

# 硒对鸡胚胎发育的影响

孟列素 谭武红 苏敏 田东萍 张舸 翟连榜 王立新 杨占田

**【摘要】** 目的 观察补硒对正常鸡胚胎谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、II型脱碘酶(ID II)活性和生长相关蛋白(GAP-43)表达的影响,探讨硒对正常动物脑发育的作用。方法 对孵育 8 d 的鸡胚分别注射不同剂量的 MSeC(含 0、1、5、10、20、40  $\mu$ g 硒),孵育至第 20 天时处死。测定脑组织中硒、GPx 活性、ID II 活性,检测 GAP-43 蛋白的表达。结果 对正常鸡胚补硒,可提高脑硒水平、脑 GPx 活性及 GAP-43 的表达,补硒量与脑硒、脑 GPx 活性显著相关( $P < 0.01$ ),而与脑 ID II 活性无相关性。结论 MSeC 可有效提高鸡胚胎脑组织硒水平、脑 GPx 活性和 GAP-43 的表达,对脑 ID II 活性没有影响。对正常鸡胚适量补硒可能会促进神经系统的生长和发育。

**【关键词】** 脑; 硒; 脱碘酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 生长相关蛋白

中图分类号:R153.1;Q55 文献标识码:A 文章编号:1000-4955(2005)01-0038-03

**Effects of selenium on the development of chick embryonic brain** MENG Lie-su\*, TAN Wu-hong, SU Min, TIAN Dong-ping, ZHANG Ge, ZHAI Lian-bang, WANG Li-xin, YANG Zhan-tian. \*Key Laboratory of Environment and Genes Related to Diseases, Xi'an Jiaotong University, Ministry of Education, Xi'an 710061, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of selenium supplementation on the brain development, the effects of selenium on activities of glutathione peroxidase (GPx) and deiodinase (ID II), and the expression of growth-associated protein (GAP-43) in chick embryo brain. **Methods** Normal chick embryos of 8 days old were injected with MSeC of different concentrations (containing 0, 1, 5, 10, 20, or 40  $\mu$ g selenium), and were sacrificed on the 20th day. The selenium concentration, GPx and ID II activities in brain was assayed, and the expression of GAP-43 was detected. **Results** MSeC increased the content of selenium, activities of GPx and the expression of GAP-43 in chick embryos brain. MSeC dosage correlated well with the selenium concentration and GPx activities in brain ( $P < 0.01$ ), but not with the ID II activities in brain. **Conclusion** MSeC can effectively increase the content of selenium, GPx activity and GAP-43 expression in tissues of chick embryos brain, but selenium supplementation don't affect ID II activities in brain. Supplying proper selenium to normal chick embryos may improve the development of brain.

**【Key words】** Brain; Selenium; Deiodinase; Glutathione peroxidase; Growth-associated protein

**CLC number:** R153.1; Q55 **Document code:** A **Article ID:** 1000-4955(2005)01-0038-03

硒是哺乳动物必需的微量元素,在机体内它主要以含硒氨基酸的形式参与形成硒蛋白来发挥生理作用。谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)是发现最早研究最多的含硒酶,在体内氧化还原过程中起重要作用,但在硒缺乏时有许多现象不能用 GPx 活性降低来解释。自 1990 年起, I 型脱碘酶(ID I)、II 型脱碘酶(ID II)和 III 型脱碘酶(ID III)相继被确定为含硒酶,它们的共同作用是维持甲状腺激素代谢的动

态平衡<sup>[1]</sup>。大脑是机体非常重要的器官,GPx 和脱碘酶对其正常生长、发育及功能有重要作用。生长相关蛋白(growth-associated protein-43, GAP-43)是一种胞膜磷酸蛋白质,是国际上研究神经生长发育和损伤修复等神经可塑性的首选分子探针<sup>[2]</sup>。甲基硒代半胱氨酸(MSeC)是富硒植物中含有的一种有机硒,是甲基硒的重要前体物质。通过对正常鸡胚补充不同剂量的 MSeC,研究硒对正常鸡胚 GPx、ID II 活性及 GAP-43 表达的影响,以探讨补硒对正常动物脑发育的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 动物模型复制及分组**<sup>[3]</sup>:将 100 只重量 65 ~ 75 g、孵育第 8 天的黄羽鸡鸡胚(购自广东省汕头市白沙研究所)按重量随机分为 5 组,每组 20 只,通过卵黄囊注射 0.2 ml 不同剂量 MSeC。对照组注射生理盐水,实验组分别补硒 1、5、10、20  $\mu$ g。孵育温

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170832)

作者单位:710061 西安交通大学环境与疾病相关基因教育部重点实验室(孟列素、谭武红、翟连榜、王立新、杨占田);汕头大学医学院(苏敏、田东萍、张舸)

作者简介:孟列素(1975-),女,陕西省西安市人,硕士,讲师,从事微量元素与地方病的关系研究

通讯作者:谭武红,副教授,从事地方病与微量元素的研究,029-82655196, twh57@163.net;苏敏,教授,从事病理学研究,0754-8900429, minsu@stu.edu.cn

度(38 ± 2)℃, 孵育期间鸡胚每天翻动 3 次, 至第 20 天时处死。

**1.2 样品制备:** 取出鸡胚脑组织, -80℃ 冻存。脑组织用冷 0.14 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (含 0.14 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.14 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol/L EDTA, pH7.4) 以 1:1.5 (体积比) 在小玻璃匀浆器中匀浆。匀浆液经 13 000 r/min, 离心 30 min, 取上清备用。以上操作均在 0 ~ 4℃ 进行。

**1.3 指标测定**

**1.3.1 样品硒测定:** 采用 2,3-二氨基萘荧光法测定。

**1.3.2 GPx 活性测定:** 采用 DTNB 直接法。

**1.3.3 脱碘酶活性测定:** ID II 活性测定参考 Sing Wu 方法<sup>[4]</sup>。三碘甲腺原氨酸(T<sub>3</sub>)检测采用放射免疫法, 试剂盒购自北京北方生物技术研究所。

**1.3.4 总蛋白测定:** 采用 Bradford 法。

**1.3.5 GAP-43 表达的检测:** 采用第 2 版《分子克隆

实验指南》Western blot 法。图片扫描和分析采用美国 SYNGENE 公司凝胶成像系统及分析软件。

**1.4 数据处理:** 用 SPSS 10.0 统计软件, One Way Anova 法进行显著性检验。

**2 结果**

**2.1 不同补硒量对脑组织硒和 GPx、ID II 活性的影响:** 如表 1 所示, 与对照组相比, 各补硒组鸡胚脑组织硒增加, 但对对照组和前 3 个补硒组组间差异无统计学意义。补硒 20 μg 组与其他各组均有显著性差异。各补硒组的 GPx 活性均高于对照组, 与对照组相比均差异有统计学意义。补硒 1、5 μg 组与补硒 10、20 μg 组相比差异有统计学意义; 但补硒 1 μg 组与 5 μg 组之间、补硒 10 μg 组与 20 μg 组之间差异无统计学意义。各实验组之间 ID II 活性差异无统计学意义。

表 1 各实验组脑组织中含硒量和 GPx、ID II 活性 (x̄ ± s)

Table 1 Selenium concentration, GPx and ID II activities of every experimental groups in brain (x̄ ± s)

组别	例数	鸡胚脑硒 mg/kg)	GPx 活性 μmol·g <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	ID II 活性 pmol·g <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )
对照组	6	0.170 3± 0.002 2 <sup>a</sup>	23.457 4± 3.371 8 <sup>a</sup>	46.677 6± 12.938 7 <sup>a</sup>
补硒 1 μg 组	7	0.201 0± 0.065 1 <sup>a</sup>	30.037 7± 3.259 8 <sup>b</sup>	44.562 2± 7.666 2 <sup>a</sup>
补硒 5 μg 组	10	0.198 3± 0.025 5 <sup>a</sup>	33.191 6± 2.379 5 <sup>b</sup>	47.016 6± 16.790 5 <sup>a</sup>
补硒 10 μg 组	7	0.224 3± 0.055 1 <sup>a</sup>	40.742 1± 6.351 2 <sup>c</sup>	36.584 3± 12.638 0 <sup>a</sup>
补硒 20 μg 组	7	0.281 4± 0.079 3 <sup>b</sup>	44.042 2± 8.990 7 <sup>c</sup>	43.736 0± 5.269 4 <sup>a</sup>

注: 同一列上标字母相同者差异无统计学意义, 上标字母不同者为差异有统计学意义 (P < 0.05); 各组例数不足 20 例, 因为部分鸡胚在孵育中死亡

**2.2 补硒量、脑组织硒、cGPx、ID II 活性的相关性分析:** 从表 2 可以看出, 补硒量与脑硒、脑 GPx 活性显著相关 (P < 0.01), 脑含硒量与脑 GPx 活性明显相关 (P < 0.05), 而脑 ID II 活性与其他 3 个指标均无相关性。

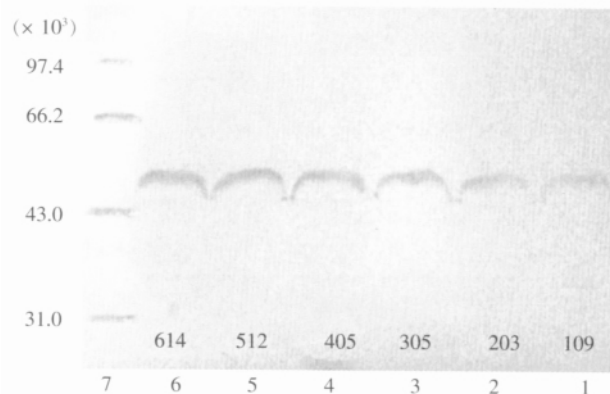
表 2 补硒量、脑组织硒、GPx 活性、ID II 活性的相关性分析  
Table 2 The analysis of correlation between the dosage of selenium supplementation, selenium concentration, GPx and ID II activities in brain

指标	补硒量	脑含硒量	脑 GPx 活性	脑 ID II 活性
补硒量	1.000	0.542**	0.809**	-0.154
		0.001	0.000	0.364
脑含硒量	0.542**	1.000	0.415*	-0.168
		0.001	0.011	0.322
脑 GPx 活性	0.809**	0.415*	1.000	-0.111
		0.000	0.011	0.514
脑 ID II 活性	-0.154	-0.168	-0.111	1.000
		0.364	0.514	

注: Pearson 相关, 表内数字为相关系数, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, n = 37

**2.3 GAP-43 的表达:** 取每个实验组不同标本进行 GAP-43 表达检测, 共进行 10 次, 大部分结果 (8 次) 显示对照组的 GAP-43 的表达量低于各补硒组; 各补硒组之间 GAP-43 的表达有差异, 有随补硒量增

大表达量增加, 如图 1 所示。表 3 显示实验组 GAP-43 表达量的相对灰度值随补硒量增加而逐渐升高, 虽然补硒 10、20、40 μg 组之间差异无统计学意义, 但它们与对照组和补硒 5 μg 组差异均有统计学意义; 同时, 对照组、补硒 1 μg 与 5 μg 组之间差异无统计学意义。



1 对照组, 2 补硒 1 μg 组, 3 补硒 5 μg 组, 4 补硒 10 μg 组, 5 补硒 20 μg 组, 6 补硒 40 μg 组, 7 Marker

图 1 各实验组脑组织中 GAP-43 的表达  
Figure 1 The expression of GAP-43 in brain of the experimental groups

表 3 各实验组脑组织中 GAP-43 水平 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3 The GAP-43 level of every experimental groups in brain ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	相对灰度值
对照组	1.000± 0.000 <sup>a</sup>
补硒 1 μg 组	1.435± 0.426 <sup>a</sup>
补硒 5 μg 组	2.118± 0.738 <sup>ab</sup>
补硒 10 μg 组	2.615± 0.502 <sup>b</sup>
补硒 20 μg 组	3.185± 0.579 <sup>b</sup>
补硒 40 μg 组	3.357± 0.650 <sup>b</sup>

注:各组均为 8 例,同一列上标字母相同者差异无统计学意义,上标字母不同者差异有统计学意义( $P < 0.01$ )

### 3 讨论

实验中使用的正常鸡胚来自于非低硒地区,对照组的脑硒约为 0.170 3 mg/kg,高于其他研究中处于硒营养状态的动物脑硒(约为 0.10 mg/kg)<sup>[4,5]</sup>,这说明使用的正常鸡胚处于非低硒营养状态。对其脑硒和 GPx 活性的检测结果显示这两项指标与补硒量显著相关,说明 MSeC 是有效的补硒制剂。

低硒可导致脑组织中 GPx 活性下降,如果对低硒动物补硒,GPx 活性可以明显升高,这已被国内外众多学者证实<sup>[5,6]</sup>。但对于硒并不缺乏的情况下,补硒会对脑组织中 GPx 活性有何影响的研究却并不多见。本实验结果提示对正常鸡胚补硒可提高脑 GPx 活性,随补硒量的增加各补硒组脑 GPx 活性呈升高趋势,但升高的幅度不大。提示在不缺硒的情况下,适当补硒也可提高脑组织中 GPx 活性,从而提高脑组织的抗氧化能力,可能对脑的发育有一定的保护和促进作用。

ID II 主要分布于大鼠、鸡胚、人等动物的中枢神经系统,对脑组织中甲状腺素的代谢起着重要的作用。实验结果显示,鸡胚脑 ID II 活性在各实验组之间差异无统计学意义,与补硒量及脑含硒量均无相关性。在低硒的情况下,脑组织与其他组织相比,对于硒有优先利用权,而且在脑组织中的含硒蛋白中,ID II 和硒蛋白 P 又比其他含硒蛋白优先利用硒<sup>[6,7]</sup>。从本实验的结果来看,在对不缺硒的正常鸡胚补硒时,脑硒升高,说明即使在不缺硒的情况下,脑对硒也具有优先利用权。但补硒对脑中 ID II 活性没有明显的影响,提示了在非低硒营养状态下,脑中的硒含量已经满足了 ID II 的需要量,再补硒时其酶活性也不会有大的改变。这也从另一方面证实了脑 ID II 利用硒的优先性和稳定性,即无论处于低硒或高硒营养状态,脑组织中 ID II 对硒的利用都处于比较稳定的状态,其 ID II 活性的变化相对较小。说明如果对处于非低硒营养状况的动物补硒,并不能通过改变 ID II 的活性来影响脑中甲状腺素的代谢,从而

影响脑发育。实验结果也显示,适硒情况下补硒可使脑中 GPx 活性有一定程度升高,而对 ID II 活性的影响微小。提示 ID II 的稳定性对胚胎脑的发育具有重要意义。

GAP-43 在发育中的中枢神经系统有较高水平的表达,尤其在生长链处浓度很高,被认为与神经元生长发育、突触形成及神经可塑性密切相关,因此是神经生长发育和损伤修复等神经可塑性的首选分子探针,可以用来指示神经元生长、突触形成的进行和程度<sup>[2]</sup>。实验结果表明硒可以促进 GAP-43 的表达,且表达量有随补硒量增加而增加的趋势,提示对正常鸡胚进行补硒可以促进其神经系统的生长和发育<sup>[8]</sup>。补硒 10、20 及 40 μg 组与对照组及补硒 1 μg 组差异有统计学意义,但它们之间的蛋白表达水平并差异无统计学意义,提示适量补硒即能促进 GAP-43 表达。GAP-43 可以通过多种途径和机制调节神经突起终末对环境刺激的反应,来促进神经元生长发育、神经再生和突触重建的作用<sup>[2,9]</sup>。硒也可能通过促进 GAP-43 蛋白的表达来实现其对脑发育的调节作用,至于硒在什么水平上、通过何种机制发挥其调节作用,还有待进一步的研究。

### 参考文献

- Kohrle J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action[J]. Cell Life Sci, 2000, 57(13-14): 1853-1863.
- 覃华丽,周雪,章为. 生长相关蛋白 GAP-43 的研究现状[J]. 四川解剖学杂志, 2002, 10(2):78-83.
- 刘德润,高建国. 硒碘对鸡胚脑发育影响的研究[J]. 中国地方病学杂志, 1994, 13(3): 136-138.
- 杨晓光,张在香,田园,等. 大鼠脑中的硒蛋白[J]. 卫生研究, 1999, 28(3):146-149.
- Joanne MB, Vickie LS, Morris JS, et al. Effects of selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in the rat during development[J]. Endocrinology, 2000, 141(7):2490-2500.
- Turan B, Acan NL, Uluşu NN, et al. A comparative study on effect of dietary selenium and vitamin E on some antioxidant enzyme activities of liver and brain tissues[J]. Biol Trace Elem Res, 2001, 81(2):141-152.
- 朴建华,张在香,杨晓光,等. 大鼠硒耗竭过程中不同组织硒蛋白利用硒的优先性[J]. 卫生研究, 1999, 28(3): 158-161.
- 王冰,阴小龙,莫立平,等. 硒促进体外培养的大鼠皮层神经细胞生长及机理的研究[J]. 中国地方病学杂志, 2002, 21(5):365-367.
- 帖利军,潘建平,闫晓彩,等. 神经生长相关蛋白在甲状腺功能减退新生鼠大脑的表达[J]. 中国地方病学杂志, 2001, 20(1): 23-25.

(收稿日期:2004-02-25)

(本文编辑:吴振荣)