

微生物源性抗氧化剂对高不饱和和脂肪酸饲料致大鼠自由基损伤模型的影响

龚灵芝 陈小连 徐建雄

摘要 探讨微生物源性抗氧化剂对高不饱和脂肪酸饲料致大鼠自由基损伤和血清抗氧化指标的影响。将 40 只 SD 大鼠随机分为对照组、高不饱和脂肪酸组、微生物源性抗氧化剂组和高不饱和脂肪酸+微生物源性抗氧化剂组, 试验共 42 d, 分别在正试期的第 21、42 d 的时候, 取血并测试各项指标。结果: 与对照组相比, 高不饱和脂肪酸组大鼠血清的 SOD 和 GSH-Px 活力下降, 且 NO 和 MDA 含量升高; 添加微生物源性抗氧化剂后大鼠血清的 SOD 和 GSH-Px 活力提高, 且 NO 和 MDA 含量降低。因此, 微生物源性抗氧化剂对高不饱和脂肪酸饲料致大鼠自由基损伤有一定的保护作用。

关键词 微生物源性抗氧化剂; 不饱和脂肪酸; 自由基损伤; 大鼠

中图分类号 S816.3

近年来寻找高效、价廉、无毒的抗氧化剂一直是人们所关心的问题。但是各种抗氧化剂单独使用往往存在不足, 因此研制高效复合自由基清除剂和抗氧化剂成为现代自由基生物学的重点研究课题。多不饱和脂肪酸很不稳定, 在机体内容易被氧化, 发生过氧化反应, 产生对机体有害的自由基, 在抗氧化剂不足情况下, 当长期过多摄入不饱和脂肪酸时, 会引起体内脂质过氧化反应上升和抗氧化酶活性降低, 导致负面作用。本试验旨在通过高不饱和脂肪酸诱导大鼠产生自由基损伤, 再在日粮中添加微生物源性抗氧化剂, 测定抗氧化指标的变化, 研究其对动物体内自由基代谢和机体损伤修复的影响。

1 试验材料与方法

1.1 试验动物及分组

试验选用 40 只 70 日龄雄性 SD 大鼠, 购自上海

西普尔-毕凯实验动物有限公司, SPF 级, 体重(300±30) g, 随机分成 4 组: 对照组饲喂基础日粮(由上海斯莱克生物科技有限公司提供), 在基础日粮的基础上, 试验 A 组在日粮中添加葵花籽油(每千克饲料添加 200 g), 试验 B 组在日粮中添加一定量的微生物源性抗氧化剂(每千克饲料添加 20 g), 试验 C 组日粮中同时添加葵花籽油和微生物复合自由基清除剂, 每组 10 只大鼠, 试验共 42 d。

1.2 微生物源性抗氧化剂

微生物源性抗氧化剂由上海创博生态工程有限公司提供。

1.3 试验药品

葵花籽油购自超市; SOD 检测试剂盒、MDA 检测试剂盒、NO 检测试剂盒和谷胱甘肽过氧化物酶活性(GSH-Px)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 无水乙醇、乙酸等均为分析纯 AR, 购自上海生物工程工程有限公司。

1.4 试验仪器和设备

紫外-可见分光光度计 (Range of UV-Visible Spectrophotometers), 英国 Thermo 公司生产; 离心机(Centrifuge), 德国 eppendorf 公司生产, 型号 Centrifuge 5804R;

龚灵芝, 上海交通大学, 200240, 上海闵行区东川路 800 号上海交通大学农业与生物学院 3 区 304。

陈小连、徐建雄(通讯作者), 单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期: 2008-09-01

酵母培养物影响后肠发酵为动物增加养分供应的机制, 与对瘤胃发酵影响的机制相同(李淑敏, 2000)。

3 结论

3.1 与对照组相比, 含有酵母培养物的试验组猪只终末体重提高 4.6%, 差异显著(P<0.05); 日增重提高 11%, 差异显著(P<0.05)。

3.2 与对照组相比, 试验组仔猪肠道内这 3 种菌群

的数量都有一定的增加, 但大肠杆菌与另两种菌群总和的比值基本保持相同。试验组仔猪小肠绒毛长度有一定程度的增加, 但增幅并不显著。

3.3 在生长猪的日粮中添加 0.15% 酵母培养物(益康 XP), 可使粗纤维表观消化率比对照组提高 9%, 且差异显著(P<0.05), 在总能表观消化率方面有提高的趋势。 (编辑: 王芳, xfang2005@163.com)

电子天平,德国 Sartorius 公司生产,型号 BA110S;电热恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司生产,型号 DK-S24。

1.5 试验方法

试验预试期 7 d,分别在正式试验期的第 21、42 d 的时候,每组取 5 只处死,每只取血 5 ml,室温静置 1~2 h,然后 3 500~4 000 r/min 低温离心 20 min,取上清液并转入 EP 管内密封,置于-70 °C 低温冰箱内保存,待测。测定动物血清中超氧化物歧化酶(SOD)活力、谷

胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力和一氧化氮自由基(NO)和丙二醛(MDA)含量等各项测试指标均采用南京建成试剂盒进行测试,操作方法严格按照试剂盒说明书进行。

1.6 数据处理

采用 Excel 软件对所测数据进行组间单尾 t 检验,结果均以平均数±标准差表示。

2 结果

2.1 大鼠血清 SOD、GSH-Px 活力(见表 1)

表 1 血清中 SOD 和 GSH-Px 活力(U/ml)

项目	SOD		GSH-Px	
	试验第 21 d	试验第 42 d	试验第 21 d	试验第 42 d
对照组	224.66±8.32 ^{ab}	222.59±10.12 ^a	2 956.88±50.75 ^a	3 525.31±105.29 ^b
试验 A 组	216.57±11.08 ^a	205.33±14.51 ^b	2 800.22±164.42 ^b	3 244.57±214.71 ^a
试验 B 组	235.53±13.81 ^b	234.46±7.52 ^c	3 097.10±204.34 ^a	3 861.72±131.14 ^c
试验 C 组	220.52±16.44 ^{ab}	219.77±8.63 ^a	2 883.45±234.28 ^{ab}	3 540.77±139.58 ^b

注:字母不相同表示差异显著(P<0.05),下同。

从表 1 中可以看出,试验第 21 d 对照组大鼠血清中 SOD 活力和各组相比差异均不显著,其中试验 B 组高于对照组 4.84%(P>0.05),试验 A 组和试验 C 组分别比对照组低 3.61%和 1.84%(P>0.05);试验 A 组比试验 B 组低 8.05%差异显著(P<0.05)。试验第 42 d 大鼠血清中 SOD 活力试验 A 组显著低于其它各组,试验 B 组显著高于其它各组,试验 C 组比对照组略低。

试验第 21 d 对照组和试验 B 组大鼠血清中 GSH-Px 活力显著高于试验 A 组,其中试验 B 组比对照组高 4.76%(P>0.05);试验 C 组比试验 A 组略高。试验第 42 d 试验 B 组大鼠血清中 GSH-Px 活力显著高于其它各组(P<0.05),试验 C 组比试验 A 组高 9.13%,试验 C 组与对照组相当。

2.2 大鼠血清 NO 和 MDA 的含量

表 2 血清中 NO 和 MDA 的含量

项目	NO(μmol/l)		MDA(nmol/l)	
	试验第 21 d	试验第 42 d	试验第 21 d	试验第 42 d
对照组	28.73±5.83 ^a	25.03±6.68 ^a	7.47±1.49 ^{ab}	8.4±0.69 ^a
试验 A 组	30.65±3.56 ^a	31.78±4.46 ^b	8.48±1.51 ^b	11.29±1.76 ^b
试验 B 组	21.53±2.09 ^b	21.25±5.41 ^c	6.12±1.47 ^a	7.19±0.72 ^c
试验 C 组	25.81±6.14 ^{ab}	22.55±7.63 ^c	7.03±1.92 ^{ab}	8.55±1.22 ^a

从表 2 中可以看出,试验第 21 d 大鼠血清中 NO 的含量试验 B 组显著低于对照组和试验 A 组,其中对照组比试验 A 组低 6.26%(P>0.05);试验 C 组比对照组低 10.16%(P>0.05)。试验第 42 d 试验 A 组大鼠

血清中 NO 的含量显著高于其它各组,对照组和试验 C 组分别比试验 B 组高 17.79%(P<0.05)和 6.12%(P>0.05),试验 C 组稍低于对照组(P>0.05)。

试验第 21 d 试验 B 组大鼠血清中 MDA 的含量显著低于试验 A 组,其它各组差异不显著。试验第 42 d 试验 A 组大鼠血清中 MDA 的含量显著高于其它各组,对照组和试验 C 组分别比试验 B 组比高 16.83%(P<0.05)和 18.92%(P<0.05),试验 C 组稍高于对照组(P>0.05)。

3 讨论

3.1 高不饱和脂肪酸日粮对大鼠自由基代谢的影响

不饱和脂肪酸根据双键个数的不同,可分为具有一个双键的单不饱和脂肪酸(Monounsaturated Fatty Acid, MFA)和带有两个和两个以上双键的多不饱和脂肪酸(Polyunsaturated Fatty Acid, PUFA)。单不饱和脂肪酸主要是油酸,多不饱和脂肪酸有亚油酸、共轭亚油酸(CLA)、亚麻酸、花生四烯酸等。葵花籽油中的不饱和脂肪酸含量很高,其中油酸约 65%,亚油酸约 20%。自由基学说认为,自由基产生于细胞和组织的氧化代谢反应过程中,自由基的不可逆累积可导致诸多损害,引发许多病变,其中一个重要危害主要表现在活性氧自由基能攻击生物膜上的多不饱和脂肪酸(PUFA),引发膜脂质过氧化链式反应(chain reaction),导致自由基的扩增和膜脂质过氧化(LPO)加深,过氧化脂质(LPO)经过氧化物酶分解,生成丙二醛(MDA),MDA 与蛋白质、肽类或脂类聚合、交联形成脂褐质,从而引

起膜结构和功能的改变,加剧细胞的损伤。由于多不饱和脂肪酸(PUFA)易于被自由基和别的活性氧种类氧化。因此摄入高的 PUFA 可能会使机体对脂质过氧化反应更加敏感^[1]。

饲喂高脂饲料会引起机体 MDA 含量增加, SOD 酶的活性下降^[2]。本试验通过在日粮中添加 20% 的葵花籽油制造大鼠机体自由基损伤模型,结果显示试验第 21 d 大鼠血清中 SOD 活力高不饱和脂肪酸组比对照组低 3.61% ($P>0.05$), GSH-Px 活力比对照组低 5.30% ($P<0.05$), 且 NO 和 MDA 含量均比对照组提高, 但差异不显著; 试验第 42 d 大鼠血清中 SOD 和 GSH-Px 活力高不饱和脂肪酸组显著低于对照组, NO 和 MDA 含量均比对照组升高, 且差异显著, 表明模型建立成功。认为当长期过多摄入不饱和脂肪酸时, 会引起体内脂质过氧化反应上升和抗氧化酶活性降低, 造成大鼠自由基代谢损伤, 丰富了人们对不饱和脂肪酸的认识。在畜牧业中, 畜禽日粮中添加多不饱和脂肪酸, 要充分考虑到种类和剂量才能取得较好的生产效果和经济效益。

3.2 微生物源性抗氧化剂对大鼠自由基代谢的影响

试验用微生物源性抗氧化剂由光合菌和酵母菌等发酵生产, 含有来源于光合菌、酵母菌及其培养物的胡萝卜素、VB₁、VB₂、VB₁₂、还原型 VC、槲皮酮-3-D 吡喃葡萄糖(栲素)、槲皮酮(类黄酮)、肌醇和多种微量元素的金属衍生物。最新研究结果显示, 类黄酮能清除体内自由基, 具抗脂质过氧化作用^[3-4]。胡萝卜素、VE、VC 等均为抗氧化维生素, 作为脂质过氧化自由基的清除剂, 参与构成体内氧化系统, 保护生物膜上的多不饱和脂肪酸及其它蛋白质巯基免受自由基攻击, 从而维持细胞膜的完整及细胞内巯基化合物的正常功能^[5]。它们的单独使用具有一定的自由基清除作用, 而抗氧化维生素的联用, 显示出协同效果, 即可使其在较小剂量情况下产生较强的清除自由基功能^[6]。

经研究发现, 与对照组相比, 试验 B 组 SOD 和 GSH-Px 酶活力最高, 试验 C 组比试验 A 组有明显的增加, 说明它们清除氧自由基的能力相对较强, 即微生物源性抗氧化剂发挥了它的抗氧化作用。且随着试验时间的延长, 微生物源性抗氧化剂的抗氧化作用逐渐增强, 试验第 42 d, 试验 C 组 SOD 和 GSH-Px 酶活力已经接近对照组的水平, 机体损伤逐渐减轻。

测定 MDA 能够间接地反映机体内氧自由基代谢状况、机体组织细胞受自由基攻击的程度及脂质氧化的程度^[7-8]。本试验中, 试验 B 组 MDA 含量最少, 试

验 C 组 MDA 含量与对照组相当, 说明微生物源性抗氧化剂可以在一定程度上减轻机体的脂质过氧化反应。这与大量文献报道的补充抗氧化营养素后, 脂质过氧化产物 MDA 的含量降低的结果一致^[6,9]。

有研究表明, 给大鼠饲喂高饱和脂肪酸饲料增加了其肝和结肠中 iNOS(一氧化氮合酶) 的活性, 刺激整个机体和骨骼肌线粒体自由基的产生和损害 DNA 的氧化^[10-11]。本研究结果显示, 试验 B 组的 NO 含量分别比相应的对照组低, 试验 C 组比相应的试验 A 组低。随着试验时间的推移, 差异显著。提示微生物源性抗氧化剂对高不饱和脂肪酸致大鼠组织的氧化损伤具有明显的拮抗作用。由此可推测其可能通过抑制自由基形成和脂质过氧化作用来修复其损伤。微生物源性抗氧化剂作为复合自由基清除剂, 可在一定程度上提高动物的抗氧化能力, 从而增强其生产性能。

参考文献

- [1] 陶新, 许梓荣, 汪以真. 营养物质对生物自由基产生及清除影响的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2005, 41(10): 61-64
- [2] 成龙, 梁日欣, 杨滨, 等. 红花提取物对高脂血症大鼠降脂和抗氧化的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(9): 25-27
- [3] 鲁文胜. 超氧化物歧化酶的测定方法及其在应用[J]. 六安师专学报, 1999(15): 62-65.
- [4] Esterbauer H J, Gebicki H P. The Role of Lipid Peroxidation and Antioxidants on Oxidative Modification of LDL[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1992, 13: 341-390.
- [5] Mates J M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology [J]. Toxicology, 2000, 153(13): 83-104.
- [6] Zahl P A, Bjerknes C. Induction of decidual-placental hemorrhage in mice by the endotoxins of certain gram negative bacteria[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1943, 54: 329-332.
- [7] 薛丽英, 李杰, 王更新, 等. 脂多糖诱导的非特异性炎症对大鼠睾丸功能的影响[J]. 生殖与避孕, 2006, 26(2): 77-80.
- [8] Cai X Q, Marik J J. Improving penetrating capacity of spermatozoa with poor motility of caffeine at coinubation with zona-free hamster ova[J]. Fertil Steril., 1989, 51: 719-721.
- [9] Rieder R T, Thomas L. Studies of the mechanism involved in the production of abortion by endotoxin[J]. Immunol., 1960, 84: 189-193.
- [10] Wan G H, Ohnmi S, Kato N. Increased hepatic activity of inducible nitric oxide synthase in rats fed on a highfat diet[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2000, 64: 555-561
- [11] Haeghele A D, Briggs S P, Thompson H J. Antioxidant status and dietary lipid unsaturation modulate oxidative DNA damage [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1994, 16: 111-115.

(编辑: 沈桂宇, guiyush@126.com)