

## 饲料氧化鱼油引起草鱼肠道黏膜结构屏障损伤

黄雨薇, 叶元土\*, 蔡春芳, 吴萍, 陈科全, 吴轲,  
徐登辉, 彭侃, 林秀秀, 罗其刚

(苏州大学基础医学与生物科学学院,江苏省水产动物营养重点实验室,江苏 苏州 215123)

**摘要:** 本实验研究了饲料氧化鱼油对草鱼肠道屏障结构和肠道通透性的影响。以豆油、鱼油、氧化鱼油作为饲料脂肪源,分别设计鱼油组(6F)、豆油组(6S)、2%氧化鱼油(2OF)、4%氧化鱼油(4OF)及6%氧化鱼油(6OF)5组等氮、等能半纯化饲料,在池塘网箱养殖草鱼[平均体质量(74.8±1.2)g]72d。采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)的方法,测定了草鱼肠道紧密连接蛋白中闭锁蛋白Occludin,闭合蛋白Claudin-3、Claudin-15a和胞浆蛋白ZO-1、ZO-2、ZO-3的基因表达活性,并结合肠黏膜细胞间紧密连接结构透射电镜观察结果、肠道通透性标志性指标综合分析。结果显示:在添加氧化鱼油后,①血清二胺氧化酶活性、内毒素和D-乳酸含量都出现显著增加( $P < 0.05$ );②组成肠黏膜细胞间紧密连接结构的闭合蛋白Claudin-3、Claudin-15a和胞浆蛋白ZO-1、ZO-2、ZO-3基因表达活性显著下降( $P < 0.05$ ),而闭锁蛋白Occludin基因表达活性出现不同程度的下降,但差异不显著( $P > 0.05$ );③透射电镜观察结果显示肠黏膜细胞间紧密连接结构出现缝隙;④饲料中的AV值、POV值、MDA含量与闭合蛋白Claudin-3、Claudin-15a,胞浆蛋白ZO-1、ZO-2、ZO-3和闭锁蛋白Occludin基因表达活性均显示负相关关系,其中饲料POV值、MDA含量与胞浆蛋白ZO-1基因表达活性呈极显著负相关关系( $P < 0.05$ )。结果表明,在饲料中添加氧化鱼油后,氧化鱼油中的过氧化物、丙二醛等油脂氧化产物导致组成肠黏膜细胞间紧密连接结构的蛋白基因表达活性显著下降、紧密连接物理性结构显著损伤,致使肠黏膜屏障结构的完整性被破坏、肠黏膜通透性显著增加。

**关键词:** 氧化鱼油;草鱼;肠道;细胞紧密连接;通透性

**中图分类号:** S 963

**文献标志码:** A

完整的肠黏膜屏障结构是维护完整的肠道屏障功能的基础,能防止有毒有害物质透过肠壁到达肠外组织,维持机体的内环境稳定。目前认为肠黏膜屏障一般由机械屏障、免疫屏障、生物屏障和化学屏障构成,其中以机械屏障最为重要。而完整的肠黏膜细胞和肠黏膜细胞间的连接是肠黏膜机械屏障的结构基础,二者共同构成了肠道的结构性屏障<sup>[1]</sup>。肠黏膜细胞间连接包括紧密连接(tight junction)、黏着连接(adherens junction)、桥粒连接(desmosome junction)和缝隙连接(gap junction)。紧密连接是肠黏膜细胞间最为重要的连接方式,位于相邻肠黏膜细胞间最

顶端,是物质通过肠黏膜细胞间通路转运的限制因素,具有栅栏功能和屏障功能<sup>[2]</sup>。栅栏功能把肠黏膜细胞质膜分成顶膜和基侧膜2个部分,阻止它们之间的脂质和蛋白质等自由弥散。而屏障功能通过对分子大小和所带电荷的选择性,调节肠黏膜细胞间通路离子、水和溶质的转运,维持组织的内环境稳态<sup>[3]</sup>。紧密连接是由多种蛋白质构成的大分子复合物,主要分为跨膜蛋白Occludin<sup>[4]</sup>、Claudins<sup>[5-6]</sup>和胞浆蛋白ZOs<sup>[7-8]</sup>。紧密连接蛋白在维持肠黏膜通透性和肠道屏障功能完整性方面具有重要作用<sup>[9]</sup>。肠黏膜通透性的升高主要通过增加肠黏膜细胞通路和肠黏膜细

收稿日期:2015-02-04 修回日期:2015-06-08

资助项目:国家自然科学基金(31172417);苏州市应用基础研究项目(SYN201316)

通信作者:叶元土,E-mail:yeyt@suda.edu.cn

胞间通路的通透性来实现<sup>[10]</sup>。其中,DAO 活性、D-乳酸和内毒素含量经常作为判断肠黏膜通透性和肠黏膜屏障功能的指标<sup>[11-14]</sup>。

鱼油虽然含有丰富的多不饱和脂肪酸,但由于鱼油的高度不饱和性,导致了其极易发生氧化变质,产生大量的自由基、过氧化物(如丙二醛)等,这些油脂氧化产物会使肠道产生氧化应激,损伤肠道屏障功能<sup>[15-16]</sup>。但是,目前关于氧化鱼油是否破坏肠道屏障结构和功能完整性的研究还少有报道。本实验在添加不同梯度氧化鱼油的条件下,采用荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)对草鱼肠道的 6 个紧密连接蛋白基因表达活性进行检测,并结合紧密连接结构透射电镜和肠道通透性指标综合分析,探讨氧化鱼油对肠黏膜细胞间紧密连接蛋白基因表达活性、肠黏膜细胞间紧密连接结构完整性和肠黏膜通透性的影响。

### 1.1 实验鱼

草鱼来源于浙江一星饲料有限公司养殖基

地,为池塘培育的 1 冬龄鱼种,挑选体格健康、无畸形、体质量为(74.8 ± 1.2) g 的草鱼 300 尾鱼,随机分为 5 组,每组 3 个重复,每个重复 20 尾鱼。

### 1.2 实验饲料

以酪蛋白和秘鲁蒸气鱼粉为主要蛋白源,采用等氮、等能方案设计基础饲料,制作了 6% 豆油组(6S 组)、6% 鱼油组(6F 组)、2% 氧化鱼油 + 4% 豆油组(2OF 组)、4% 氧化鱼油 + 2% 豆油组(4OF 组)、6% 氧化鱼油组(6OF 组)作为脂肪源的 5 组等氮等能实验饲料,饲料原料粉碎过 60 目筛,用绞肉机制成直径 1.5 mm 的长条状,切成 1.5 mm × 2.0 mm 的颗粒状,风干,饲料置于 -20 °C 冰柜保存备用,具体配方及营养水平见表 1。豆油为“福临门”牌一级大豆油,鱼油来源于广东省良种引进服务公司生产的“高美牌”精炼鱼油,氧化鱼油参考文献[10]方法制备,并分别测定了 3 种油脂过氧化值(POV)、酸价(AV)、丙二醛(MDA),并计算实验饲料中 POV 值、AV 值、MDA 含量,具体结果见表 2。

表 1 实验饲料组成及营养水平(干物质基础)

Tab. 1 Formulation and proximate composition of experiment diets(DM basis)

项目 items	组别 groups				
	6S	6F	2OF	4OF	6OF
原料 ingredients%					
酪蛋白 casein	215	215	215	215	215
蒸汽鱼粉 steam dried fish meal	167	167	167	167	167
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22	22	22	22	22
氧化鱼油 oxidized fish oil	0	0	20	40	60
豆油 soybean oil	60	0	40	20	0
鱼油 fish oil	0	60	0	0	0
氯化胆碱 choline chloride	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
预混料 premix <sup>1)</sup>	10	10	10	10	10
糊精 dextrin	110	110	110	110	110
$\alpha$ -淀粉 $\alpha$ -starch	255	255	255	255	255
微晶纤维 microcrystalline cellulose	61	61	61	61	61
羧甲基纤维素 carboxymethyl cellulose	98	98	98	98	98
乙氧基喹啉 ethoxyquin	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
合计 total	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000
营养水平 nutrient levels <sup>2)</sup>					
粗蛋白质 crude protein/%	30.01	29.52	30.55	30.09	30.14
粗脂肪 crude lipid/%	7.08	7.00	7.23	6.83	6.90
能量 energy(kJ/g)	20.242	20.652	20.652	19.943	20.860

注:1) 预混料为每 kg 饲料提供;Cu 5 mg,Fe 180 mg,Mn 35 mg,Zn 120 mg,I 0.65 mg,Se 0.5 mg,Co 0.07 mg,Mg 300 mg,K 80 mg,VA 10 mg,VB<sub>1</sub> 8 mg,VB<sub>2</sub> 8 mg,VB<sub>6</sub> 20 mg,VB<sub>12</sub> 0.1 mg,VC 250 mg,泛酸钙 20 mg,烟酸 25 mg,VD<sub>3</sub> 4 mg,VK<sub>3</sub> 6 mg,叶酸 5 mg,肌醇 100 mg; 2) 实测值

Notes:1) The premix provided the following per kg of diets;Cu 5 mg,Fe 180 mg,Mn 35 mg,Zn 120 mg,I 0.65 mg,Se 0.5 mg,Co 0.07 mg,Mg 300 mg,K 80 mg,VA 10 mg,VB<sub>1</sub> 8 mg,VB<sub>2</sub> 8 mg,VB<sub>6</sub> 20 mg,VB<sub>12</sub> 0.1 mg,VC 250 mg,calcium pantothenate 20 mg,niacin 25 mg,VD<sub>3</sub> 4 mg,VK<sub>3</sub> 6 mg,folic acid 5 mg,inositol 100 mg; 2) Measured values

表 2 实验饲料中 POV 值、AV 值、MDA 含量分析结果  
Tab.2 Analytical results for POV,AV and MDA

组别 groups	content in diets		mg/kg
	过氧化值 POV	酸价 AV	丙二醛 MD
6S	3.67	30	0.182
6F	72.45	800	10.8
2OF	64.55	400	61.6
4OF	125.43	770	123.9
6OF	186.31	1140	185

本实验中使用的鱼油有一定程度的氧化,由于其在饲料中比例为 6%,而氧化鱼油组是由氧化鱼油和豆油按比例混合作为脂肪源,所以 6F 组的实际 POV 值比 2OF 组高 12.25%,而 AV 则比 2OF 和 4OF 组分别高出 100% 和 3.9%。

### 1.3 饲养管理

饲养实验在浙江一星饲料有限公司养殖基地进行,在面积为 5 m × 667 m (平均水深 1.8 m) 的池塘中设置网箱,网箱规格为 (1.0 m × 1.5 m × 2.0 m)。饲养实验前用 6 S 组饲料驯化一周,正式饲养时间为 72 d,每天 7:00 和 16:00 定时投喂,投喂率为 4%。每 10 天依据投喂量估算鱼体增重并调整投喂率,记录每天投喂量。每周测定水质一次,实验期间水温 25 ~ 33 °C,溶解氧浓度 > 8.0 mg/L, pH 7.8 ~ 8.4, 氨氮浓度 < 0.2 mg/L, 亚硝酸盐浓度 < 0.01 mg/L, 硫化物浓度 < 0.05 mg/L。

### 1.4 主要试剂

总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus, PrimeScript™ RT Mastetr Mix 反转录试剂盒, SYBR Premix Ex Taq™ I 都来自 TaKaRa 公司,荧光定量 PCR 扩增引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.5 样品制备与分析

血清样品的制备与分析 养殖 72 d、停食 24 h 后,每网箱随机取出 10 尾鱼,采用尾静脉采血法,取其全血置于离心管中,常温放置 0.5 h 后,3 000 r/min 离心 10 min 制备血清样品,经液氮速冻后, - 80 °C 保存备用。血清二胺氧化酶 (DAO) 活性采用南京建成的二胺氧化酶试剂盒进行测定。血清 D-乳酸、内毒素含量采用南京建成的 Elisa 试剂盒进行测定。

肠道组织透射电镜样品制备与分析 每网箱

取 2 尾鱼、每组 6 尾,于中肠前四分之一处取 1 ~ 2 cm 肠管 1 段,纵向剖开用磷酸缓冲液冲洗后,立即将其投入 4% 戊二醛中固定,用于透射电镜分析。透射电镜采用锇酸固定、丙酮脱水,最后放入胶囊内包埋切片染色,用日立 HT7700 透射式电子显微镜观察肠道组织结构并拍照。

草鱼肠道组织基因样品制备 每网箱随机选取抽过血的 3 尾鱼进行活体解剖,迅速取出内脏团置于冰浴中,在中肠的 1/2 处取出 1.0 cm × 1.0 cm 的一块组织于 PBS 中,漂洗 2 ~ 3 次后,一式两份,迅速装于 EP 管中,液氮速冻,于 - 80 °C 保存。

总 RNA 的提取和反转录 cDNA 利用总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus 按照说明书提取肠道样品总 RNA。取 1 ug 总 RNA 为模板,按照 PrimeScript™ RT Mastetr Mix 反转录试剂盒的方法将 RNA 转录成 cDNA,于 - 20 °C 保存备用。

qRT-PCR 检测肠黏膜细胞间紧密连接蛋白基因表达 根据本实验室草鱼肠道转录组测序 (RNA-Seq) 结果,运用 prime5.0 软件设计了 6 个紧密连接蛋白基因和内参基因  $\beta$ -actin (Genbank 登录号: DQ211096) 的荧光定量正、反向引物(表 3)。

表 3 实时荧光定量引物

Tab.3 Primers used for quantitative real-time PCR

基因 genes		引物(5'-3') primers (5'-3')
ZO-1	F	CCAGGACAGAGTCAGTGGAGA
	R	TGGGGTCAGTGCAGGTTT
ZO-2	F	GTCGTTAGAGGTCATTTCGTCA
	R	CCAGCAGCACAATCAGCAGT
ZO-3	F	TTGTCAATTTGGGGTCTCTG
	R	CTATCCGCTAACCGTGTC
Occludin	F	TGGGTGAATGATGTGAATGG
	R	AACCGCTGCTCAGTGGGAC
Claudin-15a	F	ACAGATTCTCGTACAGGGTTGA
	R	CGGTTGTTGAAGTCGTTGC
Claudin-3	F	TCGGTGGATTGTACTTCTTCTC
	R	CCAAATCACTCGGGACTTCTA
$\beta$ -Actin	F	CGTGACATCAAGGAGAAG
	R	GAGTTGAAGGTGGTCTCAT

实时定量检测采用 CFX96 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, USA) 进行,反应体系为 20 uL; SYBR

Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) 10 uL, 候选引物各 1 uL, cDNA 2 uL, 灭菌水 6 uL。PCR 反应采用两步法, 反应条件为 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环。同一样品重复 3 个反应, 以  $\beta$ -actin 作为参照基因。根据扩增曲线得到的  $C_t$ , 计算出目标基因和参照基因  $\beta$ -actin  $C_t$  值的差异  $\Delta C_t$ ; 最后计算出不同样品相对于参照样品基因表达倍数  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , 制作出相对定量的图表。

## 1.6 数据分析

通过 SPSS 21.0 进行 One-way ANOVA 分析, 并进行 LSD 与 Duncan 氏比较, 结果以平均值  $\pm$  标准误 (mean  $\pm$  SE) 表示, 当  $P < 0.05$  时, 差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 草鱼血清内毒素、D-乳酸含量和 DAO 活性显著增加

与 6S 组相比, 在添加氧化鱼油后, 血清 DAO 活性、内毒素含量和 D-乳酸含量都出现显著增加 ( $P < 0.05$ ) (表 4)。

### 2.2 氧化鱼油使草鱼肠黏膜细胞间紧密连接结构严重损伤

经过 72 d 养殖实验后, 各个实验组草鱼肠黏膜细胞间紧密连接结构的透射电镜图见图版。图版 -1 ~ 5 分别为 6S、6F、2OF、4OF 和 6OF 组 (图中箭头所示为草鱼肠黏膜细胞间紧密连接结构), 在透射电镜下, 紧密连接结构表现为一条黑色的致密电子带, 起始于上皮顶端, 从绒毛根部

向基底层延伸。由图版 -1 可见, 6S 组紧密连接结构没有缝隙, 图版 -2 ~ 5 箭头所示处可以发现紧密连接结构出现缝隙, 并且逐步扩大, 6OF 组紧密连接结构严重受损, 缝隙达到最大。结果显示肠黏膜细胞间紧密连接结构受到严重的损伤。

表 4 氧化鱼油对草鱼肠道通透性的影响

Tab. 4 Effect of oxidized fish oil on the permeability of grass carp intestine

组别 groups	二胺氧化酶/(U/L) diamine oxidase	内毒素 /(EU/L) endotoxin	D-乳酸 /( $\mu$ mol/L) D-lactic acid
6S	19.56 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	46.5 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	0.605 $\pm$ 0.0575 <sup>a</sup>
6F	23.22 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>	53.5 $\pm$ 2.8 <sup>ab</sup>	0.883 $\pm$ 0.0031 <sup>b</sup>
2OF	29.86 $\pm$ 0.88 <sup>c</sup>	63.6 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	0.962 $\pm$ 0.0565 <sup>b</sup>
4OF	29.91 $\pm$ 0.88 <sup>c</sup>	65.2 $\pm$ 4.9 <sup>b</sup>	0.866 $\pm$ 0.1298 <sup>b</sup>
6OF	44.04 $\pm$ 1.71 <sup>d</sup>	125.3 $\pm$ 16.1 <sup>c</sup>	2.022 $\pm$ 0.2075 <sup>c</sup>

注: 表中同列数据有相同字母的表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 无相同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同

Notes: In the same precedence, values with different small letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), the same as the following

### 2.3 氧化鱼油诱导草鱼肠黏膜细胞间紧密连接蛋白基因表达活性显著下降及其相关性分析

对组成肠道黏膜细胞间紧密连接结构蛋白质基因表达活性的检测结果见表 5。由表 5 可知, 与 6S 组相比, 在饲料中添加氧化鱼油后, 闭合蛋白 Claudin-3、Claudin-15a 和胞浆蛋白 ZO-1、ZO-2、ZO-3 基因表达活性显著下降 ( $P < 0.05$ ), 而闭锁蛋白 Occludin 基因表达活性出现不同程度的下降, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

表 5 氧化鱼油对草鱼肠黏膜细胞间紧密连接蛋白基因表达活性的影响

Tab. 5 Tight junction protein gene expression of intestine in grass carp under oxidized fish oil

组别 group	闭合蛋白基因 closed protein gene				胞浆蛋白基因 cytoplasmic protein gene				闭锁蛋白基因 atresia protein gene			
	Claudin-3	变化量 fold change	Claudin-15a	变化量 fold change	ZO-1	变化量 fold change	ZO-2	变化量 fold change	ZO-3	变化量 fold change	Occludin	变化量 fold change
6S	1.00 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0	1.00 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0	1.00 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0	1.00 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0	1.00 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	0	1.00 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0
6F	0.51 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	-45%	0.51 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	-49%	0.93 $\pm$ 0.17 <sup>bc</sup>	-7%	1.5 $\pm$ 0.25 <sup>c</sup>	50%	1.04 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	4%	1.56 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	56%
2OF	0.64 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	-36%	0.44 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	-56%	0.78 $\pm$ 0.21 <sup>bc</sup>	-22%	0.45 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	-55%	0.42 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	-58%	0.88 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	-12%
4OF	0.6 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	-39%	0.71 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	-29%	0.73 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	-27%	0.52 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	-48%	0.44 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	-56%	0.88 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	-12%
6OF	0.9 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	-9%	0.55 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	-45%	0.48 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	-52%	0.36 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	-64%	0.46 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	-54%	0.94 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	-6%

注: 变化量 = (鱼油或氧化鱼油组的数值 - 豆油组的数值)  $\times$  100% / 豆油组的数值

Notes: Fold change = (the value of fish oil or oxidized fish oil group - the value of soybean oil group)  $\times$  100% / the value of soybean oil group

将 6S、6F、20F、40F 和 60F 组饲料的 AV 值、POV 值、MDA 含量分别与肠黏膜细胞间紧密连接蛋白基因表达活性做 Pearson 相关性分析, 检验双侧显著性, 样品组数  $n = 5$  (表 6)。饲料中的 AV 值、POV 值、MDA 含量与闭合蛋白

Claudin - 3、Claudin - 15a, 胞浆蛋白 ZO - 1、ZO - 2、ZO - 3 和闭锁蛋白 Occludin 基因表达活性均显示负相关关系的变化趋势, 其中饲料 POV 值、MDA 值与胞浆蛋白 ZO - 1 基因表达活性呈极显著负相关关系 ( $P < 0.05$ )。

表 6 草鱼肠黏膜细胞间紧密连接蛋白基因表达活性与饲料油脂质量的相关性分析  
 Tab. 6 Correlation analysis between tight junction protein gene expression of intestine in grass carp and oil quality in diets

Pearson 相关分析		Claudin - 3	Claudin - 15a	Occludin	ZO - 1	ZO - 2	ZO - 3
Pearson correlation analysis							
AV	R <sup>2</sup>	-0.292	-0.599	-0.147	-0.775	-0.228	-0.438
	P	0.634	0.285	0.813	0.124	0.712	0.461
POV	R <sup>2</sup>	-0.096	-0.483	-0.221	-0.941	-0.554	-0.673
	P	0.878	0.409	0.721	0.017 **	0.333	0.213
MDA	R <sup>2</sup>	-0.093	-0.318	-0.53	-0.978	-0.783	-0.806
	P	0.882	0.602	0.358	0.004 **	0.117	0.1

注: R<sup>2</sup> 相关系数; P 显著性 (双侧) 水平; \*\* 表示因子之间极显著相关,  $P < 0.01$

Notes: R<sup>2</sup> correlation coefficient; P significance level (Bilaterally); \*\* significant correlation between different factors,  $P < 0.01$

对相关系数  $R^2 > 0.90$  的因子作回归分析后发现, POV 值、MDA 含量对胞浆蛋白 ZO - 1 基因表达活性的影响以二次函数关系拟合度最高, 拟合度分别为 0.910 6 和 0.959 1 (图 1)。

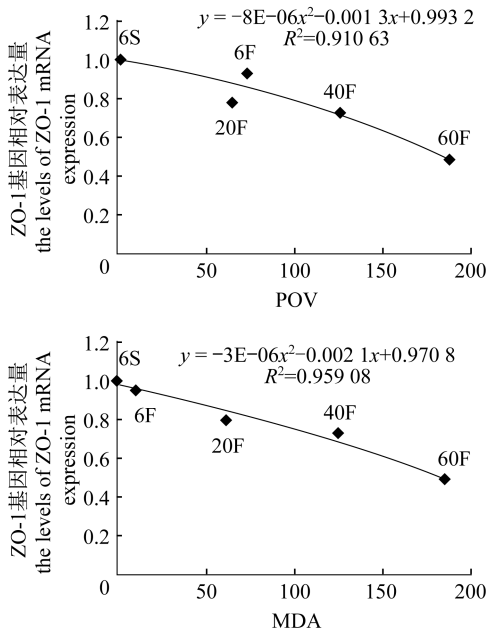


图 1 ZO - 1 基因表达活性与饲料油脂质量的关系

Fig. 1 Relationship between ZO - 1 gene expression and oil quality in diets

### 3 讨论

#### 3.1 氧化鱼油使草鱼肠黏膜通透性显著增加

DAO 是具有高度活性的细胞内酶, 该酶在小肠黏膜上层绒毛含量高, 活性强, 在其他组织含量低, 活性弱。当肠黏膜细胞受损、肠黏膜通透性增加后, 胞内释放大量的 DAO 会通过肠黏膜屏障而进入血液, 使血浆 DAO 活性升高<sup>[11]</sup>。D - 乳酸主要是细菌发酵的代谢产物, 正常情况下很少被吸收。当肠黏膜细胞受损时, 肠黏膜通透性增加, 肠道中细菌产生大量 D - 乳酸通过受损黏膜细胞进入血液, 使血浆 D - 乳酸水平升高<sup>[12]</sup>。所以血浆 DAO 活性和 D - 乳酸含量可作为反映肠道黏膜损害程度和通透性变化的重要指标。当肠道屏障被破坏时, 肠黏膜通透性增加, 大量的内毒素可通过肠黏膜细胞间通路、肠黏膜细胞微绒毛的细胞膜通路, 进入血液引发内毒素血症。因此, 内毒素的通透性可反映肠黏膜屏障的功能<sup>[13]</sup>。有研究表明, 腹泻、感染和手术等多种应激状态均可导致暂时或长时间的肠黏膜屏障损伤, 表现为肠黏膜通透性增加、细菌和毒素移位等<sup>[14]</sup>。表 4 结果显示, 在添加氧化鱼油后, 血清 DAO 活性、D - 乳酸和内毒素含量都出现显著增加 ( $P < 0.05$ ), 表明饲料氧化鱼油破坏了肠黏膜细胞和肠黏膜细胞间紧密连接结构, 即肠黏膜屏障遭到

严重损伤,肠黏膜通透性显著增加。

### 3.2 氧化鱼油使草鱼肠黏膜细胞间紧密连接蛋白基因表达活性显著下降

如图 2 所示,闭锁蛋白 Occludin 和闭合蛋白 Claudins 是构成紧密连接结构的主要跨膜蛋白,相邻肠黏膜细胞间通过跨膜蛋白 Occludin、Claudins 的胞外环以“拉链”状相连接,形成“锁扣”结构,从而封闭细胞旁间隙,在维持紧密连接的屏障功能和通透性上起着关键作用<sup>[17-18]</sup>。刘海萍等<sup>[14]</sup>研究发现,早期断奶会引起仔猪肠道屏障受损、通透性增加,这可能与紧密连接蛋白 Occludin 表达下降有关。Turksen 等<sup>[19]</sup>研究表明,当紧密连接蛋白 Claudins、Occludin 合成量不足时,紧密连接结构受到损伤,肠黏膜细胞间通透性会显著增加。Furuse 等<sup>[20]</sup>发现先天性缺乏 Claudin-1 的小鼠,皮肤上皮屏障会受到严重影响。Inoue 等<sup>[21]</sup>研究表明,缺血再灌注后大鼠回肠屏障功能的损害与 Occludin、Claudin-3 的表达改变有关。胞浆蛋白 ZO 是一类外周膜蛋白,有 3 种异构体(ZO-1、ZO-2、ZO-3),它们一端可以与跨膜蛋白 Occludin、Claudins 的胞内域相连,另一端可以与肌动蛋白相结合,从而将跨膜蛋白与细胞内骨架系统连接起来,构成稳定的紧密连接结构<sup>[22]</sup>。胞浆蛋白 ZO 可以将不同的信号传递到跨膜蛋白 Claudins、Occludin,对紧密连接结构的“开启”与“闭合”进行调控<sup>[23]</sup>。有研究表明,ZO-1 的结构和功能与紧密连接的其他成员关系密切,多数情况下,只要 ZO-1 受到破坏,紧密连接的功能也会随之变化,所以,ZO-1 常被用来作为组织紧密连接屏障功能和通透性的指标<sup>[24]</sup>。刘圣炬等<sup>[25]</sup>研究表明,当大鼠胆汁淤积时,ZO-1 表达下降对肠黏膜屏障的破坏起了主要作用。体外研究发现,一些细胞因子会降低 ZO-1 的表达而降低肠上皮细胞的屏障功能<sup>[26]</sup>。另有学者观察到,烧伤后早期肠道通透性增加的同时,细胞连接处 ZO-1 和 Occludin 减少<sup>[27]</sup>。本实验中,在添加氧化鱼油后,闭锁蛋白 Occludin 基因表达活性出现不同程度的下降,闭合蛋白 Claudin-3、Claudin-15a 基因表达活性显著下降( $P < 0.05$ ),胞浆蛋白 ZO-1、ZO-2、ZO-3 基因表达活性显著下降( $P < 0.05$ )。上述结果表明,饲料氧化鱼油减少了闭锁蛋白 Occludin、闭合蛋白 Claudin-3、Claudin-15a 的生成能力,削弱

了胞浆蛋白 ZO 对紧密连接“锁扣”结构的“闭合”调控,通过打开紧密连接“锁扣”结构的方式,导致肠黏膜细胞间紧密连接结构的破坏和肠黏膜通透性的增加,损伤肠黏膜屏障。

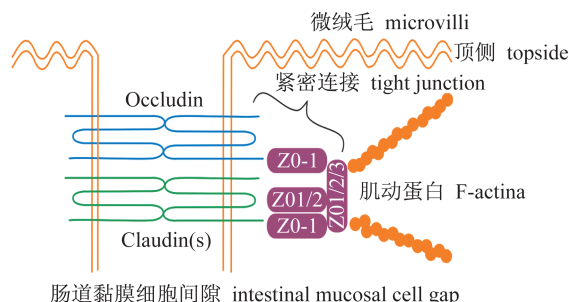


图 2 肠上皮细胞间的紧密连接示意图

Fig. 2 The tight junctions of intestinal epithelial intercellular

陈群等<sup>[16]</sup>研究发现,饲喂氧化脂肪会导致氧化应激发生,诱发消化道损伤。黄琳等<sup>[15]</sup>研究表明,饲喂氧化鱼油饲料会造成仔猪肠道氧化应激,诱发肠道炎症反应。表 6 结果显示,在添加鱼油或氧化鱼油后,饲料中的 AV 值、POV 值、MDA 含量与闭合蛋白 Claudin-3、Claudin-15a,胞浆蛋白 ZO-1、ZO-2、ZO-3 和闭锁蛋白 Occludin 基因表达活性均显示负相关关系的变化趋势,其中饲料 POV 值、MDA 值与胞浆蛋白 ZO-1 基因表达活性呈极显著负相关关系( $P < 0.05$ ),且符合二次函数关系。表明饲料 AV 值、POV 值、MDA 含量会通过肠黏膜细胞间紧密连接蛋白基因表达活性显著下降、紧密连接的“锁扣”结构被打开和紧密连接结构遭到破坏的方式,导致肠黏膜通透性增加和肠黏膜屏障受损。

作为肠黏膜细胞间通路的关键结构,紧密连接结构只允许离子和可溶性的小分子通过,大分子物质及微生物难以通过,通过紧密连接结构的“开启”与“闭合”实现肠黏膜细胞间通路的“开启”与“闭合”。Schmitz 等<sup>[28]</sup>研究发现,紧密连接发生变化会使肠黏膜屏障受损。如图版所示,6S 组紧密连接结构没有出现缝隙,在添加氧化鱼油后,2OF、4OF 组紧密连接结构开始出现缝隙,并且逐步扩大,6OF 组紧密连接结构严重受损,缝隙达到最大。这些结果表明,在添加氧化鱼油后,紧密连接的“锁扣”结构被打开,紧密连接结构遭到破坏,导致肠黏膜通透性增加。这也为肠黏膜细胞间紧密连接蛋白基因表达活性显著下降导致

肠道紧密连接结构的破坏和肠黏膜通透性的增加提供了很好的证据。

#### 4 结论

在饲料中添加氧化鱼油后,氧化鱼油中的过氧化物、丙二醛等油脂氧化产物会使肠黏膜细胞间紧密连接蛋白基因表达活性显著下降,紧密连接结构遭到破坏,导致肠黏膜通透性增加和肠黏膜屏障损伤,最终破坏肠道屏障功能的完整性。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Epstein M D, Tchervakov J I, Alexander J W, *et al.* Increased gut permeability following burn trauma [ J ]. *Archives of Surgery*, 1991, 126(2) : 198 - 200.
- [ 2 ] Saadia R, Schein M, Macfarlane C, *et al.* Gut barrier function and the surgeon [ J ]. *British Journal of Surgery*, 1990, 77(5) : 487 - 492.
- [ 3 ] Cong X, Meng Q Y, Wu L L. Salivary gland cell tight junctions progress [ J ]. *Progress in Physiological Sciences*, 2012, 43(3) : 193 - 197. [ 丛馨, 孟庆娱, 吴立玲. 涎腺细胞紧密连接的研究进展. *生理科学进展*, 2012, 43(3) : 193 - 197. ]
- [ 4 ] Tsukita S, Furuse M. Occludin and claudins in tight junction strands: leading or supporting players? [ J ]. *Trends Cell Biology*, 1999, 9(7) : 268 - 273.
- [ 5 ] Mitic L L, Van Itallie C M; Anderson J M, *et al.* Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins [ J ]. *American Journal of Physiology - Gastrointest and Liver Physiology*, 2000, 279(2) : 250 - 254.
- [ 6 ] Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, *et al.* A single gene product, claudin - 1 or - 2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts [ J ]. *Journal of Cell Biology*, 1998, 143 ( 2 ) : 391 - 401.
- [ 7 ] Keno B H, Schafer S, Kuhn C, *et al.* Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein [ J ]. *Cell Biology*, 1996, 134(4) : 1003 - 1018.
- [ 8 ] Weber E, Berta G, Tousson A, *et al.* Expression and polarized targeting of a rab3 isoform in epithelial cells [ J ]. *Journal of Cell Biology*, 1994, 125 ( 3 ) : 583 - 594.
- [ 9 ] Gao Z G, Qin H L. The biological functions of intestinal epithelial tight junctions and its role in intestinal barrier [ J ]. *Parenteral & Enteral Nutrition*, 2005, 12(5) : 299 - 302. [ 高志光, 秦环龙. 肠上皮细胞紧密连接的生物学功能及在肠屏障中的作用. *肠外与肠内营养*, 2005, 12(5) : 299 - 302. ]
- [ 10 ] Li Q W, Jia J W. Research Progress of Intestinal Permeability [ J ]. *Medical Recapitulste*, 2007, 13 ( 18 ) : 1384 - 1385. [ 李秋伟, 贾建伟. 肠黏膜通透性的研究进展. *医学综述*, 2007, 13 ( 18 ) : 1384 - 1385. ]
- [ 11 ] Li J Y, Lv Y. The significance of changes and in diamine oxidase activity in intestinal injury after trauma [ J ]. *Chinese Critical Care Medicine*, 2000, 12 ( 8 ) : 482 - 484. [ 黎君友, 吕艺. 二胺氧化酶在创伤后肠道损伤中变化及意义. *中国危重病急救医学*, 2000, 12(8) : 482 - 484. ]
- [ 12 ] Sun X Q, Fu X B, Zhang R, *et al.* The effect of intestinal ischemia - reperfusion injury on intestinal permeability [ J ]. *Journal of Traumatic Surgery*, 1999, 1(4) : 208 - 210. [ 孙晓庆, 付小兵, 张蓉, 等. 大鼠肠缺血 - 再灌注损伤对肠黏膜通透性的影响. *创伤外科杂志*, 1999, 1(4) : 208 - 210. ]
- [ 13 ] Lenz A, Franklin G A, Cheadle W G. Systemic inflammation after trauma [ J ]. *Injury*, 2007, 38(12) : 1336 - 1345.
- [ 14 ] Liu H P, Hu C H, Xu Y. Effects of Early Weaning on Intestinal Permeability and Tight Junction Protein Occludin mRNA Expression Levels of Piglets [ J ]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2008, 20 ( 4 ) : 442 - 446. [ 刘海萍, 胡彩虹, 徐勇. 早期断奶对仔猪肠通透性和肠上皮紧密连接蛋白 Occludin mRNA 表达的影响. *动物营养学报*, 2008, 20(4) : 442 - 446. ]
- [ 15 ] Huang L, Jiang Z Y, Lin Y C, *et al.* Influence of Oxidized Fish Oil on Intestinal Mucosal Immune Response in Neonatal Piglets and the Use of Soybean Isoflavones as an Intervention Measure [ J ]. *Acta Zoonutrimenta Sinica*, 2011, 23 ( 5 ) : 799 - 806. [ 黄琳, 蒋宗勇, 林映才, 等. 饲喂氧化鱼油对新生仔猪肠道黏膜免疫应答的影响及大豆异黄酮的干预作用. *动物营养学报*, 2011, 23(5) : 799 - 806. ]
- [ 16 ] Chen Q, Le G W, Shi Y H, *et al.* Advance in the Damage of Reactive Oxygen Species on the Gastrointestinal Tract in Animal [ J ]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2006, 33 ( 11 ) : 106 - 108. [ 陈群, 乐国伟, 施用晖, 等. 氧自由基对动物消化道损伤及干预研究进展. *中国畜牧兽医*, 2006, 33(11) : 106 - 108. ]
- [ 17 ] Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, *et al.* Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation [ J ]. *The Journal of Cell Biology*,

- 1997,137(6):1393-1401.
- [18] Itoh M, Furuse M, Morita K, *et al.* Direct binding of three tight junction associated MAGUKs, ZO - 1, ZO - 2, and ZO - 3, with the COOH termini of claudins [ J ]. *Journal Cell Biology*, 1999, 147 ( 6 ): 1351 - 1363.
- [19] Turksen K, Troy T C. Barriers built on claudins [ J ]. *Journal of Cell Science*, 2004, 117 ( 12 ): 2435 - 2447.
- [20] Furuse M, Hata M, Furuse K, *et al.* Claudin - based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier; a lesson from claudin - 1 - deficient mice [ J ]. *Journal of Cell Biology*, 2002, 156 ( 6 ): 1099 - 1111.
- [21] Inoue K, Oyamada M, Mitsufuji S, *et al.* Different changes in the expression of multiple kinds of tight - junction proteins during ischemia - reperfusion injury of the rat ileum [ J ]. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 2006, 39 ( 2 ): 35 - 45.
- [22] Keon B H, Schäfer S, Kuhn C, *et al.* Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein [ J ]. *Journal of Cell Biology*, 1996, 134 ( 4 ): 1003 - 1018.
- [23] Zhong Y, Saitoh T, Minase T, *et al.* Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction associated protein distinct from ZO - 1, cingulin and ZO - 2 [ J ]. *Journal of Cell Biology*, 1993, 120 ( 2 ): 477 - 483.
- [24] Utepbergenov D I, Fanning A S, Anderson J M. Dimerization of the scaffolding protein ZO - 1 through the second PDZ domain [ J ]. *Journal of Biology Chemistry*, 2006, 281 ( 34 ): 24671 - 24677.
- [25] Liu S X, Huang Z H, Lin L. Changes of expressions of intestinal mucosal tight junction proteins ZO - 1 and Occludin in rats with acute intrahepatic cholestasis [ J ]. *Journal of Applied Clinical Pediatrics*, 2011, 26 ( 1 ): 45 - 47. [ 刘圣烜, 黄志华, 林莉. 急性肝内胆汁淤积大鼠小肠上皮紧密连接蛋白 ZO - 1 和 Occludin 表达的变化. *实用儿科临床杂志*, 2011, 26 ( 1 ): 45 - 47. ]
- [26] Chen C L, Liu Y L, Wang P, *et al.* Role of MLC phosphorylation in intestinal epithelial barrier dysfunction induced by severe burn injury [ J ]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2008, 30 ( 15 ): 1434 - 1437. [ 陈传莉, 刘依凌, 王裴, 等. 严重烧伤后肠黏膜肌球蛋白轻链磷酸化表达改变及其意义. *第三军医大学学报*, 2008, 30 ( 15 ): 1434 - 1437. ]
- [27] Costantini T W, Loomis W H, Putnam J G, *et al.* Burn - induced gut barrier injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition; effects on tight junction structural proteins [ J ]. *Shock*, 2009, 31 ( 4 ): 416 - 422.
- [28] Schmitz H, Bamteyer C, Fromm M, *et al.* Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis [ J ]. *Gastroenterology*, 1999, 116 ( 2 ): 301 - 309.



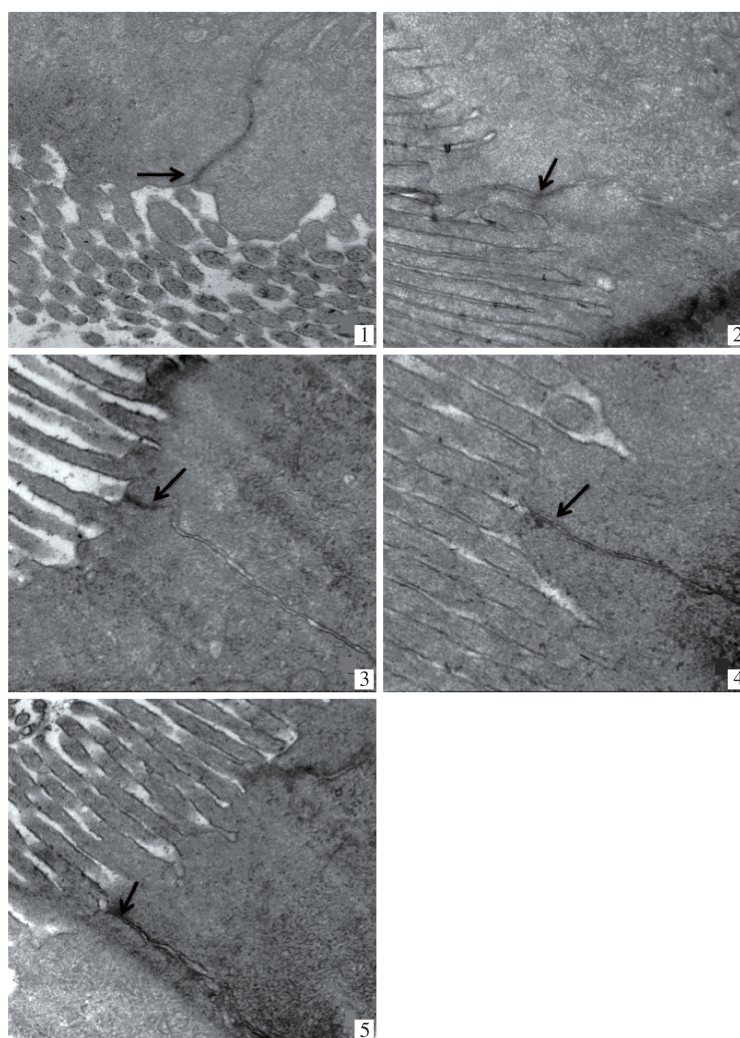
## The study on damage of intestinal mucosa barrier structure with oxidized fish oil diets in *Ctenopharyngodon idella*

HUANG Yuwei, YE Yuantu\*, CAI Chunfang, WU Ping, CHEN Kequan, WU Tao,  
XU Denghui, PENG Kan, LIN Xiuxiu, LUO Qigang  
(Key Laboratory of Aquatic Animal Nutrition in Jiangsu Province, Preclinical Medicine and Biological  
Science College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

**Abstract:** A 72-day experiment was carried out to investigate the effect of oxidized fish oil on intestinal mucosa barrier structure and intestinal permeability of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [average weight ( $74.8 \pm 1.2$ ) g]. Five diets containing different levels of soybean oil, fish oil and oxidized fish oil (6% fish oil, 6% soybean oil, 2% oxidized fish oil; 4% oxidized fish oil, 6% oxidized fish oil) were evaluated according to the equal standards of nitrogen and energy. Using qRT-PCR method, the gene expression levels about atresia protein Occludin, closed protein Claudin3, Claudin15a and cytoplasmic protein ZO-1, ZO-2, ZO-3 in the intestine were measured, and TEM observations of intestinal mucosal cells tight junction and intestinal permeability index were comprehensively analyzed. The results showed that, (1) Serum diamine oxidase activity, endotoxin and D-lactic acid content significantly increased under oxidized fish oil ( $P < 0.05$ ). (2) The gene expression of closed protein Claudin-3, Claudin-15a and cytoplasmic protein ZO-1, ZO-2, ZO-3 were significantly decreased under oxidized fish oil ( $P < 0.05$ ). (3) The tight junction structure of intestinal mucosal cells displayed gap under oxidized fish oil. (4) The values of AV, POV and the content of MDA in diet downregulated with closed protein Claudin3, Claudin15a and cytoplasmic protein ZO-1, ZO-2, ZO-3 gene expression, besides, the value of POV and the content of MDA in diet significantly downregulated with cytoplasmic protein ZO-1 gene expression under oxidized fish oil ( $P < 0.05$ ). Collectively, the present study demonstrated that after adding oxidized fish oil in feed, peroxide oxidation and other oil oxidation product like malondialdehyde of fish oil led to the fact that tight junction protein gene expression activity significantly decreased and tight junction physical structure significant damaged, resulting in the fact that intestinal barrier structure was destroyed and intestinal permeability significantly increased.

**Key words:** oxidized fish oil; grass carp; intestine; cell tight junction; permeability

**Corresponding author:** YE Yuantu. E-mail: yeyt@suda.edu.cn



图版 草鱼肠道紧密连接的透射电镜图 (×12 000)

1. 6S 组, 肠道紧密连接正常(↑); 2. 6F 组, 紧密连接出现缝隙(↑); 3. 2OF 组, 紧密连接扩张(↑); 4. 4OF 组, 紧密连接受损, 缝隙明显(↑); 5. 6OF 组, 紧密连接严重受损, 结构完全打开(↑)

**Plate TEM micrographs of the junction structures in grass carp**

1. 6S group, midgut tight junction was normal (↑); 2. 6F group, there was space between the tight junction (↑); 3. 2OF group, the space between tight junction was enlarged (↑); 4. 4OF group, the tight junction was injured and the space was obvious (↑); 5. 6OF group, the tight junction was injured badly and completely opened (↑)