

还原型谷胱甘肽对罗非鱼生长和抗氧化性能的影响

张国良, 赵会宏, 周志伟, 何志交, 郭 慧, 陈 静, 刘 丽

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:将体长、体质量相近的奥尼罗非鱼 *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* 360 尾, 随机分为 4 组, 每组 3 个重复, 每个重复 30 尾。在 I、II、III、IV 组的日粮中分别添加 0、100、200、400 mg/kg 剂量的还原型谷胱甘肽 (GSH), 试验期 60 d, 检测了与生长性能、血清中类胰岛素样生长因子 - I (IGF-I) 水平及肌肉组织抗氧化能力相关的各项指标。结果表明: 1) 在试验期间, 添加 GSH 的 II 组和 IV 组的相对体质量增长率 (RSGR) 显著高于对照组 I 组 ($P < 0.05$), 而且第 20 d 时, II 组和 IV 组鱼体的平均体质量显著高于 I 组 ($P < 0.05$); 2) 第 40 d 和第 60 d, IV 组鱼体的血中 IGF-I 水平均显著高于 I 组 ($P < 0.05$); 3) 第 20 d, 各处理组鱼体肌肉组织的总抗氧化能力 (T-AOC) 显著高于 I 组 ($P < 0.05$)。第 40 d, IV 组的 T-AOC 和总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 活力均显著高于 I 组 ($P < 0.05$)。第 60 d, II 组的 T-AOC 和 T-SOD 活力显著高于 I 组 ($P < 0.05$)。以上结果显示, 在饲料中添加适宜剂量的 GSH 能改善鱼体肌肉组织的抗氧化能力, 并使 IGF-I 水平在正常生理范围内有所升高, 从而对鱼体的生长起促进作用。

关键词: 罗非鱼; 还原型谷胱甘肽; 生长; 抗氧化性能

中图分类号: Q591.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2007)03-0090-04

The Effects of Reduced Glutathione on Growth Rate and Antioxidation Capacity of Tilapia

ZHANG Guo-liang, ZHAO Hui-hong, ZHOU Zhi-wei, HE Zhi-jiao, GUO Hui, CHEN Jing, LIU Li

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The effects of reduced glutathione (GSH) as a feed additive on tilapia growth, serum hormones and antioxidation capacity were studied. Three hundred sixty fish (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) were assigned randomly to four groups. Three groups were fed ration with 100, 200 and 400 mg/kg GSH additive, respectively, for 60 d. The other group served as a control fed ration without the additive. Results showed that during the feeding trial, RSGR of fish fed 100 and 400 mg/kg additive were statistically greater than that in the control group ($P < 0.05$), respectively. In particular, at 20 d which is the onset of the feeding trial, body mass in those two groups were respectively statistically greater than that in the control group ($P < 0.05$). At 40 and 60 d, serum IGF-I levels in fish fed 400 mg/kg additive were statistically higher than that in the control group ($P < 0.05$). At 20 d, fish fed GSH had higher T-AOC than that in the control group ($P < 0.05$). At 40 d, fish fed 400 mg/kg additive had statistically higher T-SOD activity and T-AOC than those in the control group ($P < 0.05$), and so did fish fed 100 mg/kg additive at 60 d. These data indicated that administration of GSH in feed could improve fish muscle tissue antioxidation ability, increase hormone levels and metabolism, positively affecting fish growth.

Key words: tilapia; reduced glutathione; growth; antioxidation

收稿日期: 2007-03-08

作者简介: 张国良 (1972—), 男, 硕士研究生; 通讯作者: 刘 丽 (1964—), 女, 博士, 副教授, E-mail: liuli@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技计划项目 (2004B20301007); 农业部渔业生态环境重点开放实验室开放基金课题“谷胱甘肽 (GSH) 对罗非鱼生长性能及免疫功能影响的研究”

随着对小肽营养研究的不断深入,目前对小肽的代谢特点和营养作用规律有了较全面的认识,越来越多的研究表明在动物饲料中添加小肽制品可有效避免游离氨基酸之间的竞争、提高饲料中蛋白质和微量元素的利用率、促进动物生长、改善饲料报酬、提高动物的免疫力和抗应激能力,因此小肽在动物生产中的应用也越来越受到人们的重视。还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)是由 γ -谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸(γ -Glu-Cys-Gly)组成的生物活性肽,广泛分布于自然界生物体中,在动物的肝脏、肌肉和血液中含有丰富,在组织器官的代谢活动中起着重要的作用。许多研究表明:在动物小肠上皮存在将完整的外源性 GSH 转运到细胞内的转运系统,外源的 GSH 可被小肠直接吸收进入血液循环^[1-5]。GSH 作为药物已广泛应用于人医,治疗多种疾病,还可作为功能性食品及营养强化剂用于食品加工业。研究表明,鱼类胃肠道也能吸收利用生物活性小肽^[6-7]。本试验将 GSH 添加于罗非鱼日粮中,观察鱼体的生长情况,并检测了鱼体血清中类胰岛素生长因子-I(IGF-I)水平及肌肉组织的抗氧化酶活性等,研究 GSH 对鱼体生长和抗氧化性能的影响及其可能机制,为将 GSH 作为水产饲料添加剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物和药品

奥尼罗非鱼 *Oreochromis niloticus* $\times$ *O. aureus*, 由广州市花都区恒泰农业发展有限公司提供。还原型 GSH, 纯度 >98% (质量比), 相对分子质量为 307.33 (AMRESCO 公司产品)。

1.2 试验动物分组与饲养管理

体长、体质量、体况基本一致的罗非鱼 360 尾, 按随机分组原则分为 4 组, 每组设 3 个重复, 每个重复 30 尾。I 组为对照组, 饲喂基础日粮。II、III、IV 组为试验处理组, 分别在其基础日粮中添加 100、200、400 mg/kg 剂量的 GSH。基础日粮使用广东正大康地公司的“999 罗非鱼中成鱼饲料”(主要成分为:粗蛋白 $\geq$ 28% (赖氨酸>1%), 粗灰份<14%, 水分 $\leq$ 13%, 粗纤维 $\leq$ 14%, 无机盐 0.5%~1.5%, 钙 0.882%, 磷 0.682%)。GSH 的添加和制粒在广东省农业科学院畜牧研究所水产研究试验室进行:将基础饲料粉碎后, 分别添加 100、200、400 mg/kg 的 GSH, 混合均匀后重新制成粒径为 2 mm 的颗粒料, 鼓风干燥箱烘干, 储存于 -4℃ 冰箱中。饲养试验在

广州市花都区恒泰农业经济有限公司进行, 水族箱规格为 60 cm $\times$ 60 cm $\times$ 80 cm。每天投喂 2 次, 饱饲, 投喂时间分别为早上 9:00 和下午 5:00, 并在投喂 1 h 后, 吸取残余饲料。每天换水, 每天 18 h 充气增氧, 试验水温 25~30℃, pH7.1~7.3。以基础日粮为驯化饲料, 试验鱼经过 15 d 的驯化后开始正式试验, 试验期为 60 d。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 体质量 在试验第 0、20、40、60 d, 对鱼体进行称量。试验结束时计算相对体质量增长率(RSGR)。

$$RSGR = (\text{终末体质量} - \text{初始体质量}) / \text{初始体质量} \times 100\%$$

1.3.2 血清中类胰岛素生长因子-I(IGF-I)水平 在试验第 40、60 d, 每次称体质量后, 在每个重复中选取 5 尾接近平均体质量和体长的鱼采血 2~3 mL, 制备血清, -20℃ 保存。用放射免疫分析法(RIA)测定血清 IGF-I 的水平。具体的测定原理和操作流程见试剂盒说明书(试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司)。

1.3.3 抗氧化酶活性 在试验第 20、40、60 d, 每次称体质量后, 每重复分别随机抽取 4 尾接近平均体质量的鱼, 采集鱼体肌肉组织样品, -70℃ 保存备用。按照试剂盒说明书的方法分别进行肌肉组织总抗氧化能力(T-AOC)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力和总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力的测定。试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.4 数据统计与处理

全部数据用 SPSS (10.0) 统计处理软件进行方差分析, 用最小显著差数法(LSD)进行多重比较。试验数据采用平均数 $\pm$ 标准误表示。

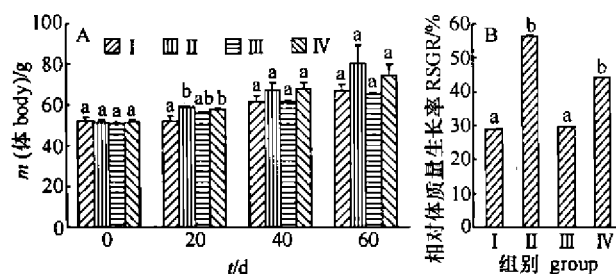
2 结果与分析

2.1 GSH 对鱼体生长的影响

试验开始时, 各组鱼体的体质量无显著差异。在第 20 d 时, 处理组 II 和 IV 的体质量显著大于对照组($P < 0.05$) (图 1A)。在试验结束时, 各处理组的 RSGR 均大于对照组, II 组和 IV 组分别比 I 组高出了 95% 和 52%, 差异显著($P < 0.05$) (图 1B)。

2.2 GSH 对鱼体血清 IGF-I 水平的影响

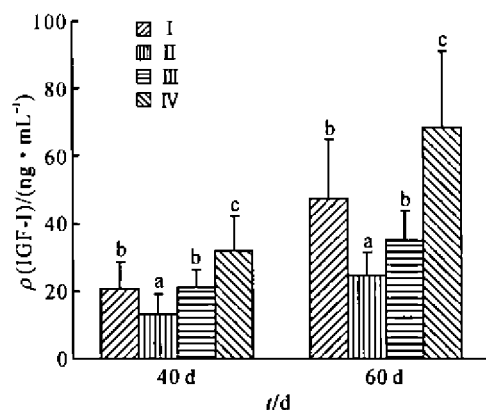
由图 2 可见, 在试验第 40 d 和第 60 d, 处理组 II 一直显著低于对照组和其他处理组($P < 0.05$), 而处理组 IV 一直显著高于对照组和其他处理组($P < 0.05$), 分别比对照组高出 53% 和 45%。处理组 III 在第 40 d 时高于对照组, 而在第 60 d 时却低



柱上不同字母表示同一日龄点各组间差异显著 ($P < 0.05$, LSD 法)
different letters above the bar indicate a significant difference between different groups at the same day ($P < 0.05$, LSD method)

图1 GSH对罗非鱼体质量和相对体质量生长率的影响

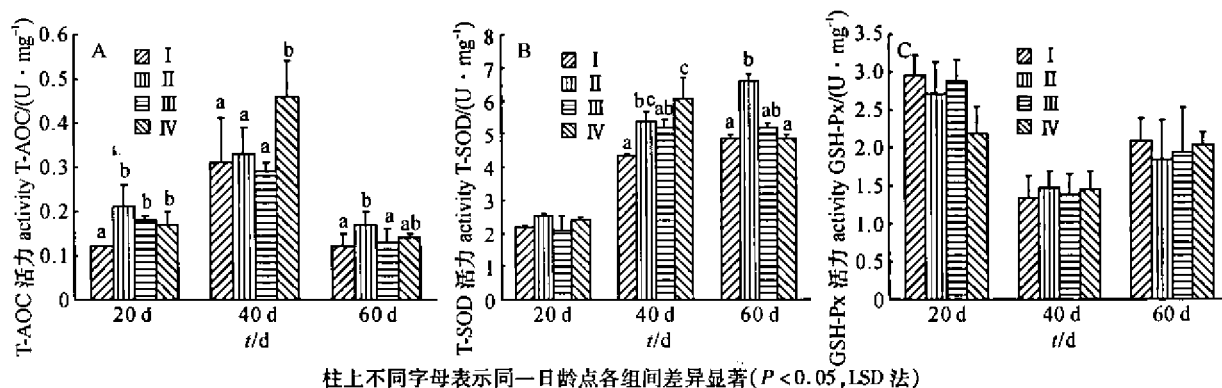
Fig. 1 Effect of GSH on the body mass and RSGR in tilapia



柱上不同字母表示同一日龄点各组间差异显著 ($P < 0.05$, LSD 法)
different letters above the bar indicate a significant difference between different groups at the same day ($P < 0.05$, LSD method)

图2 GSH对罗非鱼血清中IGF-I水平的影响 ($n = 5$)

Fig. 2 Effect of GSH on serum IGF-I level in tilapia ($n = 5$)



柱上不同字母表示同一日龄点各组间差异显著 ($P < 0.05$, LSD 法)
different letters above the bar indicate a significant difference between different groups at the same day ($P < 0.05$, LSD method)

图3 GSH对罗非鱼肌肉组织T-AOC(A)、T-SOD(B)和GSH-Px(C)活性的影响 ($n = 4$)

Fig. 3 Effect of GSH on the specific activities of T-AOC(A), T-SOD(B) and GSH-Px(C) in muscle in tilapia ($n = 4$)

3 讨论

在鱼类,抗氧化物质主要包括抗氧化性的酶(如GSH-Px, SOD, CAT等)和非酶类的抗氧化物质(如维生素E, 维生素C, GSH等)。抗氧化酶SOD、CAT和GSH-Px是体内抗氧化防御系统的重要组成部分,这3种酶的测定常用于间接反映体内自由基反应的动态变化及组织损伤情况^[9-11]。Lash等^[12]研究

于对照组,但差异均不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 GSH对鱼体肌肉组织抗氧化酶活性的影响

T-AOC活力(图3A):在试验期间,各组鱼体肌肉组织的T-AOC活力均呈现先上升后下降的趋势。比较试验期各时间点,在第20 d,添加了GSH的各处理组均显著高于对照组 ($P < 0.05$);在第40 d,各组鱼体的T-AOC活力都有明显升高,处理组IV的T-AOC活力提高了2.7倍,显著高于对照组和其他处理组 ($P < 0.05$);在第60 d,各组的T-AOC活力又明显降低,但各处理组仍高于对照组,而且处理组II与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。

T-SOD活力(图3B):比较试验期间各时间点,在第20 d,各组鱼体肌肉组织的T-SOD活力无显著差异;在第40 d,各组的活力都有成倍的升高,而且处理组II和处理组IV高出对照组24%和40%,差异显著 ($P < 0.05$);至第60 d,除处理组IV外,其他各组的T-SOD活力仍呈升高的趋势,而且处理组II显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

GSH-Px活力(图3C):比较试验期间各时间点,各组鱼体肌肉组织的GSH-Px活力均无显著差异 ($P > 0.05$)。在第20 d,添加了GSH的各处理组均低于对照组;而在第40 d,虽然各处理组的活力也与对照组一样出现下降,但却都高于对照组;至第60 d,各组的活力又回升,而且各处理组又都低于对照组。

表明小鼠口服GSH可提高空肠、结肠和胃中的GSH水平。胃肠道内的GSH及上皮细胞内的GSH在毒物和过氧化物对胃肠道的损伤防御中发挥着重要作用。本试验也发现,在日粮中添加适宜剂量的GSH,能明显提高鱼体肌肉组织T-AOC和T-SOD活力,显著高于对照组 ($P < 0.05$)。这可能是外源性添加的GSH进入鱼体后,通过改变鱼体内GSH/GSSH代谢,降低了 H_2O_2 对细胞的损伤,从而缓解了SOD的压

力,并增强了机体的抗氧化能力^[13-15]。另一方面,在本试验中,各处理组的 GSH-Px 活力与对照组相比无显著变化,作者推测是因为外源性 GSH 提高了鱼体血清中的 GSH 水平,而 GSH 可以直接清除多余的自由基,此时体内的应激少,从而不会诱导产生过多的 GSH-Px。

对断奶仔猪^[16]和黄羽肉鸡^[17]的研究表明,在饲料中添加适量的 GSH 可通过提高机体血清中的 IGF-I 水平而促进动物的生长。本试验发现,饲料中添加 GSH 的各处理组鱼体的体质量均大于对照组,添加 GSH 100 mg/kg 组和 400 mg/kg 组鱼体的 RS-GR 显著大于对照组。同时,400 mg/kg 组鱼体血清 IGF-I 水平显著高于对照组。在鱼类,血清中生长激素(GH)、IGF-I 的含量反映了鱼体的生长代谢水平。IGF-I 具有促进细胞与组织的代谢、细胞有丝分裂、软骨与骨骼的生长等作用,IGF-I 是介导 GH 促生长效应的主要因子。Chen 等^[18]报道外源性注射重组 IGFs 能促进罗非鱼生长,本试验中鱼体血清中的 IGF-I 水平也与其体质量呈现密切相关性。同时,Horbor 等^[19]的研究发现,IGF-I 在体内的氧化还原状态条件下,不能有效形成并保持其固有的二硫键,随着 GSSG/GSH 浓度比值的增加,不正常匹配的二硫键出现增多,可能会导致机体对 IGF-I 的清除加快。本试验中,由于外源添加 GSH,使鱼体内 GSH 含量增加,从而减少机体的自由基和不正常匹配的二硫键出现的机会,降低了机体对 IGF-I 的清除速率,因此处理组鱼体血清中的 IGF-I 水平升高。

作者认为,在饲料中添加 GSH,可能通过改善鱼体肌肉组织的抗氧化能力和提高鱼体血清中的 IGF-I 水平,对鱼体生长性能产生积极影响。

参考文献:

- [1] LINDER M, BURLET G D, SUDAKA P, et al. Transport of glutathione by intestinal brush border membrane vesicles [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 123:929-936.
- [2] HAGEN T M, JONES D P. Transepithelial transport of glutathione in vascularly perfused small intestine of rat [J]. *Am J Physiol*, 1987, 252(1): 607-647.
- [3] HAGEN T M, WIERZBICKA G T, BOWMAN B B, et al. Fate of dietary glutathione: disposition in the gastrointestinal tract[J]. *Am J Physiol*, 1990, 259(4): 530-613.
- [4] VINCENZINI M T, FAVILLI F, IANTOMASI T, et al. Glutathione-mediated transport across intestinal brush-border membranes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1980, 542(2):107-114.
- [5] VINCENZINI M T, FAVILLI F, IANTOMASI T, et al. Intestinal uptake and transmembrane transport systems of intact GSH: Characteristics and possible biological role [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 611(3): 13-23.
- [6] MCLEAN E, DONALDSON E M. Absorption of bioactive proteins by the gastrointestinal tract of fish: A review[J]. *J Aquat Anim Health*, 1990, 2:1-11.
- [7] SIRE M F, VERNIER J M. Intestinal absorption of protein in teleost fish [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1992, 103A(4): 771-781.
- [8] 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,2000, 192-194.
- [9] RUDNEVA I I. Blood antioxidant system of black sea e-lasmobranch and teleosts [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1997, 118C(2):255-260.
- [10] MOURENTE G, TOCHER D R, DIAZ E, et al. Relationships between antioxidants, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products during early development in *Dentex dentex* eggs and larvae [J]. *Aquaculture*, 1999, 179:309-324.
- [11] TRENZADO C, HIDALGO M C, GARCIA-GALLEGO M, et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*: A comparative study [J]. *Aquaculture*, 2006, 254:758-767.
- [12] LASH L H, HAGEN T M, JONES D P, et al. Exogenous glutathione protects intestinal epithelial cells from oxidative injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83:4641-4645.
- [13] MARACINE M, SEGNER H. Cytotoxicity of metals in isolated fish cells: Importance of the cellular glutathione status [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1998, 120A:83-88.
- [14] PENA-LLOPIS S, PENA J B, SANCHEO E, et al. Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate [J]. *Chemosphere*, 2001, 45:671-681.
- [15] PENA-LLOPIS S, FERRANDO M D, PENA J B. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 65:337-360.
- [16] 刘平祥. 谷胱甘肽对断奶仔猪的促生长作用及其机制 [D]. 广州:华南农业大学动物科学学院,2002.
- [17] 韦建福,刘丽,傅伟龙,等. 肌肽、谷胱甘肽对肉鸡生长及激素水平的影响 [J]. *生命的化学*, 2004, 24:66-68.
- [18] CHEN Jyh-yih, CHEN Jian-chyi, CHANG Chi-yao, et al. Expression of recombinant tilapia insulin-like growth factor-I and stimulation of juvenile tilapia growth by injection of recombinant IGFs polypeptides [J]. *Aquaculture*, 2000, 181: 347-360.
- [19] HOBOR S, LJUNG J L, UHLEN M, et al. Insulin-like growth factor I and II are unable to form and maintain their native disulfides under *in vivo* redox conditions [J]. *FEBS L*, 1999, 443:271-276.

【责任编辑 柴焰】

1 材料与方法

1.1 调查方法

试验于2005年3—5月在广东省江门市新会区沙堆镇黄瓜大田内进行. 由于烟粉虱成虫一般在黄瓜植株上部充分展开的幼嫩叶片背面产卵, 因此, 每次调查时, 从田间黄瓜植株上部位置剪下充分展开叶片若干张, 带回实验室内, 在显微镜下仔细检查1 cm×1 cm范围内烟粉虱卵的数量, 每次按随机取样方式检查90~160个/cm²的烟粉虱卵数量. 整个试验共调查6次, 每隔9 d调查1次.

1.2 空间分布参数

扩散系数(*C*)、聚集度指标 M^*/M 计算见文献[11-12].

计算*C*概率为95%的置信区间^[12].

Iwao 回归模型采用 Iwao^[11-12] 提出的直线回归式, 即 $M^* = \alpha + \beta M$.

Talor 冪法则^[11-12]采用 $\delta^2 = aM^b$ (即 $\log\delta^2 = \log a + b\log M$) 进行测定.

根据 Iwao^[11-12] 的 M^* 与 M 回归方程确定最适抽样数, 计算公式如下:

$$N = t^2/D^2[(\alpha + 1)/x + (\beta - 1)],$$

式中, α 、 β 为 Iwao 模型参数, t 为一定概率保证下的正

态离差值, D 为允许误差, x 为平均虫口密度(粒/cm²).

2 结果与分析

2.1 空间分布型测定

2.1.1 扩散系数、聚集度指标 烟粉虱卵空间分布有关参数计算结果见表1.

从表1可以看出, 各样本的*C*均在各自的置信区间以外, 因此各样本均属于聚集扩散^[12]. 各样本的 M^*/M 均大于1, 亦可以看出各样本呈聚集分布.

2.1.2 Iwao 回归模型 将各样本调查数据进行 M^* 对 M 的回归分析得 $M^* = 1.148\ 2 + 1.423\ 1M$, 相关系数(r) = 0.998 1, $r > r_{(0.01, 4)} = 0.917\ 0$, 说明烟粉虱卵的平均拥挤度 M^* 与卵平均密度 M 相关性极显著. $\alpha = 1.148\ 2 > 0$, 表明个体间相互吸引, 分布的基本成分是个体群; $\beta = 1.423\ 1 > 1$, 说明种群呈聚集分布型.

2.1.3 Talor 冪法则 根据表1平均密度(M)和方差(δ^2)数据得 $\log\delta^2 = 0.398\ 4 + 1.517\ 4\log M$, 相关系数(r) = 0.993 5, $r > r_{(0.01, 4)} = 0.917\ 0$, 说明方差(δ^2)和平均密度(M)线性关系极显著. 因为 $\log a = 0.398\ 4 > 0$, $b = 1.517\ 4 > 1$, 说明烟粉虱卵在一切密度下均属聚集分布, 随着种群密度的增加, 卵与卵之间的聚集性减弱.

表1 烟粉虱卵空间分布参数
Tab.1 Spatial distribution parameters of *B. tabaci* eggs

样本编号 sample no.	密度 density (<i>M</i>)/(粒·cm ⁻²)	方差 variance (δ^2)	扩散系数 ¹⁾ diffusion coefficient (<i>C</i>)	聚集度指数 index of patchiness (M^*/M)	分布型 distribution pattern
1	1.375 0	4.588 1	3.336 8 (0.775 7, 1.224 3)	2.699 5	聚集分布
2	1.731 3	5.480 8	3.165 8 (0.775 7, 1.224 3)	2.251 0	聚集分布
3	2.443 8	11.405 6	4.667 3 (0.775 7, 1.224 3)	2.500 7	聚集分布
4	7.811 1	44.581 9	5.707 5 (0.698 5, 1.301 5)	1.602 7	聚集分布
5	28.266 7	274.287 6	9.703 6 (0.698 5, 1.301 5)	1.307 9	聚集分布
6	66.311 1	2120.441 0	31.977 2 (0.698 5, 1.301 5)	1.467 2	聚集分布

1)括号内数据为*C*概率为95%的置信区间

2.2 确定最适取样数

根据表1中的结果, 结合 Iwao 的 M^* 和 M 回归方程, 确定 Iwao 模型参数 α 、 β 分别为 1.148 2、1.423 1; t 田间调查一般取 1; D 取 0.05、0.10 和 0.20. 当 $D = 0.05$ 时, 最适抽样公式为:

$$N = 859.280\ 0/x + 169.240\ 0;$$

当 $D = 0.10$ 时, 最适抽样公式为:

$$N = 214.820\ 0/x + 42.300\ 0;$$

当 $D = 0.30$ 时, 最适抽样公式为:

$$N = 53.705\ 0/x + 10.577\ 5.$$