

文章编号: 1674-5566(2009)02-0142-08

DHA对鲤抗氧化能力影响的初步研究

吉红^{1,2}, 周继术^{1,2}, 曹福余¹, 何小燕¹, 曹艳姿¹, 王建华³

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

(2. 西北农林科技大学水产科学研究所, 陕西 杨凌 712100)

(3. 西北农林科技大学动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 观察二十六碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA)对鲤抗氧化能力的影响。设计 DHA灌喂(短期)、DHA饲养(长期)和 DHA直接处理鲤肝细胞(离体)等 3 个试验, 分别对鲤肝细胞或肝脏的总抗(T-AOC)水平、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、过氧化氢酶(CAT)活性以及丙二醛(MDA)含量指标进行了测定。结果表明: (1) DHA组鲤肝胰脏 T-AOC水平在灌喂后的各时间点上均高于对照组, 且在 32 h时达到显著水平 ($P < 0.05$)。 (2) 两个油脂水平下, DHA组鲤肝胰脏 T-AOC水平、CAT、SOD活性及 MDA含量与对照组间差异均不显著 ($P > 0.05$); 血清 T-AOC水平、SOD活性 DHA组与对照组间差异也不显著 ($P > 0.05$); 12%油脂水平下 DHA组 GST活性显著低于对照组 ($P < 0.05$), 但 6%油脂水平下 GST活性在两组间差异不显著 ($P > 0.05$)。 (3) DHA组鲤肝细胞在处理 0.5 h、1 h时, MDA含量与对照差异不显著 ($P > 0.05$), 而在处理后 2 h、4 h、8 h DHA组 MDA含量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且在 4 h、8 h时达极显著水平 ($P < 0.01$); DHA组 T-SOD活性在处理 4 h时显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而在其它时间点上 DHA组与对照组间差异均不显著 ($P > 0.05$)。结果提示, DHA直接或短期作用下, 鲤肝胰脏或肝细胞处于氧化应激状态, 其抗氧化能力诱导性升高; 而 DHA长期饲喂后, 在正常油脂水平下机体表现出对 DHA造成的氧化应激的适应, 高油脂水平下 DHA的添加则可能通过加剧机体氧化应激状态, 造成抗氧化能力的下降。另外, 所采用的短期灌喂肝、细胞离体培养以及长期饲养相结合的研究手段可用于外源性物质对鱼类生理活性的评定。

关键词: 二十六碳六烯酸; 抗氧化能力; 鲤

中图分类号: S963.1 文献标识码: A

Effect of DHA on anti-oxidation capacity in common carp (Cyprinus carpio L.)

Ji Hong², Zhou Jishu², Cao Fuyi¹, He Xiaoyan¹, Cao Yanzhi¹, Wang Jianhua³

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

(2. Fisheries Research Institute, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

(3. College of Veterinary, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the effect of DHA (docosahexaenoic acid) on anti-oxidation capacity in common carp. Three experiments including DHA oral administration experiment, DHA feeding experiment (long term) and the incubated hepatocyte treated with DHA experiment (in vitro) were

收稿日期: 2008-09-10

基金项目: 国家自然科学基金 (30771667); 西北农林科技大学博士科研启动专项 (05-08080110); 西北农林科技大学青年学术骨干支持计划

作者简介: 吉红 (1967-), 男, 河南灵宝人, 副教授, 博士, 主要从事水产经济动物营养与水生生物技术研究。E-mail: jihong405@hotmail.com; jihong@nwsuaf.edu.cn

performed Antioxidation capacity (T-AOC), total superoxide dismutase (T-SOD), glutathione S transferase (GST), catalase (CAT) and maleic dialdehyde (MDA) were determined in the three experiments. The results showed (1) T-AOC in DHA group was significantly higher than that in control group at 32 h after DHA administration ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the two groups at 0 h, 2 h, 4 h, 8 h and 16 h ($P > 0.05$). (2) Under the same dietary lipid level, the MDA content, CAT, SOD activity, T-AOC level of hepatopancreas and serum SOD activity as well as T-AOC level in DHA group were not significantly different from those in the control group, the serum GST activity in DHA group was significantly different from that in control group under 12% dietary lipid level ($P < 0.05$), but no significant between the two groups under 6% lipid level. (3) In vitro experiment, there was no significant difference in MDA content between the DHA group and control group when the hepatocytes were treated with DHA for 0.5 h, 1.0 h, but at 2.0 h, 4.0 h and 8.0 h, the MDA content in the DHA group was significantly higher than that in the control group (from $P < 0.05$ to $P < 0.01$); the T-SOD activity was significantly higher in the DHA group than that in the control group when the hepatocytes were treated for 4 h. But at other times, there was no significant difference between the two groups ($P > 0.05$). These results suggest that treated with DHA for a short time, the hepatopancreas or hepatocyte of common carp are under oxidative stress and the antioxidant capacity is induced. On the other hand, the body was acclimatized to the oxidative stress caused by the DHA in a long term feeding under 6% dietary lipid level, but the antioxidant capacity was decreased significantly under 12% dietary lipid level. In addition, this protocol including oral administration, long term feeding and in vitro cell incubation could be applied in evaluating the effect of exogenous substance on physiological activity of fish.

Key words: docosahexaenoic acid; antioxidant capacity; *Cyprinus carpio*

抗氧化系统存在于所有需氧生物体内,其功能是清除物质代谢过程中产生的活性中间产物,尤其是清除氧自由基,以防止自由基攻击造成的细胞及分子氧化损伤。该抗氧化系统包括起催化反应的抗氧化酶,如超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)等^[1];小分子的抗氧化剂^[2],如维生素 E、维生素 C、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)等。而一些因子如微囊藻毒素^[3]、中药^[4]、喹乙醇^[5]、食物脂肪含量^[6]、锌^[7]以及脂肪酸^[8]等均可影响机体抗氧化机制的发挥。DHA (docosahexaenoic acid)是 n-3 系列高不饱和脂肪酸 (highly unsaturated fatty acids, HUFA)之一,对细胞膜的结构完整及其功能发挥具有重要意义。一般认为, DHA 的高不饱和性使其易受氧或其它自由基的攻击,从而产生对机体有害的过氧化产物,继而损害机体抗氧化能力^[9-13],但另有研究发现 DHA 能够增强抗氧化酶活性及促进自由基清除^[14-20]。因此, DHA 与机体抗氧化能力关系尚不明确。

DHA 对鱼类影响的研究主要集中于其对海水鱼生长及其脂质代谢的影响方面^[21-23],与抗氧化系统关系的研究则仅见于大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[12]。由于 DHA 不是淡水鱼类必需脂肪酸, DHA 对淡水鱼类影响的报道较为缺乏。尽管已有研究者关注 HUFA 尤其是 DHA 对淡水鱼脂质代谢的影响^[24],但 DHA 与淡水鱼类抗氧化能力关系的研究尚未见报道。为此,本研究以鲤为实验动物,设计了 DHA 灌喂(短期)、DHA 饲养(长期)和 DHA 直接处理鲤肝细胞(离体)等 3 个试验探讨 DHA 对鲤抗氧化能力的影响及其可能的影响机制,为完善自由基生物学及脂质营养理论以及淡水鱼类品质调控和健康养殖提供基础资料,同时为进一步的研究进行方法上的探索。

1 材料与方 法

1.1 试验设计

为研究 DHA 对鲤抗氧化能力的影响,分别以总抗 (total antioxidant capacity, T-AOC)、SOD、谷胱甘肽 S 转移酶 (glutathione S transferase, GST)、CAT 活性和丙二醛 (maleic dialdehyde, MDA) 含量为抗氧

化能力及自由基清除能力的指标,进行了3个试验,试验一: DHA制品灌喂试验,将 DHA制品用阿拉伯树胶乳化后对鲤进行灌喂,探讨短时间内 DHA对鲤抗氧化能力的影响;试验二: DHA制品饲养试验,将 DHA作为饲料因子添加入纯化饲料饲养鲤,探讨长期饲喂后 DHA对鲤抗氧化能力的影响;试验三: DHA直接处理鲤肝细胞的试验,用 DHA制品直接处理体外培养的鲤肝细胞,在不同时间段检测抗氧化指标的变化,探讨 DHA对鲤肝细胞抗氧化能力的直接影响。

1.2 DHA制品灌喂试验

1.2.1 试验材料及灌喂方法

DHA制品,经过气相色谱检测并按峰面积归一化法对各脂肪酸含量进行计算,测得其主要脂肪酸 C16:0、C20:0、C18:1n-9、C18:2n-6、C20:4n-6、C18:3n-3、C20:5n-3以及 C22:6n-3的含量(%)分别为 1.19、3.60、2.29、0.24、3.12、0.11、9.77和 48.12(注: DHA含量近 50%)。

试验用鲤禁食两天后,将个体健康鲤(25.0 ± 0.5 g)随机分为两组,一组灌喂含有 DHA的 5%阿拉伯树胶溶液^[25],灌喂 DHA剂量为 750 (mg/kg鱼体重)(参照 J等^[21]的添加量换算而成),另一组则仅灌喂该树胶溶液。灌喂方法参照罗莉等^[26]。

1.2.2 样品采集及抗氧化指标测定

一次灌喂后于 0、2、4、8、16、32 h取样,剖取试验鲤肝胰脏并用液氮迅速冻存,参照南京建成生物工程研究所试剂盒方法测其 T-AOC。

1.3 DHA制品饲养试验

1.3.1 试验饲料

采用 Love^[27]温鱼类纯化饲料配方进行基础饲料的配制。在 6%与 12%油脂水平下,以 DHA制品分别替代 3%的大豆油脂,制成四种试验饲料,饲料配方及营养成分见表 1。矿物质添加剂和微量元素添加剂均参照 Love^[27]。

表 1 半纯化试验饲料配方及常规成分

Tab 1 Formulation (g/100 g) and proximate composition of semi-purified diets with DHA and None DHA %

配方组成	6%油脂组		12%油脂组	
	None DHA	1.5% DHA	None DHA	1.5% DHA
酪蛋白	32	32	32	32
明胶	8	8	8	8
纤维素	19	19	19	19
羧甲基纤维素	2	2	2	2
混合无机盐	4	4	4	4
混合维生素	1	1	1	1
糊精	28	28	22	22
大豆油	6	3	12	9
DHA制品*	0	3	0	3
概略组分 (g/100 g)				
水分	9.68	9.70	9.29	9.62
粗脂肪	6.98	6.83	12.00	10.66
粗蛋白	32.18	32.18	32.41	32.45
粗灰分	4.96	5.05	5.00	4.42

注: *表示以饲料中 DHA实际含量 1.5%^[21]计算,由于 DHA制品中 DHA实验含量约 50%,因此 DHA制品在饲料中按 3%进行添加

1.3.2 试验鲤和饲养试验

试验鲤[(14.81 ± 0.13) g]购自陕西省周至县某渔场,体质健康。每个饲料组设 3个重复,每个重复 30尾,室内循环流水系统(每箱 200 L)中进行饲养,水源为曝气去氯自来水,沙石沉淀过滤。1周驯养期后称重并随机分组。日投饲率 3.5%,同时结合每日天气及摄食情况进行适当调整,确保饲料被试验鱼充分足量摄取。投饲时间为每天 8:30、11:30、14:30、17:30。饲养中期称重一次以调整投饲量。

饲养期间平均水温 27 ℃,溶氧 ≥ 6 mg/L, pH 7.5~8.0, 饲养期为 74 d

1.3.3 样品收集及抗氧化指标测定

饲养试验结束后,每箱随机选取 9尾鲤进行尾柄静脉采血,血浆 4 ℃静置 2 h后 3 000 r/min离心 10 min,制备血清。剖取鲤肝胰脏(采过血的鲤除外)。将血清与肝胰脏样品 -80 ℃保存备用。血清及肝胰脏 T-AOC、SOD、GST、CAT酶活性及 MDA含量采用南京建成生物工程研究所试剂盒方法进行测定。

1.4 DHA对体外培养鲤肝细胞抗氧化能力的影响

1.4.1 DHA培养基的制备

根据 DHA制品中 DHA的含量,用无水乙醇将 DHA制品配制成 DHA浓度为 0.152 mol/L的贮备液,将该贮备液稀释于无脂肪酸无血清的 2%牛血清白蛋白(BSA)的 DMEM培养液中,使该培养液中 DHA浓度为 160 μ mol/L(参照李惠侠等^[28])并将其用作 DHA组肝细胞培养液。对照组所用肝细胞培养液为等浓度乙醇和 BSA含量的 DMEM培养液。

1.4.2 鲤肝细胞获取及培养

将体重 1 kg左右的市售健康成鲤暂养 2 h后,重物击打鱼头使其昏厥,无菌条件下剖取鲤肝胰脏组织, D-Hank缓冲液清洗 3次后剪碎成 1~2 mm³小块,用 D-Hank缓冲液再清洗 2次,用 2倍(V/V)的 0.25%胰蛋白酶液 20 ℃恒温摇床中消化 50 min后,100目筛网过滤以除去碎块,滤液 1 000 r/min离心 8 min,获取肝细胞。D-Hank液清洗 2次,加入红细胞裂解液 1 mL,1 000 r/min离心 5 min,弃上清后分别用两种培养液等浓度,使肝细胞达到 0.15~0.2 $\times 10^6$ cells/mL时即将细胞于 6孔培养板中培养。培养温度 28 ℃,培养期间不补充 CO₂。

1.4.3 样品测定

于培养后 0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 h分别取培养物,将其 1 000 r/min离心 8 min,获取肝细胞,加入 2 ml生理盐水后用玻璃匀浆器匀浆,3 000 r/min离心 10 min,取上清液。上清液中 T-SOD、MDA含量均采用南京建成生物工程研究所试剂盒方法进行测定。每个处理 3个重复。

1.5 数据分析

试验结果以平均数 \pm 标准差($m\pm SD$)表示,采用 t检验进行差异显著性分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 灌喂条件下 DHA对鲤肝胰脏 T-AOC的影响

灌喂后 DHA对鲤肝胰脏 T-AOC的影响见图 1。由图 1可以看出,DHA组与对照组肝胰脏 T-AOC均在 4 h时达到最高值,4 h之前或超过 4 h时则降低,但在 32 h时 DHA组有所增高。在各时间点上 DHA组肝胰脏 T-AOC均高于对照组,且在 32 h时差异显著($P<0.05$)。

2.2 饲养条件下 DHA对鲤抗氧化能力的影响

饲养后 DHA对鲤抗氧化能力的影响见表 2。

由表 2可以看出,6%与 12%油脂水平下,DHA组肝胰脏 SOD酶活性低于对照组,而 CAT与 T-AOC活性高于对照组,同时 DHA组 MDA含量高于对照组,但差异均不显著($P>0.05$)。从血清的相关指标情况看,6%及 12%油脂水平下,DHA组鲤血清 SOD酶活性高于对照组,而 DHA组血清 T-AOC活性低于

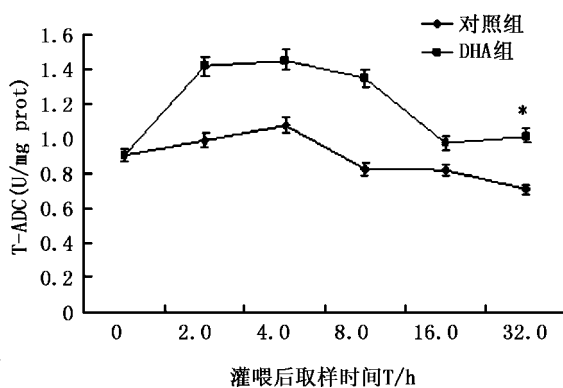


图 1 DHA灌喂对鲤肝胰脏 T-AOC的影响

Fig. 1 Effect of orally administered DHA on hepatopancreas T-AOC level in common carp

注: *表示与对照组有显著差异($P<0.05$)

对照组,但差异均不显著 ($P>0.05$);而同一油脂水平下两组间 T-AOC与 SOD酶活性在血清中的变化趋势与肝胰脏中相反。从 GST变化来看, DHA组鲤血清 GST活性均低于对照组,尽管在 6%油脂水平下未有显著性差异,但在 12%油脂水平下组间差异达到显著水平 ($P<0.05$)。

表 2 DHA对鲤肝胰脏 MDA含量, SOD, GST, CAT, T-AOC酶活性及血清酶活性的影响
Tab 2 Effect of DHA on MDA content and the activity of SOD, GST, CAT, T-AOC in hepatopancreas and serum of *Cyprinus carpio*

	6%油脂组		12%油脂组	
	none DHA	1.5% DHA	none DHA	1.5% DHA
肝胰脏				
T-AOC (U/mg prot)	2.36±0.55	2.69±0.44	2.59±1.15	4.19±2.67
T-SOD (U/mg prot)	47.91±12.03	43.93±5.92	50.51±9.24	44.91±12.82
CAT (U/mg prot)	59.59±10.91	63.38±27.76	65.18±16.25	83.46±17.11
MDA (nmol/mg prot)	2.15±0.29	2.31±0.98	1.88±1.12	2.52±0.61
血清				
T-AOC (U/mL)	9.95±1.91	7.22±1.66	8.67±5.01	7.49±4.84
T-SOD (U/mL)	132.95±17.05	146.93±32.20	159.48±62.03	223.46±74.24
GST (U/mL)	16.34±3.60	15.70±3.16	20.03±1.81	15.82±1.69*

注: *表示分别在 6%与 12%油脂添加水平下 DHA添加组与对照组差异显著 ($P<0.05$)

2.3 DHA对体外培养鲤肝细胞抗氧化能力的影响

DHA对体外培养鲤肝细胞 MDA的影响见图 2。由图 2看出,在用 DHA处理肝细胞的 0.5 h内, DHA组 MDA含量高于对照组, 1 h时, DHA组 MDA含量下降,而对照组继续升高,但各时间点上两组间差异均不显著 ($P>0.05$); 2 h, 4 h, 8 h时间点上, DHA组 MDA含量显著高于对照组 ($P<0.05$),而且在最后两时间点上达到极显著 ($P<0.01$),显示出随培养时间的延长, DHA诱使脂质过氧化作用增强。

DHA对体外培养鲤肝细胞 T-SOD的影响见图 3。由图 3可以看出, 0.5~2 h内 DHA添加后 T-SOD活性低于对照组,但无显著差异 ($P>0.05$), 4 h时在对照组 T-SOD活性持续下降的情况下 DHA组 T-SOD活性上升并显著高于对照组 ($P<0.05$),达到实验时间内 DHA组 T-SOD活性的最高值;随后肝细胞培养 8 h时两组 T-SOD活性均降低, DHA组仍高于对照组,但无显著差异 ($P>0.05$)。

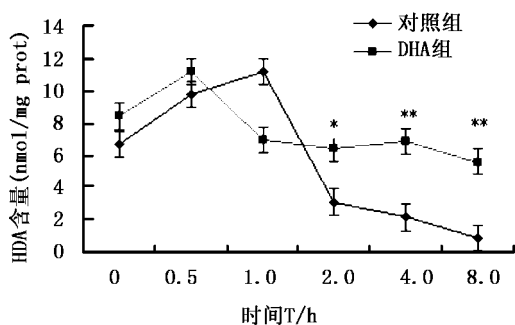


图 2 DHA对体外培养鲤肝细胞 MDA含量的影响
Fig 2 Effect of DHA on MDA content of hepatocytes in common carp in vitro

注: *表示与对照组有显著差异 ($P<0.05$), **表示差异极显著 ($P<0.01$)

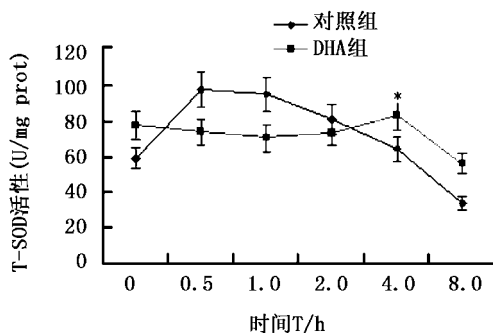


图 3 DHA对体外培养鲤肝细胞 T-SOD活性的影响
Fig 3 Effect of DHA on T-SOD activity of hepatocytes in common carp in vitro

注: *表示与对照组有显著差异 ($P<0.05$)

3 讨论

3.1 短期灌喂、长期饲喂及体外细胞培养条件下 DHA对鲤抗氧化能力的影响

T-AOC是机体内抗氧化能力的总体体现^[29],是酶促 (SOD, CAT, GST, GSH-P_x等)和非酶促 (维生

素、氨基酸和金属蛋白等)两方面因子抗氧化能力的总合。SOD对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,它能清除超氧阴离子自由基(O_2^-),保护细胞免受损伤^[30];CAT在机体内催化 H_2O_2 分解形成氧和水,从而阻断可产生活性极高的羟自由基($\cdot OH$)反应,是消除 H_2O_2 对细胞毒性作用的酶^[31]。GST是生物机体内重要的代谢酶之一,该酶存在于生物机体的各种组织中,具有消除体内自由基和解毒的双重功能^[32]。正常情况下,细胞内SOD、CAT和GST等抗氧化酶联合作用以清除活性氧自由基,它们的酶活力大小可反映生物机体抗氧化能力的高低。MDA则是脂质过氧化反应的主要代谢产物,是研究脂质过氧化作用的重要生物标志物^[33]。

DHA对动物机体抗氧化能力影响的机制尚无定论。于得庆等^[17]发现长期耐力训练可使小鼠的肝脏、心肌、骨骼肌组织中SOD活性和GPX活性升高,DHA对此过程有明显的促进作用。该作者认为这可能是机体为了减轻自由基的损伤而产生的一种适应性调节。张旭辉等^[8]则指出同为多不饱和脂肪酸的共轭亚油酸可能通过作为抗氧化剂或氧化强化剂起作用。

本研究中,DHA灌喂后32 h鲤肝胰脏T-AOC水平显著升高。DHA促进T-AOC增高可能有两方面的机制,一是DHA作为一种造成氧化应激的因子,因其高不饱和性而被迅速氧化^[9-13],使得机体适应性地提高了抗氧化能力以对抗氧化产物的危害,这是一种应激性(或反馈性)机制;另一个机制则可能是DHA特有的生理作用而直接提高了机体抗氧化系统组成因子的活力^[18]。因此本试验中T-AOC的增高可能是生物体克服不良环境和防止中毒的一种适应性改变^[34],进而表现出“抑制—诱导—抑制”的规律变化^[35],也可能是由于DHA作为PUFA的一员激活多个代谢机制以影响肝抗氧化酶基因转录^[36],进而提高抗氧化酶活性和机体抗氧化能力。Um inc等^[37]发现DHA饲喂后对鲫肝GST基因表达增强的结果即属于后者。

抗氧化防御是肝脏特有性质^[16]。研究表明,鼠肝抗氧化防御系统中Cu/Zn-SOD、CAT、GSH-PX等酶活性均受营养因子的调控^[38],同时有报道指出富含n-3脂肪酸的鱼油饲喂鼠12周后鼠(肝)抗氧化防御系统得以增强^[16],但本研究的饲喂试验发现,DHA对鲤肝胰脏SOD、CAT等酶活性及T-AOC、MDA含量及鲤血清T-AOC、SOD均无明显影响,这可能表明与鲤机体对DHA长期饲喂所带来的氧化应激的适应有关。另外DHA添加与否条件下,同一抗氧化指标如T-AOC在血清和肝胰脏中的变化不一致,或同一组织中如肝胰脏的几个抗氧化指标变化也不一致,也一定程度反应出机体对DHA氧化应激的一种适应性状态。

体外实验发现,DHA处理2 h后鲤肝细胞MDA含量显著增加,表现出外源DHA对肝细胞脂质过氧化的诱导作用,而4 h时DHA组T-SOD显著增高,表明肝细胞抗氧化初级防御系统迅速做出了反应。因此可以认为在DHA直接作用下鲤肝细胞处于氧化应激状态,从而促使其抗氧化能力的提高。结合灌喂及饲养试验结果可以初步认为,DHA短期灌喂(32 h)使机体或肝胰脏处于氧化应激状态,在氧应激与大量自由基的诱导下T-AOC增高以清除过多自由基,而在长期饲喂情况下,机体尤其是肝胰脏抗氧化系统对外源DHA表现出一定程度的适应。

3.2 油脂水平对鲤抗氧化能力的影响

研究发现6%油脂水平下DHA组血清GST活性与对照组差异不显著,而在12%油脂水平下DHA组血清GST活性显著低于对照组($P < 0.05$)。抗氧化酶活性的减弱反映了生物体对氧化应激因子十分敏感并可能受到进一步损伤^[32]。已有研究指出,在油脂水平较高的情况下,鱼体摄入PUFA越多,摄入的维生素E等抗氧化物质不能相应增高,极易造成机体的氧化损伤^[12]。本试验中使用多不饱和脂肪酸含量比较高的豆油作为基础油脂,12%油脂水平下,DHA的添加抑制了抗氧化酶的活性,表明DHA在高油脂水平下可能不具备直接提高鱼体抗氧化能力的功能,或者目前的使用剂量不能使其发挥相关作用,甚至由于其高不饱和性,与豆油中的多不饱和脂肪酸共同造成氧化应激状况的加剧,在试验鱼机体抗氧化方面起到相反的作用。DHA的添加与饲料脂肪水平的提高对机体抗氧化能力的负面影响尚需进一步研究。

综上所述,可以认为,DHA造成鲤机体抗氧化系统状况的改变与DHA作为氧化应激因子作用的时间

间和强度有关,同时还可能与其直接促使抗氧化酶基因表达乃至蛋白合成,从而发挥抗氧化作用有关。相关研究还需要进一步进行。

3.3 关于试验方法的选择

为研究 DHA对鲤抗氧化能力的影响,在利用纯化饲料进行传统的营养生理学研究的基础上,本论文还采用了在体短期灌喂及离体细胞处理等方法。灌喂方法因其简便易行,在鼠及水产动物的相关研究中已被较多采用^[25-26,39-40]。另外有学者分别采用细胞培养法研究了 DHA乙酯对体外培养人类巨噬细胞 NO生成的抑制作用^[20]和微囊藻素对鲤肝细胞的毒性^[3],本论文则采用此法研究了 DHA对体外培养肝细胞抗氧化能力影响。

本研究从短期与长期、体外等不同角度、不同层面入手,得出了 DHA对鲤抗氧化能力影响的初步结论,并探讨了研究 DHA对鲤抗氧化能力影响的方法体系。今后将采用分子生物学手段,从 DHA对淡水鱼类抗氧化酶基因表达的影响等方面进行更深入的研究。

4 结论

DHA直接或短期作用下,鲤肝胰脏或肝细胞处于氧化应激状态,诱使其抗氧化能力得以提高;而 DHA长期饲喂后,在正常油脂水平下机体表现出对 DHA造成的氧化应激的适应,较高油脂水平下 DHA的添加则可能通过加剧机体氧化应激状态,造成了抗氧化能力的下降。另外,本研究所采用的短期灌喂、长期饲养以及肝细胞离体培养相结合的研究手段可用于外源性物质对鱼类生理活性的评定。

陕西省饲料厂朱天和在鱼种供给方面给予了大力协助,本实验室硕士研究生单世涛、苏尚顺、本科生李尚学等同学参加了本实验的部分工作,一并致谢!

参考文献:

- [1] Singh R, Pathak D N. Lipid Peroxidation and glutathione Peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase, catalase, and glucose-6-Phosphate dehydrogenase activities in FeCl₃-induced epileptogenic foci in the rat brain [J]. *Epilepsia*, 1990, 31: 15-26.
- [2] Chevion S, Berry EM, Kiuosskiy N, et al. Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1997, 22: 411-421.
- [3] 李效宇,刘永定,宋立荣,等. 鲤肝细胞抗氧化系统对微囊藻毒素毒性的反应 [J]. *水生生物学报*, 2003, 27(5): 472-475.
- [4] 梅景良,黄一帆. 中药保肝解毒汤对欧鳗 (*Anguilla anguilla*) 实验性肝病保护作用的酶学机理研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(12): 1353-1359.
- [5] 高洪,浦雪艳,彭轲,等. 鸡喹乙醇中毒对血中自由基水平及抗氧化系统的影响 [J]. *云南农业大学学报*, 2007, 22(3): 396-400.
- [6] 汤宁. 食物脂肪对大鼠脑、肝、肾组织中脂质过氧化作用的影响 [J]. *环境与健康杂志*, 2005, 22(1): 23-25.
- [7] Powell SR. The antioxidant properties of zinc [J]. *The Journal of Nutrition*, 2000, 130(5 S): 1447-1454.
- [8] 张旭晖,王宝维,王雷,等. 共轭亚油酸对鹅抗氧化功能与脂质过氧化的影响 [J]. *动物营养学报*, 2007, 19(3): 299-304.
- [9] Song J H, Fujimoto K, Miyazawa T. Polyunsaturated (n₃) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid containing oil [J]. *The Journal of Nutrition*, 2000, 130: 3028-3033.
- [10] Song J H, Miyazawa T. Enhanced level of n₃ fatty acid in membrane phospholipids induces lipid peroxidation in rats fed docosahexaenoic acid oil [J]. *Atherosclerosis*, 2001, 155: 9-18.
- [11] Ibrahim W, Lee U S, Yeh C C, et al. Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: Effects of dietary lipid, Vitamin E and iron [J]. *The Journal of Nutrition*, 1997, 127: 1401-1406.
- [12] Se Phan G, Guillaume J, Lamour F. Lipid Peroxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) tissue: effect of dietary vitamin E and dietary n₆ or n₃ polyunsaturated fatty acids [J]. *Aquaculture*, 1995, 130: 251-268.
- [13] Seiji S, Kazuhiro K, Takahiro T, et al. Dietary docosahexaenoic acid-induced generation of live lipid peroxides is not suppressed further by elevated levels of glutathione in ODS rats [J]. *Nutrition*, 2006, 22: 385-394.
- [14] Jhangiri A, Leifert W R, Kind K L, et al. Dietary fish oil alters calciumocyte Ca²⁺ dynamics and antioxidant status [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2006, 40: 1592-1602.

- [15] Bechoua S, Dubois M, Dominguez Z, et al. Protective effect of docosahexaenoic acid against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human lymphocytes [J. Biochemical Pharmacology, 1999, 57: 1021—1030.
- [16] Ruiz Gutierrez V, Camen M, Vázquez C, Consuejo Sanja María. Liver lipid composition and antioxidant enzyme activities of spontaneously hypertensive rats after injection of dietary fat (Fish Olive and High-oleic sunflower oils) [J. Bioscience Reports, 2001, 21(3): 271—285.
- [17] 于得庆, 焦玲霞, 张雪红, 等. DHA、EPA对耐力训练小鼠抗氧化能力影响的实验研究[J. 河北工业科技, 2005, 22(2): 64—73.
- [18] Frenoux J R, Prost E D, Belleville J L. A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improve antioxidant status in spontaneously hypertensive rats [J. The Journal of Nutrition, 2001, 131: 39—45.
- [19] Green P, Gbjornan S, Weiner L, et al. Enhanced free radical scavenging and decrease lipid peroxidation in the rat fetal brain after treatment with ethyl docosahexaenoate [J. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1532: 203—212.
- [20] Jayarajah D R, Kiejar M, Penfield J, et al. Docosahexaenoic acid—a component of fish oil—inhibits nitric oxide production in vitro [J. Journal of Surgical Research, 1999, 83: 147—150.
- [21] Ji H, Om A D, Yoshimatsu T, et al. Effect of dietary docosahexaenoic acid on lipogenesis and lipolysis in black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii* [J. Acta Oceanologica Sinica, 2007, 26(1): 112—121.
- [22] Om A D, Umino T, Nakagawa H, et al. The effects of dietary EPA and DHA fortification on lipolysis activity and physiological function in juvenile black sea bream *Acanthopagrus schlegelii* (Bleeker) [J. Aquaculture Research, 2001, 32(suppl 1): 255—262.
- [23] Om A D, Ji H, Umino T, et al. Dietary effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on lipid metabolism in black sea bream [J. Fisheries Science, 2003, 69: 1182—1193.
- [24] 曹俊明, 田丽霞, 陈 竹, 等. 饲料中不同脂肪酸对草鱼生长和组织营养成分组成的影响[J. 华南理工大学学报(自然科学版), 1996, 12(Supp): 149—154.
- [25] Ganah S, Hashimom M, Hossain S, et al. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves the performance of radial arm maze task in aged rats [J. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2001, 28(4): 266—270.
- [26] 罗 莉, 叶元土, 林仕梅. 灌喂必需氨基酸模式溶液对草鱼全鱼和肌肉、肝胰脏蛋白质合成代谢的影响[J. 水产学报, 2002, 26(1): 73—78.
- [27] Lovell T. Nutrition and Feeding of Fish [M]. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989.
- [28] 李惠侠, 杨公社. 二十二碳六烯酸对大鼠脂肪细胞增殖分化的影响[J. 生物工程学报, 2005, 21(5): 840—843.
- [29] 段丽菊, 王晓平, 严 彦, 等. NO在甲醛介导的氧化损伤中的协同作用[J. 环境科学, 2006, 26(3): 505—508.
- [30] Mourlen G, Bell J G, Tocher D R. Does dietary tocopherol level affect fatty acid metabolism in fish? [J. Fish Physiol Biochem, 2007, 33: 269—280.
- [31] Oost R V, Beyler J, Vermeulen N P E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review [J. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2003, 13(2): 57—149.
- [32] 瞿建宏, 陈家长, 胡庚东, 等. 苯酚胁迫下罗非鱼组织中过氧化氢酶与谷胱甘肽-S-转移酶的动态变化[J. 生态环境, 2006, 15(4): 687—692.
- [33] Janero D R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury [J. Free Radical Biology Medicine, 1990, 9: 515—540.
- [34] 李 康, 周忠良, 王明山, 等. 苯并(a)芘对鲫鱼 (*Carassius auratus*) 肝脏抗氧化酶的影响[J. 应用与环境学报, 2003, 10(1): 88—91.
- [35] 吕景才, 赵元凤, 吴益春, 等. 海水中铜在扇贝组织的蓄积及其对酶活性的影响[J. 农业工程学报, 2005, 21(5): 131—135.
- [36] Jun P D B, Thelen A, Mater M. Dietary polyunsaturated fatty acids and hepatic gene expression [J. Lipids, 1999, 34(Supp): 209—212.
- [37] Umino T, Koizumi N, Ji H, et al. Gene expression profile in hepatopancreas of clonal crucian carp fed with DHA-supplemented diet [C] // 11th International Symposium on Nutrition and Feeding in Fish, 2004.
- [38] Huang C Y, Chen L H, Osio Y, et al. Effects of diet composition on liver antioxidant defence and detoxification enzymes in mice with murine AIDS [J. Nutrition Research, 1994, 14: 1841—1851.
- [39] Anebum LM, Boswell K K, Koske E K. A combined subchronic (90-day) toxicity and neurotoxicity study of a single cell source of docosahexaenoic acid triglyceride [J. Food and Chemical Toxicology, 2000, 38(1): 35—49.
- [40] 龙 勇, 罗 莉, 幺相姝, 等. 灌喂牛磺酸对草鱼消化酶活性的影响[J. 西南农业大学学报(自然科学版), 2004, 26(5): 650—653.