

中图分类号_____

学校代码_____10224

密 级_____公开

学 号_____1506079

東北農業大學

博士学位论文

硒蛋白 S 调控溶酶体稳态在鸡缺硒性小脑神经元凋亡中作用机理的研究

作 者_____赵霞

导 师_____徐世文 教授

学位类别_____农学博士

所在学院_____动物医学学院

一级学科_____兽医学

二级学科_____临床兽医学

二〇二一年六月

Classified Index:

Code: 10224

Confidential (yes/no): no

No. 1506079

Dissertation for the Doctoral Degree

Role of Selenoprotein S Regulating Lysosomal Homeostasis in Cerebellar Neuronal Apoptosis Induced by Selenium Deficiency in Chicken

Candidate: Zhao Xia

Supervisor: Prof. Xu Shiwen

Degree Category: Doctor of Agriculture

College: Veterinary Medicine

First level discipline: Veterinary Medicine

Second level discipline: Clinical Veterinary Medicine

Harbin China

June 2021

目 录

摘要	I
英文摘要	III
1 前言	1
1.1 硒与神经系统的研究进展	1
1.1.1 脑中硒分布	1
1.1.2 硒及硒蛋白研究进展	1
1.1.3 硒对神经系统的保护作用	3
1.1.4 缺硒对神经系统的影响	4
1.2 硒蛋白 S (SELS) 与神经系统损伤研究进展	4
1.2.1 SELS 的结构和组织分布	4
1.2.2 SELS 的功能	5
1.2.3 SELS 在神经系统中的作用	8
1.3 溶酶体与神经系统疾病关系的研究进展	8
1.3.1 溶酶体功能障碍与自噬流抑制	9
1.3.2 溶酶体膜通透化与细胞凋亡	9
1.3.3 硒与溶酶体稳态研究进展	10
1.3.4 溶酶体稳态与神经系统疾病	10
1.4 研究目的与意义	11
2 材料与方法	12
2.1 主要仪器与试剂	12
2.1.1 主要仪器	12
2.1.2 主要试剂	13
2.2 试验方法	14
2.2.1 动物模型的建立及样本采集	14
2.2.2 鸡胚胎神经元的分离纯化及鉴定	14
2.2.3 鸡胚胎神经元缺硒模型的建立	15
2.2.4 鸡胚胎神经元 SELS 敲低模型的建立及处理	15
2.2.5 鸡小脑组织病理组织学观察	16
2.2.6 鸡小脑组织凋亡的 TUNEL 法检测	17
2.2.7 鸡胚胎神经元凋亡的流式细胞术检测	17
2.2.8 鸡小脑组织中金属离子水平检测	17
2.2.9 鸡小脑组织 mRNA 转录组的检测	17
2.2.10 鸡胚胎神经元 ROS 水平的检测	18
2.2.11 鸡胚小脑组织中及脑神经元抗氧化水平的检测	18
2.2.12 鸡胚胎神经元溶酶体 pH 检测	18
2.2.13 鸡小脑组织及鸡胚胎神经元中溶酶体的提取	18

2.2.14 鸡小脑组织中溶酶体标志酶活性的检测	19
2.2.15 鸡小脑组织及脑神经元免疫荧光检测	19
2.2.16 鸡小脑组织及鸡胚脑神经元中 RNA 提取及 RT-PCR 检测	19
2.2.17 鸡小脑组织及鸡胚脑神经元总蛋白提取及 Western Blot 检测	21
2.2.18 鸡小脑组织及鸡胚脑神经元硒蛋白 S (SELS) 及内质网应激的检测	23
2.2.19 鸡小脑组织及鸡胚脑神经元中溶酶体相关基因的检测	23
2.2.20 鸡小脑组织及鸡胚脑神经元中自噬流基因检测	23
2.2.21 鸡小脑组织及鸡脑神经元中凋亡基因检测	23
2.3 试验数据的统计与分析	24
3 结果与分析	25
3.1 缺硒鸡小脑组织相关指标检测结果	25
3.1.1 缺硒鸡小脑组织病理结构观察结果	25
3.1.2 缺硒鸡小脑组织凋亡的 TUNEL 法检测结果	27
3.1.3 缺硒鸡小脑组织金属离子水平检测结果	28
3.1.4 缺硒鸡小脑组织 mRNA 转录组检测结果	29
3.1.5 缺硒鸡小脑组织 SELS 表达及内质网应激指标检测结果	31
3.1.6 缺硒鸡小脑组织抗氧化水平检测结果	31
3.1.7 缺硒鸡小脑组织溶酶体稳态检测结果	32
3.1.8 缺硒鸡小脑组织自噬流检测结果	35
3.1.9 缺硒鸡小脑组织凋亡检测结果	36
3.2 缺硒鸡胚神经元相关指标检测结果	37
3.2.1 鸡胚脑神经元形态学观察结果	37
3.2.2 鸡胚脑神经元的鉴定	37
3.2.3 缺硒鸡胚脑神经元形态观察结果	38
3.2.4 缺硒鸡胚脑神经元硒蛋白表达检测结果	38
3.2.5 缺硒鸡胚脑神经元 SELS 及内质网应激检测结果	40
3.2.6 缺硒鸡胚脑神经元 ROS 水平及抗氧化能力检测结果	41
3.2.7 缺硒鸡胚脑神经元溶酶体稳态检测结果	42
3.2.8 缺硒鸡胚脑神经元自噬流检测结果	45
3.2.9 缺硒鸡胚脑神经元凋亡检测结果	45
3.3 SELS 敲低鸡胚脑神经元相关指标检测结果	47
3.3.1 鸡胚脑神经元 SELS 敲低模型的建立	47
3.3.2 SELS 敲低鸡胚脑神经元细胞形态观察结果	47
3.3.3 SELS 敲低鸡胚脑神经元内质网定位硒蛋白及内质网应激检测结果	48
3.3.4 SELS 敲低鸡胚脑神经元 ROS 水平及抗氧化能力检测结果	48
3.3.5 SELS 敲低鸡胚脑神经元溶酶体稳态检测结果	50
3.3.6 SELS 敲低鸡胚脑神经元自噬流检测结果	54
3.3.7 SELS 敲低鸡胚脑神经元凋亡检测结果	54

3.4 NAC 处理 SELS 敲低鸡胚脑神经元相关指标检测结果	56
3.4.1 NAC 处理 SELS 敲低鸡胚脑神经元 ROS 检测结果	56
3.4.2 NAC 处理 SELS 敲低鸡胚脑神经元溶酶体稳检测结果	57
3.4.3 NAC 处理 SELS 敲低鸡胚脑神经元自噬流检测结果	59
3.4.4 NAC 处理 SELS 敲低鸡胚脑神经元凋亡检测结果	60
3.5 E-64 处理 SELS 敲低鸡胚脑神经元相关指标检测结果	62
3.5.1 E-64 处理 SELS 敲低鸡胚脑神经元胞浆 CTSD 检测结果	62
3.5.2 E-64 处理 SELS 敲低鸡胚脑神经元凋亡检测结果	62
3.6 Pepstatin A 处理 SELS 敲低鸡胚脑神经元相关指标检测结果	63
3.6.1 Pepstatin A 处理 SELS 敲低鸡胚脑神经元胞浆 CTSD 检测结果	63
3.6.2 Pepstatin A 处理 SELS 敲低鸡胚脑神经元凋亡检测结果	64
4 讨论	66
4.1 鸡缺硒性小脑损伤、鸡胚脑神经元缺硒及 SELS 敲低模型的建立	66
4.1.1 鸡缺硒性小脑损伤模型的建立	66
4.1.2 鸡胚脑神经元培养条件优化及缺硒模型建立	67
4.1.3 硒对 SELS 表达的影响及 SELS 敲低鸡胚脑神经元模型的建立	67
4.2 缺硒对鸡小脑金属离子稳态的影响	68
4.3 缺硒对鸡小脑 mRNA 转录组学的影响	69
4.4 SELS 对脑神经元内质网应激的影响	70
4.5 SELS 对脑神经元抗氧化能力的影响	70
4.6 SELS 对脑神经元溶酶体稳态的影响	71
4.7 SELS 对脑神经元自噬流的影响	73
4.8 SELS 对脑神经元细胞凋亡的影响	74
5 结论	76
致谢	77
参考文献	78
附录	94
攻读博士学位期间发表的学术论文	100

CONTENTS

Abstract in Chinese	I
Abstract	III
1 Introduction	1
1.1 Research progress of selenium and nervous system	1
1.1.1 Distribution of selenium in brain	1
1.1.2 Research progress of selenium and selenoprotein	1
1.1.3 Protective effect of selenium on nervous system	3
1.1.4 Effects of selenium deficiency on nervous system	4
1.2 Research progress of selenoprotein S (SELS).....	4
1.2.1 Structure and tissue distribution of SELS.....	4
1.2.2 The function of SELS	5
1.2.3 The role of SELS in nervous system	8
1.3 Research Progress on the relationship between lysosomes and nervous system diseases	8
1.3.1 Lysosomal dysfunction and autophagic flux inhibition	9
1.3.2 Lysosomal membrane permeability and apoptosis.....	9
1.3.3 Research progress of selenium and lysosomal homeostasis	10
1.3.4 Lysosomal homeostasis and nervous system diseases	10
1.4 Research purpose and significance	11
2 Materials and methods	12
2.1 Main instruments and reagents	12
2.1.1 Main instruments	12
2.1.2 Main reagents	13
2.2 Methods	14
2.2.1 Establishment of animal model and sample collection.....	14
2.2.2 Isolation, purification and identification of chick embryo brain neurons	14
2.2.3 Establishment of Se-deficient model of chick embryo brain neurons.....	15
2.2.4 Establishment and treatment of SELS knockdown model of chick embryo brain neurons	15
2.2.5 Histopathological observation of chicken cerebellum.....	16
2.2.6 Tunel detection in chicken cerebellum	17
2.2.7 Apoptosis flow pattern detection of chick embryo brain neurons.....	17
2.2.8 Detection of metal ion level in chicken cerebellum	17
2.2.9 Detection of mRNA transcriptome in chicken cerebellum	17
2.2.10 Detection of ROS level in chick embryo brain neurons	18
2.2.11 Detection of antioxidant level in chicken cerebellum and chick embryo brain neurons	18

2.2.12 Detection of lysosomal pH in chick embryo brain neurons.....	18
2.2.13 Extraction of lysosomes from chicken cerebellum and chick embryo brain neurons...	18
2.2.14 Detection of lysosomal marker enzyme activity in chicken cerebellum	19
2.2.15 Immunofluorescence detection of chicken cerebellum and chick embryo brain neurons	19
2.2.16 RNA extraction from chicken cerebellum and chick embryo brain neurons and RT-PCR detection	19
2.2.17 Total protein extraction from chicken cerebellum and chick embryo brain neurons and Western Blot detection	21
2.2.18 Detection of selenoprotein S (SELS) and endoplasmic reticulum stress in chicken cerebellum and chick embryo brain neurons	23
2.2.19 Detection of lysosome related genes in chicken cerebellum and chick embryo brain neurons	23
2.2.20 Detection of autophagic flux genes in chicken cerebellum and chick embryo brain neurons	23
2.2.21 Detection of apoptosis genes in chicken cerebellum and chick embryo brain neurons	23
2.3 Statistics and analysis of data.....	24
3 Results and analysis	25
3.1 Detection results of related indexes in Se-deficient chickens cerebellum.....	25
3.1.1 Observation on pathological structure of Se-deficient chickens cerebellum.....	25
3.1.2 Tunel detection results of Se-deficient chickens cerebellum.....	27
3.1.3 Detection results of metal ions in Se-deficient chickens cerebellum.....	28
3.1.4 Detection results of mRNA transcriptome in Se-deficient chickens cerebellum.....	29
3.1.5 Detection results of SELS expression and endoplasmic reticulum stress in Se-deficient chickens cerebellum	31
3.1.6 Detection results of antioxidant level in Se-deficient chickens cerebellum	31
3.1.7 Detection results of lysosome homeostasis in Se-deficient chickens cerebellum	32
3.1.8 Detection results of autophagic flux in Se-deficient chickens cerebellum.....	35
3.1.9 Detection results of apoptosis in Se-deficient chickens cerebellum	36
3.2 Detection results of related indexes in Se-deficient chick embryo brain neurons	37
3.2.1 Morphological observation of chick embryo brain neurons	37
3.2.2 Identification of chick embryo brain neurons	37
3.2.3 Morphological observation of Se-deficient chick embryo brain neurons	38
3.2.4 Detection results of selenoproteins expression in Se-deficient chick embryo brain neurons	38
3.2.5 Detection results of SELS and endoplasmic reticulum stress in Se-deficient chick embryo brain neurons	40
3.2.6 Detection results of ROS level and antioxidant capacity in Se-deficient chick embryo	

brain neurons	41
3.2.7 Detection results of lysosomal homeostasis in Se-deficient chick embryo brain neurons	42
3.2.8 Detection results of autophagic flux in Se-deficient chick embryo brain neurons	45
3.2.9 Detection results of apoptosis in Se-deficient chick embryo brain neurons	45
3.3 Detection results of related indexes in SELS knockdown chick embryo brain neurons	47
3.3.1 Establishment of SELD knockdown model in chick embryo brain neurons	47
3.3.2 Morphological observation of SELS knockdown chick embryo brain neurons	47
3.3.3 Detection of endoplasmic reticulum localization selenoproteins and endoplasmic reticulum stress in SELS knockdown chick embryo brain neurons	48
3.3.4 Detection results of ROS level and antioxidant capacity in SELS knockdown chick embryo brain neurons	48
3.3.5 Detection results of lysosomal homeostasis in SELS knockdown chick embryo brain neurons	50
3.3.6 Detection results of autophagic flux in SELS knockdown chick embryo brain neurons	54
3.3.7 Detection results of apoptosis in SELS knockdown chick embryo brain neurons	54
3.4 Detection results of related indexes in SELS knockdown chick embryo brain neurons treated with NAC	56
3.4.1 Detection results of ROS level in SELS knockdown chick embryo brain neurons treated with NAC	56
3.4.2 Detection results of lysosomal homeostasis in SELS knockdown chick embryo brain neurons treated with NAC	57
3.4.3 Detection results of autophagic flux in SELS knockdown chick embryo brain neurons treated with NAC	59
3.4.4 Detection results of apoptosis in SELS knockdown chick embryo brain neurons treated with NAC	60
3.5 Detection results of related indexes in SELS knockdown chick embryo brain neurons treated with E-64	62
3.5.1 Detection results of CTSB in cytoplasm in SELS knockdown chick embryo brain neurons treated with E-64	62
3.5.2 Detection results of apoptosis E-64 in SELS knockdown chick embryo brain neurons treated with E-64	62
3.6 Detection results of related indexes in SELS knockdown chick embryo brain neurons treated with Pepstatin A	63
3.6.1 Detection results of CTSD in cytoplasm in SELS knockdown chick embryo brain neurons treated with Pepstatin A	63
3.6.2 Detection results of apoptosis E-64 in SELS knockdown chick embryo brain neurons treated with Pepstatin A	64

4 Discussion	66
4.1 Establishment of Se-deficient cerebellar injury, Se-deficient and SELS knockdown chick embryo brain neurons model	66
4.1.1 Establishment of Se-deficient chickens cerebellar injury model	66
4.1.2 Optimization of culture conditions of chick embryo brain neurons and establishment of Se-deficient model	67
4.1.3 Effect of selenium on SELS expression and establishment of SELS knockdown model of chick embryonic brain neurons	67
4.2 Effects of Se-deficiency on metal ion homeostasis in chicken cerebellum	68
4.3 Effects of Se-deficiency on mRNA transcriptomics in chickens cerebellum	69
4.4 Effect of SELS on endoplasmic reticulum stress in brain neurons	70
4.5 Effect of SELS on antioxidant capacity in brain neurons	70
4.6 Effect of SELS on lysosomal homeostasis in brain neurons	71
4.7 Effect of SELS on autophagic flux in brain neurons	73
4.8 Effect of SELS on apoptosis in brain neurons	74
5 Conclusion	76
Acknowledgement	77
References	78
Appendix	94
Papers published in the period of Ph.D. education	100

独 创 声 明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含未获得_____

(注：如没有其他需要特别声明的，本栏可空)或其他教育机构的学位或证书使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：赵霞

日期：2021年6月13日

学位论文授权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权学校可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名：赵霞

日期：2021年6月13日

导 师 签 名：王世之

日期：2021年06月13日

摘要

硒 (Selenium, Se) 是人和动物所必需的微量元素, 广泛参与到机体的众多生物学过程中, 发挥多种重要的生物学功能, 研究表明缺硒可引起脑组织损伤。硒蛋白 S (SELS) 作为内质网定位硒蛋白之一, 在保护脑损伤中发挥重要作用, 高表达 SELS 可通过减轻内质网应激和炎症损伤来减轻脑损伤, 抑制 SELS 表达则会加重脑损伤。溶酶体作为细胞“消化中心”在维持细胞内稳态发挥关键作用, 许多退行性神经疾病都存在溶酶体功能紊乱。研究发现缺硒可引起溶酶体稳定性和 SELS 表达降低。然而溶酶体稳态失衡是否参与缺硒性脑损伤, SELS 是否调控溶酶体功能及稳态尚不清楚。基于此, 提出缺硒通过降低 SELS 表达调控溶酶体稳态失衡引起小脑细胞凋亡的科学假设。为阐明这一假设, 本研究在建立鸡缺硒性小脑损伤模型、缺硒鸡胚胎脑神经元模型、SELS 敲低鸡胚胎脑神经元模型及氧化应激抑制剂 N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC)、CTSB 抑制剂 E-64 及 CTSD 抑制剂 Pepstatin A 处理 SELS 敲低鸡胚胎脑神经元模型基础上, 应用 ICP-MS 法、病理组织学观察、免疫荧光、Tunel、转录组学、RT-PCR、Western Blot 及流式细胞术等方法, 对金属离子稳态、病理形态学、mRNA 转录组、抗氧化水平 (CAT、GSH-Px、SOD、T-AOC、ROS、H₂O₂、LPO 及 MDA)、内质网应激相关指标 (GRP78、IRE1、XBP1、PERK、ATF4 和 ATF6)、溶酶体相关指标 (pH、ATP6V1A、ATP6V1B2、ATP6V1D、CTSB、CTSD 及 MCOLN1) 及自噬相关指标 (LC3-2、P62)、凋亡、凋亡相关指标 (BCL2、BAX、CAS9 及 CAS3) 等进行检测, 结果表明:

(1) 病理组织学观察显示缺硒导致小脑颗粒层变薄, 小脑白质增多, 浦肯野细胞减少甚至消失、嗜酸性浦肯野细胞增多, 浦肯野细胞层中神经纤维堆积缠结, 颗粒层神经纤维杂乱稀少, 尼氏体数量减少。免疫荧光及 Tunel 结果显示, 缺硒导致小脑 α -syn 聚集及细胞凋亡。

(2) 金属离子检测结果显示, 缺硒导致鸡小脑组织中 K、Fe、Zn、B、Ni、Hg 和 Sb 含量降低, Ca、Cr、Mo、V 和 Cd 含量增加, 揭示缺硒影响鸡小脑组织中金属离子稳态。

(3) mRNA 转录组分析显示, 缺硒导致小脑组织中 421 个基因差异表达, 其中 171 个表达上调, 250 个表达下调, GO 及 KEGG 富集分析发现差异变化基因与神经功能、抗氧化、金属离子、溶酶体及凋亡等密切相关。

(4) 缺硒引起小脑及脑神经元 SELS mRNA 和蛋白表达水平降低, 内质网应激相关基因 GRP78、XBP1、ATF4 和 ATF6 mRNA 表达水平, GRP78、IRE1、XBP1、PERK、ATF4 和 ATF6 的蛋白表达水平升高, 敲低 SELS 导致鸡胚胎脑神经元内质网硒蛋白 SELN 和 DIO2 的 mRNA 水平升高, SELT 和 SEP15 的 mRNA 水平降低, 同时升高 GRP78、IRE1、XBP1、PERK、ATF4 和 ATF6 的蛋白表达水平, 表明 SELS 表达降低可引起脑神经元内质网应激。

(5) 缺硒导致小脑及脑神经元抗氧化酶 CAT、GSH-Px 和 T-AOC 活性减弱, ROS、H₂O₂、LPO 及 MDA 含量增加, 敲低 SELS 降低了脑神经元抗氧化酶活性, 自由基及脂质过氧化物含量增加, 表明 SELS 表达降低导致脑神经元氧化应激。

(6) 缺硒抑制小脑和脑神经元溶酶体 V-ATPase、CTSB 及 CTSD 蛋白表达, MCOLN1 和胞浆中 CTSB 及 CTSD 蛋白表达水平升高, SELS 敲低同样引起脑神经元上述指标发生相

似变化, NAC 有效缓解 SELS 表达降低引起的溶酶体变化, 表明 SELS 表达降低通过氧化应激引起溶酶体酸化受阻、酶活性降低、钙离子释放及溶酶体膜通透化, 导致溶酶体稳态失衡。

(7) 缺硒引起小脑和脑神经元自噬标记物 LC3-2 和 P62 蛋白表达水平升高, SELS 敲低同样诱导 LC3-2 和 P62 蛋白表达水平升高, NAC 有效恢复溶酶体稳态的同时, 缓解了 SELS 敲低引起的 LC3-2 和 P62 蛋白表达升高, 表明 SELS 表达降低通过溶酶体功能障碍抑制自噬底物降解, 引起自噬小体蓄积, 自噬流抑制。

(8) 缺硒抑制小脑和脑神经元 BCL2 mRNA 及蛋白表达水平, BAX、CAS9 及 CAS3 mRNA 和蛋白表达增加, SELS 敲低同样引起上述指标相似变化, 流式细胞术结果显示缺硒及 SELS 敲低引起脑神经元凋亡细胞增多, ROS 抑制剂 NAC、CTSB 抑制剂 E-64 及 CTSD 抑制剂 Pepstatin A 能缓解 SELS 敲低引起的细胞凋亡, 表明 SELS 表达降低通过自噬流抑制、CTSB 和 CTSD 泄露, 引起细胞线粒体途径凋亡。

综上所述, 缺硒导致鸡小脑金属离子稳态失衡, 细胞发生线粒体途径凋亡, 诱导 171 个 mRNA 表达上调, 250 个 mRNA 表达下调, 并与神经功能、抗氧化、金属离子、溶酶体及凋亡等相关。缺硒导致 SELS 表达水平降低, 进一步研究表明, SELS 表达降低引起内质网应激, 促进 ROS 积累, 导致氧化应激, 引起溶酶体稳态失衡, 引发自噬流抑制, 最终导致细胞凋亡。上述结果表明 SELS 调控溶酶体稳态诱导鸡缺硒性小脑神经元凋亡, 这一结果丰富了缺硒性小脑损伤的分子机制, 为进一步研究提供参考。

关键词: 鸡小脑; 硒蛋白 S; 氧化应激; 溶酶体; 细胞凋亡

Role of Selenoprotein S Regulating Lysosomal Homeostasis in Selenium Deficient Cerebellar Neuronal Apoptosis in Chicken

Abstract

Selenium (Se) is an essential trace element for humans and animals. It is widely involved in many biological processes and plays a variety of important biological functions. Studies has shown that Se deficiency can cause brain damage. Selenoprotein S (SELS), as one endoplasmic reticulum localized selenoprotein, plays an important role in the protection of brain injury. Highly expressed SELS can relieve brain injury by alleviating endoplasmic reticulum stress and inflammatory stimulus, however, inhibition of SELS expression may aggravate the brain injury. Lysosomes, as the "digestive center" of cells, play a key role in maintaining intracellular homeostasis through degrading and removing intracellular harmful substances. It's found that many degenerative neurological diseases are accompanied by lysosomal dysfunction. Se deficiency could decrease lysosomal stabilization and SELS expression. However, whether the imbalance of lysosomal homeostasis is involved in Se deficiency-caused cerebellar injury, and whether SELS regulates lysosomal function and homeostasis are still unclear. Based on it, we propose a scientific hypothesis that Se deficiency can mediate the lysosome imbalance and induce apoptosis through reducing SELS expression in cerebellar cells. To clarify this hypothesis, we established the Se deficient chicken cerebellar injury model, Se deficient chick embryo brain neuron model, SELS knockdown chick embryo brain neuron model and treated with the oxidative stress inhibitor N-acetyl-L-cysteine (NAC), the CTSB inhibitor E-64 and the CTSD inhibitor Pepstatin A respectively. And based on these models, ICP-MS, histopathological observation, immunofluorescence, TUNEL staining, transcriptome, RT-PCR, Western blot and flow cytometry were performed; metal ion homeostasis, pathomorphology, mRNA transcriptome, antioxidant levels (CAT, GSH-Px, SOD, T-AOC, ROS, H₂O₂, LPO and MDA), endoplasmic reticulum stress-related indexes (GRP78, IRE1, XBP1, PERK, ATF4 and ATF6), lysosomal-related indexes (pH, ATP6V1A, ATP6V1B2, ATP6V1D, CTSB and CTSD), autophagy-related indexes (LC3-2 and P62), and apoptosis-related indexes (BCL2, BAX, CAS9 and CAS3) were detected. The results showed that:

(1) Histopathological observation showed that Se deficiency led to the thinning of cerebellum granular layer, increase of cerebellum white matter, decrease or disappearance of Purkinje cells, increase of eosinophilic Purkinje cells, the accumulation and tangle of nerve fibers in the Purkinje cell layer, the disorder of nerve fibers in the granular layer and the decrease of Nissl body.

Immunofluorescence and TUNEL results showed that Se deficiency led to cerebellum α -syn aggregation and apoptosis.

(2) The detection results of metal ions showed that the contents of K, Fe, Zn, B, Ni, Hg and Sb decreased and the contents of Ca, Cr, Mo, V and Cd increased in the cerebellar tissue of chickens under Se deficiency, which indicated that Se deficiency affected the metal ion homeostasis in the cerebellar tissue of chickens.

(3) mRNA transcriptome analysis showed that Se deficiency resulted in the differential expression of 421 genes in the cerebellum, of which 171 genes were upregulated and 250 genes were downregulated. Go and KEGG enrichment analysis showed that the differential genes were closely related to neural function, antioxidation, metal ions, lysosome and apoptosis.

(4) Se deficiency resulted in the decreased expression of SELS at mRNA and protein in the chicken cerebellum and brain neurons, increased mRNA expressions of endoplasmic reticulum stress-related genes GRP78, XBP1, ATF4 and ATF6, and increased protein expressions of GRP78, IRE1, XBP1, PERK, ATF4 and ATF6. Besides, SELS Knockdown led to increased mRNA levels of SELN and DIO2, decreased mRNA levels of SELT and SEP15, and increased protein levels of GRP78, IRE1, XBP1, PERK, ATF4 and ATF6, indicating that the decreased expression of SELS could cause endoplasmic reticulum stress.

(5) Se deficiency decreased the activities of CAT, GSH-PX and T-AOC, increased the contents of ROS, H_2O_2 , LPO and MDA in the cerebellum and brain neurons. SELS Knockdown decreased the activities of antioxidant enzymes and increased the contents of free radicals and lipid peroxidation products in brain neurons, which indicated that the decreased expression of SELS led to oxidative stress in brain neurons.

(6) Se deficiency inhibited the protein expressions of lysosomal V-ATPase, CTSB and CTSD, and increased the expressions of MCOLN1 and cytoplasm CTSB and CTSD in the cerebellum and brain neurons. SELS knockdown also caused similar changes in brain neurons. NAC treatment could effectively alleviate the lysosomal changes caused by decreased SELS expression. These results indicated that the decrease of SELS expression led to the disruption of lysosomal acidification, the decrease of enzyme activity, the release of calcium ion and the permeability of the lysosomal membrane, resulting in the imbalance of lysosomal homeostasis.

(7) Se deficiency increased the expressions of autophagy markers LC3-2 and P62 in the cerebellum and brain neurons. SELS knockdown also increased the expression of LC3-2 and P62. NAC effectively restored lysosomal homeostasis and alleviated the increased expression of LC3-2 and P62 caused by SELS knockdown, which indicated that the decreased expression of SELS inhibited autophagy substrate degradation through lysosomal dysfunction, leading to autophagosome accumulation and autophagic flux inhibition.

(8) Se deficiency inhibited the expression of BCL2 in the cerebellum and brain neurons, and increased the mRNA and protein expressions of BAX, CAS9 and CAS3. SELS knockdown also caused similar changes in the above indexes. Flow cytometry showed that Se deficiency and SELS

knockdown caused the increase of apoptotic cells in brain neurons. Besides, NAC, CTSB inhibitor E-64 and CTSD inhibitor Pepstatin A could alleviate the apoptosis induced by SELS knockdown. These results indicated that the decrease of SELS expression could induce apoptosis via autophagic flux inhibition and leakage of CTSB and CTSD.

In conclusion, Se deficiency led to the imbalance of metal ion homeostasis in the chicken cerebellum, resulted in mitochondrial pathway apoptosis, induced 171 mRNA expression upregulation and 250 mRNA expression downregulation, which were closely related to neural function, antioxidation, metal ions, lysosome and apoptosis. Se deficiency led to the decrease of SELS expression, and further investigations showed that the decrease of SELS expression caused endoplasmic reticulum stress, promoted ROS accumulation, led to oxidative stress, induced imbalance of lysosome homeostasis, inhibited autophagic flux, and finally led to apoptosis. These results indicated that SELS could regulate lysosomal homeostasis and induce apoptosis in Se deficient chicken cerebellar neurons. These results enrich the molecular mechanism of Se deficient cerebellar injury and provide references for further research.

Key words: Chicken cerebellum; Selenoprotein S; Oxidative stress; Lysosome; Apoptosis

Candidate: Zhao Xia

Speciality: Clinical Veterinary Medicine

Supervisor: Prof. Xu Shiwen

1 前言

Berzelius 于 1817 年首次发现硒 (Selenium, Se)。最初, 人们一直认为硒是一种有毒元素。直到 20 世纪 50 年代, 大量的研究表明, 硒是人和动物所必需的微量元素, 广泛参与到机体众多生物学过程中, 发挥多种重要的生物学功能。人和动物主要通过食物来获取硒, 因而机体硒水平与食物中硒含量密切相关。缺硒会导致人克山病、大骨节病, 畜禽白肌病, 禽类渗出性素质等疾病。此外, 大量研究证实, 多种疾病都与缺硒密切相关, 如甲状腺疾病^[1]、妊娠期糖尿病^[2]、心血管疾病^[3]、阿尔茨海默病 (AD) 及帕金森病 (PD) 等神经退行性疾病^[4-6], 这也充分证明硒对机体的重要性^[7]。随着越来越多硒蛋白的发现, 人们对于硒的生物学功能及缺硒对机体的影响和作用机理的研究愈发关注。

1.1 硒与神经系统的研究进展

硒在机体内普遍分布, 近期研究指出, 硒在调节神经系统功能方面发挥着重要的作用, 硒可参与中枢神经系统的多种功能, 如运动能力、协调性、记忆和认知, 表明硒在脑信号传导途径中发挥重要作用^[8]。硒蛋白对维持正常脑功能非常重要, 硒蛋白功能的降低会导致认知功能出现障碍和神经系统紊乱, 适当补充硒可缓解神经退行性疾病的临床症状^[9]。硒也被证实可以有效拮抗重金属和环境毒物对神经系统的损伤^[10, 11]。

1.1.1 脑中硒分布

研究发现, 硒在脑中的分布是不均匀的, 并表现出两个特点, 一是脑区灰质中硒含量往往较高, 而白质中的硒含量则相对低得多; 二是脑中腺体部位的硒含量高于其他区域^[12, 13]。Prohaska 等^[14]通过将生理剂量 $^{75}\text{SeO}_3^{2-}$ 注射到缺硒大鼠中, 发现硒在脑中的生物半衰期约为 45 d, 同位素定位检测发现脑区中硒水平由高至低依次为小脑、皮质和延髓。Trapp 等^[15]报道小脑的硒水平高于大脑半球高于脊髓, 表明灰质最多的中枢神经系统的硒含量也最高。在对鸡和大鼠的研究中发现, 脑中腺体器官松果体和垂体硒含量较高^[15, 16]。研究发现, 人体内脑中的硒浓度随年龄的变化而改变。例如, 胎儿脑中硒浓度随胎龄的增长而降低, 但出生后机体脑中硒浓度随着年龄的增加而升高^[17]。近期的研究结果显示, 病理情况下, 脑中的硒含量会发生改变。如阿尔茨海默病 (AD) 患者脑脊液和脑组织中硒水平硒含量降低, 进一步分析显示, AD 患者的颞叶、海马和皮质区域的硒水平降低, 而杏仁核中观察到硒水平升高^[18]。

1.1.2 硒及硒蛋白研究进展

硒广泛存在于动物机体的各个组织和细胞中, 主要以硒蛋白的形式来发挥其功能。硒在机体内以硒代半胱氨酸 (Sec) 的形式参与到硒蛋白的合成。Sec 是由终止密码子 UGA 所编码的第 21 种氨基酸, 其翻译的过程中需要其下游存在调节硒蛋白合成的特殊元件硒代半胱氨酸插入元件 (SECIS) 的存在。1973 年第一个硒蛋白谷胱甘肽过氧化物酶 1 (GPX1) 被鉴

定出来,到目前为止,已有 45 种硒蛋白已从人和其他物种中鉴定出来,其中人体内含 25 种硒蛋白^[19]、猪 25 种硒蛋白^[20]、小鼠和大鼠 24 种硒蛋白^[21, 22]、鸡 25 种硒蛋白^[23]、斑马鱼 38 种硒蛋白和青蛙 24 种^[21]等。有 21 种硒蛋白在所有脊椎动物均存在,包括谷胱甘肽过氧化物酶 1、2、3 和 4 (GPX1-4)、硫氧还蛋白还原酶 1 和 3 (TXNRD1 和 TXNRD3)、脱碘酶 1、2 和 3 (DIO1-3)、硒蛋白 H (SELH)、硒蛋白 I (SELI)、硒蛋白 K (SELK)、硒蛋白 M (SELM)、硒蛋白 N (SELN)、硒蛋白 O (SELO)、硒蛋白 P (SELP)、蛋氨酸-R-亚砷还原酶 1 (MSRB1 又名硒蛋白 R, 即 SELR)、硒蛋白 S (SELS)、硒蛋白 T (SELT)、硒蛋白 W (SELW) 及 15 KDa 硒蛋白 (SEP15)^[21]。鸡 25 种硒蛋白及其亚细胞定位见表 1-1。

除 SELP 外,多数硒蛋白的 mRNA 上都包含一个独立的 Sec 残基和一个特殊的硒代半胱氨酸插入元件-SECIS。根据硒蛋白氨基酸序列中 Sec 的位置不同,将硒蛋白主要分为三类:第一类是 Sec 残基位于 C 末端,包括哺乳动物体内的 SELK、SELS、SELO、SELI、SELR 和 TXNRDs 等;第二类是残基位于 N 末端,主要是含有-CxxU 或-CxxC 基序的硫氧还蛋白结构域的硒蛋白,包括 SELH、SELM、SELT、SELV、SELW、SEP15、DIOs、GPXs 以及硒磷酸合成酶 2 (SPS2) 等;第三类硒蛋白是除上述两类硒蛋白以外的硒蛋白,如 SELP 等^[24]。

2016 年, HUGO 基因命名委员会 (HUGO Gene Nomenclature Committee, HGNC) 通过了“硒蛋白基因命名法”,为硒蛋白编码基因建立了一套合理且统一的命名体系,即除具有已知功能的硒蛋白酶:硫氧还蛋白还原酶 TXNRD1、2 和 3,谷胱甘肽过氧化物酶 GPX1、2、3、4 和 6,碘甲状腺原氨酸脱碘酶 DIO1、2 和 3,甲硫氨酸-R-亚砷还原酶 1 MSRB1 和硒磷酸合成酶 2 SEPHS2 外其他传统上用 SEL 或 SEP 符号表示的硒蛋白均可用 SELENO 加字母的方式来命名,如 SELS 可写为 SELENOS^[25]。

表 1-1 25 种硒蛋白亚细胞定位

Table 1-1 The subcellular localization of 25 selenoproteins

硒蛋白	缩写	别名	亚细胞定位
谷胱甘肽过氧化物酶 1	GPX1	胞浆谷胱甘肽过氧化物酶, GSHPX1	细胞质
谷胱甘肽过氧化物酶 2	GPX2	胃肠道谷胱甘肽过氧化物酶, GSHPX-GI	细胞质
谷胱甘肽过氧化物酶 3	GPX3	血浆谷胱甘肽过氧化物酶	分泌
谷胱甘肽过氧化物酶 4	GPX4	磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶, PHGPX	细胞质、线粒体、细胞核
硫氧还蛋白还原酶 1	TXNRD1	TR1, TRXR1	细胞质, 细胞核
硫氧还蛋白还原酶 2	TXNRD2	TRXR2, TR3, 线粒体硫氧还蛋白还原酶	线粒体
硫氧还蛋白还原酶 3	TXNRD3	TGR, TRXR3, TR2	
碘甲状腺原氨酸脱碘酶 1	DIO1	D1	质膜
碘甲状腺原氨酸脱碘酶 2	DIO2	D2	内质网
碘甲状腺原氨酸脱碘酶 3	DIO3	D3	质膜
硒代磷酸合成酶 2	SEPHS2	SPS2	细胞质
蛋氨酸-R-亚砷还原酶 1	MSRB1	SELR, SELX, SEPX1	细胞质

(转下页)

(接上页)

硒蛋白	缩写	别名	亚细胞定位
硒蛋白 F	SELENOF	selenoprotein 15, SEP15	内质网
硒蛋白 H	SELENOH	SELH, C11orf31	细胞核
硒蛋白 I	SELENOI	SELI, EPT1	膜
硒蛋白 K	SELENOK	SELK	内质网, 质膜
硒蛋白 M	SELENOM	SELM, SEPM	内质网
硒蛋白 N	SELENON	SELN, SEPN1	内质网
硒蛋白 O	SELENOO	SELO	
硒蛋白 P	SELENOP	SELP, SEPP1	分泌, 细胞质
硒蛋白 S	SELENOS	SELS, SEPS1, VIMP	内质网, 质膜
硒蛋白 T	SELENOT	SELT	内质网
硒蛋白 U	SELENOU	SELU	
硒蛋白 W	SELENOW	SELW, SEPW1	细胞质
硒蛋白 P2	SELENOP2	SEPP2, SELPb	

1.1.3 硒对神经系统的保护作用

脑是一个具有大量代谢需求的器官, 硒作为机体必需微量元素之一, 对脑发育和新陈代谢至关重要。越来越多的证据表明, 硒以硒蛋白的形式在脑内主要通过参与氧化还原调节来维持脑的最佳功能。GSH-Px 家族是硒蛋白的重要成员, 具有强大的抗氧化作用, 其中 GPX1 和 GPX4 是脑中主要的 GSH-Px 形式, 可有效清除细胞代谢产生的活性氧 (ROS), 促进神经元的生长与发育^[9]。SELP 是一种含有多个硒代半胱氨酸残基 Sec 的细胞外蛋白, 可结合血浆中的大部分硒, 被认为在硒的转运和传递中起着关键作用, 已证实 SELP 可通过结合脂蛋白受体 ApoER2 在脑内传递硒, 对神经元存活和功能至关重要^[26]。基因敲除 SELP 或 ApoER2 可导致脑中硒水平降低, 引发神经功能障碍^[27]。此外, 哺乳动物发育和成熟过程中, 脑中 SELW 处于高表达水平, Raman 等^[28]报道 SELW 广泛存在于小鼠脑内神经元和神经纤维中, 其中皮质和海马锥体神经元中 SELW 表达水平较高, 另外在小脑的浦肯野神经元及其树突状也有丰富的 SELW。有报道指出, 膳食硒缺乏降低了脑中硒浓度和 GPX 活性但并没有降低脑中的 SELW 水平, 表明 SELW 可能在维持神经正常功能发挥着重要作用^[29]。

Ji 等^[30]研究发现硫酸软骨素纳米硒 (CS@Se) 可以通过减轻氧化应激损伤, 抑制 tau 蛋白过度磷酸化, 缓解炎症, 减轻海马神经元突触损伤等方式, 延缓小鼠 AD 的发展, 改善空间学习记忆障碍, 提高 AD 小鼠的学习记忆能力。缺血再灌注损伤后腹腔注射亚硒酸钠 (Na_2SeO_3) 可显著降低缺血再灌注 (IR) 诱导的大鼠前额叶皮层和海马组织中 TNF- α 和 IL-1 β 的水平, 增加了神经生长因子 (NGF) 的水平, 减轻前额叶皮层和海马 CA1 区神经元死亡^[31]。研究发现硒能有效缓解有毒物质对中枢神经系统的毒性。硒可缓解顺铂 (Cisplatin, 一种具有神经毒性的抗癌药物) 诱导的 Wistar 白化大鼠脑组织病理改变, 减轻细胞凋亡^[32]。朱轶豪^[33]研究发现硒能有效缓解铅导致的鸡脑组织和鸡胚神经细胞氧化应激, 免疫抑制和炎

症反应,降低细胞凋亡,减轻脑损伤。郝盼^[34]证实硒可缓解由铬引起的鸡脑组织的氧化应激,保护浦肯野细胞层,缓解铬引起的浦肯野细胞数量减少和空泡化。任妍^[35]通过建立人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 镉暴露模型,发现硒可上调硫氧还蛋白还原酶 TXNRD1 的水平,降低镉引起的 ROS 水平,并抑制神经元凋亡,发挥神经保护作用。有报告指出 SELS 在反应性星形胶质细胞中的表达被激活,可通过减少内质网压力和炎症,而在神经病变状态下维持星形胶质细胞的完整性^[36]。这些研究结果表明,硒对神经系统具有保护作用。

1.1.4 缺硒对神经系统的影响

研究表明,低硒情况下脑维持硒水平的能力远高于其他组织。在对缺硒动物模型的研究中发现,脑显示了对保留硒的优先权。用缺硒饲料连续饲喂大鼠 13 周后,发现大鼠血硒含量明显降低,然而脑硒含量基本保持不变。连续饲喂大鼠缺硒日粮至第 6 代时,发现肝、骨骼肌和血液中的硒浓度不到正常水平的 1%,而脑硒含量依然能达到正常水平的 60%,证明脑组织对硒的优先利用权^[24]。

研究发现硒缺乏会导致大鼠大脑皮层和海马中的硒含量降低,大脑皮层、海马和小脑中 GSH-Px 的活性下降,海马中脂质过氧化增加,同时造成认知功能缺陷^[37]。耿义群^[38]利用低硒日粮饲喂大鼠三代后,发现缺硒可导致发育期大鼠大脑皮层和海马的氧化代谢水平降低,同时引起大脑皮层和海马神经元功能下降。此外,日粮硒缺乏可导致蛋鸡不同脑区抗氧化能力降低,引起 H₂O₂、NO、MDA 等含量增加,同时导致炎症因子表达升高和凋亡的发生,深入研究发现 SELW 可通过抑制炎症因子和凋亡基因的表达,保护神经元免受氧化应激导致的炎症和凋亡损伤。低硒导致的鸡脑组织中 SELW 表达量降低而引起的抗氧化能力降低,这可能是低硒致鸡脑组织损伤的作用机制之一^[24]。SELP 缺失会导致小鼠神经表型,包括运动协调和认知缺陷,并增加癫痫发作的易感性^[39, 40]。

1.2 硒蛋白 S (SELS) 与神经系统损伤研究进展

硒蛋白 S (Selenoprotein S, SELS) 又名 SELENOS、SEPS1、VIMP 等^[25]。2002 年 Walder 等^[41]首次在大鼠 II 型糖尿病模型中发现,大鼠在禁食 24 h 后肝脏中有一个基因的表达呈现出显著性升高,证实为新基因并将之命名为 Tanis (希伯来语,意为“禁食”)。2003 年, Kryukov 等^[42]在人类基因组中发现了一种新的硒蛋白 SELS。研究发现,人类 SELS 基因和大鼠 Tanis 基因是编码同一个蛋白质的同源物。SELS 具有硒蛋白基因所特有的特征,即在其 mRNA 开放阅读框内含有编码 Sec 的 UGA 密码子,下游 3'非翻译区存在调节硒蛋白合成的硒代半胱氨酸插入元件-SECIS。

1.2.1 SELS 的结构和组织分布

Walder 等^[41]利用 Expasy 软件工具对 SELS 进行分析和预测了认为其含有 8 个可能的丝氨酸磷酸化位点、1 个苏氨酸磷酸化位点、3 个可能的 O-糖基化位点和 4 个可能的蛋白激酶 C 磷酸化位点。预测其具有 44%的 α -螺旋, 17%的延伸链和 39%的无规卷曲。

研究发现 SELS 广泛分布在大鼠多个组织, 包括肌肉、肺、肝、小脑、大脑、脂肪、血管、脾、胃、胸腺、胰腺和心脏。此外, 在肾、睾丸和结肠组织中亦检测到 SELS 的表达^[43]。前期研究发现, SELS 广泛分布于鸡的各个组织中, 如肝^[44]、肾^[45]、肌肉^[46]、胰腺^[47]、胸腺^[48]、肠道^[49]、气管^[50]、脑^[51]等。SELS 是一种单向的跨膜蛋白, 主要分布于细胞内质网上^[52]。首先是一段较短的 N-端片段 (1~25 位氨基酸残基) 位于内质网腔内, 接着是由 26-48 位氨基酸残基组成的内质网跨膜区, 后面的 49~189 位氨基酸残基则在细胞质区^[53]。目前对 SELS 在细胞质区的结构比较清楚, 其中 52~122 位氨基酸残基形成了两段伸展的 α -螺旋 H1 和 H2, 被称为卷曲螺旋结构域, SELS 可能通过该区域与其他蛋白结合或形成二聚体。如图 1-1 所示为目前所知的人 SELS 的拓扑结构。除此之外, Kryukov 等^[22]和 Bubenik 等^[54]研究证实 SELS 也定位于质膜和核周高尔基体内。

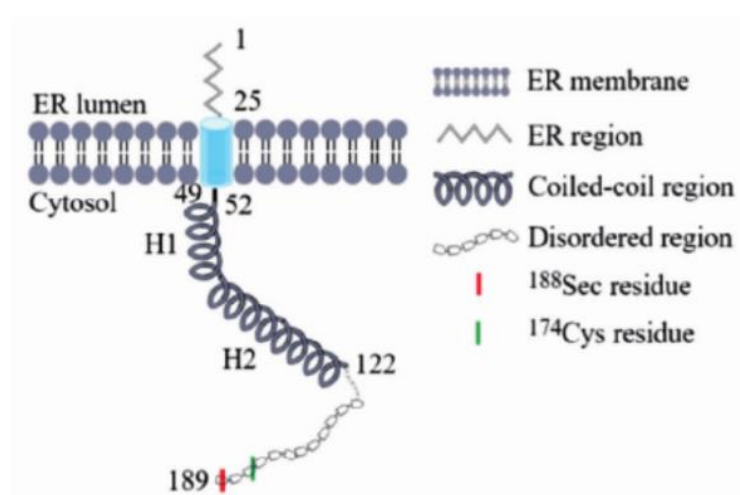


图 1-1 SELS 拓扑结构示意图^[43]

Figure 1-1 The topological structure schematic representation of SELS

1.2.2 SELS 的功能

经过多年研究发现, SELS 具有调节内质网应激、氧化应激、炎症反应、葡萄糖代谢等功能^[55, 56], 并与一些疾病的发生发展密切相关, 如心血管疾病^[57]、II 型糖尿病^[41]、阿尔茨海默病 (AD)^[58]、癌症^[52, 59]等。

1.2.2.1 SELS 调节内质网应激

内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 是细胞内极为重要的细胞器, 是蛋白质合成后折叠、修饰与装配的重要场所, 也是细胞内 Ca 的贮存器, 此外许多细胞功能都与内质网有关。当内质网中出现未折叠或错误折叠蛋白在腔内聚集和/或 Ca 平衡紊乱时, 会造成内质网功能紊乱, 称为内质网应激 (ER stress)。细胞可通过启动内质网相关蛋白降解 (ER-associated protein degradation, ERAD) 途径识别内质网中未折叠或错误折叠蛋白以逆向转移的方式从内质网中到细胞质中进行降解, 以此减轻或消除内质网应激, 进而恢复内质网稳态。而长时间的内质网应激, 会诱导 ROS 的生成^[60], 并将激活内质网相关的凋亡信号途径诱导细胞凋亡。SELS 作为内质网驻留蛋白, 已证实是 ERAD 重要组成, SELS 在内质网上与内质网蛋白 1 (Derlin1)

-泛素连接酶 E3-p97ATP 酶形成降解复合物, 以降解 ER 中未折叠或错误折叠的蛋白质^[61-65]。Gao 等^[66]发现 SELS 基因的启动子区域含有一个内质网应激响应元件 (endoplasmic reticulum stress response element, ERSE) (GGATTCTCTCCCCGCCACG)。研究表明内质网应激诱导剂衣霉素 (TM)、毒胡萝卜素 (TG) 和 β -巯基乙醇可上调 RAW264.7 巨噬细胞、HepG2 肝癌细胞、HEK293T 人胚肾细胞和小鼠星形胶质细胞中 SELS 的表达^[67-70], 过表达 SELS 可缓解 TG 和 TM 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞存活率下降和细胞凋亡增加, 从而在内质网应激期间促进细胞存活^[67], 抑制 SELS 的表达会进一步降低 β -巯基乙醇处理的 HepG2 肝癌细胞的细胞活力, 加重细胞凋亡^[69]。在人和小鼠星形胶质细胞中, 用 ER 应激诱导剂 TM 和 TG 处理后, SELS 表达水平均上调, 过表达 SELS 可以降低 ER 应激标记物 XBP1 和促凋亡转录因子 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 的表达^[71], 在小鼠星形胶质细胞中抑制 SELS 的表达进一步加剧了 TM 和 TG 诱导的细胞活力的降低^[68]。此外, 敲低 SELS 增强了 TM 诱导大鼠血管平滑肌细胞的内质网应激, 表现为内质网伴侣 78 kDa 葡萄糖调节蛋白 (GRP78)、内质网应激传感器磷酸化蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 (PERK) 和 CHOP 的蛋白水平升高^[72]。这些结果表明 SELS 在保护细胞免受内质网应激介导的细胞死亡中发挥重要作用。

1.2.2.2 SELS 调节氧化应激

氧化应激 (Oxidative stress, OS) 是机体活性氧 (ROS) 生成增加和/或自身抗氧化防御系统减弱而导致的不平衡状态。研究发现 SELS 具有抗氧化功能, 属于硫氧还蛋白依赖性还原酶, 是一种典型的氧化还原酶, 同时具有过氧化物酶活性, 能将其底物 H_2O_2 分解成 H_2O , 尽管 SELS 能够分解 H_2O_2 , 但不是一种有效的或广谱的过氧化物酶^[73]。大量的研究也已确认 SELS 能够减轻氧化应激所带来的细胞损伤。Zhao 等^[74]研究发现过表达 SELS 可显著提高 H_2O_2 处理后人内皮细胞的细胞活力和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 降低丙二醛 (MDA) 生成。而敲低 SELS 基因则显著降低了细胞活力和 SOD 活性, 同时引起 MDA 生成增加, 这一研究表明 SELS 可保护人内皮细胞免受氧化应激。Ye 等^[72]研究发现敲低 SELS 基因可使血管平滑肌细胞对 H_2O_2 诱导的细胞损伤更为敏感, 加重了 H_2O_2 诱导的血管平滑肌细胞氧化应激, 导致 ROS 和 MDA 水平进一步升高, GSH-Px 活性进一步降低。Gao 等^[75]研究发现 SELS 过表达可增强 Min6 胰岛 β 细胞对 H_2O_2 诱导的氧化应激的抵抗力, 减轻 H_2O_2 诱导的细胞毒性, 增强细胞活力, 减少细胞凋亡。Zhong 等^[76]研究证实发现 SELS 参与抵抗氧化应激诱导的血管内皮细胞损伤的防御。同时该研究发现多因素诱导的人主动脉内皮细胞 (HAECs) 氧化应激均伴有 SELS 的上调表达。这些研究充分表明, SELS 具有保护细胞免受氧化应激损伤的作用。

1.2.2.3 SELS 调节炎症反应

Walder 等^[41]在首次发现 SELS 时就观察到 SELS 与急性炎症反应蛋白-血清淀粉样蛋白 (Serum amyloid A, SAA) 有相互作用, 并证实 SELS 可作为 SAA 的受体参与炎症过程。此外, Karlsson 等^[77]发现糖尿病患者接受胰岛素刺激后其骨骼肌和脂肪组织中 SELS 的 mRNA 表达与 SAA 呈正相关, 表明 SELS 与炎症相关联。Gao 等^[66]研究发现人类的 SELS 启动子区域中含有 2 个可以与核转录因子 NF- κ B 结合的位点, 揭示 SELS 很可能是 NF- κ B 的一个靶基因, 进一步研究发现促炎症细胞因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 及肿瘤坏死因

子 TNF- α 能显著激活 HepG2 细胞中 SELS 的启动子活性, 增加其基因和蛋白质表达水平。Fradejas 等^[36]报道, 诱导 C57BL/6 小鼠脑组织和人及小鼠星形胶质细胞炎性反应, 会引起 SELS 表达显著增加, 且 SELS 过表达可降低脂多糖 LPS 刺激的 IL-1 β 和 IL-6 的表达, 而 SELS 抑制则会进一步增加 LPS 刺激的 IL-1 β 和 IL-6 的表达。Zeng 等^[78]研究发现当小干扰 RNA (siRNA) 抑制 SELS 后, 会进一步加重 LPS 刺激诱导的 HepG2 细胞 GPX1 mRNA 表达和活性降低, 以及 ROS 水平、SAA 水平、一氧化氮 (NO) 水平、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) mRNA 表达水平和活性升高, 表明 SELS 在影响炎症反应中起重要作用, 这可能与 SELS 作为内质网相关蛋白降解 (ERAD) 中逆向转运通道的中心成分及其抗氧化性有关。Cui 等^[79]的研究发现过表达 SELS 减低 TNF- α 诱导的人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 的炎症因子表达, 包括白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-8 和单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1), 相反, siRNA 敲除 SELS 可增强 TNF- α 诱导的 HUVECs 损伤。这些研究结果说明了 SELS 与炎症密切相关, SELS 会在炎症的发生下产生应答, 并在炎症调节过程中起着重要的作用, SELS 的表达变化会影响炎症反应的强度。

1.2.2.4 SELS 调节葡萄糖代谢

葡萄糖代谢包括合成、储存及分解三个方面, 其过程受到众多因素的影响和调控, 血糖的动态平衡主要依赖于激素调控, 如胰岛素、胰高血糖素和糖皮质激素等。研究证实, SELS 是一种跨膜的葡萄糖调节蛋白。Walder 等^[41]在 II 型糖尿病和代谢综合征模型的大鼠中发现, 肝组织中 SELS 的表达没有显著性差异, 但在禁食 24h 后, 糖尿病大鼠的肝中 SELS 基因表达与正常大鼠相比显著增加, 此外 SELS 基因表达水平与体内血糖浓度、胰岛素水平成反比, 与血浆甘油三酯浓度成正比。进一步研究发现葡萄糖抑制肝细胞以及其他几种细胞类型 SELS 基因的表达, 提示 SELS 的表达受葡萄糖调节, 揭示 SELS 在肝脏葡萄糖代谢中起一定作用。Karlsson 等^[77]也发现 II 型糖尿病患者与健康人群在骨骼肌和脂肪组织中 SELS mRNA 表达水平基本相同; 但当注射胰岛素后, II 型糖尿病患者脂肪组织中 SELS mRNA 表达有显著性增强。Gao 等^[80]发现人肝癌细胞 H4IIE 中过表达 SELS 会降低葡萄糖摄取、基础状态和胰岛素刺激下的糖原合成以及糖原含量, 减弱了胰岛素对磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 基因表达的抑制, 但不影响胰岛素刺激的胰岛素受体磷酸化或甘油三酯合成, 表明 SELS 可能参与了糖代谢的调节, SELS 表达增加可导致肝脏胰岛素抵抗。马帅^[81]使用饱和脂肪酸软脂酸建立 Hep G2 细胞胰岛素抵抗模型, 发现沉默 SELS 基因可抑制人肝癌细胞 (Hep-G2) 糖异生水平, 增强胰岛素敏感性, 恢复胰岛素信号通路的转导, 改善葡萄糖的代谢。

此外 Windmill 等^[82]研究还发现 SELS 可能在精子发生中起作用。SELS mRNA 表达在青春期的动物睾丸中的表达较低, 但在青春期和青春期后的动物睾丸中表达增加了 4 倍多, SELS 在精子发生过程中特定的细胞类型中表达, 表明 SELS 可能在睾丸氧化应激下发挥保护作用或在精子发生中发挥特定作用。

1.2.3 SELS 在神经系统中的作用

SELS 可在许多物种的脑组织中表达, 如鼠^[83]、鸡^[84]、猪^[85]等, 在海马、小脑和其他脑组织中均可检测到 SELS 的表达^[86]。有研究证实, SELS 在保护神经系统方面也发挥着重要作用。Fradejas 等^[36]报告 SELS 在反应性星形胶质细胞中的表达被激活, 并且 SELS 可通过减少内质网应激和炎症维持在神经病变状态下星形胶质细胞的完整性。Rueli 等^[58]发现在 SH-SY5Y 神经细胞系中, SELS 的表达水平随着内质网应激的增加而升高, 而抑制 SELS 的表达促进内质网应激诱导的细胞死亡。也有报道指出, SELS 在脑缺血保护中发挥关键作用, SELS 基因位点突变可导致人更易发生缺血性中风^[87]。Liu 等^[88]发现在大鼠短暂局灶性脑缺血再灌注后 3-7 d 缺血核心区 SELS 蛋白水平下降, 而邻近缺血核心的缺血半暗带中 SELS 表达上调, 与反应性星形胶质细胞增生相一致, SELS 的上调代表了星形胶质细胞对炎症刺激的反应。RNA 差异分析显示 SELS 在氧和葡萄糖剥夺 (OGD) 诱导星形胶质细胞缺血模型被诱导表达, 小干扰 RNA 抑制 SELS 加重了 OGD 引起的星形胶质细胞损伤, 提示 SELS 保护星形胶质细胞免受缺血损伤^[89]。

淀粉样蛋白 β ($A\beta$) 积聚形成的斑块被认为是 AD 形成和发展的关键因素, C99 是淀粉样蛋白 β 前体 (APP) 含 99 个氨基酸的 C 端片段, 可在 γ -分泌酶的作用下产生 $A\beta$ 。Jang 等^[90]研究发现在 SELS 存在情况下, C99 可通过 ERAD 途径被清除, SELS 表达水平的增加可降低 C99 的水平, 从而抑制 $A\beta$ 的产生。研究显示抑制 SELS 可增加内质网应激条件下微管相关蛋白 Tau 的磷酸化, 也促进了磷酸化 Tau 蛋白在神经突起和胞体中的聚集, Tau 蛋白的过度磷酸化导致神经原纤维缠结的形成, 而且在 AD 患者死后大脑中, SELS 的表达与神经原纤维缠结相一致。此外, 补充硒酸盐可增加 SELS 的表达并抑制 Tau 蛋白磷酸化, 这一研究表明硒酸盐可通过增加 AD 和其他神经退行性疾病中 SELS 的表达来改变 Tau 的磷酸化, 进而减轻神经损伤^[58]。这些研究表明有效的 SELS 依赖性 ERAD 途径可减少 $A\beta$ 聚集和 Tau 磷酸化, 这对减轻 AD 病理学损伤非常重要。

1.3 溶酶体与神经系统疾病关系的研究进展

20 世纪 50 年代初期, 研究人员在研究大鼠肝组织亚细胞组分时, 发现有一种酸性磷酸酶在冰箱放置一段时间后酶活性基本恢复, 进一步研究发现这种酸性磷酸酶定位于膜包被的细胞器, 由于冻存而损伤膜结构, 从而导致酶释放而增加酶活性。最初, 由于酸性磷酸酶所在的细胞器的重量大部分集中于线粒体和内质网中间, 因此被命名为“中间微体”。除酸性磷酸酶外, 后来又陆续鉴定出 4 种“中间微体”标志酶, 因为这些酶主要参与水解反应, 故又将这一新细胞器命名为溶酶体 (lysosome)^[91]。

溶酶体是一种普遍存在的单膜细胞器, 具有独特的强酸性内腔 pH 和高含量的酸性水解酶, 可通过内吞、吞噬或自噬接收底物和降解大分子。溶酶体内约含 60 多种不同的可溶性水解酶直接参与降解代谢物, 如酸性磷酸酯酶、组织蛋白酶、核糖核酸酶等, 这些水解酶在内质网 (ER) 中合成, 并通过高尔基复合体运输到内溶酶体系统。溶酶体膜上含有约 25 种膜蛋白溶酶体膜蛋白, 主要包括转运蛋白、离子通道以及调节不同溶酶体功能方面的膜受体,

如 MCOLN1 介导溶酶体 Ca 释放, V-ATPase 复合物介导溶酶体酸化, 在维持溶酶体膜完整性、管腔酸化、离子梯度和稳态、蛋白质易位和膜运输方面起着重要作用, 这些酸性水解酶和溶酶体膜蛋白在维持溶酶体功能及稳态发挥关键作用^[92]。作为内吞和自噬途径的末端降解终点, 溶酶体作为细胞的“循环中心”而在维持细胞内稳态的中发挥关键作用^[92]。除典型的“消化”作用外, 溶酶体还与营养物质传感、免疫细胞信号、代谢和膜修复有关^[93]。

1.3.1 溶酶体功能障碍与自噬流抑制

自噬溶酶体降解途径(简称自噬)在细胞生理学中起着至关重要的作用, 如适应代谢压力, 清除有害物质(包括蛋白质聚集体、受损的细胞器、细胞内病原体), 分化和发育过程中的更新以及防止基因组损伤等^[94]。依据降解底物到达溶酶体的方式不同, 一般将自噬分为三种类型, 巨自噬、微自噬及分子伴侣自噬, 其中以巨自噬研究较为广泛和深入, 通常提及的自噬都指的是巨自噬。自噬过程可分为起始、延伸、闭合和降解, 即首先形成双膜结合的自噬小泡, 随后细胞内的底物被封闭在双层膜结合的自噬体中, 并与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 并最终被溶酶体水解酶降解, 产生的分解产物可用于生成新的细胞成分和满足细胞营养需求的能量^[95]。自噬广泛地参与机体生长、发育、衰老和分化, 组织器官的代谢调控, 凋亡小体的清除等多种过程。正常情况下, 细胞内自噬活性一般处于较低水平, 受到外来刺激时, 自噬水平可显著上调。自噬可被广泛的细胞应激诱导条件激活, 如饥饿、缺氧、能量耗竭、内质网应激等生理应激, 激素刺激, 药物(如雷帕霉素)等均可诱导自噬激活^[96]。介导蛋白质聚集体、氧化脂质、受损细胞器和细胞内病原体的降解。

自噬流代表自噬的整个动态过程, 包括自噬小体形成、转送至溶酶体以及溶酶体降解, 自噬流可以反应自噬的真实状态。研究发现, 某些疾病如癌症、神经退行性疾病、心脏疾病和糖尿病伴有自噬抑制^[97], 机体衰老过程中也出现自噬功能的下降^[98, 99]。自噬底物在自噬体与溶酶体融合后降解, 研究证实自噬的降解和循环过程严格依赖于功能完善的溶酶体^[100], 因而溶酶体受损也会干扰自噬, 导致自噬流抑制。各种模型和遗传学方法的研究清楚地指出了溶酶体在各种疾病中的意义^[97]。研究证实早老素-1 (PS1) 缺失可破坏溶酶体酸化, 损害自噬底物的溶酶体降解并引起溶酶体 Ca 稳态异常, 导致自噬缺陷^[101]。巴非霉素 A1 可通过抑制 V-ATP 酶活性抑制溶酶体酸化, 而引起溶酶体 pH 升高导致蛋白质降解受到抑制^[102], 同时抑制自噬溶酶体融合, 导致自噬体蓄积而无法降解^[103]。重金属如铅^[104]、镉^[105]可引起溶酶体碱化、酶活性降低造成溶酶体功能障碍而导致自噬流抑制。纳米二氧化硅可诱导细胞 ROS 的产生, 损伤溶酶体功能导致自噬流抑制^[106]。这些研究表明, 溶酶体作为自噬过程的终端, 其功能障碍可导致自噬流抑制。

1.3.2 溶酶体膜通透化与细胞凋亡

随着研究的深入, 溶酶体已证实在细胞死亡中发挥着重要作用。细胞死亡性质与所受刺激性质、组织蛋白酶的释放、内源性组织蛋白酶抑制剂的水平以及溶酶体膜通透化 (LMP) 程度有关。溶酶体的广泛崩解可导致坏死, 而溶酶体适度通透性会导致细胞凋亡。研究发现溶酶体在细胞凋亡过程中扮演着中心角色, 溶酶体膜通透化 (LMP) 可发生在凋亡过程的早

期,对细胞凋亡信号级联的激活至关重要,或参与细胞凋亡过程,有助于扩大死亡信号^[107]。溶酶体稳态失衡被公认为是氧化应激致细胞损伤的特征之一,ROS 可导致溶酶体通透化,导致溶酶体酶泄露,并作用于线粒体导致更多 ROS 的产生,形成反馈回路,进一步加重溶酶体通透化,同时导致细胞凋亡^[108]。豆蔻素 A 可导致溶酶体通透化,并引发人 A549 上皮细胞发生凋亡^[109]。组织蛋白酶是一种在生理条件下定位于溶酶体内的蛋白酶。作为对某些信号的反应,它们可从溶酶体释放到细胞质中,通过各种途径触发凋亡细胞死亡,包括半胱天冬酶的激活或线粒体促凋亡因子的释放^[110]。纳米金棒(GNRs)可在溶酶体中累积,导致溶酶体通透化及组织蛋白 D 泄露,诱发线粒体途径凋亡^[111]。印楝素能引起溶酶体膜通透化和组织蛋白酶 L 释放到胞浆中,诱导细胞凋亡。组织蛋白酶 L 抑制剂 Z-FF-FMK 能有效抑制印楝素诱导的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(CAS3)活化和细胞凋亡,表明印楝素可以通过溶酶体途径诱导细胞凋亡,组织蛋白酶 L 通过释放到胞浆和激活 CAS3 起到促凋亡的作用^[112]。各种细胞模型已证实溶酶体组织蛋白酶 B、L 和 D 参与细胞凋亡的调节^[113]。研究证实,组织蛋白 D 可切割胞浆中 Bid 为 t-Bid,进而导致促凋亡基因 BAX 和 BAK 蛋白结构改变和寡聚化,最终导致线粒体外膜孔形成,细胞色素 C 的释放,释放的细胞色素 C 与凋亡蛋白酶激活因子 Apaf-1 结合形成凋亡小体,激活 CASPASE 级联反应,最终导致细胞凋亡的发生^[114]。这些研究表明,溶酶体稳态失衡在细胞凋亡中发挥重要作用。

1.3.3 硒与溶酶体稳态研究进展

氧化应激和自由基可损伤溶酶体造成溶酶体功能异常^[115, 116],硒在维持溶酶体稳态方面也发挥重要作用,这可能与抗氧化作用密切相关。亚硒酸钠可减弱丙戊酸(VPA)导致大鼠皮层神经元细胞活力下降,缓解氧化应激,降低脂质过氧化水平同时提高 GSH 含量,有效缓解丙戊酸(VPA)处理导致的溶酶体膜渗漏,改善溶酶体功能^[117]。庆大霉素可导致大鼠肾脏溶酶体膜肿胀,溶酶体悬浮液的光吸收率升高,溶酶体酸水解酶的释放,硒酸钾可有效降低溶酶体悬浮液的光吸收率和溶酶体酸水解酶的释放,硒对庆大霉素诱导的溶酶体膜不稳定有保护作用^[118]。硒纳米粒(SeNPs)可诱导酸性溶酶体和自噬体的形成,增加人角质形成细胞自噬^[119]。Cao 等^[119]研究指出亚硒酸钠可显著提高鹅 T 细胞主要溶酶体膜蛋白,如与溶酶体稳定性和完整性相关溶酶体相关膜蛋白(LAMPs)、维持与囊泡的裂变/融合相关的溶酶体整合膜蛋白(LIMPs)的 mRNA 水平,此外溶酶体酸性水解酶,包括蛋白酶、糖苷酶、硫酸酯酶,脂肪酶、磷酸酶等 mRNA 水平也显著提高,表明硒可通过激活溶酶体途径相关基因来促进鹅的免疫功能。这些研究证实,硒在维持溶酶体稳态方面发挥重要作用,而硒缺乏可导致溶酶体稳定性降低。缺硒可导致大鼠心脏及肝脏脂质过氧化增强,溶酶体游离酶增多,表明溶酶体膜受损,提示缺硒导致溶酶体膜稳定性变差^[120, 121]。这些研究表明,溶酶体功能的紊乱及稳态破坏在缺硒性损伤的过程中具有一定的作用。

1.3.4 溶酶体稳态与神经系统疾病

溶酶体作为内吞和自噬途径的降解中枢可维持细胞内稳态,是维持神经元生存和功能所必需的,可以保护神经元免受细胞代谢产物蓄积而导致的损伤。研究发现神经元中溶酶体的

分布具有两极化,其中神经元胞体中最为丰富,在树突中适度存在,在轴突中相对少见^[122]。越来越多的研究表明,神经元的存活与溶酶体功能的有效性密切相关。在对常见和罕见的神经退行性疾病中溶酶体生物合成和功能的研究中发现,自噬-溶酶体系统障碍是这些退行性疾病的共同点,说明溶酶体在维持和保护神经元功能方面发挥重要作用^[123]。大量证据表明,任何一种溶酶体酶缺乏都会导致其特定底物在溶酶体内积聚,此外任何一个酶转运步骤的缺陷均可引起未降解底物蓄积进而导致溶酶体代谢障碍和细胞功能障碍,最终导致人类疾病,此类疾病统称为溶酶体贮积症(LSD)^[124]。溶酶体内未降解底物的蓄积可增加溶酶体膜的通透性,从而可导致溶酶体酶缓慢释放到胞浆中,最终引发细胞凋亡^[125]。 α -突触核蛋白(α -syn)的积累和错误折叠是退行性疾病帕金森病(PD)的主要病理特征。 α -syn 的过度表达和细胞蛋白降解系统的失效在 α -syn 聚集中起主要作用,在 α -syn 聚集的同一脑区测量到溶酶体酶活性降低,证实 α -syn 聚集和自噬溶酶体损伤之间关系密切,表明自噬溶酶体途径功能失调在 PD 发生和进展中发挥重要作用^[126]。

1.4 研究目的与意义

缺硒可导致 SELS 表达水平降低,SELS 作为一种定位于内质网中的小分子硒蛋白,在维持内质网稳态方面发挥重要作用。研究表明,SELS 具有抗内质网应激以及潜在的抗氧化等生物学功能。溶酶体作为细胞内重要细胞器,在维持脑神经细胞正常功能方面发挥重要作用,易受到 ROS 的损害而引起功能紊乱,溶酶体稳态失衡会引发神经系统紊乱造成脑损伤。前期研究表明缺硒可导致 SELS 表达降低和溶酶体稳态失衡,然而溶酶体稳态失衡是否参与缺硒性脑损伤以及 SELS 是否调控溶酶体功能及稳态尚不清楚。

本研究利用低硒日粮和低硒培养基复制了鸡小脑和鸡脑神经元缺硒模型,从病理组织学、金属离子稳态、mRNA 转录组、SELS 表达、内质网应激、抗氧化水平、溶酶体稳态、自噬流及凋亡方面探讨缺硒对鸡小脑组织及脑神经元损伤、SELS 水平及溶酶体稳态的影响,同时利用 siRNA 干扰技术建立鸡胚胎脑神经元 SELS 敲低模型,探讨 SELS 调控溶酶体稳态的机制及其在缺硒性小脑损伤中的作用机制。本研究旨在阐明缺硒性小脑损伤的潜在机制,揭示 SELS 在维持溶酶体稳态方面所发挥的作用及在缺硒性小脑损伤的作用机制,丰富 SELS 的生物学功能,同时为缺硒相关的研究提供参考,为缺硒性小脑损伤特异靶点的筛选及其机制的研究提供参考及理论依据。

2 材料与amp;方法

2.1 主要仪器与试剂

2.1.1 主要仪器

本试验中所使用的主要仪器见表 2-1。

表 2-1 主要仪器

Table 2-1 Main instruments

仪器及型号	厂家
低温高速离心机 Sorvall ST 8R	赛默飞世尔科技（中国）公司
常温高速离心机 Pico17	赛默飞世尔科技（中国）公司
常温水平离心机 TD25-WS	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司
超速离心机 LE-80K	美国 Beckman 公司
板式离心机 BE6100	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
酶标仪 Infinite F50	瑞士 TECAN 公司
超净工作台 SW-CJ-2FD	上海博迅实业有限公司
水浴锅 HWS-12	上海一恒科学仪器有限公司
实时荧光定量 PCR 仪 LineGene 9600	杭州博日科技股份有限公司
化学发光成像系统 Azure 600	美国 Azure Biosystems 公司
37℃ 二氧化氮培养箱 QP160	山东博科生物产业有限公司
电热恒温培养箱 WP-25AB	天津泰斯特仪器有限公司
电热鼓风干燥箱 GFL-230	天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司
干热消毒箱 GRX-05A	上海森信试验仪器有限公司
微量测量仪 QuickDrop E113783	上海 Molecular Devices 公司
电泳仪 PowerPac Basic 1645050	美国 BIO-RAD 公司
小型垂直电泳槽 1658001 及转印槽 1903930	美国 BIO-RAD 公司
小型摇床 SLK-O3000-S	美国赛洛捷克公司
多功能摇床 ZQPL-200	天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司
电子天平 ME104、ME802E	梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司
孵化器 JLX-3	德州市德城区金菱孵化设备厂
荧光显微镜 IX50	日本奥林巴斯株式会社
数码倒置显微镜 CKX53	日本奥林巴斯株式会社
常规冰箱 BCD-600WDEA	青岛海尔股份有限公司
-80℃ 冰箱 DW-86L626	海尔生物医疗
流式细胞仪 FZCSARIA	美国 BD 公司

2.1.2 主要试剂

本试验中所使用的主要试剂见表 2-2。

表 2-2 主要试剂

Table 2-2 Main reagents

试剂	厂家
亚硒酸钠	德国默克集团旗下 Sigma 公司
Trizol	宝生物工程(大连)有限公司
反转录试剂盒	杭州博日科技股份有限公司
荧光定量检测试剂盒	杭州博日科技股份有限公司
超敏 ECL 化学发光液	北京兰杰柯科技有限公司
RIPA 裂解液及 PMSF	上海碧云天生物技术有限公司
多聚甲醛	科密欧化学试剂有限公司试剂
考马斯亮蓝试剂盒	南京建成生物工程研究所有限公司
一氧化氮合酶 (NOS) 分型试剂盒	南京建成生物工程研究所有限公司
一氧化氮 (NO) 测定试剂盒	南京建成生物工程研究所有限公司
过氧化氢 (H ₂ O ₂) 测定试剂盒	南京建成生物工程研究所有限公司
过氧化氢酶 (CAT) 测定试剂盒	南京建成生物工程研究所有限公司
丙二醛 (MDA) 测定试剂盒	南京建成生物工程研究所有限公司
超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒	南京建成生物工程研究所有限公司
脂质过氧化物 (LPO) 测定试剂盒	南京建成生物工程研究所有限公司
谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 测定试剂盒	南京建成生物工程研究所有限公司
总抗氧化能力 (T-AOC) 测定试剂盒	南京建成生物工程研究所有限公司
溶酶体提取试剂盒	德国默克集团旗下 Sigma 公司
Neurobasal™ 培养基	赛默飞世尔科技 (中国) 公司
Opti-MEM 培养基	赛默飞世尔科技 (中国) 公司
DMEM-F12 培养基	赛默飞世尔科技 (中国) 公司
B-27	赛默飞世尔科技 (中国) 公司
GlutaMax	赛默飞世尔科技 (中国) 公司
免疫荧光试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
Lyso-Tracker-Red	上海碧云天生物技术有限公司
D-多聚赖氨酸	德国默克集团旗下 Sigma 公司
木瓜蛋白酶	德国默克集团旗下 Sigma 公司
0.25%胰酶	上海碧云天生物技术有限公司
转铁蛋白	北京兰杰柯科技有限公司
胰岛素	北京兰杰柯科技有限公司
Nycoprop 1.077	北京东方华辉生物医药科技有限公司

(转下页)

(接上页)

试剂	厂家
TUNEL 检测试剂盒	瑞士 Roche 公司
Stealth siRNA	美国 Invitrogen 公司
Lipofectamine RNAi MAX Reagent	美国 Invitrogen 公司
N-乙酰半胱氨酸	北京博奥拓达科技有限公司
E64、Pepstatin A	上海碧云天生物技术有限公司
Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
ROS 检测试剂盒	南京建成生物工程研究所有限公司

2.2 试验方法

2.2.1 动物模型的建立及样本采集

1 日龄的 AA 肉鸡 (180 只) 随机分为两组, 即对照组 (Con Group) 与缺硒组 (-Se Group)。缺硒组饲喂缺硒日粮 (硒含量为 0.008 mg/kg) (其中玉米和豆粕均购于中国黑龙江省缺硒地区龙江县), 对照组饲喂硒含量为 0.2 mg/kg 的全价日粮 (缺硒日粮基础上补充亚硒酸钠)。所有鸡均常规饲养, 自由采食和饮水。日粮组成见附录表 1。

当鸡出现典型的缺硒症状-渗出性素质症时 (一般为 20~30 日龄) 将其处死, 并立即采集小脑组织, 部分保存于 -80 °C 备用, 便于后续 mRNA 及蛋白提取, 部分样品切成适宜大小后放置于 4% 多聚甲醛缓冲液中于 4 °C 备用, 部分样品制备组织匀浆液 (10%), 进行抗氧化水平的检测。

2.2.2 鸡胚胎神经元的分离纯化及鉴定

2.2.2.1 鸡胚胎神经元分离纯化及培养

取 7 日龄鸡胚, 用酒精棉球将其表面仔细擦拭干净, 随后放入操作台蛋托上, 小心去除气室处蛋壳, 用眼科镊夹出鸡胚放入盛有 10% FBS DMEM-F12 的 10 cm 的培养皿中 (置于冰袋上, 除消化外全程冰上)。待所有鸡胚都取出后, 将全脑剥离出来, 并置于一个新的盛有 10% FBS DMEM-F12 的 100 mm 的培养皿中。小心去除脑膜及血管, 将获得的脑组织移入一个新的盛有 10% FBS DMEM-F12 的 60 mm 培养皿中, 并将其剪成 1~2 mm³ 的组织块, 随后轻柔清洗 2~3 遍后, 加入 1.5~2 mL 木瓜蛋白酶-胰酶混合消化液, 放入 37 °C 的培养箱中消化 20-30 min, 并每间隔 5 min 稍微摇动一次。

消化完成后, 加入 2 mL 10% FBS-DMEM-F12 终止消化, 静置待组织块沉降后小心去除混合液, 加入 1.5 mL 含适量 DNase I 的 DMEM-F12, 轻柔吹打 10 次, 静置 2 min 后将上清液移入新的 15 mL 离心管中, 并在平皿中再加入 1.5 mL 含适量 DNase I 的 DMEM-F12, 轻柔吹打 10 次, 静置 2 min 后将上清液移入新的 15 mL 离心管中, 3 次吹打后, 弃掉平皿中未

吹散的组织块。细胞悬液可采用 1000×rpm 离心 5 min 获取,也可采用 Nycoprop 1.077 低速密度梯度 1500×rpm 离心 5~8 min 方法进行神经元纯化。

将获取的细胞用种植培养基 10% FBS DMEM-F12 种植到已经用 D-多聚赖氨酸包被好的六孔板中,并置于 37℃,5% CO₂ 的培养箱中培养,6 h 后去除种植培养基,并用无血清 DMEM-F12 清洗 1 遍去除未贴壁的杂细胞和细胞碎片,更换神经元专用饲养培养基 Neurobasal+2% B27+1% GlutaMax (前 3 天),3 天以后更换为不含 GlutaMax 的 Neurobasal+2% B27。

2.2.2.2 鸡胚胎神经元的鉴定

鸡胚胎神经元的鉴定采用 MAP2 的免疫荧光法。分离纯化的细胞在 24 孔板中培养至 3 d 时可使用免疫荧光染色试剂盒进行 MAP2 (万类, 1: 100) 免疫荧光鉴定。方法如下: 首先去除培养基并用 PBS 清洗 2 遍, 然后加入 0.5 mL 4% 多聚甲醛固定液固定 10 min 或更长时间; 去除固定液, 用洗涤液 (TBSTx, 即 0.1% Triton X-100 的 TBS) 洗涤 3 次, 每次 3-5 min; 用含 5% BSA 的 TBSTx 作为封闭液封闭 60 min; 去除封闭液, 室温摇床孵育 MAP2 抗体 60 min 或 4℃ 过夜; 回收一抗, 洗涤液洗涤 3 次, 每次 3-5 min; 加入稀释好的荧光标记的二抗避光孵育 60 min; 回收二抗, 洗涤 3 次后滴加抗荧光猝灭封片液, 随后在荧光显微镜下观察, 拍照并进行分析。

2.2.3 鸡胚胎神经元缺硒模型的建立

待细胞融合达 80% 时 (约 48 h) 更换为缺硒培养基。饲养培养基中硒的来源为 B27 添加剂, 通过调控 B27 的添加量达到控制培养基中硒的含量, 降低 B27 含量 (由常规 2% 降为 0.4%) 的同时补充 10 μg/mL 转铁蛋白和 5 μg/mL 胰岛素以维持细胞营养, 对照组通过补充亚硒酸钠来维持正常硒水平。细胞缺硒培养 24 h 后, 根据试验需要进行后续操作。对照组 (Con Group) 及缺硒组 (-Se Group) 饲养培养基配制见表 2-3, 亚硒酸钠每次现用现配。

表 2-3 缺硒培养基的配制

Table 2-3 The preparation of selenium deficient medium

	Neurobasal	B27 (50×)	转铁蛋白 (10 mg/mL)	胰岛素 (2.5 mg/mL)	亚硒酸钠
Con Group	50 mL	200 μL	25 μL	100 μL	7 ng/mL
-Se Group	50 mL	200 μL	25 μL	100 μL	0 ng/mL

2.2.4 鸡胚胎神经元 SELS 敲低模型的建立及处理

2.2.4.1 鸡胚胎神经元 SELS 敲低模型的建立

待细胞融合达 80% 后 (约 48 h) 进行转染, 设置阴性对照组 (si-NC Group) 和 SELS 敲低组 (si-SELS Group)。小心去除培养基, PBS 轻柔清洗后更换为 800 μL 转染专用培养基 Opti-MEM, 并加入预混好的 RNAiMAX 与 siRNA 复合物 200 μL, 轻柔混匀后置于 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中继续培养。6 h 后去除转染培养基, 更换为不含 GlutaMax 的 2% B27 Neurobasal 培养基继续培养至 24 h, 根据试验需要进行后续操作。所用 siRNA 序列见表 2-4。

表 2-4 Stealth siRNA 序列
Table 2-4 The sequences of Stealth siRNA

siRNA (序列位点)	引物序列
SELS_Stealth (480)	正义链: 5'-CAGCAGUCCCGAAAUCUAAACCAAA-3'
	反义链: 5'-UUUGGUUUAGAUUUCGGGACUGCUG-3'
NC_Stealth	正义链: 5'-ACCAGAUUAGCGUCUCUUUCGUCUC-3'
	反义链: 5'-GAGACGAAAGAGACGCUAAUCUGGU-3'

2.2.4.2 SELS 敲低鸡胚脑神经元 NAC 处理

试验分为 4 组: si-NC、si-SELS、NAC 及 si-SELS+NAC 组。NAC 组和 si-SELS+NAC 组在 si-SELS 转染 6 h 后更换为含 NAC (100 μ M) 不含 GlutaMax 的 2% B27 Neurobasal 培养基继续培养至 24 h, 根据试验需要进行后续操作。

2.2.4.3 SELS 敲低鸡胚脑神经元 E-64 处理

试验分组为: si-NC、si-SELS、E-64 及 si-SELS+E-64 组。E-64 和 si-SELS+E-64 组进行 si-SELS 转染前分别进行 E-64 (10 μ M) 预处理 1 h, 随后进行 si-SELS 转染。转染 6 h 后更换为不含 GlutaMax 的 2% B27 Neurobasal 培养基继续培养至 24 h, 根据试验需要进行后续操作。

2.2.4.4 SELS 敲低鸡胚脑神经元 Pepstatin A 处理

试验分组为: si-NC、si-SELS、Pepstatin A 及 si-SELS+Pepstatin A 组。Pepstatin A 及 si-SELS+Pepstatin A 组进行 si-SELS 转染前分别进行 Pepstatin A (20 μ M) 预处理 1 h, 随后进行 si-SELS 转染。转染 6 h 后更换为不含 GlutaMax 的 2% B27 Neurobasal 培养基继续培养至 24 h, 根据试验需要进行后续操作。

2.2.5 鸡小脑组织病理组织学观察

将固定于福尔马林中的组织进行脱水透明、浸蜡包埋、修片贴片后进行脱蜡染色及脱水封片, 并在光学显微镜下观察拍照记录病理组织学变化。

(1) HE 染色: 石蜡切片依次经二甲苯-酒精-水进行脱蜡, 随后进行苏木素-伊红染色, 蒸馏水洗净染料后并依次经酒精-二甲苯脱水, 最后晾干后用中性树胶封片并在显微下观察, 采集图像进行分析

(2) 镀银染色 (甘氨酸银浸镀神经染色): 石蜡切片依次经二甲苯-酒精-水进行脱蜡, 并通过甘氨酸银染液 C 染色, 甘氨酸银染液 B 处理, 最后进行甘氨酸银染液 A 染色, 随后蒸馏水洗净染料后依次经酒精-二甲苯脱水, 最后晾干后用中性树胶封片并在显微下观察, 采集图像进行分析。

(3) 尼氏体染色 (甲苯胺蓝染色): 蜡切片依次经二甲苯-酒精-水进行脱蜡, 60 $^{\circ}$ C 温箱用 1% 甲苯胺蓝染色 40 min, 随后蒸馏水洗净染料后依次经酒精-二甲苯脱水, 最后晾干后用中性树胶封片并在显微下观察, 采集图像进行分析。

2.2.6 鸡小脑组织凋亡的 TUNEL 法检测

采用 TUNEL 法检测鸡小脑组织中凋亡情况，方法如下：

石蜡切片依次经二甲苯-酒精-水进行脱蜡，蛋白酶 K 修复后进行破膜，试剂 1 (TdT) 和试剂 2 (dUTP) 按 1: 9 混合后覆盖组织，切片平放于湿盒内，37 °C 恒温箱孵育 2 h，随后 DAPI 室温避光 10 min 复染细胞核，PBS 洗涤后晾干，用抗荧光淬灭封片剂封片，在荧光显微镜下观察并采集图像进行分析。

2.2.7 鸡胚胎神经元凋亡的流式细胞术检测

使用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒通过流式细胞术进行凋亡检测，具体操作步骤按表如下：小心吸取细胞上清液于离心管中；细胞用 PBS 清洗两遍后，加入 500 μ L 无 EDTA 胰酶消化 15 s 后加入 1 mL 10% FBS DMEM-F12 终止消化；轻柔地将细胞从培养板吹打下来，收集细胞悬液于已有上清液的离心管中，1200 $\times$ rpm 离心 5 min；PBS 洗涤细胞两次后加入 500 μ L binding buffer；加入 5 μ L Annexin V-FITC，轻轻混匀；加入 5 μ L propidium iodide (PI)，轻轻混匀；1 h 之内完成上机检测。

2.2.8 鸡小脑组织中金属离子水平检测

采用 ICP-MS 法检测鸡小脑组织的金属离子水平。称取小脑组织 1 g，加入 HNO₃ 和 H₂O₂ 于微波消解罐中消解，用去离子水转移消解液于 50 mL 容量瓶中定容。同时作试剂空白，加标回收及国家标准物质验证分析试验。对 ICP-SM 仪器进行工作条件进行优化后上机测定。

2.2.9 鸡小脑组织 mRNA 转录组的检测

流程如下：(1) 总 RNA 提取质检：提取总 RNA，利用 Agilent2100/Labchip 进行检测，检测 RNA 样本是否有降解及杂峰 (RIN/RQS>7)。参考内容：RNA 样本的外观性状是否含有异物；1%琼脂糖电泳检测样品是否有降解以及 RNA 片段的大小；Nanodrop 检测 RNA 纯度 (OD260/280 在 1.8~2.0 之间，OD260/230 在 2.0~2.2 之间)。选取质量最好的样品进行后续实验。(2) 构建 ployA 文库及质检：提取样品总 RNA 后，用带有 Oligo (dT) 的磁珠富集真核生物 mRNA，加入 fragmentation buffer 将 mRNA 打断成短片段，以 mRNA 为模板，用六碱基随机引物 (random hexamers) 合成第一条 cDNA 链，然后加入缓冲液、dNTPs、RNaseH 和 DNA polymerase I 合成第二条 cDNA 链，在经过 PCR 纯化并加 EB 缓冲液洗脱之后做末端修复、加 A 并连接测序接头，然后用琼脂糖凝胶电泳进行片段大小选择，最后进行 PCR 扩增，建好的测序文库 (200~300 bp) 进行文库质检。(3) 上机测序：质检合格的样品进行测序。

数据分析：将下机数据进行过滤得到 Clean reads，将 Clean reads 与参考基因组序列进行比对，根据基因组的注释文件和 reads 比对到基因组的位置，统计每个基因包含的 reads 数即

表达量, 然后进行统计检验获得差异表达基因, 最后对差异表达基因进行功能注释及 GO、KEGG 富集检验, 获得差异表达基因所富集的 GO、KEGG 集合。

2.2.10 鸡胚胎神经元 ROS 水平的检测

细胞处理结束后, 去除培养基并用 PBS 洗涤 2 遍后, 加入 1 mL 含 1 μ L DCFH-DA 荧光探针的无血清 DMEM-F12 培养基于 37℃ 继续培养 20~30 min 后, 去除培养基并用 PBS 洗涤 3 遍以去除残留探针, 最后加入 1 mL DMEM-F12 培养基在荧光显微镜下观察 ROS 荧光变化并拍照分析。

2.2.11 鸡胚小脑组织及脑神经元抗氧化水平的检测

(1) 根据试剂盒说明书, 使用生理盐水制备适宜浓度的新鲜组织匀浆液 (在 10% 基础上用生理盐水进行稀释)。(2) 细胞处理结束后, PBS 洗涤 2 遍后, 胰酶消化收集细胞并用生理盐水洗涤 2 遍后使用细胞超声破碎仪破碎细胞后 3000×rpm 离心 10 min 取上清液。随后按照各说明书步骤进行操作, 最终检测前将混合液转移至 96 孔板 (每孔加入 200 μ L) 中, 并利用酶标仪测量其 OD 值, 最后根据说明书提供的计算方法计算结果。检测的指标有: 考马斯亮蓝蛋白浓度、超氧化物歧化酶 (SOD) 酶活力、过氧化氢酶 (CAT) 酶活力、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 酶活力、总抗氧化能力 (T-AOC)、诱导性一氧化氮合酶 (iNOS) 酶活力、一氧化氮 (NO) 含量、过氧化氢 (H_2O_2) 含量、脂质过氧化物 (LPO) 及丙二醛 (MDA) 含量。

2.2.12 鸡胚胎神经元溶酶体 pH 检测

细胞处理结束后, 去除培养基并用 PBS 洗涤 2 遍后, 加入 1 mL 含 Lyso-Tracker-Red 荧光探针的培养基于 37℃ 继续培养 30~60 min 后, 去除培养基并用 PBS 洗涤 3 遍以去除残留探针, 最后加入 1 mL 培养基在荧光显微镜下观察荧光变化并拍照分析。

2.2.13 鸡小脑组织及鸡胚胎神经元中溶酶体的提取

使用 Sigma 溶酶体试剂盒提取新鲜组织和脑神经元中溶酶体。提取过程中获取的胞浆组分和溶酶体组分可用于酶活性的检测及蛋白提取。

2.2.13.1 鸡小脑组织中溶酶体的提取

取样前动物禁食一晚, 第二天处死获取新鲜小脑组织; 用预冷的 PBS 仔细温柔清洗组织, 随后放到吸水纸上, 仔细去除多余脂肪和血管膜, 并剪成 1.5~2 cm 大小再次清洗; 吸水纸吸走多余水分并进行称重, 并将组织剪成 0.3-0.5 大小, 转移到玻璃匀浆器中; 加入 4 倍体积的 1×Extraction Buffer (如 1 g 加 4 mL), 并进行匀浆, 大约 20~30 次左右; 将液体转移到离心管中, 1000×g, 4℃ 离心 10 min; 取上清于新的离心管中, 20000×g, 4℃ 离心 20 min, 沉淀为粗提溶酶体组分, 上清为胞浆组分。用适量 1×Extraction Buffer 重悬粗提溶酶体组分, 进

行密度梯度超速离心, 150000×g, 4℃离心 4 h, 沉淀即为提纯的溶酶体组分。

2.2.13.2 鸡胚胎神经元中溶酶体的提取

细胞处理后, 使用 EDTA 胰酶消化细胞, 并 600×g, 4℃离心 5 min 收集细胞, 并用 PBS 清洗两次; 加入适量 1×Extraction Buffer 重悬细胞; 将细胞悬液转移到预冷的玻璃匀浆器中进行匀浆, 大约 20~30 次左右; 将液体转移到离心管中, 1000×g, 4℃离心 10 min; 取上清于新的离心管中, 20000×g, 4℃离心 20 min, 沉淀为粗提溶酶体组分, 上清为胞浆组分。用适量 1×Extraction Buffer 重悬粗提溶酶体组分, 进行密度梯度超速离心, 150000×g, 4℃离心 4 h, 沉淀即为提纯的溶酶体组分。

2.2.14 鸡小脑组织中溶酶体标志酶活性的检测

分别检测组织中和溶酶体中酸性磷酸酶 (ACP) 和 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (NAG) 的酶活力。制备 10% 的新鲜组织匀浆液, 同时提取组织中溶酶体。根据试剂盒说明书按步骤进行操作, 最终检测前将混合液转移至 96 孔板 (每孔加入 200 μ L) 中, 并利用酶标仪测量其 OD 值, 最后根据说明书提供的计算方法计算结果。

2.2.15 鸡小脑组织及脑神经元免疫荧光检测

(1) 组织免疫荧光检测: 石蜡切片依次经二甲苯-酒精-水进行脱蜡, 蛋白酶 K 修复后用固定液固定 10 min 或更长时间 (可 4℃过夜); (2) 细胞免疫荧光检测: 细胞在 24 孔板中培养处理后, 首先去除培养基并用 PBS 清洗 2 遍, 然后加入 0.5 mL 4% 多聚甲醛固定液固定 10 min 或更长时间, 之后操作同 2.2.2.2。本试验用免疫荧光检测的抗体见表 2-5:

表 2-5 用于免疫荧光检测的抗体

Table 2-5 Antibodies for immunofluorescence detection

抗体	厂家	稀释倍数
α -syn	Abclonal	1: 100
P62	Abclonal	1: 100
CTSB	Abclonal	1: 100
CTSD	Abclonal	1: 100
ATP6V1B2	Immunoway	1: 100
MCOLN1	博奥森	1: 100
山羊抗兔 IgG-Alexa Fluor 488	博奥龙	1: 1000
山羊抗兔 IgG-Dylight 594	博奥龙	1: 1000

2.2.16 鸡小脑组织及鸡胚胎神经元中 RNA 提取及 RT-PCR 检测

采用经典 Trizol 法提取鸡小脑组织及鸡胚胎神经元中总 RNA。方法如下: (1) 称取 60~100 mg 小脑组织置于预冷的研钵中, 加入液氮研磨至粉末状后加入 1 mL Trizol 充分混匀并转移

至到 1.5 mL EP 管中静置 5~10 min; (2) 细胞处理结束后, 去掉培养基, PBS 轻柔洗涤两遍后, 加入 Trizol 并用细胞刮刀充分研磨后转移 1.5 mL EP 管中静置 5~10 min。然后, 按照表 2-6 步骤进行鸡小脑组织及鸡胚脑神经元中总 RNA 的提取并根据 Bio RT Master HiSensi cDNA First Strand Synthesis Kit 试剂盒配制反转录体系 (10 μ L): 5 μ L Hybrid mix, 0.5 μ L Enzyme mix, 1 pg~2 μ g RNA, 补充 Nuclease-free 水至 10 μ L。随后反转录成 cDNA, 过程如下: 37 $^{\circ}$ C 逆转录 20 min, 95 $^{\circ}$ C 酶失活 5 min 后于 -20 $^{\circ}$ C 保存 (此过程中使用的吸头及 EP 管均经过 RNA 酶灭活无菌处理)。

表 2-6 RNA 提取步骤
Table 2-6 RNA extraction steps

步骤	试剂	操作
1	400 μ L 氯仿	剧烈震荡 15 s, 静置 5~10 min, 4 $^{\circ}$ C 12000 $\times$ g 离心 15 min, 取上清于新的 EP 管中
2	等体积预冷的异丙醇	轻柔混匀, 静置 5~10 min, 4 $^{\circ}$ C 12000 $\times$ g 离心 15 min, 弃上清, 白色沉淀即为 RNA
3	1 mL 75% DEPC 酒精	轻轻吹打, 4 $^{\circ}$ C 7500 $\times$ g 离心 5 min, 弃上清, 静置干燥
4	20~40 μ L DEPC 水	轻柔吹打溶解 RNA, 并测定浓度及纯度

RT-PCR 采用的是经典的 SYBR Green 荧光染料法。按照 BioEasy Master Mix 试剂盒使用说明书进行, 反应体系为 10 μ L (3.4 μ L PCR 等级水; 5 μ L 荧光染料; 0.3 μ L 上游引物; 0.3 μ L 下游引物; 1 μ L cDNA)。本试验所用引物均由上海生工有限公司合成, 引物序列见表 2-7。利用 QuantGene 9600 System 进行检测, 反应过程如下: 95 $^{\circ}$ C, 1 min; 95 $^{\circ}$ C, 15 s, 60 $^{\circ}$ C, 1 min, 循环 40 次; 最后进行融解反应 (95 $^{\circ}$ C, 1 min; 65 $^{\circ}$ C, 1 min; 95 $^{\circ}$ C, 20 s, 步进 0.5 $^{\circ}$ C/s; 30 $^{\circ}$ C, 1 min)。每个样品平行做 3 个重复孔, 以 β -actin 为内参, 进行基因 mRNA 表达水平相对定量分析, 最后采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算, 其中:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{参照基因}})_{\text{处理组}} - (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{参照基因}})_{\text{对照组}}$$

表 2-7 所用引物

Table 2-7 Primers used in this study

基因	上游引物	下游引物
β -actin	CCGCTCTATGAAGGCTACGC	CTCTCGGCTGTGGTGGTGAA
SELS	GCGTCGCCATCTATCTCATCGT	TCTTCTGCCTTCGCTTCTGTTCTT
GRP78	GATTGGACAAGAGAGAGGGTGA	CCATAACACGCTGGTCAAAGTC
XBP1	TTCGGCTTTCTGGACAGTCT	GGAGGTCGGTATGGAATTTG
ATF4	TCACCCAATGACAACCCG	TCACCTTTGCTGACGCTACC
ATF6	CGTCGTCTGAACCACTTACTGA	CCTTCTTTCTAACAGCCACAC
CTSB	CGGCAGAGGATTTGCTGT	TAGAGACCCCCAGACACGAG
CTSD	CCAAGGAAGTGAAGGAGCTG	GTGACAACAGGCAGAGACGA
ATP6V1A	CGGGACGACTGGCTGAAATGC	AACAATCGTGACGCTGCCTTCC

(转下页)

(接上页)

基因	上游引物	下游引物
ATP6V1B2	ACTGCCCTCCTTGTCTCGACTG	CTTCATGGCCTGCACGTCCTTC
ATP6V1D	GGCAAGGACCGCATCGAGATC	AATCGGAGCGTCAAAGCGTCAG
MCOLN1	GCTGACATCAAGGAGTGCAA	GGCACAGAGGATGAAGGAGA
BCL2	ATCGTCGCCTTCTTCGAGTT	ATCCCATCCTCCGTTGTCCT
BAX	TCATGGGCTGGACATTGGAC	GCGTCCCAAAGTAGGAGAGG
CAS9	CCGAAGGAGCAAGCACG	AGGTTGGACTGGGATGGAC
CAS3	CATCTGCATCCGTGCCTGA	CTCTCGGCTGTGGTGGTGAA
GPX1	ACGGCGCATCTTCCAAAG	TGTTCCCCCAACCATTTCTC
GPX2	ACGGCACCAACGAGGAGAT	TTCAGGTAGGCGAAGACGG
GPX3	CCTGCAGTACCTCGAACTGA	CTTCAGTGCAGGGAGGATCT
GPX4	CTTCGTCTGCATCATCACCAA	TCGACGAGCTGAGTGTAATTCAC
DIO1	GCGCTATACCACAGGCAGTA	GGTCTTGCAAATGTCACCAC
DIO2	ATTTGCTGATCACGCTTCAG	GCTCAGAAACAGCACCATGT
DIO3	CTGTGCATTGCAAGAAGAT	GCCGACTTGAAGAAGTCCAG
TXNRD1	TACGCCTCTGGGAAATTCGT	CTTGCAAGGCTTGTCCCAGTA
TXNRD2	GCTCTTAAAGATGCCAGCACTAC	GAACAGCTTGAGCCATCACAGA
TXNRD3	CCTGGCAAAACGCTAGTTGTG	CGCACCATTACTGTGACATCTAGAC
SELN	CAGGATCCATGCTGAGTTCCA	GAGAGGACGATGTAACCCGTAAAC
SELK	GAAGAGGGCCTCCAGGAAAT	CAGCCATTGGTGGTGGACTAG
SELW	TGGTGTGGGTCTGCTTTACG	CCAAAGCTGGAAGGTGCAA
SELT	AGGAGTACATGCGGGTCATCA	GACAGACAGGAAGGATGCTATGTG
SELH	CATCGAGCACTGCCGTAG	GACACCTCGAAGCTGTTCTC
SELM	AAGAAGGACCACCCAGACCT	GCTGTCTGTCTCCCTC ATC
SEP15	ACTTGGCTTCTCCAGTAACTTGCT	GCCTACAGAATGGATCCAACTGA
SELI	TGCCAGCCTCTGAACTGGAT	TGCAAACCCAGACATCACCAT
SELU	GATGCTTTCAGGCTTCTTCC	CTGTCTTCTGTCTCCAATCA
SELPb	AGGCCAACAGTACCATGGAG	GTGGTGAGGATGGAGATGGT
SELP	CCAAGTGGTCAGCATTACATC	ATGACGACCACCCTCACGAT
SELO	CCAGCGTTAACCGGAATGAT	ATGCGCCTCCTGGATTCT
SEPX1	TGGCAAGTGTGGCAATGG	GAATTTGAGCGAGCTGCTGAAT
SPS2	CGTTGGGTATCGGAACTGAC	CGTCCACCAGAGGGTAGAAA

2.2.17 鸡小脑组织及鸡胚胎神经元总蛋白提取及 Western Blot 检测

(1) 称取 60~100 mg 小脑组织置于预冷的匀浆器中, 加入 1 mL 含 10 mM PMSF 的裂解液充分研磨裂解, 将液体移入 1.5 mL EP 管中, 置于冰上静置 10 min 以充分裂解,; (2) 细

胞处理结束后,胰酶消化收集细胞,PBS 轻柔洗涤两遍后,加入裂解液置于冰上并用细胞破碎超声仪进行破碎。随后,4℃ 12000×g 离心 15 min,上清即为总蛋白,测定其浓度并调成各样品浓度体积一致,随后加入 SDS 上样缓冲液于沸水浴中煮 10~15 min,分装后于-20℃保存备用。提取的总蛋白可进行 Western Blot 检测,步骤见表 2-8。

表 2-8 Western Blot 步骤

Table 2-8 Western Blot steps

步骤	过程	操作
1	SDS-PAGE 凝胶电泳	80V 35 min, 120V 1 h
2	转膜	200 mA 1 h (具体时间根据目地蛋白大小进行调整)
3	封闭	5% TBST-脱脂乳, 37℃, 2 h (或 5% TBST-BSA, 37℃, 1 h)
4	一抗孵育	4℃过夜, TBST 清洗 3 遍, 每遍 15 min
5	二抗孵育	室温 90 min, TBST 清洗 3 遍, 每遍 15 min, 蒸馏水 1 遍 15 min
6	化学发光	100~200 μL 发光液 (A: B=1: 1)

利用化学发光系统进行曝光及拍照,并用 Image J 软件进行蛋白条带灰度计算。蛋白表达水平用蛋白灰度值/ACTB 灰度值计算并以“Fold of Con”进行处理后制作柱状图。本试验所用抗体见表 2-9。

表 2-9 所用抗体

Table 2-9 The antibodies used in this study

抗体	厂家	稀释倍数	大小
ACTB (β-actin)	Abclonal	1: 100000	43 kDa
SELS	Sigma	1: 1000	21 kDa
GRP78	万类	1: 500	78 kDa
IRE1	万类	1: 500	120 kDa
XBP1	万类	1: 500	29/40 kDa
ATF4	万类	1: 500	39 kDa
ATF6	万类	1: 500	75 kDa
PERK	万类	1: 500	125 kDa
LAMP2	万类	1: 500	120 kDa
CTSB	Abclonal	1: 1000	38/44 kDa
CTSD	Abclonal	1: 1000	28/44 kDa
ATP6V1A	Immunoway	1: 1000	67 kDa
ATP6V1B2	Immunoway	1: 1000	57 kDa
ATP6V1D	Immunoway	1: 1000	28/35 kDa
MCOLN1	博奥森	1: 1000	65 kDa
LC3	Abclonal	1: 1000	14/16 kDa
P62	Abclonal	1: 1000	62 kDa

(转下页)

(接上页)

抗体	厂家	稀释倍数	大小
BCL2	万类	1: 500	26 kDa
BAX	万类	1: 500	21 kDa
cle-CAS9	Abclonal	1: 1000	17/35 kDa
cle-CAS3	万类	1: 500	17/35 kDa
GPX1	万类	1: 500	23 kDa
山羊抗兔 IgG (H&L)	Immunoway	1: 10000	二抗

2.2.18 鸡小脑组织及鸡胚胎脑神经元硒蛋白 S (SELS) 及内质网应激的检测

采用 RT-PCR 及 Western Blot 技术检测鸡小脑组织中 SELS 及内质网应激相关基因 GRP78、XBP1、ATF4 和 ATF6 mRNA 表达水平及 GRP78、IRE1、XBP1、ATF4、ATF6 和 PERK 蛋白表达水平, 所用方法同 2.2.16 及 2.2.17。

2.2.19 鸡小脑组织及鸡胚胎脑神经元中溶酶体相关基因的检测

采用 RT-PCR 技术检测小脑组织及脑神经元中溶酶体相关基因 CTSB、CTSD、ATP6V1A、ATP6V1B2、ATP6V1D 及 MCOLN1 的 mRNA 表达水平, 所用方法同 2.2.16。

采用 Western Blot 技术检测小脑组织及脑神经元中总蛋白中 CTSB 和 CTSD 蛋白表达水平, 胞浆组分中 CTSB 和 CTSD 蛋白表达水平, 以及溶酶体组分中 CTSB、CTSD、ATP6V1A、ATP6V1B2、ATP6V1D 及 MCOLN1 的蛋白表达水平, 所用方法同 2.2.17。

2.2.20 鸡小脑组织及鸡胚胎脑神经元中自噬流基因检测

采用 Western Blot 技术检测鸡小脑组织中自噬流相关基因 LC3-2 和 P62 的蛋白表达水平, 所用方法同 2.2.17。

2.2.21 鸡小脑组织及鸡脑神经元中凋亡基因检测

使用 RT-PCR 及 Western Blot 技术检测小脑组织及脑神经元凋亡相关基因 BCL2、BAX、CAS9 和 CAS3 mRNA 表达水平及 BCL2、BAX、cle-CAS9 和 cle-CAS3 蛋白表达水平, 所用方法同 2.2.16 及 2.2.17。

2.3 试验数据的统计与分析

所有的数据均用 Microsoft Office Excel 2019、SPSS 18.0 和 Graphpad prism 8 进行统计、分析及作图。所有数值均表示为“mean±SD”的形式。 $p<0.05$ 被认为具有显著性差异，两组之间差异性分析采用 t-test 法，多组之间采用 one-way ANOVA 法。试验结果中，标有*符号或不同字母的表示存在显著性差异($p<0.05$)，标有“ns”或相同字母的表示差异不显著($p>0.05$)。

3 结果与分析

3.1 缺硒鸡小脑组织相关指标检测结果

3.1.1 缺硒鸡小脑组织病理结构观察结果

鸡在饲喂缺硒日粮 20~30 d 时,陆续出现硒缺乏典型症状-渗出性素质,以胸、腹部皮下出现淡绿色胶冻样物质为主要特征,代表着鸡缺硒模型建立成功。如图 3-1 所示,HE 染色结果显示,缺硒可导致鸡小脑颗粒层变薄,小脑白质增多(红框),浦肯野细胞减少甚至消失(黑箭头),嗜酸性浦肯野细胞增多(蓝箭头),白质区少量神经元死亡(红箭头),但并未见明显的炎性细胞浸润。镀银染色是神经元和神经纤维的主要染色法,如图 3-2 所示,镀银染色结果显示,缺硒导致小脑浦肯野细胞减少,浦肯野细胞层中神经纤维堆积缠结(紫色箭头),此外颗粒层神经纤维杂乱稀少(黑框)。尼氏体是神经元胞体或树突内大的嗜碱性团块和颗粒,负责合成更新细胞器所需的结构蛋白、合成神经递质所需的酶类以及肽类的神经调质,当神经元受到损伤或过度疲劳时,尼氏体可减少、解体甚至消失,故尼氏体可作为神经元功能状态的标志。如图 3-3 所示,尼氏体染色结果显示,缺硒可导致小脑组织尼氏体数量减少。 α -syn 是脑内一种含量丰富的可溶性蛋白质,正常情况下以可溶的单体形式存在,当其聚集成不溶性寡聚体时,可引起神经元细胞死亡。如图 3-4 所示, α -syn 免疫荧光染色结果显示,缺硒可导致小脑组织中 α -syn 表达量增多,并出现大量聚集。以上结果表明,缺硒引起鸡小脑组织损伤。

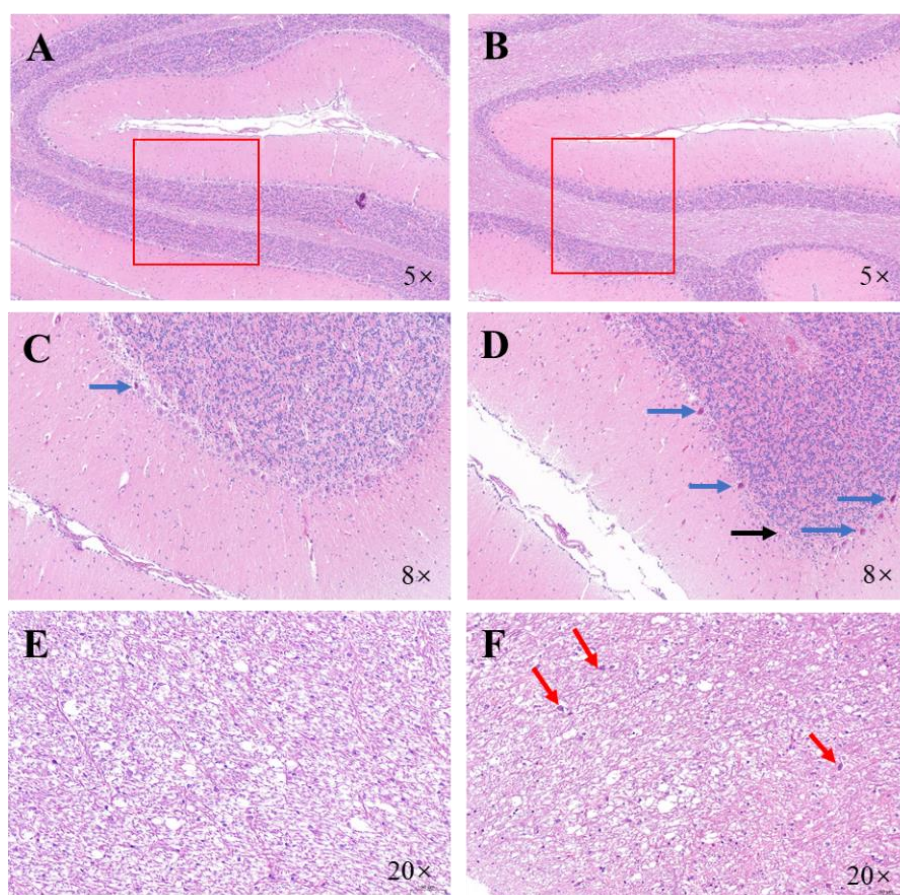


图 3-1 鸡小脑组织 HE 染色结果，A、C、E：对照组；B、D、F：缺硒组。
Figure 3-1 HE staining of chicken cerebellum, A, C and E: Con Group; B, D and F: -Se Group.

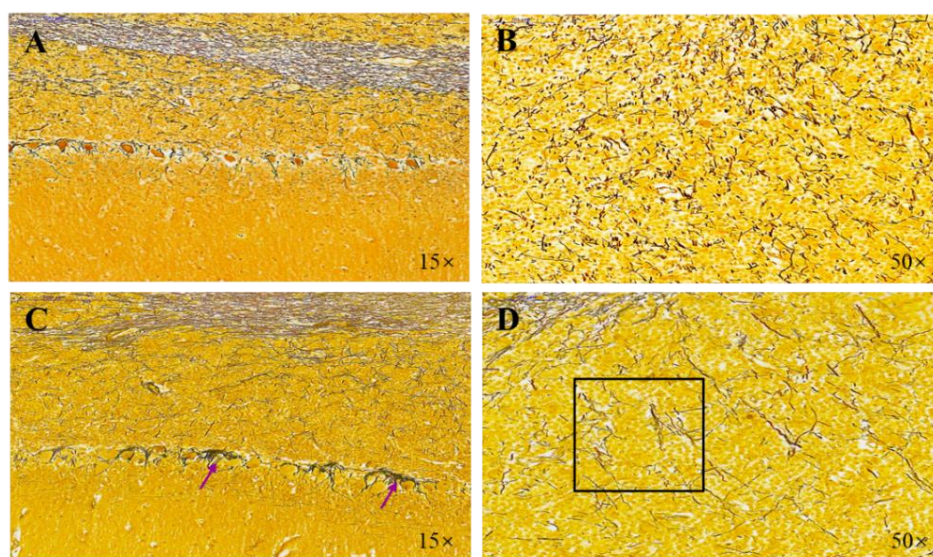


图 3-2 鸡小脑组织镀银染色结果，A 和 B：对照组；C 和 D：缺硒组
Figure 3-2 Silver staining of chicken cerebellum, A and B: Con Group; C and D: -Se Group.

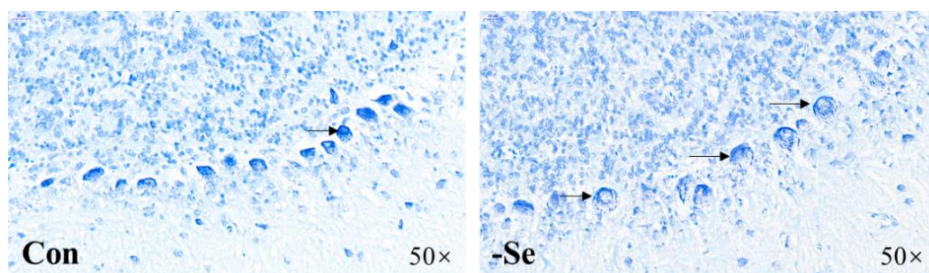


图 3-3 鸡小脑组织尼氏体染色结果

Figure 3-3 Nissl body staining results of chicken cerebellum

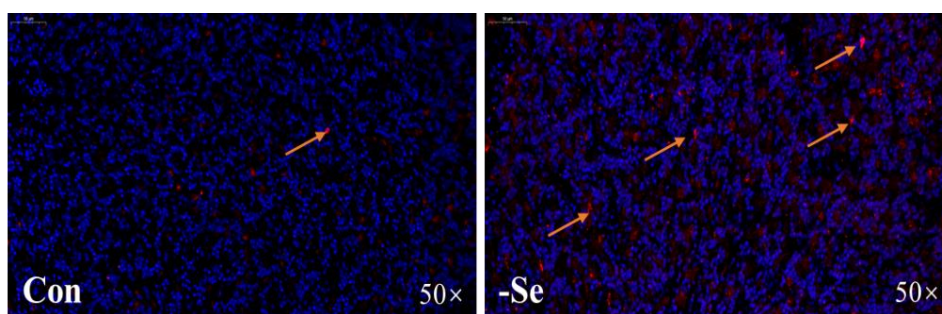


图 3-4 鸡小脑组织 α -syn 染色结果

Figure 3-4 α -syn staining results of chicken cerebellum

3.1.2 缺硒鸡小脑组织凋亡 TUNEL 法检测结果

如图 3-5 所示，TUNEL 法检测结果显示，缺硒导致鸡小脑组织中细胞凋亡数量增加，表明缺硒可诱导鸡小脑组织细胞凋亡的发生，从而诱发小脑损伤。

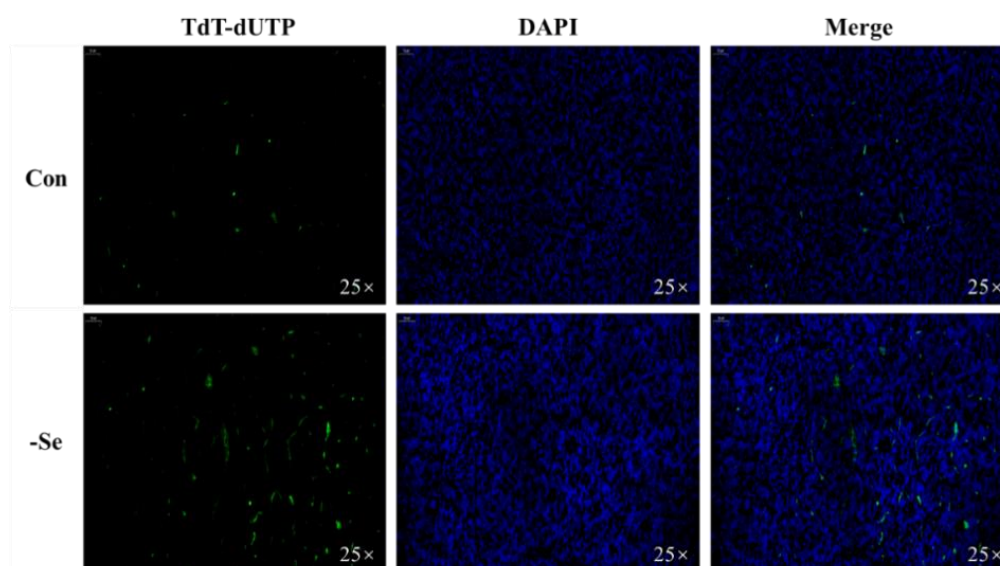


图 3-5 鸡小脑组织 TUNEL 染色结果

Figure 3-5 TUNEL staining results of chicken cerebellum

3.1.3 缺硒鸡小脑组织金属离子水平检测结果

对鸡血清及小脑组织中硒含量进行检测，如图 3-6 所示，正常情况下，小脑中硒水平与血清中基本一致（血清 $180.015 \pm 0.689 \mu\text{g/Kg}$ ，小脑 $173.963 \pm 10.842 \mu\text{g/Kg}$ ），缺硒导致鸡血清中硒含量降低 77%（缺硒组为 $41.728 \pm 2.952 \mu\text{g/Kg}$ ）（ $p < 0.05$ ），小脑中硒含量降低 32%（缺硒组为 $117.840 \pm 4.141 \mu\text{g/Kg}$ ）（ $p < 0.05$ ），表明日粮硒缺乏引起小脑硒含量降低，且小脑中缺硒程度远低于机体总体缺硒水平，表明在机体缺硒情况下小脑仍可以维持一定硒含量。

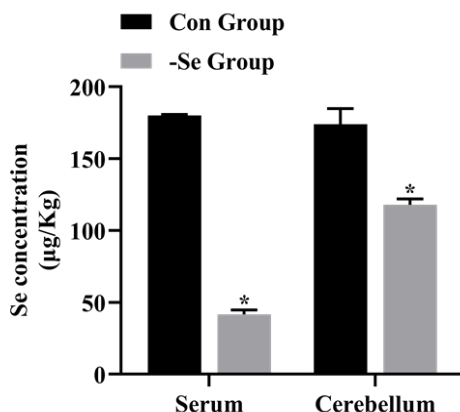


图 3-6 缺硒对鸡血清及小脑中硒含量的影响

Figure 3-6 The effect of Se-deficiency on Se concentration in chicken serum and cerebellum

此外，对血清及小脑组织中其他 25 种离子水平进行检测，如附表 2、3 和图 3-7 所示，缺硒可导致鸡小脑组织中常量元素 K 含量降低（ $p < 0.05$ ），Ca 含量增加（ $p < 0.05$ ），微量元素 Fe、Zn、B、Ni 含量降低（ $p < 0.05$ ），Cr、Mo、V 含量增加（ $p < 0.05$ ）。同时缺硒导致小脑组织中毒性金属离子 Cd 含量升高（ $p < 0.05$ ），而 Hg 和 Sb 含量降低（ $p < 0.05$ ），其他元素不受硒缺乏的影响（ $p > 0.05$ ）。结果表明，缺硒影响鸡小脑组织中金属离子稳态。

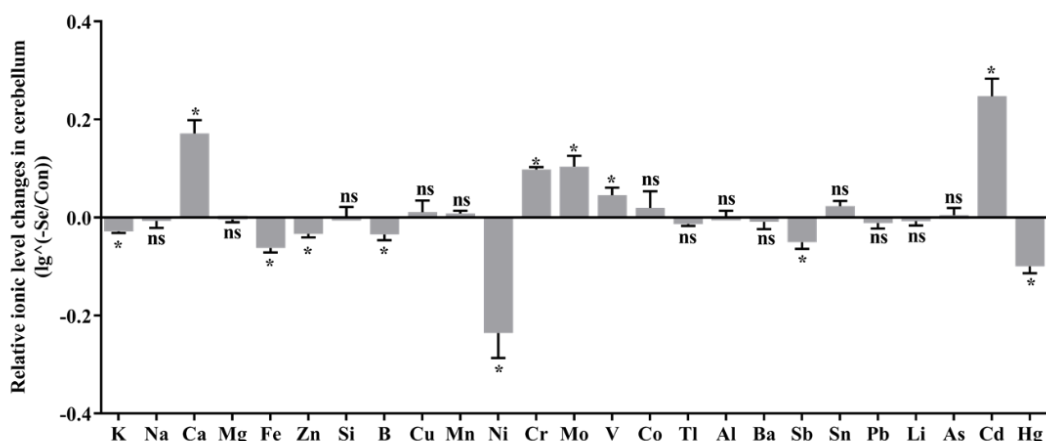


图 3-7 缺硒对鸡小脑组织离子水平的影响

Fig. 3-7 The effect of Se-deficiency on ionic level in chicken cerebellum

3.1.4 缺硒鸡小脑组织 mRNA 转录组检测结果

3.1.4.1 缺硒鸡小脑组织差异 mRNA 筛选结果

为揭示缺硒造成鸡小脑损伤的机制,对对照组和缺硒组小脑进行 mRNA 转录组测序。如图 3-8 火山图所示, mRNA 转录组测序结果显示,缺硒可导致鸡小脑组织中 421 个基因差异表达,其中有 171 个差异表达上调,250 个差异表达下调 ($|\log_2(\text{Fold change})| > 0.585$ 和 $p\text{-value} < 0.05$)。

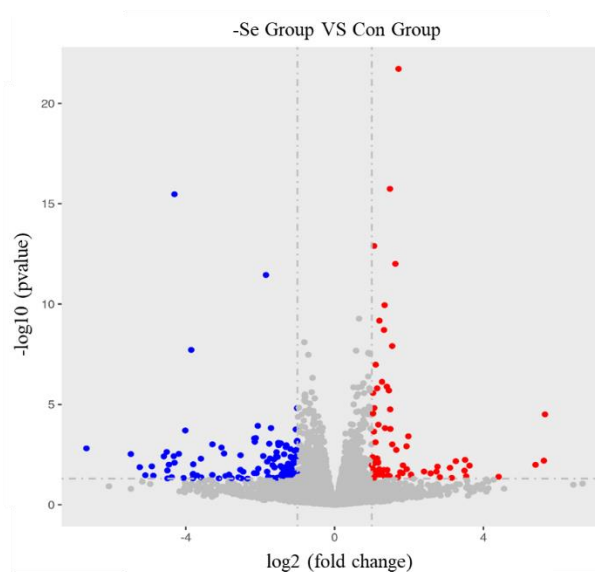


图 3-8 基因表达分析火山图,蓝色:下调基因,红色:上调基因,灰色:非差异基因

Figure 3-8 Volcanic map for genes expression analysis, blue: down regulated genes, red: up regulated genes, gray: no different genes

3.1.4.2 缺硒鸡小脑组织差异 mRNA 功能富集分析

对差异 mRNA 进行 GO (Gene Ontology) 富集分析,如图 3-9 所示,BP 域 (biological process, 生物过程) 方面差异表达基因主要集中在补体激活、补体激活 (经典途径)、免疫反应、免疫球蛋白产生、细胞迁移的正调控、细胞表面受体信号、过氧化氢分解代谢过程、toll 样受体信号通路通、转化生长因子对产量的正调节及凋亡 DNA 断裂等。CC 域 (cellular component, 细胞组分) 方面差异表达基因主要集中在胞外区、细胞外间隙、质膜的组成成分、免疫球蛋白复合物、质膜外侧、细胞表面、突触后密度、囊泡、双细胞紧密连接及钙通道复合体等。MF 域 (molecular function, 分子功能) 方面差异表达基因主要集中在金属离子结合、钙离子结合、金属内肽酶活性、铁离子结合、毒素活性、肽酶激活剂活性、胶原结合、NAD(P)⁺ 核苷酶活性、ATP 酶偶联膜内脂质转运蛋白活性及氧化还原酶活性等。

对差异的 mRNA 进行 KEGG 富集分析,如图 3-10 所示,KEGG 富集结果显示差异 mRNA 主要参与到代谢途径、神经活性配体受体相互作用、吞噬体、MAPK 信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、钙信号通路、内吞作用、细胞粘附分子、组氨酸代谢、精氨酸和脯氨

酸代谢、Toll 样受体信号通路、NOD 样受体信号通路、花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢及溶酶体等信号通路。

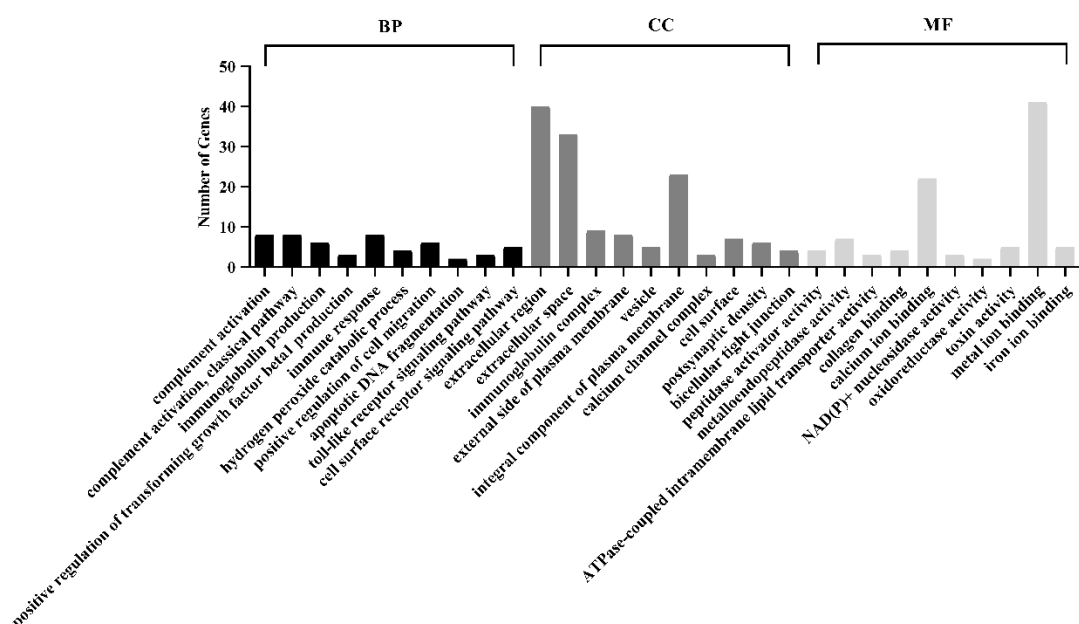


图 3-9 鸡小脑中差异 mRNA 的 GO 富集图

Figure 3-9 GO enrichment of differentially expressed mRNAs in chicken cerebellum

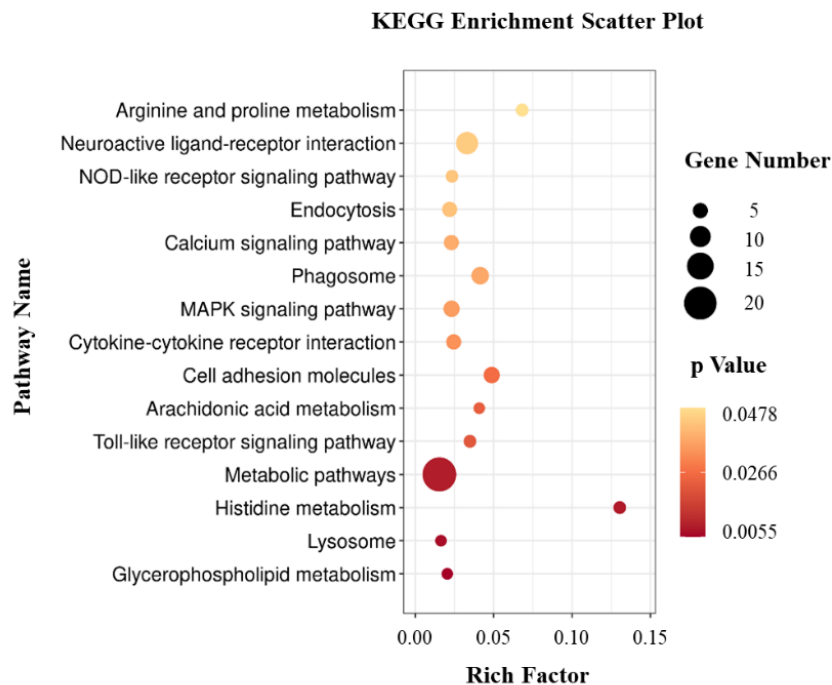


图 3-10 鸡小脑中差异 mRNA 的 KEGG 富集图

Figure 3-10 KEGG enrichment of differentially expressed mRNAs in chicken cerebellum

3.1.5 缺硒鸡小脑组织 SELS 表达及内质网应激指标检测结果

如图 3-11 所示, 缺硒引起鸡小脑组织中 SELS mRNA 和蛋白水平降低 ($p<0.05$)。进一步对内质网应激相关指标进行检测, 如图 3-12 所示, 缺硒导致鸡小脑组织中内质网应激相关基因 GRP78、XBP1、ATF4 和 ATF6 mRNA 表达水平显著升高, 同时 GRP78、IRE1、XBP1、PERK、ATF4 和 ATF6 的蛋白表达水平升高 ($p<0.05$), 这一结果表明, 缺硒导致鸡小脑 SELS 表达降低和内质网应激的发生。

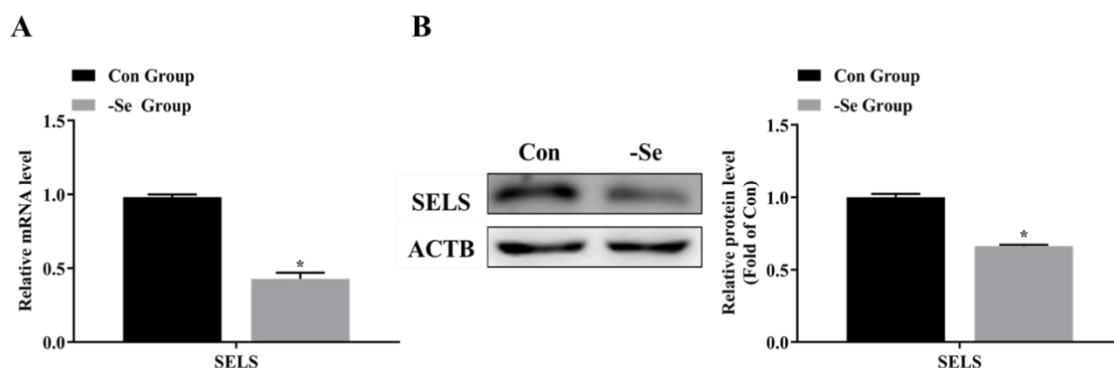


图 3-11 缺硒对鸡小脑组织中 SELS 表达的影响, A: mRNA 水平; B: 蛋白水平
Figure 3-11 The effect of Se-deficiency on SELS expression in chicken cerebellum, A: mRNA level; B: protein level

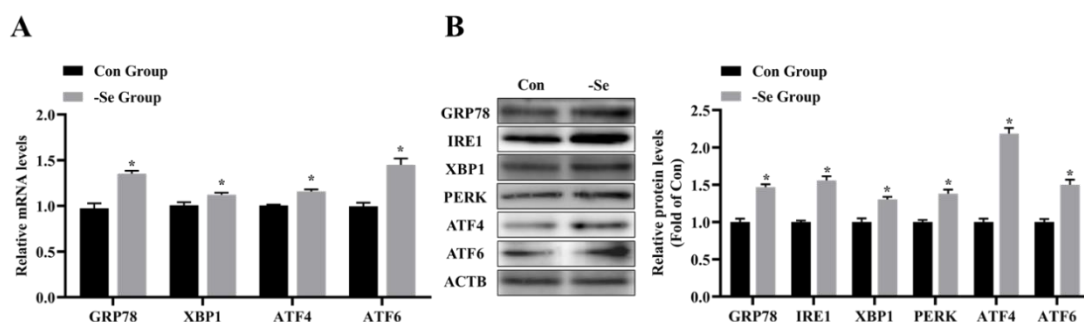


图 3-12 缺硒对鸡小脑组织中内质网应激指标的影响, A: mRNA 水平; B: 蛋白水平
Figure 3-12 The effect of Se-deficiency on ER-stress related indexes in chicken cerebellum, A: mRNA level; B: protein level

3.1.6 缺硒鸡小脑组织抗氧化水平检测结果

如图 3-13 所示, 缺硒引起小脑组织引起抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-Px 活性及 T-AOC 的降低 ($p<0.05$), 同时 iNOS、NO、H₂O₂、LPO 及 MDA 水平升高 ($p<0.05$), 结果表明缺硒降低鸡小脑组织中抗氧化酶的活性, 增加自由基含量, 引起脂质过氧化, 导致鸡小脑组织氧化应激的发生。

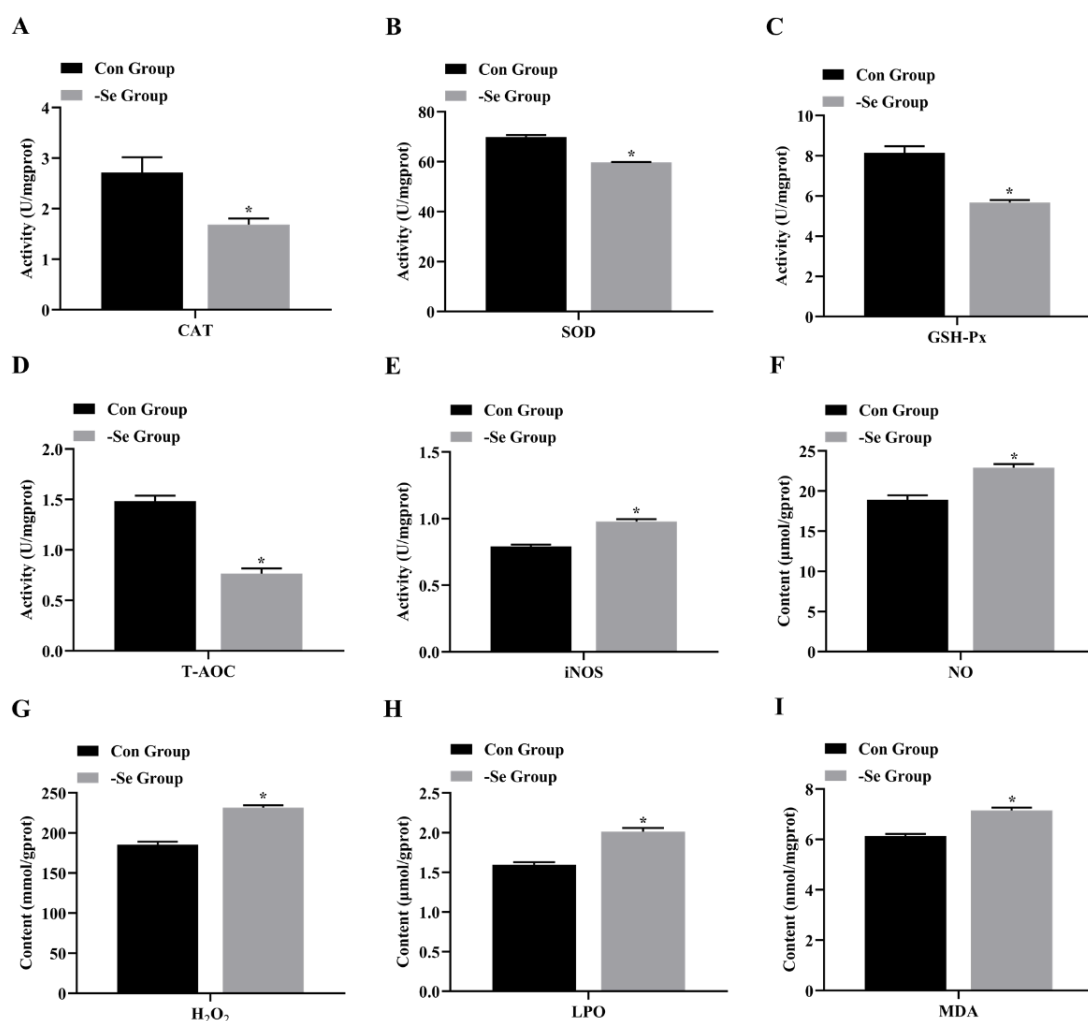


图 3-13 缺硒对鸡小脑组织抗氧化能力的影响，A：CAT 活性；B：SOD 活性；C：GSH-Px 活性；D：T-AOC 活性；E：iNOS 活性；F：NO 含量；G：H₂O₂ 含量；H：LPO 含量；I：MDA 含量

Figure 3-13 The effect of Se-deficiency on antioxidative ability in chicken cerebellum, A: CAT activity; B: SOD activity; C: GSH-Px activity; D: T-AOC activity; E: iNOS activity; F: NO content; G: H₂O₂ content; H: LPO content; I: MDA content

3.1.7 缺硒鸡小脑组织溶酶体稳态检测结果

3.1.7.1 缺硒鸡小脑组织溶酶体 V-ATPase 检测结果

如图 3-14 所示，缺硒导致鸡小脑组织中 ATP6V1A、ATP6V1B2 及 ATP6V1D mRNA 表达水平降低 ($p < 0.05$)，同时降低小脑组织中溶酶体中 ATP6V1A、ATP6V1B2 及 ATP6V1D 的蛋白表达 ($p < 0.05$)，这一结果表明，缺硒抑制溶酶体 V-ATPase 的活性，导致溶酶体酸化受损。

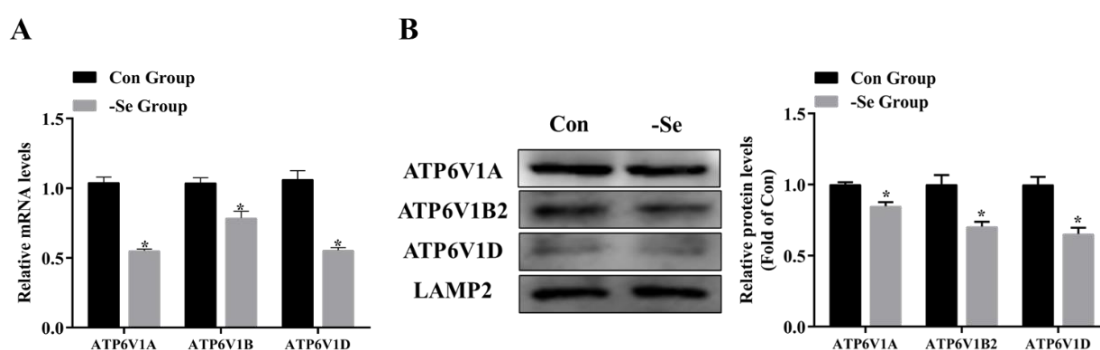


图 3-14 缺硒对鸡小脑溶酶体 V-ATPase 的影响, A: mRNA 水平; B: 蛋白水平

Figure 3-14 The effect of Se-deficiency on lysosomal V-ATPase in chicken cerebellum, A: mRNA level; B: protein level

3.1.7.2 缺硒鸡小脑组织溶酶体酶活力检测结果

为探讨缺硒对鸡小脑溶酶体酶的影响,本研究分别检测组织匀浆液和溶酶体组分中溶酶体特征酶-酸性磷酸酶 (ACP) 和 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (NAG) 的酶活力,如图 3-15 所示,缺硒导致小脑组织中 ACP 和 NAG 中酶活力减低 ($p < 0.05$),同时对溶酶体组分检测发现缺硒导致溶酶体中 ACP 和 NAG 中酶活力降低 ($p < 0.05$)。本研究进一步检测了缺硒对小脑组织中 CTSD 和 CTSD 的表达情况,如图 3-16 所示,缺硒降低小脑组织中 CTSD 和 CTSD mRNA 表达水平 ($p < 0.05$),同时成熟 CTSD 和 CTSD 蛋白水平亦显著降低 ($p < 0.05$),表明缺抑制小脑中 CTSD 和 CTSD 的成熟,导致酶活性降低。

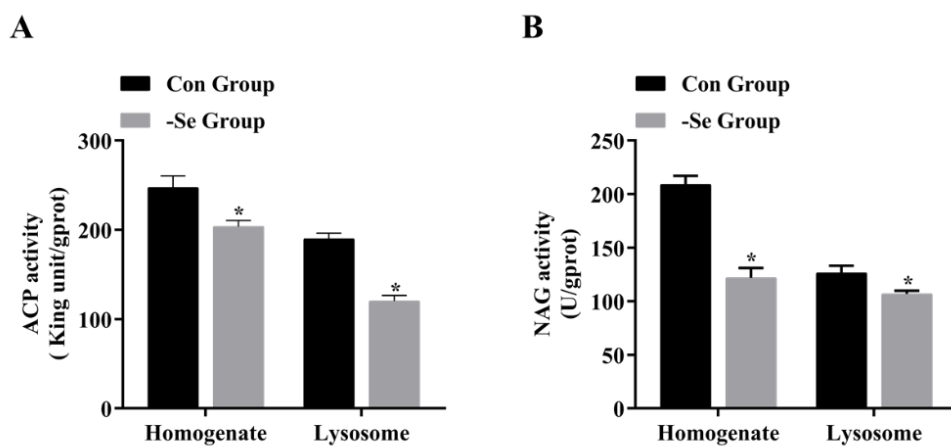


图 3-15 缺硒对鸡小脑组织中 ACP 和 NAG 的影响, A: ACP 活性; B: NAG 活性

Figure 3-15 The effect of Se-deficiency on ACP and NAG in chicken cerebellum, A: ACP activity; B: NAG activity

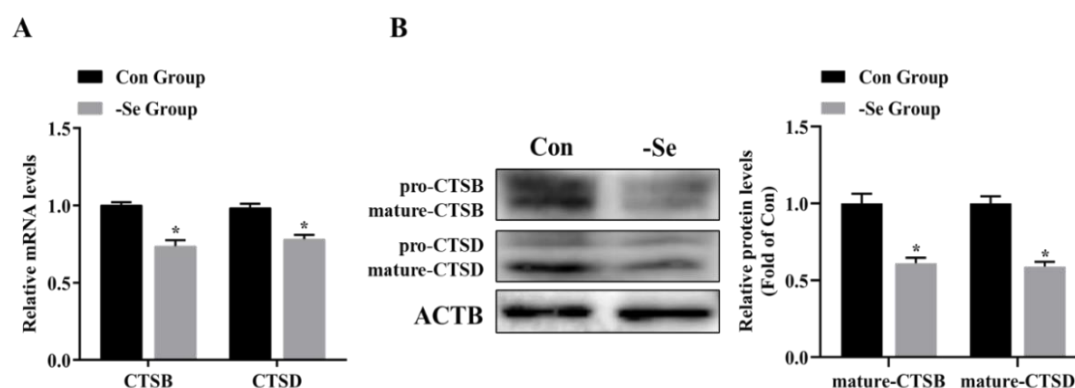


图 3-16 缺硒对鸡小脑中组织蛋白酶 CTSB 和 CTSD 的影响, A: mRNA 水平; B: 蛋白水平

Figure 3-16 The effect of Se-deficiency on CTSB and CTSD in chicken cerebellum, A: mRNA level; B: protein level

3.1.7.3 缺硒鸡小脑组织溶酶体钙离子通道检测结果

如图 3-17 所示, 缺硒导致溶酶体钙离子释放通道 MCOLN1 mRNA 和蛋白水平升高 ($p < 0.05$), 表明缺硒导致鸡小脑组织中溶酶体钙离子释放通道 MCOLN1 激活, 从而促进钙离子由溶酶体腔释放到胞浆中。

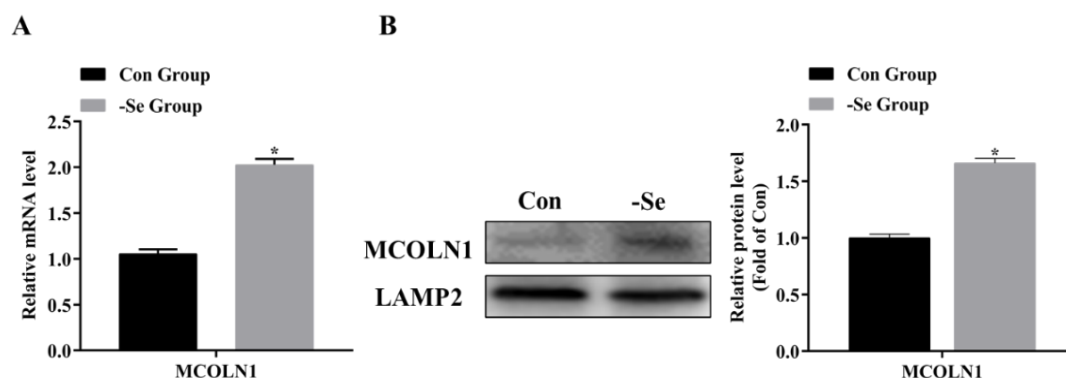


图 3-17 缺硒对鸡小脑溶酶体 MCOLN1 的影响, A: mRNA 水平; B: 蛋白水平

Figure 3-17 The effect of Se-deficiency on lysosomal MCOLN1 in chicken cerebellum, A: mRNA level; B: protein level

3.1.7.4 缺硒鸡小脑组织溶酶体膜通透性检测结果

正常情况下, 组织蛋白酶位于溶酶体中, 因此在细胞中会呈点状分布, 而溶酶体膜通透化会导致溶酶体酶从溶酶体腔泄漏到胞浆中, 会使组织蛋白酶呈弥散性分布, 因此可根据组织蛋白的分布及亚细胞定位观测溶酶体的通透性变化。如图 3-18 所示, CTSB 免疫荧光结果显示, 对照组鸡小脑浦肯野细胞中 CTSB 点状分布, 缺硒导致 CTSB 呈弥散性分布 (黄色箭头), 表明缺硒导致 CTSB 从溶酶体中释放到胞浆中, 即缺硒可引起溶酶体通透化。此外本研究采用试剂盒分离溶酶体并通过检测溶酶体及胞浆中的 CTSB 和 CTSD 的蛋白表达情况来观察其亚细胞定位。如图 3-19 所示, 缺硒可导致小脑中溶酶体成熟 CTSB 和 CTSD 的蛋白表达

水平降低 ($p<0.05$), 而胞浆中 CTSD 和 CTSD 的蛋白表达水平升高 ($p<0.05$), 表明缺硒可导致 CTSD 和 CTSD 由溶酶体腔泄漏到胞浆中, 这也说明缺硒引起溶酶体通透化。

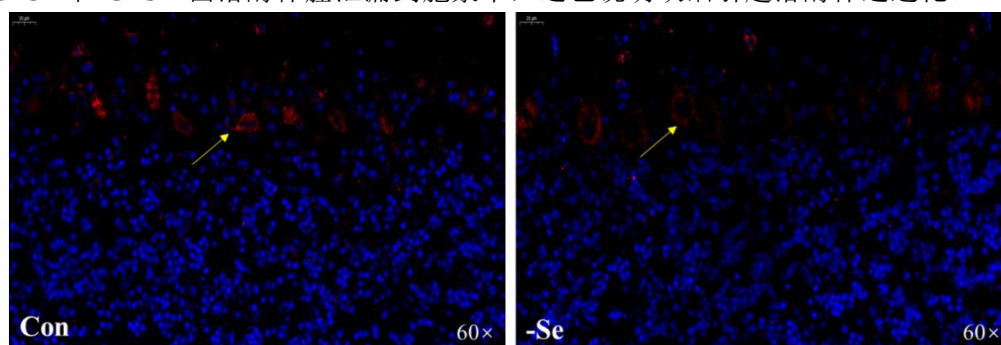


图 3-18 缺硒对鸡小脑中 CTSD 免疫着色的影响

Figure 3-18 The effect of Se-deficiency on CTSD immunostaining in chicken cerebellum

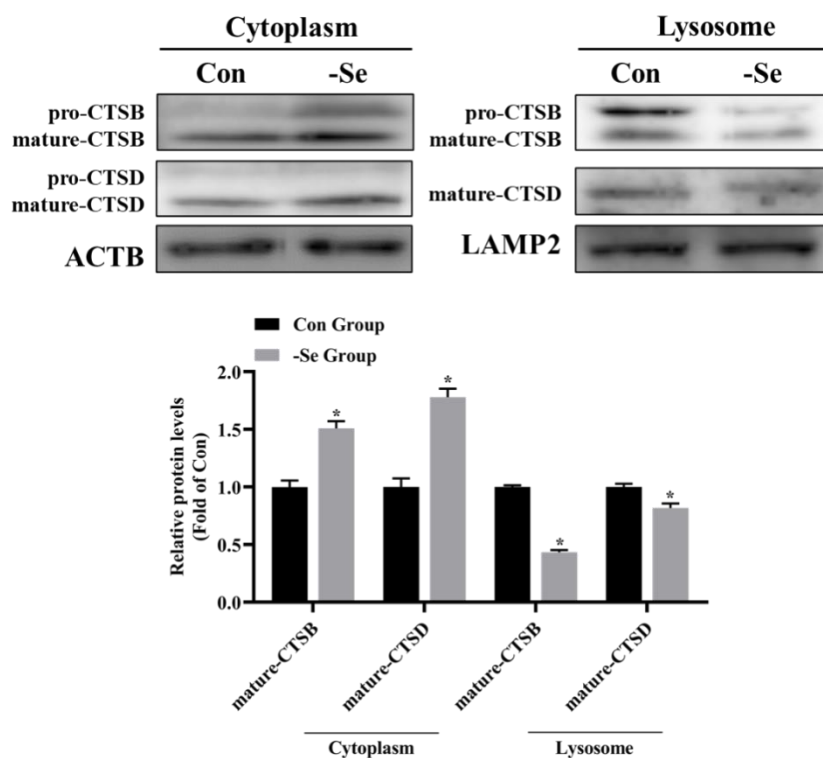


图 3-19 缺硒对鸡小脑中 CTSD 和 CTSD 亚细胞定位的影响

Figure 3-19 The effect of Se-deficiency on the subcellular localization of CTSD and CTSD in chicken cerebellum

3.1.8 缺硒鸡小脑组织自噬流检测结果

如图 3-20 和 3-21 所示, 缺硒导致自噬小体标记物 LC3-2 和自噬底物标记蛋白 P62 的蛋白水平显著升高 ($p<0.05$), 免疫荧光结果显示缺硒显著增强小脑组织中 P62 荧光强度 (红色箭头), 表明缺硒可导致自噬底物降解受阻。这一结果表明缺硒可导致自噬降解能力降低而导致自噬流抑制, 这与缺硒导致溶酶体稳态失衡密切相关。

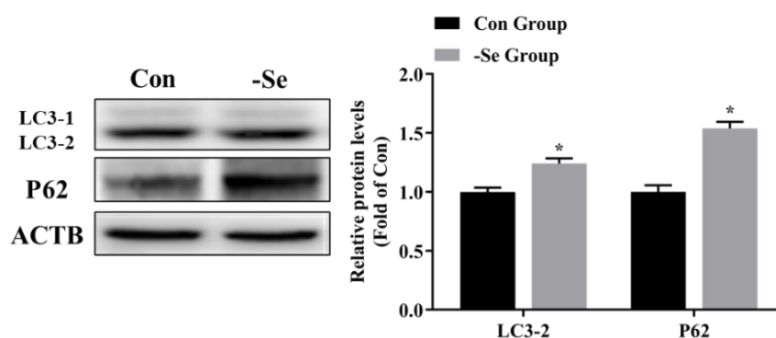


图 3-20 缺硒对鸡小脑自噬流的影响

Figure 3-20 The effect of Se-deficiency on autophagic flux in chicken cerebellum

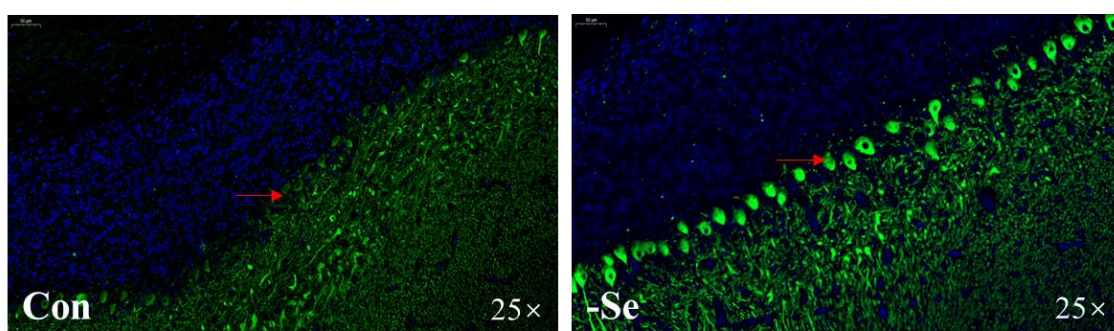


图 3-21 缺硒对鸡小脑中 P62 免疫着色的影响

Figure 3-21 The effect of Se-deficiency on P62 immunostaining in chicken cerebellum

3.1.9 缺硒鸡小脑组织凋亡检测结果

如图 3-22 所示, 缺硒导致抗凋亡基因 BCL2 mRNA 表达水平降低, 促凋亡基因 BAX 及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 9 和 3 (CAS9 和 CAS3) mRNA 表达水平升高 ($p < 0.05$)。同时缺硒引起 BCL2 蛋白表达降低, BAX 和切割 CAS9 (cle-CAS9) 及 cle-CAS3 蛋白水平显著升高 ($p < 0.05$)。这些结果表明, 缺硒可诱导鸡小脑组织发生线粒体途径凋亡。

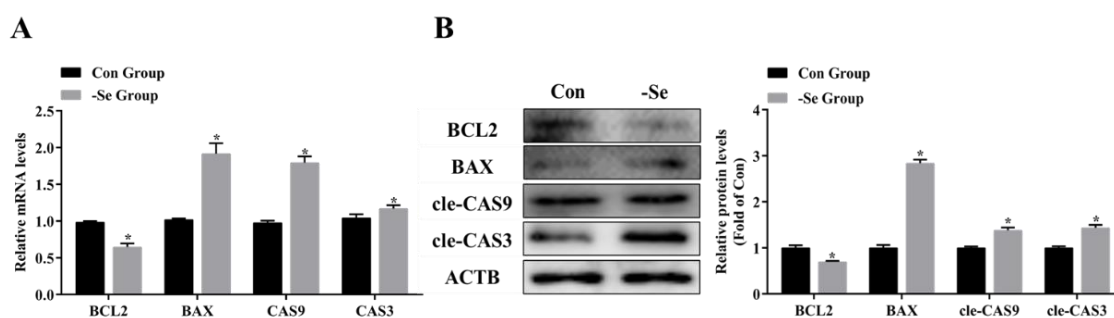


图 3-22 缺硒对鸡小脑组织中凋亡的影响, A: mRNA 水平; B: 蛋白水平

Figure 3-22 The effect of Se-deficiency on apoptosis in chicken cerebellum, A: mRNA level; B: protein level

3.2 缺硒鸡胚神经元相关指标检测结果

3.2.1 鸡胚脑神经元形态学观察结果

如图 3-23 所示,分离得到的鸡胚脑神经元刚接种于培养板中时,体积小,呈圆形,透亮,单个均匀分布并悬浮于培养液中。6 h 后部分细胞已贴壁,贴壁的细胞呈圆形,胞体亮,部分细胞有出芽趋势。18 h 后细胞呈椭圆形大部分细胞已出芽并伸出少量突起。24 h 后细胞出现突起延长并形成细胞网络。36 h 后神经细胞以多个突起的细胞为主,细胞间联系增多。48 h 后细胞突起较长并连接形成密集的网络。

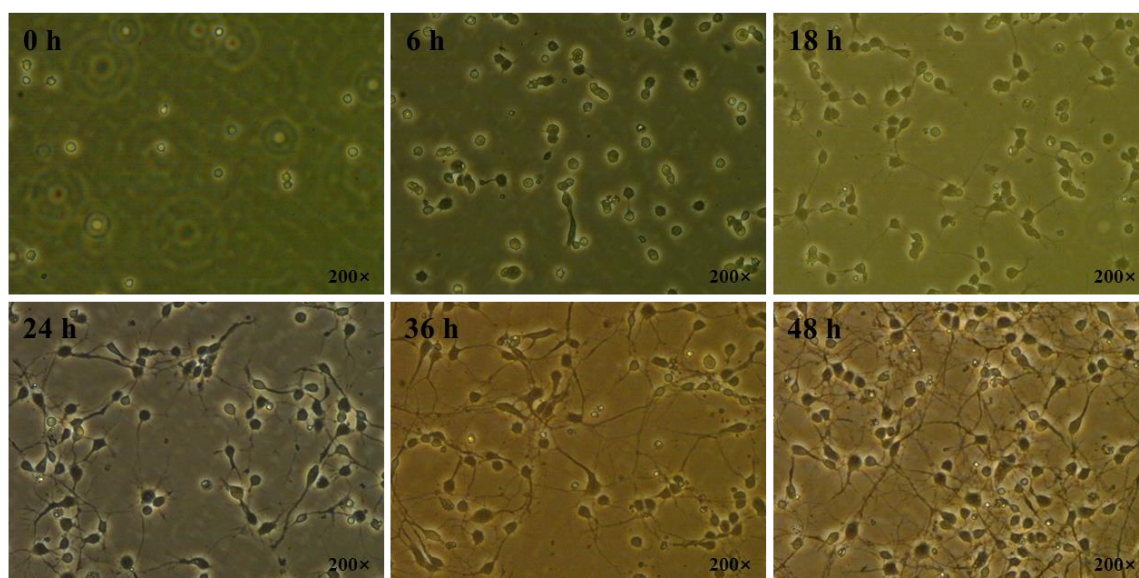


图 3-23 不同培养时间的鸡胚脑神经元形态

Figure 3-23 The morphology of chick embryo brain neurons cells in different incubation time

3.2.2 鸡胚脑神经元的鉴定

MAP2 是成熟神经元特异性标志物,对提取的鸡胚神经元进行 MAP2 免疫荧光检测以鉴定神经元纯度。如图 3-24 所示,MAP2 免疫荧光结果显示提取的细胞中含有大量 MAP2 阳性细胞,表明本试验获取的细胞可作为鸡胚神经元进行后续实验。

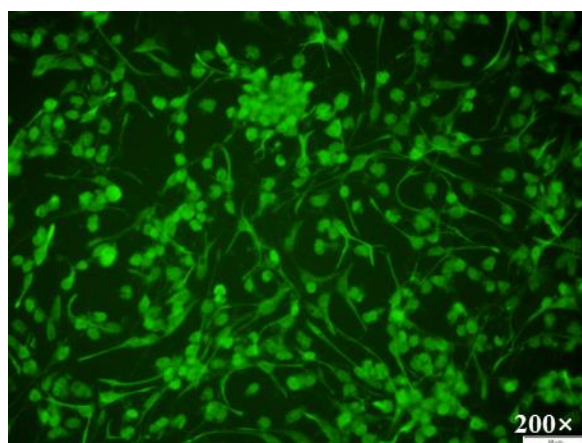


图 3-24 鸡胚神经元细胞 MAP2 免疫荧光鉴定

Figure 3-24 The immunofluorescence identification of MAP2 in chick embryo brain neurons

3.2.3 缺硒鸡胚脑神经元细胞形态观察结果

硒是神经元生长和发育所必需的。如图 3-25 所示，缺硒导致鸡胚脑神经元突起变少变细，胞体细胞间的联系减弱，并导致鸡胚脑神经元出现死亡（明亮点）。

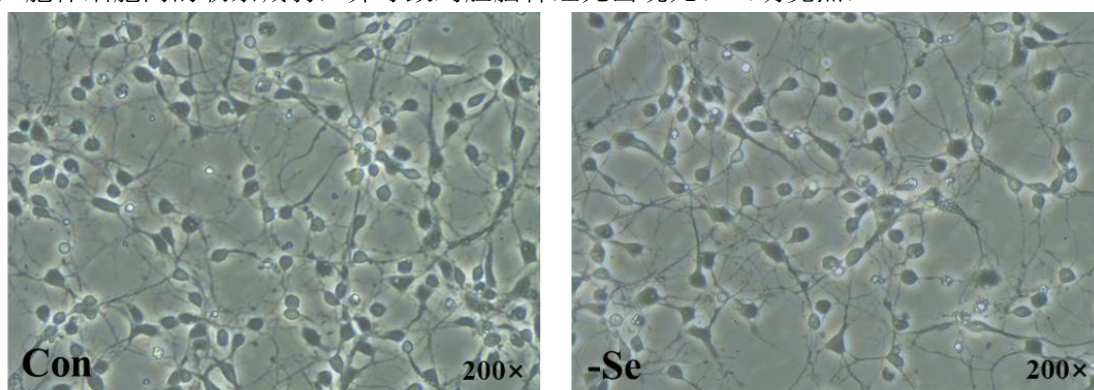


图 3-25 缺硒对鸡胚脑神经元形态的影响

Figure 3-25 The effect of Se-deficiency on the morphology of chick embryo brain neurons cells

3.2.4 缺硒鸡胚脑神经元硒蛋白表达检测结果

如图 3-26 所示，不同硒蛋白在鸡胚神经元细胞中的表达具有差异性，其中 SELU、SELK、SEP15、SELW、SELS 及 SELT 表达水平较高。硒缺乏导致鸡胚脑神经元硒蛋白表达紊乱，除 GPX3、TXNRD3、SELT 及 SEP15 外，其他硒蛋白均表现出不同程度降低（ $p<0.05$ ）。如图 3-27 和 3-28 所示，缺硒显著降低硒蛋白 GPX1 蛋白表达水平（ $p<0.05$ ）和 GSH-Px 酶活性（ $p<0.05$ ），表明缺硒鸡胚脑神经元模型建立成功。

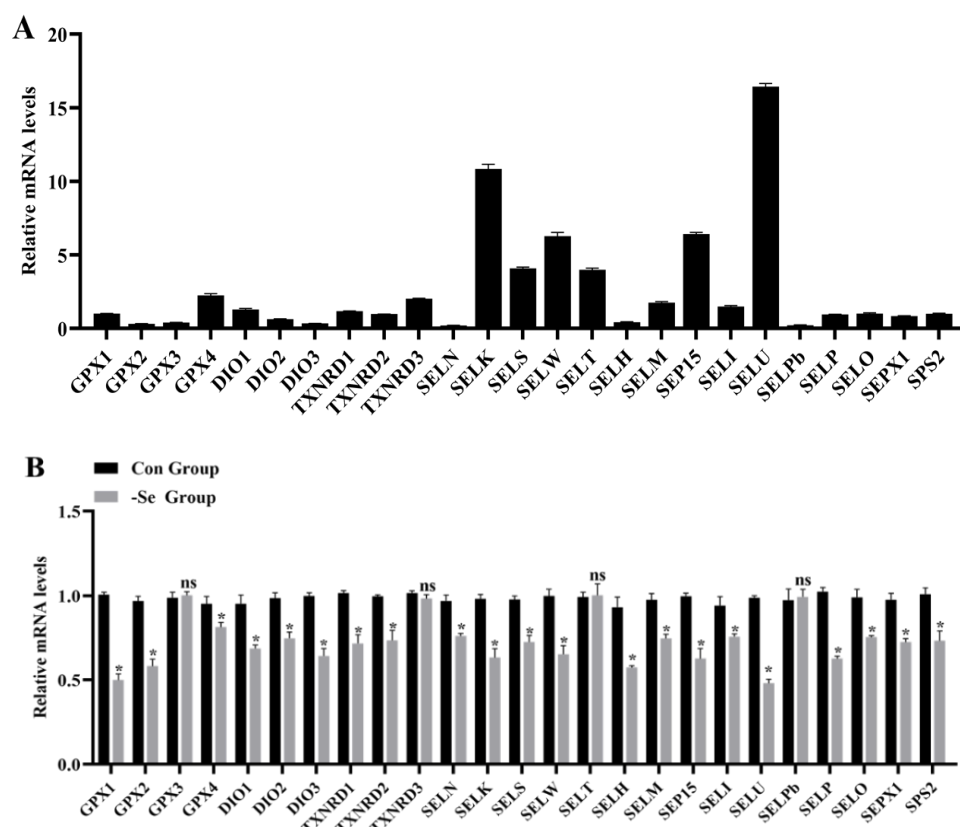


图 3-26 缺硒对鸡胚胎脑神经元硒蛋白的影响，A：鸡胚胎脑神经元中 25 种硒蛋白表达情况；
B：缺硒对 25 种硒蛋白的影响

Figure 3-26 The effect of Se-deficiency on the selenoproteins in chick embryo brain neurons, A: the expression of 25 selenoproteins in chick embryo brain neurons; B: effects of selenium deficiency on 25 selenoproteins

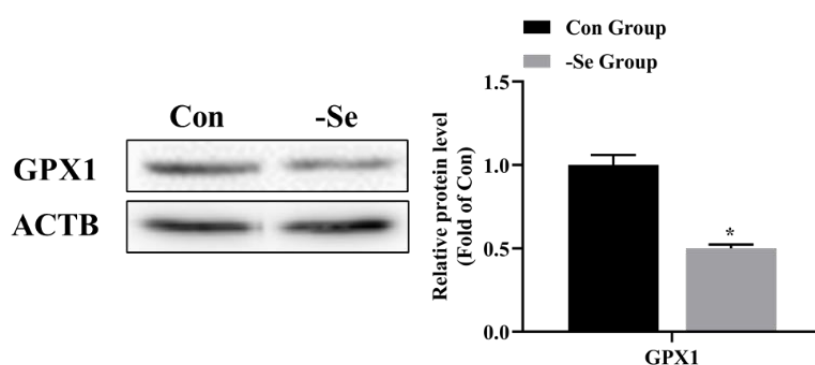


图 3-27 缺硒对鸡胚胎脑神经元 GPX1 蛋白表达的影响

Figure 3-27 The effect of Se-deficiency on protein level of GPX1 in chick embryo brain neurons

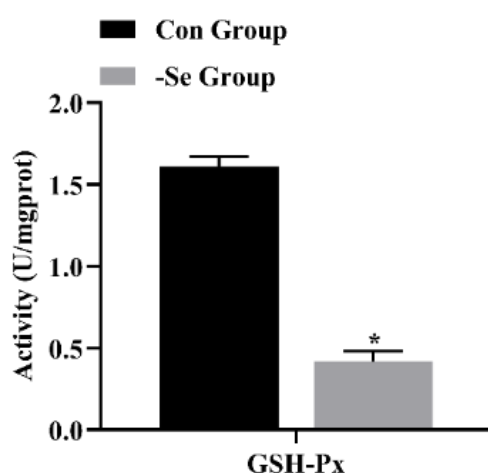


图 3-28 缺硒对鸡胚神经元细胞 GSH-Px 酶活力的影响

Figure 3-28 The effect of Se-deficiency on GSH-Px activity in chick embryo brain neurons

3.2.5 缺硒鸡胚脑神经元 SELS 及内质网应激检测结果

如图 3-29 所示, 缺硒可导致鸡胚神经元细胞中 SELS 蛋白水平降低 ($p<0.05$)。进一步对内质网应激相关指标进行检测, 如图 3-30 所示, 缺硒导致鸡胚神经元细胞中内质网应激相关基因 GRP78、XBP1、ATF4 和 ATF6 mRNA 表达水平及 GRP78、IRE1、XBP1、PERK、ATF4 和 ATF6 的蛋白表达水平升高 ($p<0.05$), 结果表明, 缺硒导致鸡胚神经元细胞内质网应激。

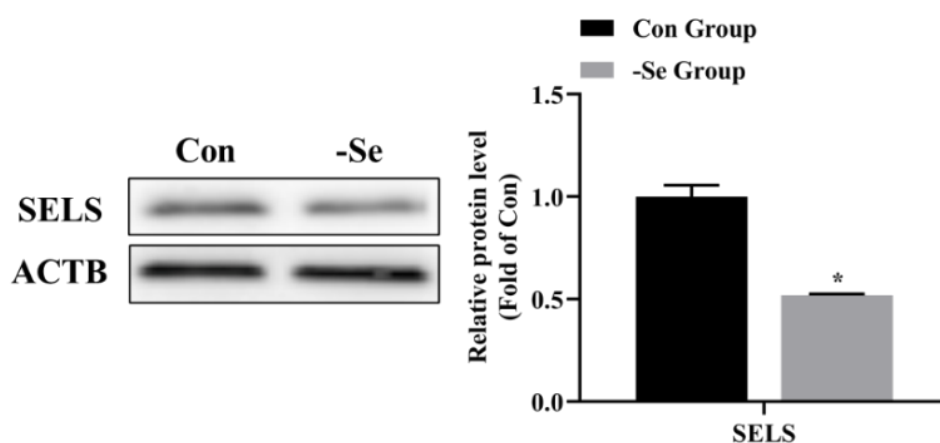


图 3-29 缺硒对鸡胚脑神经元 SELS 蛋白水平的影响

Figure 3-29 The effect of Se-deficiency of SELS protein level in chick embryo brain neurons

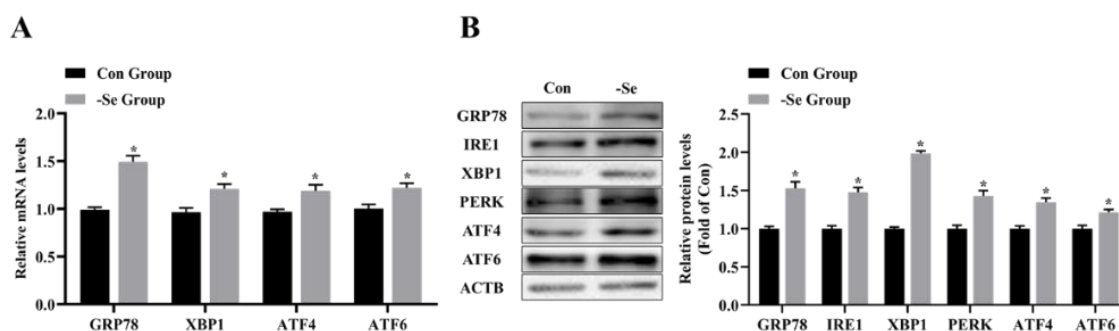


图 3-30 缺硒对鸡胚脑神经元内质网应激的影响, A: mRNA 水平; B: 蛋白水平

Figure 3-30 The effect of Se-deficiency on ER-stress in chick embryo brain neurons, A: mRNA level; B: protein level

3.2.6 缺硒鸡胚脑神经元 ROS 水平及抗氧化能力检测结果

如图 3-31 和图 3-32 所示, 缺硒导致鸡胚神经元细胞中 ROS 水平显著升高 ($p < 0.05$), 同 SOD 活性升高, CAT 活性和 T-AOC 降低 ($p < 0.05$), iNOS 活性、NO、 H_2O_2 、LPO 及 MDA 含量增多 ($p < 0.05$), 表明缺硒导致鸡胚脑神经元抗氧化能力减低, 导致细胞内自由基增多, 引起脂质过氧化, 诱发细胞氧化应激。

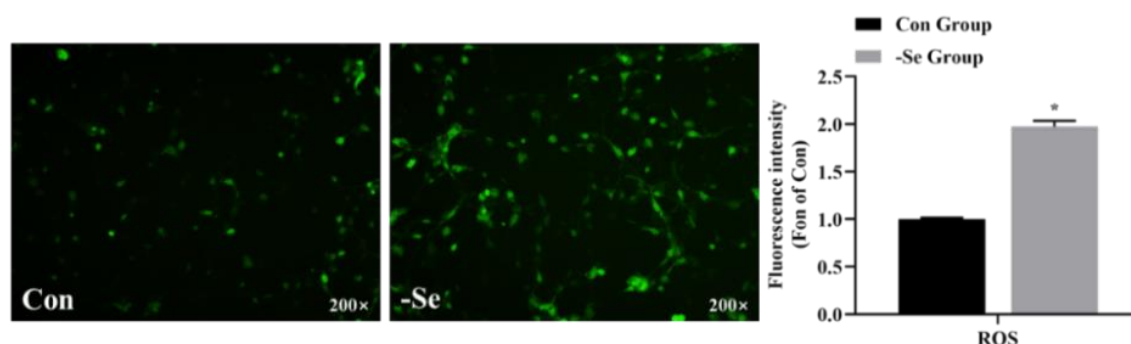


图 3-31 缺硒对鸡胚脑神经元 ROS 水平的影响

Figure 3-31 The effect of Se-deficiency on the ROS level in chick embryo brain neurons

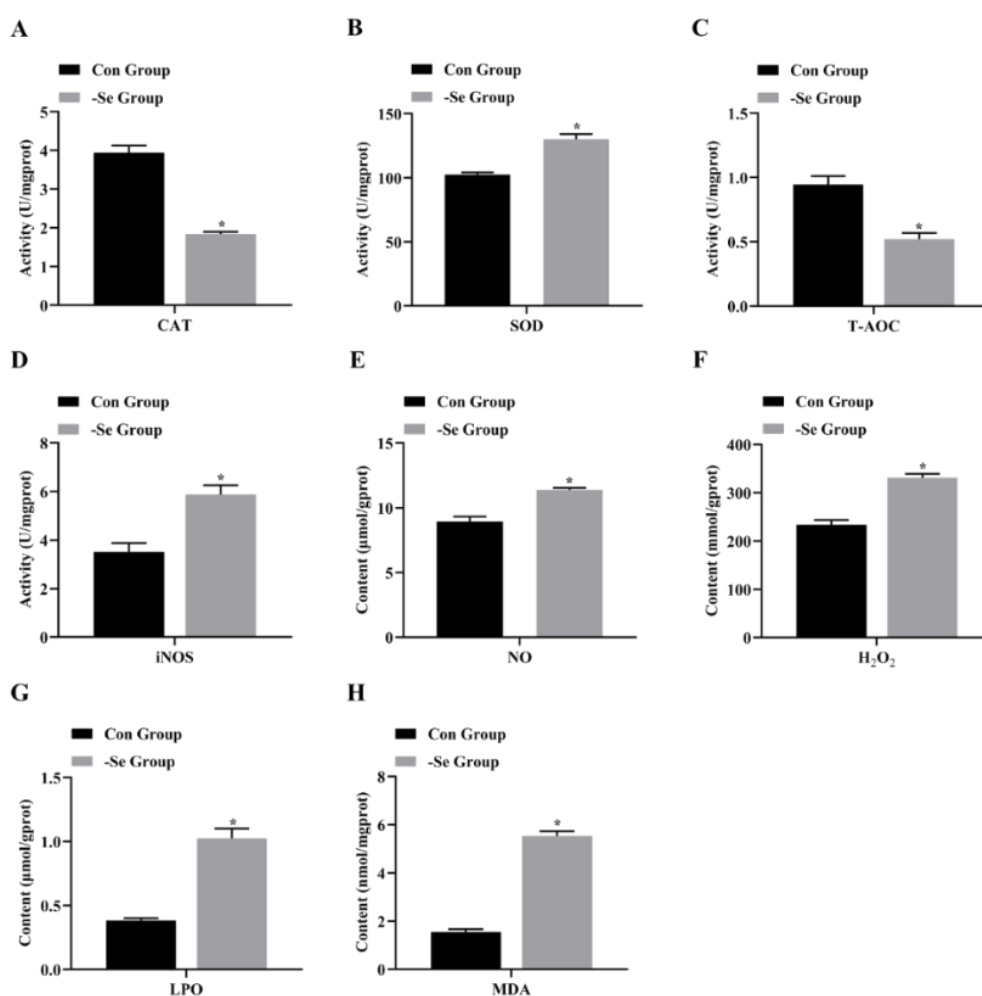


图 3-32 缺硒对鸡胚脑神经元抗氧化能力的影响, A: CAT 活性; B: SOD 活性; C: T-AOC 活性; D: iNOS 活性; E: NO 含量; F: H₂O₂ 含量; G: LPO 含量; H: MDA 含量

Figure 3-32 The effect of Se-deficiency on antioxidative ability in chick embryo brain neurons, A: CAT activity; B: SOD activity; C: T-AOC activity; D: iNOS activity; E: NO content; F: H₂O₂ content; G: LPO content; H: MDA content

3.2.7 缺硒鸡胚脑神经元溶酶体稳态检测结果

3.2.7.1 缺硒鸡胚脑神经元溶酶体 pH 及 V-ATPase 检测结果

溶酶体荧光探针 Lyso-Tracker-Red 可敏感反映溶酶体 pH 变化, 其荧光强度可随溶酶体 pH 升高而减弱。如图 3-33 所示, 缺硒可导致 Lyso-Tracker-Red 荧光强度减弱 ($p < 0.05$), 表明缺硒可导致鸡胚脑神经元溶酶体 pH 升高。此外对溶酶体 V-ATPase 进行检测, 如图 3-34 所示, 缺硒可导致鸡胚神经元中 V-ATPase 通道 ATP6V1A、ATP6V1B2 和 ATP6V1D mRNA 和蛋白表达水平降低 ($p < 0.05$), 表明缺硒可抑制溶酶体 V-ATPase 的活性, 导致溶酶体酸化受阻。

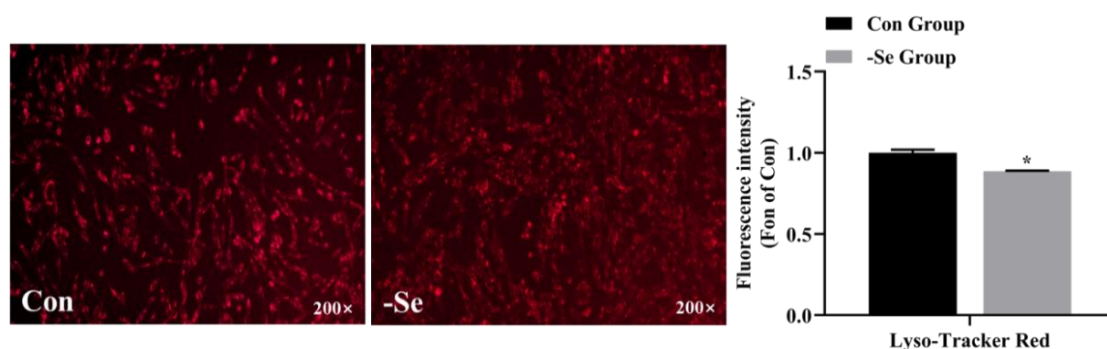


图 3-33 缺硒对鸡胚脑神经元溶酶体 pH 的影响

Figure 3-33 The effect of Se-deficiency on lysosomal pH in chick embryo brain neurons

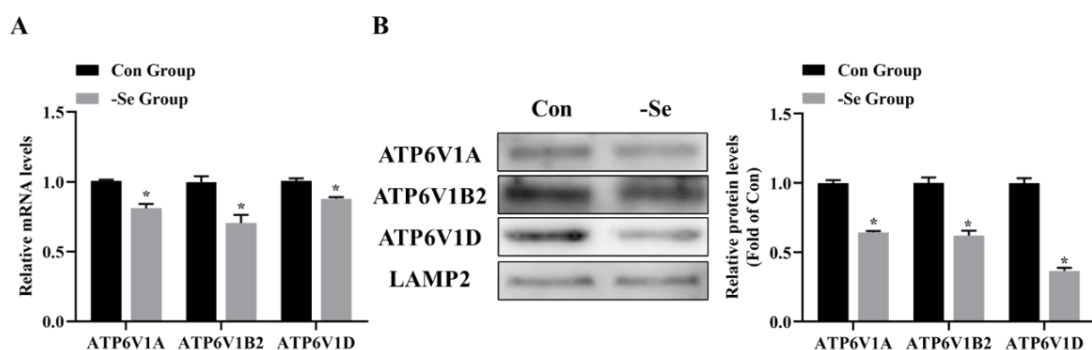


图 3-34 缺硒对鸡胚脑神经元 V-ATPase 的影响, A: mRNA 水平; B: 蛋白水平

Figure 3-34 The effect of Se-deficiency on V-ATPase in chick embryo brain neurons, A: mRNA level; B: protein level

3.2.7.2 缺硒鸡胚脑神经元溶酶体组织蛋白酶检测结果

如图 3-35 所示, 缺硒对鸡胚神经元细胞中组织蛋白酶 CTSB 和 CTSD mRNA 表达水平无显著影响($p>0.05$), 但降低了鸡胚脑神经元中成熟 CTSB 和 CTSD 的蛋白表达水平($p<0.05$), 这一结果表明缺硒抑制溶酶体酶的成熟, 而对溶酶体的降解功能造成影响。

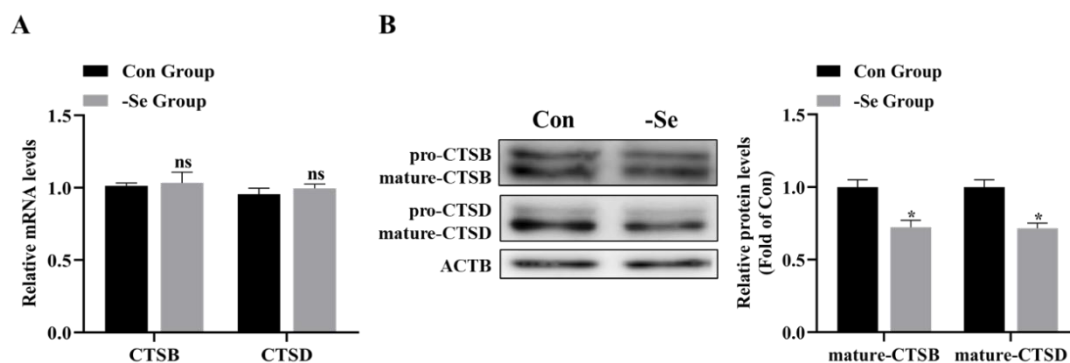


图 3-35 缺硒对鸡胚脑神经元 CTSB 和 CTSD 的影响, A: mRNA 水平; B: 蛋白水平

Figure 3-35 The effect of Se-deficiency on CTSB and CTSD in chick embryo brain neurons, A: mRNA level; B: protein level

3.2.7.3 缺硒鸡胚脑神经元溶酶体钙离子通道检测结果

如图 3-36 所示, 缺硒导致鸡胚神经元细胞中 MCOLN1 mRNA 和蛋白表达水平升高 ($p<0.05$), 表明缺硒可激活鸡胚神经元细胞溶酶体钙离子通道, 引起溶酶体钙释放到胞浆中。

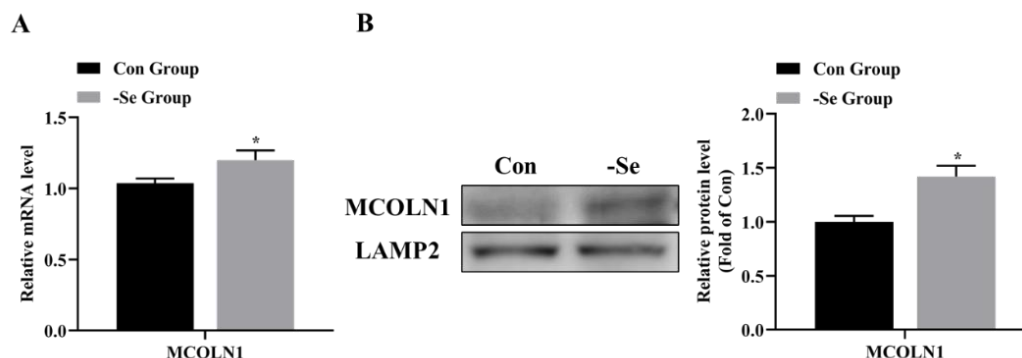


图 3-36 缺硒对鸡胚脑神经元 MCOLN1 的影响, A: mRNA 水平; B: 蛋白水平
Figure 3-36 The effect of Se-deficiency on MCOLN1 in chick embryo brain neurons, A: mRNA level; B: protein level

3.2.7.4 缺硒鸡胚脑神经元溶酶体膜通透化检测结果

如图 3-37 所示, 缺硒可导致溶酶体中成熟 CTSB 和 CTSD 蛋白水平降低 ($p<0.05$), 胞浆中成熟 CTSB 和 CTSD 蛋白水平增加 ($p<0.05$), 表明缺硒可导致 CTSB 和 CTSD 由溶酶体释放到胞浆中, 这一结果表明缺硒导致鸡胚脑神经元溶酶体通透化。

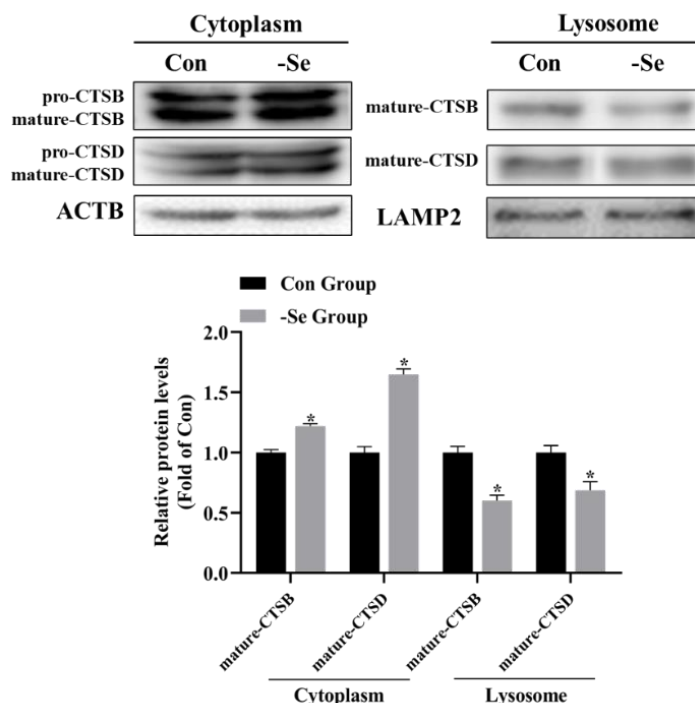


图 3-37 缺硒对鸡胚脑神经元组织蛋白酶 B 和 D 亚细胞的影响
Figure 3-37 The effect of Se-deficiency on the subcellular localization of CTSB and CTSD in chick embryo brain neurons

3.2.8 缺硒鸡胚脑神经元自噬流检测结果

如图 3-38 所示, 缺硒导致鸡胚脑神经元 LC3-2 和 P62 蛋白表达显著增加 ($p<0.05$), 表明缺硒影响自噬底物的降解导致自噬小体蓄积, 自噬流抑制。

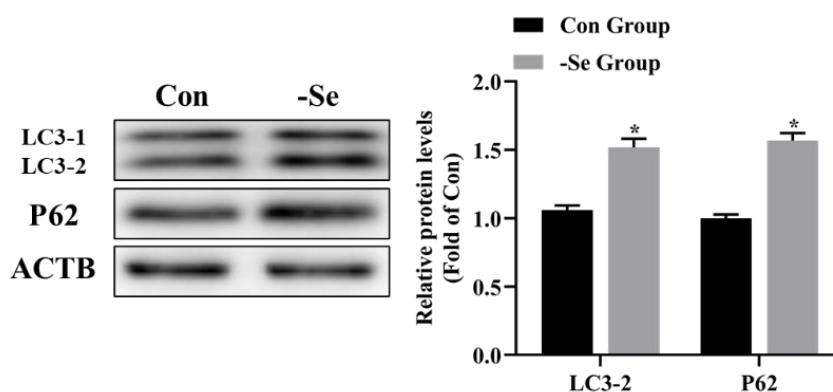


图 3-38 缺硒对鸡胚神经元细胞自噬流的影响

Figure 3-38 The effect of Se-deficiency on autophagic flux in chick embryo brain neurons

3.2.9 缺硒鸡胚脑神经元凋亡检测结果

采用流式细胞术检测缺硒对鸡胚脑神经元凋亡的影响, 如图 3-39 所示, 缺硒可导致鸡胚脑神经元细胞凋亡显著增多 ($p<0.05$), 表明缺硒可引起鸡胚脑神经元细胞凋亡。此外, 本研究进一步检测凋亡相关指标, 如图 3-40 所示, 缺硒可导致鸡胚脑神经元细胞 BCL2 mRNA 表达水平降低 ($p<0.05$), BAX、CAS9、CAS3 mRNA 表达水平升高 ($p<0.05$), 同时缺硒可导致鸡胚脑神经元细胞 BCL2 蛋白表达水平降低 ($p<0.05$), BAX、cle-CAS9 及 cle-CAS3 蛋白表达水平升高 ($p<0.05$), 结果表明, 缺硒可导致鸡胚脑神经元发生线粒体凋亡。

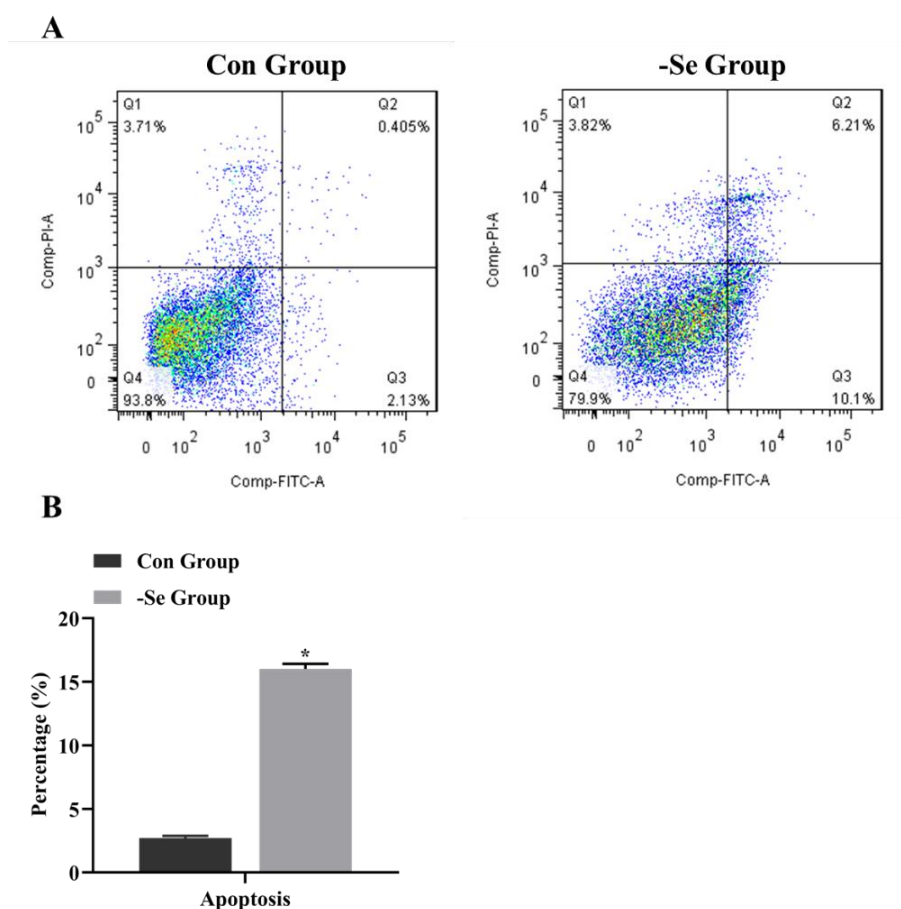


图 3-39 缺硒鸡胚脑神经元凋亡的流式细胞术检测结果，A：流式细胞术检测结果；B：凋亡细胞比例

Figure 3-39 Detection of chick embryo brain neurons apoptosis by flow cytometry, A: the results of flow cytometry; B: percentage of apoptotic cells

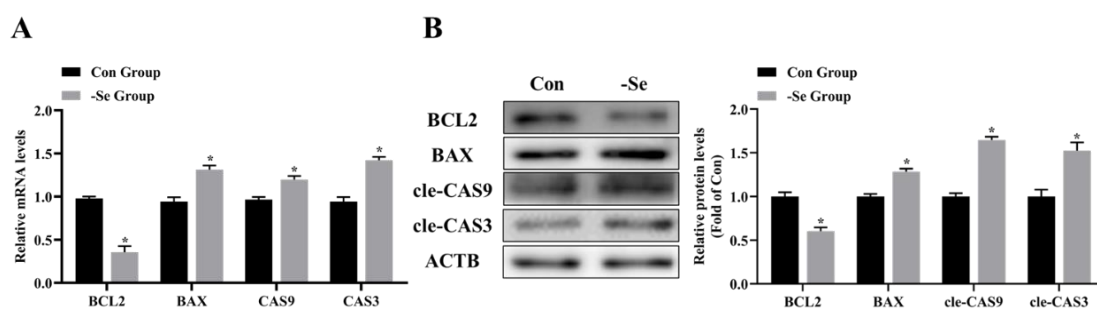


图 3-40 缺硒对鸡胚脑神经元凋亡的影响，A：mRNA 水平；B：蛋白水平

Figure 3-40 The effect of Se-deficiency on apoptosis in chick embryo brain neurons, A: mRNA level; B: protein level

3.3 SELS 敲低鸡胚脑神经元相关指标检测结果

3.3.1 鸡胚脑神经元 SELS 敲低模型的建立

如图 3-41 所示, 鸡胚脑神经细胞转染 SELS 的 Stealth RNAi™ siRNA 24 h 后与对照组相比, SELS 的 mRNA 和蛋白水平的表达量显著下调 (分别下调到 34.9%和 22.5%) ($p<0.05$), 结果表明鸡胚脑神经元 SELS 敲低模型建立成功。

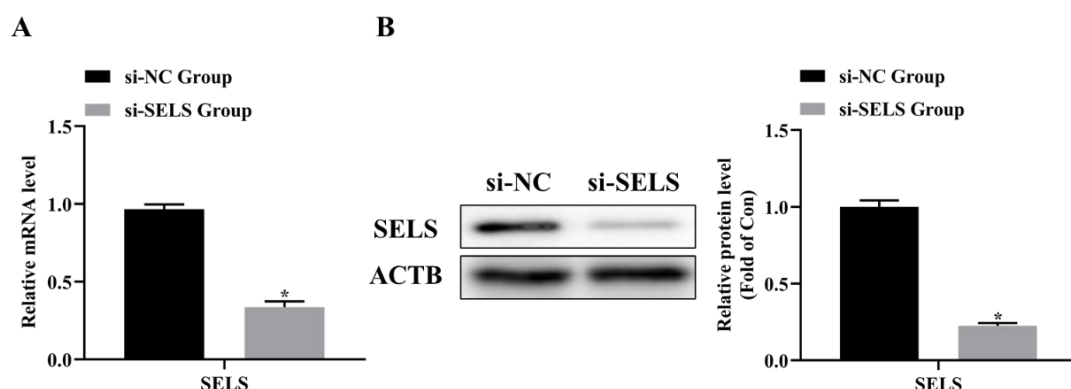


图 3-41 SELS 敲低对鸡胚脑神经元 SELS 的影响, A: mRNA 水平; B: 蛋白水平
Figure 3-41 The effect of SELS knock down on SELS in chick embryo brain neurons, A: mRNA level; B: protein level

3.3.2 SELS 敲低鸡胚脑神经元细胞形态观察结果

如图 3-42 所示, SELS 敲低导致鸡胚脑神经元数量减少, 神经突起减少, 细胞间联系减弱, 细胞代谢产物增加, 并引起鸡胚脑神经元出现死亡 (明亮点)。

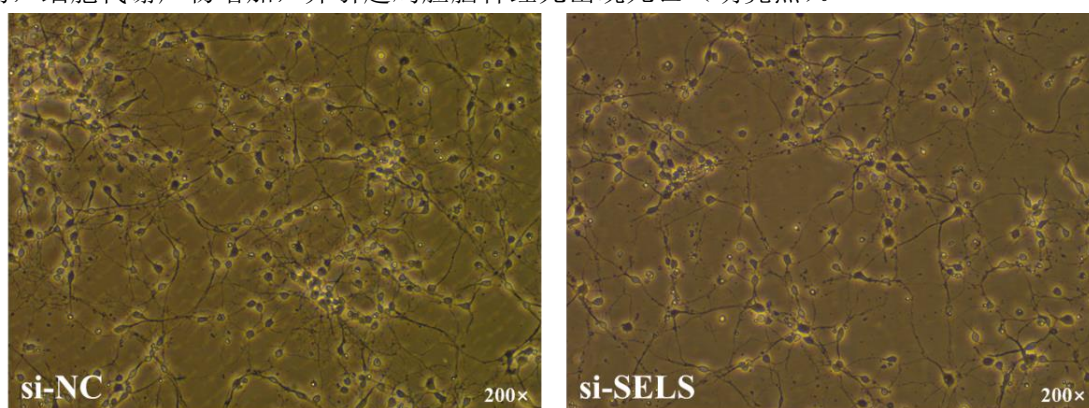


图 3-42 SELS 敲低对鸡胚脑神经元形态的影响
Figure 3-42 The effect of SELS knock down on the morphology of chick embryo brain neurons

3.3.3 SELS 敲低鸡胚脑神经元内质网定位硒蛋白及内质网应激检测结果

如图 3-43 所示, SELS 敲低改变了内质网硒蛋白的表达, 其中 SELN 和 DIO2 的 mRNA 表达水平升高 ($p<0.05$), SELT 和 SEP15 的 mRNA 水平降低 ($p<0.05$), 但对 SELK 和 SELM 的 mRNA 表达无显著影响 ($p>0.05$)。如图 3-44 所示, SELS 敲低导致鸡胚脑神经元 GRP78、IRE、XBP1、PERK、ATF4 及 ATF6 的蛋白表达升高 ($p<0.05$), 表明 SELS 敲低导致鸡胚脑神经元发生内质网应激。

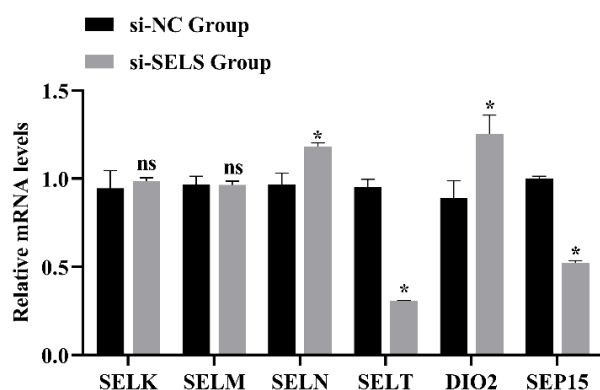


图 3-43 SELS 敲低对鸡胚脑神经元内质网定位硒蛋白的影响

Figure 3-43 The effect of SELS knock down on ER-resident selenoproteins in chick embryo brain neurons

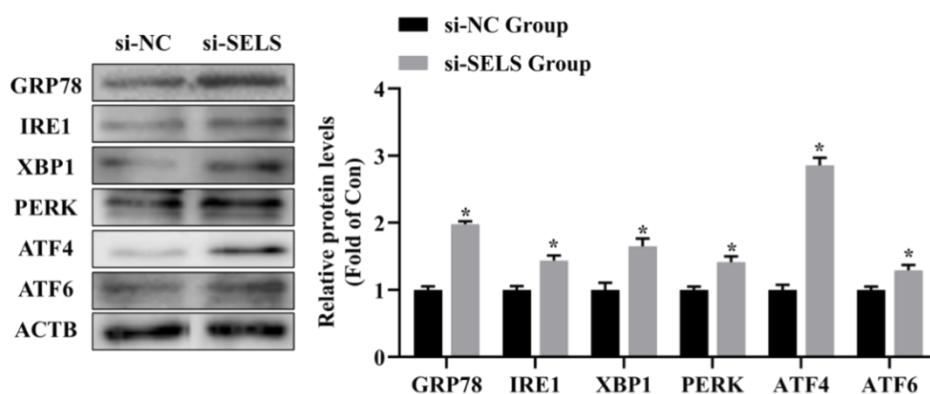


图 3-44 SELS 敲低对鸡胚脑神经元内质网应激的影响

Figure 3-44 The effect of SELS knock down on ER- stress in chick embryo brain neurons cells

3.3.4 SELS 敲低鸡胚脑神经元 ROS 水平及抗氧化能力检测结果

如图 3-45 和 3-46 所示, SELS 敲低引起鸡胚脑神经元内 ROS 含量显著增加 ($p<0.05$), 同时 SELS 敲低可导致细胞内抗氧化酶 CAT、SOD 和 GSH-Px 活性和总抗氧化能力 T-AOC

降低 ($p<0.05$), H_2O_2 、LPO 及 MDA 含量增加 ($p<0.05$), 表明 SELS 敲低导致鸡胚胎脑神经元发生氧化应激。

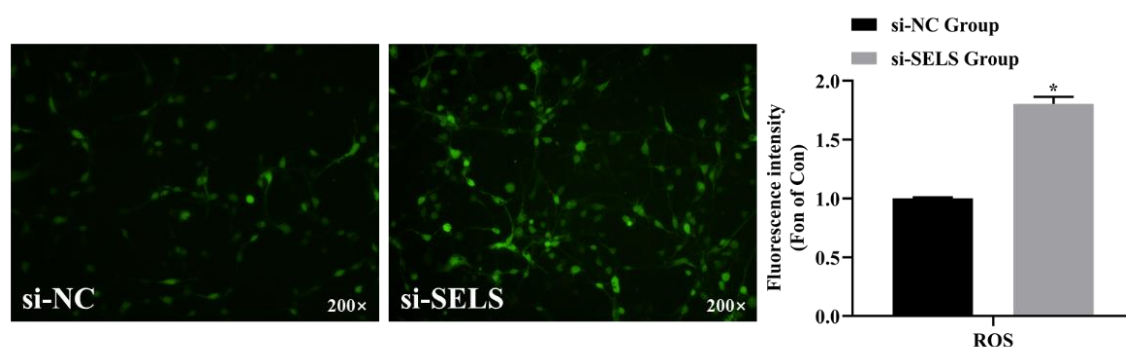


图 3-45 SELS 敲低对鸡胚胎脑神经元 ROS 的影响

Figure 3-45 The effect of SELS knock down on the ROS in chick embryo brain neurons cells

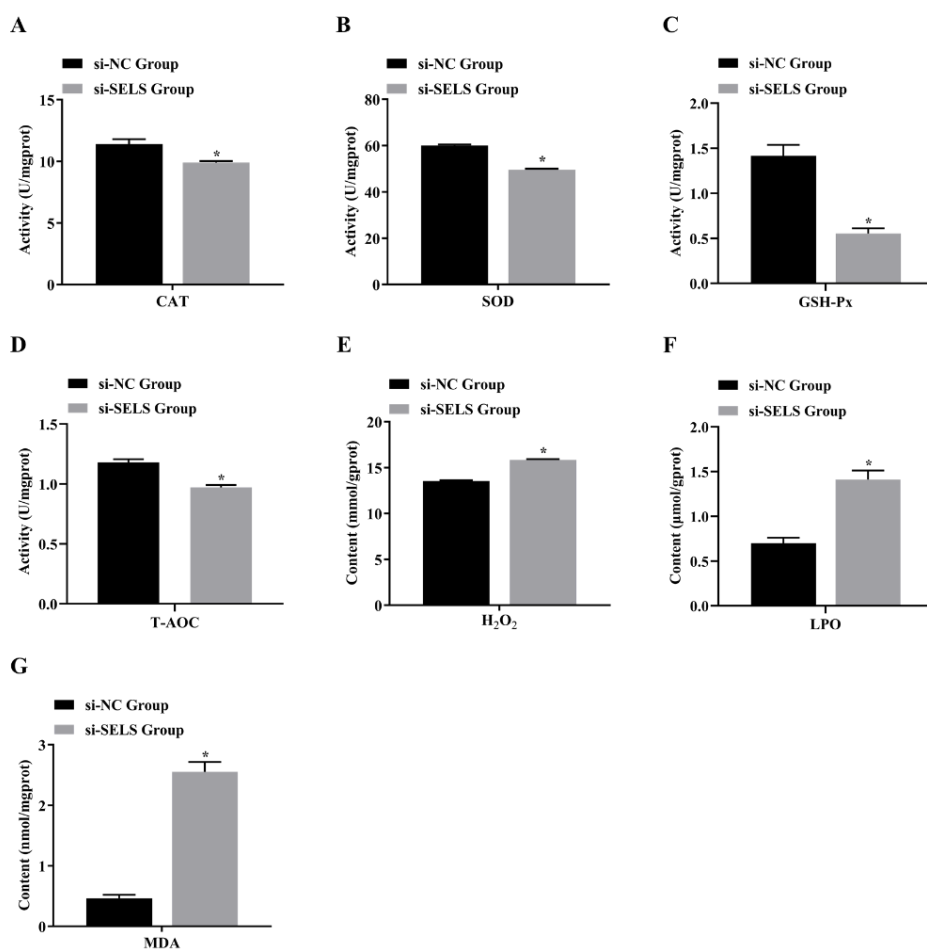


图 3-46 SELS 敲低对鸡胚胎脑神经元抗氧化能力的影响, A: CAT 活性; B: SOD 活性; C: GSH-Px 活性; D: T-AOC 活性; E: H_2O_2 含量; F: LPO 含量; G: MDA 含量

Figure 3-46 The effect of SELS knock down on antioxidative ability in in chick embryo brain neurons, A: CAT activity; B: SOD activity; C: GSH-Px activity; D: T-AOC activity; E: H_2O_2 content; F: LPO content; G: MDA content

3.3.5 SELS 敲低鸡胚脑神经元溶酶体稳态检测结果

3.3.5.1 SELS 敲低鸡胚脑神经元溶酶体 V-ATPase 检测结果

如图 3-47 所示, SELS 敲低可导致 Lyso-Tracker-Red 荧光强度减弱 ($p<0.05$), 表明 SELS 敲低可导致鸡胚脑神经元溶酶体 pH 升高。对溶酶体 V-ATPase 通道进行检测, 如图 3-48 所示, SELS 敲低导致鸡胚脑神经元溶酶体 ATP6V1A、ATP6V1B2 和 ATP6V1D 蛋白表达水平降低 ($p<0.05$), 表明缺硒可抑制溶酶体 V-ATPase 的活性。此外进行 ATP6V1B2 免疫荧光检测, 如图 3-49 所示, SELS 敲低引起 ATP6V1B2 荧光强度减弱 ($p<0.05$)。以上结果表明, SELS 敲低抑制鸡胚脑神经元细胞 V-ATPase 的活性, 导致溶酶体酸化受阻, 进而干扰鸡胚脑神经元溶酶体腔内 pH。

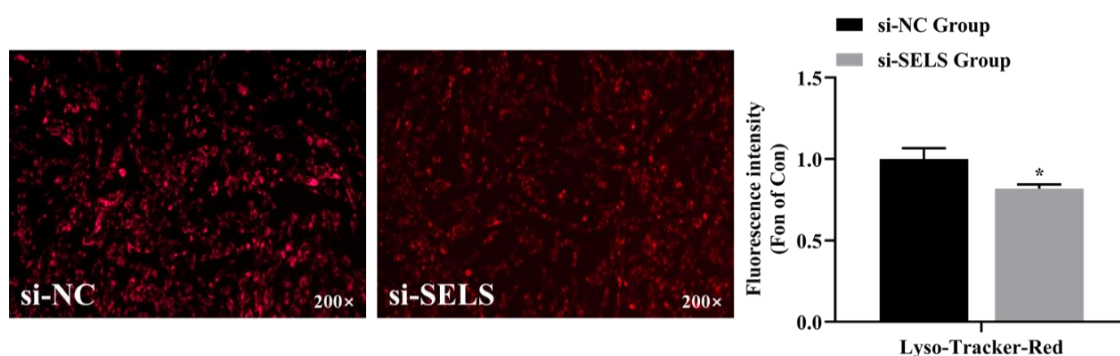


图 3-47 SELS 敲低对鸡胚脑神经元溶酶体 pH 的影响

Figure 3-47 The effect of SELS knock down on lysosomal pH in chick embryo brain neurons

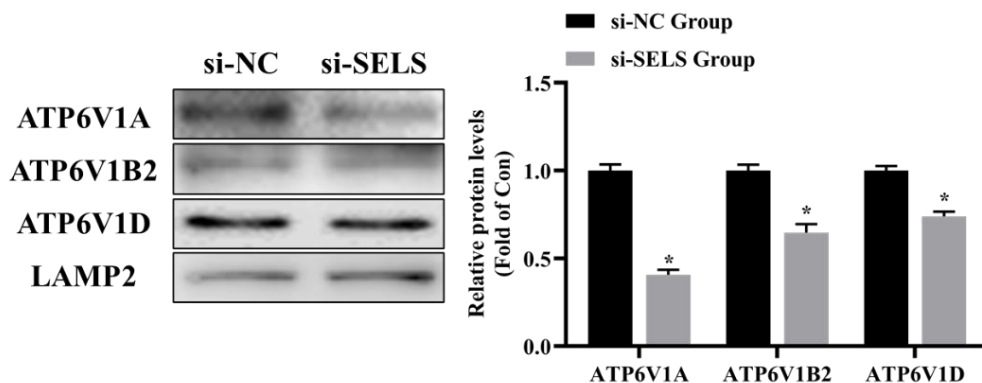


图 3-48 SELS 敲低对鸡胚脑神经元 V-ATPase 的影响

Figure 3-48 The effect of SELS knock down on V-ATPase in chick embryo brain neurons

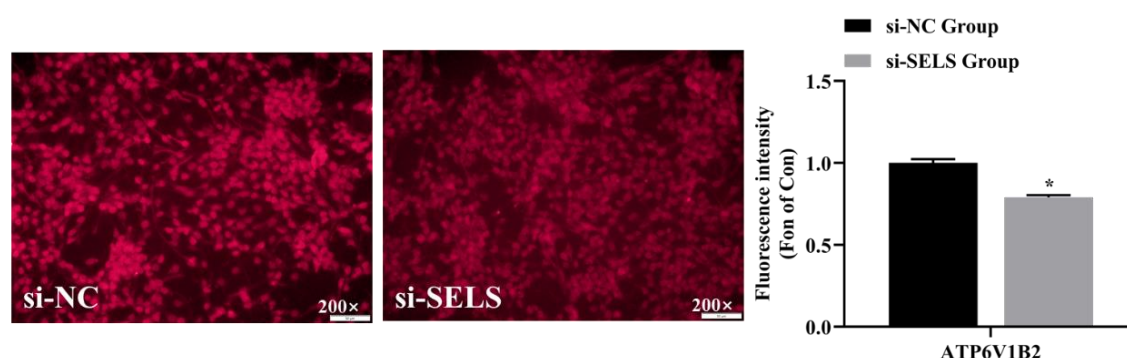


图 3-49 SELS 敲低对鸡胚神经元细胞 ATP6V1B2 免疫着色的影响

Figure 3-49 The effect of SELS knock down on ATP6V1B2 immunostaining in chick embryo brain neurons

3.3.5.2 SELS 敲低鸡胚脑神经元组织蛋白酶检测结果

如图 3-50 所示, SELS 敲低显著降低了鸡胚脑神经元中成熟 CTSB 和 CTSD 的蛋白表达 ($p < 0.05$), 同时对细胞进行 CTSB 和 CTSD 免疫荧光染色, 如前描述 CTSB 和 CTSD 定位于溶酶体, 因而在细胞内可呈点状分布, 如图 3-51 所示, SELS 敲低可导致 CTSB 和 CTSD 点状分布减少, 表明 SELS 敲低降低了溶酶体 CTSB 和 CTSD 的含量并抑制其成熟, 这将干扰鸡胚神经元细胞溶酶体的降解功能。

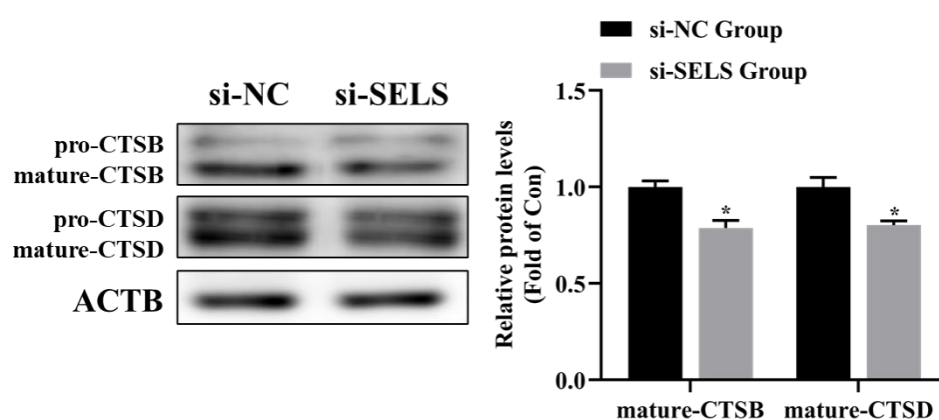


图 3-50 SELS 敲低对鸡胚神经元细胞 CTSB 和 CTSD 的影响

Figure 3-50 The effect of SELS knock down on CTSB and CTSD in chick embryo brain neurons

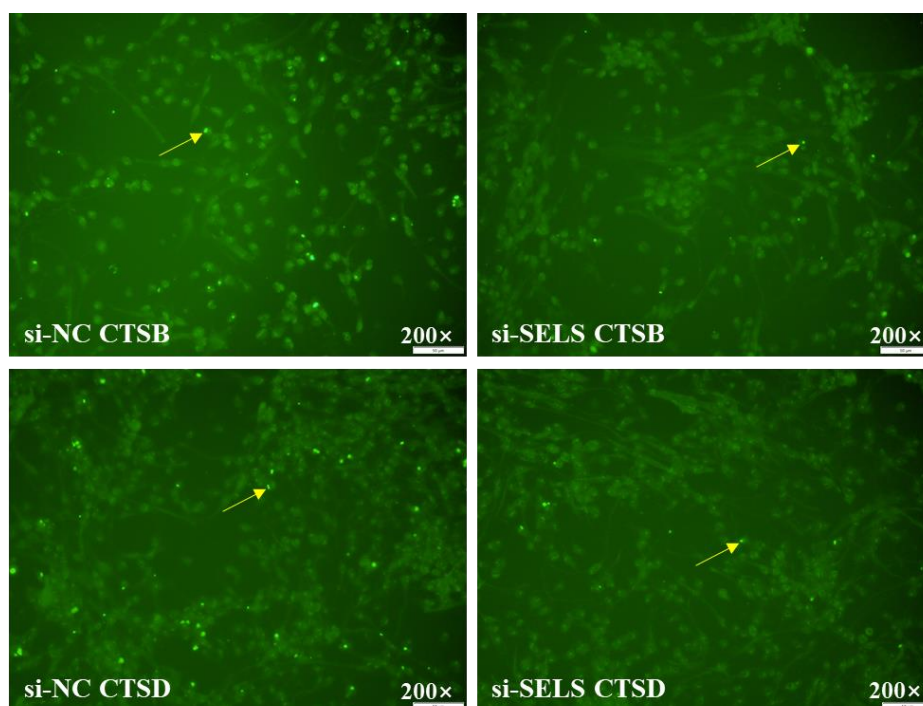


图 3-51 SELS 敲低对鸡胚神经元细胞 CTSB 和 CTSD 免疫着色的影响

Figure 3-51 The effect of SELS knock down on CTSB and CTSD immunostaining in chick embryo brain neurons

3.3.5.3 SELS 敲低鸡胚脑神经元溶酶体钙离子通道 MCOLN1 检测结果

如图 3-52 所示, SELS 敲低增强鸡胚神经元细胞中 MCOLN1 免疫荧光强度 ($p<0.05$), 进一步对 MCOLN1 mRNA 和蛋白表达进行检测, 如图 3-53 所示, SELS 敲低导致鸡胚神经元细胞 MCOLN1 mRNA 和蛋白表达水平升高 ($p<0.05$), 表明 SELS 敲低导致鸡胚神经元细胞溶酶体钙离子通道被激活, 导致溶酶体钙释放到胞浆中。

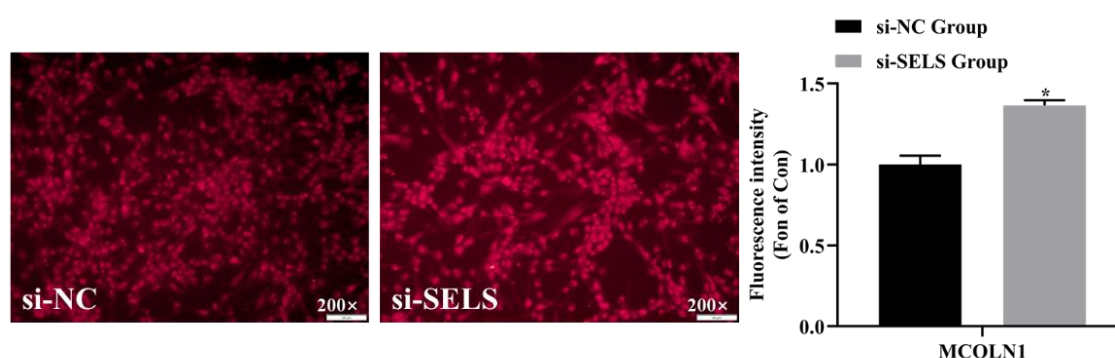


图 3-52 SELS 敲低对鸡胚神经元细胞 MCOLN1 免疫着色的影响

Figure 3-52 The effect of SELS knock down on MCOLN1 immunostaining in chick embryo brain neurons

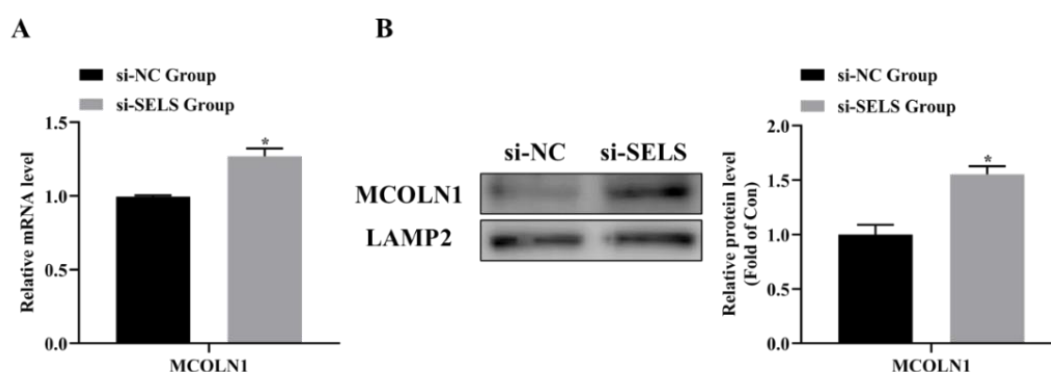


图 3-53 SELS 敲低对鸡胚脑神经元 MCOLN1 的影响, A: mRNA 水平; B: 蛋白水平

Figure 3-53 The effect of SELS knock down on MCOLN1 in chick embryo brain neurons, A: mRNA level; B: protein level

3.3.5.4 SELS 敲低鸡胚脑神经元溶酶体通透性检测结果

如图 3-54 所示, SELS 敲低导致溶酶体中 CTSB 和 CTSD 蛋白水平降低 ($p < 0.05$), 同时胞浆中 CTSB 和 CTSD 蛋白水平增加 ($p < 0.05$), 表明 SELS 敲低可导致 CTSB 和 CTSD 由溶酶体释放到胞浆中, 这一结果表明 SELS 敲低导致鸡胚脑神经元溶酶体通透化。

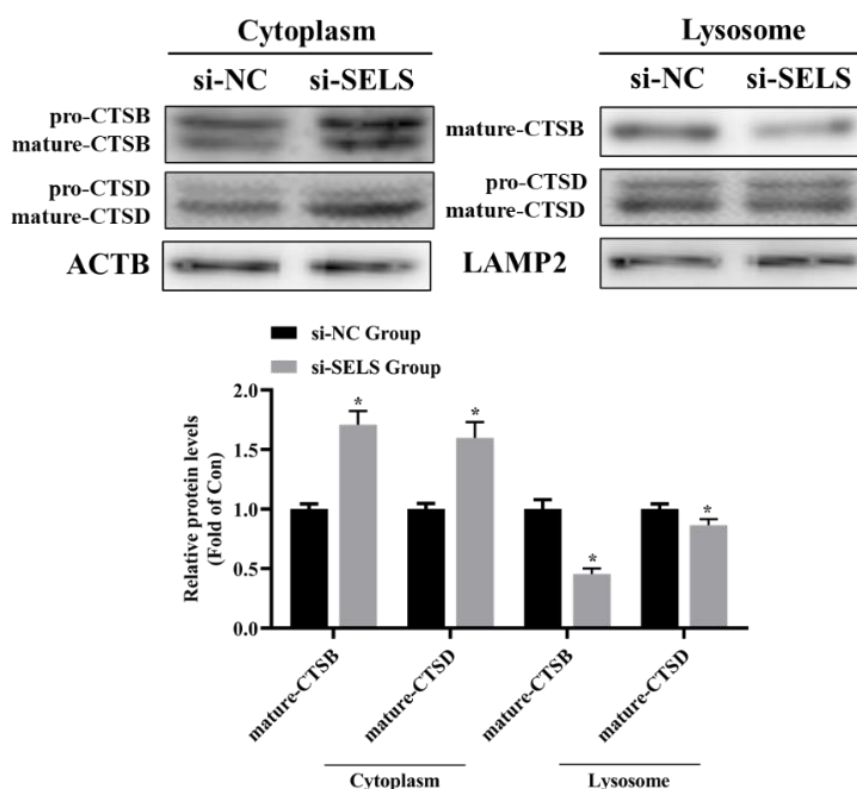


图 3-54 SELS 敲低对鸡胚脑神经元组织蛋白酶 B 和 D 亚细胞定位的影响

Figure 3-54 The effect of Se-deficiency on the subcellular localization of CTSB and CTSD in chick embryo brain neurons

3.3.6 SELS 敲低鸡胚脑神经元自噬流检测结果

如图 3-55 所示, SELS 敲低可导致鸡胚脑神经元 LC3-2 和 P62 蛋白表达增加 ($p<0.05$), 表明 SELS 敲低可导致鸡胚神经元细胞自噬小体增多, 影响自噬底物的降解而导致自噬流抑制。

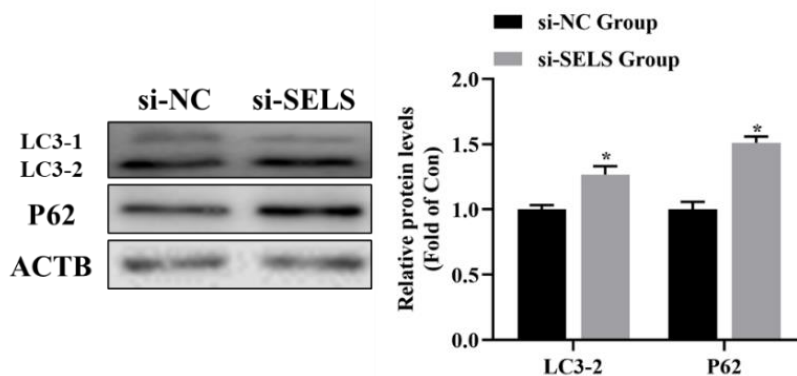


图 3-55 SELS 敲低对鸡胚神经元细胞自噬流的影响

Figure 3-55 The effect of SELS knock down on autophagic flux in chick embryo brain neurons

3.3.7 SELS 敲低鸡胚脑神经元凋亡检测结果

如图 3-56 所示, 流式细胞术检测显示 SELS 敲低导致鸡胚脑神经元细胞凋亡显著增多 ($p<0.05$) 对凋亡相关基因 BCL2、BAX、CAS9 及 CAS3 mRNA 和蛋白表达水平进行检测, 如图 3-57 所示, SELS 敲低可导致鸡胚神经元细胞 BCL2 mRNA 表达水平降低, BAX 及 CAS9、CAS3 mRNA 表达水平升高 ($p<0.05$), 同时 BCL2 蛋白表达水平降低, BAX 及 cle-CAS9 及 cle-CAS3 蛋白表达水平升高 ($p<0.05$), 结果表明, SELS 敲低引起鸡胚脑神经元线粒体途径凋亡。

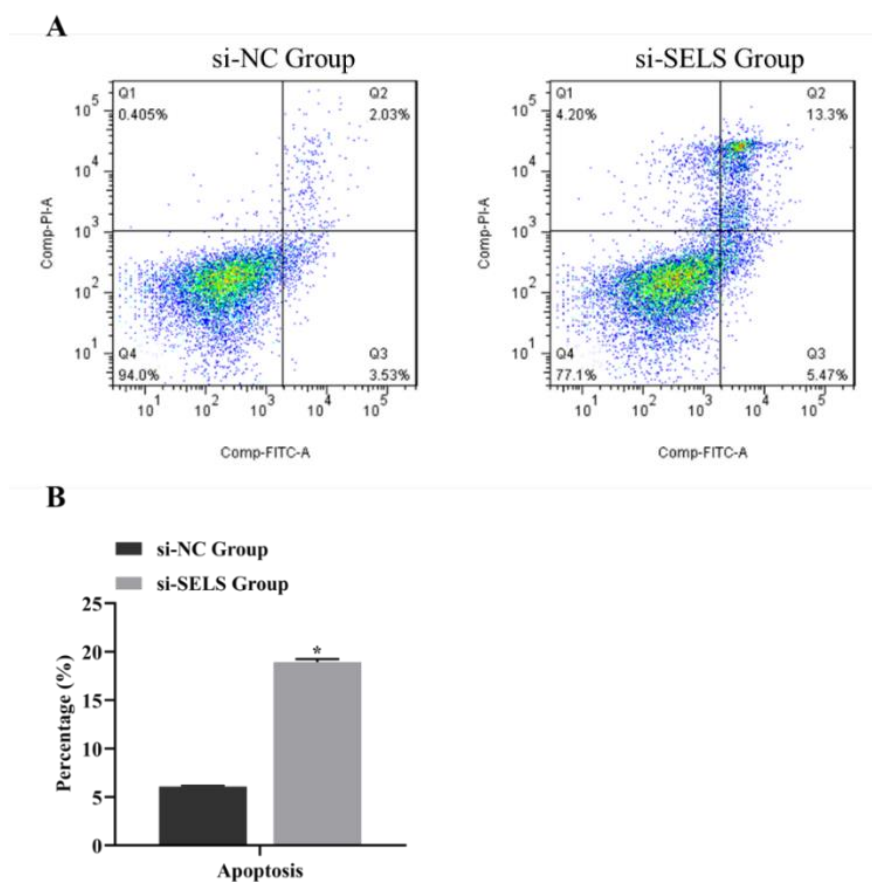


图 3-56 SELS 敲低鸡胚脑神经元凋亡流式细胞术检测结果，A：流式细胞术检测结果；
B：凋亡细胞比例

Figure 3-56 Detection of chick embryo brain neurons apoptosis by flow cytometry, A: the results of flow cytometry; B: percentage of apoptotic cells

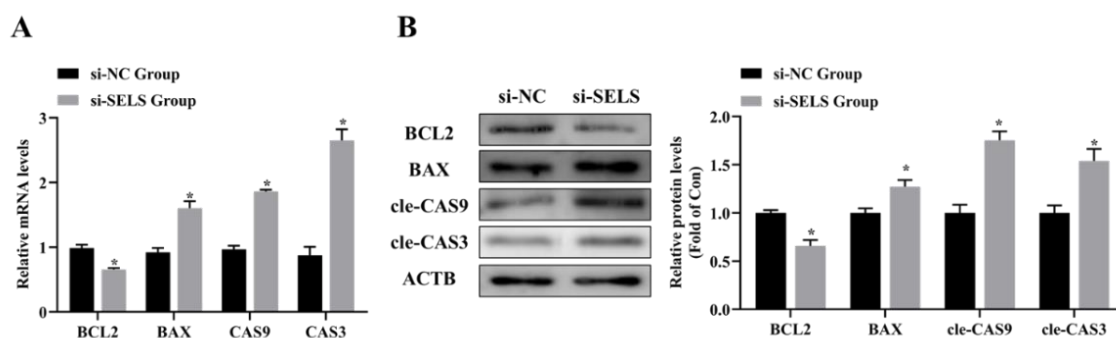


图 3-57 SELS 敲低对鸡胚脑神经元凋亡的影响，A：mRNA 水平；B：蛋白水平
Figure 3-57 The effect of SELS knock down on apoptosis in chick embryo brain neurons, A: mRNA level; B: protein level

3.4 NAC 处理 SELS 敲低鸡胚胎脑神经元相关指标检测结果

3.4.1 NAC 处理 SELS 敲低鸡胚胎脑神经元 ROS 检测结果

如图 3-58 所示, NAC 可有效降低 ROS 荧光强度 ($p<0.05$), 表明 NAC 可以缓解 SELS 敲低引起的 ROS 的水平, 缓解减轻 SELS 敲低引起的氧化应激损伤。

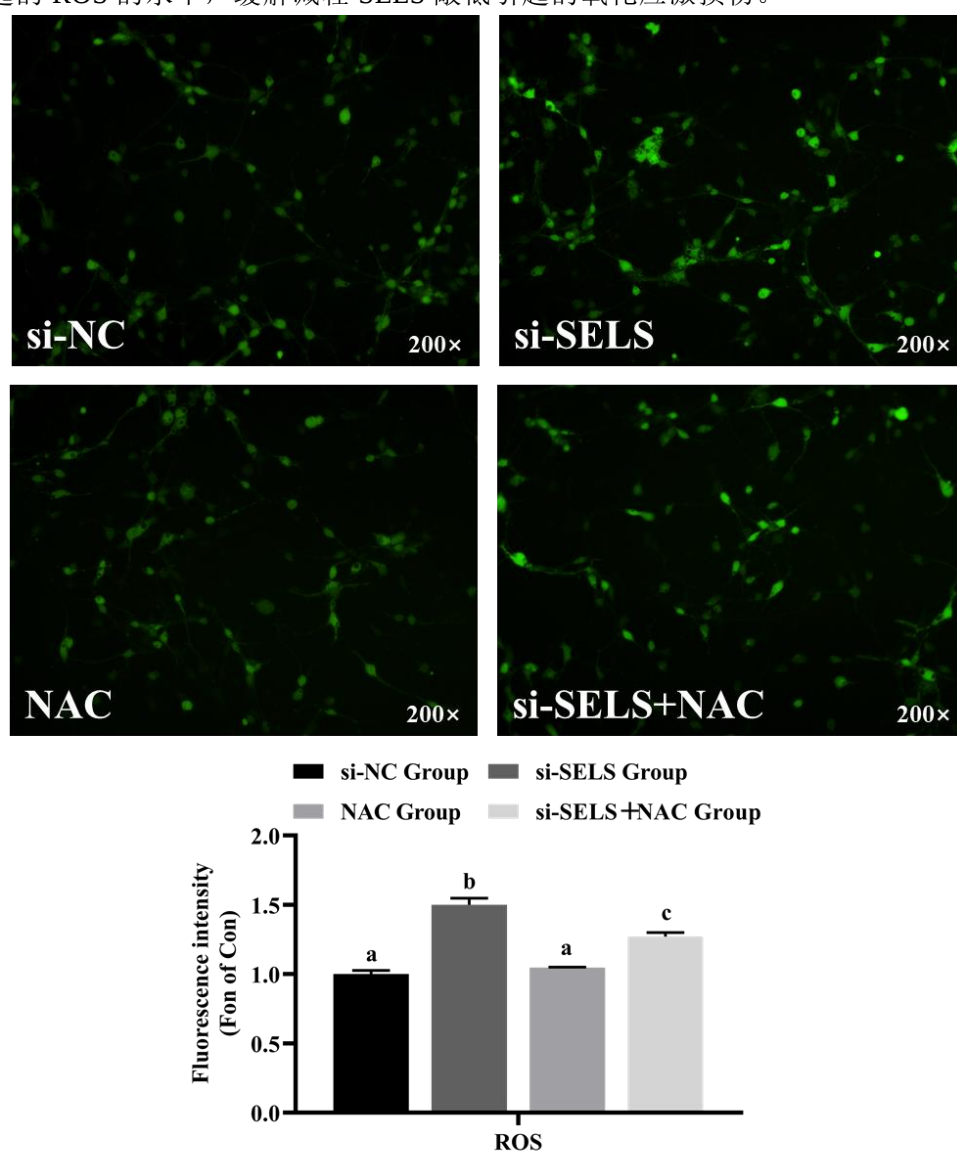


图 3-58 NAC 对 SELS 敲低引起的 ROS 水平升高的影响

Figure 3-58 The effect of NAC on the increase of ROS level induced by SELS knockdown

3.4.2 NAC 处理 SELS 敲低鸡胚胎脑神经元溶酶体稳检测结果

3.4.2.1 NAC 处理 SELS 敲低鸡胚胎脑神经元溶酶体 V-ATPase 检测结果

如图 3-59 所示, NAC 可以有效缓解 SELS 敲低所导致的 ATP6V1A、ATP6V1B2 及 ATP6V1D 的抑制 ($p<0.05$), 恢复其蛋白表达, 表明缓解氧化应激可有效恢复 V-ATPase 活性, 缓解 SELS 敲低引起的溶酶体酸化受阻。

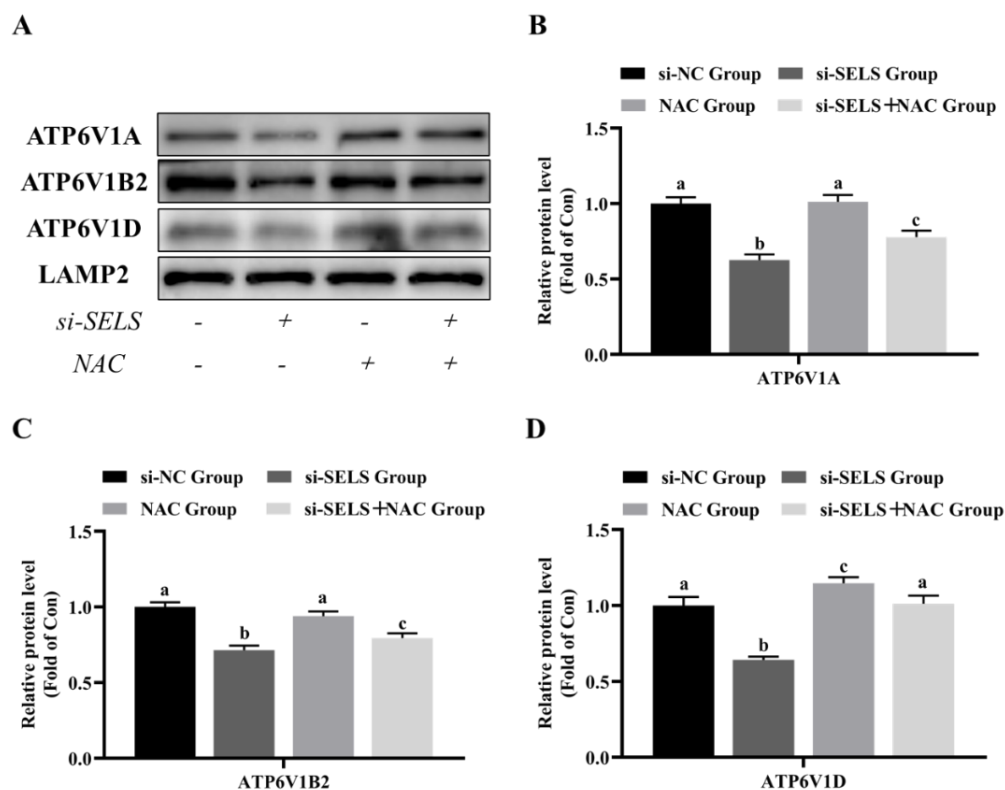


图 3-59 NAC 对 SELS 敲低引起的 V-ATPase 抑制的影响, A: 蛋白结果; B: ATP6V1A 蛋白水平; C: ATP6V1B2 蛋白水平; D: ATP6V1D 蛋白水平

Figure 3-59 The effect of NAC on the inhibition of V-ATPase induced by SELS knockdown, A: protein results; B: ATP6V1A protein level; C: ATP6V1B2 protein level; D: ATP6V1D protein level

3.4.2.2 NAC 处理 SELS 敲低鸡胚胎脑神经元组织蛋白酶检测结果

如图 3-60 所示, NAC 有效缓解 SELS 敲低所导致的成熟 CTSB 和 CTSD 的抑制 ($p<0.05$), 恢复其蛋白表达, 表明缓解氧化应激可以缓解 SELS 敲低引起的成熟 CTSB 和 CTSD 蛋白水平降低, 缓解溶酶体酶活性的降低。

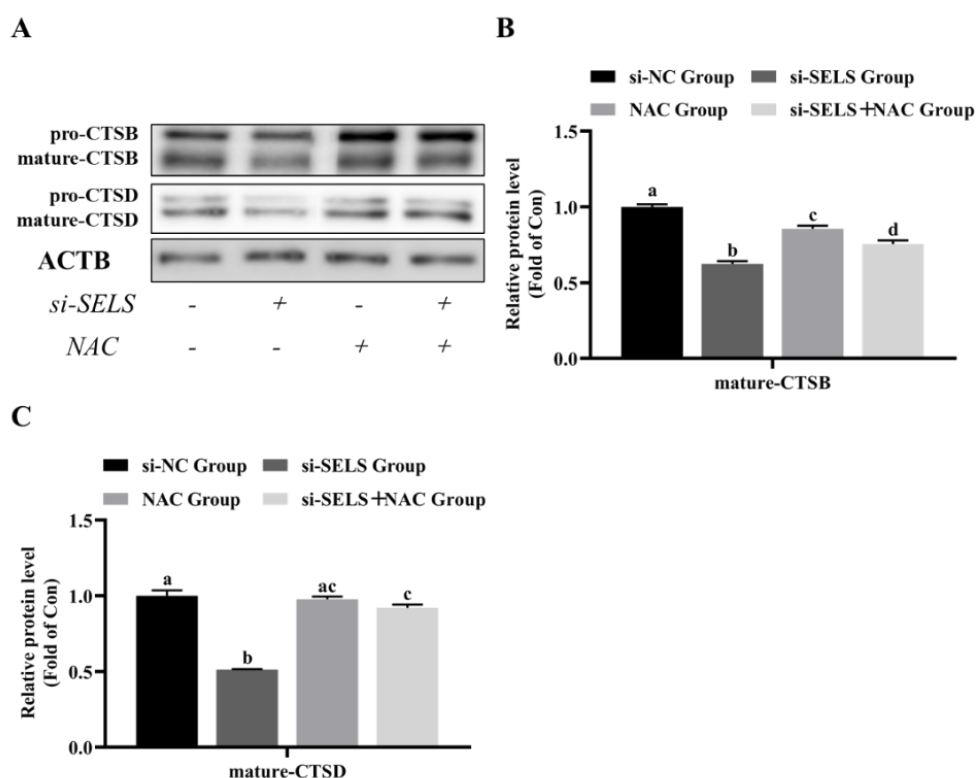


图 3-60 NAC 对 SELS 敲低引起的 CTSB 和 CTSD 抑制的影响，A：蛋白结果；B：CTSB 蛋白水平；C：CTSD 蛋白水平

Figure 3-60 The effect of NAC on the inhibition of CTSB and CTSD induced by SELS knockdown, A: protein results; B: CTSB protein level; C: CTSD protein level

3.4.2.3 NAC 处理 SELS 敲低鸡胚胎脑神经元溶酶体 MCOLN1 检测结果

如图 3-61 所示，NAC 降低 SELS 敲低导致的 MCOLN1 升高 ($p < 0.05$)，表明抑制氧化应激可缓解 SELS 敲低引起的溶酶体钙离子泄露，维持溶酶体钙稳态。

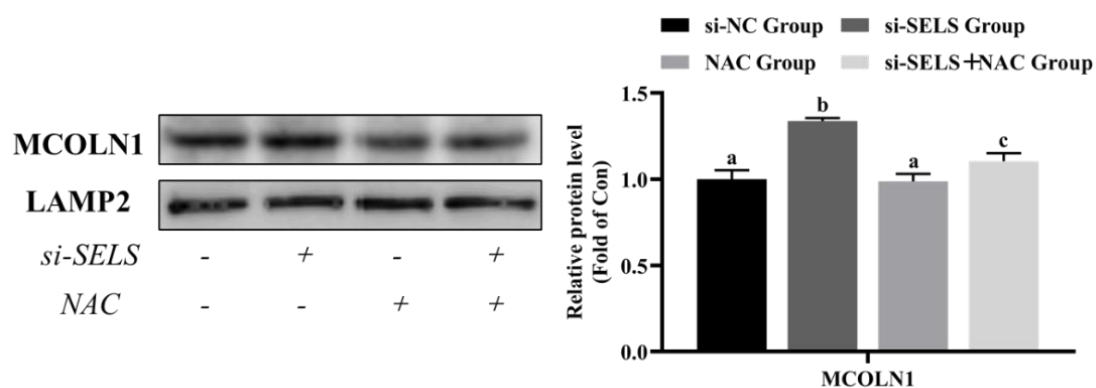


图 3-61 NAC 对 SELS 敲低引起的 MCOLN1 升高的影响

Figure 3-61 The effect of NAC on the increase of MCOLN1 induced by SELS knockdown

3.4.2.4 NAC 处理 SELS 敲低鸡胚胎脑神经元溶酶体膜通透性检测结果

如图 3-62 所示, NAC 有效降低 SELS 敲低导致的胞浆中成熟 CTSB 和 CTSD 增加($p<0.05$), 表明 NAC 可以缓解 SELS 敲低引起的溶酶体膜通透化, 维持溶酶体膜稳态。

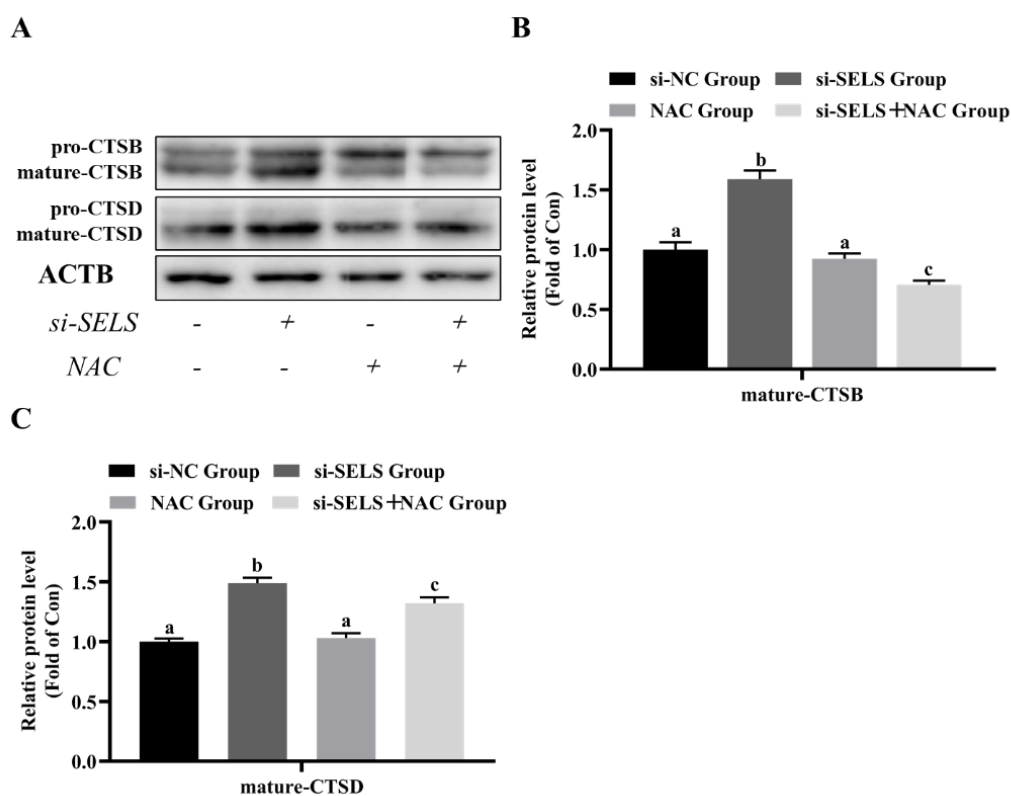


图 3-62 NAC 对 SELS 敲低引起的胞浆 CTSB 和 CTSD 升高的影响, A: 蛋白结果; B: CTSB 蛋白水平; C: CTSD 蛋白水平

Figure 3-62 The effect of NAC on the increase of CTSB and CTSD in cytoplasm induced by SELS knockdown, A: protein results; B: CTSB protein level; C: CTSD protein level

3.4.3 NAC 处理 SELS 敲低鸡胚胎脑神经元自噬流检测结果

如图 3-63 所示, NAC 有效降低 SELS 敲低导致的 LC3-2 及 P62 升高 ($p<0.05$), 表明 NAC 可以缓解 SELS 敲低引起的自噬流抑制, 恢复自噬流, 揭示溶酶体酶稳态失衡引起导致自噬流抑制。

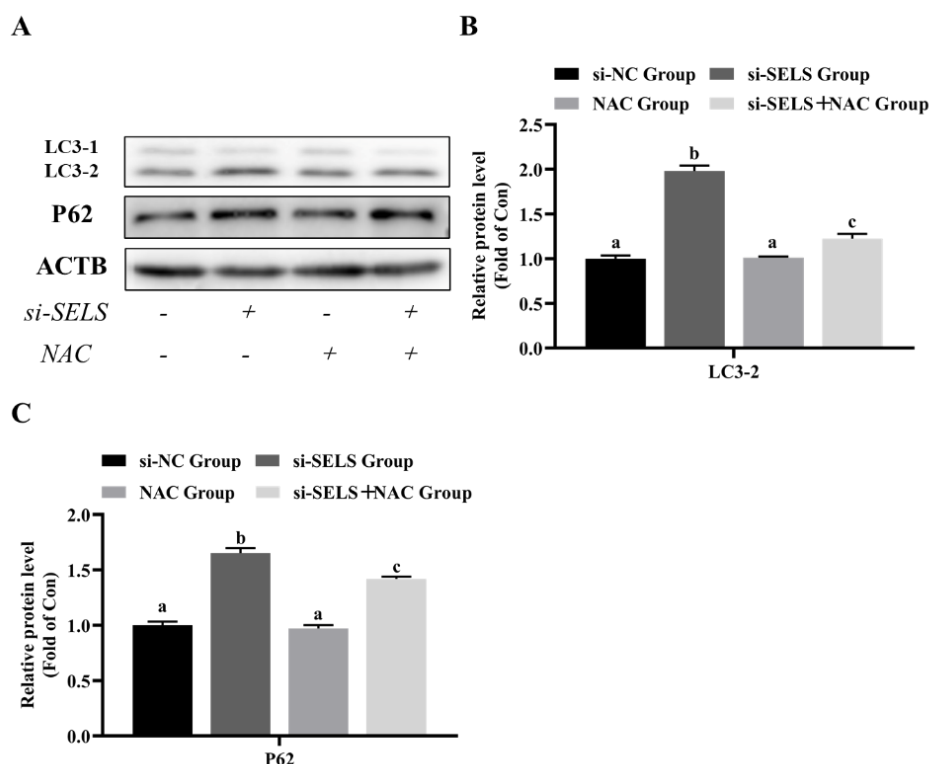


图 3-63 NAC 对 SELS 敲低引起的自噬流抑制的影响，A：蛋白结果；B：LC3-2 蛋白水平；C：P62 蛋白水平

Figure 3-63 The effect of NAC on the inhibition of autophagic flux in cytoplasm induced by SELS knockdown, A: protein results; B: LC3-2 protein level; C: P62 protein level

3.4.4 NAC 处理 SELS 敲低鸡胚胎脑神经元凋亡检测结果

如图 3-64 及 3-65 所示，NAC 有效降低 SELS 敲低引起的凋亡细胞的数量 ($p < 0.05$) 及 cle-CAS3 蛋白表达水平 ($p < 0.05$)，表明缓解氧化应激可缓解 SELS 敲低引起的细胞凋亡，且这种改变可能与溶酶体功能稳态失衡恢复相关。

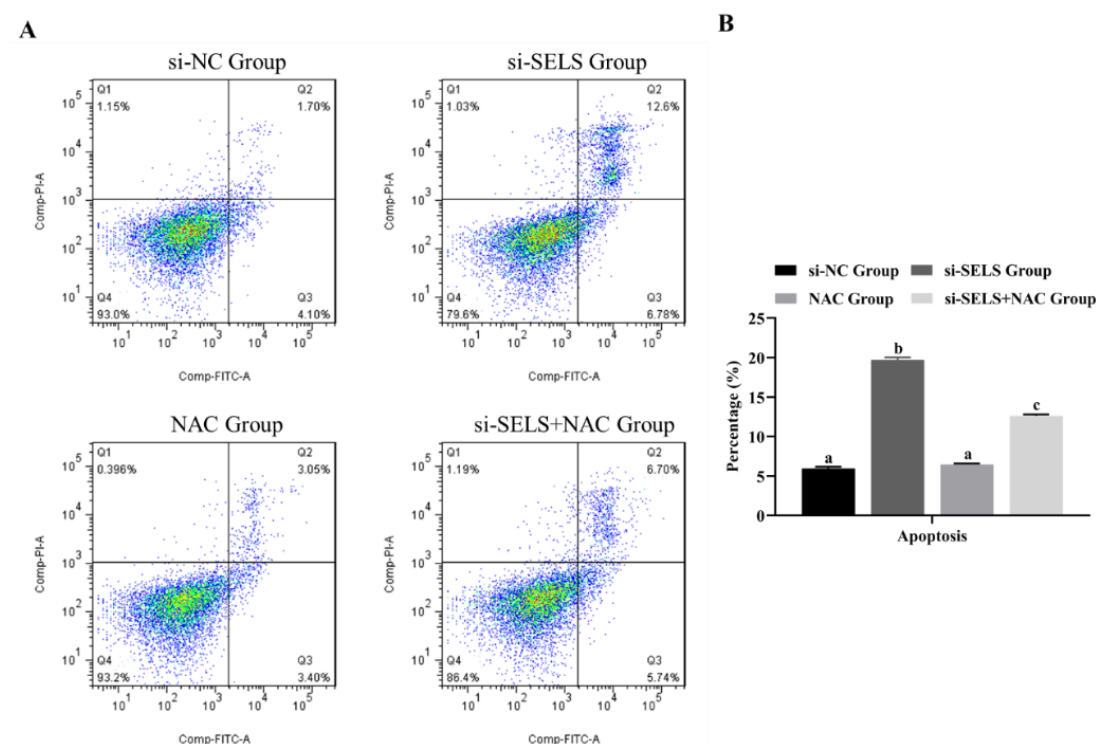


图 3-64 NAC 对 SELS 敲低引起鸡胚脑神经元细胞凋亡的影响, A: 流式细胞术检测结果; B: 凋亡细胞比例

Figure 3-64 Effect of NAC on apoptosis induced by SELS knockdown in chick embryonic brain neurons, A: the results of flow cytometry; B: percentage of apoptotic cells

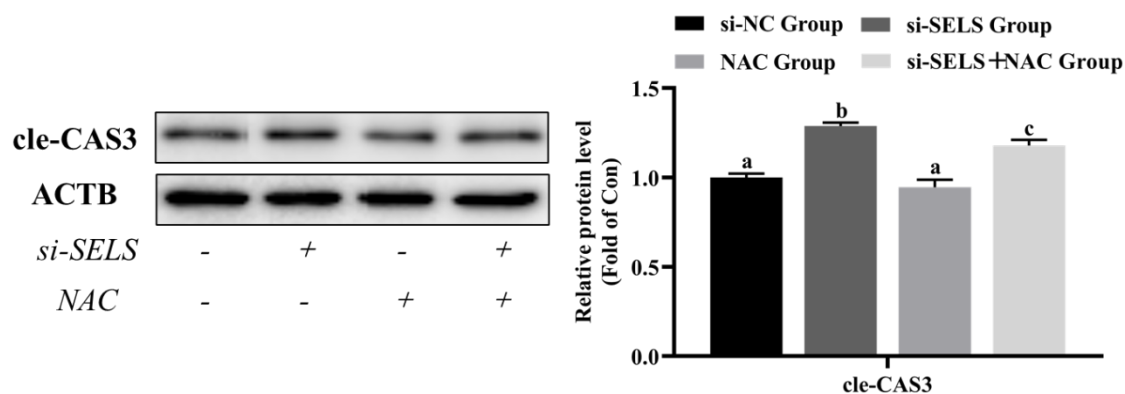


图 3-65 NAC 对 SELS 敲低引起的 cle-CAS3 升高的影响

Figure 3-65 The effect of NAC on the increased cle-CAS3 induced by SELS knockdown

3.5 E-64 处理 SELS 敲低鸡胚胎脑神经元相关指标检测结果

3.5.1 E-64 处理 SELS 敲低鸡胚胎脑神经元胞浆 CTSB 检测结果

如图 3-66 所示, 随着 CTSB 抑制剂 E-64 的加入, SELS 敲低引起的胞浆中 CTSB 蛋白水平升高得到缓解 ($p<0.05$), 表明 E-64 有效抑制脑神经元中 CTSB 的表达。

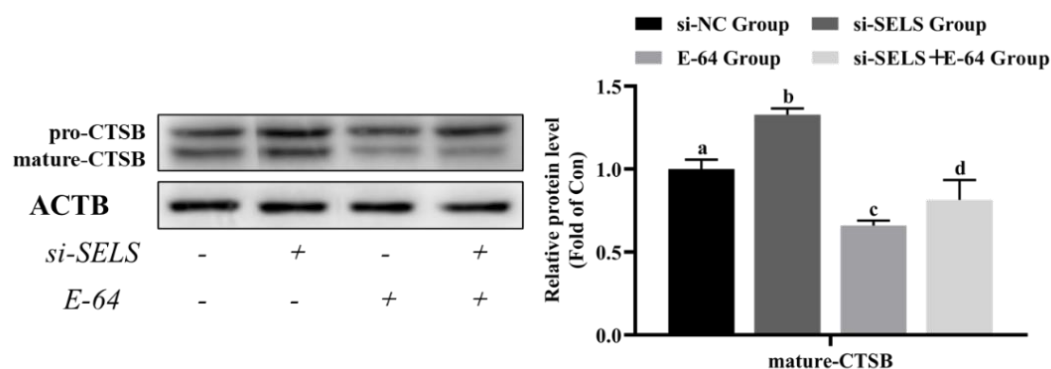


图 3-66 E-64 对 SELS 敲低引起的胞浆 CTSB 升高的影响

Figure 3-66 The effect of E-64 on the increased CTSB in cytoplasm induced by SELS knockdown

3.5.2 E-64 处理 SELS 敲低鸡胚胎脑神经元凋亡检测结果

如图 3-67 和 3-68 所示, E-64 降低 SELS 敲低引起的凋亡细胞的数量 ($p<0.05$) 及 cle-CAS3 蛋白表达水平 ($p<0.05$), 表明胞浆中 CTSB 参与启动细胞凋亡。

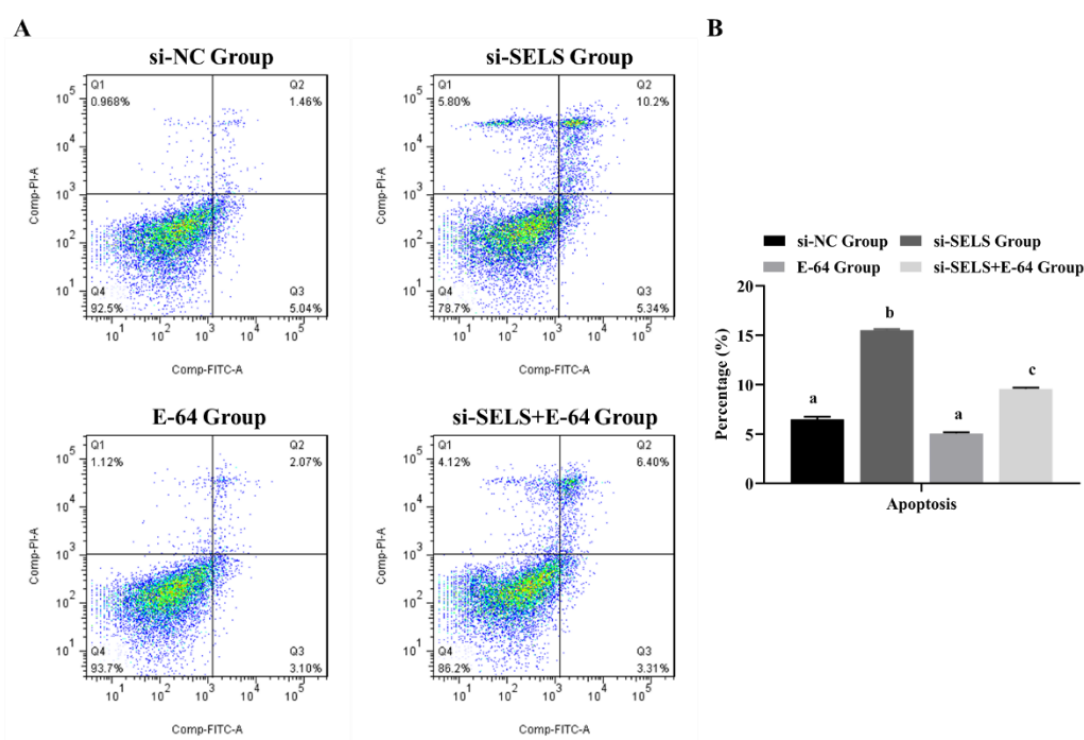


图 3-67 鸡胚胎脑神经元凋亡的流式细胞术检测, A: 流式细胞术结果; B: 凋亡细胞比例

Figure 3-67 Detection of chick embryo brain neurons apoptosis by flow cytometry, A: the results of flow cytometry; B: percentage of apoptotic cells

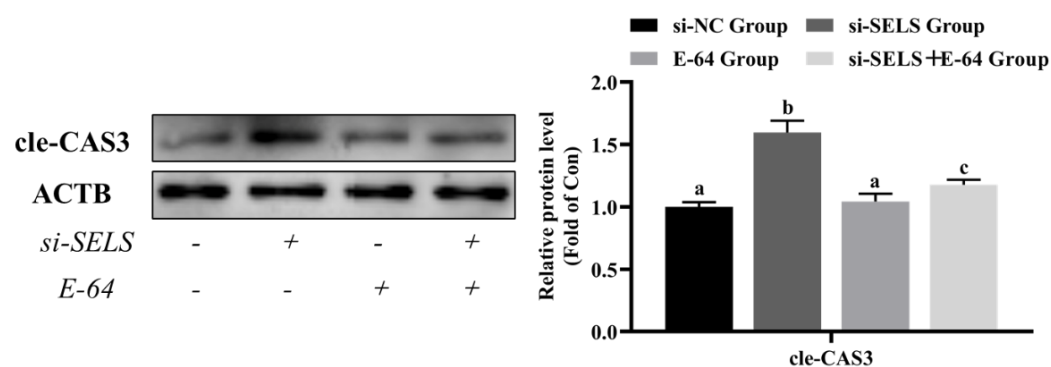


图 3-68 E-64 对 SELS 敲低引起的 cle-CAS3 升高的影响

Figure 3-68 The effect of NAC on the increased cle-CAS3 induced by SELS knockdown

3.6 Pepstatin A 处理 SELS 敲低鸡胚胎脑神经元相关指标检测结果

3.6.1 Pepstatin A 处理 SELS 敲低鸡胚胎脑神经元胞浆 CTSD 检测结果

如图 3-69 所示, 随着 CTSD 抑制剂 Pepstatin A 的加入, SELS 敲低引起的胞浆中 CTSD 蛋白水平升高得到缓解 ($p < 0.05$), 表明 Pepstatin A 可有效抑制脑神经元中 CTSD 的表达。

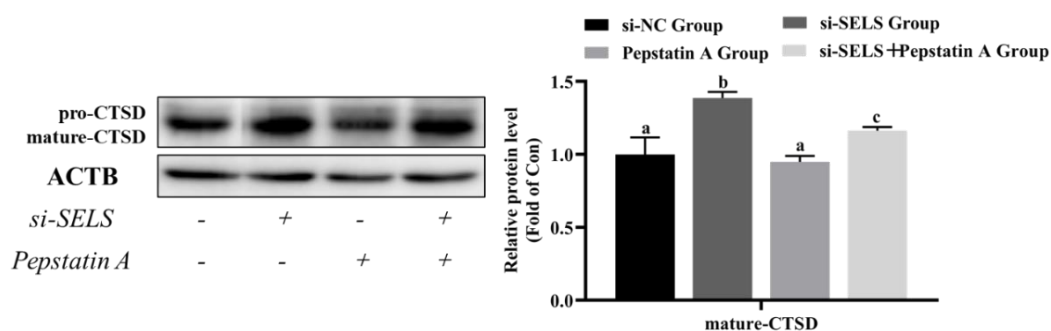


图 3-69 Pepstatin A 对 SELS 敲低引起的胞浆 CTSD 升高的影响

Figure 3-69 The effect of Pepstatin A on the increase of CTSD in cytoplasm induced by SELS knockdown

3.6.2 Pepstatin A 处理 SELS 敲低鸡胚脑神经元凋亡检测结果

Pepstatin A 降低 SELS 敲低引起的凋亡细胞的数量 ($p<0.05$) 及 cle-CAS3 蛋白表达水平 ($p<0.05$), 表明胞浆中 CTSD 参与细胞凋亡的启动。

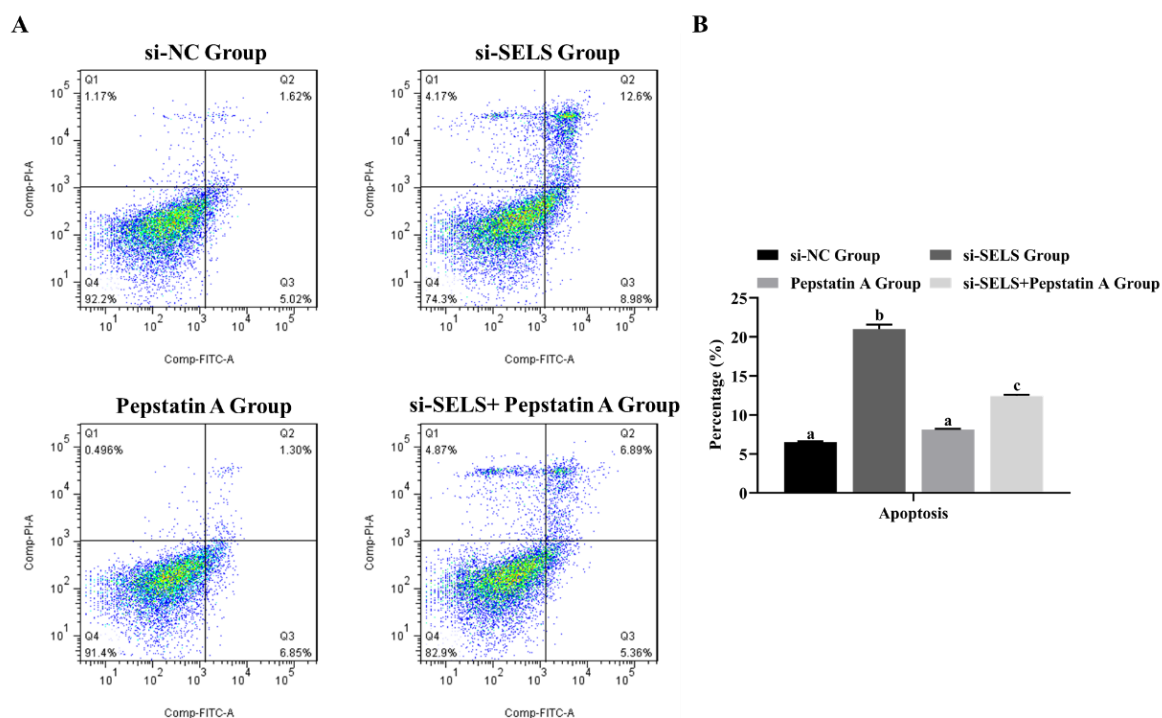


图 3-70 鸡胚脑神经元凋亡的流式细胞术检测结果, A: 流式细胞术检测结果; B: 凋亡细胞比例

Figure 3-70 Detection of chick embryo brain neurons apoptosis by flow cytometry, A: the results of flow cytometry; B: percentage of apoptotic cells

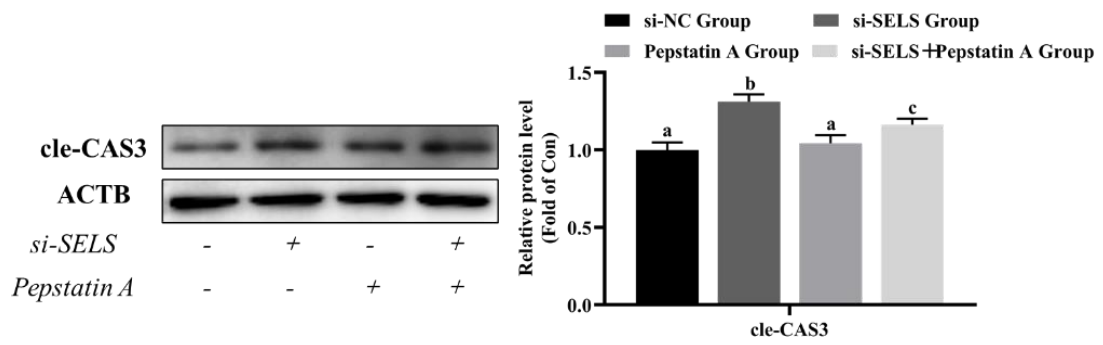


图 3-71 Pepstatin A 对 SELS 敲低引起的 cle-CAS3 升高的影响

Figure 3-71 The effect of Pepstatin A on the increased cle-CAS3 induced by SELS knockdown

4 讨论

鸡缺硒主要临床表现为腹部、翅膀下部及大腿伴有胶冻样淡绿色渗出物，又称为渗出性素质症，病鸡常精神不佳，喜趴卧，部分病鸡站立时两腿叉开并表现出运动功能障碍，行走困难，解剖后发现小脑出现软化。小脑是机体运动的重要调节中枢，可调节躯体平衡和随意运动，小脑损伤可引起机体共济失调及平衡障碍。临床症状及剖检观察表明，硒缺乏可引起鸡小脑损伤，揭示硒在维持小脑正常功能方面发挥重要作用。

目前，尽管人们对硒生物学功能有了很深的认识，但硒在维持小脑及神经元正常功能的机制仍缺乏了解。前期研究表明，日粮缺硒可引起雏鸡体内多组织及细胞内 SELS 表达降低^[47, 49, 127-130]，此外，SELS 在各种脑损伤中表达升高，并通过减轻内质网应激和炎症损伤来减轻脑损伤^[36, 58, 83]，提示 SELS 在保护脑损伤中发挥重要作用。溶酶体作为细胞“消化中心”在维持细胞内稳态发挥关键作用，许多神经退行性神经疾病都存在溶酶体功能紊乱^[123]。早期研究发现缺硒可引起溶酶体稳定性降低^[120, 121]。然而硒缺乏是否通过溶酶体功能障碍导致脑损伤，SELS 是否参与溶酶体稳态调控及其在缺硒性脑损伤中的作用机制尚不清楚。本课题通过配制缺硒日粮和缺硒培养基复制鸡小脑和鸡胚脑神经元缺硒模型，并通过检测内质网应激、抗氧化水平、溶酶体稳态、自噬溶酶体降解途径及凋亡分析缺硒性小脑损伤的可能机制，同时建立 SELS 敲低鸡胚脑神经元模型，探讨 SELS 维持溶酶体稳态的机制及 SELS 表达降低对脑神经元的损伤，以揭示 SELS 维持溶酶体稳态的可能机制及其在缺硒性小脑损伤的作用机制。

4.1 鸡缺硒性小脑损伤、鸡胚脑神经元缺硒及 SELS 敲低模型的建立

4.1.1 鸡缺硒性小脑损伤模型的建立

已证实，当硒摄入量不足时，机体会优先将硒供给中枢神经系统，脑中硒含量的维持时间普遍长于其他器官，因此，脑是机体内最后受到缺硒影响的器官，长期缺硒会引起脑部损伤及疾病的发生^[131]。张健^[132]研究发现硒缺乏可导致伊莎蛋鸡站立不稳，行走困难，两肢麻痹、卧地不起，解剖发现小脑肿胀湿润，脑回和脑沟闭合，变得平展。进一步对大脑病理学变化和超微结构进行观察发现，随着缺硒时间的延长，大脑髓质松散加剧，皮质更薄，颗粒细胞几乎完全消失，而细胞核质比明显变小，细胞器、核糖体等减少，线粒体电子密度更大，嵴结构消失。赵金欣^[133]成功复制了 AA 肉鸡低硒模型，发现缺硒可导致鸡食欲减退，羽毛凌乱无光泽，并站立不稳喜俯卧。缺硒可导致核膜皱缩、核浓缩、粗面内质网减少、肿胀，线粒体出现空泡化。为进一步探讨缺硒性小脑损伤机制，本研究饲喂缺硒日粮建立缺硒鸡模型，通过临床症状及剖检变化证实缺硒鸡模型建立成功。

本研究通过 HE 染色、镀银染色、尼氏体染色观察缺硒对鸡小脑造成的损伤,发现缺硒可导致鸡小脑颗粒层变薄,小脑白质增多,浦肯野细胞减少甚至消失,嗜酸性浦肯野细胞增多,浦肯野细胞层中神经纤维堆积缠结,颗粒层神经纤维杂乱稀少,尼氏体数量减少,白质区少量神经元细胞死亡,但并未见明显的炎性细胞浸润。本研究还进行了 α -syn 免疫荧光染色。 α -syn 是脑内一种含量丰富的可溶性蛋白质,正常情况下以可溶的单体形式存在,当其聚集成不溶性寡聚体时,可引起神经元细胞死亡。自噬溶酶体途径在 α -syn 降解中发挥重要作用。本研究结果表明缺硒可导致小脑组织 α -syn 表达量增多,并出现大量聚集,这代表着自噬溶酶体途径或溶酶体功能可能受损。此外,TUNEL 法检测结果表明缺硒可导致鸡小脑凋亡的发生。这些结果表明,缺硒可导致鸡小脑损伤,细胞凋亡可能是其主要损伤机制,为深入研究缺硒性小脑损伤指明方向,同时溶酶体这一重要细胞器也成为本研究的研究重点。

4.1.2 鸡胚胎神经元培养条件优化及缺硒模型建立

原代培养的神经元与体内的神经元非常相似,因此本研究分离和纯化鸡胚胎神经元用于体外研究。鼠海马神经元的分离纯化手段已非常成熟,本研究借鉴和参照鼠海马神经元分离纯化及培养方法对 7 日龄鸡胚全脑进行脑神经元的分离纯化和培养^[134, 135]。该方法获得的鸡胚胎神经元大小均匀,生长状况良好,且在培养 18 h 已有一部分神经元突起明显,至 48 h 时已基本形成纵横交错的神经网络。用 MAP2 免疫荧光染色法对神经元进行鉴定,可见视野中细胞 MAP2 阳性数量较多,表明神经元纯度较高,可用于神经元体外研究。

体外培养的细胞中硒主要来源于培养基。本研究对所用细胞培养基 Neurobasal 和 B-27 添加剂的组分(见附录表 4 和 5)分析发现,培养基 Neurobasal 不含硒,硒主要由 B-27 提供。B-27 是神经元培养常用的一种添加剂,取代常规 10%血清,可促进神经元的生长而抑制非神经元的生长和繁殖。B27 中还含有多种神经细胞生长的必需神经因子,如亚硒酸钠。因而,本研究通过降低培养基中 B-27 的含量(从 2%将为 0.4%)来达到缺硒目的,并通过补充胰岛素和转铁蛋白来维持细胞正常营养需求。正常培养基在此基础上补充终浓度为 7 ng/mL 的亚硒酸钠(以硒计)^[136, 137]。随后本研究对硒蛋白的 mRNA 表达、GPX1 蛋白表达水平及 GSH-Px 酶活性进行检测,发现与补硒的培养基相比,未补硒的培养基可显著降低大部分硒蛋白的 mRNA 表达水平、GPX1 蛋白水平及 GSH-Px 酶活性,标志着鸡胚胎神经元缺硒模型建立成功,可进行后续试验。

4.1.3 硒对 SELS 表达的影响及 SELS 敲低鸡胚胎神经元模型的建立

SELS 作为硒蛋白的一员,其表达受到硒含量的影响。日粮缺硒可引起雏鸡体内各组织及细胞内 SELS 表达降低,如胰腺^[47]、脂肪^[127]、肠道^[49]、软骨^[128]、中性粒细胞^[129]、树突状细胞^[130]等,表明 SELS 参与缺硒性损伤。此外,研究发现 SELS 广泛表达于不同物种的脑组织中,如猪^[138]、鼠^[83]、鸡^[84]等,以及一些神经细胞,如人星形胶质细胞^[36]、小鼠神经母细胞瘤^[90]。本研究发现,缺硒导致鸡小脑及鸡胚胎神经元 SELS 表达水平降低,氧化应激、内质网应激、自噬流抑制及凋亡等,同时伴有溶酶体稳态失衡,包括溶酶体酸化受抑制、酶活

性降低、钙泄露及膜通透性化,表明溶酶体稳态失衡参与缺硒性小脑损伤。然而,对于 SELS 是否参与溶酶体稳态调节及潜在机制尚未可知。

为进一步探讨 SELS 在缺硒性脑损伤中的潜在作用及其调控溶酶体稳态机制,本研究建立鸡胚脑神经元 SELS 敲低模型。神经元是终末分化细胞,进行转染的难度较高,因此选择合适的转染方法进行试验至关重要,既要有较高的转染效率,又不能对神经元造成损伤。目前,常见的转染方法主要有病毒转染、磷酸钙共沉淀法、电穿孔法和阳离子脂质体法。相较于其他方法,阳离子脂质体法操作简单、安全可靠、转染效率相对较高^[139]。因此,本研究使用 Lipofectamine RNAi MAX 进行转染,其对细胞损伤较小,转染 24 h 后收集细胞检测 SELS mRNA 及蛋白表达水平,发现该方法可显著抑制 SELS 表达,标志着 SELS 敲低鸡胚脑神经元模型建立成功,可用于后续试验。

4.2 缺硒对鸡小脑金属离子稳态的影响

离子在各种生物中起着至关重要的作用,细胞内离子稳态对细胞维持正常功能是必不可少的。金属离子是机体内近乎一半酶功能所必需的基本组成部分,几乎参与所有的基本生物过程。金属离子在金属蛋白中有三个主要功能:提供结构支持、作为酶辅因子和介导电子传递^[140]。细胞内金属离子浓度的任何异常都可能导致重要代谢物质的缺乏,进而造成细胞死亡和疾病发生^[141]。脑需要突触间隙中高水平的游离金属离子作为突触传递的调节剂,因而金属稳态失调,包括金属离子过量或不足,都可作为神经毒性的中介因子,导致神经元功能障碍^[142]及细胞死亡^[143]。有证据表明,人体内必需的生物金属离子平衡破坏,以及暴露于环境中的某些金属离子都可能导致 AD 病理学的改变^[144]。因此了解缺硒性小脑损伤过程中离子水平变化及硒与离子相互作用对于揭示缺硒性疾病大有裨益。

已有研究表明日粮硒缺乏可影响动物机体内多种金属离子的水平和组织分布。有研究指出,缺硒 12 周可导致 Wistar 大鼠肝脏中 Cu 升高而对 Fe、Zn 并无明显影响^[145]。Giray 等^[146]检测缺硒雄性 Wistar 大鼠血浆、肝脏、脑、肾脏、心脏及睾丸中 Cu、Zn、Fe、Mn 等金属离子变化,发现缺硒 5 周可导致脑中 Cu 升高而心脏和睾丸中 Cu 降低,肝脏和肾脏中 Fe 升高而心脏中 Fe 降低,肾脏中 Zn 升高,血浆和肾脏中 Mn 升高而肝脏中 Mn 降低。Erkekoglu 等^[147]发现 Sprague-Dawley 大鼠缺硒 5 周可导致血浆中 Zn 及肾脏中 Cu 和 Mn 降低,肾脏中 Zn 及睾丸 Zn 和 Cu 升高。缺硒可导致鸡骨骼肌金属离子 Ca 降低,V, Cr, Mn, Cu, Cd 和 Hg 升高^[23, 148]。本研究发现缺硒可导致鸡小脑组织中 K、Fe、Zn、B 及 Ni 含量降低,Ca、Cr、Mo 及 V 含量增加,并导致小脑组织中毒性元素 Cd 含量升高。金属离子稳态对中枢神经系统中许多生理功能如酶活性、线粒体功能、髓鞘形成、神经传递以及学习和记忆的发育和维持都至关重要^[149]。这些受影响的金属离子中 K 和 Ca 与细胞渗透平衡和信号传导(包括突触通讯和兴奋性)有关,它们可通过低亲和力的结合位点与蛋白质形成复合物,并在细胞间快速移动,其含量异常可导致神经元功能异常^[150, 151]。Fe 和 Zn 参与氧化还原信号传导,在调节抗氧化方面发挥重要作用,同时可参与神经递质的合成、调节突触传递、脑发育以及免疫功能等^[144]。B、Ni、Cr、Mo 和 V 作为机体必需微量元素,缺乏和过量可导致某些神经化学过程受损而引发疾病^[152]。Cd 作为有毒重金属,具有严重神经毒性,可导致氧化还原稳态破

坏及代谢功能紊乱^[153]，同时研究表明 Cd 可通过抑制 α -分泌酶的活性导致 A β 斑块沉积增加从而参与 AD 的发病机制^[154]。本研究揭示硒缺乏可干扰鸡小脑中金属离子稳态，其中 K、Fe、Zn、B 及 Ni 的流失，Ca、Cr、Mo、V 及 Cd 的蓄积参与缺硒性小脑损伤，可能导致小脑抗氧化水平及神经元功能受损。

4.3 缺硒对鸡小脑 mRNA 转录组学的影响

转录组是指某一生理或病理状态下特定细胞、组织或器官所能转录出的所有 RNA 的总和^[155]，既包括 mRNA 和非编码 RNA，如 miRNA 和 LncRNA 等，狭义的转录组指 mRNA 转录组。进行转录组学研究，可以深入分析和探究基因的结构与功能，在揭示基因表达与生物表型的内在联系方面发挥重要作用^[156]。此外，可以根据基因转录的情况进行与疾病相关的基因的筛选，从而揭示疾病发生过程中的分子机理^[157]。因此，转录组学是发现新的诊断或治疗靶点的潜力工具。虽然才刚刚开始转化为临床实践，随着成本的降低和对这些技术的利用率的提高，转录组学的优势日益突出。鸡是最重要的经济物种之一，也是生物学和医学研究的独特模式生物，是第一个进行基因组测序的非哺乳动物^[158]。转录组学也被广泛应用于鸡等禽类疾病的发生与发展研究中。Boo 等^[159]利用 mRNA 转录组学技术发现，传染性法氏囊病病毒可导致鸡上皮内淋巴细胞自然杀伤（IEL-NK）细胞 1266 个基因差异表达。Xu 等^[160]对雄鸡 3 个胚胎阶段、2 个生长阶段和 3 个成体阶段的大脑进行 mRNA 和 lncRNA 组学分析，探索了鸡脑发育和衰老过程中转录组的整体表达模式。Guo 等^[161]探讨了苯巴比妥（PB）对鸡胚肝脏转录组的影响，发现苯巴比妥对鸡胚肝脏转录组的影响具有性别差异，可引起雄性 52 个基因、雌性 516 个基因表达发生改变。

许多研究也运用 mRNA 转录组学对缺硒性损伤分析，为探讨硒缺乏症机理提供依据。Qazi 等^[162]对小鼠衰老卵巢转录组学研究发现，饲喂缺硒和中高硒水平日粮之间相比，卵巢中有 168 个基因表达存在差异，差异基因主要富集在 PI3K-Akt 信号途径、类固醇激素生物合成，信号通路调节干细胞的多能性，河马信号通路、卵巢类固醇生成和 Wnt 信号通路等途径。Feng 等^[163]对大鼠心脏的转录组研究发现，缺硒可导致心脏 4931 个 mRNA 差异表达，其中 2514 个表达上调，2417 个表达下调，涉及脂质代谢过程、心脏发育细胞粘附、血管发育、细胞分化和信号转导等。缺硒可导致鸡肌肉组织 687 个 mRNA 表达差异，其中 285 上调，402 下调，富集分析显示差异 mRNA 主要集中在吞噬体、心肌收缩、PPAR 信号传导途径、细胞粘附分子、局灶粘附、谷胱甘肽代谢、细胞色素 P450 异源生物的代谢等途径^[164]。本研究发现缺硒可导致鸡小脑 mRNA 转录组中 421 个 mRNA 差异表达，其中有 171 个基因表达上调，250 个基因表达下调，对这些差异表达基因进行 GO 富集分析发现，差异表达 mRNA 的功能与金属离子结合（金属离子结合、钙离子结合、金属内肽酶活性、铁离子结合、钙通道复合体）、抗氧化（过氧化氢分解代谢过程、NAD(P)⁺核苷酶活性、氧化还原酶活性）及细胞凋亡（Toll 样受体信号通路、凋亡 DNA 断裂）等相关，同时 KEGG 通路富集分析发现，富集的信号通路与以下几方面密切相关，如神经功能（神经活性配体受体相互作用、细胞因子-细胞因子受体相互作用、细胞粘附分子）、细胞凋亡（MAPK 信号通路、Toll 样受体信号通路、钙信号通路）、溶酶体及其功能（代谢途径、内吞作用、组氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸

代谢、溶酶体、甘油磷脂代谢)等。本研究结果表明,缺硒可导致鸡小脑神经功能受损,而抗氧化、金属离子结合、溶酶体及凋亡可能在缺硒性小脑损伤中发挥重要作用,这也是本研究关注的重点。

4.4 SELS 对脑神经元内质网应激的影响

研究发现,硒可以通过抑制内质网应激信号通路对玉米赤霉烯酮诱导的小鼠肾脏损伤起到保护作用^[165]。纳米硒(Nano-Se)可减少氧化损伤和抑制内质网应激以拮抗硫酸镍所致的大鼠睾丸损伤^[166]。硒能够缓解铅中毒诱导的鸡睾丸内质网应激^[167]。缺硒可导致多组织内质网应激发生。陈向阳等^[168]研究发现低硒可以诱导大鼠心肌组织中内质网应激反应,并参与心肌细胞的凋亡。潘升驰^[169]研究表明低硒状态会加剧 T-2 毒素引起的鼠心肌细胞损伤,导致心肌细胞发生更加严重的氧化应激和内质网应激。此外,氧化-内质网应激信号通路参与了缺硒引起的鸡肝脏凋亡^[170]。赵金欣^[133]研究发现缺硒可导致鸡脑组织发生内质网应激。这些研究都表明,硒在调节内质网应激方面发挥中重要作用。与赵金欣结果一致,本研究发现缺硒可导致鸡小脑及鸡胚神经元内质网应激相关基因(GRP78、IRE-1、XBP1、PERK、ATF4 及 ATF6)蛋白表达水平显著升高,表明缺硒可引起神经元内质网应激。

目前已知的硒蛋白中,有 7 种硒蛋白确定定位于内质网,分别为 SEP15、DIO2、SELK、SELT、SELM、SELN 和 SELS,这些硒蛋白在内质网蛋白质折叠的质量控制,错误折叠的蛋白质从内质网到细胞质的逆转易位及内质网钙稳态的调节方面发挥着重要作用^[171]。SELS 和 SELK 是内质网相关蛋白降解(ER-associated protein degradation, ERAD)途径重要组成部分,二者均可与细胞质含缬氨酸蛋白(p97 (VCP))相结合参与内质网中未折叠蛋白的降解,维持内质网稳态,减轻内质网应激,且研究证实 SELK 与 p97 (VCP)的结合具有 SELS 依赖性^[172]。然而对于 SELS 敲低是否会引起内质网应激方面存在争议。Speckmann 等^[173]抑制 LS174T、HT29 和 Caco-2 结肠癌细胞系中 SELS 表达,发现不会引起或调节内质网应激。Li^[174]研究发现 SELS 敲低也不会引起 Hepa1-6 细胞内质网应激。而研究发现 SELS 表达降低,可导致细胞对内质网应激诱导剂的敏感性,导致细胞内质网应激加重^[68, 72],如 Du 等^[175]发现 SELS 敲低可导致 HepG2 细胞内质网应激标志物 GRP78 蛋白表达升高,并加重 β -mercaptoethanol (β -ME)引起的内质网应激。本研究发现鸡胚脑神经元细胞 SELS 敲低可引起内质网应激相关指标 GRP78、IRE-1、XBP1、PERK、ATF4 及 ATF6 蛋白表达升高,表明 SELS 敲低可导致脑神经元细胞发生内质网应激。这两种结果的出现可能是因为细胞种类差异引起的。神经元新陈代谢旺盛,易产生错误折叠蛋白,而导致内质网应激的发生^[176],SELS 作为 ERAD 重要组成在维持神经元内质网稳态尤为重要,其表达降低导致鸡胚脑神经元发生内质网应激。

4.5 SELS 对脑神经元抗氧化能力的影响

脑耗氧量高,脂质含量高,抗氧化能力弱,因此极易受到氧化应激的影响^[177]。在正常情况下,有氧代谢过程中产生 ROS 的有害影响可被细胞内抗氧化剂中和,这种方式可以使脑有效地调节其耗氧量和氧化还原生成能力。当 ROS 的产生量超过抗氧化反应系统的清除能力时,就会发生广泛的蛋白质氧化和脂质过氧化,导致脑的生化完整性受到损伤,影响中枢神

经系统的正常功能^[178]。据报道, ROS 会引发多种分子级联反应, 增加血脑屏障通透性和改变脑形态, 从而导致神经炎症和神经元死亡^[179]。目前已证实氧化应激与阿尔茨海默病、亨廷顿病和帕金森病等神经退行性疾病有关^[180]。

硒主要通过形成硒蛋白而发挥生物学作用。目前, 功能已知的硒蛋白中大部分都是氧化还原酶, 具有抗氧化功能, 如谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px、硫氧还蛋白还原酶及 SELW 等, 可清除机体内的自由基, 如 ROS, 使其还原成无毒的水或醇。GSH-Px 是最早已知的具有抗氧化功能的硒蛋白, GSH-Px 和 SOD、CAT 以及过氧化物酶都参与组织和细胞内 ROS 的分解。硒可以减轻砷引起的 GSH 水平和 SOD、CAT、GST、GSH-Px 活性的降低以及 LPO、NO、MPO 增加, 减轻氧化应激, 缓解砷诱导的大鼠行为异常^[181]。日粮中添加硒可显著降低鸡大脑和小脑镉的积累, 减轻镉暴露引起 NO、iNOS 及 MDA 的升高, 及 SOD 和 GSH-Px 酶活性抑制, 缓解氧化应激和组织病理学损伤^[10]。缺硒可抑制动物脑中抗氧化酶活性, 导致氧化应激的发生而引起脑损伤。缺硒可导致小鼠大脑皮层、海马和小脑的 GSH-Px 活性下降^[37]。硒缺乏导致鸡大脑组织硒含量、GSH-Px 和 CAT 活性降低, 丙二醛 (MDA) 含量升高, 引发氧化损伤^[182, 183]。本研究发现硒缺乏可导致鸡小脑抗氧化酶 CAT、SOD、GSH-Px 活性及 T-AOC 降低, iNOS 及 NO、H₂O₂、LPO 及 MDA 升高, 缺硒也可导致鸡胚胎脑神经元 SOD 升高, CAT、GSH-Px 活性及 T-AOC 降低, iNOS 及 NO、H₂O₂、LPO 及 MDA 升高和 ROS 蓄积, 结果表明缺硒可导致小脑和鸡胚神经元发生氧化应激, 引起氧化损伤。

研究表明, SELS 也具有抗氧化作用, 其表达升高可降低细胞内 ROS 水平减轻氧化应激所带来的细胞损伤, 而 SELS 表达降低可导致细胞对氧化应激诱导剂的敏感性增加^[74, 184]。敲低 SELS 加剧血管平滑肌细胞对 H₂O₂ 的敏感, 导致 ROS 和 MDA 水平进一步升高, GSH-Px 活性进一步降低^[72]。Gao 等^[75]研究发现 SELS 过表达可增强 Min6 胰岛 β 细胞对 H₂O₂ 诱导的氧化应激的抵抗力, 减轻 H₂O₂ 诱导的细胞毒性, 增强细胞活力, 减少细胞凋亡。这些研究充分表明, SELS 具有保护细胞免受氧化应激诱导损伤的作用。大量证据表明, 内质网应激可导致 ROS 的生成增加, 引起氧化应激的发生, 同样 ROS 的增加也会加剧内质网应激^[185-188]。缓解内质网应激可有效减少 ROS 生成, 如内质网应激抑制剂 4-苯基丁酸 (4-PBA) 可缓解高草酸尿引起的内质网应激并减轻 ROS 升高, 缓解氧化应激^[189]。本研究发现 SELS 敲低可导致鸡胚胎脑神经元 ROS、MDA 及 H₂O₂ 含量升高, CAT、SOD 及 T-AOC 降低, 表明 SELS 敲低可引起脑神经元发生氧化应激, 揭示 SELS 在抗氧化方面发挥重要作用, 而 SELS 的这种抗氧化作用与其维持内质网稳态方面密切相关, SELS 表达降低通过引起脑神经元内质网应激促进 ROS 生成, 并导致氧化应激的发生。

4.6 SELS 对脑神经元溶酶体稳态的影响

大量研究发现, 氧化应激是引起溶酶体功能障碍及稳定性降低的主要原因之一^[190, 191]。氧化应激可通过增加受损大分子或细胞器的产生, 引起直接的溶酶体内损伤或继发性溶酶体损伤^[115]。溶酶体作为真核细胞的分解代谢中心, 可降解通过内吞作用内化的细胞外物质和通过自噬隔离的细胞内成分, 降解细胞代谢产物, 在维持和控制细胞内环境稳定中起到中心作用。溶酶体内酸性环境是维持腔内酶活性并促进其催化功能发挥的关键。V-ATPase 是一种保

守的质子泵,在维持溶酶体 pH 方面发挥中重要作用,可通过水解 ATP 而将氢离子泵入溶酶体腔内以维持酸性环境^[192]。溶酶体碱化会导致溶酶体内酶活性减弱,从而影响溶酶体降解功能。组织蛋白酶在溶酶体中含量较丰富,组织蛋白酶通过降解囊泡内容物直接参与溶酶体中底物清除^[193],而其活化需要酸性环境,pH 升高会显著降低其活性^[194]。溶酶体 pH 值升高可诱导 TRPML1 编码的溶酶体钙离子释放通道 MCOLN1 介导的溶酶体 Ca 离子异常外流,导致胞浆 Ca 离子升高^[195]。MCOLN1 可调节溶酶体中的膜运输过程(分裂和融合)、信号转导和离子稳态等^[196]。TRPML1 的突变可导致细胞内溶酶体膜运输紊乱,引起溶酶体贮积病^[197]。同时,MCOLN 也是溶酶体上 ROS 感应器,外源性氧化剂或线粒体 ROS 水平增加直接特异性激活溶酶体 MCOLN1 通道,诱导溶酶体钙释放,触发钙调神经磷酸酶依赖的转录因子 EB (TFEB)核易位、自噬诱导和溶酶体生物发生,增强自噬以促进受损物质和过量 ROS 的清除^[198, 199]。溶酶体膜稳定性降低可导致溶酶体膜通透化,引起溶酶体内组分泄露至胞浆中^[200]。

研究发现硒在维持溶酶体稳态方面发挥重要作用。硒可能通过提高缺血心肌 GSH-Px 活性,阻止自由基介导的脂质过氧化,增加溶酶体膜的稳定性,降低游离酶活性及游离酶活性/总酶活性比值,从而减轻大鼠心肌缺血性损伤^[201]。硒能稳定溶酶体膜,减轻氟引起 Wistar 大鼠肾近曲小管溶酶体的破坏,从而拮抗氟对肾脏的损害作用^[202]。硒可缓解黄绿青霉素致 ICR 小鼠心肌溶酶体膜稳定性下降和通透性增加^[203]。研究证实,硒缺乏可导致溶酶体稳定性降低。缺硒可导致大鼠心、肝的 GSH-Px 活性减低,脂质过氧化增强,组织溶酶体游离酶/总酶比值升高,溶酶体膜受损,这表明缺硒可导致抗氧化能力降低,引起脂质过氧化进而导致溶酶体膜稳定性变差^[120, 121]。这些研究表明,溶酶体稳态失衡在缺硒性损伤的过程中具有一定的作用。脑是新陈代谢旺盛的器官,溶酶体在维持脑正常功能发挥不可替代的作用,可通过自噬溶酶体途径保护神经元免受有害细胞废物积累的影响。溶酶体功能及稳态破坏可导致脑损伤,研究表明,自噬溶酶体系统功能失调是常见和罕见的神经退行性疾病的共同点^[123]。神经元对溶酶体功能异常敏感,氧化应激和自由基损伤对溶酶体功能异常的影响可能是神经退行性疾病的病因之一^[115]。本研究发现缺硒可引起鸡小脑及鸡胚神经元氧化应激的同时可导致溶酶体 V-ATPase 活性减弱,溶酶体组织蛋白酶 CTSB 和 CTSD 活性减弱、MCOLN1 激活、同时溶酶体膜通透性增强引起溶酶体酶 CTSB 和 CTSD 外泄,表明缺硒引起溶酶体酸化受阻、酶活性减弱、钙泄露及膜通透化而破坏神经元溶酶体稳态。通过溶酶体特异性探针 Lyso-Tracker-Red 检测溶酶体 pH 变化发现,SELS 敲低导致其荧光强度减弱,表明溶酶体 pH 升高,此外 V-ATPase mRNA 及蛋白表达降低,亦证实溶酶体酸化受阻。同时,SELS 敲低降低了溶酶体 CTSB 和 CTSD 蛋白水平,而溶酶体钙离子释放通道 MCOLN1、胞浆中 CTSB 和 CTSD 蛋白表达显著升高,表明 SELS 敲低导致溶酶体稳态失衡。

NAC 是一种不需要主动转运的膜通透性的半胱氨酸前体,以独特的方式将半胱氨酸传递到细胞中,游离 NAC 进入细胞后,会迅速水解释放半胱氨酸,半胱氨酸是 GSH 的限制性前体。GSH 是细胞内的抗氧化物质,以非酶和酶的方式参与对 ROS 引起的氧化损伤的保护,可催化 H₂O₂ 及过氧化物的分解^[204]。因此,NAC 是一种有效的抗氧化剂和自由基清除剂,通过增加细胞内 GSH 保护细胞免受氧化应激^[205]。因此,本研究通过添加 NAC 来清除 SELS 敲低产生的 ROS 增多,观察添加 NAC 后是否可以缓解 SELS 敲低引起的溶酶体稳态失衡。研究发现 NAC 的加入,有效降低因 SELS 敲低而引起的 ROS 升高,缓解 SELS 敲低对 V-ATPase

的抑制,提高 V-ATPase 的蛋白表达,恢复其活性,同时 NAC 可有效缓解 SELS 敲低引起的 CTSB 和 CTSD 蛋白表达降低和 MCOLN1 激活,缓解 SELS 敲低引起的胞浆中 CTSB 和 CTSD 蛋白表达升高,表明 NAC 可以缓解 SELS 敲低引起的溶酶体酸化受阻、酶活性降低、Ca 离子泄露及溶酶体膜通透化,恢复溶酶体稳态。本研究的结果表明 SELS 敲低通过氧化应激引起溶酶体稳态失衡,缓解氧化应激可有效缓解 SELS 敲低引起的溶酶体稳态失衡。

4.7 SELS 对脑神经元自噬流的影响

自噬是真核生物中由溶酶体介导的生物学过程,在多重压力下维持细胞存活,恢复细胞内稳态方面起着至关重要的作用。自噬可清除细胞受损或老化的长寿命蛋白质和细胞器(如内质网、线粒体或核糖体),溶酶体降解这些物质后可以回收利用用于制造新的蛋白质和细胞器^[206, 207]。LC3 是监测自噬激活最常用的标记物,可与自噬体外膜紧密结合^[208],LC3-2 可以与自噬体内膜结合,被到传递溶酶体中被降解,因此,LC3-2 成为衡量自噬体的标志物^[209]。此外泛素化结合蛋白 P62 常被用于自噬流的检测,P62 可以绑定 LC3,并和包裹的“货物”一起被降解^[210]。因此,P62 水平降低代表自噬流增强,P62 水平升高代表自噬流抑制^[211]。自噬参与细胞的生长、存活、发育和死亡,许多神经系统疾病都伴有自噬功能障碍^[212]。自噬溶酶体途径在保护神经元免受有害细胞废物积累方面发挥重要作用,溶酶体功能及稳态破坏可导致脑损伤^[123]。在对 AD 或 PD 的研究中发现,自噬体成熟延迟、自噬囊泡结构受损、溶酶体水解受损或自噬体转运受损等^[213, 214]。研究发现溶酶体受损可引起自噬异常,这也被认为是引起细胞损伤的主要原因之一^[215]。破坏溶酶体酸化,会引起溶酶体 Ca 稳态异常,损害自噬底物的溶酶体降解,导致自噬缺陷,同时自噬溶酶体融合障碍也会导致自噬小体蓄积而无法降解^[101-103]。Wang 等^[105]研究发现溶酶体功能障碍导致的自噬流抑制与镉诱导的 rPT 细胞毒性有关。Gu 等^[104]发现铅通过抑制神经细胞溶酶体的形成和活性而破坏自噬流。以往的研究也证实,恢复溶酶体功能有助于自噬失调的恢复。如槲皮素可缓解镉诱导的溶酶体碱化及溶酶体降解能力下降,恢复自噬流,缓解镉的细胞毒性^[216]。海藻糖可显著恢复镉诱导的溶酶体碱化和溶酶体降解能力的损伤,恢复溶酶体功能,恢复镉暴露导致的自噬流抑制,减少自噬体积累^[105]。

研究发现硒可促进巨噬细胞的自噬,减轻金黄色葡萄球菌感染引起的自噬流抑制,抑制巨噬细胞中金黄色葡萄球菌的增殖,从而减轻炎症反应^[217]。本研究发现缺硒可导致鸡小脑及鸡胚脑神经元 LC3-2 及 P62 蛋白表达升高,表明缺硒可引起自噬小体蓄积及自噬流抑制,这可能与溶酶体稳态失衡有关。目前尚未有研究表明 SELS 在调控自噬方面发挥作用,本研究发现 SELS 敲低可引起鸡胚脑神经元自噬流抑制,提示 SELS 敲低在缺硒引起的自噬流抑制中发挥重要作用。本研究发现随着 NAC 的加入,SELS 敲低引起溶酶体稳态失衡得到缓解,同时 LC3-2 及 P62 水平升高得到缓解,表明自噬流恢复,这可能与溶酶体酶活性恢复有关。这一结果表明,SELS 敲低可通过氧化应激引起溶酶体稳态失衡而导致自噬流抑制。具体机制需进一步研究。

4.8 SELS 对脑神经元细胞凋亡的影响

研究指出硒可以有效缓解有毒物质引起的细胞凋亡,如镉^[35]、铅^[167]、丙烯醛^[218]、氟化物^[219]等。大量的研究证实,硒缺乏可导致机体细胞凋亡的发生。硒缺乏可通过线粒体介导的途径诱导 Wistar 大鼠心肌细胞凋亡^[220]。缺硒可通过氧化应激诱导的线粒体凋亡途径和炎症信号诱导的死亡受体途径引起十二指肠绒毛细胞凋亡^[221]。本课题组前期研究发现,缺硒可导致鸡心脏^[222]、肝脏^[170]、肌肉^[223]、胰腺^[224]、免疫器官(脾脏、法氏囊、胸腺)^[225]、肾脏^[226]及静脉^[227]等组织凋亡的发生。在本研究中,Tunel 染色结果和流式细胞术结果表明缺硒可引起鸡小脑及鸡胚脑神经元凋亡的发生,凋亡相关基因 BCL2、BAX、CAS9 及 CAS3 的 mRNA 及蛋白水平的变化亦证实了凋亡的发生。研究发现,SELS 与细胞凋亡密切相关。Yu 等^[228]发现过表达 SELS 可减轻高糖(HG)诱导血管内皮细胞的细胞凋亡,而 SELS 敲低则加重 HG 诱导血管内皮细胞的细胞凋亡。Li^[174]发现 Hepa1-6 细胞 SELS 敲低可导致其发生细胞凋亡。SELS 敲低可引起 HepG2 细胞发生凋亡,同时加剧 β -ME 引起的细胞凋亡^[175]。SELS 过表达和敲低可通过调节氧化应激和 p38 磷酸化影响赭曲霉毒素 A (OTA)对猪 PK15 细胞的细胞毒性和凋亡^[229]。这些研究表明 SELS 在抗凋亡方面发挥重要作用。本研究发现鸡胚脑神经元 SELS 敲低会导致抗凋亡基因 BCL2 减低,促凋亡基因 BAX、CAS9、CAS3 表达升高,表明 SELS 敲低引起线粒体途径凋亡。

研究表明自噬流抑制可促进细胞凋亡。黄曲霉毒素 B1 (AFB1)引起 HepG2 细胞溶酶体 pH 升高,溶酶体膜通透化,组织蛋白酶泄露,同时 LC3-2 和 P62 蛋白表达升高,表明 AFB1 可通过溶酶体稳态失衡而导致自噬流抑制,并引起 BAX/BCL2、CAS9 和 CAS3 升高,导致线粒体途径凋亡^[230]。镉可通过抑制自噬流引起 PC12 细胞和小鼠原代神经元发生线粒体途径细胞凋亡^[231]。氧化石墨稀(GO)干扰溶酶体酸性 pH 值和膜通透性,导致溶酶体降解功能下降,引起自噬流抑制,P62 蛋白异常积累而引起细胞凋亡^[232]。由于溶酶体酸化受阻和溶酶体组织蛋白酶活性降低所致的溶酶体稳态失衡破坏自噬-溶酶体的融合,引起自噬流抑制,诱导细胞凋亡^[233]。其他研究也证实,自噬流抑制可促进外来刺激诱导的细胞凋亡^[234, 235]。本研究发现,SELS 敲低可导致自噬流抑制和细胞凋亡,而 NAC 有效缓解自噬流抑制并减轻细胞凋亡,表明 SELS 敲低通过抑制自噬流促进细胞凋亡,但具体机制仍需进一步研究。

有研究表明,溶酶体通透化可引发线粒体途径凋亡。宋祥彬^[236]发现镉暴露可引起溶酶体通透化而致 CTSB 和 CTSD 释放到胞浆中,引发细胞凋亡。金纳米棒(GNRs)可特异性在溶酶体内累积导致溶酶体通透性升高,释放 CTSD 并引起线粒体膜电位降低,促进癌细胞凋亡^[111]。而溶酶体通透化是否参与 SELS 敲低引起的细胞凋亡尚不清楚。CTSB 和 CTSD 是几乎所有细胞都含有的组织蛋白酶,正常情况下,它们高度集中于溶酶体中,然而一些生理刺激或病理性功能障碍会导致溶酶体通透化而导致 CTSB 和 CTSD 逸出至胞浆中^[237, 238]。而进入胞浆中的 CTSB 和 CTSD 可诱发细胞凋亡通路的一系列反应,包括 Bid 剪切,凋亡酶的激活以及后续的线粒体凋亡^[110, 200, 239]。本研究发现,缺硒引起鸡小脑及鸡胚脑神经元线粒体途径凋亡,这可能与溶酶体通透化引起组织蛋白酶外泄有关。为进一步探讨溶酶体通透化释放到胞浆的 CTSB 和 CTSD 是否参与 SELS 敲低引起的细胞凋亡。本研究分别使用 CTSB 抑制剂 E-64 和 CTSD 抑制剂 Pepstatin A 抑制胞浆中 CTSB 和 CTSD 水平,发现随着抑制剂的加入,

胞浆中 CTSB 和 CTSD 显著降低,同时,缓解 SELS 敲低引起的 cle-CAS3 升高,部分缓解细胞凋亡,表明 CTSB 和 CTSD 参与 SELS 敲低引起的细胞凋亡。这些结果表明 SELS 敲低引起溶酶体膜通透化,导致 CTSB 和 CTSD 逸出到胞浆中,从而促进细胞凋亡。

总而言之,本研究揭示 SELS 在维持和保护神经元正常功能方面发挥重要作用,其表达水平降低可引起神经元发生内质网应激,并促进 ROS 的生成,引发氧化应激;氧化应激可引起溶酶体酸化受阻、酶活性降低、钙泄露、膜通透性增加而导致溶酶体稳态失衡,导致神经元自噬流抑制,并最终引起细胞凋亡(如图 4-1)。本研究揭示 SELS 在缺硒性小脑损伤中的重要作用,丰富了 SELS 的生物学作用,同时为后续研究指明方向。

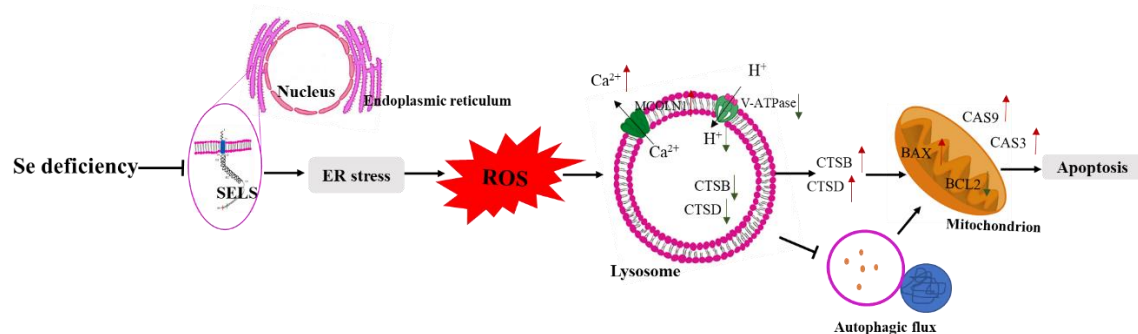


图 4-1 缺硒通过影响 SELS 表达调控溶酶体稳态诱导鸡脑神经元凋亡的分子机制

Figure 4-1 Molecular mechanism of selenium deficiency regulating lysosomal homeostasis and inducing apoptosis of chicken neurons by affecting SELS expression

5 结论

(1) 缺硒引起鸡小脑组织中金属离子稳态失衡，影响小脑的正常功能。

(2) 缺硒导致鸡小脑中 171 个 mRNA 表达上调，250 个 mRNA 表达下调，富集分析表明神经功能、抗氧化、金属离子、溶酶体及凋亡等受到影响。

(3) SELS 敲低通过内质网应激引起 ROS 蓄积，导致溶酶体稳态失衡，进而抑制自噬流诱导神经元细胞凋亡。

致 谢

感谢国家自然科学基金面上项目（31772814）对本研究的资助。

从 2015 到 2021，六年的时间，这是一段漫长而难忘的岁月。在这六年里，我顺利成为徐世文教授的博士研究生，嫁人生女成为一位妻子一位母亲，并在离开 20 个月后重返实验室继续进行课题研究，今天站在这里进行博士毕业答辩。这段时光既快乐又苦涩，既煎熬又美好，我谨向我的导师徐世文教授致以崇高的敬意和由衷的感谢！感谢导师在学习、生活、为人等方面给予的指引和帮助，感谢导师在我做出人生选择时给予的理解和支持，感谢导师在我重返实验室时给予的鼓励，感谢导师在我自我认可崩塌时开导我，引领我前进，学生铭记于心终身难忘。

感谢李术老师、林洪金老师、李金龙老师、张子威老师、郭梦尧老师、高学娇老师对我的指导和帮助，老师们严谨的治学态度和一丝不苟的敬业精神是我永远学习的榜样。感谢我的师兄姚海东和樊瑞锋对我学习和生活上的帮助，感谢我所有的师弟师妹们，因为有了可爱的你们，我的博士生活多姿多彩充满活力。特别感谢李晓晶、杨杰、蔡敬增、王巍、苗芷若、汪圣晨、柳清清、石续等对我的帮助！

借此机会，向我的父母、公婆表示最深情的敬意！你们的无私支持与鼓励是我走到现在并继续努力向前的最大动力；感谢我的爱人赵志超对我重返实验室继续攻读博士学位的理解和支持；感谢我的女儿赵姝颖，你的乖巧可爱懂事，让我在最后的博士生涯里斗志满满；最后感谢不坚强的、爱哭的自己坚持了下来。

真心感谢所有曾经帮助、关心支持过我的老师和同学，你们的无私付出是我的巨大人生财富！

参考文献

- [1] WU Q, RAYMAN M P, LV H, et al. Low Population Selenium Status Is Associated With Increased Prevalence of Thyroid Disease[J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2015, 100(11): 4037-4047.
- [2] KONG F J, MA L L, CHEN S P, et al. Serum selenium level and gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis[J]. *Nutrition journal*, 2016, 15.
- [3] BENSTOEM C, GOETZENICH A, KRAEMER S, et al. Selenium and Its Supplementation in Cardiovascular Disease-What do We Know?[J]. *Nutrients*, 2015, 7(5): 3094-3118.
- [4] CARDOSO B R, ROBERTS B R, BUSH A I, et al. Selenium, selenoproteins and neurodegenerative diseases[J]. *Metallomics*, 2015, 7(8): 1213-1228.
- [5] DU X, WANG C, LIU Q. Potential Roles of Selenium and Selenoproteins in the Prevention of Alzheimer's Disease[J]. *Current topics in medicinal chemistry*, 2016, 16(8): 835-848.
- [6] ELLWANGER J H, FRANKE S I R, BORDIN D L, et al. Biological functions of selenium and its potential influence on Parkinson's disease[J]. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 2016, 88(3): 1655-1674.
- [7] YING H, ZHANG Y. Systems Biology of Selenium and Complex Disease[J]. *Biological trace element research*, 2019, 192(1): 38-50.
- [8] SOLOVYEV N D. Importance of selenium and selenoprotein for brain function: From antioxidant protection to neuronal signalling[J]. *Journal of inorganic biochemistry*, 2015, 153: 1-12.
- [9] PILLAI R, UYEHARA-LOCK J H, BELLINGER F P. Selenium and Selenoprotein Function in Brain Disorders[J]. *IUBMB life*, 2014, 66(4): 229-239.
- [10] LIU L L, LI C M, ZHANG Z W, et al. Protective Effects of Selenium on Cadmium-Induced Brain Damage in Chickens[J]. *Biological trace element research*, 2014, 158(2): 176-185.
- [11] WHANGER P D. Selenium and the brain: a review[J]. *Nutritional neuroscience*, 2001, 4(2): 81-97.
- [12] HOCK A, DEMMEL U, SCHICHA H, et al. Trace element concentration in human brain. Activation analysis of cobalt, iron, rubidium, selenium, zinc, chromium, silver, cesium, antimony and scandium[J]. *Brain*, 1975, 98(1): 49-64.
- [13] DRASCH G, MAIL DER S, SCHLOSSER C, et al. Content of non-mercury-associated selenium in human tissues[J]. *Biological trace element research*, 2000, 77(3): 219-230.
- [14] PROHASKA J R, GANTHER H E. Selenium and glutathione peroxidase in developing rat brain[J]. *Journal of neurochemistry*, 1976, 27(6): 1379-1387.
- [15] TRAPP G A, MILLAM J. The distribution of ⁷⁵Se in brains of selenium-deficient rats[J]. *Journal of neurochemistry*, 1975, 24(3): 593-595.
- [16] MCFARLAND L Z, WINGET C M, WILSON W O, et al. Role of selenium in neural

- physiology of avian species. 1. The distribution of selenium in tissues of chickens, turkeys and coturnix[J]. Poultry science, 1970, 49(1): 216-221.
- [17] VAHTER M, LUTZ E, LIND B, et al. Concentrations of copper, zinc and selenium in brain and kidney of second trimester fetuses and infants[J]. Journal of trace elements in medicine and biology, 1997, 11(4): 215-222.
- [18] VARIKASUVU S R, PRASAD S V, KOTHAPALLI J, et al. Brain Selenium in Alzheimer's Disease (BRAIN SEAD Study): a Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Biological trace element research, 2019, 189(2): 361-369.
- [19] REEVES M A, HOFFMANN P R. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009, 66(15): 2457-2478.
- [20] CHEN X D, ZHAO Z P, ZHOU J C, et al. Evolution, regulation, and function of porcine selenogenome[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2018, 127: 116-123.
- [21] MARIOTTI M, RIDGE P G, ZHANG Y, et al. Composition and Evolution of the Vertebrate and Mammalian Selenoproteomes[J]. PloS one, 2012, 7(3).
- [22] KRYUKOV G V, CASTELLANO S, NOVOSELOV S V, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes[J]. Science, 2003, 300(5624): 1439-1443.
- [23] 姚海东. 硒蛋白 W 在鸡缺硒性骨骼肌损伤中作用机理研究[D]. 东北农业大学, 2016.
- [24] 盛鹏飞. 硒蛋白 W 与低硒致鸡脑损伤的相关性研究[D]. 东北农业大学, 2014.
- [25] GLADYSHEV V N, ARNER E S, BERRY M J, et al. Selenoprotein Gene Nomenclature[J]. The Journal of biological chemistry, 2016, 291(46): 24036-24040.
- [26] BURK R F, HILL K E. Selenoprotein P-Expression, functions, and roles in mammals[J]. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2009, 1790(11): 1441-1447.
- [27] SASUCLARK A R, KHADKA V S, PITTS M W. Cell-Type Specific Analysis of Selenium-Related Genes in Brain[J]. Antioxidants, 2019, 8(5).
- [28] RAMAN A V, PITTS M W, SEYEDALI A, et al. Selenoprotein W expression and regulation in mouse brain and neurons[J]. Brain and behavior, 2013, 3(5): 562-574.
- [29] SUN Y, BUTLER J A, WHANGER P D. Glutathione peroxidase activity and selenoprotein W levels in different brain regions of selenium-depleted rats(1)[J]. The Journal of nutritional biochemistry, 2001, 12(2): 88-94.
- [30] JI D, WU X, LI D, et al. Protective effects of chondroitin sulphate nano-selenium on a mouse model of Alzheimer's disease[J]. International journal of biological macromolecules, 2020, 154: 233-245.
- [31] OZBAL S, ERBIL G, KOCDOR H, et al. The effects of selenium against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Neuroscience letters, 2008, 438(3): 265-269.
- [32] KARAVELIOGLU E, BOYACI M G, SIMSEK N, et al. Selenium protects cerebral cells by cisplatin induced neurotoxicity[J]. Acta Cirurgica Brasileira, 2015, 30(6): 394-400.
- [33] 朱轶豪. 硒对铅引起鸡神经毒性的缓解作用[D]. 东北农业大学, 2017.
- [34] 郝盼. 硒对六价铬引起鸡脑氧化应激损伤的影响研究[D]. 山东农业大学, 2017.

- [35] 任妍. 硒对镉诱导神经元损伤的干预作用及机制研究[D]. 大连理工大学, 2020.
- [36] FRADEJAS N, DEL CARMEN SERRANO-PEREZ M, TRANQUE P, et al. Selenoprotein S Expression in Reactive Astrocytes Following Brain Injury[J]. *Glia*, 2011, 59(6): 959-972.
- [37] SHARMA S K, BANSAL M P, SANDHIR R. Altered dietary selenium influences brain iron content and behavioural outcomes[J]. *Behavioural brain research*, 2019, 372.
- [38] 耿义群. 低硒对发育期大鼠脑中 CREB 及核基质蛋白影响的研究[D]. 汕头大学, 2004.
- [39] HILL K E, ZHOU J D, MCMAHAN W J, et al. Neurological dysfunction occurs in mice with targeted deletion of the selenoprotein P gene[J]. *Journal of Nutrition*, 2004, 134(1): 157-161.
- [40] PETERS M M, HILL K E, BURK R F, et al. Altered hippocampus synaptic function in selenoprotein P deficient mice[J]. *Molecular neurodegeneration*, 2006, 1.
- [41] WALDER K, KANTHAM L, MCMILLAN J S, et al. Tanis: a link between type 2 diabetes and inflammation?[J]. *Diabetes*, 2002, 51(6): 1859-1866.
- [42] KRYUKOV G V, CASTELLANO S, NOVOSELOV S V, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes[J]. *Science*, 2003, 300(5624): 1439-1443.
- [43] 刘红梅, 金剑波, 周军, 等. 硒蛋白 S 的结构、功能及与疾病的关系[J]. *化学进展*, 2018, 30(10): 1487-1495.
- [44] 许敬洋. 日粮硒缺乏对肉鸡硒蛋白基因及胰岛素信号相关基因表达的影响[D]. 四川农业大学, 2016.
- [45] CHU J H, YAN Y X, GAO P C, et al. Response of selenoproteins gene expression profile to mercuric chloride exposure in chicken kidney[J]. *Research in veterinary science*, 2020, 133: 4-11.
- [46] YAO H, ZHAO W, ZHAO X, et al. Selenium Deficiency Mainly Influences the Gene Expressions of Antioxidative Selenoproteins in Chicken Muscles[J]. *Biological trace element research*, 2014, 161(3): 318-327.
- [47] 赵霞. 鸡缺硒性胰腺组织炎性损伤的研究[D]. 东北农业大学, 2015.
- [48] KHOSO P A, YANG Z J, LIU C P, et al. Selenium Deficiency Downregulates Selenoproteins and Suppresses Immune Function in Chicken Thymus[J]. *Biological trace element research*, 2015, 167(1): 48-55.
- [49] 于娇. 缺硒对鸡肠道免疫功能的影响[D]. 东北农业大学, 2014.
- [50] SHI X, WANG W, ZHENG S, et al. Selenomethionine relieves inflammation in the chicken trachea caused by LPS though inhibiting the NF-kappa B pathway[J]. *Biological trace element research*, 2020, 194(2): 525-535.
- [51] ZHU Y, JIAO X, AN Y, et al. Selenium against lead-induced apoptosis in chicken nervous tissues via mitochondrial pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(64): 108130-108145.
- [52] SHIBATA T, ARISAWA T, TAHARA T, et al. Selenoprotein S (SEPSI) gene-105G > A promoter polymorphism influences the susceptibility to gastric cancer in the Japanese population[J]. *Bmc Gastroenterology*, 2009, 9.

- [53] CHRISTENSEN L C, JENSEN N W, VALA A, et al. The Human Selenoprotein VCP-interacting Membrane Protein (VIMP) Is Non-globular and Harbors a Reductase Function in an Intrinsically Disordered Region[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(31): 26388-26399.
- [54] BUBENIK J L, MINIARD A C, DRISCOLL D M. Alternative Transcripts and 3' UTR Elements Govern the Incorporation of Selenocysteine into Selenoprotein S[J]. *PloS one*, 2013, 8(4).
- [55] LABUNSKYY V M, HATFIELD D L, GLADYSHEV V N. Selenoproteins: molecular pathways and physiological[J]. *Physiological reviews*, 2014, 94(3): 739-777.
- [56] ADDINSALL A B, WRIGHT C R, ANDRIKOPOULOS S, et al. Emerging roles of endoplasmic reticulum-resident selenoproteins in the regulation of cellular stress responses and the implications for metabolic disease[J]. *Biochemical Journal*, 2018, 475: 1037-1057.
- [57] GHARIPOUR M, BEHMANESH M, SALEHI M, et al. Association of Selenoprotein S Expression and its Variants with Metabolic Syndrome in Subjects with Cardiovascular Disease[J]. *Archives of medical research*, 2020, 51(6): 535-541.
- [58] RUELI R H L H, TORRES D J, DEWING A S T, et al. Selenoprotein S Reduces Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Phosphorylation of Tau: Potential Role in Selenate Mitigation of Tau Pathology[J]. *Journal of Alzheimers Disease*, 2017, 55(2): 749-762.
- [59] SUTHERLAND A, KIM D-H, RELTON C, et al. Polymorphisms in the selenoprotein S and 15-kDa selenoprotein genes are associated with altered susceptibility to colorectal cancer[J]. *Genes and Nutrition*, 2010, 5(3): 215-223.
- [60] 孙晶,王巍,田野,等. 内质网应激相关活性氧及其机制[J]. *中国医药导报*, 2018, 15(16): 42-44+54.
- [61] SHCHEDRINA V A, ZHANG Y, LABUNSKYY V M, et al. Structure-function relations, physiological roles, and evolution of mammalian ER-resident selenoproteins[J]. *Antioxidants & redox signaling*, 2010, 12(7): 839-849.
- [62] SCHULZE A, STANDERA S, BUERGER E, et al. The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway[J]. *Journal of molecular biology*, 2005, 354(5): 1021-1027.
- [63] YE Y, SHIBATA Y, KIKKERT M, et al. Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(40): 14132-14138.
- [64] TURANOV A A, SHCHEDRINA V A, EVERLEY R A, et al. Selenoprotein S is involved in maintenance and transport of multiprotein complexes[J]. *The Biochemical journal*, 2014, 462(3): 555-565.
- [65] LEE J H, KWON J H, JEON Y H, et al. Pro178 and Pro183 of selenoprotein S are essential residues for interaction with p97(VCP) during endoplasmic reticulum-associated

- p>degradation[J]. The Journal of biological chemistry, 2014, 289(20): 13758-13768.
- [66] GAO Y, HANNAN N R F, WANYONYI S, et al. Activation of the selenoprotein SEPS 1 gene expression by pro-inflammatory cytokines in HepG2 cells[J]. Cytokine, 2006, 33(5): 246-251.
- [67] KIM K H, GAO Y, WALDER K, et al. SEPS1 protects RAW264.7 cells from pharmacological ER stress agent-induced apoptosis[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2007, 354(1): 127-132.
- [68] FRADEJAS N, PASTOR M D, MORA-LEE S, et al. SEPS1 gene is activated during astrocyte ischemia and shows prominent antiapoptotic effects[J]. Journal of molecular neuroscience, 2008, 35(3): 259-265.
- [69] DU S, LIU H, HUANG K. Influence of SelS gene silence on beta-Mercaptoethanol-mediated endoplasmic reticulum stress and cell apoptosis in HepG2 cells[J]. Biochimica et biophysica acta, 2010, 1800(5): 511-517.
- [70] QIN H S, YU P P, SUN Y, et al. Paclitaxel inhibits selenoprotein S expression and attenuates endoplasmic reticulum stress[J]. Molecular medicine reports, 2016, 13(6): 5118-5124.
- [71] SPECKMANN B, GERLOFF K, SIMMS L, et al. Selenoprotein S is a marker but not a regulator of endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells[J]. Free radical biology & medicine, 2014, 67: 265-277.
- [72] YE Y, FU F, LI X, et al. Selenoprotein S Is Highly Expressed in the Blood Vessels and Prevents Vascular Smooth Muscle Cells From Apoptosis[J]. Journal of cellular biochemistry, 2016, 117(1): 106-117.
- [73] LIU J, LI F, ROZOVSKY S. The Intrinsically Disordered Membrane Protein Selenoprotein S Is a Reductase in Vitro[J]. Biochemistry, 2013, 52(18): 3051-3061.
- [74] ZHAO Y, LI H, MEN L L, et al. Effects of selenoprotein S on oxidative injury in human endothelial cells[J]. Journal of translational medicine, 2013, 11.
- [75] GAO Y, FENG H C, WALDER K, et al. Regulation of the selenoprotein SelS by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress - SelS is a novel glucose-regulated protein[J]. FEBS letters, 2004, 563(1-3): 185-190.
- [76] ZHONG Y, YU S, YU H, et al. Selenoprotein S attenuates endothelial dysfunction in a diabetic vascular chip[J]. Experimental gerontology, 2020, 137.
- [77] KARLSSON H K R, TSUCHIDA H, LAKE S, et al. Relationship between serum amyloid A level and Tanis/SelS mRNA expression in skeletal muscle and adipose tissue from healthy and type 2 diabetic subjects[J]. Diabetes, 2004, 53(6): 1424-1428.
- [78] ZENG J, DU S, ZHOU J, et al. Role of SelS in lipopolysaccharide-induced inflammatory response in hepatoma HepG2 cells[J]. Archives of biochemistry and biophysics, 2008, 478(1): 1-6.
- [79] CUI S, MEN L, LI Y, et al. Selenoprotein S Attenuates Tumor Necrosis Factor-alpha-Induced Dysfunction in Endothelial Cells[J]. Mediators of inflammation, 2018, 2018.

- [80] GAO Y, WALDER K, SUNDERLAND T, et al. Elevation in tanis expression alters glucose metabolism and insulin sensitivity in H4IIE cells[J]. Diabetes, 2003, 52(4): 929-934.
- [81] 马帅. SelS 基因沉默对软脂酸诱导 HepG2 细胞胰岛素抵抗的作用及机制研究[D]. 华中科技大学, 2016.
- [82] WINDMILL K, TENNE-BROWN J, BAYLES R, et al. Localization and expression of selenoprotein S in the testis of Psammomys obesus[J]. Journal of molecular histology, 2007, 38(1): 97-101.
- [83] 刘丽霞. 硒蛋白 S 在缺血性脑卒中大鼠脑组织的表达[D]. 山东大学, 2012.
- [84] JIANG X Q, CAO C Y, LI Z Y, et al. Delineating hierarchy of selenotranscriptome expression and their response to selenium status in chicken central nervous system[J]. Journal of inorganic biochemistry, 2017, 169: 13-22.
- [85] CUI J, LIU H, XU S. Selenium-deficient diet induces necroptosis in the pig brain by activating TNFR1viamir-29a-3p[J]. Metallomics, 2020, 12(8): 1290-1301.
- [86] ZHANG Y, ZHOU Y, SCHWEIZER U, et al. Comparative analysis of selenocysteine machinery and selenoproteome gene expression in mouse brain identifies neurons as key functional sites of selenium in mammals[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(4): 2427-2438.
- [87] ALANNE M, KRISTIANSSON K, AURO K, et al. Variation in the selenoprotein S gene locus is associated with coronary heart disease and ischemic stroke in two independent Finnish cohorts[J]. Human genetics, 2007, 122(3-4): 355-365.
- [88] LIU L X, ZHOU X Y, LI C S, et al. Selenoprotein S expression in the rat brain following focal cerebral ischemia[J]. Neurological Sciences, 2013, 34(9): 1671-1678.
- [89] FRADEJAS N, PASTOR M D, MORA-LEE S, et al. SEPS1 gene is activated during astrocyte ischemia and shows prominent antiapoptotic effects[J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2008, 35(3): 259-265.
- [90] JANG J K, PARK K J, LEE J H, et al. Selenoprotein S is required for clearance of C99 through endoplasmic reticulum-associated degradation[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2017, 486(2): 444-450.
- [91] DE DUVE C, PRESSMAN B C, GIANETTO R, et al. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue[J]. The Biochemical journal, 1955, 60(4): 604-617.
- [92] SAFTIG P, KLUMPERMAN J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009, 10(9): 623-635.
- [93] PERERA R M, ZONCU R. The Lysosome as a Regulatory Hub[M]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2016, 32: 223-253.
- [94] LEVINE B, KROEMER G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective[J]. Cell, 2019, 176(1-2): 11-42.

- [95] BALLABIO A. The awesome lysosome[J]. EMBO molecular medicine, 2016, 8(2): 73-76.
- [96] KROEMER G, MARINO G, LEVINE B. Autophagy and the Integrated Stress Response[J]. Molecular cell, 2010, 40(2): 280-293.
- [97] SAHA S, PANIGRAHI D P, PATIL S, et al. Autophagy in health and disease: A comprehensive review[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 104: 485-495.
- [98] MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, LEVINE B. Methods in Mammalian Autophagy Research[J]. Cell, 2010, 140(3): 313-326.
- [99] LEVINE B, KROEMER G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. Cell, 2008, 132(1): 27-42.
- [100] SETTEMBRE C, FRALDI A, MEDINA D L, et al. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2013, 14(5): 283-296.
- [101] LEE J-H, MCBRAYER M K, WOLFE D M, et al. Presenilin 1 Maintains Lysosomal Ca²⁺ Homeostasis via TRPML1 by Regulating vATPase-Mediated Lysosome Acidification[J]. Cell reports, 2015, 12(9): 1430-1444.
- [102] YOSHIMORI T, YAMAMOTO A, MORIYAMA Y, et al. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells[J]. The Journal of biological chemistry, 1991, 266(26): 17707-17712.
- [103] YAMAMOTO A, TAGAWA Y, YOSHIMORI T, et al. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells[J]. Cell structure and function, 1998, 23(1): 33-42.
- [104] GU X, HAN M, DU Y, et al. Pb disrupts autophagic flux through inhibiting the formation and activity of lysosomes in neural cells[J]. Toxicology in Vitro, 2019, 55: 43-50.
- [105] WANG X Y, YANG H, WANG M G, et al. Trehalose protects against cadmium-induced cytotoxicity in primary rat proximal tubular cells via inhibiting apoptosis and restoring autophagic flux[J]. Cell death & disease, 2017, 8.
- [106] WANG M, LI J, DONG S, et al. Silica nanoparticles induce lung inflammation in mice via ROS/PARP/TRPM2 signaling-mediated lysosome impairment and autophagy dysfunction[J]. Particle and fibre toxicology, 2020, 17(1).
- [107] TURK B, TURK V. Lysosomes as "Suicide Bags" in Cell Death: Myth or Reality?[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(33): 21783-21787.
- [108] ZHAO M, ANTUNES F, EATON J W, et al. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis[J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270(18): 3778-3786.
- [109] WU H, CASTANHEIRA P, FARO C, et al. Cardosin A endocytosis mediated by integrin leads to lysosome leakage and apoptosis of epithelial cells[J]. Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 2019, 87(6): 502-511.

- [110] CHWIERALSKI C E, WELTE T, BUHLING F. Cathepsin-regulated apoptosis[J]. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 2006, 11(2): 143-149.
- [111] ZHANG F, ZHU X, GONG J, et al. Lysosome-mitochondria-mediated apoptosis specifically evoked in cancer cells induced by gold nanorods[J]. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 2016, 11(15): 1993-2006.
- [112] WANG Z, CHENG X, MENG Q, et al. Azadirachtin-induced apoptosis involves lysosomal membrane permeabilization and cathepsin L release in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells[J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2015, 64: 126-135.
- [113] SOUSA M J, AZEVEDO F, PEDRAS A, et al. Vacuole-mitochondrial cross-talk during apoptosis in yeast: a model for understanding lysosome-mitochondria-mediated apoptosis in mammals[J]. *Biochemical Society transactions*, 2011, 39: 1533-1537.
- [114] JOHANSSON A-C, APPELQVIST H, NILSSON C, et al. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization[J]. *Apoptosis*, 2010, 15(5): 527-540.
- [115] PIVTORAIKO V N, STONE S L, ROTH K A, et al. Oxidative Stress and Autophagy in the Regulation of Lysosome-Dependent Neuron Death[J]. *Antioxidants & redox signaling*, 2009, 11(3): 481-496.
- [116] YUAN Y, CHEN Y, PENG T, et al. Mitochondrial ROS-induced lysosomal dysfunction impairs autophagic flux and contributes to M1 macrophage polarization in a diabetic condition[J]. *Clinical science*, 2019, 133(15): 1759-1777.
- [117] SALIMI A, ALYAN N, AKBARIN, et al. Selenium and L-carnitine protects from valproic acid-Induced oxidative stress and mitochondrial damages in rat cortical neurons[J]. *Drug and chemical toxicology*, 2020.
- [118] NGAHA E O, OGUNLEYE I O. Studies on gentamicin-induced labilization of rat kidney lysosomes in vitro. Possible protection by selenium[J]. *Biochemical pharmacology*, 1983, 32(18): 2659-2664.
- [119] KIRWALE S, POOLADANDA V, THATIKONDA S, et al. Selenium nanoparticles induce autophagy mediated cell death in human keratinocytes[J]. *Nanomedicine*, 2019, 14(15): 1991-2010.
- [120] 纪宗实, 贾锡安. 微量元素硒对大鼠心、肝组织 RNA 含量及溶酶体 RNase 活性的影响[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 1987, 01: 17-22.
- [121] 向瑞华, 贾锡安. 大剂量维生素 C 对克山病病区粮饲大鼠心肝组织溶酶体酶活性的影响[J]. *实用地方病学杂志*, 1986, 1(01): 40-42.
- [122] FERGUSON S M. Neuronal lysosomes[J]. *Neuroscience letters*, 2019, 697: 1-9.
- [123] SHARMA J, DI RONZA A, LOTFI P, et al. Lysosomes and Brain Health[M]. *Annual Review of Neuroscience*, 2018, 41: 255-276.
- [124] BALLABIO A, GIESELMANN V. Lysosomal disorders: From storage to cellular damage[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2009, 1793(4): 684-696.
- [125] KROEMER G, JAATTELA M. Lysosomes and autophagy in cell death control[J]. *Nature*

- Reviews Cancer, 2005, 5(11): 886-897.
- [126] BELLOMO G, PACIOTTI S, GATTICCHI L, et al. The vicious cycle between alpha-synuclein aggregation and autophagic-lysosomal dysfunction[J]. Movement Disorders, 2020, 35(1): 34-44.
- [127] 梁杨. 低硒对鸡脂肪组织中脂肪代谢与硒蛋白表达的影响[D]. 东北农业大学, 2014.
- [128] 栾依霖. 缺硒通过 gga-miR-138-5p 靶向 SelM 激活的线粒体通路诱导软骨细胞凋亡[D]. 东北农业大学, 2017.
- [129] 陈晰. 肉鸡日粮硒含量调查及缺硒对中性粒细胞功能的影响[D]. 东北农业大学, 2015.
- [130] 孙哲鹏. 硒缺乏对鸡树突状细胞成熟分化及功能的影响[D]. 东北农业大学, 2018.
- [131] 刘琼, 田静, 陈平, 等. 硒缺乏与阿尔茨海默症[J]. 生命科学, 2012, 24(08): 892-900.
- [132] 张健. 缺硒对鸡脑组织损伤的研究[D]. 东北农业大学, 2008.
- [133] 赵金欣. 基于内质网应激通路探讨缺硒鸡脑细胞凋亡的研究[D]. 东北农业大学, 2017.
- [134] 谢丽, 赵树进, 严华成, 等. 一种简单高效的新生鼠海马神经元原代培养方法[J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(4): 570-573.
- [135] 张文雅, 程秀永, 张静, 等. SD 大鼠的胎鼠海马神经元细胞的分离培养和鉴定[J]. 中国实用医刊, 2017, 44(10): 1-4+128.
- [136] YAN J, ZHENG Y, MIN Z, et al. Selenium effect on selenoprotein transcriptome in chondrocytes[J]. Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine, 2013, 26(2): 285-296.
- [137] PAGMANTIDIS V, BERMANO G, VILLETTE S, et al. Effects of Se-depletion on glutathione peroxidase and selenoprotein W gene expression in the colon[J]. FEBS letters, 2005, 579(3): 792-796.
- [138] 崔嘉文. 龙江县猪缺硒病流行病学调查与缺硒对脑组织程序性坏死的影响[D]. 东北农业大学, 2020.
- [139] 李诺, 吕中明, 王民生. 原代培养神经元的转染技术研究进展[J]. 江苏预防医学, 2016, 27(03): 308-310.
- [140] WANG C, ZHANG R, WEI X, et al. Metalloimmunology: The metal ion-controlled immunity[M]. Advances in Immunology in China - Pt B. 2020: 187-241.
- [141] NELSON N. Metal ion transporters and homeostasis[J]. The EMBO journal, 1999, 18(16): 4361-4371.
- [142] MYHRE O, UTKILEN H, DUALE N, et al. Metal Dyshomeostasis and Inflammation in Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Possible Impact of Environmental Exposures[J]. Oxidative medicine and cellular longevity, 2013, 2013.
- [143] WRIGHT R O, BACCARELLI A. Metals and neurotoxicology[J]. Journal of Nutrition, 2007, 137(12): 2809-2813.
- [144] KIM A C, LIM S, KIM Y K. Metal Ion Effects on A and Tau Aggregation[J]. International journal of molecular sciences, 2018, 19(1).
- [145] KOTYZOVA D, CERNA P, LESETICKY L, et al. Trace Elements Status in Selenium-

- Deficient Rats-Interaction with Cadmium[J]. Biological trace element research, 2010, 136(3): 287-293.
- [146] GirAY B, RIONDEL J, ARNAUD J, et al. Iodine and/or selenium deficiency alters tissue distribution pattern of other trace elements in rats[J]. Biological trace element research, 2003, 95(3): 247-258.
- [147] ERKEKOGLU P, ARNAUD J, RACHIDI W, et al. The effects of di(2-ethylhexyl) phthalate and/or selenium on trace element levels in different organs of rats[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2015, 29: 296-302.
- [148] YAO H, ZHAO X, FAN R, et al. Selenium deficiency-induced alterations in ion profiles in chicken muscle[J]. PloS one, 2017, 12(9).
- [149] DUCE J A, BUSH A I. Biological metals and Alzheimer's disease: Implications for therapeutics and diagnostics[J]. Progress in neurobiology, 2010, 92(1): 1-18.
- [150] GARZA-LOMBO C, POSADAS Y, QUINTANAR L, et al. Neurotoxicity Linked to Dysfunctional Metal Ion Homeostasis and Xenobiotic Metal Exposure: Redox Signaling and Oxidative Stress[J]. Antioxidants & redox signaling, 2018, 28(18): 1669-1703.
- [151] VERKHRATSKY A, UNTIET V, ROSE C R. Ionic signalling in astroglia beyond calcium[J]. Journal of Physiology-London, 2020, 598(9): 1655-1670.
- [152] JANKA Z. Tracing trace elements in mental functions[J]. Ideggyogyaszati Szemle-Clinical Neuroscience, 2019, 72(11-12): 367-379.
- [153] WANG B, DU Y. Cadmium and Its Neurotoxic Effects[J]. Oxidative medicine and cellular longevity, 2013, 2013.
- [154] LI X, LV Y, YU S, et al. The effect of cadmium on A beta levels in APP/PS1 transgenic mice[J]. Experimental and therapeutic medicine, 2012, 4(1): 125-130.
- [155] CHAMBERS D C, CAREW A M, LUKOWSKI S W, et al. Transcriptomics and single-cell RNA-sequencing[J]. Respiriology, 2019, 24(1): 29-36.
- [156] LOCKHART D J, WINZELER E A. Genomics, gene expression and DNA arrays[J]. Nature, 2000, 405(6788): 827-836.
- [157] 石田培, 张莉. 全转录组学在畜牧业中的应用[J]. 遗传, 2019, 41(03): 193-205.
- [158] CHENG Y, BURT D W. Chicken genomics[J]. International Journal of Developmental Biology, 2018, 62(1-3): 265-271.
- [159] BOO S Y, TAN S W, ALITHEEN N B, et al. Transcriptome analysis of chicken intraepithelial lymphocyte natural killer cells infected with very virulent infectious bursal disease virus[J]. Scientific reports, 2020, 10(1).
- [160] XU Z, CHE T, LI F, et al. The temporal expression patterns of brain transcriptome during chicken development and ageing[J]. BMC genomics, 2018, 19.
- [161] GUO J, ITO S, HOA THANH N, et al. Effects on the hepatic transcriptome of chicken embryos in ovo exposed to phenobarbital[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2018, 160: 94-103.

- [162] QAZI I H, CAO Y, YANG H, et al. Impact of Dietary Selenium on Modulation of Expression of Several Non-Selenoprotein Genes Related to Key Ovarian Functions, Female Fertility, and Proteostasis: a Transcriptome-Based Analysis of the Aging Mice Ovaries[J]. Biological trace element research, 2021, 199(2): 633-648.
- [163] FENG Y, XING Y, LIU Z, et al. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in rats with selenium deficiency and identification of associated miRNA-mRNA network[J]. Scientific reports, 2018, 8.
- [164] FAN R, CAO C, ZHAO X, et al. Downregulated long noncoding RNA ALDBGALG0000005049 induces inflammation in chicken muscle suffered from selenium deficiency by regulating stearyl-CoA desaturase[J]. Oncotarget, 2017, 8(32): 52761-52774.
- [165] 佟晶晶. 硒通过抑制内质网应激信号通路对玉米赤霉烯酮诱导的小鼠肾脏损伤保护作用的研究[D]. 沈阳农业大学, 2019.
- [166] 张晓田, 甘小琴, 俄倩男, 等. 纳米硒对硫酸镍致大鼠睾丸损伤的保护作用[J]. 毒理学杂志, 2019, 33(02): 142-146.
- [167] 毕亚楠. 内质网应激参与了硒缓解铅诱导的鸡睾丸细胞凋亡[D]. 东北农业大学, 2018.
- [168] 陈向阳, 杨光, 王民, 等. 低硒对大鼠心肌细胞内质网应激相关凋亡途径的研究[J]. 国外医学(医学地理分册), 2015, 36(03): 178-181.
- [169] 潘升驰. 低硒加剧 T-2 毒素对心肌细胞损伤及其内质网应激机制研究[D]. 南京农业大学, 2015.
- [170] 姚琳琳. 氧化-内质网应激通路在缺硒引起鸡肝脏凋亡中的作用[D]. 东北农业大学, 2015.
- [171] SHCHEDRINA V A, ZHANG Y, LABUNSKYY V M, et al. Structure-Function Relations, Physiological Roles, and Evolution of Mammalian ER-Resident Selenoproteins[J]. Antioxidants & redox signaling, 2010, 12(7): 839-849.
- [172] LEE J H, PARK K J, JANG J K, et al. Selenoprotein S-dependent Selenoprotein K Binding to p97(VCP) Protein Is Essential for Endoplasmic Reticulum-associated Degradation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(50): 29941-29952.
- [173] SPECKMANN B, GERLOFF K, SIMMS L, et al. Selenoprotein S is a marker but not a regulator of endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2014, 67: 265-277.
- [174] LI X, CHEN M, YANG Z, et al. Selenoprotein S silencing triggers mouse hepatoma cells apoptosis and necrosis involving in intracellular calcium imbalance and ROS-mPTP-ATP[J]. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2018, 1862(10): 2113-2123.
- [175] DU S, LIU H, HUANG K. Influence of SelS gene silence on beta-Mercaptoethanol-mediated endoplasmic reticulum stress and cell apoptosis in HepG2 cells[J]. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2010, 1800(5): 511-517.
- [176] SPRENKLE N T, SIMS S G, SANCHEZ C L, et al. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system[J]. Molecular neurodegeneration, 2017, 12.

- [177] HULBERT A J, PAMPLONAR R, BUFFENSTEIN R, et al. Life and death: Metabolic rate, membrane composition, and life span of animals[J]. *Physiological reviews*, 2007, 87(4): 1175-1213.
- [178] SALIM S. Oxidative Stress and the Central Nervous System[J]. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2017, 360(1): 201-205.
- [179] GU Y, DEE C M, SHEN J. Interaction of free radicals, matrix metalloproteinases and caveolin-1 impacts blood-brain barrier permeability[J]. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 2011, 3: 1216-1231.
- [180] SORCE S, KRAUSE K-H. NOX Enzymes in the Central Nervous System: From Signaling to Disease[J]. *Antioxidants & redox signaling*, 2009, 11(10): 2481-2504.
- [181] ADEDARA I A, FABUNMI A T, AYENITAJU F C, et al. Neuroprotective mechanisms of selenium against arsenic-induced behavioral impairments in rats[J]. *Neurotoxicology*, 2020, 76: 99-110.
- [182] HUANG J Q, REN F Z, JIANG Y Y, et al. Characterization of Selenoprotein M and Its Response to Selenium Deficiency in Chicken Brain[J]. *Biological trace element research*, 2016, 170(2): 449-458.
- [183] XU S W, YAO H D, ZHANG J, et al. The Oxidative Damage and Disbalance of Calcium Homeostasis in Brain of Chicken Induced by Selenium Deficiency[J]. *Biological trace element research*, 2013, 151(2): 225-233.
- [184] LU C, QIU F, ZHOU H, et al. Identification and characterization of selenoprotein K: An antioxidant in cardiomyocytes[J]. *FEBS letters*, 2006, 580(22): 5189-5197.
- [185] TU B P, WEISSMAN J S. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences[J]. *Journal of Cell Biology*, 2004, 164(3): 341-346.
- [186] ELETTO D, CHEVET E, ARGON Y, et al. Redox controls UPR to control redox[J]. *Journal of cell science*, 2014, 127(17): 3649-3658.
- [187] WANG H F, WANG Z Q, DING Y, et al. Endoplasmic reticulum stress regulates oxygen-glucose deprivation-induced parthanatos in human SH-SY5Y cells via improvement of intracellular ROS[J]. *Cns Neuroscience & Therapeutics*, 2018, 24(1): 29-38.
- [188] ZEESHAN H M A, LEE G H, KIM H-R, et al. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS[J]. *International journal of molecular sciences*, 2016, 17(3).
- [189] BHARDWAJ R, TANDON C, DHAWAN D K, et al. Effect of endoplasmic reticulum stress inhibition on hyperoxaluria-induced oxidative stress: influence on cellular ROS sources[J]. *World Journal of Urology*, 2017, 35(12): 1955-1965.
- [190] RAJAPAKSE D, CURTIS T, CHEN M, et al. Zinc Protects Oxidative Stress-Induced RPE Death by Reducing Mitochondrial Damage and Preventing Lysosome Rupture[J]. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 2017.
- [191] KIFFIN R, BANDYOPADHYAY U, CUERVO A M. Oxidative stress and autophagy[J]. *Antioxidants & redox signaling*, 2006, 8(1-2): 152-162.

- [192] MAUVEZIN C, NAGY P, JUHASZ G, et al. Autophagosome-lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification[J]. Nature communications, 2015, 6.
- [193] KAMINSKYY V, ZHIVOTOVSKY B. Proteases in autophagy[J]. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2012, 1824(1): 44-50.
- [194] ORR M E, ODDO S. Autophagic/lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Research & Therapy, 2013, 5(5).
- [195] RAYCHOWDHURY M K, GONZALEZ-PERRETT S, TIMPANARO G A, et al. Molecular pathophysiology of mucopolidosis type IV: pH dysregulation of the mucolipin-1 cation channel[J]. Human molecular genetics, 2004, 13(6): 617-627.
- [196] WANG W, ZHANG X, GAO Q, et al. TRPML1: an ion channel in the lysosome[J]. Handbook of experimental pharmacology, 2014, 222: 631-645.
- [197] BASSI M T, MANZONI M, MONTI E, et al. Cloning of the gene encoding a novel integral membrane protein, mucolipidin-and identification of the two major founder mutations causing mucopolidosis type IV[J]. American journal of human genetics, 2000, 67(5): 1110-1120.
- [198] ZHANG X, CHENG X, YU L, et al. MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy[J]. Nature communications, 2016, 7.
- [199] ZHANG X, YU L, XU H. Lysosome calcium in ROS regulation of autophagy[J]. Autophagy, 2016, 12(10): 1954-1955.
- [200] BOYA P, KROEMER G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death[J]. Oncogene, 2008, 27(50): 6434-6451.
- [201] 陈艳炯, 严玉仙. 硒对大鼠急性缺血心肌溶酶体膜的影响[J]. 中国地方病学杂志, 1995, 03: 129-132.
- [202] 张明溪, 扬克敌, 熊希凯, 等. 硒拮抗氟对肾脏损害的酶组织化学观察[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1999, 01: 57-60+129.
- [203] 李丹丹. 硒和维生素 B₁ 对黄绿青霉素所致心肌自噬依赖性凋亡的干预机制研究[D]. 大连医科大学, 2018.
- [204] SHAHRIPOUR R B, HARRIGAN M R, ALEXANDROV A V. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities[J]. Brain and behavior, 2014, 4(2): 108-122.
- [205] ARAKAWA M, ITO Y. N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases: Basic and clinical pharmacology[J]. Cerebellum, 2007, 6(4): 308-314.
- [206] RAVIKUMAR B, SARKAR S, DAVIES J E, et al. Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology[J]. Physiological reviews, 2010, 90(4): 1383-1435.
- [207] GLICK D, BARTH S, MACLEOD K F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms[J]. Journal of Pathology, 2010, 221(1): 3-12.
- [208] MIZUSHIMA N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation[J]. Current opinion in cell biology, 2010, 22(2): 132-139.

- [209] NAKATOGAWA H, SUZUKI K, KAMADA Y, et al. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(7): 458-467.
- [210] PANKIV S, CLAUSEN T H, LAMARK T, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(33): 24131-24145.
- [211] SHARIFI M N, MOWERS E E, DRAKE L E, et al. Measuring autophagy in stressed cells[J]. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 2015, 1292: 129-150.
- [212] ZHANG X J, CHEN S, HUANG K X, et al. Why should autophagic flux be assessed?[J]. *Acta pharmacologica Sinica*, 2013, 34(5): 595-599.
- [213] TANIK S A, SCHULTHEISS C E, VOLPICELLI-DALEY L A, et al. Lewy Body-like alpha-Synuclein Aggregates Resist Degradation and Impair Macroautophagy[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(21): 15194-15210.
- [214] LEE S, SATO Y, NIXON R A. Lysosomal Proteolysis Inhibition Selectively Disrupts Axonal Transport of Degradative Organelles and Causes an Alzheimer's-Like Axonal Dystrophy[J]. *Journal of Neuroscience*, 2011, 31(21): 7817-7830.
- [215] YU L, CHEN Y, TOOZE S A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms[J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 207-215.
- [216] ZHAO Y, LI Z F, ZHANG D, et al. Quercetin alleviates Cadmium-induced autophagy inhibition via TFEB-dependent lysosomal restoration in primary proximal tubular cells[J]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2021, 208.
- [217] ZANG H, QIAN S, LI J, et al. The effect of selenium on the autophagy of macrophage infected by *Staphylococcus aureus*[J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 83.
- [218] GOKCE A B, EREN B, SAGIR D, et al. Inhibition of acrolein-induced apoptosis by the antioxidant selenium[J]. *Toxicology and industrial health*, 2020, 36(2): 84-92.
- [219] GAO J, WANG Y, XU G, et al. Selenium attenuates apoptosis and p-AMPK expressions in fluoride-induced NRK-52E cells[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(15): 15685-15697.
- [220] ZHANG L, GAO Y, FENG H, et al. Effects of selenium deficiency and low protein intake on the apoptosis through a mitochondria-dependent pathway[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2019, 56: 21-30.
- [221] WANG J, LIU Z, HE X, et al. Selenium deficiency induces duodenal villi cell apoptosis via an oxidative stress-induced mitochondrial apoptosis pathway and an inflammatory signaling-induced death receptor pathway[J]. *Metallomics*, 2018, 10(10).
- [222] 赵文超. Mir-30b 抑制 Oxr1 在鸡缺硒性心肌细胞凋亡中作用机制的研究[D]. 东北农业大学, 2016.
- [223] 姚海东. 硒蛋白 W 抗氧化功能及其在鸡缺硒性骨骼肌细胞凋亡作用中的研究[D]. 东北农业大学, 2013.

- [224] 张利娜. 硒缺乏致鸡胰腺损伤机理的研究[D]. 东北农业大学, 2009.
- [225] 王巧红. 硒缺乏致鸡免疫抑制机制的研究[D]. 东北农业大学, 2009.
- [226] WAN N, XU Z, CHI Q, et al. microRNA-33-3p involved in selenium deficiency-induced apoptosis via targeting ADAM10 in the chicken kidney[J]. *Journal of cellular physiology*, 2019, 234(8): 13693-13704.
- [227] 曹嫦妤. LncRNA-ALDBGALG0000001600-mir-223-Inpp4a 通路在渗出性素质鸡静脉内皮细胞凋亡中作用的研究[D]. 东北农业大学, 2017.
- [228] YU S, LIU X, MEN L, et al. Selenoprotein S protects against high glucose-induced vascular endothelial apoptosis through the PKC beta II/JNK/Bcl-2 pathway[J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2019, 120(5): 8661-8675.
- [229] GAN F, HU Z, ZHOU Y, et al. Overexpression and Low Expression of Selenoprotein S Impact Ochratoxin A-Induced Porcine Cytotoxicity and Apoptosis in Vitro[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2017, 65(32): 6972-6981.
- [230] 冯喆. 黄曲霉毒素 B1 阻断 HepG2 细胞自噬流及诱导细胞凋亡的机制研究[D]. 吉林大学, 2020.
- [231] 吴文. 二甲双胍改善镉诱导神经细胞自噬体积累依赖的凋亡分子机理研究[D]. 南京师范大学, 2020.
- [232] 冯晓黎. 氧化石墨烯损害自噬流和溶酶体功能诱导 PC12 细胞系发生 p62 蛋白依赖性凋亡的机制研究[D]. 南方医科大学, 2019.
- [233] PAN H, WANG Y, NA K, et al. Autophagic flux disruption contributes to Ganoderma lucidum polysaccharide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells via MAPK/ERK activation[J]. *Cell death & disease*, 2019, 10.
- [234] LI Q, YIN Y, ZHENG Y, et al. Inhibition of autophagy promoted high glucose/ROS-mediated apoptosis in ADSCs[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2018, 9.
- [235] LI J, HOU N, FARIED A, et al. Inhibition of Autophagy by 3-MA Enhances the Effect of 5-FU-Induced Apoptosis in Colon Cancer Cells[J]. *Annals of surgical oncology*, 2009, 16(3): 761-771.
- [236] 宋祥彬. 自噬阻断和溶酶体膜通透化在铅所致大鼠肾小管上皮细胞毒性中的作用[D]. 山东农业大学, 2017.
- [237] LI J, BALBOULA A Z, ABOELENAIN M, et al. Effect of autophagy induction and cathepsin B inhibition on developmental competence of poor quality bovine oocytes[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2020, 66(1): 83-91.
- [238] CHEN C S, CHEN W N, ZHOU M, et al. Probing the cathepsin D using a BODIPY FL-pepstatin A: applications in fluorescence polarization and microscopy[J]. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 2000, 42(3): 137-151.
- [239] BALBOULA A Z, YAMANAKA K, SAKATANI M, et al. Cathepsin B activity has a crucial role in the developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes exposed to heat shock during in vitro maturation[J]. *Reproduction*, 2013, 146(4): 407-417.

附录

表 1 日粮组成

Table 1 Diet composition

主要成分	含量 (%)
玉米	64.73%
大豆粕	28%
大豆油	2.5%
磷酸氢钙	2.3%
石粉	1.3%
赖氨酸 (70%)	0.4%
盐	0.27%
蛋氨酸	0.19%
胆碱	0.07%
肉鸡多维	0.04%
肉鸡复合矿物质	0.2%
Fe SO ₄ ·7H ₂ O	16%
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.5%
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	15%
MnSO ₄ ·5H ₂ O	20%
10%氯化钴	0.4%
碘酸钙	0.9%
石粉	46.2%

表 2 肉鸡血清中离子含量
Table 2 The ions concentration in chicken serum

	对照组	缺硒组
常量元素		
Na (mg/Kg)	2779.102±144.603	2928.121±45.265
K (mg/Kg)	199.826±15.864	174.464±17.639
Ca (mg/Kg)	87.657±4.678	91.815±3.163
Mg (mg/Kg)	26.621±1.530	25.502±1.096
微量元素		
B (mg/Kg)	8.645±1.123	7.197±0.602
Si (mg/Kg)	7.910±1.247	7.590±0.241
Fe (mg/Kg)	4.845±0.357	7.148±0.727
Zn (mg/Kg)	1.657±0.054	2.222±0.197
Cu (mg/Kg)	0.256±0.017	0.281±0.004
Se (μg/Kg)	180.015±0.689	41.728±2.952
Cr (μg/Kg)	81.455±3.172	75.413±12.587
Mo (μg/Kg)	58.373±5.620	126.423±5.927
Mn (μg/Kg)	55.391±9.412	71.837±13.999
V (μg/Kg)	31.361±1.104	29.977±3.707
Ni (μg/Kg)	28.992±1.392	35.720±10.171
Co (μg/Kg)	8.886±0.830	7.925±1.139
Tl (μg/Kg)	1.357±0.141	0.993±0.065
有毒元素		
Al (mg/Kg)	2.491±0.030	2.274±0.064
Ba (μg/Kg)	547.493±98.229	536.717±68.815
Sb (μg/Kg)	95.308±2.850	93.273±6.317
Sn (μg/Kg)	88.074±10.771	101.827±1.530
Pb (μg/Kg)	57.509±6.581	86.136±5.180
Li (μg/Kg)	31.888±0.188	27.021±0.945
As (μg/Kg)	24.300±3.763	27.061±0.378
Cd (μg/Kg)	11.075±0.120	5.069±0.243
Hg (μg/Kg)	0.554±0.0488	0.407±0.016

注：表中离子按其性质分类，含量排序。

表 3 鸡小脑中离子含量
Table 3 The ions concentration in chicken cerebellum

	对照组	缺硒组
常量元素		
K (mg/Kg)	2746.285±84.841	2573.299±44.569
Na (mg/Kg)	1136.449±92.762	1115.765±45.762
Ca (mg/Kg)	354.866±41.866	523.928±13.530
Mg (mg/Kg)	193.356±9.185	191.402±6.175
微量元素		
Fe (mg/Kg)	18.129±1.795	15.675±0.962
Zn (mg/Kg)	12.266±0.189	11.356±0.478
Si (mg/Kg)	8.378±0.700	8.450±1.391
B (mg/Kg)	4.580±0.067	4.231±0.212
Cu (mg/Kg)	3.318±0.244	3.402±0.233
Mn (μg/Kg)	447.883±26.077	456.481 ±29.011
Se (μg/Kg)	173.963±10.842	117.840±4.141
Ni (μg/Kg)	146.394±2.631	86.366±18.634
Cr (μg/Kg)	76.563±1.679	95.854±1.799
Mo (μg/Kg)	63.803±1.939	81.250±7.895
V (μg/Kg)	29.106±1.625	32.308±0.981
Co (μg/Kg)	4.203±0.0980	4.431±0.721
Tl (μg/Kg)	1.003±0.027	0.973±0.032
有毒元素		
Al (mg/Kg)	2.611±0.160	2.617±0.057
Ba (μg/Kg)	640.443±40.388	627.552±40.898
Sb (μg/Kg)	107.637±0.0.687	95.931±5.488
Sn (μg/Kg)	78.245±10.977	82.245±8.508
Pb (μg/Kg)	74.543±6.058	72.450±2.775
Li (μg/Kg)	25.203±0.626	24.766±0.690
As (μg/Kg)	24.024±1.377	24.305±2.226
Cd (μg/Kg)	1.835±0.848	3.224±1.552
Hg (μg/Kg)	0.323±0.013	0.256±0.005

注：表中离子按其性质分类，含量排序。

表 4 Neurobasal™培养基组分
Table 4 The components of Neurobasal™ Media

组分	分子量	浓度 (mg/L)	mM
氨基酸			
Glycine (甘氨酸)	75.0	30.0	0.4
L-Alanine (L-丙氨酸)	89.0	2.0	0.02247191
L-Arginine hydrochloride (L-精氨酸盐酸盐)	211.0	84.0	0.39810428
L-Asparagine-H ₂ O (L-天冬酰胺-水合物)	150.0	0.83	0.0055333334
L-Cysteine (L-半胱氨酸)	121.0	31.5	0.2603306
L-Histidine hydrochloride-H ₂ O (L-组氨酸盐酸盐-水合物)	210.0	42.0	0.2
L-Isoleucine (L-异亮氨酸)	131.0	105.0	0.8015267
L-Leucine (L-亮氨酸)	131.0	105.0	0.8015267
L-Lysine hydrochloride (赖氨酸盐酸盐)	183.0	146.0	0.7978142
L-Methionine (L-蛋氨酸)	149.0	30.0	0.20134228
L-Phenylalanine (L-苯丙氨酸)	165.0	66.0	0.4
L-Proline (L-脯氨酸)	115.0	7.76	0.06747826
L-Serine (L-丝氨酸)	105.0	42.0	0.4
L-Threonine (L-苏氨酸)	119.0	95.0	0.79831934
L-Tryptophan (L-色氨酸)	204.0	16.0	0.078431375
L-Tyrosine (L-酪氨酸)	181.0	72.0	0.39779004
L-Valine (L-缬氨酸)	117.0	94.0	0.8034188
维生素			
Choline chloride (氯化胆碱)	140.0	4.0	0.028571429
D-Calcium pantothenate (泛酸钙)	477.0	4.0	0.008385744
Folic Acid (叶酸)	441.0	4.0	0.009070295
Niacinamide (烟酰胺)	122.0	4.0	0.032786883
Pyridoxal hydrochloride (盐酸吡哆醛)	204.0	4.0	0.019607844
Riboflavin (核黄素)	376.0	0.4	0.0010638298
Thiamine hydrochloride (盐酸硫胺)	337.0	4.0	0.011869436
Vitamin B12 (维生素 B12)	1355.0	0.0068	5.0184503E-6
i-Inositol (肌醇)	180.0	7.2	0.04
无机盐			
Calcium Chloride (anhyd.) (无水 CaCl ₂)	111.0	200.0	1.8018018
Magnesium Chloride (anhyd.) (无水 MgCl ₂)	95.0	77.3	0.8136842
Potassium Chloride (KCl)	75.0	400.0	5.3333335
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	84.0	2200.0	26.190475

(转下页)

(接上页)

组分	分子量	浓 度 (mg/L)	mM
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	3000.0	51.724136
Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	138.0	125.0	0.9057971
Zinc sulfate (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	288.0	0.194	6.736111E-4
其他组分			
D-Glucose (Dextrose) (D-葡萄糖)	180.0	4500.0	25.0
HEPES	238.0	2600.0	10.92437
Phenol Red (酚红)	376.4	8.1	0.021519661
Sodium Pyruvate (丙酮酸钠)	110.0	25.0	0.22727273

注：详情参见官方网页 <https://www.thermofisher.com/cn/zh/home/technical-resources/media-formulation.251.html>。

表 5 B-27 添加物组分

Table 5 The components of B-27 supplement

组分	浓度 (mg/L)
维生素	
Biotin (生物素)	机密
DL Alpha Tocopherol Acetate (DL- α -生育酚醋酸酯)	机密
DL Alpha-Tocopherol (DL- α -生育酚)	机密
Vitamin A (acetate) (维生素 A (醋酸盐))	机密
蛋白质	
BSA, fatty acid free Fraction V (牛血清白蛋白, 无脂肪酸组分 V)	机密
Catalase (过氧化氢酶)	机密
Human Recombinant Insulin (人重组胰岛素)	机密
Human Transferrin (人转铁蛋白)	机密
Superoxide Dismutase (超氧化物歧化酶)	机密
其他组分	
Corticosterone (皮质酮)	机密
D-Galactose (D-半乳糖)	机密
Ethanolamine HCl (盐酸乙醇胺)	机密
Glutathione (reduced) (谷胱甘肽 (还原))	机密
L-Carnitine HCl (盐酸左旋肉碱)	机密
Linoleic Acid (亚油酸)	机密
Linolenic Acid (亚麻酸)	机密
Progesterone (孕酮)	机密
Putrescine 2HCl (腐胺双盐酸盐)	机密
Sodium Selenite (亚硒酸钠)	机密
T3 (triiodo-L-thyronine) (T3 (三碘甲状腺素))	机密

注：因涉及商业机密和专利，商家不提供 B-27 各成分具体浓度，详情参见官方网页 <https://www.thermofisher.com/cn/zh/home/technical-resources/media-formulation.250.html>。

攻读博士学位期间发表的学术论文

- [1] ZHAO X, WANG S, LI X, et al. Cadmium exposure induces TNF-alpha-mediated necroptosis via FPR2/TGF-beta/NF-kappaB pathway in swine myocardium[J]. Toxicology, 2021, 453.
- [2] ZHAO X, LI X, WANG S, et al. Cadmium exposure induces mitochondrial pathway apoptosis in swine myocardium through xenobiotic receptors-mediated CYP450s activation[J]. Journal of inorganic biochemistry, 2021, 217.
- [3] LI X, ZHAO X, YAO Y, et al. New insights into crosstalk between apoptosis and necroptosis co-induced by chlorothalonil and imidacloprid in Ctenopharyngodon idellus kidney cells[J]. The Science of the total environment, 2021, 780.
- [4] GUAN Y, ZHAO X, SONG N, et al. Albicanol antagonizes Cd-induced apoptosis through a NO/iNOS-regulated mitochondrial pathway in chicken liver cells[J]. Food & function, 2021, 12(4): 1757-1768.
- [5] YAO H, ZHAO X, FAN R, et al. Selenium deficiency-induced alterations in ion profiles in chicken muscle[J]. PloS one, 2017, 12(9).
- [6] SATTAR H, YANG J, ZHAO X, et al. Selenoprotein-U (SelU) knockdown triggers autophagy through PI3K-Akt-mTOR pathway inhibition in rooster Sertoli cells[J]. Metallomics, 2018, 10(7).
- [7] FAN R, CAO C, ZHAO X, et al. Downregulated long noncoding RNA ALDBGALG0000005049 induces inflammation in chicken muscle suffered from selenium deficiency by regulating stearyl-CoA desaturase[J]. Oncotarget, 2017, 8(32): 52761-52774.
- [8] JIN X, XU Z, ZHAO X, et al. The antagonistic effect of selenium on lead-induced apoptosis via mitochondrial dynamics pathway in the chicken kidney[J]. Chemosphere, 2017, 180 : 259-266.