

高铜日粮对肉鸡肝脏 *TrxR2* 基因 mRNA 表达和还原活性的影响

刘好朋¹, 唐兆新^{1,2*}, 苏荣胜¹, 胡京京¹, 韩前彪¹, 胡 锴¹,
刘传敦¹, 万 婷¹

(1. 华南农业大学兽医学院, 广州 510642; 2. 广东省兽用生物制品技术研究与应用企业重点实验室, 肇庆 527400)

摘 要: 本文旨在了解高铜日粮对肉鸡肝脏 *TrxR2* 基因 mRNA 表达和还原活性的影响。200 羽 1 日龄 Cobb 商品代肉鸡随机分为 4 组, 各组日粮中铜含量分别为: 对照组 (I 组) 11 mg · kg⁻¹、试验 II 组 110 mg · kg⁻¹、试验 III 组 330 mg · kg⁻¹ 和试验 IV 组 550 mg · kg⁻¹。饲养至 10、30、50 d 时每组各取 5 只鸡用于采集肝脏样品, 提取肝脏线粒体用 DTNB 法测定肝脏 *TrxR2* 的还原活性, 提取肝脏总 RNA 用 RT-PCR 法测定 *TrxR2* mRNA 在肝脏中的表达量。结果显示, 饲喂铜含量为 550 mg · kg⁻¹ 日粮 50 d 时还原活性降低 ($P < 0.05$)、*TrxR2* 基因 mRNA 的表达量降低 ($P < 0.05$), 饲喂铜含量为 330 mg · kg⁻¹ 日粮 30 d 时 *TrxR2* 的还原活性升高 ($P < 0.05$), 50 d 时降低 ($P > 0.05$), 表明饲喂高铜日粮 (330~550 mg · kg⁻¹) 可导致 *TrxR2* mRNA 在肝脏中的表达量降低, 还原活性先升高后降低。

关键词: 肉鸡; 肝脏; 硫酸铜; *TrxR2*; mRNA; 还原活性

中图分类号: S856.9

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)03-0423-06

Effect of High-level Copper Diet on Expression of *TrxR2* mRNA and Reduction Activity of *TrxR2* of Liver in Broiler

LIU Hao-peng¹, TANG Zhao-xin^{1,2*}, SU Rong-sheng¹, HU Jing-jing¹, HAN Qian-biao¹,
HU Kai¹, LIU Chuan-dun¹, WAN Ting¹

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Guangdong Veterinary Biological Products Research and Application of Enterprise Laboratory, Zhaoqing 527400, China)

Abstract: In order to examine the effect of high dietary copper on expression of *TrxR2* mRNA in liver, and the reduction activity of *TrxR2*, the experiment was conducted with two hundred healthy 1 day-old Cobb broilers which were randomly divided into four groups based on diets as follows: control group (Cu 11 mg · kg⁻¹ as the group I) and high copper groups (Cu content 110, 330, 550 mg · kg⁻¹, named group II, III and IV). The liver was taken from broiler in each group at the 10th, 30th and 50th days, respectively, reduction activity of the liver *TrxR2* was determined by the method of DTNB, and the testing material was liver mitochondria which has been extraction from the liver, and the expression of the liver *TrxR2* was determined by the method of semi-quantification and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that the reduction activity of liver *TrxR2* decreased ($P < 0.05$) and the expression of *TrxR2* mRNA was reduced ($P < 0.05$) at 50 d of Group IV, the reduction activity of liver *TrxR2* was increased ($P < 0.05$) at 30 d and reduced ($P > 0.05$) at 50 d of Group III, The experiental results indicated that fed high copper diets (330-550 mg · kg⁻¹) could decrease *TrxR2* mRNA ex-

收稿日期: 2010-10-20

基金项目: 国家自然科学基金 (30871900)

作者简介: 刘好朋 (1985-), 男, 山东潍坊人, 硕士生, 主要从事兽医内科学研究, Tel: 020-85280248, E-mail: liuhaopeng8503@163.com

* 通讯作者: 唐兆新, 教授, E-mail: tangzx@scau.edu.cn

pression in the liver and increase the reduction activity of TrxR2 first, and decrease it on 50 days.

Key words: broiler; liver; copper sulfate; TrxR2; mRNA; reduction activity

氧自由基能够攻击生物膜磷脂中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用^[1]。线粒体中含有多种抗氧化系统,如线粒体型硫氧还蛋白(Trx2)系统,该系统是由线粒体型硫氧还蛋白(Thioredoxin2, Trx2)、线粒体型硫氧还蛋白还原酶(Thioredoxin Reductase 2, TrxR2)和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸三者组成,其主要作用是维持细胞内外氧化还原平衡^[2]。TrxR2是一种依赖 NADPH 还原力、能够还原线粒体型硫氧还蛋白(Trx2)及其余底物的还原酶^[3],在 Trx2 系统中具有重要作用。有研究报道铜通过参与机体抗氧化过程而发挥其主要作用,高铜可对肉鸡肝脏及其线粒体抗氧化功能产生影响^[4],但是国内外文献鲜见高铜对 TrxR2 的影响,本文旨在探讨高铜日粮对肉鸡肝脏 TrxR2 在基因表达和还原活性方面的影响,以研究高铜对动物肝脏线粒体抗氧化功能的损伤机理,同时为动物养殖生产中合理使用铜添加剂,预防过量铜对畜禽造成危害提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

选用 1 日龄 Cobb 商品代肉鸡 200 只(购于深圳某种鸡场,平均体质量为 $36 \text{ g} \pm 0.3 \text{ g}$),随机分成 4 组,每组 50 只。对鸡进行常规免疫,自由采食和饮水,24 h 光照。试验选用 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 作为铜源,基础日粮对照组铜含量为 Feedsuf 推荐的 $11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (对照组,即 I 组),高铜试验组分别为此标准的 10、30 倍和 50 倍,即 $110 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (II 组)、 $330 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (III 组)、 $550 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (IV 组)。基础日粮以玉米、豆粕为主配制而成,蛋白含量、能量以及维生素和微量元素添加量均按照 NRC (1994)家禽营养需要配制。

1.2 试验材料

RT-PCR 试剂盒(TaKaRa PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2),PCR 仪(Bio-RAD),凝胶成像仪(Bio-RAD),紫外分光光度计(上海天美 UV-8500),RNA 提取试剂盒(TaKaRa RNAiso Plus),胶回收试剂盒(TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0),NADPH(SIGMA),DTNB(SIGMA),其余试剂为国产分析纯。

1.3 样品的采集

于试验的 10、30 和 50 d,每组随机选择 5 只鸡宰杀、采集肝脏,单只肝脏一部分立即提取线粒体测定 TrxR2 的还原活性,另一部分置液氮中保存,用于提取肝脏总 RNA。

1.4 肉鸡肝脏总 RNA 的提取和测定

总 RNA 提取按 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 试剂盒进行。紫外比色法测定总 RNA 浓度和纯度,取 $10 \mu\text{g}$ 总 RNA,变性琼脂糖凝胶电泳分离、拍照观察 RNA 条带。

1.5 PCR 引物的设计及 RT-PCR 反应

目的基因引物序列是根据 GenBank 上鸡的 TrxR2、 β -actin cDNA 序列按 Primer 6 软件自行设计的,引物序列见表 1,由上海博亚工程技术服务有限公司合成。

参照 TaKaRa 公司的 PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2 的说明书进行 RT-PCR 反应。反应体系中模板即总 RNA 为 $2 \mu\text{g}$;经多次条件优化、选择后,最终确定本试验反应条件为 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s(变性), $54 \text{ }^\circ\text{C}$ 40 s(退火), $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 50 s(延伸),3~5 步循环 35 次, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min。TrxR2 和 β -actin 目的基因的退火温度均为 $54 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

表 1 目的基因引物参数

Table 1 Parameters of the target gene primers

| 目的基因 Target gene | 基因序列号 No. of gene | 目的产物/bp Product of target gene | 引物序列 Primer sequence |
|---------------------|----------------------|-----------------------------------|--|
| TrxR2 | NM:001122691 | 573(613-1 185) | 5'-TGCTACTGGAGGAAGACC-3' 5'-GCTATTGCTGTGGGTGTC-3' |
| β -actin | L08165 | 331(865-1 195) | 5'-TCTTGGGTATGGAGTCCTG-3' 5'-TAGAAGCATTGCGGTGG-3' |

1.6 DNA 片段回收及测序

将鉴定准确的 PCR 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分离,然后按 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 操作说明将 DNA 片段进行回收,送宝生物工程(大连)有限公司测序。

1.7 PCR 扩增、电泳及灰度分析

按上述条件进行 RT-PCR 扩增所要测定样品,取单个样品 PCR 产物 5 μL 在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳(EB 染色)。用 Quanty One 图像分析软件系统分析条带灰度。目的基因条带灰度与 βactin 条带灰度的比值来表示 *TrxR2* 目的基因丰度,亦即试验结果。每组 5 个样品,每个样品做 2 次重复。

1.8 肝脏线粒体的提取及 *TrxR2* 活性的测定

参照 Tang 等^[5]和 Johnson 等^[6]介绍的方法提取肝脏线粒体。蛋白质测定采用考马斯亮蓝 G-250 法,以牛血清蛋白作标准。另 *TrxR2* 活性由 *Trx2* 催化的、依赖于 NADPH 的 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 中二硫键的还原来表示,故按照邹宁等^[7]和 Holmgren 等^[8]介绍的方法(DTNB 法)测定 *TrxR2* 活性。根据以下公式计算: $\text{TrxR2 活性} = \Delta A_{412 \text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1} \div (13.6 \text{ nmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \times 150 \mu\text{L} \cdot 900 \mu\text{L}^{-1}$ 。

1.9 数据处理

应用 SPSS 统计分析软件统计各组的试验数据,通过 Duncan's 新复极差检验法(DMRT 法)比较组间的差异。

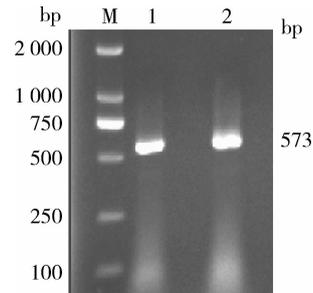
2 结果及分析

2.1 总 RNA 提取结果

抽提的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳,呈现 28S、18S 和 5S 清晰条带,紫外分光光度测定表明 $A_{260}/A_{280} > 1.8$,表明提取的总 RNA 完整且纯度较好。

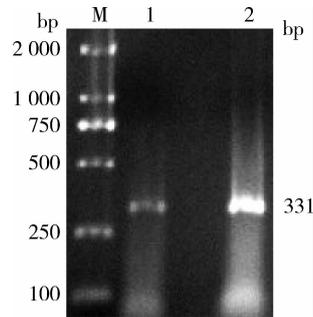
2.2 RT-PCR 扩增结果

目的基因 *TrxR2* 和内参基因 βactin 的 RT-PCR 结果见图 1,图 2。



1,2. RT-PCR 扩增产物;M. DL2000 相对分子质量标准
1,2. RT-PCR products; M. DL2000 DNA Marker
图 1 *TrxR2* RT-PCR 产物电泳结果

Fig. 1 RT-PCR product of *TrxR2* gene in liver



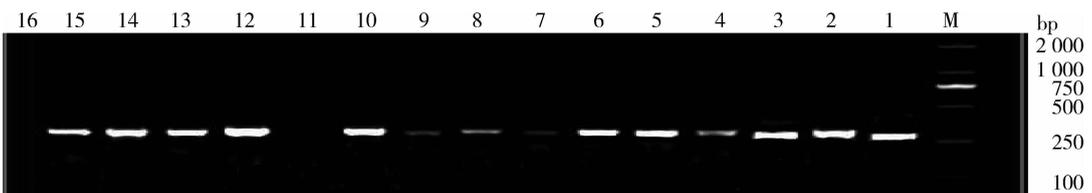
1,2. RT-PCR 扩增产物;M. DL2000 相对分子质量标准
1,2. RT-PCR products; M. DL2000 DNA Marker
图 2 βactin RT-PCR 产物电泳结果

Fig. 2 RT-PCR product of βactin gene in liver

2.3 RT-PCR 产物的测序结果

TrxR2、 βactin 基因产物经回收后经生物公司进行序列测定,结果表明(图 3)所扩增产物与 NCBI 上发表的基因核酸序列一致,经 DNA STAR 分析,同源性分别为 96.2% 和 100%。

2.4 肝脏 *TrxR2* 和 βactin 在不同试验时间时的表达结果(图 3-8)



M. DL2000 相对分子质量标准; 1~4. I 组; 5~8. II 组; 9~12. III 组; 13~16. IV 组。下同

M. DL2000 DNA Marker; 1-4. Group I; 5-8. Group II; 9-12. Group III; 13-16. Group IV. The same as below

图 3 试验第 10 天时,4 组 βactin mRNA 的 RT-PCR 结果

Fig. 3 On the 10th day, four test groups of RT-PCR product of βactin mRNA in liver

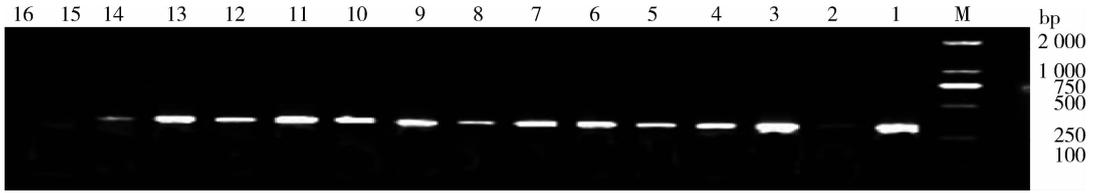


图 4 试验第 30 天时, 4 组 β -actin mRNA 的 RT-PCR 结果

Fig. 4 On the 30th day, four test groups of RT-PCR product of β -actin mRNA in liver

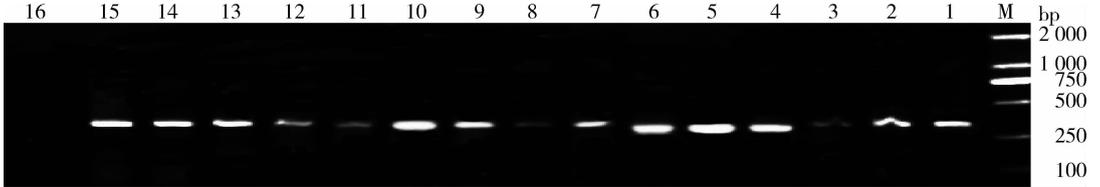


图 5 试验第 50 天时, 4 组 β -actin mRNA 的 RT-PCR 结果

Fig. 5 On the 50th day, four test groups of RT-PCR product of β -actin mRNA in liver

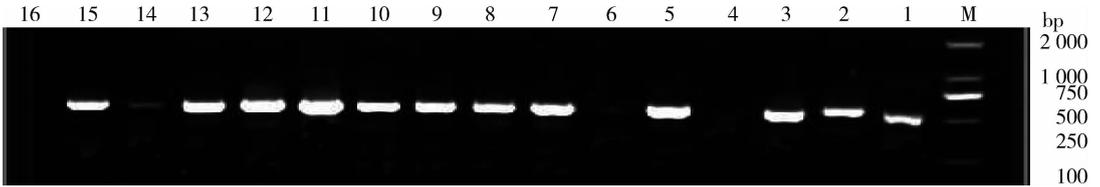


图 6 试验第 10 天时, 4 组 $TrxR2$ mRNA 的 RT-PCR 结果

Fig. 6 RT-PCR product of $TrxR2$ mRNA in liver for the 10th day at four test groups

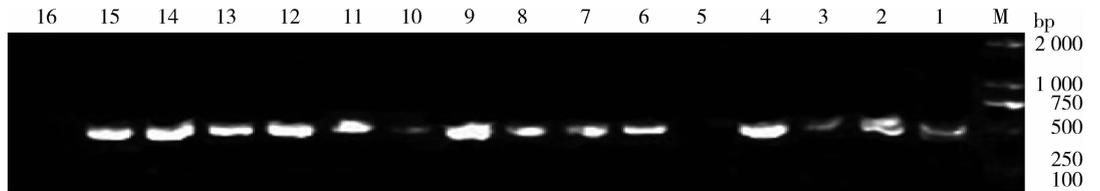


图 7 试验第 30 天时, 4 组 $TrxR2$ mRNA 的 RT-PCR 结果

Fig. 7 RT-PCR product of $TrxR2$ mRNA in liver for the 30th day at four test groups

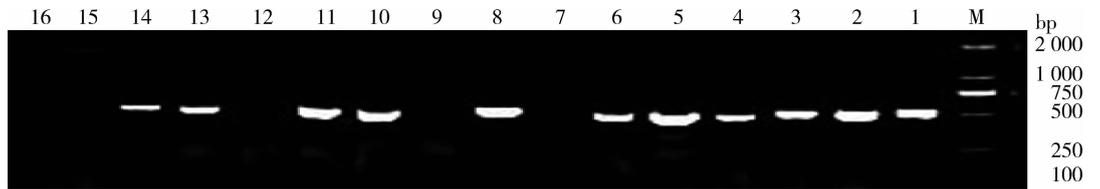


图 8 试验第 50 天时, 4 组 $TrxR2$ mRNA 的 RT-PCR 结果

Fig. 8 RT-PCR product of $TrxR2$ mRNA in liver for the 50th day at four test groups

2.5 高铜日粮对 $TrxR2$ 基因 mRNA 表达的影响

组间比较, 与 I 组相比, 对应试验时间下, IV 组 50 d 时 $TrxR2$ mRNA 基因表达量降低, 且差异显著 ($P < 0.05$), 其余组别在试验时间内比较差异不

显著 ($P > 0.05$); 组内比较, I、II、III 组在 30、50 d 较该组 10 d 时 $TrxR2$ mRNA 基因表达量升高, 但差异不显著 ($P > 0.05$), IV 组 30、50 d 较该组 10 d 时 $TrxR2$ mRNA 基因表达量降低, 且 50 d 时差异显著 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 高铜日粮对 *TrxR2* 基因 mRNA 表达的影响Table 2 Effect of high-level copper diet on expression of *TrxR2* mRNA

| 组别 Group | 处理时间/d Treatment time | | |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 10 | 30 | 50 |
| I | 0.98±0.09 ^{Aa} | 1.01±0.13 ^{Aa} | 1.09±0.18 ^{Aa} |
| II | 0.99±0.11 ^{Aa} | 1.04±0.18 ^{Aa} | 1.13±0.15 ^{Aa} |
| III | 1.03±0.15 ^{Aa} | 1.06±0.21 ^{Aa} | 1.17±0.24 ^{Aa} |
| IV | 1.11±0.19 ^{Aa} | 1.02±0.08 ^{Aa} | 0.80±0.09 ^{Bb} |

同行大写字母相同者表示差异不显著($P>0.05$),不同者表示差异显著($P<0.05$);同列小写字母相同者表示差异不显著($P>0.05$),不同者表示差异显著($P<0.05$)。下同

In the same row, the same capital superscript means no significant difference ($P<0.05$), the different capital superscripts mean significant difference; In the same column, the same lowercase superscript means no significant difference, the different lowercase superscripts mean significant difference. The same as below

2.6 高铜日粮对 *TrxR2* 还原活性的影响

组间比较,与 I 组相比,对应试验时间下,III 组 30 d 时 *TrxR2* mRNA 基因表达量升高,且差异显著($P<0.05$),IV 组 50 d 时 *TrxR2* mRNA 基因表达量降低,且差异显著($P<0.05$),其余组别在试验时间内比较差异不显著($P>0.05$);组内比较,III 组 30 d 较该组 10 d 时 *TrxR2* mRNA 基因表达量升高,且差异显著($P<0.05$),IV 组 50 d 较该组 10 d 时 *TrxR2* mRNA 基因表达量降低,且差异显著($P<0.05$),其余各组组内组在试验时间内比较差异不显著($P>0.05$),见表 3。

表 3 高铜日粮对 *TrxR2* 活性的影响Table 3 Effect of high-level copper diet on the reduction activity of *TrxR2*

| 组别 Group | 处理时间/d Treatment time | | |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 10 | 30 | 50 |
| I | 13.27±1.45 ^{Aa} | 13.50±1.17 ^{Aa} | 13.61±1.39 ^{Aa} |
| II | 13.43±1.46 ^{Aa} | 14.75±2.23 ^{Aa} | 16.39±1.88 ^{Aa} |
| III | 14.21±1.53 ^{Aa} | 20.73±2.31 ^{Bb} | 14.86±1.34 ^{Aa} |
| IV | 15.46±2.02 ^{Aa} | 12.68±1.26 ^{Aa} | 7.34±0.99 ^{Bb} |

3 讨论

机体铜过量时,二价铜离子能与细胞膜的巯基结合而使细胞膜脂质过氧化^[9],同时,铜能够使氧化还原剂构象重排而使其活性受到抑制^[10-11],导致抗氧化酶活性降低。而氧自由基(ROS)对机体的损

伤主要是其攻击生物膜磷脂中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用。线粒体硫氧还蛋白系统是调节 ROS 水平的主要酶系统,对于线粒体内的氧化还原的功能调节尤为重要^[12]。肝脏 Trx2 系统能够清除线粒体内自由基、保持正常的氧化还原状态。本课题前期研究发现,高铜饲料能不仅导致肉鸡肝脏损伤,更能导致肝脏线粒体抗氧化性能降低。本试验应用半定量 RT-PCR 方法对高铜饲喂肉鸡肝脏中 *TrxR2* mRNA 表达水平进行定量测定,应用 DTNB 法测定 *TrxR2* 酶活性,以探讨肝脏 *TrxR2* 基因在试验性铜中毒中表达状况,从分子水平揭示铜中毒对 *TrxR2* 的损害作用。

试验结果表明,采用高铜日粮饲喂本试验鸡后,*TrxR2* mRNA 表达水平和酶活性在不同组别不同时期有一定的变化趋势。I、II 组随着试验时间的进行 *TrxR2* 的活性升高,基因表达量也升高,说明饲料中铜含量在 $110 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时能够提高肝脏 *TrxR2* 的基因表达量和活性,从而增强肝脏的抗氧化性能、提高线粒体呼吸功能^[13],进而提高肉鸡的生长性能^[14]。

III 组在 30 d 时酶活性升高($P<0.05$),50 d 时降低,但是该组基因表达量一直升高,50 d 时升高到最大值,这要归咎于机体的代偿机制,高铜饲料($330 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)饲喂一段时间以后(30 d 左右)肝脏铜含量过高。铜在其氧化状态下促使机体产生 ROS,降低细胞抗氧化能力^[15],进而线粒体中的抗氧化系统功能降低,机体为了抵抗高铜带来的损伤而代偿性的提高 *TrxR2* 的活性,以大量还原氧化型 Trx2 而达到修复肝脏 Trx2 系统的作用;同样,为了抵御 *TrxR2* 活性的降低,机体的基因表达量还是升高的,双重作用以是维持 Trx2 系统的氧化还原作用。

肉鸡在饲喂含铜量为 $550 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的饲料 10 d 时,基因表达量和酶活性均升高,说明短时间内该剂量铜能够导致 *TrxR2* 基因表达量和还原活性升高。但是随着饲喂时间的延长,该两项指标均降低,50 d 时该两项指标降至该组最低值($P<0.05$),说明机体出现损伤,高铜产生的氧自由基损伤机体抗氧化系统,同时受损的抗氧化系统难以清除机体的过氧化产物,形成恶性循环,最终导致肝脏 Trx2 系统受损,致使 *TrxR2* 基因 mRNA 的表达量降低,还原活性降低。

参考文献:

- [1] GOODE H F, WEBSTER N R. Free radicals and antioxidants in sepsis[J]. *Crit Care Med*, 1993, 21: 1770-1776.
- [2] SONG J J, LEE Y J. Differential role of glutaredoxin and thioredoxin in metabolic oxidative stress induced activation of apoptosis signal regulating kinase 1 [J]. *Biochem J*, 2003, 373(Pt 3): 845-853.
- [3] MIRANDA-VIZUETE A, DAMDIMOPOULOS A E. cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the mouse mitochondrial thioredoxin reductase gene[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1447: 113-118.
- [4] 曹华斌, 苏荣胜, 唐兆新. 铜对肉鸡肝细胞线粒体膜通透性及呼吸的影响[J]. *中国兽医科学*, 2007, 4: 342-345.
- [5] TANG Z, IQBAL M, CAWTHON D. Heart and breast muscle mitochondrial dysfunction in Pulmonary hypertension syndrome in broilers (*Gallus domesticus*) [J]. *Comp Biochem and Physiol A*, 2002, 132(3): 527-540.
- [6] JOHNSON D, LARDY H. Isolation of liver or kidney mitochondria [J]. *Methods Enzymol*, 1967, 10: 94-96.
- [7] 邹宁, 赵文然, 藤宗艳, 等. 低硒大鼠心肌线粒体型硫氧还蛋白还原酶的活性和表达[J]. *中国地方病学杂志*, 2004, 23(3): 213-215.
- [8] HOLMGREN A, BJOMSTEDT M. Thioredoxin and thioredoxin reductase [J]. *Methods Enzymol*, 1995, 252: 199-208.
- [9] MAGDALENA L, KATARAYNA M, ANETA B, et al. Interactions of free copper (II) ions alone or in complex with iron (III) ions with erythrocytes of marine fish *Dicentrarchus labrax* [J]. *Cell Biol Int*, 2009, 33: 941-948.
- [10] BRZYSKA M, TRZESNIEWSKA K, WIECKOWSKA A, et al. Electrochemical and conformational consequences of copper (Cu^{I} and Cu^{II}) binding to β -amyloid(1-40) [J]. *ChemBio Chem*, 2009, 10: 1045-1055.
- [11] FREEMAN B A, CRAPO J D. Biology of disease: free radicals and tissue injury [J]. *Lab Invest*, 1982, 47(6): 412-426.
- [12] RUNDLO F A K, ARNER E S. Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2004, 6: 41-52.
- [13] 郭剑英, 曹华斌, 苏荣胜, 等. 高铜日粮对肉鸡肝细胞线粒体呼吸功能的影响 [J]. *中国家禽*, 2008, 30(11): 11-14.
- [14] BRAUDE R. Some observations on the need for copper in the diet of fattening pigs [J]. *J Agricul Sci*, 1945, 35: 163-171.
- [15] WU T M, HSU Y T, SUNG M S. Expression of genes involved in redox homeostasis and antioxidant defense in a marine macroalga *Ulva fasciata* by excess copper [J]. *Aquatic Toxicol*, 2009, 94: 275-285.

(编辑 朱绯)