

日粮 V_A 和油脂对肉鸡 β -胡萝卜素-15 及 15-加双氧酶活性的影响*

宋建婷, 高峰, 周光宏*

(南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095)

[摘 要] 通过饲养试验研究日粮 V_A 和油脂对肉鸡 β -胡萝卜素-15 及 15-加双氧酶活性的影响。结果表明:无 V_A 组的血清、肝脏 V_A 水平低于对照组 ($P < 0.01$), 小肠和肝脏 CDIOX 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$);硬脂酸组、豆油组肝脏 V_A 水平低于对照组 ($P < 0.01$), 豆油组的肠黏膜和肝脏 CDIOX 活性高于对照组 ($P > 0.05$), 硬脂酸组的肠黏膜 CDIOX 活性低于对照组, 肝脏 CDIOX 活性高于对照组, 但差异均不显著 ($P > 0.05$)。结果证实:日粮 V_A 水平和油脂组成均不同程度的影响机体 β -胡萝卜素-15 及 15-加双氧酶活性, 进而影响 β -胡萝卜素的体内转化。

[关键词] V_A ; 油脂; β -胡萝卜素-15; 15-加双氧酶; 肉鸡

[中图分类号] S811.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-5228(2007)02-0025-04

类胡萝卜素是动植物体内的一种天然色素, 共 600 多种, 是植物和细菌合成的最普遍的一种色素。根据其结构不同可分为碳氢类胡萝卜素和含氧类胡萝卜素, 前者的典型代表是 β -胡萝卜素 (β -Carotene), 后者的典型代表是黄体素 (Lutein)。类胡萝卜素具有抗氧化、提高动物繁殖机能、提高免疫应答、防癌、抗肿瘤、沉积于畜禽体内改善畜产品品质等作用。影响类胡萝卜素在体内转化的因素很多, 它们或者影响类胡萝卜素的吸收, 或者直接影响 β -胡萝卜素-15, 15-加双氧酶 (CDIOX) 的活性, 进而影响类胡萝卜素的转化。关于影响类胡萝卜素吸收的研究, 已有诸多研究报道^[1,2], 而对影响类胡萝卜素转化的研究较少, 本试验主要研究日粮中 V_A 和油脂不同水平及组成对 β -胡萝卜素转化的影响, 为进一步研究 β -胡萝卜素转化调节机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

选用健康体重相近的 18 日龄三黄肉鸡 60 只,

随机分为 5 组, 即对照组、无 V_A 组、高 V_A 组、硬脂酸组及豆油组, 每组 12 只。日粮组成见表 1。试验期 40d, 常规饲养管理。

1.2 样品采集和 CDIOX 的提取

屠宰前一天, 禁食 12h, 自由饮水。屠宰后立即取血液、空肠、肝脏, 4℃ 保存。血液在 4℃ 放两小时后, 4000rpm 离心 15min, 分离血清-20℃ 下保存待测。取空肠, 用冰冷的生理盐水冲洗干净, 用剪刀将肠道纵向剖开, 用载玻片刮取肠黏膜, 然后按 1:5 (W/V) 的比例加入 pH 7.4 的 PBS 缓冲液匀浆, 10000rpm 离心 40min, 取上清, 分装成两份。一份在-20℃ 下保存, 用于测蛋白质浓度。另一份在液氮中迅速冷冻, 然后转移到-85℃ 超低温冰箱中保存, 用于测酶活。取肝脏, 用冰冷的生理盐水冲洗干净, 取 1g 剪碎, 加 5mL pH 7.4 的 PBS 缓冲液匀浆, 其他同上。

1.3 蛋白质浓度的测定

用 Bradford 法测蛋白浓度^[3]。

* [收稿日期] 2006-02-13, 修回日期: 2006-4-26

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30270971)。

[作者简介] 宋建婷 (1978-), 女, 山东滨州人, 硕士研究生, 主要研究方向: 营养生理学。

* [通讯作者] 周光宏 (1960-), 教授, 主要从事营养生理研究。E-mail: ghzhou@njau.edu.cn

1.4 -胡萝卜素底物溶液的制备

将 -胡萝卜素溶于四氢呋喃:二甲基亚砷(1:1, V:V)溶液,抗氧化剂 BHT 的量为 -胡萝卜素的 1 %^[4]

1.5 CDIOX 活性测定

取 1mL CDIOX 酶液在 37 μL 下预温 5min,加入 120μmol/L 的 -胡萝卜素 50μL,反应 60min,加 1mL 95 %乙醇终止反应,酶反应在空气氧中进行,37 振动水浴反应 60min,加入 1mL 95 %的乙醇后反应被终止。然后加入 2mL 正己烷:丙酮=2:1(V/V)的混合液,摇匀,1000g 离心 5min,取上层移入干净的试管内,氮气下吹干,加入 200μL 甲醇,进行高压液相色谱分析。甲醇:四氢呋喃:乙腈=50:30:20(V/V/V)做流动相。流速 1.5mL/min。

进样 20μL,在 325nm 下检测 V_A(视黄醇、视黄醛、视黄酸)的最大光吸收。CDIOX 活性表示方法以比活力表示酶活大小,即以在 37、pH7.7 条件下,每 mg 蛋白质每小时生成视黄醇的 μg 数表示(μg Retinol·h⁻¹·mg⁻¹ Protein)。

1.6 血清和肝脏 V_A 测定

0.5mL 血清(或 0.5mL 肝脏匀浆离心上清液)加 1mL 含 1mMBHT 的乙醇,剧烈震荡,加 2mL 正己烷,摇匀,1000g 离心 5min。用正己烷提取 2 次,取上层移入干净的试管内,氮气下吹干,加入 200μL 甲醇溶解,取 20μL 进行高压液相色谱分析。

1.7 数据统计分析

采用 SPSS11.0 软件进行单因子方差分析 LSD 法多重比较,数据结果以平均数 ±标准差表示。

表 1 日粮组成

Table 1 The composition of diets

	糙米 Brown rice	小麦麸 Wheat bran	豆粕 Soybean meal	油脂 Fat	预混料 Premix
对照组 Control	72.73	2.16	20.11	-	5
无 V _A 组 V _A free group	72.73	2.16	20.11	-	5
高 V _A 组 High V _A group	72.73	2.16	20.11	-	5
硬脂酸组 Stearic acid group	64.76	8.89	19.35	2(硬脂酸)	5
豆油组 Soybean oil group	64.76	8.89	19.35	2(豆油)	5

注:1.豆油的组成(g 脂肪酸/100g 豆油):亚油酸 54.1;油酸 23.6;棕榈酸 11.9;亚麻酸 6.3;硬脂酸 3.9;其它脂肪酸 0.2。

2.对照组 V_A 10 000IU/kg、高 V_A 组 20 000IU/kg。3.粗蛋白 16.15 %、代谢能 12.35MJ/ Kg。

Note: 1. The composition of soybean oil(g/100g): linoleic acid 54.1; Oleic acid 23.6; palmitic acid 11.9; linolenic acid 6.3; stearic acid 3.9; other fat acids 0.2. 2. The V_A level of the control diet is 10,000 IU/kg, the V_A level of the high V_A diet is 20,000 IU/kg. 3. The crude protein level of diets is 16.15 %, the metabolizable energy of diets is 12.35MJ/kg.

2 结果与分析

2.1 血清和肝脏中维生素 A 水平

无 V_A 组血清中视黄醇(ROL)含量低于对照组、高 V_A 组、硬脂酸组和豆油组(P < 0.01);高 V_A 组血清视黄醇高于对照组,但差异不显著(P > 0.05);硬脂酸组、豆油组血清中视黄醇相近均低于对照组,差异不显著(P > 0.05)(见图 1)。

硬脂酸组、豆油组血清中视黄醛(RAL)含量低于对照组、无 V_A 组、高 V_A 组(P < 0.01)(图 1);高 V_A 组血清中视黄醛含量低于对照组,高于无 V_A 组,但差异均不显著(P > 0.05)。

无 V_A 组肝脏中视黄醇水平低于对照组和高 V_A 组(P < 0.01),低于硬脂酸组和豆油组(P < 0.05);高 V_A 组肝脏中视黄醇水平高于对照组(P > 0.05);硬脂酸组及豆油组肝脏中视黄醇水平极显著低于对照组(P < 0.01)。

本试验发现血清中维生素 A 主要以视黄醇的形式存在,还有少量的视黄醛,未发现视黄酸,而肝脏中只检测出了视黄醇。这可能是因为视黄醛、视黄酸的含量太少,以至未检出。

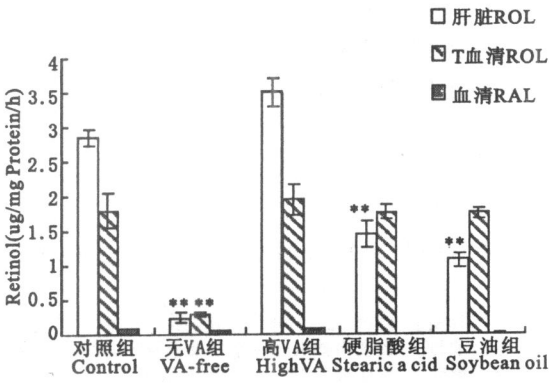


图 1 血清及肝脏中维生素 A 水平

Fig. 1 Vitamine A in serum and liver

2.2 小肠、肝脏 CDIOX 的活性

无 V_A 组肠黏膜上皮的 CDIOX 的活性高于对照组 ($P < 0.01$), 高 V_A 组的肠黏膜上皮的 CDIOX 的活性低于对照组 ($P > 0.05$), 硬脂酸组肠黏膜上皮的 CDIOX 活性低于对照组 ($P > 0.05$), 豆油组肠黏膜上皮的 CDIOX 的活性高于对照组和硬脂酸组, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

无 V_A 组的肝脏 CDIOX 的活性显著高于对照组 ($P < 0.05$), 高 V_A 组肝脏 CDIOX 的活性与对照组相近, 硬脂酸组、豆油组肝脏 CDIOX 的活性相近, 高于对照组, 但差异均不显著 ($P > 0.05$)。

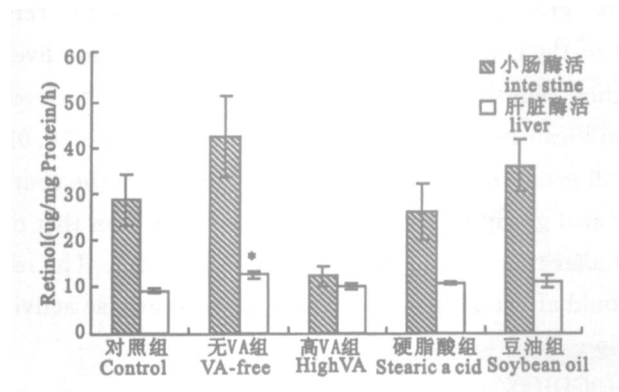


图2 小肠及肝脏中BCDIOX的活性

Fig.2 Activity of BCDIOX in intestine and liver

3 讨论

动物本身不能合成 V_A , 最终必须通过日粮 V_A 原类胡萝卜素断裂的途径获取机体需要的 V_A 。 β -胡萝卜素-15,15-加双氧酶 (CDIOX) 催化 β -胡萝卜素断裂产生 V_A 。

Van (1996) 研究报道, 饲喂低 V_A 日粮且不补充 β -胡萝卜素的大鼠其小肠 CDIOX 活性显著高于饲喂高 V_A 且不补充 β -胡萝卜素的个体, 而肝脏中 CDIOX 活性不受日粮 V_A 水平的影响^[5]。本饲养实验结果发现: 无 V_A 组小肠黏膜 CDIOX 活性极显著高于对照组和高 V_A 组。无 V_A 组个体肝脏中 CDIOX 活性极显著高于对照组, 与高 V_A 组个体肝脏中 CDIOX 差异不显著, 这与上述报道不太一致, 具体机制还有待进一步研究。

游离脂肪酸可显著促进小肠细胞对 β -胡萝卜素的吸收, 而且油酸的促吸收作用极显著大于硬脂酸^[2]。Goodman (1967) 认为脂肪酸对大鼠 β -胡萝卜素的促吸收作用是通过加速细胞内 β -胡萝卜素断裂成 V_A , 从而加快 β -胡萝卜素扩散来实现的^[6]。Dur-

ing (1998) 报道日粮橄榄油 (富含单不饱和脂肪酸) 和豆油 (富含多不饱和脂肪酸) 能提高小肠黏膜 CDIOX 活性^[7]。本实验结果, 2% 豆油组小肠黏膜 CDIOX 活性高于对照组和 2% 硬脂酸组, 但差异不显著; 2% 硬脂酸组小肠黏膜 CDIOX 活性低于对照组, 但差异不显著。硬脂酸组 (2%)、豆油组 (2%) 个体肝脏中 CDIOX 活性高于对照组, 但差异均不显著 ($P > 0.05$)。尽管本试验未得到显著结果, 但结合前人的研究^[7] 和本研究体外实验结果^[8] 可以看出油脂能调节 β -胡萝卜素吸收和转化能力, 但油脂的组成和水平对其作用程度可能存在差别。宋建婷等 (2004) 通过体外实验研究发现不同浓度油酸对 CDIOX 的活性有不同影响, 油酸的浓度为 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时不显著促进 CDIOX 的活性; 当油酸浓度为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时极显著促进 CDIOX 的活性。而对不同游离脂肪酸对 CDIOX 的活性的影响结果表明, 棕榈酸、硬脂酸对 CDIOX 活性的作用相近, 与对照组差异不显著; 油酸极显著促进 CDIOX 活性; 亚油酸和亚麻酸对 CDIOX 活性的促进作用不明显^[8]。本次实验所用油脂为豆油 (其脂肪酸组成以亚油酸、油酸为主), 差异不显著可能与豆油的添加水平较低有关, 而添加硬脂酸研究结果和体外研究结果相一致, 即硬脂酸 (饱和性脂肪酸) 对 CDIOX 活性无明显作用。在体内状态下, 动物对类胡萝卜素吸收和转化机制还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 周光宏, Tume R 和 Larson T. 离体牛小肠细胞对 β -胡萝卜素和叶黄素吸收的研究[J]. 动物营养学报, 1996, 8(4): 15-18.
- [2] 陈波, 周光宏, 刘清. 胆盐和游离脂肪酸影响离体小肠细胞类胡萝卜素吸收的研究[J]. 动物营养学报, 2001, 13(2): 47-50.
- [3] 汪家政. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社. 2000.
- [4] During A., Nagao A., Hoshino C, Ferao J. Assay of β -carotene 15,15'-dioxygenase activity by reverse-phase high-pressure liquid chromatography[J]. Anal. Biochem. 1996, 241: 199-205.
- [5] Van T. V., Vlissingen M. F. V., Schaik F. V., Berg H. V. D. β -carotene absorption and cleavage in rats is affected by the vitamin A concentration of the diet[J]. J. Nutr. 1996, 126: 499-505.
- [6] Goodman D S, H S Huang. The enzymatic conversion of all-trans-carotene into retinal[J]. J. Biol. Chem. 1967, 242: 3543-3554.
- [7] During A., Nagao A., Terao J. β -carotene 15,15'-dioxygen-

ase activity and cellular retinal-binding protein type level are enhanced by dietary unsaturated triacylglycerols in rat intestines[J]. J. Nutr. 1998, 128: 1614-1619.

[8] 宋建婷,周光宏,高峰. 胆酸盐、游离脂肪酸、黄体素对 β -胡萝卜素-15,15-加双氧酶活性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(3): 70-73.

Effects of Diet V_A Levels and Fat Levels on β -Carotene-15 and 15-dioxygenase Activity of Broilers

SONG Jian-ting, GAO Feng, ZHOU Guang-hong*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The feed experiment was conducted to study the effect of diet V_A levels and fat levels on β -carotene-15 and 15-dioxygenase activity of broilers. The broilers were divided into five groups: control, V_A -free, high- V_A , stearic acid(2 %) and soybean oil(2 %) group. The results showed that the level of serum and liver V_A of V_A -free group was lower than that of the control($P < 0.01$);the intestinal and liver CDIOX activity of V_A -free group was significantly higher than that of the control($P < 0.05$). The level of liver V_A of stearic acid and soybean oil group was significantly lower than that of the control($P < 0.01$). The intestinal and liver CDIOX activity of soybean oil group was not significantly higher than the control ($P > 0.05$). Intestinal CDIOX activity of stearic acid group was not significantly lower than that of the control, and that of the liver was not significantly higher than that of the control ($P > 0.05$). The results indicated that diet V_A levels and fat composition could affect β -Carotene-15 and 15-dioxygenase activity to some extent and further affect β -carotene conversion.

Key words: V_A ; fat; β -carotene-15;15-dioxygenase(CDIOX); broiler