

试验
研究葡萄糖氧化酶制剂对小鼠血清指标和
肝脏抗氧化能力及组织结构的影响崔亚利¹, 赵艳姣¹, 孙海云¹, 陈宝江^{2*}, 李三吓¹

(1. 河北农业大学动物医学院, 湖北 保定 071001; 2. 河北农业大学动物科技学院, 湖北 保定 071001)

摘要: 75 只 18~22 g 的 KM 小鼠随机分为 5 组, 对照组饲喂基础日粮, 其余 4 组在基础日粮中添加 30% 霉变玉米面和不同浓度 (0%、0.1%、0.3%、0.5%) 的葡萄糖氧化酶 (GOD), 饲养期为 60 d。结果表明: 添加 30% 霉变玉米面, 肝脏中 GSH-Px、T-SOD 和 CAT 活性显著 ($P < 0.05$) 或极显著降低 ($P < 0.01$), MDA 含量升高 ($P < 0.01$)。与对照组比较, 添加 0.3% 和 0.5% 的 GOD, 肝脏中 GSH-Px、T-SOD 和 CAT 活性显著 ($P < 0.05$) 或极显著升高 ($P < 0.01$), MDA 含量显著下降 ($P < 0.05$)。对血清中 CHO、TG、GPT 和 GOT 没有显著影响, TP 和 ALB 含量升高, 且差异显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 添加 0.3% GOD 组与对照组比较, AST 含量极显著降低 ($P < 0.01$)。研究提示, 含有 30% 霉变玉米面的饲料中添加 0.3%~0.5% 的 GOD 可以增强肝脏的抗氧化能力和蛋白质代谢功能, 缓解对动物肝脏造成的慢性毒性作用。

关键词: 葡萄糖氧化酶; 小鼠; 肝脏; 抗氧化功能; 血清指标

中图分类号: S859.79 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2015)07-0001-04

Effects of glucose oxidase on serum indexes, antioxidative ability
and histological structure of livers in miceCUI Yali¹, ZHAO Yanjiao¹, SUN Haiyun¹, CHEN Baojiang^{2*}, Li Sanxia¹

(1. College of Veterinary Medicine, Hebei Agricultural University, Baoding 070001, China;

2. College of Animal Science and Techonlogy, Hebei Agricultural University, Baoding 070001, China)

Abstract: Seventy-five KM mice at weight 18~22g were randomly assigned to five groups. The control group was fed basal diet. The four experimental groups were fed diet supplemented with 30% mouldy maize flour and 0%, 0.1%, 0.3% and 0.5% glucose oxidase, separately. The feeding trial lasted for 60 days. The results showed that the diet with 30% mouldy maize flour significantly decreased GSH-Px, T-SOD and CAT activities ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and increased the content of MDA in livers ($P < 0.01$). Compared with control group, adding 0.3% and 0.5% GOD increased GSH-Px, T-SOD and CAT activities ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and decreased the content of MDA ($P < 0.05$) in livers. There was no effect on serum levels of CHO, TG, GPT and GOT. TP and ALB levels were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Addition of 0.3% GOD, the AST content was declined compared with control group ($P < 0.01$). Our experiment suggests that addition of 0.3%~0.5% GOD to diet with 30% mouldy maize flour can improve antioxidant capacity and protein metabolism of livers and chronic toxicity of mouldy maize flour in mice.

Kew words: glucose oxidase; mouse; liver; antioxidative capacity; serum index

玉米是畜禽饲料的主要能量原料, 在畜禽日粮中占有较高的比例, 在小鼠饲料中也占到 25% 左右^[1]。玉米在田间生产和仓储保管过程中很容易霉败变质, 对畜禽造成危害和原料的浪费。霉变饲料产生的黄曲霉毒素主要损害动物肝脏, 可导致肝功能下降, 并使动物的免疫力降低^[2]。葡萄糖氧化酶 (glucose oxi-

dase, GOD) 作为一种新型酶制剂, 具有去葡萄糖、脱氧、杀菌等特性, 饲料中添加 0.4% 的葡萄糖氧化酶, 可以抑制蛋鸡盲肠内大肠杆菌的增殖, 并对乳酸菌的生长和繁殖有促进作用^[3]。添加不同浓度的 GOD (0.15%、0.3%、0.4%、0.5%), 能降低肉鸡空肠、回肠 pH, 具有明显抑制大肠杆菌生长、促进盲肠中乳酸杆菌和双歧杆菌增殖的作用^[4]; 可提高断奶仔猪、断奶仔兔的日增重和饲料转化率, 但不影响仔兔免疫器官的发育^[5-6]。饲料霉变是困扰饲料业和畜牧业的一个全球性难题, 如何有效地去除和降低霉菌毒素污染对动物的危害已成为人们研究的重点。目前, 对霉变日粮中添加葡萄糖氧化酶制剂缓解

收稿日期: 2014-07-14; 修回日期: 2015-05-26

基金项目: 国家“十二·五”支撑计划项目 (2012BAD39B01); 石家庄科技研究与发展计划课题 (08150322A)

作者简介: 崔亚利 (1970-), 女, 副教授, 博士

* 通信作者: 陈宝江, 教授, 博士, 主要从事动物营养教学研究, E-mail: chengbaojiang@vip.sina.com

慢性中毒的研究较少。本试验通过在 KM 小鼠饲料中添加发霉玉米面和不同浓度葡萄糖氧化酶制剂, 研究其对血清指标、肝脏抗氧化功能和肝脏结构的影响, 为霉变玉米的利用和缓解畜禽中毒提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和日粮

从北京大学医学部购入雄性清洁级 KM 小鼠 75 只, 体重 18 ~ 22 g, 4 周龄左右 (实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2011-0012)。从北京科澳协力饲料有限公司购入小鼠粉状维持饲料和小鼠维持颗粒料。

1.2 发霉玉米面的制作和检测

恒温培养箱温度设定为 29 °C, 湿度 80% ~ 85%, 以利于霉菌的生长。内有蒸馏水的搪瓷盘置于培养箱内以保持湿度。将盛有玉米面的灭菌搪瓷盘置于培养箱内, 每日观察温湿度和玉米面的发霉程度。取霉变 7 d 左右的玉米面, 采用高盐察氏培养基进行培养。经测定, 发霉玉米面黄曲霉毒素 B1 含量为 225.9 μg/kg, 呕吐毒素含量为 1 023.1 μg/kg。

1.3 小鼠颗粒饲料的制作

根据试验设计, 在小鼠粉状维持料中加入相应比例的葡萄糖氧化酶制剂和霉变玉米面, 加水搅拌。水与料的比例大概为 1: 2, 待混合料能握成团但稍微一握还能松散时比较适宜。使用塑料漏斗制成柱状颗粒料, 50 °C 5 ~ 6 h 烘干。

1.4 葡萄糖氧化酶

保定鲜尔康生物工程有限责任公司生产, 含量 15 U · g⁻¹, 麸皮作为载体。

1.5 试验设计和饲养管理

小鼠常规饲养 7 d 后开始试验, 试验期为 60 d。小鼠随机分为 5 组, 每组 15 只。空白对照组 (A 组) 饲喂自制基础颗粒料, 试验对照组 (B 组) 饲料中添加 30% 发霉玉米面。根据前人研究结果和建议添加量, C、D、E 组的饲料分别在 B 组的基础上添加 0.1%、0.3% 和 0.5% 的 GOD。添加 30% 发霉玉米面饲料中黄曲霉毒素 B1 含量为 67.77 μg/kg, 呕吐毒素含量为 306.93 μg/kg。小鼠饲养在温度为 (25 ± 3) °C, 相对湿度为 55%, 自然光照环境中。

1.6 样品采集

在试验的第 60 天, 各组随机选取 5 只小鼠, 禁食 12 h 后, 眼球采血, 分离血清, 置 -20 °C 冰箱内保存备用。采血后的小鼠颈椎脱臼法处死, 取右叶肝脏同一部位 2 份, 一份置于 10% 中性福尔马林溶液保存以备病理组织形态学检测; 另一份置于 1.5 mL

离心管内, -80 °C 冰箱保存, 用于制备 10% 肝脏匀浆。

1.7 指标测定

1.7.1 肝脏抗氧化能力测定

将玻璃匀浆管置于冰水混合物中制备 10% 肝组织匀浆。肝脏中谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH - Px)、总超氧化物歧化酶 (T - SOD) 活性、丙二醛 (MDA) 和过氧化氢酶 (CAT) 含量 (以每毫克蛋白计) 均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒, 按照说明书操作步骤进行, 紫外分光光度计测定。

1.7.2 血清生化指标的测定

血清中谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、碱性磷酸酶 (ALP)、甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (CHO)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB) 含量均采用中生北控生物科技股份有限公司生产试剂盒, Microlab3000 半自动生化分析仪 (荷兰威图) 测定。

1.7.3 肝脏病理组织形态学检测

常规石蜡切片, 制成 5 ~ 6 μm 切片, HE 染色, 镜下观察。

1.8 数据分析

数据处理与分析采用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差分析, 并用 LSD 法进行多重比较, 结果以平均值 ± 标准差表示。

2 结果

2.1 GOD 对小鼠肝脏抗氧化能力的影响

由表 1 可见, 饲喂含霉变玉米面饲料后, B 组肝脏中 GSH - Px、T - SOD 和 CAT 活性极显著降低 ($P < 0.01$), MDA 含量升高 ($P < 0.01$)。试验组 GSH - Px 活性与 B 组比较均极显著升高 ($P < 0.01$), 添加 0.1% 和 0.3% GOD 组差异显著 ($P < 0.05$); D 组和 E 组与 B 组比较, GSH - Px、T - SOD 活性极显著升高 ($P < 0.01$); 与 B 组比较, 0.3% GOD 组 MDA 含量极显著下降 ($P < 0.01$), 0.5% GOD 组 MDA 含量显著下降 ($P < 0.05$); 添加 0.3% 和 0.5% GOD 组与 B 组比较, CAT 活性显著升高 ($P < 0.05$)。

2.2 GOD 对小鼠血清生化指标的影响

由表 2 可知, 饲喂含霉变玉米面饲料后, 对血清中各检测生化指标均有不同程度的影响, B 组谷丙转氨酶和碱性磷酸酶活性升高, 与 A 组比较差异显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。添加 0.1% 和 0.5% GOD 组, 总蛋白含量与 B 组比较均有不同程度的升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 各试验组间差异不显著; 添加 0.3% 和 0.5% GOD 组与 B 组比较, 白蛋白含量升高, 且差异显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 总胆固醇和

甘油三酯的含量各试验组与 B 组比较均有不同程度的下降, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 与 B 组比较, C 组、D 组和 E 组谷丙转氨酶活性降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 谷草转氨酶含量各试验组都有不同程度的

上升 ($P > 0.05$); 各试验组碱性磷酸酶含量也都有不同程度的降低, D 组与 B 组比较差异极显著 ($P < 0.01$), 0.3% GOD 组与其他 2 个试验组比较差异显著 ($P < 0.05$)。

表 1 GOD 对小鼠肝脏抗氧化能力的影响

| 测定指标 | A 组 | B 组 | C 组 | D 组 | E 组 |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| GSH-Px (酶活力单位) | 996.32 ± 152.61 ^{Bb} | 675.94 ± 30.54 ^{Ad} | 892.61 ± 63.74 ^{Ba} | 960.50 ± 27.81 ^{Bbc} | 917.85 ± 13.32 ^{Bac} |
| T-SOD/ (U · mg ⁻¹) | 297.78 ± 33.95 ^B | 174.57 ± 41.58 ^A | 260.23 ± 41.15 ^B | 279.94 ± 24.77 ^B | 276.33 ± 43.91 ^B |
| MDA/ (nmol · mg ⁻¹) | 1.92 ± 0.61 ^{Bb} | 3.61 ± 0.96 ^{Aa} | 3.12 ± 0.78 ^b | 2.17 ± 0.33 ^{Bb} | 2.34 ± 0.25 ^b |
| CAT/ (U · mg ⁻¹) | 115.64 ± 28.15 ^{Bb} | 80.03 ± 9.04 ^{Aa} | 86.22 ± 2.91 | 93.49 ± 8.61 ^{Ab} | 92.88 ± 8.43 ^{Ab} |

注: 同行小写字母相同或未标字母者表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同表示差异显著 ($P < 0.05$); 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下同

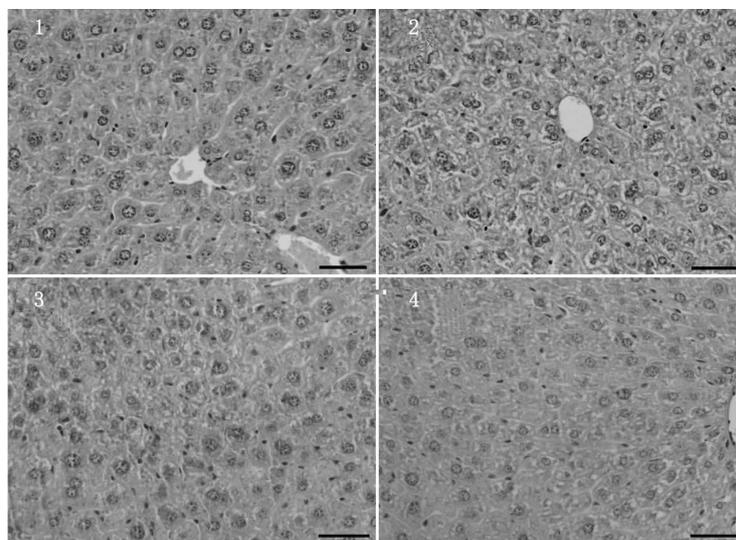
表 2 GOD 对小鼠血清生化指标的影响

| 测定指标 | A 组 | B 组 | C 组 | D 组 | E 组 |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 总蛋白/ (g · L ⁻¹) | 78.25 ± 7.49 | 66.58 ± 1.87 ^{Aa} | 82.49 ± 1.51 ^b | 79.78 ± 10.21 ^b | 91.99 ± 1.39 ^{Bb} |
| 白蛋白/ (g · L ⁻¹) | 29.30 ± 1.29 ^b | 22.52 ± 1.32 ^{Aa} | 25.33 ± 1.53 | 29.30 ± 1.29 ^b | 31.06 ± 2.38 ^{Bb} |
| 总胆固醇/ (g · L ⁻¹) | 4.27 ± 0.16 | 4.04 ± 0.22 | 3.05 ± 0.02 | 2.69 ± 0.16 | 3.04 ± 4.26 |
| 甘油三酯/ (g · L ⁻¹) | 2.45 ± 0.70 | 1.36 ± 0.61 | 1.58 ± 0.24 | 2.02 ± 0.17 | 1.60 ± 0.13 |
| 谷丙转氨酶/ (U · L ⁻¹) | 44.52 ± 10.87 ^B | 80.57 ± 1.77 ^{Aa} | 53.95 ± 4.44 ^b | 41.56 ± 13.58 ^{Bb} | 64.78 ± 19.26 ^b |
| 谷草转氨酶/ (U · L ⁻¹) | 136.97 ± 26.31 | 159.15 ± 1.85 | 146.75 ± 103.34 | 153.38 ± 10.24 | 109.47 ± 7.16 |
| 碱性磷酸酶/ (U · L ⁻¹) | 40.94 ± 16.57 ^{Bb} | 57.07 ± 2.73 ^{Bb} | 48.52 ± 1.94 ^{Ba} | 37.36 ± 2.53 ^{Ac} | 47.83 ± 1.36 ^{Ba} |

2.3 肝脏组织形态学观察

饲料中添加霉变玉米面组肝脏组织结构, 光镜下可见肝细胞索紊乱, 肝细胞内出现空泡 (图 1-2), 中央静脉和窦状隙中有淤血 (图 1-3)。有些肝细胞

体积缩小, 胞核大小不等, 甚至胞核消失。添加 0.3% 和 0.5% GOD 试验组肝脏的损伤得到不同程度的缓解, 肝细胞索排列较整齐, 肝细胞结构基本正常, 有些肝细胞内可见少量空泡 (图 1-4)。



1. A 组肝脏组织结构基本正常; 2. B 组肝细胞索紊乱, 肝细胞内出现空泡; 3. B 组肝脏窦状隙中可见淤血; 4. E 组肝脏组织结构基本正常, 有些肝细胞内可见少量空泡

图 1 小鼠肝脏组织切片 (标尺示 10 μm)

3 讨论

3.1 葡萄糖氧化酶对肝脏抗氧化能力的影响

长期饲喂黄曲霉污染的日粮能诱发动物的慢性中毒,肝脏是黄曲霉毒素主要的靶器官^[7]。动物摄入的黄曲霉毒素在肝脏内积累,导致肝脏肿大、苍白、变脆、胆管上皮增生等。氧化损伤是霉菌毒素危害动物健康的主要病理学基础。肝脏内有一套较完善的抗氧化防御系统,主要包括 SOD、GSH - Px、CAT 和 MDA。研究表明,在饲料中添加 0.1 mg/kg 黄曲霉毒素可抑制生长育肥猪肝脏抗氧化能力,导致血清 SOD、血清和肝脏中的 GSH - Px 活性显著降低^[8]。但也有相反的报道,含霉变玉米饲料能显著提高仔猪肝脏 MDA 含量,有增加 GSH - Px 活力的趋势^[9]。霉菌毒素污染的玉米 (AF 597 mg/kg, 玉米赤霉烯酮 ZEN 729 mg/kg, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 DON 3.1 mg/kg) 添加到 3 周龄 ICR 小鼠日粮中,饲喂 4 周后,肝脏中 SOD、CAT 没有发生变化,GSH - Px、MDA 活性升高^[10]。这可能与动物品种、发育阶段、毒素含量和饲喂时间等有关。霉变玉米使蛋壳厚度和蛋壳强度指标显著变差,霉变饲料中添加黄曲霉毒素降解菌在一定程度上能改善和缓解黄曲霉毒素对蛋鸡生产性能和蛋品质的不利影响^[11]。本研究发现,饲喂 60 d 后,霉变玉米面能显著降低小鼠肝脏 T - SOD、GSH - Px 和 CAT 活性,含霉变玉米面饲料中添加不同浓度的 GOD,能使小鼠肝脏 T - SOD、GSH - Px 和 CAT 活性升高,MDA 含量降低,从而改善肝脏的抗氧化能力。

3.2 葡萄糖氧化酶对血清生化指标的影响

血清生化指标在很大程度上能反应机体的生理变化情况。谷草转氨酶和谷丙转氨酶是机体内两种重要的氨基酸转移酶,为血液中表示肝脏健康状态的重要指标。在血液中 ALT 和 AST 一般含量较低,当肝脏和其他组织受到损伤甚至坏死时,从细胞内释放流入血液中导致血清酶活力的升高,AST 明显升高则说明肝损害明显。霉菌毒素污染的玉米添加到 3 周龄 ICR 小鼠日粮中,饲喂 4 周后,血清中 AST 活性显著升高,ALT 活性升高^[11]。总蛋白和白蛋白能反应机体蛋白代谢能力的高低,血清甘油三酯和总胆固醇是脂肪代谢的重要指标。发霉玉米日粮中低剂量的霉菌毒素对肉仔鸡生长性能无影响,但可导致血清中总蛋白、白蛋白、尿素氮浓度降低^[12]。本试验结果显示,曲霉毒素 B1 含量为 67.77 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的饲料能显著影响血清谷丙转氨酶和碱性磷酸酶的活性,本试验添加量对血清总蛋白浓度和谷草转氨酶活性没有显著影响。添加 GOD 能够不同程度地改善肝脏蛋白质和脂类代

谢能力,显著降低谷丙转氨酶和碱性磷酸酶活性,肝脏功能得以恢复,添加 0.3% ~ 0.5% GOD 的效果较好。

3.3 葡萄糖氧化酶对肝脏结构的影响

霉变玉米能使仔猪肝脏小叶间结缔组织呈局部性增生病变,肝细胞轻度萎缩,并伴发轻度的颗粒变性,肝小叶交界处肝细胞发生严重的颗粒变性和空泡变性,甚至出现肝细胞质溶解、消失,细胞核固缩或消失。本试验中添加霉变玉米面,使肝脏发生了明显的细胞变性、轻微淤血等病理变化,与已有报道基本一致。添加 0.3% ~ 0.5% 的 GOD 后,能够增强肝脏的抗氧化能力和蛋白质代谢功能,不同程度地缓解肝脏的病变程度,肝脏组织结构基本正常。

参考文献:

- [1] 耿春银,金英海,齐雪,等. 红曲霉饲料制剂对小白鼠饲料表观消化率及血清胆固醇含量的影响 [J]. 饲料工业,2012,33(10): 8-10.
- [2] 赵志军. 霉变玉米对畜禽的危害及其防治 [J]. 畜禽业,2012,275: 36-37.
- [3] 宋海彬,赵国先,李娜,等. 葡萄糖氧化酶及其在畜牧生产中的应用 [J]. 饲料与畜牧,2008,7: 37-39.
- [4] 赵国先,宋海彬,马可为,等. 葡萄糖氧化酶制剂对肉鸡肠道 pH 及盲肠微生物的影响 [J]. 河北农业大学学报,2009,32(4): 83-87.
- [5] 杨久仙,张荣飞,张金柱,等. 葡萄糖氧化酶对仔猪胃肠道微生物区系及血液生化指标的影响 [J]. 畜牧与兽医,2011,43(6): 53-55.
- [6] 王永康,吴艳芳,吕景智,等. 葡萄糖氧化酶对断奶仔猪生产性能和免疫器官发育的影响 [J]. 中国饲料,2012,14: 35-39.
- [7] Yunus A W, Razzazi-Fazeli E, Bohm J. Aflatoxin B1 in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: a review of history and contemporary [J]. Toxins, 2011, 3: 566-590.
- [8] 史莹华,许梓荣,王成章. 黄曲霉毒素对猪生长性能及免疫和抗氧化指标的影响 [J]. 中国兽医学报,2007,27(5): 733-736.
- [9] 张玲,陈代文,雷晓娅,等. 自然霉变玉米及添加甘露寡糖对断奶仔猪肝脏结构与功能的影响 [J]. 中国畜牧杂志,2012,48(11): 36-41.
- [10] Hou Y H, Zhao Y Y, Xiong B, et al. Mycotoxin-containing diet causes oxidative stress in the mouse [J]. PloS One, 2013, 8(3): 1-7.
- [11] 赵丽红,高欣,马秋刚,等. 黄曲霉毒素降解菌对饲喂含 AFB1 霉变玉米日粮蛋鸡生产性能和蛋品质的影响 [J]. 中国畜牧杂志,2012,48(11): 31-35.
- [12] 王兆钧,王春维. 霉变日粮中添加酵母葡聚糖对肉仔鸡生长性能、器官指数及血清指标的影响 [J]. 饲料工业,2011,32(14): 44-48.