

硒和维生素E对皱纹盘鲍血清抗氧化酶活力的影响

万 敏 麦康森 马洪明 徐 玮 刘付志国

(中国海洋大学, 教育部海水养殖重点实验室, 青岛 266003)

摘要: 利用双因素实验设计研究了在饲料中添加维生素 E (VE) (0, 50 IU/kg) 和硒 (Se) (0, 0.2, 0.6, 1.5 mg/kg) 对皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino) 血清中过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、依赖硒的谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX)、谷胱甘肽还原酶 (GR)、谷胱甘肽转移酶 (GST) 这 5 种抗氧化酶活力的影响。结果表明: Se 对皱纹盘鲍血清 5 种抗氧化酶活力都有显著影响 ($P < 0.05$), 而 VE 仅对 GPX 和 GR 的活力有显著影响 ($P < 0.05$)。VE 和 Se 对 CAT、GRX 和 GR 的活力的影响具有显著的交互作用。GPX/SOD、GR/GPX、CAT/SOD 这 3 个抗氧化化的重要指标都表明, 当饲料中含有 450 IU/kg 的 VE 时, 添加 0.6 mg/kg 的硒能使皱纹盘鲍血清中的抗氧化物酶系统总体达到相对平衡, 从而能有效地抵抗氧化损害。

关键词: 皱纹盘鲍; 硒; 维生素 E; 抗氧化酶

中图分类号: S968 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2004)05-0496-08

贝类体内的防御系统不同于高等动物, 一般认为它们缺乏特异性的免疫机制, 是以血细胞为防御基础^[1]。而血细胞在吞噬外源异物的过程中会释放活性氧 (ROIs, reactive oxygen intermediate) 来杀死和消化这些异物。活性氧包括超氧阴离子 (O_2^-)、羟自由基 ($\cdot OH$)、单线态氧 (1O_2) 及中间反应产物过氧化氢 (H_2O_2)。它们一方面发挥重要的抗菌作用, 但是另一方面过多的 ROIs 又会对生物体内的各种生物大分子, 如脂类、蛋白质和 DNA 等产生氧化性的破坏作用^[2]。所以动物体为了维持健康, 阻止氧化引起的疾病和死亡, 就必须有一个行之有效的抗氧化系统, 以维持体内产生适量 ROIs 和清除多余 ROIs 之间的平衡^[3]。这个抗氧化系统包括非酶系统和酶系统, 前者包括一些代谢中间产物 (如 NADH/NADHP, GSH, 尿酸等)、微量成分 (如 VE、VC、类胡萝卜素、硒、锌等), 后者主要包括各种抗氧化酶, 主要指一些自由基清除酶 (如 CAT、SOD、GPX、GST、GR 等)^[4-5]。研究发现 GPX/SOD、GR/GPX、CAT/SOD 等指标可以灵敏地反映动物体的抗氧化状态^[6-7]。

维生素 E 是一种重要的自由基清除剂, 同时也是脂肪氧化酶的抑制剂, 它可以防止细胞膜、血浆中

极低密度脂蛋白、细胞蛋白、DNA 等遭到氧化破坏^[7-9], 并且通过在连锁反应中清除过氧化自由基中间代谢物来抑制脂质过氧化作用^[10]; 硒 (Se) 作为一种抗氧化剂并不是直接发挥作用, 而是作为依赖硒的 GPX 的核心组成部分, 参与有机和无机过氧化物的清除过程^[4, 7-8], 许多研究已经发现 VE 和 Se 在生物体抗氧化保护方面发挥着至关重要的作用。但是, 在软体动物中仍然未见到相关报道。皱纹盘鲍是在分类地位和经济上都具有重要意义的养殖动物。本实验主要研究了饲料中不同添加量的 VE 和硒对皱纹盘鲍血清中各类抗氧化酶活力的影响。

1 材料和方法

1.1 饲料的配制 基础饲料参照 Mai 等和周歧存等的配方^[11-14], 略做改动, 成分见表 1。根据周歧存等的实验结果^[12] 确定 VE 的 2 个添加水平为: 0、50 IU/kg; 根据海水鱼类对饲料中硒的需要量一般在 0.2—0.5 mg/kg 之间^[15-16], 确定本实验饲料中硒的 4 个添加水平为: 0、0.2、0.6、1.5 mg/kg; 同时用鲜海带 (*Laminaria japonica*) 作对照饲料。

收稿日期: 2003-05-06; 修订日期: 2004-03-20

基金项目: 教育部跨世纪人才培养基金项目资助

作者简介: 万 敏 (1978—), 女, 江西九江人; 硕士; 研究方向: 水产动物营养免疫学

通讯作者: 麦康森, E-mail: kmmai@ouc.edu.cn

表 1 基础饲料的组成原料和成分

Tab. 1 Diet fomulation and chemical composition of basal diet

组成原料 Ingredient	含量 content (%)
酪蛋白 Casein	25.00
明胶 Gelatin	6.00
糊精 Dextrin	34.00
羧甲基纤维素 CM cellulose	5.00
褐藻酸钠 Sodium alginate	20.00
维生素混合物 Vitamin mix, VE free ¹	2.00
无机盐混合物 Mineral mix ²	4.00
豆油和鲱鱼油 SO/ MFO ³	3.50
氯化胆碱 Choline chloride	0.50
主要成分 Chemical composition, n= 3	
粗蛋白 Crude protein	25.70
粗脂肪 Crude lipid	4.61
灰分 Ash	12.48

¹ 维生素混合物: 每 1000g 饲料中含有盐酸硫胺素 120mg; 核黄素 100mg; 叶酸 30mg; 对氨基苯甲酸 400mg; 盐酸吡哆醇 40mg; 尼克酸 200mg; 泛酸钙 200mg; 肌醇 4000mg; 生物素 12mg; VB12 0.18mg; 抗坏血酸 4000mg; 醋酸视黄醇 100,000 IU; VD3 2000mg; 甲萘醌 890mg; 乙氧基喹啉 400mg。

Vitamin mix.: each 1000g of diet contained thiamin HCl, 120mg; riboflavin, 100mg; folic acid, 30mg; PABA, 400mg; pyridoxine HCl, 40mg; niacin, 200mg; Ca pantothenate, 200mg; inositol, 4000mg; biotin, 12mg; VB12, 0.18mg; ascorbic acid, 4000mg; retinol acetate, 100,000 IU; cholecalciferol, 2000mg; menadione, 890mg IU; ethoxyquin, 400mg.

² 无机盐混合物: 每 1000g 饲料中含有 NaCl 0.4g; MgSO₄·7H₂O, 6.0g; NaH₂PO₄·2H₂O, 10g; KH₂PO₄, 12.8g; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 8g; Fe citrate, 1.0g; Ca lactate, 1.4g; ZnSO₄·7H₂O, 141.4mg; MnSO₄·4H₂O, 64mg; CuSO₄·5H₂O, 12.4mg; CoCl₂·6H₂O, 0.4mg; KIO₃, 1.2mg。

Mineral mix.: each 1000g of diet contained NaCl, 0.4g; MgSO₄·7H₂O, 6.0g; NaH₂PO₄·2H₂O, 10g; KH₂PO₄, 12.8g; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 8g; Fe citrate, 1.0g; Ca lactate, 1.4g; ZnSO₄·7H₂O, 141.4mg; MnSO₄·4H₂O, 64mg; CuSO₄·5H₂O, 12.4mg; CoCl₂·6H₂O, 0.4mg; KIO₃, 1.2mg

³ 豆油 鱼油= 1:1 (Soybean oil: Menhaden fish oil= 1:1)。

1.2 实验分组及管理 鲍鱼购于青岛大麦岛鲍鱼养殖场, 其平均壳长为 6—7cm, 于 2002 年 4—8 月在青岛海洋大学动物营养实验室的循环系统中进行养殖。鲍鱼暂养 15d 后分组, 每组设 3 个重复, 每个重复放养 7 只鲍鱼。在养殖过程中每日光照 12h; 水温保持在 15.6—20.5℃, 盐度 31—34, pH 7.5—7.9, 溶解氧不低于 7.2mg/L, 水中氨氮未检出; 每日下午 18:00—19:00 投喂饲料, 次日早 9:00—10:00 刷洗附着板和饵料板。实验饲养期为 120d。实验结束时随机抽取每组鲍的血淋巴, 立即在 4℃, 3000r/min 下离心 5min, 得到血清, 在 -70℃ 下保存, 直到测定酶活力。

1.3 过氢化氢酶(CAT, catalase) 活力测定 根据 Beers 和 Sizer 的方法^[17]。用 PBS 配制过氧化氢溶液, 取 3mL 在 25℃ 下预热, 与 0.02mL 的血清样品混合, 在 240nm 下检测吸光值。

1.4 超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase) 活力测定 根据邹国林等的方法^[18]。取 3.7mL 的蒸馏水和 0.5mL 的血清在 25℃ 下与 0.3mL 的 3mmol/L 邻苯三酚反应, 在 325nm 下每隔 30s 测一次吸光值, 共测定 3min。

1.5 硒依赖谷胱甘肽过氧化物酶(Se-GPX, Se-dependent glutathione peroxidase) 活力测定 根据 Bell 等的方法^[19]。反应混合物为 1mmol/L EDTA, 5mmol/L 的谷胱甘肽(GSH), 0.2mmol/L NADPH, 5IU/mL GR, 2mmol/L NaN₃ 和 50mmol/L PBS, 以过氧化氢为反应底物, 在 340nm 下测定吸收值。

1.6 谷胱甘肽转移酶(GST, glutathione S-transferase) 活力测定 根据 Habig 和 Jakoby 的方法^[20]。反应混合物为 1mmol/L EDTA, 6mmol/L GSH, 1mmol/L 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene(CDNB), 50mmol/L PBS, 反应液最终在 340nm 下测定吸收值。

1.7 谷胱甘肽还原酶(GR, glutathione reductase) 活力测定 根据 DiIlio 等的方法^[21]。反应的混合物包括 0.5mmol/L GSH, 1mmol/L EDTA, 0.1mmol/L NADPH 和 50mmol/L PBS, 反应液最终在 340nm 下测定吸收值。

1.8 统计分析 实验结果应用双因素方差分析和 Tukey 多重比较来进行差异显著性比较, 所有的统计分析都是用 EXCEL 2000 和 STATISTICA™ 软件进行。

2 结果

2.1 CAT 活力变化

CAT 活力的变化见表 2。饲料中不同浓度的 Se 含量对 CAT 活力影响显著 ($P < 0.05$), 而是否添加 VE 对 CAT 酶活力没有显著的影响 ($P > 0.05$), 且两者不具有显著的交互作用 ($P < 0.05$)。饲料中添加 Se 导致 CAT 活力下降; 当饲料中添加 VE 时, 在 Se 的含量达到 0.2mg/kg 时, CAT 的活力最小; 而饲料中不含 VE 时, 当 Se 含量达到 0.6mg/kg CAT 活力最小。当饲料添加 0.2mg/kg Se 且不添加 VE 时或者添加 1.5mg/kg Se 和 50IU/kg VE 时, 鲍鱼血清中的 CAT 活力值与对照组最接近。

2.2 SOD 活力变化

SOD 活力的变化见表 2。饲料中不同浓度的 Se 对 SOD 活力影响显著 ($P < 0.05$), 随着饲料中 Se 添

表 2 饲料中不同含量的 VE 和硒对皱纹盘鲍血清中 CAT、SOD、GPX、GR、GST 活性的影响

Tab. 2 Effects of dietary vitamin E and selenium on CAT, SOD, GPX, GR, GST activities in abalone serum (mean $\pm$ s.d., n = 3)

饲料组 Diet		CAT 活力 (U/mL) CAT activity	SOD 活力 (U/mL) SOD activity	GPX 活力 (U/mL) GPX activity	GR 活力 (U/L) GR activity	GST 活力 (U/mL) GST activity
VE 含量 (IU/kg) VE contents	硒含量 (mg/kg) Selenium contents					
海带 Kelp 0	(对照 Control)	6.09 $\pm$ 0.73 ^a	14.79 $\pm$ 2.16 ^d	70.36 $\pm$ 2.05 ^{bc}	28.38 $\pm$ 0.69 ^c	29.35 $\pm$ 2.77 ^{ab}
	0	7.43 $\pm$ 0.21 ^a	25.53 $\pm$ 3.55 ^{bc}	16.49 $\pm$ 2.23 ^f	36.78 $\pm$ 1.56 ^a	28.26 $\pm$ 0.87 ^{ab}
	0.2	6.08 $\pm$ 1.67 ^{ab}	22.32 $\pm$ 2.57 ^{cd}	61.85 $\pm$ 3.34 ^{cd}	36.28 $\pm$ 1.59 ^{ab}	24.65 $\pm$ 0.66 ^{abc}
	0.6	2.88 $\pm$ 0.04 ^c	18.63 $\pm$ 1.93 ^{cd}	77.94 $\pm$ 6.94 ^{ab}	36.20 $\pm$ 0.73 ^{ab}	17.02 $\pm$ 2.91 ^c
	1.5	5.65 $\pm$ 0.74 ^{abc}	31.28 $\pm$ 3.46 ^{ab}	83.66 $\pm$ 3.46 ^a	32.66 $\pm$ 0.64 ^b	19.51 $\pm$ 5.10 ^c
50	0	6.79 $\pm$ 0.64 ^a	23.64 $\pm$ 3.92 ^{bc}	40.18 $\pm$ 1.42 ^e	35.90 $\pm$ 1.09 ^{ab}	31.32 $\pm$ 2.96 ^a
	0.2	3.62 $\pm$ 0.87 ^{bc}	17.93 $\pm$ 1.48 ^{cd}	54.34 $\pm$ 2.97 ^d	33.82 $\pm$ 1.80 ^{ab}	24.08 $\pm$ 1.82 ^{abc}
	0.6	4.58 $\pm$ 1.09 ^{abc}	21.23 $\pm$ 0.35 ^{cd}	84.82 $\pm$ 5.01 ^a	32.53 $\pm$ 0.39 ^b	21.72 $\pm$ 3.66 ^{abc}
	1.5	6.09 $\pm$ 1.69 ^{ab}	34.37 $\pm$ 3.15 ^a	88.18 $\pm$ 5.82 ^a	34.74 $\pm$ 2.28 ^{ab}	17.56 $\pm$ 1.04 ^c
ANOVA						
P 值 (P value)	VE	0.577429	0.908946	0.001143	0.046922	0.267048
	Se	0.00028	1.32E-06	2.41E-13	0.029142	8.98E-06
	VE $\times$ Se	0.020292	0.097382	0.000117	0.015167	0.179399

在同一个数据栏中,具有相同上标字母的平均值之间差异不显著(Turkey 检验, $P > 0.05$)。

Means in each column sharing the same letter are not significantly different based on Turkey test ($P > 0.05$).

CAT: 过氧化氢酶(catalase); SOD: 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase); GPX: 谷胱甘肽过氧化物酶(Ge-dependent glutathione peroxidase); GR: 谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase); GST: 谷胱甘肽转氨酶(glutathione-S-transferase)。

表 3 饲料中不同含量的 VE 和硒对 3 个抗氧化指标 (GPX/SOD、GR/GPX、CAT/SOD) 的影响
Tab. 3 Effect of dietary vitamin E and selenium on antioxidant indices (mean $\pm$ s. d., n = 3)

饲料组 Diet				
VE 含量 (IU/kg) VE contents	硒含量 (mg/kg) Selenium contents	GPX/SOD	GR/GPX	CAT/SOD
海带 (对照组饲料)				
0		4.82 $\pm$ 0.64 ^a	0.40 $\pm$ 0.02 ^c	0.47 $\pm$ 0.09 ^a
	0	0.65 $\pm$ 0.13 ^c	2.26 $\pm$ 0.39 ^a	0.30 $\pm$ 0.05 ^a
	0.2	2.79 $\pm$ 0.31 ^{cd}	0.59 $\pm$ 0.06 ^{bc}	0.27 $\pm$ 0.08 ^b
	0.6	4.23 $\pm$ 0.70 ^a	0.47 $\pm$ 0.05 ^c	0.16 $\pm$ 0.02 ^b
	1.5	2.69 $\pm$ 0.30 ^{cd}	0.39 $\pm$ 0.02 ^c	0.18 $\pm$ 0.03 ^b
50	0	1.73 $\pm$ 0.33 ^{de}	0.89 $\pm$ 0.04 ^b	0.29 $\pm$ 0.07 ^b
	0.2	3.04 $\pm$ 0.10 ^{bc}	0.62 $\pm$ 0.07 ^{bc}	0.20 $\pm$ 0.04 ^b
	0.6	4.00 $\pm$ 0.29 ^{ab}	0.38 $\pm$ 0.03 ^c	0.22 $\pm$ 0.05 ^b
	1.5	2.69 $\pm$ 0.37 ^{cd}	0.39 $\pm$ 0.02 ^c	0.18 $\pm$ 0.06 ^b
ANOVA				
P 值 (P value)	VE	0.11248	1.77E-05	0.847866
	Se	2.76E-09	2.83E-10	0.005504
	VE $\times$ Se	0.025471	3.89E-07	0.2246

在同一个数据栏中, 具有相同上标字母的平均值之间差异不显著 (Turkey 检验, $P > 0.05$)。
Means in each column sharing the same letter are not significantly different based on Turkey test ($P > 0.05$)。
GPX: 依模寇的谷胱甘肽过氧化物酶 (Se-dependent glutathione peroxidase); SOD: 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase); GR: 谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase); CAT: 过氧化氢酶 (catalase)。

加量的增加SOD活力显示出下降的趋势;而当Se的添加量增加到1.5mg/kg时,SOD活力又有所上升。VE对SOD活力没有显著的影响($P > 0.05$),且两者没有显著的交互作用($P > 0.05$)。海带组鲍鱼血清中的SOD活力值比所有饲料组鲍鱼都低。

2.3 GPX活力变化

GPX活力的变化见表2。饲料中Se和VE对血清中GPX活力都有非常显著的影响($P < 0.05$),且两者交互作用显著($P < 0.05$)。GPX活力随着饲料中Se含量的增加而升高,当饲料中Se含量大于或等于0.6mg/kg时GPX活力最大;而当饲料中不含Se时,饲料中添加VE的鲍鱼组GPX活力比不添加组要显著提高。天然饲料海带组鲍鱼血清中GPX活力相当于0.6mg/kg Se添加组。

2.4 GR活力变化

各饲料处理组的GR活力变化幅度不像其他抗氧化酶大(表2)。当饲料中不添加VE时,饲料中添加1.5mg/kg Se组的GR活力比不添加Se组明显下降;当饲料中添加VE时,各组GR活力差异不显著;同时两者具有显著的交互作用($P < 0.05$)。海带组鲍鱼血清中GR活力比所有饲料组鲍鱼显著低。

2.5 GST活力的变化

GST活力的变化见表2。饲料中不同浓度的Se含量对血清中GST活力影响显著($P < 0.05$),而VE对酶活力影响不显著($P > 0.05$),且两者也不存在显著的交互作用($P > 0.05$)。血清中的GST活力随着饲料中Se含量的升高而降低。海带组鲍鱼血清中的GST活力与不添加Se的饲料组相似,而比其他饲料组都高。

2.6 GPX/SOD, GR/GPX和CAT/SOD比值的变化

三个抗氧化指标的计算结果见表3。饲料中不同浓度的Se含量对GPX/SOD值影响显著($P < 0.05$),随着Se添加量的升高GPX/SOD值显著上升,当饲料中含有0.6mg/kg Se时GPX/SOD达到最高值,而添加量达到1.5mg/kg时GPX/SOD降低。饲料中是否添加VE对GPX/SOD值影响不显著($P > 0.05$),但VE和Se之间具有显著的交互作用($P < 0.05$)。海带组鲍鱼血清中GPX/SOD值比所有饲料组鲍鱼都高,但是与添加0.6mg/kg Se饲料组鲍鱼差异不显著。

饲料中Se和VE对GR/GPX都有显著的影响($P < 0.05$),且两者具有显著的交互作用($P < 0.05$)。GR/GPX值随着饲料中VE和Se添加量升

高时显示下降的趋势。

饲料中不同浓度的Se含量对CAT/SOD值影响显著($P < 0.05$),而饲料中是否添加VE影响不显著($P > 0.05$),而且两者交互作用不显著($P > 0.05$)。同样,随着Se添加量的增加,CAT/SOD值下降。海带组鲍鱼血清中CAT/SOD值比所有饲料组鲍鱼显著高。

3 讨论

自由基是指含有一个或多个不成对的电子并能独立存在的基团^[10];自由基通常很不稳定,它可以破坏和攻击DNA、细胞膜、蛋白质和脂类,而在动物体内自由基最容易攻击生物膜磷脂中的多不饱和脂肪酸引发膜脂质过氧化反应^[3,9]。本实验所研究的五种酶在清除自由基的过程中发挥重要的作用。CAT和SOD分别作用于 H_2O_2 和 O_2^- ;GPX主要清除 H_2O_2 和脂质过氧化物;GR主要在于维持体内还原态谷胱甘肽(Reduced glutathione, GSH)的正常水平;GST的一些同功酶具有清除代谢脂质过氧化物的作用^[8]。

尽管许多研究者都发现硒和维生素E能有效影响动物体内的抗氧化系统,并且存在交互作用,但是,仍然存在许多不统一的结果。Sarada等认为Se在高氧环境下能帮助鼠防止体内的脂质过氧化^[4]。Reddy等报道VE和Se都能有效影响白化鼠肝组织中抗氧化酶系统^[23]。Avanzo等却发现饲料中VE而不是硒能有效影响鸡肌肉中抗氧化物酶活力^[7]。然而,Wise和Tomasso的实验结果显示饲料中使用推荐量的VE并不能改变斑点叉尾(Ictalurus punctatus)肝脏中GPX活力^[22]。Mourete等认为VE对金头鲷(Sparus aurata L.)肝脏中的GPX和GR活力影响不显著^[3]。Lygren等的实验结果也显示VE对大西洋鲑(Salmo salar L.)体内抗氧化酶没有显著影响^[24]。但是,本研究结果却发现,对于皱纹盘鲍血清中的抗氧化酶系统来说,Se是一个有效的影响因子,饲料中不同含量的Se对5种抗氧化物酶活力都有显著的影响。而VE仅对GPX和GR活力有显著的影响,且两者对于SOD和GST活力的影响没有显著的交互作用。Mourete等认为对于抗氧化酶活力的研究由于研究动物种类、器官组织、饲喂方式及其他生态条件不同,而且一些小分子抗氧化物(尿素、VC、VE等)在进化发育过程中比抗氧化酶出现要早,这些因素都会导致研究结果的不统一^[3]。

本研究显示GPX的活力随着饲料中Se含量的

增加而升高, 这与以前的许多研究结果相似。Reddy 等认为动物体内低水平的 GPX 会导致有机和无机氢过氧化物的积累, 从而导致脂质过氧化^[23]。SOD 活力是随着饲料中 Se 或 VE 的含量的升高而降低, 且两者具有明显的交互作用。SOD 是底物诱导酶, 它的活力升高说明体内 O_2^- 或羟自由基含量上升, 从而导致动物体内氧化压力过大。Amstad 指出 GPX/Cu, Zr SOD 这个指标的轻微变化会影响到细胞抵制氧化诱导的基因组和细胞损害^[6]。实验只测定了总 SOD 活力, 但在计算 GPX/SOD 这个指标之后也发现这个指标可以有效地反映动物体的抗氧化状态。当饲料中添加 0.6mg/kg 硒时, 这个指标达到最高, 当添加 VE 时是 4.0, 不添加 VE 时是 4.2, 与天然饲料海带组 (4.82) 相当; 而饲料中不添加 VE 和硒时, 这个指标达到最低 0.6。

Avanzo 等认为 GR/GPX 这个指标升高标志着动物体内的某些组织系统(而不是依赖硒的 GPX)正在加剧消耗 GSH, 即表示体内氧化压力增大^[7]。由实验结果可以看到, 当饲料缺乏 VE 和硒时, 这个指标达到最高 2.26, 而饲料中添加 VE 和 0.6mg/kg 的硒时这个指标达到最低 0.38。

Mourente 等认为从 CAT 和 SOD 的作用机理可以推测这两种酶活力变化应该保持同步, 从结果可以看出这两种酶的活力保持了平行变化的趋势^[3]。从酶动力学观点看, 与 CAT 相比哺乳动物体内的 GPX 对 H_2O_2 更具亲和力^[7,23], 也就是说动物体内主要是 GPX 完成清除 H_2O_2 。当饲料中 Se 含量减少而使得 GPX 活力降低时, CAT 活力就会上升以弥补 GPX 活力的下降。本实验结果很好地证实了这个理论。同时 CAT/SOD 是动物体内又一个重要的抗氧化指标^[7], 它的升高标志着抵制 ROIs 的抗氧化酶系统的激活, 也表示动物体受到的氧化压力增大。当饲料缺乏硒时鲍血清中 CAT/SOD 指标达到最高, 而随着饲料中 Se 和 VE 的添加, CAT/SOD 的值逐渐减小。这也进一步说明饲料中添加 VE 和硒能有效提高皱纹盘鲍体内的抗氧化能力。

Avanzo 等在实验中发现饲料中 Se 或 VE 的缺乏都能使鸡肌肉线粒体内的 GST 活力升高^[7]。本实验也发现当饲料缺乏 VE 或 Se 时, 皱纹盘鲍血清内的 GST 活力达到最高。一些研究者认为一些 GST 的同工酶具有不依赖硒的 GPX 活力, 所以 GST 活力的上升在一定程度上可以弥补 GPX 活力的下降^[7]。

综合各种酶活力指标, 投喂海带的对照组鲍鱼的抗氧化状态优于投喂人工饲料的鲍鱼。这也说明

皱纹盘鲍的实验饲料配方还有待进一步完善。

总体而言, 饲料中添加 VE 和 Se 能有效提高皱纹盘鲍体内的抗氧化能力, 而相对于 VE 而言, 饲料中的硒对皱纹盘鲍血清中的抗氧化酶系统影响更显著。当饲料中含有 50IU/kg 的 VE 时, 添加 0.6mg/kg 左右的硒能够使皱纹盘鲍血清中的抗氧化酶系统达到相对平衡, 从而使动物体能有效地抵抗氧化损害。

参考文献:

- [1] Zhang F, Li G. Progress on researches of reactive oxygen intermediates of molluscs hemocytes in internal defense[J]. *Marine Science*, 1999, 2: 16—19. [张峰, 李光友. 贝类血细胞活性氧体内防御作用的研究进展. 海洋科学, 1999, 2: 16—19]
- [2] Lygen B, Hamre K, Waagbø R. Effects of dietary pro and antioxidants on some protective mechanisms and health parameters in Atlantic salmon *Salmo salar* L. [J]. *J. Aquat. Anim. Health*, 1999, 11: 211—221
- [3] Mourente G, Diaz Salvago E, Bell J G, et al. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidized oil: attenuation by dietary vitamin E[J]. *Aquaculture*, 2002, 214: 343—361
- [4] Sarada S K S, Sairam M, Anju P D B, et al. Role of selenium in reducing hypoxia induced oxidative stress: an in vivo study[J]. *Biomed Pharmacother*, 2002, 56: 173—178
- [5] Mourente G, Tocher D R, Diaz Salvago 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
- [6] Amstad P, Moret R, Cerutti P. Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu, Zr superoxide dismutase overproducers to oxidant stress[J]. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269: 1606—1609
- [7] Avanzo J L, Mendonca Jr, Pugine C X, et al. Effect of vitamin E and selenium on resistance to oxidative stress in chicken superficial pectoralis muscle[J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, 2001, 129: 163—173
- [8] Fang Y, Yang S, Wu G, et al. Free Radicals, antioxidants, and nutrition[J]. *Nutrition*, 2002, 18: 872—879
- [9] Wolf R, Wolf D, Ruocco V, et al. Vitamin E: the radical protector [J]. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 1998, 10: 103—117
- [10] Ziegler E E, Filer Jr, L J. *Present knowledge in Nutrition* [M]. Beijing: People Hygeian Press, 1998: 567—574. [Ziegler E E, Filer Jr, L J 现代营养学. 北京: 人民卫生出版社 1998, 567—574]
- [11] Mai K. Comparative Studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. VII Effects of dietary vitamin C on survival, growth and tissue concentration of ascorbic acid[J]. *Aquaculture*, 1998, 161: 383—392
- [12] Zhou Q, Mai K, Tan B, et al. The effects of vitamin E on growth, survival and carcass composition of juvenile abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2001, 32(2): 125—131. [周

歧存, 麦康森, 潭北平, 等. 维生素 E 对皱纹盘鲍幼鲍生长、存活及体成分的影响. 海洋与湖沼, 2001, **32**(2): 125—131]

[13] Mai K, Mercer J P, Donlon J. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. III Response of abalone to various levels of dietary lipids[J]. *Aquaculture*, 1995a, **134**: 65—80

[14] Mai K, Mercer J P, Donlon J. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. IV. Optimum dietary protein level for growth[J]. *Aquaculture*, 1995b, **136**: 165—180

[15] Hilton J W. The Interaction of vitamin, minerals and diet composition in the diet of fish[J]. *Aquaculture*, 1989, **79**: 223—244

[16] Watanabe T, Kiron V, Satoh S. Trace minerals in fish nutrition[J]. *Aquaculture*, 1997, **151**: 185—207

[17] Beers R F, Sizer I W. Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase[J]. *J. Biol Chem.* 1952, **195**, 133—140

[18] Zou G, Gui X. , Zhong X, *et al.* A method of assessing SOD activity [J]. *Prog. Biochem. Biophys.* , 1986, **4**: 71—73. [邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 一种 SOD 的测活方法. 生物化学和生物物理进展, 1986, **4**: 71—73]

[19] Bell J G, Cowey C B, Adron J W, *et al.* Some effects of vitamin E and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Br. J. Nutr.* 1985, **53**, 149—157

[20] Habig W H, Jakoby W B, *et al.* Glutathione S transferases (rat and human) [J]. *Methods Enzymol.* , 1981, **77**, 218—231

[21] D'Illo C, Polidoro G, Arduini A, *et al.* Glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S transferase and gamma glutamyl transpeptidase activities in the human early pregnancy[J]. *Biochem. Med.* , 1983. **29** : 143—148

[22] Wise D J, Tomasso J R. Effects of dietary selenium and vitamin E on red blood cell peroxidation, glutathione peroxidase activity, and macrophage superoxide anion production in Channel Catfish[J]. *J. Aquat. Anim. Health*, 1993, **5**: 177—182

[23] Reddy, K V, Kumar, T C, Prasad, M, *et al.* Pulmonary lipid peroxidation and antioxidant defenses during exhaustive physical exercise: the role of vitamin E and selenium [J]. *Nutrition*, 1998, **14** (5): 448—451

[24] Lygren B, Hamre K, Waagbo R. Effect of induced hyperoxia on the antioxidant status of Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed three different levels of dietary vitamin E[J]. *Aquacult. Res.* , 2000, **31**: 401—407

EFFECTS OF DIETARY SELENIUM AND VITAMIN E ON ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES IN ABALONE, *HALIOTIS DISCUS HANNAI* INO

WAN Min, MAI Kang-Sen, MA Hong-Ming, XU Wei and LIUFU Zhi-Guo

(Key Laboratory of Mariculture, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract: When attacked by microbes, the immune system of the host can be activated, which induces many changes. One of them is that the hemocytes can produce reactive oxygen intermediate(ROIs) to kill the microbes. On the other hand, antioxidant system is necessary to maintain an appropriate amount of ROIs, and keep a good balance between killing microbes and protecting itself from hurt by superfluous ROIs. Vitamin E(VE) and selenium(Se) are two important components of the antioxidant system, and can eliminate the superfluous ROIs directly or indirectly. In the present study, a two-factorial experiment was designed to evaluate the effects of dietary Se and VE on antioxidant enzyme activities, which can reflect the oxidant status of the organisms, abalone *Haliotis discus hannai* Ino. Totally eight semi-purified diets were formulated to provide graded levels of Se(0, 0.2, 0.6, 1.5 mg/kg) and VE(0, 50 IU/kg). Abalone of similar size(6—7 cm) were distributed randomly into buckets with recirculating sea water. Eight different artificial diets and one control(fresh kelp, *Laminaria japonica*) were tested. Each treatment had three replicates. The feeding experiments lasted for 120 days. The culture conditions during this period were as follows: 12 hr illumination per day, water temperature 15.6—20.5 °C, salinity 31—34, dissolved oxygen 7.2 mg/L, pH 7.5—7.9. After the feeding experiments, the animals were sacrificed and hemolymph was withdrawn, and centrifuged at 3000 r/min for 5 min at 4 °C. The supernatant was kept in -70 °C for further use. The activities of catalase(CAT), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPX), glutathione reductase(GR), glutathione S-transferase(GST) in serum were assayed. The results showed that dietary Se had more efficient effects on antioxidant enzyme activities than VE. Dietary Se had significant effects on all five antioxidant enzyme activities($P < 0.05$), while VE significantly influenced the activities of only GPX and GR($P < 0.05$). There were significant interactions between Se and VE on the activities of CAT, GPX and GR($P < 0.05$). It was found that SOD and CAT activity in abalone serum decrease with increasing of dietary content of Se or VE. GPX activity increased when dietary Se content increased. GST activity was the highest when no Se or VE in the diet. Addition to enzyme activities, GPX/SOD, GR/GPX and CAT/SOD ratios were used as indices of antioxidant level. It was found that these three ratios were affected significantly by dietary selenium($P < 0.05$), while only GR/GPX was influenced significantly by dietary VE. Se and VE had interaction in GPX/SOD and GR/GPX($P < 0.05$). When no Se or VE was added to the diet, the value of GR/GPX and CAT/SOD was the highest(2.3 and 0.3 respectively) while GPX/SOD was the lowest(0.6). These indices also changed sensitively when Se or VE were added. In the diet containing 0.6 mg/kg Se, the GPX/SOD was the highest. When 0.6 mg/kg Se and 50 IU/kg VE was added to the diet, GP/GPX reached the lowest point, and also the value of CAT/SOD showed the decreasing trend with Se and VE was added. Considering all the indices we had measured, it could be concluded that 0.6 mg/kg Se and 50 IU/kg VE could keep the antioxidant enzymes in a balanced level, which could protect abalone from oxidant damages. According to these results, the abalone fed with kelp, *L. japonica* kept better antioxidant status at the end of the experiments than those fed with artificial diet. It indicated that the formula of the artificial diet used in the present experiments still needs to be optimized.

Key words: Abalone; *Haliotis discus hannai*; Selenium; Vitamin E; Antioxidant enzymes