE and NOS-positive neurons in myenteric plexus of goat small intestine

3 讨论

3.1 山羊小肠胆碱能和 NO 能神经元的分布

本实验用 AchE 和 NADPH-黄递酶组织化学方法显示了山羊小肠中分布有丰富的 AchE 和 NOS 阳性神经元,其中 AchE 阳性神经元在肌间神经丛和黏膜下层均有大量存在,聚集构成神经节,并形成网络结构;但 NOS 阳性神经元主要分布在肌间神经丛,并形成清晰的三级网络结构,在黏膜下层多单个存在,偶有若干个组成神经细胞群。这与在猪、大鼠的观察是一致的^[3,6],但与 Nichols 的观察不同,他们在豚鼠的肠黏膜下层内检出了密集的李 NOS 阳性神经成分,这可能与动物种属的差别有关^[7]。总之,ENS 中肌间神经丛和黏膜下神经丛大量存在的胆碱能神经成分可能与肠管运动肠和腺分泌有关,而 NO 能神经元在肌间神经丛非常丰富与其主要支配环行平滑肌层有关。

很多学者报道消化道不同部位神经元的密度是不同的。有学者报道在回肠有高的神经元密度,AchE 阳性神经元从十二指肠到回肠的数量是增加

的^[8],从十二指肠到回盲部,NOS 阳性神经元胞体密度渐渐增高,但变化幅度不大。此外,胃肠道神经细胞的密度似乎与肌层厚度有关,肌层越厚密度越高。

本试验对山羊小肠不同部位 AchE 阳性神经元密度分布的研究表明,山羊回肠具有较高的胆碱能神经元密度,可能与哺乳动物回肠是主动吸收的主要部位有关。胆碱能神经元在羊小肠壁分布差异及在不同部位分布密度的差别,提示小肠各段神经成分与不同肠段功能活动的调节机制密切相关。胆碱能神经元的多少及功能状态是肠道运动能力强弱的关键因素。

山羊小肠 NO 能神经元密度从十二指肠到回肠呈下行性增多。在不同肠段不同水平,NOS 阳性神经元的密度不同,这可能与其生理状态有关。如空肠具有较低的李 NOS 神经元密度,与空肠的运动抑制较弱,便于空肠排空及营养物质的消化吸收是一致的。十二指肠和回肠密度高,可能与 NOS 阳性神经元主要支配环行平滑肌层,而十二指肠、回肠的环行肌层较厚有关。此外,十二指肠较高的 NOS 神经元密度可能与十二指肠舒张以容纳胃内食糜有关。

3.2 山羊小肠肌间神经丛胆碱能和 NO 能神经元发育的数量变化

Gabella^[9]通过观察大鼠肠道肌间神经元的出生后的变化,发现神经元胞体逐渐增大,而神经元密度下降。后来在小鼠、豚鼠、绵羊^[10-12]、仔猪^[13]肠道发育中神经元数量变化也得到同样规律。本试验的结果显示,随年龄增长,山羊小肠肌间神经丛中 AChE、NOS 阳性神经元的密度下降,总数增加。在 15 日龄山羊小肠肌间神经丛中两种神经元均已经形成规则的神经网络。随后,神经元胞体逐步增大,数量增多,而密度下降,至成年,肌间神经丛节间束粗大、阳性纤维密集,AChE 和 NOS 神经元分布密度进一步下降。

肠道肌间神经元在发育过程中,其密度变化与肠管大小呈负相关^[1],随着肠管的发育增长,肠壁内神经元也会不断增多、成熟、功能健全,但其增长速度则会越来越慢于肠壁肌肉的快速增长,这势必导致神经元密度的相对下降。另外,NOS 神经元密度的下降也不能排除过量增殖的神经元在发育中未能获取足够的由靶细胞产生的对维系其存活必需的信号物质,如神经营养因子而造成的神经元程序性死亡的可能;至于 NOS 神经元数目增加,有研究者推测可能是细胞分裂增殖或一些阴性细胞在发育中产生了 NOS 的表达^[14]。

3.3 胆碱能和 NO 能神经元

胃肠道功能的调节机理非常复杂,已被公认接受外源性的和内在的外周自主神经的双重支配^[15-16]。其中内在的外周自主神经为肠壁内小神经节和节内含有各种性质的神经元(包括感觉、运动和中间神经元),被统称为 ENS。ENS 中神经元的种类众多。本试验结果显示山羊小肠中含有丰富的胆碱能和 NO 能神经元,而且二者在肌间神经丛的分布模式是相似的。但是,胆碱能神经元的胞体小于 NO 能神经元胞体,其数量明显多于 NO 能神经元,各个年龄山羊小肠中 AChE 和 NOS 阳性神经元的数量比为 1.15:1。与其他动物的相似,如大鼠回肠的 AChE 与 NOS 阳性神经元比例约为 2.6:1^[6],猪小肠胆碱能神经元与 NO 能神经元的比例约为 2:1^[3]。

传统认为,肠壁内胆碱能神经元是副交感节后运动神经元,胆碱能神经元释放经典递质乙酰胆碱,为胃肠动力兴奋性递质,具有刺激肠肌收缩和促进肠蠕动、调节黏膜血管扩张,血流增加和物质吸收的作用。而 NO 作为抑制性神经递质和调节介质,起

着调节胃肠运动、介导血管扩张、控制腺体分泌等重要作用。NOS 在小肠肌间神经丛非常丰富,更说明主要是胆碱能和 NO 能神经维持着小肠运动的动态平衡。

4 小 结

山羊小肠 ENS 中分布有丰富的胆碱能和 NO 能神经元,胆碱能与 NO 能神经元在肌间神经丛的分布模式相似,但黏膜下神经丛中胆碱能神经元多于 NO 能神经元;随着山羊小肠的发育,肌间神经丛中胆碱能和 NO 能神经元的数量逐渐增多而密度逐渐下降,呈现动态变化。

参 考 文 献

- [1] Gabella G, Trigg P. Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea pig, rabbit and sheep[J]. *J Neurocytol*, 1984, 13(1):49-71
- [2] Van Ginneken C, Van Meir F, Sys S, et al. Nitric oxide synthase expression in the pig duodenum[J]. *Anat Embryol*, 1998, 198:399-408
- [3] Axel Brehmer, Falk Schrödl, Winfried Neuhuber, et al. Co-expression pattern of neuronal nitric oxide synthase and two variants of choline acetyltransferase in myenteric neurons of porcine ileum[J]. *J Chem Neuroanat*, 2004, 27:33-41
- [4] 刘云芳,陈耀星,王子旭,等. 不同年龄山羊小肠肌间神经丛 NOS 神经元形态和分布的比较[J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(2):196-201
- [5] Grozdanovic Z, Baumgarten H G, Bruning G. Histochemistry of NADPH diaphorase, a marker for neuronal nitric oxide synthase, in the peripheral autonomic nervous system of the mouse[J]. *Neuroscience*, 1992, 48(1):225-235
- [6] 吴红金,林传友,曹福元,等. 大鼠肠道内 NOS 与 AChE、VIP 阳性神经元的分布关系研究[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2000, 9(2):187-190
- [7] Nichols K, Krantis A, Stain W. Histochemical localization of nitric oxide-synthesizing neurons and vascular sites in the guinea-pig intestine. *Neuroscience*, 1992, 51(3):791-799
- [8] Wu HJ, Lin C-Y, Hu D-S, et al. A comparative study on the distribution of NOS and AChE, VIP-positive neurons in the intestine of rat[J]. *Chinese J. Histochem. Cytochem*, 2000, 9(2):187-190

(下转第 20 页)

低镁对肉仔鸡红细胞体外氧化应激敏感性及 红细胞膜流动性的影响

刘永祥 闫于明

(中国农业大学 动物科学技术学院, 北京 100094)

摘要 为研究镁对肉仔鸡红细胞体外氧化应激的敏感性和红细胞膜流动性的影响,本试验用 96 只 1 日龄的 AA 肉仔鸡随机分配为低镁日粮组(镁含量 1.2 g/kg)和对照组(镁含量 2.4 g/kg)。在体外氧化应激反应体系中,低镁组肉仔鸡红细胞丙二醛(MDA)的生成量高于对照组($P < 0.01$),低镁日粮显著提高红细胞膜的各向异性参数($P < 0.05$);低镁组肉仔鸡红细胞的谷胱甘肽(GSH)含量降低了 17%,丙二醛(MDA)的含量升高了 19%($P < 0.05$),红细胞膜的镁含量降低 18%($P < 0.05$);低镁日粮组肉仔鸡红细胞膜胆固醇的含量($P < 0.05$)及胆固醇/磷脂比($P < 0.01$)均显著提高。结果表明低镁日粮削弱了红细胞的抗氧化系统从而提高红细胞对体外氧化应激的敏感性;红细胞膜胆固醇含量的提高和丙二醛(MDA)的积累可能是低镁日粮降低红细胞膜流动性的原因。

关键词 低镁; 红细胞; 氧化应激敏感性; 细胞膜流动性; 肉仔鸡

中图分类号 S 831.4

文章编号 1007-4333(2007)02-0015-06

文献标识码 A

Effects of low-magnesium on susceptibility of erythrocyte to in vitro oxidative stress and erythrocyte membrane fluidity in broiler chickens

Liu Yongxiang, Guo Yuming

(College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The objective of this study was to investigate effects of magnesium on susceptibility of erythrocyte to in vitro oxidative stress and membrane fluidity in broiler chickens. Ninety six 1-day-old male Abor Acre broiler chicks were randomly allocated into low-magnesium and control groups, each group had 6 replicates of 8 male birds each, fed either control or low magnesium diets containing about 1.2 g/kg or 2.4 g/kg of diet respectively. The erythrocyte from low-magnesium group exhibited higher MDA production in in vitro oxidative stress reaction system than that from control ($P < 0.05$). The anisotropy parameter of erythrocyte membranes was increased by low magnesium diet ($P < 0.05$). Glutathione (GSH) content of erythrocyte decreased by 17% ($P < 0.05$) while malondialdehyde (MDA) concentration increased by 19% in low-magnesium group ($P < 0.05$). Magnesium content of erythrocyte membrane from low-magnesium group was reduced by 14% ($P < 0.05$). Feeding low-magnesium diet for 21 days resulted in a smaller but significant increase in cholesterol content of erythrocyte membrane ($P < 0.05$) and in higher cholesterol/phospholipids ratio ($P < 0.01$). These results suggest that low magnesium diet impaired antioxidant capacity of erythrocyte and then increased susceptibility of erythrocyte to in vitro oxidative stress. Increased MDA content and altered cholesterol composition of erythrocyte membrane should be contributing factors to the decrease of erythrocyte membrane fluidity.

Key words low-magnesium diet; erythrocyte; susceptibility to oxidative stress; membrane fluidity; broiler chickens

在多种心血管疾病中镁的缺乏和氧化应激是相互关联的^[1],进一步研究发现日粮镁缺乏可诱导大

收稿日期: 2006-07-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371043)

作者简介: 刘永祥, 博士研究生, E-mail: yxliu225@163.com; 闫于明, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事家禽营养的研究, E-mail: guoyum@cau.edu.cn

鼠和小鼠多种组织氧化应激状态的增强,提高组织中脂质过氧化物丙二醛(MDA)的含量^[2]。另一方面,日粮中添加镁能有效地降低猪肉的脂质过氧化水平^[3]。在家禽科学中,Guo等首次报道日粮中添加镁能显著降低肉仔鸡肝脏和腿肌中丙二醛的含量^[4],在体外试验中,培养液镁缺乏诱导鸡胚肝细胞的氧化应激损伤^[5]。最近的研究表明处于热应激状态下的鹌鹑,其血清、肝脏及腿肌中丙二醛的含量随日粮中镁含量的提高线性降低^[6]。这些试验结果揭示镁和机体组织脂质过氧化之间存在密切关系,但迄今为止,人们对镁影响组织中脂质过氧化水平的机制仍知之甚少。

脂质过氧化是自由基攻击不饱和脂肪酸的结果,推测日粮中的镁可能影响组织抗氧化能力的阈值,从而影响组织对自由基损伤的敏感性。本试验将肉仔鸡的红细胞直接暴露于体外的自由基生成系统,评价日粮中镁对红细胞体外氧化应激敏感性的影响。细胞膜的流动性是细胞功能的重要参数,影响完整的膜蛋白定向、膜的渗透性、跨膜转运过程等。细胞脂质过氧化水平的提高影响细胞膜的流动性^[7];此外,红细胞膜的流动性与细胞膜的镁含量、膜的脂质组成有关,这些因素受镁营养的影响。本试验旨在探讨镁营养对红细胞功能的潜在影响。

1 材料与方法

1.1 动物与日粮

96只1日龄AA肉仔鸡随机分配到低镁日粮组和对照组,每个处理6个重复,每个重复8只鸡。低镁日粮组和对照组的镁含量分别是1.20和2.40 g/kg(日粮实测值)。日粮是半纯化的,其配制参照NRC的标准(1994)。对照组的基础镁含量与低镁日粮组相同,在此基础上添加1%(质量分数)的天门冬氨酸镁(购自安徽生物制品厂),镁含量为11.9%。日粮的组分和营养水平见表1。肉仔鸡均饲养至3周龄,在最初的3d,鸡舍的室温为33~35℃,以后每周降3℃,自由采食和饮水,常规免疫。

1.2 样品收集

饲养至3周龄时,从每个重复中随机抽取2只鸡,颈静脉放血处死,收集血样,来自同一重复的血样混合。血样3000g,4℃离心15min。沉淀的红细胞用生理盐水洗涤2次。

1.3 红细胞谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量的测定

红细胞加4倍体积的蒸馏水充分溶血,采用商业化试剂盒测定溶血液中的红细胞谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量(南京建成生物工程研究所提供)。

表1 日粮的组分和营养水平

Table 1 Experimental diet composition and nutrition levels

日粮组分	%		营养水平	%	
	低镁日粮组	对照组		低镁日粮组	对照组
大豆分离蛋白	16.20	16.20	代谢能(MJ/kg)	13.36	13.36
大豆粕	10.00	10.00	粗蛋白	22.99	22.97
大豆油	3.34	3.34	钙	1.00	1.00
磷酸氢钙(CR)	1.84	1.84	有效磷	0.45	0.45
碳酸钙(CR)	1.30	1.30	蛋氨酸	0.52	0.52
蛋氨酸	0.29	0.29	蛋+胱氨酸	0.90	0.90
金霉素	0.08	0.08	赖氨酸	1.17	1.17
氯化胆碱	0.10	0.10	镁(g/kg)(实测值)	1.20	2.40
氯化钠(AR)	0.30	0.30			
多维	0.02	0.02			
多矿	0.20	0.20			
抗氧化剂	0.04	0.04			
天门冬氨酸	0.70				
天门冬氨酸镁		1.00			

注: % ,质量分数; 金霉素、氯化胆碱和抗氧化剂的有效成分分别为15%、50%和33%; 每kg饲料含VA 10 800 IU, VD3 2 160 IU, VE 6.5 mg, VK₃ 1.0 mg, VB₁ 0.4 mg, VB₂ 5 mg, VB₁₂ 6 mg, 叶酸 0.1 mg, 烟酸 7 mg, 泛酸 5 mg; 每kg饲料含Cu 6 mg, Fe 60 mg, Mn 60 mg, Zn 50 mg, Se 0.15 mg, 0.35 mg。

1.4 体外应激敏感性检测

将 0.1 mL 1:1 红细胞悬液(为红细胞与等渗磷酸盐缓冲液等体积配制)加入到 1 mL 的反应液(1 mmol/L ADP, 0.05 mmol/L FeCl₃, 0.4 mmol/L NADPH)中, 37 °C 孵育 30 min, 反应期间不停摇动。反应结束后立即测定 MDA 含量。反应混合液中加入 2 倍体积的下述混合液: 15% (体积分数) 三氯乙酸, 0.375% (体积分数) 三氯巴比土酸, 0.25 mol/L HCL, 充分混匀后煮沸 30 min, 然后 3 000 g, 4 °C 离心 10 min, 535 nm 处测定上清液的吸光度。

1.5 红细胞膜的制备和红细胞膜流动性测定

采用低渗破膜的方法制备红细胞膜, 采用双缩脲方法测定蛋白含量。部分细胞膜立即用于膜流动性的测定。其余冷冻干燥后, -80 °C 冻存。采用荧光极化技术测定红细胞膜的流动性, DPH 荧光探针购自 SIGMA 公司。2 mL 新鲜制备的红细胞膜悬液(膜蛋白质量浓度 300~600 μg/mL)与 2 mL 的磷酸盐缓冲液(含 2 × 10⁻⁶ mol/L DPH)充分混匀, 25 °C 孵育 30 min, 20 000 g, 4 °C 离心 10 min。沉淀的红细胞膜用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次, 重悬于缓冲液中后立即上机测试。

1.6 血浆镁含量及红细胞膜镁和钙含量的测定

血浆用稀盐酸 10 倍稀释后直接用原子吸收法测定镁含量。冷冻干燥的红细胞膜在 450 °C 高温下充分灰化 12 h, 灰分溶于 0.1 mol/L HCL, 原子吸收

法测定镁含量。采用常规的邻络合铜指示剂法测定钙的含量。

1.7 膜胆固醇、总磷脂、脂肪酸组成分析

采用一步法抽提膜脂质。气相色谱法测定膜脂肪酸组成。采用酶分析法测定胆固醇和总磷脂含量(试剂盒由南京建成生物工程研究所提供)。

1.8 统计分析

数据表示为平均数 ± 方差, 用 *t* 检验比较平均数差异的显著性, 显著水准为 $P < 0.05$ 。

2 结果

在体外应激反应体系中, 低镁组肉仔鸡红细胞的 MDA 生成量((15.61 ± 1.29) nmol/g) 显著高于对照组((12.01 ± 1.41) nmol/g) ($P < 0.01$), 说明低镁日粮提高了红细胞对体外氧化应激的敏感性。

低镁组肉仔鸡红细胞膜各向异性参数(2.99 ± 0.034) 显著高于对照组(2.87 ± 0.045) ($P < 0.05$), 说明低镁日粮显著降低红细胞膜的流动性。

与对照组相比, 低镁日粮组肉仔鸡的红细胞 GSH 的含量降低了 17%, MDA 的含量升高了 19% ($P < 0.05$) (表 2)。

如表 3 所示, 低镁日粮组肉仔鸡的血浆和红细胞膜的镁含量分别降低了 14% ($P < 0.01$) 和 18% ($P < 0.05$)。对照组和低镁组肉仔鸡细胞膜钙的含量没有差异 ($P > 0.05$)。

表 2 日粮镁对红细胞内谷胱甘肽和丙二醛含量的影响

Table 2 Mg concentration in plasma and Mg and Ca contents in erythrocyte membrane

检测指标	低镁日粮组	对照组	<i>P</i>
谷胱甘肽 GSH(mg/g)	88.28 ± 10.79	106.65 ± 13.50	0.034
丙二醛 MDA(nmol/g)	1.05 ± 0.17	0.85 ± 0.14	0.026

注: 低镁日粮含镁 1.2 g/kg; 对照含镁 2.4 g/kg。下同。

表 3 日粮镁对血浆中的镁浓度及红细胞膜上的镁、钙含量的影响

Table 3 Effects of dietary Mg on Mg concentration in plasma and Mg, Ca contents in erythrocyte membrane

检测指标	低镁日粮组	对照组	<i>P</i>
血浆镁 Mg(mg/L)	21.46 ± 1.62	24.85 ± 1.24	0.002
镁/(mmol/g) *	6.45 ± 0.26	7.85 ± 0.13	0.023
钙/(mmol/g) *	3.12 ± 0.16	3.08 ± 0.21	0.876

注: * 红细胞膜冻干重。

从表 4 可见, 不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸的比值在低镁日粮和对照组之间没有差异 ($P > 0.05$)。低

镁组肉仔鸡红细胞膜 C18:2 的含量显著降低 ($P < 0.05$), C20:0, C22:0 的含量显著提高 ($P < 0.01$)。

采食低镁日粮的肉仔鸡红细胞膜胆固醇的含量 ($P < 0.05$) 及胆固醇/磷脂比 ($P < 0.01$) 均显著高于对照组。

表4 日粮镁对红细胞膜脂类组成的影响

Table 4 Comparison of susceptibility of erythrocyte to *in vitro* oxidative stress

脂肪酸	$w^*/\%$		
	低镁日粮组	对照组	<i>P</i>
C14:0	2.28 ± 0.33	2.68 ± 0.56	0.565
C14:1	1.13 ± 0.25	1.23 ± 0.14	0.193
C16:0	24.13 ± 1.16	25.54 ± 1.24	0.571
C16:1	1.16 ± 0.13	1.19 ± 0.13	0.727
C18:0	26.56 ± 4.48	27.38 ± 2.77	0.249
C18:1	10.89 ± 0.62	10.26 ± 1.23	0.141
C18:2	15.02 ± 6.11	17.68 ± 2.68	0.023
C20:0	7.35 ± 1.62	5.20 ± 0.61	0.002
C20:2	1.11 ± 0.22	0.98 ± 0.30	0.130
C20:3	1.73 ± 0.89	2.47 ± 0.69	0.831
20:4	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.04	0.089
C22:0	8.56 ± 1.92	5.20 ± 0.66	0.005
C22:1	0.047 ± 0.02	0.08 ± 0.04	0.127
<i>m</i> (UFA) / <i>m</i> (SPA)	0.51 ± 0.07	0.53 ± 0.05	0.397
<i>w</i> (胆固醇) / (mg/ mg)	0.34 ± 0.01	0.31 ± 0.01	< 0.050
<i>w</i> (磷脂) / (mg/ mg)	1.36 ± 0.04	1.35 ± 0.05	0.356
胆固醇/ 磷脂 (mol/ mol)	0.49 ± 0.01	0.45 ± 0.01	< 0.010

注: * 各种脂肪酸占可鉴别脂肪酸总量的质量比; UFA/ SPA = 不饱和脂肪酸/ 饱和脂肪酸。

3 讨论

3.1 红细胞是进行体外氧化应激研究的良好模型

红细胞内的血红蛋白不断氧化,此过程产生氧自由基,而且红细胞富含多不饱和脂肪酸、氧、铁,因此红细胞对氧化应激比较敏感。红细胞对体外氧化应激的敏感性反映了其他组织和器官同样的趋势^[8];此外,红细胞及其膜比其他组织细胞及膜容易分离。

3.2 日粮镁对红细胞体外氧化应激敏感性的影响

以前的研究表明肉仔鸡的镁营养状态影响肉仔鸡肝脏和腿肌的脂质过氧化水平^[4],培养液中的镁缺乏诱导鸡胚肝细胞的氧化应激^[5]。为加深镁营养对肉仔鸡机体抗氧化能力及其机制的了解,本试验采用体外氧化应激刺激的方法,研究来自不同镁

营养水平的肉仔鸡红细胞对体外氧化应激的敏感性。在本试验条件下,低镁日粮显著提高红细胞对体外氧化应激的敏感性,意味着低镁日粮降低了红细胞抵抗自由基攻击的能力;低镁日粮显著降低肉仔鸡血浆的镁水平,血浆的镁水平是反映机体镁营养状态的最敏感指标。以上结果表明日粮的镁含量影响机体的镁营养状态,从而影响肉仔鸡红细胞抗氧化能力的阈值。在以鼠类为模型的试验中,日粮镁缺乏增强儿茶酚胺类激素诱导的心肌损伤的程度^[9],儿茶酚胺类激素诱导心肌损伤的机制十分复杂,但VE可以显著缓解其对心肌的损伤,说明自由基参与了儿茶酚胺类激素诱导的大鼠心肌损伤的过程,日粮镁缺乏增强儿茶酚胺类激素诱导的大鼠心肌损伤的程度,说明镁缺乏降低了心肌自我保护和抵抗自由基攻击的能力。这与本试验的结果一致。

由于本试验采用统一的体外氧化应激刺激体系,低镁组红细胞对体外氧化应激敏感性的提高只可能与 2 方面的因素有关:1) 自由基作用底物即多不饱和脂肪酸含量提高。2) 抗氧化系统的削弱。多不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸的比值在低镁组和对照组之间没有差异,因此细胞膜脂肪酸的组成与提高的应激敏感性无关。在家禽科学中尚无镁营养对鸡红细胞膜脂肪酸组成的相关报道。在鼠类动物,极度的镁缺乏提高红细胞膜中 C18:1n9、C20:4n4 的含量,降低 C20:3n6、C22:5n6 的含量^[10],与本试验的结果存在明显差异(表 4)。差异或许来自于物种的不同,与试验日粮的不同也可能有关。在鼠类动物试验中日粮中镁极度缺乏,而本试验低镁日粮中的镁含量对于肉仔鸡的需要而言是临界的。低镁日粮显著降低红细胞内 GSH 的含量,降低了红细胞的抗氧化能力,从而提高了红细胞对体外氧化应激的敏感性。机体的镁营养状态对组织的抗氧化系统有重要影响。镁缺乏降低了大鼠红细胞中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性以及 GSH 含量。目前尚不了解镁影响抗氧化酶活性的途径。由于镁广泛参与多种基因表达,包括基因组的稳定、转率效率、mRNA 的稳定性和翻译,镁可能激活了抗氧化酶基因的表达。另外,镁在体内外对多种酶有激活作用,对抗氧化酶可能有激活作用。机体镁营养水平影响红细胞中 GSH 的原因可能在于镁参与 GSH 的合成,是合成 GSH 必需酶的激活剂。增强的抗氧化酶活性可以减少 GSH 的消耗。

3.3 日粮镁对红细胞膜流动性的影响

利用荧光极化技术评价红细胞膜的流动性。疏水的 DPH 嵌入细胞膜的脂质双层,提供细胞膜脂质双层的分子顺序,以各相异性参数表示,其值与红细胞膜的流动性呈反比。低镁日粮显著提高红细胞膜的各向异性参数,说明低镁日粮显著降低红细胞膜的流动性。

镁与细胞膜脂质双层中带负电荷的磷脂头部的磷酸基结合,对脂质双层结构有稳定作用,镁从细胞膜中流失提高细胞膜的流动性;但本试验中,低镁日粮同时降低红细胞膜中镁含量和细胞膜的流动性。因此,细胞膜上镁含量的变化不是低镁日粮组肉仔鸡红细胞膜流动性降低的原因。钙是细胞膜的钢化因子,但日粮中镁含量并不影响细胞膜中钙的含量。

胆固醇是细胞膜的钢化因子,低镁日粮显著提

高红细胞胆固醇的含量,说明红细胞膜胆固醇含量的提高是低镁日粮降低红细胞膜流动性的原因之一。除合成葡萄糖外,红细胞几乎没有代谢功能,红细胞在骨髓形成后,没有自我更新的能力,但红细胞的组分与血浆之间存在交换。红细胞膜中的胆固醇与血浆中的胆固醇存在快速交换。文献[6]报道鹌鹑血清中胆固醇的含量随日粮中镁添加量的提高而线性降低。另据研究表明日粮镁缺乏显著提高鼠血浆中游离胆固醇的含量^[11],反之,日粮中补充镁则显著降低鼠血浆中游离胆固醇的浓度。镁营养节 LCAT 的活性可能是镁营养影响血浆中游离胆固醇的浓度的原因,LCAT 的功能是阻止非酯化的胆固醇在血浆中的积累,镁缺乏削弱 LCAT 的活性,导致胆固醇在血浆中的积累^[12]。

脂质过氧化可以改变生物膜的结构,影响酶的活性,改变膜结合蛋白的构想及影响受体活性。红细胞中 MDA 的积累导致细胞内的脱水和整个细胞可塑性的降低,影响红细胞脂质双层的稳定性^[13]。对组织硬结病的研究发现红细胞膜脂质过氧化水平与红细胞膜的流动性呈负相关^[14]。低镁日粮增加红细胞中 MDA 的产量,降低红细胞膜的流动性,这种相反的趋势意味着 MDA 产量的增加可能是红细胞膜的流动性降低的原因之一。

镁对生物膜的功能有重要影响。镁缺乏削弱 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性,导致细胞内 K^+ 降低,引起膜电位下降,从而提高细胞内 Na^+ ,刺激 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换,导致钙过载和细胞的死亡,线粒体上镁的去除导致线粒体的膨胀和对单价阳离子渗透性的增加。细胞膜的流动性是细胞膜重要的结构和动力学特性,是细胞膜功能的重要参数,低镁日粮显著降低肉仔鸡红细胞膜的流动性,必然影响红细胞膜的功能,但对红细胞功能的具体影响尚需进一步的探讨。

4 结 论

本研究表明低镁日粮提高红细胞对体外氧化应激的敏感性并降低红细胞膜的流动性,根据脂质分析和抗氧化能力标志物 GSH 的测定结果,红细胞抗氧化系统的削弱是红细胞对体外氧化应激敏感性提高的原因。红细胞膜胆固醇含量的提高导致膜流动性的降低,MDA 的积累也可能是红细胞膜流动性降低的原因之一。

参 考 文 献

- [1] Seeling M S. Consequences of Mg deficiency on the enhancement of stress reactions [J]. J Am Coll Nutri, 1994, 5: 429-446
- [2] Andrzej K, Piotr K, Boleslaw F S, et al. The changes in the antioxidant status of heart during experimental hypomagnesemia in balb/c mice [J]. Biometals, 2001, 14: 127-133
- [3] Dong R, Zhao J. The influence of Mg on the lipid peroxidation in meat [J]. Meat Hygi, 1994, 1: 1-4
- [4] Guo Y M, Zhang G M, Yuan J M, et al. Effects of source and level of Mg and vitamin E on prevention of hepatic peroxidation and oxidative deterioration of broiler meat [J]. Anim Feed Sci Tech, 2003, 107: 143-150
- [5] Yang Y, Wu Z L, Chen Y, et al. Mg deficiency enhances hydrogen peroxide production and oxidative damage in chick embryo hepatocyte *in vitro* [J]. Biometals, 2005, 18: 26-36
- [6] Sahin N M, Onderci M, Sahin K, et al. Mg proteinate is more protective than Mg oxidative [J]. J Nutr, 2005, 135: 1732-1737
- [7] Rosario J, Satherland E, Zaccaro L, et al. Ethinylestradiol administration selectively alters liver sinusoidal membrane lipid fluidity and protein composition [J]. Biochemistry, 1988, 27: 3939-3946
- [8] Stocks J, Dormandy T L. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide [J]. Br J Haematol, 1971, 20: 95-100
- [9] Freedman A M, Cassidy M M, Weglicki W B. Magnesium deficient myocardium demonstrates an increased susceptibility to an *in vivo* oxidative stress [J]. Mg Res, 1991, 4: 185-189
- [10] Lerma A, Planells E, Arannda P, et al. Effect of magnesium deficiency on fatty acid composition of the erythrocyte membrane and plasma lipid concentration in rats [J]. Nutr Biochem, 1995, 6: 577-581
- [11] Rayssierguier Y, Noe L, Etienne J, et al. Effect of Mg deficiency on post heparin lipase activity and tissue liprotein in the rat [J]. Lipids, 1991, 26: 182-186
- [12] Gueux E, Rayssierguier Y, Piot M M, et al. Reduction of plasma lecithin cholesterol acyltransferase activity by acute magnesium deficiency in the rat [J]. J Nutr, 1984, 114: 1479-1483
- [13] Jain S K, Mohandas N, Clark M R, et al. The effect of MDA, a product of fatty acid peroxidation on the deformability, dehydration and 51 Cr-survival of erythrocytes [J]. Br J Haema, 1983, 53: 247-225
- [14] Solan R, Motta C, Sola R. Abnormalities of erythrocyte membrane fluidity, lipid composition, and lipid peroxidation in systemic sclerosis: evidence of free radical mediated injury [J]. Arthritis and Rheumatism, 2000, 43(4): 894-900
- (上接第 14 页)
- [9] Gabella G. Neuron size and number in the myenteric of the newborn and adult rat [J]. J Anat, 1971, 109: 81-95
- [10] Gabella G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep [J]. Neuroscience, 1987, 22(2): 737-752
- [11] Young H M, Furness J B, Sewell P, et al. Total numbers of neurons in myenteric ganglia of the guinea-pig small intestine [J]. Cell Tissue Res, 1993, 272(1): 197-200
- [12] Doxey D L, Pearson G T, Milne E M, et al. The equine enteric nervous system - neuron characterization and distribution in adults and juveniles [J]. Vet Res Commun, 1995, 19: 6433-6449
- [13] 张原, 滕可导, 张晗, 等. 仔猪小肠肌间神经丛中神经元数量的定量测定 [J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(11): 11-13
- [14] Tay S S W, Burnstock G. Localization of age-related changes in NADPH-diaphorase activity in pancreatic neurons [J]. Neuroscience, 1994, 615(2): 597-602
- [15] Nemeth L, Fourcade L, Puri P. Marked morphological differences in the myenteric plexus between the mesenteric sides of small bowel in premature infants [J]. J Pediatr Surg, 2000, 35(5): 748-751
- [16] Dinan T G, Scott L V, Brady D, et al. Altered hypothalamic cholinergic responses in patients with non-ulcer dyspepsia: a study of pyridostigmine stimulated growth hormone release [J]. Am J Gastroenterol, 2002, 97(8): 1937-1940