

文章编号: 1000-0615(2004)03-0231-05

喹乙醇对鲤肝胰脏抗氧化酶系统的影响

叶继丹¹, 韩友文², 赵吉伟¹, 卢彤岩¹, 刘红柏¹, 杨雨辉¹

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:用含不同剂量喹乙醇(0~3200mg·kg⁻¹)的饲料饲喂鲤,分别对鲤在摄食3、6、9和12周时肝胰脏中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)等抗氧化酶活性、脂质过氧化物丙二醛(MDA)含量及总抗氧化能力(T-AOC)进行了测定。结果表明,SOD活性随饲料喹乙醇剂量的升高总体上呈升高的趋势,试验时间对各个处理组的SOD酶活性影响不大。饲料中喹乙醇对GSH-px活性的影响较小,其剂量达1600mg·kg⁻¹以上时GSH-px酶活性变化明显,主要表现为诱导效应。饲料中喹乙醇剂量的改变大体上不对MDA含量产生影响,且随着时间的延长,除3200mg·kg⁻¹组外,其余各实验组的MDA含量都有所降低。随喹乙醇剂量的增加和实验时间的延长,T-AOC均呈现降低的趋势,其中以1600和3200mg·kg⁻¹组的下降幅度最大。结果提示,高剂量下喹乙醇对抗氧化酶活性影响较大,并伴随着机体抗氧化能力的减弱。

关键词:鲤; 喹乙醇; 肝胰脏; 抗氧化酶系统; 脂质过氧化物; 总抗氧化能力

中图分类号: S948 文献标识码: A

Effects of dietary olaquinox on antioxidant enzymes system in hepatopancreas of *Cyprinus carpio*

YE Ji-dan¹, HAN You-wen², ZHAO Ji-wei¹, LU Tong-yan¹,

LIU Hong-bai¹, YANG Yu-hui¹

(1. Heilongjiang Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Harbin 150070, China;

2. Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

Abstract: Mirror carp *Cyprinus carpio* were fed diets containing different concentrations of olaquinox (0–3200 mg·kg⁻¹) for 12 weeks. Activities of two antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-px), levels of malondialdehyde (MDA) and total antioxidative competence (T-AOC) in hepatopancreas were determined every 3 weeks. SOD activities roughly increased with increasing olaquinox concentration, but didn't change greatly as feeding period was prolonged. Activities of GSH-px were not affected markedly by increasing olaquinox concentration and feeding period until above the dose of 1600 mg·kg⁻¹. Also were MDA contents influenced in general with the change of olaquinox concentration in feed, however, decreased gradually when the period was lengthened except for a dose of 3200 mg·kg⁻¹. T-AOC values declined with increasing olaquinox concentration and feeding period, and did to a very low level at above 1600mg·kg⁻¹. From

收稿日期: 2003-01-31

资助项目: 中国水产科学研究院人才基金(2000-B-11); 黑龙江省科技计划项目(GZD3B110)

作者简介: 叶继丹(1966-), 男, 湖北新洲人, 研究员, 博士, 从事鱼类营养学研究。E-mail: yjdwk@mail.hl.cn

these results, it can be concluded that antioxidant enzyme activities are induced more significantly at relatively higher concentration of olaquinox than at lower concentration. Elevation of concentration of olaquinox in feed is accompanied by weakened antioxidative ability of carp.

Key words: *Cyprinus carpio*; olaquinox; hepatopancreas; antioxidative enzyme system; malondialdehyde; total antioxidative competence

现代生物研究表明,动植物细胞在代谢过程中不断产生自由基,这些自由基会被细胞本身具有的防御体系所清除,在正常生理条件下二者之间始终处于动态平衡^[1,2],一旦平衡被打破,机体组织内的活性氧自由基不断聚积,使组织代谢功能出现异常并发生组织过氧化现象,从而引发一系列病理及生理变化。因此,抗氧化酶系统在维持机体正常代谢和功能上起着十分重要的作用^[3]。已有不少研究结果证实,受到来自环境化学污染物及环境应激因子胁迫的动植物机体组织能够产生大量自由基,使抗氧化酶活性发生相应的改变^[4-6]。由于抗氧化酶对低浓度的环境化学污染物非常敏感,很多环境生态实验均将其作为研究、检测及评价这类污染物引起的机体生化效应的一种重要生物标志物^[7-9]。目前抗氧化酶在动植物抗逆性、病理、肿瘤及衰老等疾病的发生机制方面受到广泛的关注和应用,已经成为生命科学领域中的研究热点。喹乙醇(olaquinox)是化学合成药物,由于具有优良的抗菌促长作用,曾被广泛应用于畜牧业及水产养殖业,但同时发现该药对养殖动物有一定的蓄积毒性,特别是禽类对此比较敏感^[10]。因此,本研究通过对长期投喂喹乙醇后鲤体组织超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)、丙二醛(MDA)及总抗氧化能力(T-AOC)等几个指标的测定,研究不同剂量和不同时间对鲤肝脏抗氧化酶活性效应的影响,从自由基学说初步探讨喹乙醇对鱼类可能的致毒机理,以进一步了解鱼类抗氧化防御体系对抗菌药物引起毒性效应的反应性。

1 材料与方法

1.1 试验饲料

以鱼粉20%、豆饼40%、麦麸25%、面粉10%、磷酸二氢钠0.5%、磷酸二氢钙1.5%、豆油2%、微量元素预混剂0.5%和维生素预混剂0.5%组成基础试验饲料,喹乙醇按0、100、200、400、800、1600、3200 mg·kg⁻¹添加到基础饲料中,分别制成7种不同喹乙醇含量的试验饲料。

1.2 试验鱼及处理

1龄德国镜鲤(*Cyprinus carpio* L.)鱼种采自黑龙江水产研究所松浦水产试验渔场,在室内暂养,并进行常规鱼病的预防,15d将其按体重(平均体重为97.6g)随机分成7组,每组3个重复,每重复20尾鱼,共21个自体水循环过滤水族箱(90 cm×50 cm×45 cm)。每组鱼喂1种试验饲料,试验共进行12周。试验期内,持续充氧,氧量保持在8 mg·L⁻¹以上,每天排换水1/3,水源为充分曝气的自来水,光制为12L:12D。水温21~26.4℃,日投饵率为2%~3%。

1.3 试验方法及样品采集

从试验开始,每隔21d称一次鱼体重,在各组中选取接近于平均体重的5尾鱼,剖杀后迅速取出肝胰脏,用预冷的去离子水冲洗干净,滤纸吸干后装袋密封,置-20℃冰箱中保存备用。

1.4 仪器与试剂

岛津UV2401型光度计, HZSH型恒温水浴振荡器, TGL-16C型高速离心机, SK-1型旋涡混合器, FSH³II高速组织匀浆机, 计时器。喹乙醇原粉, 含量98%, 批号200030L, 湖北广济制药有限公司生产; SOD试剂盒、GSH-px试剂盒、MDA试剂盒及T-AOC试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

1.5 样品分析

组织样品在4℃下解冻,剪碎,按1:9重量体积比(W/V)加入预冷生理盐水(含0.75%氯化钠和0.03%氯化钾),然后匀浆(10 000 r·min⁻¹, 3min)。匀浆液经10 000 r·min⁻¹离心10min,取上清液备用。测定SOD酶活性时上清液稀释至0.5%,测定GSH-px酶活性、MDA和T-AOC时分别稀释至5%。

SOD活性用SOD试剂盒(黄嘌呤氧化酶法)测定,其活性单位定义为:在30℃条件下,每毫克组织蛋白在1mL反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD量为1个亚硝酸盐单位(NU·mg⁻¹ prot)。

GSH-px活性用GSH-px试剂盒(DTNB法)测

定。其活性单位定义: 在 30℃ 条件下每毫克组织蛋白每分钟扣除酶促反应作用, 使反应体系中 GSH 降低 $1\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为 1 个酶活力单位 ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}\cdot\text{min}^{-1}$)。

MDA 用 MDA 试剂盒 (TBA 法) 测定 ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$)。

T-AOC 用 T-AOC 试剂盒测定, 其定义为: 在 30℃ 条件下, 每分钟每毫克组织蛋白使反应体系的吸光度 (OD) 值, 每增加 0.01 时, 为 1 个总抗氧化能力单位 ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$)。

组织匀浆液蛋白含量按不同指标测定前的浓度确定, 以福林-酚试剂法测定^[11]。

1.6 数据处理

实验数据用 SPSS 统计软件进行统计分析。数据结果表示为平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD)。

2 结果

2.1 喹乙醇对鲤肝胰脏 SOD 活性的影响

鲤摄食喹乙醇饲料 3 周后, 各处理组与对照组相比, 肝胰脏中 SOD 活性显著增加, 且随剂量的增加酶活性有升高的趋势。至第 6 周时中高剂量组 SOD 活性仍维持在较高的水平。至 9 周后除 1600 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组酶活性略有升高外, 其余各组差异均不明显 (图 1)。

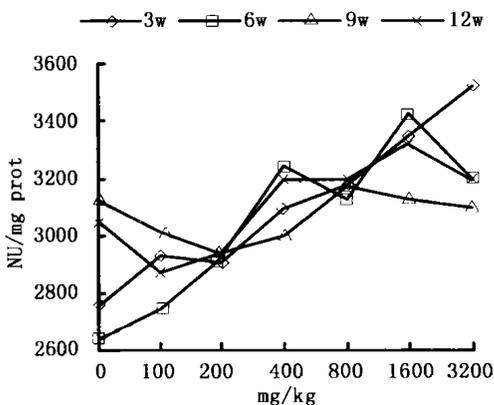


图 1 喹乙醇对鲤肝胰脏中 SOD 活性的影响
Fig.1 Effect of olaquinox on SOD activity in hepatopancreas of carp

2.2 喹乙醇对鲤肝胰脏 GSH px 活性的影响

3 周时对照组 GSH px 活性明显高于处理组 (图 2), 以 100 和 3200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组降低的幅度最大。与 3 周的结果比较, 6 周时各组酶活性有升有降, 变化较小。至 9 周时各组酶活性均升高较快, 其中

以 1600 和 3200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组上升幅度较大, 至 12 周时仍以这两组的酶活性较高。饲喂时间的长短明显影响两个高剂量组酶活性, 即在高剂量下酶活性先期下降, 随着摄食时间延长酶活性急剧升高。

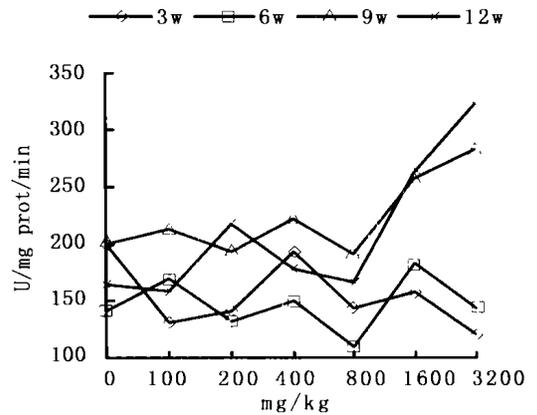


图 2 喹乙醇对鲤肝胰脏中 GSH px 活性的影响
Fig.2 Effect of olaquinox on GSH px activity in hepatopancreas of carp

2.3 喹乙醇对鲤肝胰脏 MDA 生成的影响

3 周后, 肝胰脏中 MDA 含量在各组中的变化不明显 (图 3)。400 和 800 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组 MDA 在 6 周时出现明显的下降现象。9 周时只有 3200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组仍保持较高的含量水平外, 均有所下降。这种现象持续到 12 周。由表 3 还可发现, 随饲喂时间的延长 MDA 含量呈逐渐减少的趋势 (3200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组除外)。

2.4 喹乙醇对鲤肝胰脏 T-AOC 的影响

随喹乙醇添加剂量的增加, T-AOC 在各个试验期内均呈不同程度的下降趋势。随着饲喂时间的延长, T-AOC 在 400~3200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 范围内的降低幅度较大 (图 4)。

3 讨论

大量研究表明, 毒性物质所致的动植物组织细胞功能的改变与细胞中自由基的代谢失衡而引发的连锁反应的结果有着密切的关系^[12]。机体的抗氧化防御系统作为需氧生物体内活性氧自由基清除、防止过氧化损伤的主要保护机制, 负责清除组织细胞代谢产生的活性氧自由基, 使之始终维持在较低的水平而不致在体内聚积, 以保持机体正常的生理功能^[13]。抗氧化酶的合成增加或减少受基因的调控, 在外源因子 (如化学毒物) 的刺激下, 机体组织中自由基生成量会大量增加, 从而诱导抗氧化

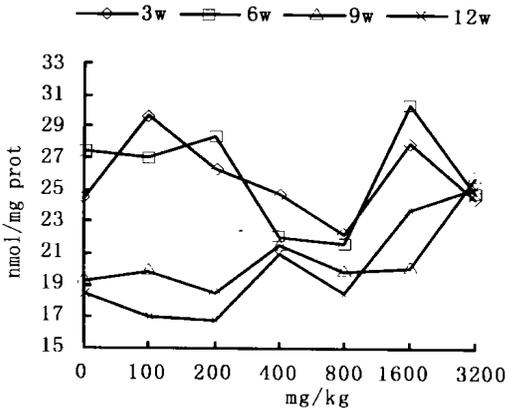


图3 喹乙醇对鲤肝胰脏中MDA含量的影响
Fig.3 Effect of olaquinox on MDA content in hepatopancreas of carp

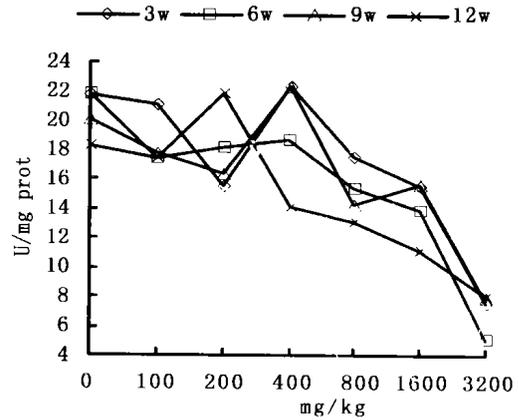


图4 喹乙醇对鲤肝胰脏中总抗氧化能力的影响
Fig.4 Effect of olaquinox on T-AOC in hepatopancreas of carp

酶的合成, 这种应激补偿效应在动植物中普遍存在^[14]。

有研究表明, 一些药物如庆大霉素 (gentamicin)、环孢霉素 (cyclosporine)、阿司匹林 (aspirin) 等在用来治疗某些疾病的过程中同时对机体的某些特定组织和细胞产生较大的毒性, 这些药物对动物机体组织产生毒性效应的同时往往伴随着机体氧化应激和过氧化作用^[15], 抗氧化酶基因表达的改变是这类药物导致组织损伤的一种分子机制^[16]。喹乙醇同这些药物类似, 对动物具有双重的作用, 在适宜的剂量下对养殖动物具有良好的抗菌促生长作用, 一旦使用不当或用药时间过长会产生毒副作用。动物喹乙醇中毒时, 肝、肾等组织发生不同程度的病变, 鸡病灶肝组织中 P450 酶活性降低^[17]。

本研究结果表明, 不同剂量的喹乙醇对 SOD 活性的影响程度不同, 较低剂量下其活性变化不明显, 高剂量作用下表现出较高的活性, 说明 SOD 仅在高剂量作用下能被诱导。从图 1 可以看出, 两个高剂量组 SOD 从一开始就表现出较高的活性, 表明机体遭受了较大的氧化应激, 可能是一种反应性升高现象。这与动植物遭受环境化学物质胁迫后, 其组织中的抗氧化酶活性的变化结果不同, 即低剂量作用时, 抗氧化酶活性被诱导, 高剂量作用下则被抑制^[7, 8]。

GSH px 活性也与 SOD 活性的变化结果大致相同, 所不同的是在高剂量作用下, GSH px 先期被抑制, 然后再升高, 这与高温应激雏鸡肝脏 GSH px

活性的变化结果一致^[18]。但引起 GSH px 在前期较低的机制还不清楚。

MDA 是细胞脂质氧化的代谢产物, 其含量的高低反应了机体细胞受自由基攻击的程度。本实验中, 鲤肝胰脏 MDA 含量的变化差异不大, 这是与 SOD 和 GSH px 在中低喹乙醇剂量下的活性变化不明显是相适应的, 而且随着饲喂时间的延长, 其含量呈现逐渐下降的趋势 (除最高剂量组外), 反应出鲤在本实验剂量范围内对喹乙醇的应激作用具有良好的适应性, 也说明鲤可以忍受低于 1600 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的喹乙醇剂量, 且其耐受剂量比猪、鸡的要高得多^[17]。但 MDA 的降低并不总是与抗氧化酶活性的升高相一致, Martinez Alvarez 等^[19]观察到水中盐度胁迫下抗氧化酶活性的降低而没有伴随 MDA 升高的现象, 这一变化可能显示的是细胞代谢发生一定程度的改变而不是氧化应激的结果。

本实验还对肝胰脏总抗氧化能力 (T-AOC) 进行了测定。结果表明, 喹乙醇对 T-AOC 影响呈剂量效应关系, 且随摄食时间的延长, 机体的抗氧化能力逐渐降低, 表明机体整体机能状况在逐渐变差, 喹乙醇作用的这一进程是缓慢的。总抗氧化能力是综合反映了机体非酶抗氧化系统和抗氧化酶系共同完成抗氧化作用, SOD 酶的诱导及其活性的持续升高对降低喹乙醇对组织细胞的氧化损伤作用更为有利, 在防御组织的过氧化损伤方面可能是一种主动的也是更为有效的途径, 同时体内抗氧化剂在执行抗氧化防御过程中被不断消耗, 以至减少了非酶抗氧化系统发挥这种作用的程度, 最终表

现为机体抗氧化能力的减弱。

值得注意的是, 从 SOD、GSH px 在不同剂量作用下和延长作用时间所呈现的诱导效应不稳定的结果看, 说明实验过程中除了喹乙醇的作用外, 还可能存在其他因素的干扰^[9, 20]。鱼类是变温动物, 由于本实验的时间较长, 鱼的摄食与生长, 水质、水温等环境因素的变化, 也可对测定的结果产生一定的影响。另一方面, 喹乙醇是毒性很低的药物, 本实验药物剂量梯度可能仍然过小, 不足以使相近的两个药物剂量产生明显的差异效应。由此可见, 评价喹乙醇亚慢性毒性作用时, 相对于其它 3 个指标, T-AOC 较为敏感。

参考文献:

- [1] Li Y P, Gong H. Advances in antioxidant system of insects[J]. Chinese Bull Life Sci, 1998, 10(5): 240- 243. [李毅平, 龚和. 昆虫体内抗氧化酶系统研究进展[J]. 生命科学, 1998, 10(5): 240- 243.]
- [2] Liu J Z, Gong M. Advances in antioxidant systems of plants[J]. J Yunnan Normal Univ, 1999, 19(6): 1- 11. [刘家忠, 龚明. 植物抗氧化系统研究进展[J]. 云南师范大学学报, 1999, 19(6): 1- 11.]
- [3] Palace V P. An evaluation of the relationships among oxidative stress, antioxidant vitamins and early mortality syndrome(EMS) of lake trout (*Salvelinus namaycush*) from Lake Ontario[J]. Aquat Toxicol, 43(2- 3): 195- 208.
- [4] Vaziri N D, Lin C Y, Farnand F, et al. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension[J]. Kidney Int, 2003, 63(1): 186- 194.
- [5] Lopes P A, Pinheiro T, Santos M C, et al. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides complex*) to inorganic pollutants exposure[J]. Sci Total Environ, 2001, 280(1- 3): 153- 163.
- [6] Lin H, Du R. The effect of thermal environment on peroxidation of tissues in heat stressed broilers[J]. Acta Zoonutri Sin, 2001, (2): 30- 32. [林海, 杜荣. 热应激对肉鸡组织过氧化状态的影响[J]. 动物营养学报, 2001, (2): 30- 32.]
- [7] Wang C G, Zheng W Y, Yu Q, et al. Effects of mixture of benzo(a) pyrene and pyrene exposure on hepatic antioxidant enzymes activities in *Mugil soiley* [J]. Acta Scientiae Circustantiae, 2002, 22(4): 529- 533. [王重刚, 郑微云, 余群, 等. 苯并(a) 芘和芘的混合物暴露对梭鱼肝脏抗氧化酶活性的影响[J]. 环境科学学报, 2002, 22(4): 529- 533.]
- [8] Li W M, Yin D Q, Hu S Q, et al. Effects of chloric nitroaminated chemicals on antioxidant enzymes in serum of *Carassius auratus* [J]. Acta Scientiae Circustantiae, 2002, 22(2): 236- 240. [李伟民, 尹大强, 胡双庆, 等. 氯代硝基苯胺对鲫鱼(*Carassius auratus*)血清抗氧化酶的影响[J]. 环境科学学报, 2002, 22(2): 236- 240.]
- [9] Almeida J A, Dimiz Y S, Marques S F, et al. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia(*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination[J]. Environ Int, 2002, 27(8): 673- 679.
- [10] Geng Y, Wang K Y. Olaquinox to animal toxicity[J]. Livestock and Avian Industry, 2000, 5: 31- 32. [耿毅, 汪开毓. 动物喹乙醇中毒研究进展[J]. 畜禽业, 2000, 5: 31- 32.]
- [11] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265- 375.
- [12] Livingstone DR, Garcia Martinez P, Michel X, et al. Oxyradical production as a pollution mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L and other mollusks[J]. Funct Ecol, 1990, 4: 415- 424.
- [13] Winston G W, Di Giulio R T. Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organism[J]. Aquat Toxicol, 1991, 24: 143- 152.
- [14] Tang X X, Zhang P Y. Effects of anthracene on activity of superoxide dismutase in *Sebastes fuscescens* [J]. J Fish China, 2000, 24(3): 217- 220. [唐学玺, 张培玉. 蒽对黑超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 水产学报, 2000, 24(3): 217- 220.]
- [15] Durak I, Karaayvaz M, Cimen M Y, et al. Aspirin impairs antioxidant system and causes peroxidation in human erythrocytes and guinea pig myocardial tissue[J]. Hum Exp Toxicol, 2001, 20(1): 34- 37.
- [16] Li Y M, Song B G, Zhan G F, et al. Study molecular mechanism of cardiac injury induced by adriamycin[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2002, 7(3): 209- 212. [李咏梅, 宋伯根, 赵桂芬, 等. 盐酸阿霉素对大鼠心肌损伤的分子机制研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2002, 7(3): 209- 212.]
- [17] Waldmann K H, Kikovic D, Stockhofe N. Clinical and hematological changes after olaquinox poisoning in fattening pigs [J]. Zentralbl Veterinarmed A, 1989, 36(9): 676- 686.
- [18] Fan S J. Synergism protection of antioxidative nutrients peroxidative damage of body tissues in layers exposed to acute ambient temperature [D]. Ph. D Dissertation of Northeast Agricultural University, 1998. 20- 27. [范石军. 热应激对产蛋鸡体内组织的过氧化损伤及抗氧化微量营养素的协同保护效应[D]. 东北农业大学博士学位论文, 1998. 20- 27.]
- [19] Martinez Alvarez R M, Hidalgo M C, Domezain A, et al. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity[J]. J Exp Biol, 2002, 205: 3699 - 3706.
- [20] Wilhelm F D. Fish antioxidant defenses a comparative approach [J]. Braz J Med Biol Res, 1996, 29(12): 1735- 1742.