

微生物源性抗氧化剂对氧化应激大鼠抗氧化能力和肝细胞 DNA 损伤的作用研究

陈小连 龚灵芝 徐建雄

摘要:研究以高脂日粮诱导氧化应激大鼠为模型,应用单细胞凝胶电泳研究微生物源性抗氧化剂对大鼠肝细胞 DNA 损伤的修复作用。结果表明,高脂日粮可致大鼠氧化损伤,显著降低机体抗氧化能力($P<0.05$),肝细胞 DNA 严重损伤($P<0.05$);日粮中补充微生物源性抗氧化剂可提高机体超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性,显著降低丙二醛(MDA)含量,有效降低高脂日粮引起的肝细胞 DNA 的氧化损伤($P<0.05$)。

关键词:微生物 抗氧化剂 氧化应激 彗星试验 保护

中图分类号:S816.7

文献标识码:A

文章编号:1001-991X(2012)01-0014-04

随着畜牧业特别是现代养殖业集约化程度的提高,畜禽遭受到越来越严重的氧化应激。动物发生氧化应激时,氧化系统和抗氧化系统失衡,体内产生的过量自由基会破坏生物膜,影响 DNA、RNA 热稳定性和酶的活性,加速蛋白质分解,动物表现为生产性能下降,免疫力低下,对疾病的易感性增加等,从而诱发一系列的疾病或者死亡,严重影响着机体的健康和动物生产性能的发挥,给畜牧业生产带来巨大经济损失。抗氧化剂能有效清除体内过量的自由基,提高机体抗氧化能力,保护细胞组织免受自由基的损害。目前寻找高效、无毒、价廉的抗氧化剂已在不同领域广泛展开。微生物源性抗氧化剂是一种新型的饲料添加剂,本研究旨在以高脂日粮诱导氧化应激大鼠为模型,研究微生物源性抗氧化剂对大鼠抗氧化能力及肝细胞 DNA 损伤的作用。深入研究此类抗氧化剂清除自由基的机理及对机体氧化损伤的作用,能深化对抗氧化剂的认识,为抗氧化剂的筛选提供思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

微生物源性抗氧化剂主要由乳酸菌、芽孢杆菌和酵母菌等微生物发酵而来,有效微生物含量为 $5.8 \times$

10^9 个/g,由上海创博生态工程有限公司提供;纯葵花籽油购于上海佳格食品有限公司;试验用 SD 大鼠购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)活力、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力、丙二醛(MDA)测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;Trevigen Comet Assay 试剂盒购于上海晶美生物有限公司。

1.2 试验动物及饲养管理

试验选用 30 只 70 日龄雄性 SD 大鼠,SPF 级,体重(300 ± 30) g,饲养于 25 cm×40 cm 上加不锈钢盖的特制塑料盒中,每笼 10 只,饲养于试验动物房内,温度为 28~32 °C 相对湿度 50%~60%,光照明暗各 12 h,自由进食与饮水。

1.3 试验设计与方法

30 只 SD 大鼠随机分为 3 组,每组 10 只,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),应激模型组在基础日粮中添加 20%纯葵花籽油,抗氧化剂组在基础日粮中同时添加 20%纯葵花籽油和 2%微生物源性抗氧化剂。试验预试期 7 d,正试期 42 d。分别在正试期第 21、42 d,每组各取出 5 只,颈椎脱臼法处死、解剖,观察肝组织形态后,迅速分离肝脏,分别制成肝组织匀浆和肝细胞悬液,测定其抗氧化性能和肝细胞 DNA 完整性,分析微生物源性抗氧化剂对多不饱和脂肪酸诱导生自由基动物 DNA 损伤的保护作用。

1.4 测定指标和方法

1.4.1 生长性能指标

在整个试验过程中认真观察大鼠的精神状态、毛色、饮食、饮水和排便等一般状况和记录体重变化。

陈小连,上海交通大学农业与生物学院,上海市兽医生物技术重点实验室,博士 200240,上海闵行区东川路 800 号。

龚灵芝,徐建雄(通讯作者) 单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期 2011-09-21

基金项目 国家自然科学基金[30972103];上海交通大学农业与生物学院青年人才发展培育基金[NRC201102]

1.4.2 抗氧化能力指标

准确称取 1 g 肝组织,用 4 ℃、0.9%的生理盐水充分洗净组织上的血迹之后,按 1:9 比例以此生理盐水为匀浆介质进行匀浆,制备成 10%的肝组织匀浆液。然后将匀浆液在 4 ℃ 3 000 r/min 左右离心 10 min,留上清液待测抗氧化能力。其中超氧化物歧化酶(SOD)活力采用黄嘌呤氧化酶法,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力采用二硫代硝基苯甲酸法(DTNB法)、丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法,蛋白质含量采用考马斯亮蓝法测定,试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.4.3 肝细胞 DNA 损伤检测

采用单细胞凝胶电泳(彗星试验)检测肝细胞 DNA 的损伤情况,方法如下:

1.4.3.1 肝细胞悬液制备

将新鲜大鼠肝组织剪碎,过 100 目不锈钢网,3 层无菌纱布过滤,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加磷酸盐缓冲液(PBS)1 000 r/min 离心 10 min,制成细胞浓度为 1×10^6 个/ml、细胞活力>95%的肝细胞悬液备用。

1.4.3.2 彗星试验条件

试验条件参照试剂盒方法进行。将细胞悬液与 1%低熔点琼脂糖 LMA (37 ℃)按 1:10 混匀,立即移取 75 μ l 混合液于载玻片上,盖上盖玻片,4 ℃静置 10 min,移去盖玻片,将载玻片完全浸入裂解液中,4 ℃避光裂解 60 min。从裂解液中取出载玻片,倒出玻片上多余的裂解液,再将其浸入新鲜配制的碱液(pH 值>13, NaOH 0.6 g, 200 mM EDTA)中,室温避光静置 60 min。取出载玻片,用 1 \times TBE 缓冲液漂洗后,置于水平电泳槽内,倒入 TBE 缓冲液,调节电压 25 V,电流 300 mA,电泳 10 min。电泳完毕后,用 dH₂O 小心漂洗载玻片除去 TBE,每张玻片加 70%的冰乙醇脱水 5 min,空气中自然干燥。

1.4.3.3 染色和观察

取凝胶载玻片,在胶面上滴加 SYBR Green 避光染色 10 min,然后室温晾干用倒置荧光显微镜(激发

波长 515~560 nm)观察玻片。每片随机抓取 40 个彗星图像,并用数码相机拍照后输入计算机储存,用 CASP 软件系统分析彗星图像,以尾长、尾部 DNA%、尾矩、Olive 尾矩(彗星细胞尾部 DNA% \times 头部中心到尾部中心的距离)作为主要分析指标,以评定 DNA 损伤程度。

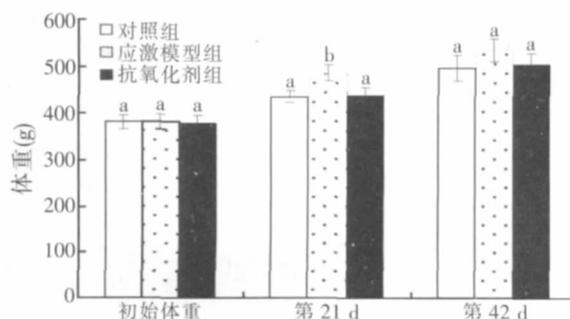
1.5 数据处理

应用统计软件 SPSS 11.0 对试验数据进行单因素方差分析,以 P<0.05 为差异显著性判断标准,数据均以平均数 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 大鼠生长情况

在试验期,各组大鼠均无拒食拒饮现象,成活率 100%。对照组和抗氧化剂组大鼠毛色正常有光泽,活动力强。应激模型组与对照组相比,部分大鼠毛发蓬乱、毛色逐渐发黄,粪质较稀且不成形。4~6 周后大鼠逐渐表现为食少纳呆。各组大鼠体重的变化见图 1,图 1 可见,应激模型组大鼠前期(第 21 d)体重增长迅速,显著高于对照组和抗氧化剂组(P<0.05),抗氧化剂组与对照组间差异不显著(P>0.05),试验后期(第 42 d),各组间均无显著差异(P>0.05)。



注:图中不同字母表示差异显著(P<0.05),相同字母表示差异不显著(P>0.05)。

图 1 微生物源性抗氧化剂对氧化应激大鼠体重的影响

2.2 肝脏组织形态观察(见图 2)

由试验结束解剖大鼠可见,对照组大鼠肝脏颜色鲜红,质地柔软,富有弹性;应激模型组大鼠肝脏体积

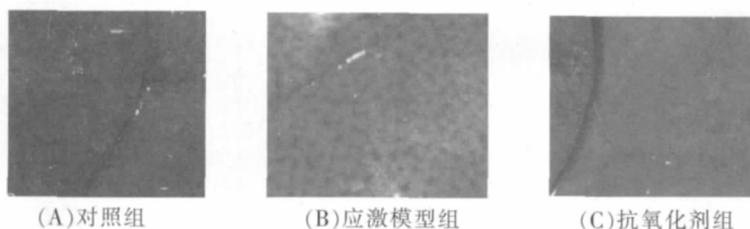


图 2 各处理组大鼠肝脏组织形态的比较

明显增大,色泽黄灰,触之有油腻感,边缘饱满,质地稍韧,呈明显脂肪肝样;抗氧化剂组大鼠肝脏体积较正常组略大,颜色呈较浅淡的黄褐色,质地、弹性和柔

韧性较正常组略差。

2.3 微生物源性抗氧化剂对氧化应激大鼠抗氧化性能的影响(见表 1)

表 1 微生物源性抗氧化剂对氧化应激大鼠肝组织抗氧化能力的影响

组别		SOD[U/(mg·prot)]	GSH-Px[U/(mg·prot)]	MDA[U/(mg·prot)]
21 d	对照组	38.72±1.72 ^a	325.74±20.25 ^a	2.50±0.08 ^b
	应激模型组	32.31±3.21 ^b	285.52±16.78 ^b	3.23±0.21 ^a
	抗氧化剂组	37.56±2.25 ^a	319.24±18.21 ^a	2.64±0.17 ^b
42 d	对照组	39.54±2.57 ^a	350.74±23.30 ^a	2.84±0.07 ^b
	应激模型组	33.45±2.01 ^b	293.77±17.54 ^b	3.55±0.54 ^a
	抗氧化剂组	39.01±3.78 ^a	307.31±25.36 ^a	3.07±0.47 ^b

注:同一试验期间列数据肩标不相同字母表示差异显著(P<0.05),相同字母表示差异不显著(P>0.05)。下表同。

从表 1 可知,试验第 21 d,高脂日粮引起大鼠氧化应激产生,表现为与对照组相比,应激模型组大鼠 SOD 和 GSH-Px 活力显著降低、脂质过氧化产物 MDA 显著增多(P<0.05);试验第 42 d,呈现出相同的规律。日粮中添加微生物源性抗氧化剂后,与应激模型组相比,第 21 d 和 42 d 的 SOD 和 GSH-Px 活力显著升高、

MDA 显著降低(P<0.05)。抗氧化剂组与对照组的 SOD 活力、GSH-Px 活力和 MDA 含量组间差异不显著(P>0.05),说明日粮中添加微生物源性抗氧化剂具有提高机体抗氧化能力的作用。

2.3 微生物源性抗氧化剂对氧化应激大鼠肝细胞 DNA 损伤的影响(见图 3)

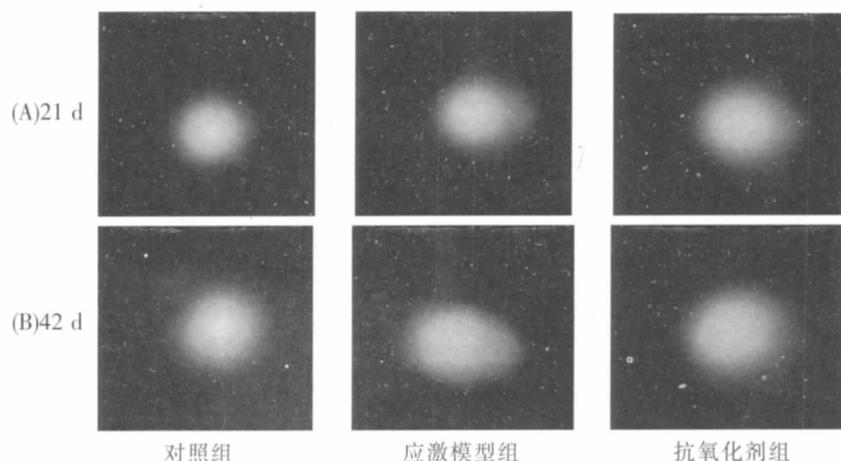


图 3 试验第 21 和 42 d 肝细胞 DNA 损伤观察实例

从荧光显微镜下观察的结果显示,肝细胞线粒体 DNA 被荧光染料染成绿色,未受损细胞表现为以圆形荧光核心,即彗星头部,没有尾巴,荧光强度均匀,边缘整齐。受损细胞则有彗尾伸向阳极,形成一个亮的头部和尾部,类似彗星样的拖尾。喂饲高脂日粮的应激模型组大鼠在 21 d 肝细胞 DNA 出现明显的慧尾,到 42 d 慧尾更长。

利用 CASP 彗星图像分析软件对试验所得的彗星图像进行数据分析结果表明(见表 2),试验第 21 d 应激模型组大鼠肝细胞与对照组相比,尾部 DNA 含量、尾长、尾矩、Olive 尾矩均显著增加(P<0.05),表明 DNA 受到损伤,抗氧化剂组有轻微拖尾现象,但与应

激模型组相比损伤较轻,尾部 DNA 含量、尾长、尾矩、Olive 尾矩均有所降低(P<0.05)。

表 2 微生物源性抗氧化剂对氧化应激大鼠肝细胞 DNA 损伤的作用

项目	对照组	应激模型组	抗氧化剂组	
21 d	尾部 DNA(%)	0.53±0.97 ^a	5.18±1.77 ^c	3.46±1.80 ^b
	尾长(μm)	4.26±3.41 ^a	14.79±5.63 ^c	9.39±5.78 ^b
	尾矩(μm)	0.03±0.02 ^a	0.73±0.35 ^c	0.32±0.18 ^b
	Olive 尾矩	0.19±0.17 ^a	1.86±0.77 ^c	1.08±0.95 ^b
42 d	尾部 DNA(%)	0.34±0.17 ^a	7.84±3.74 ^c	3.09±1.96 ^b
	尾长(μm)	3.84±1.65 ^a	23.09±6.45 ^c	12.09±3.87 ^b
	尾矩(μm)	0.10±0.17 ^a	1.81±0.65 ^c	0.43±0.37 ^b
	Olive 尾矩	0.13±0.09 ^a	3.00±0.94 ^c	1.07±0.77 ^b

试验第 42 d 应激模型组大鼠肝细胞有明显拖

尾,尾部 DNA 含量为 7.84%(>5%),为低度损伤,且与其它各组均有显著差异($P<0.05$)。抗氧化剂组肝细胞亦有拖尾现象,与对照组和应激模型组相比各指标均有显著差异,但比模型组损伤明显较轻($P<0.05$)。

3 讨论

氧化应激是由于机体内活性氧(ROS)的产生和机体抗氧化体系的自由基清除能力不平衡所引起的。生物体在正常新陈代谢过程中会产生 ROS,机体依靠自身内的抗氧化防御体系使自由基的产生与消除处于动态平衡,从而维持机体的正常生命活动。当自由基的产生超出机体清除自由基的能力时,过量自由基在体内积累就会引起氧化应激。引起氧化应激的因素很多,如日粮中某些营养素过高或缺乏、环境改变或恶化、管理不当等,导致机体自由基过量生成和/或细胞内抗氧化防御系统受损。本研究采用富含高不饱和脂肪酸的葵花籽油作为大鼠高脂日粮来源发现,大鼠饲喂高脂日粮 21 d 后,其 SOD 和 GSH-Px 活力显著低于对照组、脂质过氧化产物 MDA 显著高于对照组($P<0.05$)。这与其他学者报道的结果一致。

随着对抗生素副作用的认识及促生长饲用抗生素在动物饲养上的禁用,作为无毒无害无抗药性的益生菌受到追捧,成为 21 世纪的热门话题,人们对其特性、分类、分布与营养意义等研究取得了很大进展,发现其具有促进肠道有益菌的生长,竞争性抑制病原菌,提高宿主免疫力等生物学功能,在替代传统抗生素方面具有良好的潜力。国外有研究报道某些益生菌还具有抗氧化活性,如乳酸菌、酵母等,该发现为益生菌的生物学特性研究开辟了新的思路。本研究所用的微生物源性抗氧化剂由乳酸菌、芽孢杆菌和酵母菌等发酵而来,在日粮中补充微生物源抗氧化剂,结果表明微生物源抗氧化剂具有提高大鼠 SOD 和 GSH-Px 活性、降低脂质过氧化反应的作用。

肝脏是机体新陈代谢的重要器官,具有复杂的生理生化功能。当长期饲喂高脂日粮时,一方面肝细胞对脂肪酸的摄取多于分泌,脂肪酸在肝内积聚,从而促使肝脏脂质代谢稳态紊乱,肝细胞脂肪变性、巨嗜细胞浸润,甚至导致非酒精性脂肪肝病,在本研究中通过对肝组织外观形态的观察也发现饲喂高脂日粮的模型组肝呈现一定程度的变性;另一方面 ROS 的大量产生,即促氧化物与抗氧化物之间的动态平衡失调,最终导致肝细胞损伤。ROS 除直接造成肝损伤外,另一重要发病机制是通过脂质过氧化反应而引起疾病,过氧化脂质不仅可使内源性 ROS 数量及毒性增

加,而且可抑制抗氧化,增加外源性过氧化物毒害的敏感性,从而导致肝损害。

检测 DNA 链的断裂是测定 DNA 损伤程度的有效技术,单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis, SCGE)就是一种检测单个细胞 DNA 断裂的技术。由于被损伤的 DNA 在电场力作用下移动后形似彗星,所以又称彗星试验(comet assay),自 Singh 等在 Ostling 等首先提出的中性凝胶电泳技术基础上报道了碱性 SCGE 以来,此法经过不断改进,后经 Olive 等的改进后形成现在完善的检测方法。该法能够灵敏地检测单个细胞水平的 DNA 链断裂,具有简便、快速、灵敏、廉价、所需样品量少及不需放射性等特点,广泛应用于 DNA 的损伤与修复机理方面研究。本研究应用 SCGE 检测了高脂日粮对大鼠肝细胞 DNA 的损伤及微生物源性抗氧化剂对损伤 DNA 的作用,发现饲喂高脂日粮能使大鼠肝脏线粒体 DNA 发生严重的氧化损伤。SCGE 试验显示高脂日粮组的线粒体 DNA 拖尾严重,尾部 DNA 含量,尾长、尾矩、Olive 尾矩都显著高于对照组($P<0.05$),日粮中补充微生物源性抗氧化剂的大鼠其尾部 DNA 含量,尾长、尾矩、Olive 尾矩均显著低于模型组,说明微生物源性抗氧化剂能减少氧化损伤,其作用机理可能是由于益生菌具有螯合金属离子(铁离子、铜离子)、抗氧化酶活性、还原能力及产生抗氧化剂(如 NADH、NADPH、谷胱甘肽、尿酸、蛋白和多肽等)的特性,以清除不同的自由基,从而减少氧化应激损伤。

4 结论

高脂日粮可诱导大鼠发生氧化应激,产生脂质过氧化反应,降低机体 SOD 和 GSH-Px 活性,造成肝细胞 DNA 受损;日粮中补充微生物源性抗氧化剂可以提高大鼠抗氧化性能,降低肝细胞 DNA 损伤程度,具有一定的损伤修复功能。

(参考文献 17 篇,刊略,需者可函索)

(编辑:王芳 xfang2005@163.com)