

桑叶中添加三聚氰胺对家蚕生长及代谢的影响*

贾漫丽^{1,2**} 李娜^{1,2} 谢岩^{1,2} 黄露^{1,2} 杨贵明^{1,2} 李季生^{1,2***}

(1. 河北省高校特产蚕桑应用技术研发中心, 承德 067000; 2. 承德医学院蚕业研究所, 承德 067000)

摘要 【目的】本试验旨在探讨桑叶中添加三聚氰胺 (Melamine, MEL) 对家蚕的生长和血清生化指标的影响, 进而揭示三聚氰胺在家蚕体内的代谢途径和毒理学特征。【方法】选取大小基本一致、发育整齐的 5 龄家蚕 600 头, 随机分成 4 组 (每组 3 个处理重复, 每个重复区 50 头家蚕, 雌雄各半)。对照组饲喂新鲜桑叶, 试验组添饲 3 种非致死浓度水平的三聚氰胺 (10、15、20 mg/kg), 从起蚕起连续饲喂 72 h, 测定表型和血淋巴生化指标。【结果】添食三聚氰胺导致家蚕体质量日增长率的相对下降, 20 mg/kg 剂量的三聚氰胺抑制效果达到显著水平 ($P < 0.05$)。家蚕血淋巴糖代谢水平升高, 血脂含量降低, 而黄嘌呤氧化酶和尿酸含量变化趋势不明显。【结论】桑叶中添加三聚氰胺显著影响了家蚕的体质量增长, 以及体内糖代谢和脂代谢, 对尿酸代谢的影响较小。

关键词 家蚕, 三聚氰胺, 血清, 生化指标

Effects of adding melamine to mulberry leaves on the growth and digestive metabolism of silkworms

JIA Man-Li^{1,2**} LI Na^{1,2} XIE Yan^{1,2} HUANG Lu^{1,2} YANG Gui-Ming^{1,2} LI Ji-Sheng^{1,2***}

(1. Hebei Universities R&D Centre for Sericulture and Specialty Enabling Technologies, Chengde 067000, China;

2. Institute of Sericulture, Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the effects of adding melamine (MEL) to mulberry leaves on the growth and serum biochemical indices of silkworms, and thereby reveal the metabolic pathways by which ingestion of a nonlethal dose of MEL produces toxic effects in this species. 【Methods】600 newly exuviated 5th instar larvae of approximately the same size were randomly divided into four groups, each group having 3 replicates of 50 silkworms (25 males and 25 females). The control group were fed fresh mulberry leaves whereas the three treatment groups were fed fresh mulberry leaves to which one of three nonlethal doses (10, 15 and 20 mg/kg) of MEL had been added. Monitoring of phenotypic and serum biochemical indices began 5-days after silkworms had begun feeding. 【Results】The addition of MEL slowed the relative growth rate of larvae, significantly so ($P < 0.05$) in the 20 mg/kg MEL treatment group. Glycometabolism and haemolymph levels increased with MEL whereas blood lipid content declined. The addition of MEL had no obvious effect on xanthine oxidase and uric acid content. 【Conclusion】The addition of melamine to mulberry leaves significantly affected the growth, carbohydrate metabolism and lipid metabolism, of silkworm larvae, but appeared to have little effect on their uric acid metabolism.

Key words silkworm, melamine, serum, biochemistry indexes

三聚氰胺 (Melamine, MEL), 是一种三嗪类含氮杂环有机化合物, 作为重要的精细化工基础有机原料, 能与醛缩合生成三聚氰胺-甲醛树

脂, 并广泛用于木材、造纸、医药等行业。三聚氰胺的含氮量在 66% 左右 (丁雪梅, 2010), 因此在动物饲料中添加三聚氰胺来替代蛋白原料,

*资助项目 Supported projects: 河北省教育厅重点课题 (ZD2016044)

**第一作者 First author, E-mail: 94789458@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: jshlee@163.com

收稿日期 Received: 2017-12-12, 接受日期 Accepted: 2018-01-25

可造成蛋白含量虚高的假象 (Lang, 2007)。2007-2008 年间, 发生了由三聚氰胺引发的奶粉事件和宠物中毒事件后, 三聚氰胺添饲动物导致的食品安全问题成为国内外关注的热点。研究表明, 三聚氰胺在动物机体内代谢不活泼, 与组织没有亲和性, 靶器官主要是泌尿系统, 通常情况下以原体或同系物形式排出体外 (高新乐, 2016)。长期摄入三聚氰胺会对动物泌尿系统造成伤害, 进而导致膀胱结石、肾结石, 还可能引起肝、肾等重要器官的毒性损伤和衰竭 (王蔚等, 2011)。目前, 有关三聚氰胺在动物体内的代谢和毒性效应研究主要针对实验动物、哺乳动物、家禽和水生动物, 且研究内容集中在三聚氰胺对动物的生长性能和消化代谢的影响、对泌尿系统的损伤、对肝脏酶活性和肝肾组织结构的变化, 以及其残留物消除规律等方面 (金鑫等, 2010), 但其对家蚕等无脊椎动物的影响和毒性效应的研究尚未见报道。

家蚕 *Bombyx mori* L. 作为鳞翅目 Lepidoptera 昆虫的代表, 是仅次于果蝇的模式昆虫, 具有易于饲养和繁殖, 生活世代短, 繁殖系数高, 遗传资源丰富、遗传背景清楚、大小适中容易操作, 以及对低剂量药物毒性反应灵敏等优点, 是研究鳞翅目昆虫的生理生化、遗传学、细胞生物学、细菌感染和基因组学不可多得的宝贵资源 (Hamamoto *et al.*, 2004)。随着家蚕基因组测序和重测序的完成 (李斌等, 2000), 也为家蚕模式化应用提供了关键的理论基础和技术平台。目前, 用家蚕代替高等动物作为实验动物进行损伤性试验, 更符合动物伦理学的要求, 在病理学、药理学、毒理学研究及环境监测等方面得到广泛应用。如家蚕肥胖模型的构建可用以阐明高糖饮食导致人体糖代谢和脂质代谢的变化 (卢忠燕等, 2014); 家蚕痛风药物筛选模型的建立 (王长春, 2012); 添食重金属 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 对家蚕生长发育及细胞凋亡的影响 (朱玉芳等, 2006); 吡虫啉、苦参碱、氟化物对家蚕的毒性及毒害作用 (吕顺霖等, 2002; 黄露, 2014; 菜自峥, 2015); 红景天对家蚕寿命的影响 (陈聪, 2014); 纳米 TiO_2 对家蚕生长发育及蛋白合成的影响等

(倪敏, 2016)。现有研究均表明, 家蚕是理想的生命科学和医学研究模型, 并具有广阔的应用前景。近几年来, 随着人力成本等方面的增加, 人工饲料养蚕技术越来越引起人们的关注, 标准化饲养技术基本成熟, 促进了工厂化和规模化的高效养蚕时代的来临 (张月华, 2015; 崔为正等, 2016), 也为家蚕作为模式生物进行标准化饲养提供了技术方法。家蚕是泌丝昆虫, 对蛋白摄入量有着极高的要求, 在饲料中添加三聚氰胺来替代蛋白原料, 既节省成本又可在检测中造成高蛋白含量的假象。尽管目前未发现家蚕人工饲料中添加三聚氰胺及三聚氰胺对家蚕毒害的相关报道, 然而随着小蚕和全龄人工饲料育的推广和普及, 很难避免未来有以三聚氰胺类冒充高氮原料饲料的问题, 可能会给养蚕业造成重大损失。为防患于未然, 同时利用家蚕作为模式生物研究三聚氰胺对动物乃至人类健康的威胁, 本试验通过在桑叶中添加不同剂量的三聚氰胺, 观察其对蚕体生长和健康的影响, 并探讨其在家蚕体内的代谢、转化, 以及对重要组织器官的毒性损伤, 以期阐明三聚氰胺对养蚕业的影响以及建立以家蚕为实验动物的三聚氰胺毒理学模型提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试家蚕品种为菁松×皓月 (Jingsong × Haoyue), 由山东广通蚕种集团提供, 保存于承德医学院蚕业研究所家蚕研究室。试剂: 葡萄糖测定试剂盒 (F006), 己糖激酶测定试剂盒 (A077-1), 磷酸果糖激酶测试盒 (A129), 游离脂肪酸测定试剂盒 (A042-1), 甘油三酯测定试剂盒 (A110-1), 黄嘌呤氧化酶 (XOD) 测试盒 (A002-1), 尿酸 (UA) 测试盒 (C012-1) 等检测试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。三聚氰胺 (Melamine) 购自国药试剂化学集团有限公司 (上海)。主要仪器: 台式高速冷冻离心机 (Dynamica Velocity 18R)、酶标仪 (BioTek ELX808)、紫外可见分光光度计 (普析 T6 新世纪)。

1.2 试验方法

1.2.1 家蚕饲养 家蚕幼虫在温度 (25±1) 、相对湿度 RH 75% 的条件下采用新鲜桑叶饲养至 5 龄, 选取发育整齐一致的健康家蚕, 分成 4 组, 每组设 3 个重复 (每个重复区 50 头蚕, 雌雄各半)。试验设计 3 个 MEL 剂量组: M1、M1、M3, MEL 添加浓度分别为 10、15、20 mg/kg (桑叶), 对照组添食清水。每次添食时根据桑叶重量将清水或 MEL 溶液均匀涂抹于桑叶上喂蚕, 桑叶质量与 MEL 溶液质量比为 4:1 过量饲喂, 每日 1 次。

1.2.2 家蚕血液样品制备 家蚕饲喂 72 h 后取血样, 剪破家蚕幼虫胸足 (或尾角), 轻压腹部, 迅速采集血液 0.5-1 mL 至 1.5 mL 离心管中, 加入少量苯基硫脲 (分析纯), 于 4 、5 000 r/min 离心 10 min, 去除血细胞, 取上清液置于 -20 冰箱中保存待测。每次随机选取 6 头家蚕 (雌雄各半), 血样 3 个重复。

1.2.3 测定方法 体质量 (Body weight) 增长率测定: 分别于添饲三聚氰胺后 1、2、3 d 称量每组家蚕的体质量, 每组内测 50 头, 取平均值, 并记录。体质量增长率按下列公式计算, 其中 W1: 每组家蚕 5 龄起添饲三聚氰胺 72 h 后平均体质量; W: 每组家蚕 5 龄起平均体质量。体质量 (BW) 增长率 (%) = (W1-W) / W × 100。

血液指标测定: 测定前血浆自然解冻, 摇匀。分光光度比色法测定血液中葡萄糖 (GLU) 含量、己糖激酶 (HK) 活力、游离脂肪酸 (NEFA) 含

量、黄嘌呤氧化酶 (XOD) 活力和尿酸 (UA) 含量, 酶标仪法测定 6-磷酸果糖激酶 (PFK) 活力和甘油三酯 (TG) 含量, 具体测定方法按照试剂盒说明书的要求规范操作。

1.3 数据处理

数据采用 SPASS18.1 统计软件进行实验数据的模型拟合及方差分析, 如分析结果具有显著差异 ($P < 0.05$) 则用 LSD 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 三聚氰胺对家蚕生长的影响

分别观察各剂量组家蚕添食三聚氰胺 1、2、3 d 后的采食及生长情况, 各剂量组家蚕与对照组家蚕相比均出现采食量下降的现象, 家蚕的体质量增加缓慢, 差异不显著 ($P > 0.05$), 且均未出现死亡情况。连续饲喂 3 d 后, 三聚氰胺添饲组家蚕幼虫体质量增长率均低于添加清水饲养对照组 (Mck 组, 下同), 且添加剂量越大, 体质量增长率越低 (见表 1), 与对照组相比, M1 和 M2 试验组家蚕的体质量增长率差异不显著 ($P > 0.05$); 而添加 20 mg/kg 三聚氰胺 M3 组家蚕体质量增长率与 Mck 相比显著降低 ($P < 0.05$)。

2.2 三聚氰胺对家蚕糖代谢的影响

随着三聚氰胺添饲量的增加, GLU 浓度呈先升高后降低的趋势 (图 1:A)。其中 10 mg/kg 剂量组家蚕血淋巴中 GLU 浓度达到最高值

表 1 添食三聚氰胺对家蚕生长的影响
Table 1 Effects of addition of melamine on growth performance of silkworm

调查指标 Survey indicators	天数 Test days	Mck (0 mg/kg)	M1 (10 mg/kg)	M2 (15 mg/kg)	M3 (20 mg/kg)
平均体质量 Average mass (g)	1 d	1.097±0.012	1.060±0.059	1.072±0.215	1.162±0.138
平均体质量 Average mass (g)	2 d	1.758±0.088	1.677±0.118	1.671±0.188	1.792±0.063
平均体质量 Average mass (g)	3 d	2.025±0.148	1.906±0.068	1.886±0.039	2.022±0.303
体质量增长率 Mass growth rate (%)		84.63±0.059 ^a	79.83±0.046 ^a	75.96±0.019 ^a	73.97±0.014 ^b

Mck: 添加清水饲养组, M1: 添加 10 mg/kg 三聚氰胺组, M2: 添加 15 mg/kg 三聚氰胺组, M3: 添加 20 mg/kg 三聚氰胺组。同行数据后标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Mck: Clean water feeding group, M1: Adding 10 mg/kg melamine group, M2: Adding 15 mg/kg melamine group, M3: Adding 20 mg/kg melamine group. Data with different lowercase letters in the same row indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.215 mmol/L, 与对照相比增加了 19.11%, 差异极显著 ($P < 0.05$)。而 15 mg/kg 剂量组家蚕血淋巴中 GLU 浓度下降到 1.930 mmol/L, 但仍高于对照组 3.77%, 差异不显著。20 mg/kg 剂量组家蚕血淋巴中 GLC 浓度达到最低水平 1.382 mmol/L, 与对照相比降低了 34.55% ($P < 0.05$)。

各浓度处理组 HK 活力均高于对照水平 (图 1: B), 且随着三聚氰胺处理浓度的增加一直呈上升趋势。三聚氰胺各剂量组饲养家蚕血液中 HK 活力分别比对照增加了 74.36%、153.85%、266.67%, 20 mg/kg 剂量组 HK 活力达到最大值 464.405 U/L, 与对照差异达到极显著水平 ($P < 0.05$)。

随着三聚氰胺处理剂量的增加, 各浓度处理组 PFK 活力呈现先激活后抑制的变化规律 (图 1: C)。其中, 10 mg/kg 剂量组家蚕血液中 PFK 活力为 6.644 U/mL, 与对照相比增加了 32.56%, 15 mg/kg 剂量组家蚕血液中 PFK 活力持续升高达到峰值 13.987 U/mL, 与对照相比增加了 179.07% ($P < 0.05$), 20 mg/kg 剂量组家蚕血液中 PFK 活力下降到 7.576 U/mL, 但仍高于对照, 仍比对照组增加 51.16%。

2.3 三聚氰胺对家蚕脂代谢的影响

Mck 处理下 TG 含量最高, 达到 0.616 $\mu\text{mol/L}$, 各浓度处理组 TG 含量均低于对照水平, 且随着三聚氰胺处理剂量的增加, TC 含量总体呈下降趋势 (图 2: A)。添加 20 mg/kg 剂量组家蚕血液中 TG 含量达到最低值 0.381 $\mu\text{mol/L}$, TG 含量比对照显著降低了 61.60% ($P < 0.05$)。

随着三聚氰胺添加剂量的增加, 家蚕血液中 NEFA 含量呈先降低后升高的变化规律 (图 2: B)。10 mg/kg 剂量组家蚕血液中 NEFA 含量达到 2 656.72 $\mu\text{mol/L}$, 与对照相比下降了 56.92%, 15 mg/kg 剂量组家蚕血液中 NEFA 含量持续下降到 2 149.25 $\mu\text{mol/L}$, 与 Mck 相比显著降低了 93.97% ($P < 0.05$)。但 20 mg/kg 剂量组家蚕血液中 NEFA 含量显著高于前两个剂量组 ($P < 0.05$), 达到 5 074.63 $\mu\text{mol/L}$, 比对照增加了 21.72%。

Mck 处理下 TG 含量最高, 达到 0.616 $\mu\text{mol/L}$,

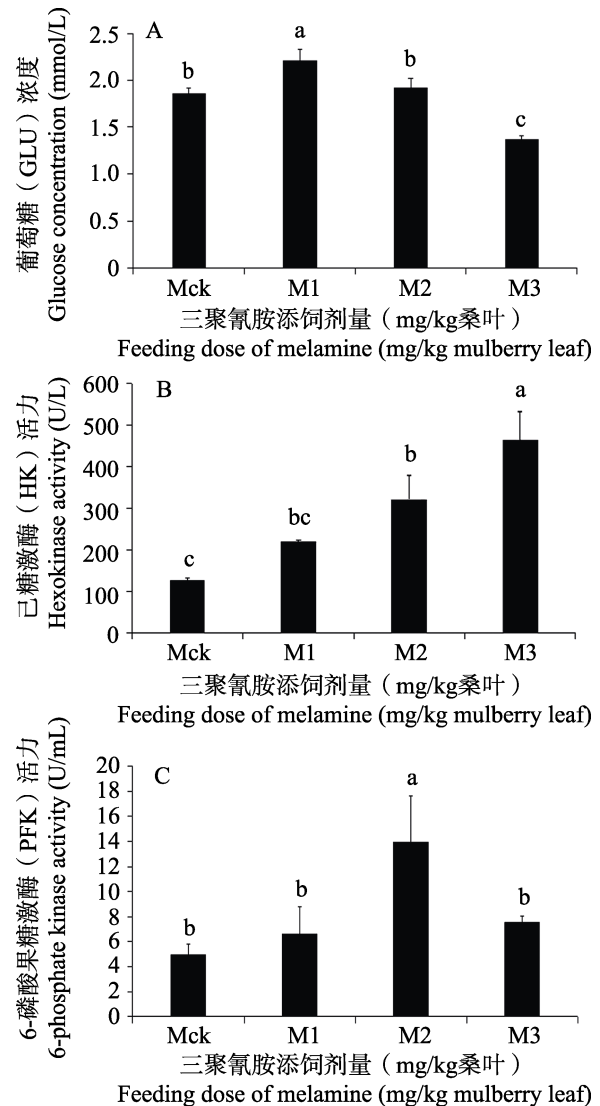


图 1 三聚氰胺对家蚕糖代谢的影响

Fig. 1 Effects of melamine on the metabolism of sugar in silkworm

A. 三聚氰胺对家蚕血清葡萄糖 (GLU) 含量的影响; B. 三聚氰胺对家蚕血清己糖激酶 (HK) 活力的影响; C. 三聚氰胺对家蚕血清 6-磷酸果糖激酶活力 (PFK) 的影响。柱上标有不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。Mck: 添加清水饲养组, M1: 添加 10 mg/kg 三聚氰胺组, M2: 添加 15 mg/kg 三聚氰胺组, M3: 添加 20 mg/kg 三聚氰胺组。下图同。

A. Effect of melamine on serum glucose (GLU) content in silkworm; B. Effect of melamine on serum hexokinase (HK) activity in silkworm; C. Effects of melamine on serum 6-phosphofructokinase activity (PFK) in silkworm. Histograms with different lowercase letters indicate significant difference between groups ($P < 0.05$). Mck: Clean water feeding group, M1: Adding 10 mg/kg melamine group, M2: Adding 15 mg/kg melamine group, M3: Adding 20 mg/kg melamine group. The same below.

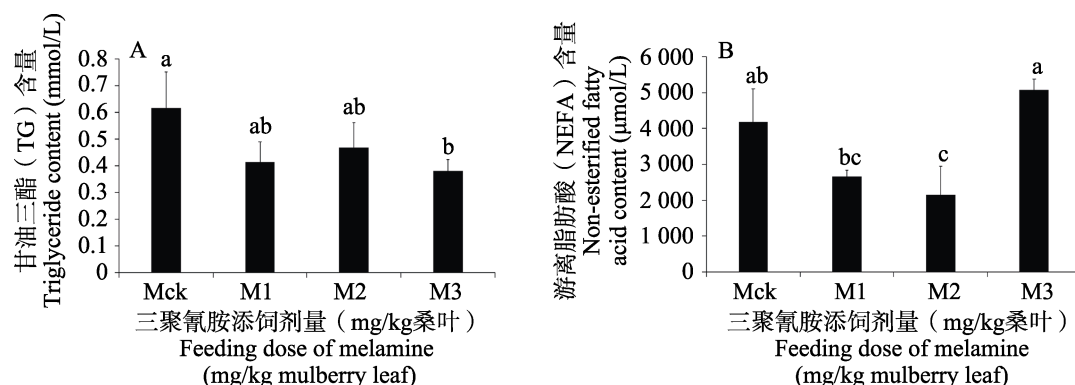


图2 三聚氰胺对家蚕脂代谢的影响

Fig. 2 Effects of melamine on the metabolism of fat in silkworm

A. 三聚氰胺对家蚕血清甘油三酯 (TG) 含量的影响; B. 三聚氰胺对家蚕血清游离脂肪酸 (NEFA) 含量的影响。

A. Effects of melamine on serum triglyceride (TG) in silkworm; B. Effects of melamine on serum free fatty acid (NEFA) in silkworm.

各浓度处理组 TG 含量均低于对照水平, 且随着三聚氰胺处理剂量的增加, TC 含量总体呈下降趋势 (图 2:A)。添加 20 mg/kg 剂量组家蚕血液中 TG 含量达到最低值 0.381 μmol/L, TG 含量比对照显著降低了 61.60% ($P<0.05$)。

随着三聚氰胺添加剂量的增加, 家蚕血液中 NEFA 含量呈先降低后升高的变化规律 (图 2:B)。10 mg/kg 剂量组家蚕血液中 NEFA 含量达到 2 656.72 μmol/L, 与对照相比下降了 56.92%, 15 mg/kg 剂量组家蚕血液中 NEFA 含量持续下降到 2 149.25 μmol/L, 与 Mck 相比显著降低了 93.97% ($P<0.05$)。但 20 mg/kg 剂量组家蚕血液中 NEFA 含量显著高于前两个剂量组 ($P<0.05$)。

达到 5 074.63 μmol/L, 比对照增加了 21.72%。

2.4 三聚氰胺对家蚕尿酸代谢的影响

5 龄家蚕添食三聚氰胺 72 h 后, 家蚕血液中黄嘌呤氧化酶 (XOD) 活力变化趋势不明显 (图 3:A)。3 个剂量组黄嘌呤氧化酶 (XOD) 活力达到 18.459、21.427、17.585 U/L, M1 与 M3 分别低于对照组 14.92% 和 20.63%, 差异均不显著 ($P>0.05$)。图 3(B) 说明, 15 mg/kg 剂量组 UA 含量达到 643.094 μmol/L, 显著高于对照组 41.43% ($P<0.05$)。但 20 mg/kg 剂量组 UA 含量有所下降, 与其他组差异均不显著 ($P>0.05$)。

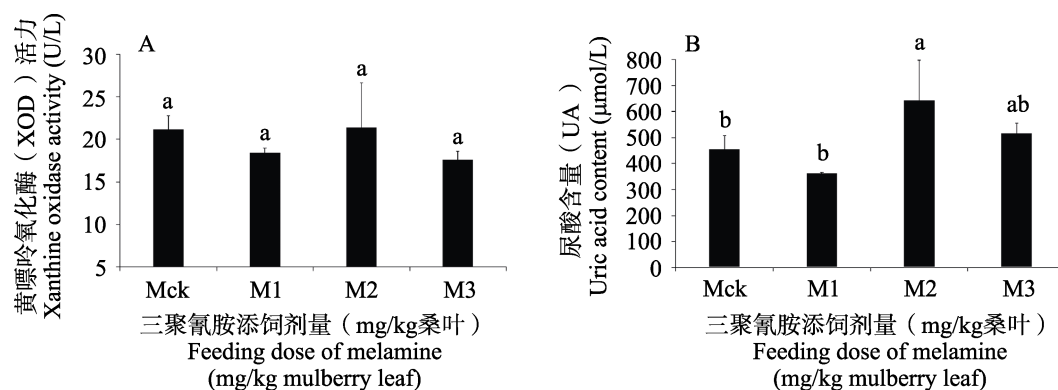


图3 三聚氰胺对家蚕尿酸代谢的影响

Fig. 3 Effects of melamine on uric acid metabolism in silkworm

A. 三聚氰胺对家蚕血清黄嘌呤氧化酶 (XOD) 活力的影响; B. 三聚氰胺对家蚕血清尿酸 (UA) 含量的影响。

A. Effect of adding melamine on serum XOD activity in silkworm; B. Effect of adding melamine on on serum UA content in silkworm.

3 讨论

目前,已有研究表明动物长期摄食含三聚氰胺的饲料会对机体产生不良影响。根据卫生部、国家质量监督检验检疫总局等联合发布公告,婴幼儿配方乳粉中三聚氰胺的限量值为 1 mg/kg,液态奶、奶粉、其他配方乳粉中三聚氰胺的限量值为 2.5 mg/kg;刘汇涛等(2010)在日粮中添加三聚氰胺(15 mg/kg)可显著降低蓝狐 *Alopex lagopus* 体质量、氮沉积、氮沉积率和氮生物学效价;张定华等(2011)在饲料中单独添加 5-30 mg/kg MEL 可造成蛋鸡 *Gallus domesticus* 肝脏和肾脏损伤。本试验的前期采用浓度 40 mg/kg 的 MEL 添饲量,家蚕拒食严重,72 h 后试验家蚕全部死亡。因此,在本试验中设计浓度低于 40 mg/kg 添饲量,是根据预试验的结果确定的三聚氰胺最大安全限量值,能体现在非致死剂量下 MEL 对家蚕正常体征的影响。家蚕 5 龄起添食 3 种剂量(10、15、20 mg/kg)的三聚氰胺 72 h 后可观察到家蚕食欲减退,采食量降低,并且体质量日增长量呈逐渐降低。最大添饲剂量 20 mg/kg 的三聚氰胺显著抑制了家蚕的体质量增加($P < 0.05$),说明桑叶添加三聚氰胺对家蚕体质量增加有抑制作用,这与在其它动物上的研究结果一致。

3.1 家蚕血淋巴中糖代谢的三个指标关联分析

生物体机体内主要提供能量的物质是葡萄糖,蚕血淋巴中海藻糖在海藻糖酶的作用下分解成葡萄糖后供器官和组织吸收利用,生命体血糖的产生和利用应处于动态平衡的状态,维持在一个相对稳定的水平,因此,血糖含量是机体代谢紊乱检测的一个重要指标。己糖激酶(HK)和果糖 6-磷酸激酶(PFK)是糖酵解反应过程中的关键酶(马红娜等,2016),对血糖平衡维持和应激反应功能(夏定国等,2010)起重要作用。本试验中,随着三聚氰胺添加剂量的增加,家蚕血液中葡萄糖的浓度呈先上升后降低的趋势,HK 活力呈连续上升趋势,PFK 活力先升高后降低。该结果说明三聚氰胺的摄入引起家蚕体内耗

氧代谢升高或机体供氧不充足,导致机体能量消耗增大,家蚕机体通过自身调节提升血糖浓度,来满足高代谢需求,可能是机体代谢补偿的一种结果(Lemos *et al.*, 2003)。而随着三聚氰胺摄入剂量的增加,家蚕体内的耗氧代谢继续升高,单一血糖升高无法满足能量需求,HK 活力相应升高加速糖酵解,导致血糖下降。PFK 会被高浓度 ATP 抑制,其活力先升高后降低,说明糖酵解释放的 ATP 先提升 PFK 的活力,而随着 ATP 持续增高,又对其产生了抑制作用。这 2 种酶的变化过程与家蚕血糖含量的变化趋势基本一致,揭示了三聚氰胺的持续摄入引起机体的应激和抵御机制,机体通过能量代谢的调控,维持正常生理和抵御机制的平衡。由于抵御应激的损耗过大,机体出现体质量增长受到抑制的现象。

3.2 添食三聚氰胺对家蚕脂代谢的影响

甘油三酯(TG)是参与体内能量代谢的营养物质之一,其变化情况直接反映机体的营养状况(徐等,2012)。而血清中的游离脂肪酸(NEFA)也是机体内非常重要的“代谢燃料”,脂肪细胞内 TG 在各种脂肪酶作用下被水解为 NEFA 和甘油,释放进入血液并被机体组织利用(刘倩,2017),参与机体的循环代谢,其含量反映着机体的营养状态和物理活性,同样是反映脂类代谢的一个敏感指标(Cree-Green *et al.*, 2017)。本研究中,20 mg/kg 剂量组 TG 含量显著低于对照($P < 0.05$),而其水解产物 NEFA 则显著高于 10、15 mg/kg 剂量组,据此推测在三聚氰胺的毒性作用下,家蚕机体动员脂质水解来参与更多的能量供应和代谢转化,以应对有害物质的应激反应所带来的营养消耗,脂解作用的持续增加又引起血清 NEFA 显著升高。Randle 等(1963)在 30 年前即提出葡萄糖-脂肪酸循环假设,机体内葡萄糖氧化的增加可以抑制脂肪酸的氧化,两者之间存在着代谢竞争。本试验中葡萄糖(GLU)和 NEFA 的变化趋势与此相符。

3.3 添食三聚氰胺对家蚕尿酸代谢的影响

尿酸是嘌呤代谢的最终产物,而黄嘌呤氧化

酶也是嘌呤代谢生成尿酸的过程中起关键作用的限速酶, 在最后阶段催化黄嘌呤转化成尿酸(朱明敏, 2015)。从这条代谢通路上可以看出, XOD 活性的强弱在一定程度上影响着生物体内黄嘌呤最终氧化成为尿酸的水平。张定华等(2011)在蛋鸡饲料分别添加 5、15 和 30 mg/kg 的三聚氰胺 21 d 后, 血清尿酸(UA)含量受到显著影响。本试验不同三聚氰胺剂量组处理下家蚕 XOD 活性和 UA 含量变化趋势不明显($P>0.05$), 仅 15 mg/kg 三聚氰胺进入家蚕体内后尿酸生成加速, 显著高于对照($P<0.05$), 说明三聚氰胺对家蚕尿酸代谢的影响可能尚不明确。

本试验研究结果表明, 在非致死剂量下用添加三聚氰胺的桑叶饲养家蚕 72 h, 家蚕血液各项生化指标变化趋势明显, 能够明确显示机体产生了应激响应。本试验初步研究了三聚氰胺在家蚕体内的代谢、转化过程中对家蚕生长和重要生理生化指标的影响, 今后有必要进一步研究三聚氰胺对蚕体造成毒害的分子机理, 可为揭示三聚氰胺对哺乳动物乃至人类的毒理提供更有价值的参考。

参考文献 (References)

Cai ZZ, 2015. Research on the expression characteristics of the detoxification enzyme system in silkworm, *Bombyx mori* L. Master dissertation. Hangzhou: Zhejiang University. [蔡自峥, 2015. 家蚕解毒酶系的表达特性研究. 硕士学位论文. 杭州: 浙江大学.]

Chen C, 2014. The effect of rhodiola on lifespan of silkworm and preliminary research on molecular mechanism. Master dissertation. Chongqing: Southwest University. [陈聪, 2014. 红景天对家蚕寿命的影响及其机理初探. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]

Cree-Green M, Gupta A, Coe GV, Baumgartner AD, Pyle L, Reusch JE, Brown MS, Newcomer BR, Nadeau KJ, 2017. Insulin resistance in type2 diabetes youth relates to serum free fatty acids and muscle mitochondrial dysfunction. *J. Diabetes Complications*, 31(1): 141–148.

Cui WZ, Zhang SX, Liu QX, Wang YW, Wang HL, Liu XL, Mou ZM, 2016. An overview on research and commercialization of artificial diet for silkworm (*Bombyx mori*) in China. *Sericulture Science*, 42 (1): 3–15. [崔为正, 张升祥, 刘庆信, 王彦文, 王洪利, 刘训理, 牟志美, 2016. 我国家蚕人工饲料

的研究概况及生产实用化进展. *蚕业科学*, 42(1): 3–15.]

Liu Q, Yang FM, Zhao SL, Zheng P, Zhu W, 2017. Diagnostic value of serum free fatty acids and urine podocalyxin in the patients with type 2 diabetic nephropathy. *Journal of Clinical Examination*, 3(3): 189–192. [刘倩, 杨伏猛, 赵绍林, 郑萍, 朱伟, 2017. 血清游离脂肪酸和尿足细胞标志蛋白检测在 2 型糖尿病肾病中的诊断价值. *临床检验杂志*, 3(3): 189–192.]

Ding XM, 2010. Patten of melamine residue and withdrawal in broiler tissues and effects of melamine on nutrient utilization and health in Broilers. Doctoral dissertation. Ya'an: Sichuan Agricultural University. [丁雪梅, 2010. 三聚氰胺在肉鸡体内残留消除规律及对饲料养分利用和肉鸡健康的影响研究. 博士学位论文. 雅安: 四川农业大学.]

Gao XL, 2016. The experimental investigation of the kidney damages causedby melamine in canine. Master dissertation. Yangzhou: Yangzhou university. [高新乐, 2016. 三聚氰胺对犬肾损伤的试验研究. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学.]

Hiroshi H, Kenji K, Chikara K, Koushirou K, Iony MR, Hiroyuki K, Tomofumi S, Kazuhisa S, 2004. Quantitative evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworms infected with human pathogenic microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(3): 774–779.

Huang L, 2014. Study oil matrine toxicity to *Bombyx mori* L. Master dissertation. Tai'an: Shandong Agricultural University. [黄露, 2014. 苦参碱对家蚕的毒害作用研究. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]

Jin X, Zhang Y, Li SL, Zhang HT, Zhang Q, 2010. Metabolic mechanism of melamine in dairy cows. 22(6): 1703–1708. [金鑫, 张艳, 李胜利, 张红涛, 张倩, 2010. 三聚氰胺在奶牛体内代谢规律的研究. 22(6): 1703–1708.]

Lang L, 2007. FDA issues statement on diethyleneglycol and melamine food contamination. *Gastroenterology*, 133(10): 5–6.

Lemos D, Salomon M, Gomes V, Phan VN, Buchholz F, 2003. Citrate synthase and pyruvate kinase activities during early life stages of the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae): effects of development and temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 135(4): 707–719.

Li B, Lu C, Zhou ZY, Xiang ZH, 2000. Construction of silkworm RAPD molecular linkage map. *Aetq Genetica Sinica*, 27(2): 127–132. [李斌, 鲁成, 周泽扬, 向仲怀, 2000. RAPD 标记构建家蚕分子连锁图. *遗传学报*, 27(2): 127–132.]

Liu HT, Yang FH, Gao XH, Xing XM, Zhang TT, 2010. Effects of melamine cyanuric acid in diets on digestion, metabolism and growth performance of blue foxes in early growth stage. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 2(15): 1–5.[刘汇涛,

- 杨福合, 高秀华, 邢秀梅, 张铁涛, 2010. 日粮中添加三聚氰胺和三聚氰酸对生长前期蓝狐消化代谢及生长性能的影响. *特产研究*, 2(15): 1–5.]
- Lu ZY, Wen YL, Zhang Z, Ren X, Zhang Y, Zhao P, Xia QY, 2014. Effects of high carbohydrate diet on serum sugar level and fat body triglyceride content in silkworm, *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 40(5): 933–937. [卢忠燕, 温阳丽, 张振, 任秀, 张毅, 赵萍, 夏庆友, 2014. 高糖饲料饲养对家蚕的血糖浓度和脂肪体中的甘油三酯含量影响. *蚕业科学*, 40(5): 933–937.]
- Lv SL, Min SJ, Ding CY, 2002. The activity of glutathione peroxidase in the hemolymph of the silkworm larvae of fluorosis. *Science of Sericulture*, 28(1): 61–63. [吕顺霖, 闵思佳, 丁春阳, 2002. 氟中毒家蚕幼虫血淋巴中谷胱甘肽过氧化物酶的活. *蚕业科学*, 28(1): 61–63.]
- Ma HN, Zhou PP, Lu Y, Yuan Y, Hou YM, Sun P, Ding LY, Zhou QC, 2016. Effects of different lipid and glucose levels on growth performance, hepatic glycolysis and gluconeogenic key enzyme activities of large yellow croaker (*Larimichthys crocea* Richardson). *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 28(10): 3110–3122. [马红娜, 周飘苹, 陆游, 袁野, 侯迎梅, 孙蓬, 丁立云, 周歧存, 2016. 不同脂肪和葡萄糖水平对大黄鱼生长性能、肝脏糖酵解和糖异生关键酶活性的影响. *动物营养学报*, 28(10): 3110–3122.]
- Ni M, 2016. Effect of nanoparticulate anatase titanium dioxide on the growth, development and protein synthesis of silkworm. Master dissertation. Suzhou: Soochow University. [倪敏, 2016. 纳米 TiO₂ 对家蚕生长发育及蛋白合成的影响. 硕士学位论文. 苏州: 苏州大学.]
- Randle P, Hales CN, Garland PB, Newsholme EA, 1963. The glucose fatty-acid cycle-it's role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *The Lancet*, 281(7285): 785–789.
- Wang CC, 2012. The study on silkworm model to screen and valuate gouty therapeutic drugs. Master dissertation. Chongqing: Southwest University. [王长春, 2012. 建立家蚕痛风药物筛选模型的初探. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Wang W, Chen DW, Mao XB, Chen H, Yu B, 2011. Toxicity of Melamine: Damage on the structure and function of kidneys in finisher pigs. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 23(9): 1584–1591. [王蔚, 陈代文, 毛湘冰, 陈洪, 余冰, 2011. 饲料中三聚氰胺的添加对育肥猪肾脏结构与功能的影响. *动物营养学报*, 23(9): 1584–1591.]
- Xu QY, Xu ZC, Wang CA, Zhao ZG, Luo L, 2012. Effect of dietary lipid levels on liver free fatty acids, serum biochemical parameters and liver histological structure in mirror common carp at different temperatures. *Journal of Northeast Agricultural University*, 43(9): 118–126. [徐奇友, 许治冲, 王常安, 赵志刚, 罗亮, 2012. 不同温度下饲料脂肪水平对松浦镜鲤幼鱼肝脏游离脂肪酸、血清生化及肝脏组织结构的影响. *东北农业大学学报*, 43(9): 118–126.]
- Xia DG, Zhang GZ, Zhao, 2010. Effect of glucose feeding on fructose kinase and cocoon quality of silkworm, (*Bombyx mori*). Academic Symposium on the Sixth Silkworm and Tussah Genetics and Breeding of Chinese Silkworm Society. Hulun Buir. 312–316. [夏定国, 张国政, 赵巧玲, 2010. 葡萄糖添食对家蚕磷酸果糖激酶及茧质的影响. 中国蚕学会第六届家蚕和柞蚕遗传育种学术研讨会. 呼伦贝尔. 312–316.]
- Zhu MM, 2015. Inhibition of compound tufuling granules on xanthine oxidase in hyperuricemia. Doctoral dissertation. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine. [朱明敏, 2015. 复方土茯苓颗粒对高尿酸血症黄嘌呤氧化酶的抑制作用. 博士学位论文. 广州: 广州中医药大学.]
- Zhang YH, 2015. Study on the feeding character of silkworm to artificial feed and the construction of fingerprints of silkworm. Master dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [张月华, 2015. 家蚕对人工饲料摄食性的研究及家蚕指纹图谱的构建. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Zhu YF, Xu YX, Zheng XJ, Cui YH, Zhou XW, 2006. Effect of silkworm fed on mixture of Pb²⁺ and Cd²⁺ on its development and Inducement of apoptosis. *Science of Sericulture*, 32(1): 125–128. [朱玉芳, 许雅香, 郑小坚, 崔勇华, 周新文, 2006. Pb²⁺、Cd²⁺混合添食对家蚕生长发育及细胞凋亡的影响. *蚕业科学*, 32(1): 125–128.]
- Zhang DH, Bai SP, Zhang KY, Ding XM, Wu CH, 2011. Study on the toxic effect of melamine and cyanuric acid on laying hens. *Journal of Animal Nutrition*, 23(6): 1027–1034. [张定华, 白世平, 张克英, 丁雪梅, 吴彩梅, 2011. 三聚氰胺和三聚氰酸对蛋鸡毒性效应的研究. *动物营养学报*, 23(6): 1027–1034.]