

## 胆碱对高脂胁迫的团头鲂肝脏抗氧化、 组织结构和免疫力的影响

张定东, 李俊怡, 王冰柯, 李向飞, 蒋广震,  
李鹏飞, 蔡万存, 刘文斌\*

(南京农业大学动物科技学院, 江苏省水产动物营养重点实验室, 江苏南京 210095)

**摘要:** 以初始体质量(42.20±0.34) g团头鲂为研究对象, 研究饲料中添加胆碱对高脂胁迫团头鲂肝脏抗氧化、组织结构和免疫力的影响。实验采用2×2因子设计方法, 共配置2个脂肪水平(5%和15%)和2个胆碱水平(1200和2200 mg/kg)的等氮饲料4组。养殖实验在室内循环水系统中进行, 养殖周期为8周。养殖实验结束后进行血液和肝脏生化指标、肝脏抗氧化指标和非特异性免疫指标等的检测分析, 以及观察肝细胞的超微结构变化。结果显示, 当饲料中添加1200 mg/kg胆碱时, 随着脂肪水平的升高, 团头鲂肝脏脂肪含量和甘油三酯浓度显著增加, 而血浆中谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)活性则显著上升; 肝脏中丙二醛(MDA)含量、总超氧化物歧化酶(t-SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性等显著升高; 血液中白细胞数、溶菌酶活性、总蛋白和球蛋白水平以及还原型谷胱甘肽(GSH)活性显著降低; 超微结构观察到肝细胞中存在大量脂滴, 伴随着细胞核变性、核膜残缺、线粒体水肿等异常现象。这些结果表明高脂日粮不仅导致肝细胞的结构和功能的损伤, 而且造成肝脏氧化应激和机体免疫力的下降。在高脂饲料(15%脂肪)中添加2200 mg/kg胆碱, 可显著降低肝脏脂肪含量、血浆谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)活性, 显著降低肝脏丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性, 并显著提高白细胞数和球蛋白水平以及还原型谷胱甘肽(GSH)活性, 同时肝细胞形态及细胞器结构也趋于正常。研究表明, 添加适量胆碱能够减少肝脏脂肪沉积, 维持肝脏结构和功能的正常, 并增强团头鲂抗氧化能力和机体免疫力, 继而保持鱼体的健康。

**关键词:** 团头鲂; 胆碱; 高脂; 抗氧化; 免疫; 超微结构

**中图分类号:** S 963.73

**文献标志码:** A

随着集约化水产养殖的迅猛发展, 养殖密度的加大, 生产周期的缩短对高效率、低成本饲料的需求不断增加, 为达到节约蛋白质、提高饲料利用率的目的, 往往通过提高饲料脂肪水平来实现<sup>[1-3]</sup>。脂肪不仅能够为机体提供生命活动所需的能量, 而且是必需脂肪酸、磷脂等体内所需的活性物质的来源。但过多的脂肪添加会造成肝脏脂肪沉积, 造成机体代谢紊乱,

影响鱼类的生长和繁殖等, 从而给水产养殖业的健康和可持续发展造成了严重的威胁。胆碱作为水产动物必需的营养素, 在动物体内发挥了重要的生理功能, 能够有效地促进生长、提高饲料利用率、减少肝脏脂肪沉积<sup>[4-6]</sup>。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)属鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)鱼类, 因其具有成活率高、生长速度快、营养丰富、肉质鲜

收稿日期: 2015-10-14 修回日期: 2016-08-15

资助项目: 国家自然科学基金(C190401); 国家大宗淡水鱼产业技术体系资金(CARS-49-20)

通信作者: 刘文斌, E-mail: wbliu@njau.edu.cn

美等优点,已成为我国重要的淡水养殖品种<sup>[7]</sup>。与其他草食性鱼类相似,团头鲂对饲料中脂肪的耐受性较差,过高的脂肪水平会导致鱼类生长、生理等异常,甚至出现脂肪肝症状<sup>[8-9]</sup>。以往胆碱对团头鲂的作用也较多集中于生长性能、饲料利用等研究上,关于胆碱对团头鲂肝脏组织结构、功能以及脂肪代谢的影响却鲜有报道。鉴于此,本实验以投喂高脂饲料的团头鲂为实验模型,旨在探究胆碱对团头鲂肝脏抗氧化、组织结构和免疫力的影响,为开发团头鲂和其他水产养殖品种更有效健康的饲料配方提供基础数据,同时为进一步研究胆碱对脂肪代谢的调控机制提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验饲料、实验鱼及养殖管理

实验配置4组等氮半纯合饲料,饲料以酪蛋白、鱼粉和豆粕为蛋白源,鱼油和豆油等比例添加作为脂肪源,以玉米淀粉和 $\alpha$ -淀粉为糖源。实验采用2×2因子设计:饲料脂肪水平设为5%和15%,胆碱水平设为1200和2200 mg/kg。实验饲料采用无胆碱的维生素预混料,饲料原料中鱼粉和豆粕的胆碱含量约600 mg/kg,因此配方中需分别添加约600和1600 mg/kg的胆碱(即约691和1843 mg/kg的氯化胆碱)。饲料配方中添加的氯化胆碱(Sigma, St. Louis, MO, USA)是固体状,分析纯。实验饲料中胆碱水平实测值为1232和2232 mg/kg。实验饲料配方及营养组成见表1。将各种原料粉碎过80目筛,并按配方比例称重,逐级混匀。使用实验室内的制粒机加工为颗粒饲料,自然晾干后置于-20℃冰箱内储存备用。

实验团头鲂幼鱼取自江苏广陵长江系家鱼原种场,养殖实验在南京农业大学江苏省水产动物营养重点实验室的室内循环水系统中进行。实验鱼驯化1周后,选择健康、规格基本一致,均重为(42.20±0.34) g的团头鲂幼鱼随机分配到12个圆柱形缸(150 L)中,每缸15尾。

实验开始后,随机投喂4种实验饲料,每种饲料3个重复。每天定时饱食投喂3次(8:00, 12:00, 17:00),使其自由采食。24 h连续增氧,保证氧气充足,保持室内安静,每天换水(水源是曝气后的自来水),每次换水1/4~1/3,并定期检查循环水系统。养殖期间确保水温25~27℃,

溶解氧5.0~6.0 mg/L, pH 7.2~7.6,光照12 h:12 h(7:30—19:30)。养殖实验期为8周。

### 1.2 样品采集及处理

实验结束后采样,将鱼饥饿24 h后置于浓度为100 mg/L的MS-222(Sigma, 美国)中将鱼麻醉,用一次性医用注射器(用肝素溶液润洗)从尾静脉取血,留取少量全血用于血液红细胞和白细胞计数,将其余装有血液的抗凝管放入离心机中,4℃下850×g离心10 min,吸取上层血清样品后-20℃保存待分析。采血之后的样本在冰袋上迅速解剖分离出肝脏,存放在-70℃冰箱中待测。此外,每缸取两尾鱼的肝脏,在大致相同的位置切取小块组织,置于2.5%的戊二醛中固定,用于组织学观察。

### 1.3 样品的测定和分析

**饲料营养成分分析** 将实验饲料称重后置于培养皿中,在105℃烘箱中至恒重后得到水分含量;采用全自动凯氏定氮仪(FOSS KT260,瑞士)测定粗蛋白的含量;粗脂肪采用索氏抽提法测定,将样品置于坩埚中,在电炉上碳化后,置于马福炉中(550±20)℃灼烧后确定粗灰分含量;将样品进行酸碱处理后,采用全自动纤维分析仪(ANKOM A2000i,美国)测定饲料中的粗纤维含量。

**血液和肝脏生化指标测定** 血浆谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)活性采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定,血浆和肝脏甘油三酯(TG)含量均采用北京北化康泰临床试剂有限公司生产的试剂盒进行测定,具体操作步骤参照试剂盒说明书。肝脏脂肪含量采用氯仿-甲醇抽提法测定。

**肝脏抗氧化指标测定** 肝脏匀浆液离心吸取上清液后待测。总超氧化物歧化酶(t-SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)的活性、还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)的含量均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定,具体测定步骤参见试剂盒说明书。匀浆液蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法。

**非特异性免疫指标测定** 全血红细胞和白细胞的计数方法参照Johnson等<sup>[10]</sup>。血浆溶菌酶活性、血浆总蛋白和白蛋白含量的测定采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒,详细操

表 1 实验饲料配方及营养组成

Tab. 1 Formulation and proximate composition of experimental diets

原料/% ingredients	胆碱水平/mg/kg choline level			
	脂肪水平为5%组 lipid level		脂肪水平为15%组 lipid level	
	1200	2200	1200	2200
鱼粉 fish meal	15.0	15.0	15.0	15.0
豆粕 soybean meal	15.0	15.0	15.0	15.0
酪蛋白 casein	20.0	20.0	20.0	20.0
玉米淀粉 corn starch	20.0	20.0	20.0	20.0
$\alpha$ -淀粉 $\alpha$ -starch	5.0	5.0	5.0	5.0
鱼油:豆油(1:1) fish oil:soybean oil (1:1)	3.8	3.8	13.8	13.8
纤维素 cellulose	15.1	15.1	5.1	5.1
预混料 premix <sup>1</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0
磷酸二氢钙 Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.8	1.8	1.8	1.8
食盐 sodium chloride	0.3	0.3	0.3	0.3
羧甲基纤维素 carboxymethyl cellulose	3.0	3.0	3.0	3.0
氯化胆碱 choline chloride	0.07	0.18	0.07	0.18
<b>营养组成/% proximate composition</b>				
水分 moisture	9.8	9.9	9.7	9.7
粗蛋白 crude protein	31.2	31.3	31.1	31.6
粗脂肪 crude lipid	4.9	4.9	14.9	15.1
粗纤维 crude fiber	13.9	13.8	4.1	4.2
灰分 ash	7.8	7.7	8.0	8.1
无氮浸出物 nitrogen-free extract <sup>2</sup>	32.4	32.4	32.2	31.3

注: 1. 每千克预混料包含: CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 2.0 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 25 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 22 g, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 7 g, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 0.04 g, KI 0.026 g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.1 g, 维生素A 900 000 IU, 维生素D 200 000 IU, 维生素E 4500 mg, 维生素K<sub>3</sub> 220 mg, 维生素B<sub>1</sub> 320 mg, 维生素B<sub>2</sub> 1090 mg, 维生素B<sub>6</sub> 500 mg, 维生素B<sub>12</sub> 1.6 mg, 维生素C 10 000 mg, 泛酸 1000 mg, 叶酸 165 mg, 烟酸 2500 mg, 生物素 100 mg, 肌醇 15 000 mg。2. 无氮浸出物含量=100-(水分+粗蛋白+粗脂肪+粗灰分+粗纤维)

Notes: 1. The premix provides per kilogram of diet: CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 2.0 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 25 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 22 g, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 7 g, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 0.04 g, KI 0.026 g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.1 g, VA 900 000 IU, VD 200 000 IU, VE 4500 mg, VK<sub>3</sub> 220 mg, VB<sub>1</sub> 320 mg, VB<sub>2</sub> 1090 mg, VB<sub>6</sub> 500 mg, VB<sub>12</sub> 1.6 mg, VC 10 000 mg, Pantothenate 1000 mg, Folic acid 165 mg, Niacin 2500 mg, Biotin 100 mg, Myoinositol 15 000 mg。2. Nitrogen-free extract content=100-(moisture+crudeprotein+crudelipid+ash+crude fiber)

作见试剂盒说明书。血浆球蛋白含量=总蛋白含量-白蛋白含量。

肝脏细胞超微结构的观察 肝脏样品用2.5%的戊二醛固定24 h以上, 再经过固定、脱水、包埋处理后, 用超薄切片(RMC PowerTome XL)切成70 nm厚度, 最后将染色后的切片置于透射电子显微镜(Hitachi H-7650)观察细胞超微结构。

#### 1.4 数据统计与分析

原始数据经Excel计算整理后, 采用SPSS 16.0

对实验数据进行统计分析, 用Duncan氏多重检验法比较各组间的差异,  $P < 0.05$ 表示差异显著。实验结果以平均值±标准误(mean±SE)表示。

## 2 结果

### 2.1 饲料中的脂肪和胆碱水平对团头鲂血液和肝脏生化指标的影响

随着饲料脂肪水平的上升, 血浆谷草转氨酶(AST)活性显著升高( $P < 0.05$ ), 但随着饲料胆碱

的增加,其活性显著下降( $P<0.05$ )(表2)。血浆谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)活性在15%脂肪和1200 mg/kg胆碱组显著高于其他各组( $P<0.05$ )。在5%脂肪组增加胆碱添加量,其均无显著差异( $P>0.05$ )。随饲料脂肪水平的上升,肝脏脂肪含量、肝脏和血浆的甘油三酯(TG)水平显著升高( $P<0.05$ )。三者均受饲料脂肪和胆碱的交互作用影响,并在15%脂肪和1200 mg/kg胆碱组均显著高于其他各组( $P<0.05$ )。在15%脂肪组,肝脏脂肪含量、肝脏和血浆的TG水平均随着饲料胆碱水平的升高显著降低( $P<0.05$ )。

## 2.2 饲料中的脂肪和胆碱水平对团头鲂肝脏抗氧化指标的影响

随着饲料脂肪水平的升高,肝脏超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)的活性以及丙二醛(MDA)含量均显著( $P<0.05$ )上升;还原型谷胱甘肽(GSH)活性显著下降。在15%脂肪组,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量随饲料中胆碱水平的增加而显著降低( $P<0.05$ );还原型谷胱甘肽(GSH)活性显著上升(表3)。SOD、CAT、MDA和GSH均受饲料脂肪和胆碱水平交互作用影响,SOD、CAT、MDA在15%脂肪和1200 mg/kg胆碱组均显著高于其他各组( $P<0.05$ ),GSH在15%脂肪和1200 mg/kg胆碱组显著低于其他各组( $P<0.05$ )。

表2 饲料中不同的脂肪和胆碱水平对团头鲂肝脏和血液生化指标的影响

Tab. 2 Hepatic and plasma lipid composition of blunt snout bream fed diets with different lipid and choline levels

饲料 diets		谷草转氨酶/ (U/L) AST	谷丙转氨酶/ (U/L) ALT	肝脏脂肪含量/% lipid content	肝脏甘油三酯/ (mg/g) TG	血液甘油三酯/ (mmol/L) TG
脂肪/% lipid	胆碱/(mg/kg) choline					
5	1200	3.83±0.07 <sup>c</sup>	0.75±0.17 <sup>b</sup>	6.83±0.41 <sup>c</sup>	48.4±4.47 <sup>b</sup>	1242±76.9 <sup>b</sup>
5	2200	3.58±0.19 <sup>c</sup>	0.65±0.06 <sup>b</sup>	6.7±0.17 <sup>c</sup>	49.9±0.61 <sup>b</sup>	1321±69.0 <sup>bc</sup>
15	1200	6.86±0.22 <sup>a</sup>	1.02±0.46 <sup>a</sup>	12.8±0.22 <sup>a</sup>	75.8±2.10 <sup>a</sup>	1580±72.4 <sup>a</sup>
15	2200	4.75±0.18 <sup>b</sup>	0.84±0.02 <sup>ab</sup>	8.92±0.06 <sup>b</sup>	54.8±1.52 <sup>b</sup>	1495±29.7 <sup>ab</sup>
胆碱 choline		0.000	0.016	0.000	0.001	0.000
脂肪 lipid		0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
交互作用 interaction		0.000	0.490	0.000	0.000	0.001

双因素分析 Two-Way ANOVA

注:表中数据表示为平均值±标准误(mean±SE)。同列数据后标注不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ),下同

Notes: Values are presented as mean values and standard error (mean±SE). Mean values in the same column with different letters indicate significant differences between treatments ( $P<0.05$ ), the same below

表3 饲料中不同的脂肪和胆碱水平对团头鲂肝脏抗氧化指标的影响

Tab. 3 Hepatic antioxidant parameters in blunt snout bream fed diets with different lipid and choline levels

饲料 diets		总超氧化物歧化酶/ (U/mg prot) t-SOD	过氧化氢酶/ (U/mg prot) CAT	谷胱甘肽过氧化物酶 (U/mg prot) GPX	还原型谷胱甘肽/ (mg/g prot) GSH	丙二醛 (nmol/mg prot) MDA
脂肪/% lipid	胆碱/(mg/kg) choline					
5	1200	154±5.5 <sup>b</sup>	67.5±3.3 <sup>c</sup>	21.8±0.78 <sup>b</sup>	14.2±0.27 <sup>a</sup>	6.82±0.3 <sup>c</sup>
5	2200	158±4.7 <sup>b</sup>	77.3±3.6 <sup>b</sup>	21.5±0.92 <sup>b</sup>	14.4±0.27 <sup>a</sup>	6.24±0.19 <sup>c</sup>
15	1200	192±6.5 <sup>a</sup>	88.9±1.6 <sup>a</sup>	34.8±3.67 <sup>a</sup>	9.28±0.34 <sup>b</sup>	12.8±0.14 <sup>a</sup>
15	2200	166±4.8 <sup>b</sup>	68.2±1.39 <sup>c</sup>	28.5±2.63 <sup>ab</sup>	13.5±0.49 <sup>a</sup>	7.86±0.29 <sup>b</sup>
胆碱 choline		0.054	0.038	0.169	0.000	0.000
脂肪 lipid		0.010	0.023	0.000	0.000	0.000
交互作用 interaction		0.013	0.000	0.214	0.000	0.000

双因素分析 Two-Way ANOVA

### 2.3 饲料中的脂肪和胆碱水平对团头鲂非特异性免疫的影响

饲料中不同的脂肪和胆碱水平对全红细胞数和血浆白蛋白含量均无显著差异( $P>0.05$ )。随着饲料脂肪水平的升高,红细胞数和血浆球蛋白水平显著降低( $P<0.05$ ),并且溶菌酶活性和总蛋白含量均呈现降低的趋势,但差异不显著( $P>0.05$ )(表4)。在15%脂肪组,增加饲料胆碱的添加量显著( $P<0.05$ )提高了溶菌酶活性。饲料脂肪和胆碱对白细胞和球蛋白含量具有交互作用,其含量在15%脂肪和1200 mg/kg胆碱组显著低于其他各组( $P<0.05$ )。

### 2.4 饲料中的脂肪和胆碱水平对团头鲂肝细胞超微结构的影响

在脂肪水平为5%,胆碱水平分别为1200和2200 mg/kg时,肝脏细胞结构均显示正常状态,细胞核圆滑,细胞质均匀,细胞膜清晰可见,粗面内质网排列有序(图版-1~4)。在15%脂肪和1200 mg/kg胆碱组,肝细胞质中充满较大的脂肪滴,有些已超过了细胞核的大小,细胞核被挤压变形,并偏移至细胞边缘处,核膜残缺,并出现线粒体肿胀现象(图版-5,6)。在15%脂肪和2200 mg/kg胆碱组,细胞内有较小的脂肪滴,但细胞形态与细胞超微结构均无异常(图版-7,8)。

## 3 讨论

团头鲂作为草食性鱼类,对高脂的耐受性较低,已有研究表明,团头鲂幼鱼对脂肪的最

适需求量为4%~7%<sup>[11]</sup>。前期的研究表明,5%脂肪需要量是团头鲂较为适宜的脂肪水平,而当饲料中脂肪水平为15%时,能够诱导团头鲂产生较为严重的营养性脂肪肝病症<sup>[8]</sup>,因此本实验日粮选用5%和15%两种脂肪水平。以增重率为评价指标时,团头鲂幼鱼胆碱的需求量约为1200 mg/kg,当饲料中胆碱含量为2000~4000 mg/kg时,能够减少团头鲂肝脏中的脂肪沉积<sup>[12]</sup>,因此本实验选取1200 mg/kg和2200 mg/kg的两种胆碱水平,以期考查适量增加胆碱是否能够缓解高脂饲料(15%脂肪)对团头鲂产生的不利影响。

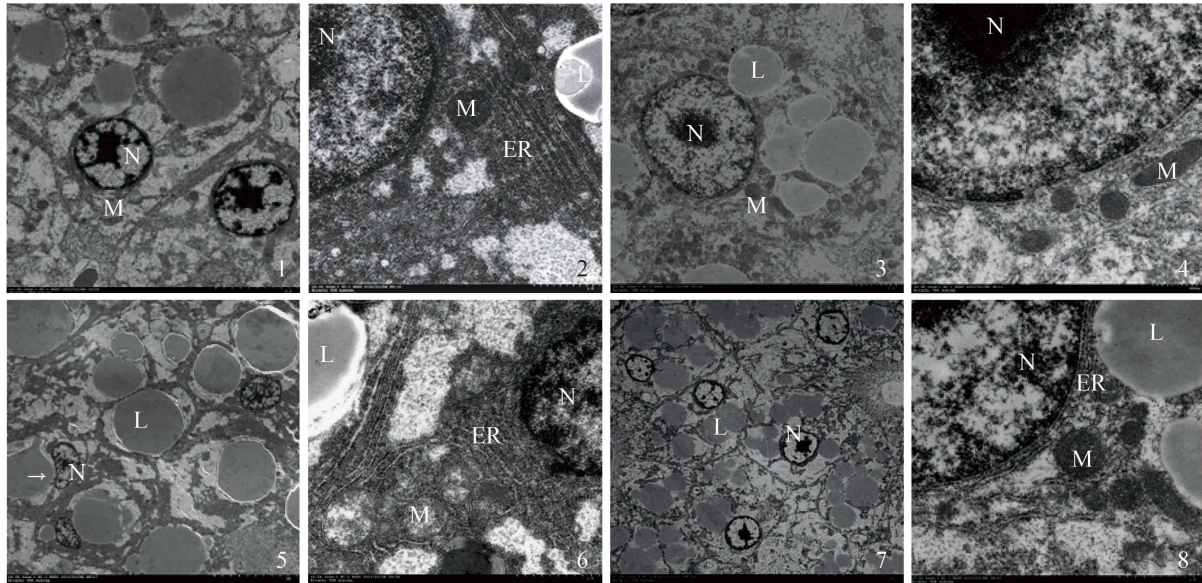
血液和肝脏脂肪含量的分析,可以有效地反映鱼类的脂肪代谢状况。已有研究表明摄入过多的脂肪,可能造成水产动物营养性脂肪肝病症<sup>[13-14]</sup>。本实验结果表明,饲料脂肪水平从5%增加至15%时,肝脏脂肪含量显著上升,同时肝脏甘油三酯(TG)和血浆甘油三酯(TG)的含量也呈现相同的上升趋势,这与在大黄鱼(*Larimichthys crocea*)上的研究一致<sup>[15]</sup>。该结果说明了饲料脂肪水平的增加往往会导致组织脂肪沉积的增加,而过多的游离脂肪酸进一步使肝脏合成的甘油三酯(TG)过量,过量的甘油三酯(TG)被转运出肝脏,使血液甘油三酯(TG)水平升高。在高脂饲料中额外添加胆碱,显著降低了肝脏脂肪和甘油三酯(TG)的含量。类似的实验结果在斑点叉尾(*Ictalurus punctatus*)<sup>[16]</sup>,湖红点鲑(*Salvelinus namaycush*)<sup>[17]</sup>以及杂交条纹鲈(*Morone chrysops* × *M. saxatilis*)<sup>[18]</sup>均有报道。其中原因可能是胆碱作为磷脂酰胆碱的重要组成成分,能够促进脂蛋

表4 饲料中不同的脂肪和胆碱水平对团头鲂非特异性免疫的影响

Tab. 4 Haemato-immunological parameters of blunt snout bream fed diets with different lipid and choline levels

饲料 diets		红细胞计数/ ( $10^6/\mu\text{L}$ ) RBC	白细胞计数/ ( $10^5/\mu\text{L}$ ) WBC	溶菌酶/ (U/mL) lysozyme	总蛋白/ (g/L) total protein	白蛋白/ (g/L) albumin	球蛋白/ (g/L) globulin
脂肪/% lipid	胆碱/(mg/kg) choline						
5	1200	1.05±0.45	2.44±0.05 <sup>a</sup>	21.1±1.86 <sup>a</sup>	20.6±0.13 <sup>a</sup>	5.92±0.41	14.7±0.41 <sup>a</sup>
5	2200	1.17±0.01	2.64±0.07 <sup>a</sup>	20.0±1.08 <sup>a</sup>	20.1±0.27 <sup>ab</sup>	7.63±0.38	12.4±0.34 <sup>b</sup>
15	1200	1.79±0.04	1.40±0.02 <sup>b</sup>	14.9±1.44 <sup>b</sup>	17.7±0.63 <sup>c</sup>	7.07±0.76	10.7±0.32 <sup>c</sup>
15	2200	1.44±0.13	1.95±0.05 <sup>ab</sup>	20.8±1.54 <sup>a</sup>	18.3±1.09 <sup>bc</sup>	6.91±0.11	11.4±0.38 <sup>bc</sup>
胆碱 choline		0.651	0.000	0.119	0.987	0.314	0.044
脂肪 lipid		0.068	0.000	0.092	0.030	0.776	0.000
交互作用 interaction		0.344	0.011	0.061	0.429	0.224	0.010

双因素分析 Two-Way ANOVA



图版 肝脏透射电镜超微结构观察

1, 2. 5%脂肪和1200 mg/kg胆碱组; 3, 4. 5%脂肪和2200 mg/kg胆碱组; 5, 6. 15%脂肪和1200 mg/kg胆碱组; 7, 8. 15%脂肪和2200 mg/kg胆碱组。

N.细胞核, L.脂肪滴, M.线粒体, ER.内质网

Plate TEM images of blunt snout bream hepatocytes ultrastructure

1, 2. 5% lipid and 1200 mg/kg choline group; 3, 4. 5% lipid and 2200 mg/kg choline group; 5, 6. 15% lipid and 1200 mg/kg choline group; 7, 8. 15% lipid and 2200 mg/kg choline group.

N. nucleus, L. lipid droplet, M. mitochondrion, ER. endoplasmic reticulum

白的合成以及肝脏脂肪向外周的转运<sup>[19-20]</sup>, 从而减少了脂肪在肝脏内的沉积。然而在5%脂肪组, 增加饲料中胆碱的添加, 对肝脏脂肪含量并无显著影响, 可能是由于团头鲂对脂肪的适宜需要量约为4%~7%<sup>[21]</sup>, 5%的脂肪水平并不会引起鱼类肝脏脂肪的过多积累。

谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)是氨基酸代谢过程中两个重要的氨基转移酶, 它们活性的变化不仅是判断肝脏组织损伤的一种有效手段, 而且还能够在一定程度上反映鱼类的脂肪代谢状况<sup>[22-23]</sup>。本实验中, 与5%脂肪组相比, 15%脂肪显著提高了血液谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)的活性, 说明过多的脂肪摄入对肝脏造成了损伤, 导致肝脏转氨酶溢出进入血液。在高脂饲料中增加胆碱水平, 显著降低了血液转氨酶的活性。由此可以说明胆碱能够减缓高脂造成的肝脏损伤, 维持肝脏的功能正常, 这与肝细胞超微结构观察得出的结果相吻合。

正常生理状况下, 动物机体代谢过程中会产生活性氧(ROS)<sup>[24]</sup>, 与此同时, 机体本身存在抗氧化体系来防范和抵御活性氧对其造成的危

害<sup>[25]</sup>, 从而保持机体的氧化平衡状态。当机体中活性氧(ROS)产生过多, 无法清除, 则会出现氧化应激现象<sup>[26]</sup>。通常抗氧化系统功能的发挥与营养素之间密切相关<sup>[27]</sup>。之前的研究认为, 还原型谷胱甘肽(GSH)自身易被活性氧(ROS)氧化, 因此能够抵抗氧化应激对组织和细胞带来的损伤。丙二醛(MDA)是脂质过氧化过程的终产物, 其含量的变化是作为考察细胞受威胁程度的指标之一<sup>[28]</sup>。在本实验中, 高脂饲料导致团头鲂肝脏丙二醛(MDA)含量显著增加, 而还原型谷胱甘肽(GSH)含量显著降低, 同时抗氧化物歧化酶(SOD), 过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)的活性显著升高。其中原因可能是为抵御高脂所导致的组织细胞的氧化应激, 机体产生的适应性反应, 继而促使机体抗氧化能力的增强。众所周知, 线粒体是机体生命和代谢活动的能量来源, 因此更易产生活性氧<sup>[24]</sup>。当过多的脂肪进入机体代谢, 活性氧(ROS)就会不断增加<sup>[29-30]</sup>, 同时脂质过氧化抑制了线粒体电子呼吸链的传递, 释放出更多的活性氧<sup>[31]</sup>, 因而造成了组织和细胞的损伤。在高脂饲料中增加胆碱的添加, 显著降低了丙二醛(MDA)含量以及抗氧化

酶的活性, 以此推断胆碱能够促进肝脏脂肪的向外转运, 并且增加了脂肪的分解供能<sup>[32]</sup>, 因而可能在一定程度上减缓了肝脏的氧化应激。

已有大量关于饲料脂肪源和必需脂肪酸对鱼类免疫与抗病力影响的研究<sup>[33]</sup>, 但对脂肪水平与非特异性免疫的关系了解甚少。先前的研究表明, 血液白细胞的数量以及蛋白水平是检测鱼类健康状况的重要指标<sup>[34-36]</sup>。同时, 溶菌酶在鱼类非特异性免疫系统中起关键作用, 其能够有效抵抗病原微生物的入侵<sup>[37-38]</sup>。在本实验中, 15%脂肪组的血液白细胞数、溶菌酶活性、总蛋白和球蛋白水平显著低于5%脂肪组, 说明高脂摄入对团头鲂免疫系统的损害。另一方面, 高脂饲料中过多鱼油的添加, 其中所含的(n-3)系列多不饱和脂肪酸, 可能会增加机体的脂质过氧化<sup>[39]</sup>, 继而大量活性氧的释放会产生细胞毒性<sup>[40]</sup>。在高脂饲料中添加胆碱, 显著提高了团头鲂的免疫机能。究其原因可能有: 首先, 胆碱的摄入对鱼类免疫器官的生长和发育至关重要<sup>[41-42]</sup>; 其二, 胆碱是乙酰胆碱合成的组分, 而后者在脊椎动物的免疫稳态中起重要调节作用<sup>[43]</sup>。然而, 胆碱在团头鲂非特异性免疫中的作用还需要通过进一步的实验来研究探索。

肝脏作为鱼类重要的代谢器官, 对其组织结构的观察是了解和研究鱼类肝脏功能和病理状况的重要手段<sup>[44]</sup>。本实验中, 在饲料脂肪水平5%, 胆碱水平分别为1200和2200 mg/kg时, 肝细胞超微结构显示正常状态。在15%脂肪和1200 mg/kg胆碱组, 细胞内出现大量脂肪滴、胞质空泡化、细胞核变形以及线粒体肿胀等异常现象。在15%脂肪和2200 mg/kg胆碱组, 肝细胞内有较小的脂肪滴, 细胞核圆滑, 细胞质均匀, 细胞膜清晰可见。Du等<sup>[45]</sup>研究表明, 肝脏脂肪的沉积会造成线粒体和内质网的形态异常。线粒体作为脂肪 $\beta$ -氧化的主要场所<sup>[46]</sup>, 其结构异常会抑制线粒体内脂肪分解代谢, 加剧肝脏中脂肪的堆积。内质网是脂蛋白合成、折叠、组装和成熟的场所<sup>[47-48]</sup>, 其结构的变化会阻碍脂蛋白的正常合成与分泌, 因而导致脂肪的转运障碍。然而, 在高脂饲料中增加胆碱添加并未观察到肝细胞内出现以上的异常现象, 因此可以证明适当增加胆碱添加量在一定程度上减少肝脏脂肪沉积, 并进一步影响肝脏的内部结构以及功能。

## 4 小结

本实验证实了高脂饲料会促进团头鲂肝脏脂肪的大量沉积, 同时会引起肝细胞超微结构的异常和肝脏功能的受阻, 继而导致肝脏抗氧化能力和免疫力的下降。但是饲料中添加适量胆碱, 能够在一定程度上缓解由高脂引起的团头鲂生理状态的异常和肝组织结构的损伤, 从而保持鱼体的健康状态。

## 参考文献:

- [1] Du Z Y, Clouet P, Zheng W H, *et al.* Biochemical hepatic alterations and body lipid composition in the herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed high-fat diets[J]. *British Journal of Nutrition*, 2006, 95(5): 905-915.
- [2] Li X F, Jiang Y Y, Liu W B, *et al.* Protein-sparing effect of dietary lipid in practical diets for blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerlings: Effects on digestive and metabolic responses[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2012, 38(2): 529-541.
- [3] Beamish F W H, Medland T E. Protein sparing effects in large rainbow trout, *Salmo gairdneri*[J]. *Aquaculture*, 1986, 55(1): 35-42.
- [4] Craig S R, Gatlin D M III. Growth and body composition of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) fed diets containing lecithin and supplemental choline[J]. *Aquaculture*, 1997, 151(1-4): 259-267.
- [5] Hung S S O. Choline requirement of hatchery-produced juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*)[J]. *Aquaculture*, 1989, 78(2): 183-194.
- [6] Shiao S Y, Lo P S. Dietary choline requirements of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*[J]. *The Journal of Nutrition*, 2000, 130(1): 100-103.
- [7] 柯鸿文. 一种优良淡水鱼-团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)的繁殖和饲养[J]. *水生生物学集刊*, 1975, 5(3): 293-314.  
Ke H W. An excellent fresh-water food fish, *Megalobrama amblycephala*, and its propagating and culturing[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1975, 5(3): 293-314 (in Chinese).
- [8] Lu K L, Xu W N, Li J Y, *et al.* Alterations of liver histology and blood biochemistry in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed high-fat diets[J].

- Fisheries Science, 2013, 79(4): 661-671.
- [9] Li J Y, Li X F, Xu W N, *et al.* Effects of dietary choline supplementation on growth performance, lipid deposition and intestinal enzyme activities of blunt snout bream *Megalobrama amblycephal*, fed high-lipid diet[J]. Aquaculture Nutrition, 2016, 22: 181-190.
- [10] Johnson C W, Timmons D L, Hall P E. Essential laboratory mathematics: concepts and applications for the chemical and clinical laboratory technician[M]. 2nd ed. Thomson Delmar Learning, 2003.
- [11] Li X F, Liu W B, Jiang Y Y, *et al.* Effects of dietary protein and lipid levels in practical diets on growth performance and body composition of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerlings[J]. Aquaculture, 2010, 303(1-4): 65-70.
- [12] Jiang G Z, Wang M, Liu W B, *et al.* Dietary choline requirement for juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. Aquaculture Nutrition, 2013, 19(4): 499-505.
- [13] Du Z Y, Liu Y J, Tian L X, *et al.* Effect of dietary lipid level on growth, feed utilization and body composition by juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Aquaculture Nutrition, 2005, 11(2): 139-146.
- [14] Kjær M A, Vegusdal A, Berge G M, *et al.* Characterisation of lipid transport in Atlantic cod (*Gadus morhua*) when fasted and fed high or low fat diets[J]. Aquaculture, 2009, 288(3-4): 325-336.
- [15] Wang X X, Li Y J, Hou C L, *et al.* Physiological and molecular changes in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.) with highfat diet-induced fatty liver disease [J]. Aquaculture Research, 2015, 46(2): 272-282.
- [16] Wilson R P, Poe W E. Choline nutrition of fingerling channel catfish[J]. Aquaculture, 1988, 68(1): 65-71.
- [17] Ketola H G. Choline metabolism and nutritional requirement of lake trout (*Salvelinus namaycush*)[J]. Journal of Animal Science, 1976, 43(2): 474-477.
- [18] Griffin M E, Wilson K A, White M R, *et al.* Dietary choline requirement of juvenile hybrid striped bass[J]. The Journal of Nutrition, 1994, 124(9): 1685-1689.
- [19] Kuksis A, Mookerjee S. Choline[J]. Nutrition Reviews, 1978, 36(7): 201-207.
- [20] Zeisel S H. Choline: An important nutrient in brain development, liver function and carcinogenesis[J]. Journal of the American College of Nutrition, 1992, 11(5): 473-481.
- [21] Li X F, Liu W B, Lu K L, *et al.* Dietary carbohydrate/lipid ratios affect stress, oxidative status and non-specific immune responses of fingerling blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(2): 316-323.
- [22] Wróblewski F, LaDue J S. Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease[J]. Experimental Biology and Medicine, 1956, 91(4): 569-571.
- [23] Wróblewski F, Ladue J S. Serum glutamic pyruvic transaminase (SGP-T) in hepatic disease: A preliminary report[J]. Annals of Internal Medicine, 1956, 45(5): 801-811.
- [24] Ossani G, Dalghi M, Repetto M. Oxidative damage lipid peroxidation in the kidney of choline-deficient rats[J]. Frontiers in Bioscience, 2007, 12: 1174-1183.
- [25] Sies H. Biochemistry of oxidative stress[J]. Angewandte Chemie International Edition in English, 1986, 25(12): 1058-1071.
- [26] Sies H. Oxidative stress: From basic research to clinical application[J]. The American Journal of Medicine, 1991, 91(3): 31-38.
- [27] Sheikhzadeh N, Tayefi-Nasrabadi H, Oushani A K, *et al.* Effects of *Haematococcus pluvialis* supplementation on antioxidant system and metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2012, 38(2): 413-419.
- [28] Livingstone D R. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture[J]. Revue de Médecine Vétérinaire, 2003, 154(6): 427-430.
- [29] Day C P, James O F W. Hepatic steatosis: Innocent bystander or guilty party[J]. Hepatology, 1998, 27(6): 1463-1466.
- [30] Yang S Q, Zhu H, Li Y B, *et al.* Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000, 378(2): 259-268.
- [31] Pessayre D, Berson A, Fromenty B, *et al.* Mitochondria in steatohepatitis[J]. Seminars in Liver Disease, 2001, 21(1): 57-70.
- [32] Li J Y, Zhang D D, Xu W N, *et al.* Effects of dietary choline supplementation on growth performance and hepatic lipid transport in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fed high-fat diets[J]. Aquaculture, 2014,



- 434: 340-347.
- [33] Blazer V S. Nutrition and disease resistance in fish[J]. Annual Review of Fish Diseases, 1992, 2: 309-323.
- [34] Wiegertjes G F, Stet R J M, Parmentier H K, *et al.* Immunogenetics of disease resistance in fish: A comparative approach[J]. Developmental & Comparative Immunology, 1996, 20(6): 365-381.
- [35] Lin Y H, Shiau S Y. Dietary lipid requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, and effects on immune responses[J]. Aquaculture, 2003, 225(1-4): 243-250.
- [36] Yildirim-Aksoy M, Lim C, Shelby R, *et al.* Increasing fish oil levels in commercial diets influences hematological and immunological responses of channel catfish, *Ictalurus punctatus*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2009, 40(1): 76-86.
- [37] Siwicki A K, Miyazaki T, Komatsu I *et al.* Effects of heat extract from firefly squid, *Watasenia scintillans*, on the nonspecific defence mechanisms and protection against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Archiwum Rybactwa Polskiego, 1998, 6(1): 59-66.
- [38] Tort L, Balasch J C, Mackenzie S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses[J]. Immunología, 2003, 22(3): 277-286.
- [39] Meydani M, Natiello F, Goldin B, *et al.* Effect of long-term fish oil supplementation on vitamin E status and lipid peroxidation in women[J]. The Journal of Nutrition, 1991, 121(4): 484-491.
- [40] De Pablo M A, De Cienfuegos G Á. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions[J]. Immunology and Cell Biology, 2000, 78(1): 31-39.
- [41] Albright C D, da Costa K A, Craciunescu C N, *et al.* Regulation of choline deficiency apoptosis by epidermal growth factor in CWSV-1 rat hepatocytes[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2005, 15(1-4): 59-68.
- [42] Tocher D R, Bendiksen E Å, Campbell P J, *et al.* The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish[J]. Aquaculture, 2008, 280(1-4): 21-34.
- [43] Andersson U, Tracey K J. Reflex principles of immunological homeostasis[J]. Annual Review of Immunology, 2012, 30(1): 313-335.
- [44] Segner H, Braunbeck T. Hepatocellular adaptation to extreme nutritional conditions in ide, *Leuciscus idus melanotus* L. (Cyprinidae). A morphofunctional analysis[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1988, 5(2): 79-97.
- [45] Du Z Y, Clouet P, Huang L M, *et al.* Utilization of different dietary lipid sources at high level in herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Mechanism related to hepatic fatty acid oxidation[J]. Aquaculture Nutrition, 2008, 14(1): 77-92.
- [46] Bilinski E, Jonas R E E. Effects of coenzyme A and carnitine on fatty acid oxidation by rainbow trout mitochondria[J]. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1970, 27(5): 857-864.
- [47] Manoli I, Alesci S, Blackman M R, *et al.* Mitochondria as key components of the stress response[J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2007, 18(5): 190-198.
- [48] Bell R M, Ballas L M, Coleman R A. Lipid topogenesis [J]. Journal of Lipid Research, 1981, 22(3): 391-403.

## Effects of choline on hepatic antioxidant status, ultrastructure and innate immunity in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fed high-fat diet

ZHANG Dingdong, LI Junyi, WANG Bingke, LI Xiangfei, JIANG Guangzhen,  
LI Pengfei, CAI Wancun, LIU Wenbin\*

(Key Laboratory of Aquatic Animal Nutrition and Feed Science of Jiangsu Province, College of Animal Science and Technology,  
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** This study aimed to delineate the potentially beneficial effects of choline on the liver histopathology, antioxidative status and innate immunity in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fed high-fat diet. Fish [weight: (42.20±0.34) g] were fed four experimental diets containing two dietary lipid levels (5% and 15%) and two choline levels (1200 and 2200 mg/kg) in an indoor circulatory system for eight weeks. After the feeding trial, fish were sampled for analysis of plasma and hepatic lipid metabolites, antioxidant enzymes, haemato-immunological parameters and hepatocyte ultrastructural examination. The results showed that high-fat diet significantly increased liver lipid accumulation, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities, malondialdehyde (MDA) concentration, activities of total superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX); meanwhile, high-fat diet remarkably reduced blood leucocyte counts, plasma lysozyme activity, total protein and globulin contents and glutathione (GSH). In addition, obvious ultrastructure abnormalities were observed in the hepatocytes of fish fed 15% lipid and 1200 mg/kg choline with apparent alterations involving mitochondrion, endoplasmic reticulum, nucleus and cell membrane. The results indicated that high-fat diet induced significant liver histological alterations, severe oxidative stress and depressed innate immunity of blunt snout bream. However, high dose of choline in high-fat diet significantly decreased liver lipid content, plasma AST and ALT activities, liver MDA concentration, hepatic SOD and CAT activities, and enhanced blood leucocyte counts and globulin protein level; meanwhile, the structures of hepatocyte organelles were normal. In summary, choline could reduce hepatic excess fat deposition, maintain normal structure and function of liver, and enhance anti-oxidative capacity and innate immunity, and hence it could keep the health of the fish.

**Key words:** *Megalobrama amblycephala*; choline; high-fat diet; antioxidant status; immunity; histopathology

**Corresponding author:** LIU Wenbin. E-mail: wbliu@njau.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (C190401); National Technology System For Conventional Freshwater Fish Industries of China (CARS-49-20)