

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17437

饲料中添加姜黄素对尼罗罗非鱼幼鱼生长和四氯化碳诱导肝损伤的影响

张媛媛^{1,2}, 宋理平^{1,2}, 胡斌^{1,2}, 冒树泉^{1,2}, 许鹏^{1,2}

1. 山东省淡水渔业研究院, 山东 济南 250013;

2. 山东省淡水水产遗传育种重点实验室, 山东 济南 250013

摘要: 本试验旨在研究饲料中姜黄素对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼生长性能的影响和对四氯化碳(CCl_4)诱导鱼体急性肝损伤的保护作用, 为筛选治疗鱼类肝脏综合征的绿色药物提供理论依据。在基础饲料中分别添加不同水平(0、15 mg/kg、30 mg/kg、60 mg/kg、120 mg/kg 和 240 mg/kg)的姜黄素, 连续饲喂鱼体 8 周后进行采样, 探讨姜黄素对尼罗罗非鱼生长的影响, 并采用 CCl_4 诱导鱼体急性肝损伤, 72 h 后采集血液和肝组织, 检测相关抗氧化指标以及肝组织切片的变化。结果显示, 饲料中添加 60 mg/kg 和 120 mg/kg 姜黄素可显著增加鱼体的增重率和特定生长率($P<0.05$); 当罗非鱼经 CCl_4 诱导 72 h 后, 60 mg/kg 和 120 mg/kg 姜黄素组的血浆谷草转氨酶(GOT)、谷丙转氨酶(GPT)活力和丙二醛(MDA)含量显著低于对照组($P<0.05$), 而血浆总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、谷胱甘肽(GSH)、血浆总抗氧化能力(T-AOC)、肝超氧化物歧化酶(SOD)活力、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力却显著高于对照组($P<0.05$); 姜黄素在一定程度上可保护鱼体肝不受损伤, 且以添加 120 mg/kg 水平时效果最佳。综上, 饲料中添加 60~120 mg/kg 姜黄素可促进尼罗罗非鱼幼鱼生长性能的提高, 而当饲料中添加 120 mg/kg 姜黄素时, 对其肝的保护作用最强, 可有效地抑制肝组织的脂质过氧化。

关键词: 姜黄素; 四氯化碳; 尼罗罗非鱼; 生长; 肝损伤; 脂质过氧化

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)06-1271-10

近年来, 中国水产养殖业逐渐向高密度、集约化发展, 人工配合饲料的大量投喂、药物和激素的不规范化使用、养殖水体环境的日益恶化、饲料中存在有害物质以及饲料营养成分缺失与失衡等不利因素越来越多, 对鱼体本身造成巨大胁迫, 使其代谢系统失衡特别是对肝功能的损害尤为巨大, 最终导致鱼类肝胆综合征的大规模暴发, 使水产养殖业的发展受限^[1]。肝胆综合征若不对症用药, 鱼体可迅速大量死亡。因此, 了解鱼类肝胆综合征的发病机制并在发病时及时对症下药, 对鱼体肝胆综合征的防治具有重要意义。

目前许多研究表明, 部分化学物质如乙醇、

四氯化碳(CCl_4)、铬化物等^[2]均能导致肝损伤, 其中, CCl_4 是经典的肝毒物, 可损害肝细胞膜、细胞器膜, 致使膜发生脂质过氧化, 最终导致肝功能下降, 肝细胞坏死等^[3]。在哺乳动物中, CCl_4 作为一种模式毒物被广泛用于构建肝(细胞)损伤模型以筛选保肝药物和研究肝机理等^[4]。与哺乳动物类似, 鱼类的肝细胞对 CCl_4 较为敏感^[5], 近年来 CCl_4 被广泛用于构建鱼体肝损伤模型^[6]。

对于鱼类肝胆综合征的治疗, 尚未发现特效药物, 目前还是多以抗生素为主。然而, 许多研究^[7-8]发现鱼类内服抗生素不但会引起鱼体本身消化道功能降低, 还会对机体肝胆、脾肾等脏器

收稿日期: 2017-12-08; 修订日期: 2018-01-12.

基金项目: 山东省 2017 年度农业重大应用技术创新项目.

作者简介: 张媛媛(1984-), 博士, 助理研究员, 从事水产动物营养与免疫研究. E-mail: yyuanzhang2008@163.com

通信作者: 宋理平(1974-), 博士, 研究员, 主要从事水产动物营养与饲料加工研究. E-mail: lpsyang1974@126.com

造成损伤。此外, 抗生素在机体内大量残留会致使病原菌对药物产生一定耐药性, 最终给人类健康造成危害。因此, 开发一种绿色的无毒副作用的对鱼体肝脏损伤具有保护和治疗作用的中成渔药已变得至关重要。姜黄素(curcumin)是一种从姜科植物中提取的分子量较小的多酚类植物。大量研究显示, 姜黄素具有抗氧化^[9]、杀菌消炎^[10-11]、清除自由基^[9]及抗癌^[12]等作用, 并且在临床中发现姜黄素也可作为一种特效药广泛应用于心血管系统和消化系统疾病的治疗。目前, 有关姜黄素抗氧化和防护肝损伤方面的研究多见于小鼠(*Mus musculus*)^[13-14]和畜禽类^[15], 研究结果均表明姜黄素对小鼠或肉鸡(*Gallus gallus*)等动物肝损伤具有保护作用, 而鱼类在此方面的研究却很少见, 仅有喻运珍等^[16]对草鱼(*Ctenopharynodon idellus*)急性肝损伤保护作用的研究, 然而此研究中姜黄素是采用灌胃给药的方法, 较难操作, 对鱼体消化道功能具一定的损伤, 不适用于大规模的养殖过程。而本研究以 CCl₄ 诱导尼罗罗非鱼肝急性损伤模型为基础, 姜黄素以添加剂的形式添加于饲料中, 研究饲料中姜黄素对鱼体生长和对急性肝损伤的保护作用, 以期为鱼类保肝药物的进一步开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

本试验分为 7 组, P1 组为对照组, P2 组为空白对照组, 以基础饲料(不添加姜黄素)投喂; P3、P4、P5、P6、P7 为试验组, 饲喂试验饲料(姜黄素的添加水平分别为 15 mg/kg、30 mg/kg、60 mg/kg、120 mg/kg 和 240 mg/kg)。姜黄素(纯度>95%)和 CCl₄ 分别由西安飞达生物技术有限公司和德州润昕实验仪器有限公司 提供。

试验一: 连续饲养 8 周后, 对 P1、P3、P4、P5、P6 和 P7 组进行采样, 分析不同添加量的姜黄素对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼生长性能的影响。试验二: 连续饲养 8 周后, 以 0.5 mL/100 g 体重的比例, 分别对 P1、P3、P4、P5、P6 和 P7 组鱼体腹腔注射 30%的 CCl₄ 溶液(溶于橄榄油); P2 (空白对照)组的罗非鱼幼鱼在连续

饲养 8 周后, 不进行 CCl₄ 溶液注射, 而是按照相同的比例(0.5 mL/100 g 体重)注射橄榄油, 72 h 后分别采样, 以探究姜黄素对四氯化碳诱导鱼体肝损伤的影响。

1.2 试验饲料

试验饲料在山东省淡水渔业研究院营养与饲料加工研究室制备, 先将饲料原料粉碎并过 40 目筛, 随后采用逐级混匀的方法使原料充分混匀, 加水后用小型颗粒机(SLP-45, 购自中国水产科学研究院渔业机械研究所)制成直径为 2 mm 的颗粒备用, 基础饲料见表 1。

表 1 试验饲料配方与营养水平
Tab. 1 Formulation and nutrient contents of the experimental diets

饲料组成 ingredients	干重百分比/% percentage dry weight
鱼粉 fish meal	15
豆粕 soybean meal	40
米糠 rice bran	20
次粉 wheat middling	16
豆油 soybean oil	4
氯化胆碱 choline chloride	1
维生素预混料 ^a vitamin premix ^a	1
矿物质预混料 ^b mineral premix ^b	1
磷酸二氢钙 calcium dihydrogen phosphate	2
营养水平/% proximate composition	
粗蛋白 crude protein	31.32
粗脂肪 ether extract	7.68
灰分 ash	8.94

注: a. 每千克维生素预混料包含: 维生素 A, 900000 IU; 维生素 D, 200000 IU; 维生素 E, 4500 mg; 维生素 K₃, 220 mg; 维生素 B₁, 320 mg; 维生素 B₂, 1090 mg; 烟酸 2800 mg; 维生素 B₅, 2000 mg; 维生素 B₆, 500 mg; 维生素 B₁₂, 1.6 mg; 维生素 C, 5000 mg; 泛酸, 1000 mg; 叶酸, 165 mg; 胆碱, 60000 mg.
b. 每千克矿物质预混料包含: FeSO₄·7H₂O, 25 g; CuSO₄·5H₂O, 2.0 g; ZnSO₄·7H₂O, 22 g; Na₂SeO₃, 0.04 g; KI, 0.026 g; MnSO₄·4H₂O, 7 g; CoCl₂·6H₂O, 0.1 g.
Note: a. vitamin premix supplied the following vitamins (per kg diet): vitamin A, 900000 IU; vitamin D, 200000 IU; vitamin E, 4500 mg; vitamin K₃, 220 mg; vitamin B₁, 320 mg; vitamin B₂, 1090 mg; Niacin, 2800 mg; vitamin B₅, 2000 mg; vitamin B₆, 500 mg; vitamin B₁₂, 1.6 mg; vitamin C, 5000 mg; pantothenate, 1000 mg; folic acid, 165 mg; choline, 60000 mg.
b. mineral premix supplied the following minerals (per kg diet): FeSO₄·7H₂O, 25 g; CuSO₄·5H₂O, 2.0 g; ZnSO₄·7H₂O, 22 g; Na₂SeO₃, 0.04 g; KI, 0.026 g; MnSO₄·4H₂O, 7 g; CoCl₂·6H₂O, 0.1 g.

1.3 试验鱼与养殖管理

尼罗罗非鱼鱼苗由山东省淡水渔业研究院罗非鱼良种场提供。试验开始前,使用通威饲料公司提供的沉性饲料暂养,21 d后,随机将630尾规格、体重基本一致的鱼苗分为7个组(表2),每组3个平行,每个平行30尾鱼,分别放入21个网箱(60 cm×60 cm×120 cm)中,网箱悬挂于室内养殖池中。

每组试验所用网箱在空间位置上随机分散分布,减少试验组之间因光线等因素造成的误差。每天投喂3次(分别于8:30、12:30和4:30),近饱食投喂,每次投喂持续30 min以上。每天除污确保水质,日夜连续充气增氧^[17]。整个试验期间水质条件为:水温24.5~27.5℃、溶解氧在6 mg/L以上、氨氮在0.1 mg/L以下、亚硝酸盐在0.1 mg/L以下、pH 6.8~7.0。

1.4 采样与处理

采样前禁食24 h,每个网箱随机取3尾鱼,用质量浓度为100 mg/L的MS-222作快速深度麻醉,尾静脉采血,将血样收集在抗凝管中,以4℃ 6000 r/min转速离心10 min制备血浆,-80℃冻存备用。迅速分离肝和肠道,并称重^[18]。同时,每条鱼采集肝,存于波恩氏液中以备作切片用。

1.4.1 生长与形体指标 试验结束后,停喂24 h,对每缸分别进行称重,测定每缸鱼的总体重和尾数,计算特定生长率、增重率、饲料系数及蛋白质效率等。随后每个网箱随机抽取3尾鱼测定体重、体长、内脏重、肝重,用于肥满度、内脏比、肝体比的测定^[19]。

鱼体生长及饲料利用率等指标的计算方法如下:

增重率(weight gain, WG, %)=($W_t - W_0$)×100%/ W_0

特定生长率(specific growth rate, SGR, %/d)=($\ln W_t - \ln W_0$)×100%/t

脏体比(viserosomatic index, VSI, %)=内脏重×100%/ W_t

肝体比(hepatosomatic index, HIS, %)=肝脏重×100%/ W_t

肥满度(condition factor, CF, %)= $W_t \times 100\% / L^3$

饵料系数(feed conversion ratio, FCR)= $F / (W_t - W_0)$

式中, W_0 为实验开始时鱼的体重(g); W_t 为实验结束时鱼的体重(g); L 为实验结束时鱼的体长(cm); t 为鱼的养殖天数(d); F 为摄食的饲料量(g)。

1.4.2 血浆肝功能指标测定 总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、谷草转氨酶(GOT)、谷丙转氨酶(GPT)和总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所科技有限公司。

1.4.3 肝抗氧化指标测定 采样所取得的肝脏,在4℃冰箱化冻,用生理盐水冲洗去掉血液并用滤纸吸干,以生理盐水为介质按照1:9的比例制成匀浆液,随后离心10 min(转速3000 r/min),取上清液用于谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的测定,试剂盒购自南京建成生物工程研究所科技有限公司。

1.4.4 肝组织切片分析 养殖试验结束后,每个网箱中随机取3尾鱼麻醉,在冰盘上解剖取出肝,放入预先配制好的波恩氏固定液(配制比例:1.22%的饱和苦味酸75 mL,40%的福尔马林溶液25 mL,冰醋酸5 mL)中进行组织固定^[20]。然后按照操作规范对固定好的肝脏组织进行水洗、脱水、透明、浸蜡、包埋和切片(所用切片机型号为Leica RM-2255,德国)。蜡片制作完成后,将其附贴于用蛋白甘油处理过的载玻片上进行HE染色,然后用中性树胶封片。封片结束后,将组织切片置于光学显微镜(NIKON DS-Fi1)(油镜×1000)下观察。

1.5 数据统计与分析

试验数据采用SPSS 17.0软件进行单因素方差分析,数据差异显著时,采用Duncan's检验法进行多重比较,差异水平定为 $P < 0.05$ 。试验结果以平均值±标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。

2 结果与分析

2.1 不同添加水平的姜黄素对尼罗罗非鱼生长性能和形体指标的影响

由表2可知,饲料中添加不同水平的姜黄素可显著影响尼罗罗非鱼的增重率和特定生长率($P < 0.05$),与对照组(P1)和15 mg/kg姜黄素组(P3)

相比, 60 mg/kg (P5)和 120 mg/kg (P6)姜黄素组的增重率和特定生长率显著升高, 而与 30 mg/kg (P4)和 240 mg/kg(P7)组无显著差异($P>0.05$); 添加不同水平的姜黄素对肝体比、脏体比、饵料系数和肥满度等均无显著影响($P>0.05$)。

2.2 姜黄素对 CCl₄ 诱导尼罗罗非鱼肝损伤后血液肝功指标的影响

表 3 显示, 鱼体未经过 CCl₄ 诱导致肝损伤时, 姜黄素在饲料中的添加水平对血浆中 GPT 和 GOT 活力影响不显著($P>0.05$); 血浆中总蛋白含量和白蛋白含量随着姜黄素添加量的升高而先升高后降低, 姜黄素添加水平对白蛋白无显著影响($P>0.05$), 但却显著影响总蛋白含量($P<0.05$), 由结果可知, 当饲料中姜黄素的添加量为 60 mg/kg

和 120 mg/kg 时, 血液中总蛋白含量显著高于对照组(P1 和 P2) ($P<0.05$), 但与其他各姜黄素组均无显著差异($P>0.05$); 血浆中总抗氧化能力受饲料中姜黄素的添加水平影响显著($P<0.05$), 与对照组(P1 和 P2)相比, P4 (30 mg/kg)、P5 (60 mg/kg)和 P6 (120 mg/kg)组的 T-AOC 显著升高($P<0.05$), P6 组的 T-AOC 显著高于 P4 组($P<0.05$), 其他各组之间差异不显著($P>0.05$)。

表 4 显示, 罗非鱼经 CCl₄ 诱导处理后, 对照组血液中的 GPT 和 GOT 活力明显上升, 而 TP 和 ALB 含量以及 T-AOC 则显著降低($P<0.05$), 与空白对照组(P2)相比, 差异极显著($P<0.05$)。随着饲料中姜黄素添加量的逐渐增大, GPT 和 GOT 活力均先降低后升高, 当添加量为 120 mg/kg (P6)时,

表 2 饲料中姜黄素的添加量对尼罗罗非鱼生长性能和形体指标的影响
Tab. 2 Growth performance of *Oreochromis niloticus* fed diets containing different curcumin levels

n=3; $\bar{x} \pm SE$

变量 variables	组别 group					
	P1	P3	P4	P5	P6	P7
初重/g W_0	4.35±0.01	4.32±0.02	4.4±0.05	4.33±0.02	4.35±0.01	4.32±0.06
末重/g W_t	34.75±1.14 ^a	35.68±2.15 ^a	35.59±1.2 ^{ab}	38.86±1.08 ^b	39.57±1.3 ^b	36.95±1.3 ^{ab}
增重率/% WGR	704.69±9.38 ^a	722.91.9±8.1 ^a	748.1.36±11.11 ^{ab}	797.26±21.08 ^b	799.83±14.25 ^b	755.13±9.25 ^{ab}
特定增长率/(%/d) SGR	3.12±0.02 ^a	3.23±0.03 ^a	3.54±0.08 ^{ab}	3.70±0.12 ^b	3.74±0.05 ^b	3.58±0.09 ^{ab}
饵料系数 FCR	1.22±0.06	1.22±0.12	1.22±0.04	1.25±0.09	1.22±0.07	1.2±0.07
存活率/% SR	100	100	100	100	100	100
脏体比/% VSI	11.35±0.46	11.28±0.17	11.95±0.80	12.38±0.20	11.89±0.51	11.35±0.46
肝体比/% HIS	1.54±0.15	1.36±0. 7	1.48±0.10	1.09±0.17	1.09±0.22	1.54±0.05
肥满度/% CF	3.96±0.18	3.81±0.24	3.77±0.19	3.46±0.17	3.55±0.12	4.05±0.22

注: 同行数据肩标不含相同字母的两组平均值之间差异显著($P<0.05$).
Note: Means in the same line with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

表 3 CCl₄ 诱导前姜黄素对尼罗罗非鱼血浆肝功指标的影响
Tab. 3 Effects of curcumin on the plasma liver function of *Oreochromis niloticus* before CCl₄-induced

n=9; $\bar{x} \pm SE$

变量 variable	组别 group						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
谷丙转氨酶/(U/L) GPT	15.53±2.20	17.40±2.29	22.00±2.05	24.67±3.75	20.68±5.81	21.58±3.56	22.92±4.25
谷草转氨酶/(U/L) GOT	20.62±9.17	22.20±7.16	25.69±8.71	24.70±15.9	27.86±16.15	25.49±8.76	24.72±17.39
总蛋白/(g/L) TP	21.89±2.58 ^a	20.96±1.69 ^a	25.43±1.44 ^{ab}	27.51±2.27 ^{ab}	30.57±1.41 ^b	31.43±2.89 ^b	27.26±2.15 ^{ab}
白蛋白/(g/L) ALB	15.38±1.17	14.21±3.14	13.92±1.75	15.05±2.77	17.25±3.69	18.51±1.98	16.58±2.77
总抗氧化能力/(U/mL) T-AOC	6.57±0.85 ^a	6.89±0.57 ^a	7.25±0.95 ^{ab}	8.11±1.10 ^b	8.96±0.77 ^{bc}	9.25±1.05 ^c	7.92±1.27 ^{ab}

注: 同行数据肩标不含相同字母的两组平均值之间差异显著($P<0.05$).
Note: Means in the same line with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

表 4 CCl₄ 诱导后 72 h 姜黄素对尼罗罗非鱼血浆肝功指标的影响
Tab. 4 Effects of curcumin on the plasma liver function of *Oreochromis niloticus* after 72 h CCl₄-induced

变量 variable	组别 group						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
谷丙转氨酶/(U/L) GPT	39.87±4.62 ^a	18.26±1.89 ^b	37.45±3.05 ^a	30.58±3.85 ^{ab}	24.22±3.81 ^{ab}	22.55±1.74 ^b	26.92±3.33 ^{ab}
谷草转氨酶/(U/L) GOT	54.20±11.54 ^a	22.98±5.46 ^c	48.52±6.25 ^a	40.70±5.2 ^{ab}	32.49±3.92 ^b	27.24±6.79 ^c	33.36±9.60 ^{bc}
总蛋白/(mg/L) TP	15.71±2.12 ^a	23.96±1.69 ^b	15.43±1.26 ^a	16.24±3.15 ^a	19.57±3.89 ^{ab}	21.53±3.92 ^b	18.67±3.15 ^{ab}
白蛋白/(mg/L) ALB	9.57±1.27 ^a	15.21±2.45 ^b	10.23±1.69 ^{ab}	12.57±1.96 ^{ab}	14.62±2.60 ^b	14.96±2.07 ^b	11.28±1.11 ^{ab}
总抗氧化能力/(U/mL) T-AOC	3.87±0.33 ^a	7.25±0.97 ^b	5.14±0.85 ^{ab}	6.58±0.81 ^b	8.25±1.22 ^c	8.87±1.04 ^c	7.64±0.88 ^{bc}

注: 同行数据肩标不含相同字母的两组平均值之间差异显著($P<0.05$).
Note: Means in the same line with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

血液中 GPT 活力显著低于($P<0.05$)对照组(P1)和 15 mg/kg 组(P3), 与其他各组无显著差异; P5、P6 和 P7 组的 GOT 活力均显著低于($P<0.05$)P1 组, 而当姜黄素添加水平为 120 mg/kg 时, 其效果最佳。与 P1 组相比, 饲料中添加一定水平的姜黄素均可使鱼体在一定程度上抵抗 CCl₄ 侵害, 其 TP、ALB 和 T-AOC 的表现为升高, 且以 120 mg/kg 的姜黄素效果最佳。

2.3 四氯化碳诱导后姜黄素对尼罗罗非鱼肝抗氧化酶的影响

由图 1 可知, 在饲料中添加姜黄素在一定程度上可提高肝 SOD 活力并降低 MDA 含量, 而鱼体经 CCl₄ 诱导处理后, 与空白对照组相比, P1 组的肝 SOD 活力明显降低, MDA 含量则显著升高($P<0.05$); 但随着饲料中姜黄素添加水平的逐渐增大, SOD 活力呈先升高后降低的趋势,

且以 60 mg/kg 和 120 mg/kg 姜黄素组的效果最佳($P<0.05$)(图 1A); MDA 含量则呈相反趋势, 当姜黄素添加量为 30 mg/kg、60 mg/kg 和 120 mg/kg 时, 其 MDA 均显著低于($P<0.05$)P1 组(图 1B)。

由图 2 可知, CCl₄ 诱导前, 鱼肝中 GSH-Px 和 GSH 活力均随着饲料中姜黄素添加量的增加呈先升高后降低的趋势, 但各组之间的 GSH-Px 活力无显著差异, 当姜黄素添加量为 120 mg/kg 时, 其肝脏 GSH 显著高于对照组(P1)和高剂量组(240 mg/kg, P7); 当 CCl₄ 诱导 72 h 后, 对照组的 GSH-Px 和 GSH 活力均显著降低($P<0.05$), 而二者在姜黄素组的活力均有所升高, 其中, P5 (60 mg/kg)、P6 (120 mg/kg)和 P7 (240 mg/kg)组的 GSH-Px 活力显著高于对照组, 且以 120 mg/kg 组的 GSH 活力最高。

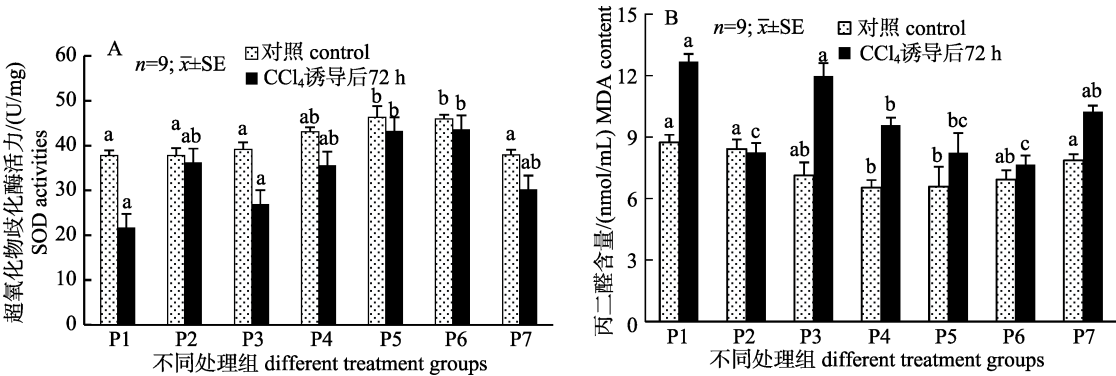


图 1 姜黄素对 CCl₄ 诱导尼罗罗非鱼肝超氧化物歧化酶活力(A)和丙二醛含量(B)的影响
Fig. 1 Effects of curcumin on the activity of SOD (A) and MDA content (B) in CCl₄-induced *Oreochromis niloticus* liver homogenate supernatant

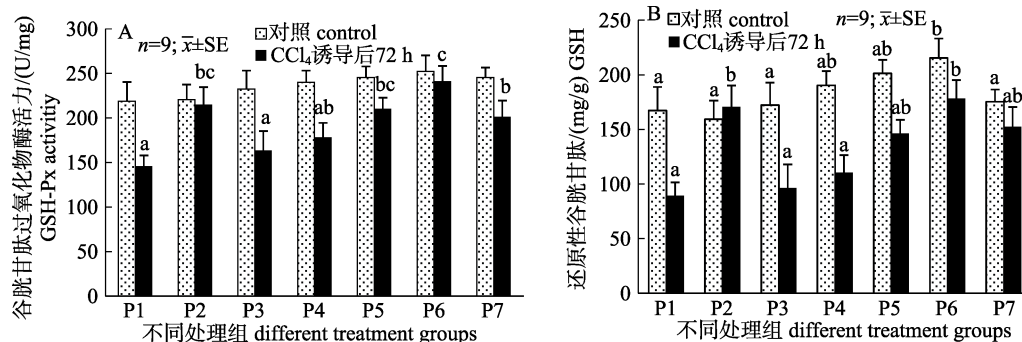


图 2 姜黄素对 CCl₄ 诱导尼罗罗非鱼肝谷胱甘肽过氧化物酶活力(A)和谷胱甘肽含量(B)的影响
Fig. 2 Effects of curcumin on the activity of GPx (A) and GSH content (B) in CCl₄-induced *Oreochromis niloticus* liver homogenate supernatant

2.4 CCl₄ 诱导后姜黄素对尼罗罗非鱼肝组织结构的影响

罗非鱼经 CCl₄ 诱导后肝组织病理切片如图 3

所示。诱导后 72 h, 样品在油镜(×1000)下观察, 结果表明, 与空白对照组(P2)相比, CCl₄ 可引起鱼体肝严重损伤, 肝细胞出现严重空泡现象及细胞

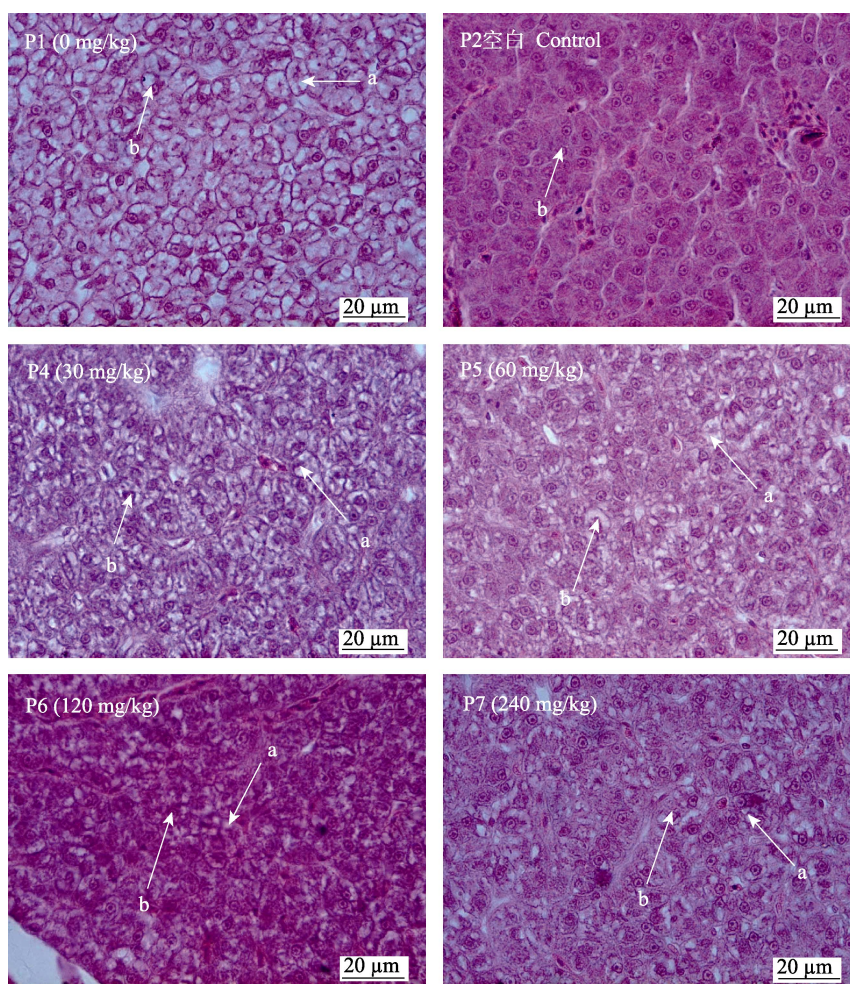


图 3 CCl₄ 诱导 72 h 后姜黄素对尼罗罗非鱼肝脏组织结构的影响
a 代表脂肪空泡; b 代表细胞核。

Fig. 3 Effects of curcumin on liver histology in *Oreochromis niloticus* in 72 h of CCl₄-induced
a indicated adipose hollow space; b indicated cell nucleus.

膨大现象,大部分肝细胞的细胞核出现偏移。随着姜黄素添加量的增加,与P1组相比各试验组肝细胞空泡化和膨大现象均出现不同程度的减轻,其中,P6 (120 mg/kg)和P7 (240 mg/kg)组的肝细胞形状较为正常,没有表现出细胞膨大现象,也无明显的脂肪空泡,细胞核大小适中,分布于细胞中间。

3 讨论

3.1 姜黄素对尼罗罗非鱼生长性能和形体指标的影响

生长和抗病是广大水产养殖户最关心的两大问题。目前,在陆生动物的养殖过程中,存在广泛使用抗生素和其他抗寄生虫药物来达到促生长和提高免疫力的现象^[21]。然而,抗生素存在耐药性,最终将危害人类的健康。中草药资源丰富且无毒副作用,目前已被广泛应用于水产动物的养殖过程中^[22]。本试验中,基础饲料里添加60 mg/kg和120 mg/kg的姜黄素可显著促进尼罗罗非鱼的增重率(WG)和特定生长率(SGR),这一结论与俞军等^[23]和胡忠泽等^[24]分别在大黄鱼(*Larimichthys crocea*) (300 mg/kg)和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) (0.06%)的研究中得出的最适添加量略有不同,这可能与姜黄素的纯度和养殖对象及其大小有关。

3.2 CCl₄ 诱导后姜黄素对尼罗罗非鱼血液肝功指标的影响

鱼类血液中具有很多生理指标能够很好地体现机体代谢及营养状况。当血浆生理指标发生变化时,这代表机体可能受到外界因子的影响而发生生理病变。因此,鱼类的营养和健康状况以及对环境的适应情况大多可以根据血液生理指标的高低来判断。GPT和GOT是鱼类最重要的转氨酶,具有分布广、活力强的特点,是反映肝生理状态的重要指标^[25]。在肝细胞受损时,GPT和GOT会被释放到血液中,在一定程度上血浆GOT和GPT活力的相对增加能反映肝功能的障碍,被认为是肝功能损害最具有特异性和最广泛应用的一个指标^[26]。本试验中,当尼罗罗非鱼未经CCl₄诱导时,血液中GPT和GOT活力无显著差异,这说

明一定范围内添加姜黄素不会导致肝功能损伤,鱼体肝代谢功能正常,且肝无肿大、萎缩等现象,这与肝体比等形体指标无显著差异这一结论是一致的;而当CCl₄诱导鱼体72 h后,血浆GOT和GPT活力显著升高,这说明鱼体肝受到严重损伤,然而当基础饲料中添加一定水平的姜黄素时,血液中GPT和GOT活力可显著降低,且以120 mg/kg的水平添加时,GPT活力与对照组显著差异,这说明饲料中添加一定水平的姜黄素对尼罗罗非鱼肝脏具有保护作用。

血浆中蛋白浓度是反应机体营养和代谢好坏的重要指标,也间接反映了机体的抗氧化水平。蛋白质代谢多发生在肝中,当肝损伤时,血液中TP和ALB活性会发生骤降,因此,TP和ALB也可作为检测肝功能的重要指标被用于临床鉴定。本试验中,当鱼体未受CCl₄诱导时,与对照组相比,一定添加量的姜黄素组TP和ALB含量明显升高;而当CCl₄诱导72 h后,对照组的TP和ALB与空白对照组相比明显降低,然而姜黄素组的TP和ALB含量却逐渐有所回升,这说明饲料中添加一定含量的姜黄素可促进鱼体蛋白质的合成,保护鱼肝不受损伤。刘红柏等^[27]的研究表明多种中草药不仅可以提高施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)的抗氧化功能,也能显著提高鱼体TP含量,与本实验结论一致。原因可能有以下几个方面:首先,姜黄素本身具有一定的免疫功能,可通过增加自身免疫力而抵抗外来病源的损伤,从而促进机体的生长和蛋白质代谢;其次,姜黄素作为Nrf2重要的诱导剂,可通过诱导Nrf2的活力来激活抗氧化通路中相关抗氧化酶的基因表达,最终达到提高肝脏抗氧化功能的目的^[28]。

3.3 CCl₄ 诱导后姜黄素对尼罗罗非鱼肝抗氧化指标的影响

在生物体正常的代谢活动中,活性氧(超氧化物阴离子(O₂⁻)、羟基阴离子(•OH)和过氧化氢(H₂O₂)等的产生和代谢维持着机体的动态平衡。SOD可将O₂歧化为H₂O₂,而谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)又可通过还原性谷胱甘肽(GSH)将H₂O₂催化生成水,以达到抵抗体内自由基的目

的。MDA 是脂质过氧化的产物,是由羟基阴离子攻击细胞膜所产生的,具有很强的生物毒性,并会破坏细胞的结构和功能。本试验中,60 mg/kg 和 120 mg/kg 姜黄素组的 SOD 活力和 GSH 含量显著高于对照组和 240 mg/kg 姜黄素组,而 MDA 含量的趋势正好相反,这说明姜黄素在一定范围内可提高鱼体的抗氧化功能,同样的结论也见于 Malar 和 Charles 的研究^[29]。而当尼罗罗非鱼经 CCl₄ 诱导 72 h 后,对照组的 SOD、GPx 活力和 GSH 含量出现了明显降低,MDA 含量也明显升高,但当饲料中添加一定含量的姜黄素时,鱼体肝脏中抗氧化物活力得到明显改善,且以 120 mg/kg 添加水平的效果最佳。这说明,120 mg/kg 的姜黄素在一定程度上提高了鱼体抗氧化功能,保护肝脏不受损伤。这可能是因为姜黄素可以通过抑制 CCl₄ 引起的 NF- κ B/c-Rel、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达量和 NF- κ B/c-Rel 蛋白水平上调,来调控部分抗氧化酶的活力,最终保护肝脏不受损伤^[30]。

3.4 四氯化碳诱导后姜黄素对尼罗罗非鱼肝组织结构的影响

机体中抗氧化机制可以被许多因素所调节,而最终抗氧化功能的提高是各种抗氧化因子共同作用的结果。因此,在一个试验中,一个单纯的抗氧化指标的上升或下降并不能说其抗氧化功能是被增强还是抑制了,这与各个抗氧化指标之间的相互作用并不同步。所以关于姜黄素可以提高罗非鱼抗氧化功能以保护肝不受损伤,需要进一步的更加可信的指标来证明。CCl₄ 是一种最常见的肝损伤诱导剂,被广泛应用于畜禽、小鼠及临床等试验中,所以通过观察经 CCl₄ 诱导后机体的肝脏组织切片是一个用来确定姜黄素是否具有肝脏保护作用的最直接、最客观的方法。本试验中,鱼体经 CCl₄ 诱导后,与空白对照组相比,对照组肝细胞的空泡化及细胞核偏移等现象严重,然而,姜黄素组的空泡化有所缓解,其中 30 mg/kg、60 mg/kg、240 mg/kg 组有轻微空泡化,120 mg/kg 组的细胞基本无空泡化,这说明姜黄素对鱼体具有保护肝脏不受损伤的功能,且以 120 mg/kg 的添加水平效果最佳。类似的结论在人^[31]和小鼠^[32]中均有报道。这可能是因为姜黄素可以诱导机体

产生 ROS,其可使受损细胞的 DNA 分子损伤,通过调节细胞凋亡相关基因的表达以期修复肝功能^[33],但剂量不足或者过量均不能达到最佳效果。

4 结论

饲料中添加 60 mg/kg 和 120 mg/kg 姜黄素可提高尼罗罗非鱼幼鱼的生长性能;姜黄素对尼罗罗非鱼的抗氧化功能有一定促进作用,当姜黄素的添加水平为 120 mg/kg 时,可最大程度降低其幼鱼脂质过氧化,保护肝脏不受损伤,机体的抗氧化功能最强。

参考文献:

- [1] Hu B L. Research on the prevention of fish liver and gall syndrome[J]. Journal of Aquaculture, 2006, 27(2): 335. [胡宝林. 鱼类肝胆综合症的防治[J]. 水产养殖, 2006, 27(2): 335.]
- [2] Arnold H, Pluta H J, Braunbeck T. Sublethal effects of prolonged exposure to disulfoton in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): cytological alterations in the liver by a potent acetylcholine esterase inhibitor[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1996, 34(1): 43-55.
- [3] Adzet T, Camarasa J, Laguna J C. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes[J]. Journal of Natural Products, 1987, 50(4): 612-617.
- [4] Koneri R, Balaraman R, Firdous K M V, et al. Hepatoprotective effects of Momordica Cymbalaria Fenzl. against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats[J]. Pharmacologyonline, 2008, 1: 365-374.
- [5] Statham C N, Croft W A, Lech J J. Uptake, distribution, and effects of carbon tetrachloride in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1978, 45(1): 131-140.
- [6] Koskinen H, Pehkonen P, Vehniäinen E, et al. Response of rainbow trout transcriptome to model chemical contaminants[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 320(3): 745-753.
- [7] Liu H C, Cai L H, Wang S Y. Progress on antitumor mechanisms of *Polyporus polysaccharide*[J]. Journal of Henan University of Science and Technology: Medical Edition, 2011, 29(3): 236-238. [刘洪超, 蔡林衡, 王淑英. 猪苓多糖抗肿瘤机制研究进展[J]. 河南科技大学学报: 医学版, 2011, 29(3): 236-238.]
- [8] Zhang M Y, Wang J X. The pathogenesis and treatment of fish liver and gall syndrome[J]. Journal of China Aquatic, 2009(10): 61-62. [张忙友, 王菊肖. 鱼类肝胆综合症的发病规律及治疗措施[J]. 中国水产, 2009(10): 61-62.]
- [9] Yang K Y, Gu J L, Yin D M, et al. Effect of curcumin on

- iNOS expression in LPS-activated microglia cells and anti-oxidation[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 23(11): 938-945. [杨开艳, 顾建兰, 殷冬梅, 等. 姜黄素对脂多糖激活的小胶质细胞 iNOS 表达的抑制及抗氧化作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(11): 938-945.]
- [10] Bengmark S. Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NFκB, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases[J]. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 2006, 30(1): 45-51.
- [11] Maczurek A, Hager K, Kenklies M, et al. Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, 60(13): 1463-1470.
- [12] Kuttan G, Hari Kumar K B, Guruvayoorappan C, et al. Antitumor, anti-invasion, and antimetastatic effects of curcumin[J]. The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease, 2007: 173-184.
- [13] Ma X L, Li X M, Chu F, et al. Protective effect of curcumin on liver injury induced by endoplasmic reticulum stress in mice[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2014, 49(11): 1629-1633. [马晓磊, 李晓明, 储菲, 等. 姜黄素对内质网应激诱导小鼠肝损伤的保护作用[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(11): 1629-1633.]
- [14] Han G, Wan H, Zhai G Y, et al. Protective effect of curcumin solid dispersion on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2009, 20(6): 1321-1322. [韩刚, 万红, 翟冠钰, 等. 姜黄素固体分散体对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1321-1322.]
- [15] Zhang J F. The protective effects of curcumin on mitochondrial oxidant damages in animals and the potential antioxidant mechanism[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015. [张靖菲. 姜黄素对动物线粒体氧化损伤的保护作用及其抗氧化机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.]
- [16] Yu Y Z, Yu S M, Xiong W J, et al. The protective effect of curcumin in acute hepatic injured *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(6): 1514-1517. [喻运珍, 余少梅, 熊文静, 等. 姜黄素对草鱼急性肝损伤的保护作用研究[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(6): 1514-1517.]
- [17] Zhang C N, Wang A M, Liu W B, et al. Effects of dietary lipid levels on fat deposition, lipid metabolize enzyme and antioxidant activities of *Chelon haematocheilus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(1): 108-115. [张春暖, 王爱民, 刘文斌, 等. 饲料脂肪水平对梭鱼脂肪沉积、脂肪代谢酶及抗氧化酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(1): 108-115.]
- [18] Liao Y J, Liu B, Ren M C, et al. Effects of dietary arginine level on growth performance, free essential amino acids, hematological characteristics, and immune response in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(3): 549-559. [廖英杰, 刘波, 任鸣春, 等. 精氨酸对团头鲂生长、血清游离精氨酸和赖氨酸、血液生化及免疫指标的影响[J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 549-559.]
- [19] Wu F, Wen H, Jiang M, et al. Effect of dietary vitamin C on growth performance, flesh quality and antioxidant function in genetically improved farmed tilapia[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(1): 79-87. [吴凡, 文华, 蒋明, 等. 饲料维生素 C 水平对吉富罗非鱼生长性能、肌肉品质和抗氧化功能的影响[J]. 中国水产科学, 2015, 22(1): 79-87.]
- [20] Du J L, Jia R, Cao L P, et al. Protective effects of *Polyporus umbellatus* polysaccharide on liver injury induced by carbon tetrachloride in *Cyprinus carpio* var. Jian[J]. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44(9): 1564-1570. [杜金梁, 贾睿, 曹丽萍, 等. 猪苓多糖对四氯化碳诱导建鲤肝损伤的保护作用[J]. 南方农业学报, 2013, 44(9): 1564-1570.]
- [21] Turnidge J. Antibiotic use in animals-prejudices, perceptions and realities[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004, 53(1): 26-27.
- [22] Yin G, Jeney G, Racz T, et al. Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Aquaculture, 2006, 253(1): 39-47.
- [23] Yu J, Chen Q T, Li S Y, et al. Effects of curcumin on growth and non-specific immunity of *Pseudosciaena crocea*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46(7): 1315-1321. [俞军, 陈庆堂, 李宋钰, 等. 姜黄素对大黄鱼生长及非特异性免疫功能的影响[J]. 南方农业学报, 2015, 46(7): 1315-1321.]
- [24] Hu Z Z, Yang J F, Tan Z J, et al. Effects of curcumin on the production performance and immune function of broiler chickens[J]. Cereal and Feed Industry, 2003(11): 29-30. [胡忠泽, 杨九峰, 谭志静, 等. 姜黄素对草鱼生长和肠道酶活力的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2003(11): 29-30.]
- [25] Hemre G I, Waagbø R, Hjeltne B, et al. Effect of gelatinized wheat and maize in diets for large Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) on glycogen retention, plasma glucose and fish health[J]. Aquaculture Nutrition, 1996, 2(1): 33-39.
- [26] Sheikhzadeh N, Tayefi-Nasrabadi H, Oushani A K, et al. Effects of *Haematococcus pluvialis* supplementation on antioxidant system and metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2012, 38(2): 413-419.
- [27] Liu H B, Huang J, Ma A Z, et al. Effects of the Chinese medicinal herb compound additives on growth and blood biochemical indicator of Amur sturgeon (*Acipenser schrencki* Brandt)[J]. Chinese Journal Fisheries, 2009, 22(3): 14-18. [刘红柏, 黄江, 马爱枝, 等. 中草药复方添加剂对施氏鲟生长及血液生化指标的影响[J]. 水产学杂志, 2009, 22(3): 14-18.]

- [28] Charoensuk L, Pinlaor P, Prakobwong S, et al. Curcumin induces a nuclear factor-erythroid 2-related factor 2-driven response against oxidative and nitritative stress after praziquantel treatment in liver fluke-infected hamsters[J]. *International Journal for Parasitology*, 2011, 41(6): 615-626.
- [29] Malar H L V, Charles P M. Effect of turmeric *Curcuma longa* Linn. extract on immunity and resistance to *Vibrio harveyi* in black tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. *International Journal of Research in Zoology*, 2013, 3(2): 21-26.
- [30] Cao L, Ding W, Du J, et al. Effects of curcumin on antioxidative activities and cytokine production in Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *jian*) with CCl₄-induced liver damage[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 150-157.
- [31] Jing X, Ueki N, Cheng J, et al. Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin[J]. *Cancer Science*, 2002, 93(8): 874-882.
- [32] Hemeida R A, Mohafez O M. Curcumin attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative damage in rats[J]. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 2008, 20(2): 141-148.
- [33] Jiang S, Song M J, Shin E C, et al. Apoptosis in human hepatoma cell lines by chemotherapeutic drugs via fas-dependent and fas-independent pathways[J]. *Hepatology*, 1999, 29(1): 101-110.

Effect of curcumin on growth performance and protective effect of liver injury induced by carbon tetrachloride in *Oreochromis niloticus*

ZHANG Yuanyuan^{1,2}, SONG Liping^{1,2}, HU Bin^{1,2}, MAO Shuquan^{1,2}, XU Peng^{1,2}

1. Freshwater Fisheries Research Institute of Shandong Province, Jinan 250013, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries of Genetics and Breeding of Shandong Province, Jinan 250013, China

Abstract: We evaluated the growth performance and hepatoprotective and antioxidant effects of curcumin against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury in *Oreochromis niloticus* based on an 8-week feeding trial. A basal diet was supplemented with 0 (control), 15, 30, 60, 120, and 240 mg/kg curcumin to formulate six experimental diets. At the end of the feeding trial, the growth performance was determined. Subsequently, CCl₄ was used for the model experiment. The plasma and liver were collected for the test after 72 h. Then, the expression levels of total protein (TP), albumin (ALB), total antioxidant capacity (T-AOC), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), and glutamic pyruvic transaminase (GPT) of plasma and liver superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) activities were detected. The liver tissues were also collected for anatomical analysis. The change of liver tissue structure was observed under a microscope. Results showed that there was a significant ($P<0.05$) increase in weight gain rate (WG) and special growth rate (SGR) of fish fed diets supplemented with 60 and 120 mg/kg curcumin. When fish were exposed to CCl₄ after 72 h, fish fed diets supplemented with 60 and 120 mg/kg curcumin had significantly ($P<0.05$) lower plasma GOT and GPT activities and MDA content, and higher contents of plasma TP and ALB, and activities of liver SOD, GSH, GSH-Px, and plasma T-AOC than those in other treatment groups. Curcumin (120 mg/kg curcumin per diet) obviously inhibited the damage of liver tissue structure caused by CCl₄ and resulted in the liver tissue structure returning to normal. Overall, the results indicated that appropriate dietary curcumin supplementation could enhance the growth (especially 60 and 120 mg/kg curcumin per diet) of fish and effectively protect the liver against CCl₄-induced injury (especially 120 mg/kg curcumin per diet). Therefore, curcumin can promote the growth of fish and increase the protective effect on liver injury of fish in a certain extent. However, as a Chinese herbal medicine, curcumin is complex, we need to further study its pharmacological mechanism in detail. Especially, because curcumin is insoluble in water, easy to metabolize, and not readily absorbed by the body, we need to develop a new formula to improve its solubility, pharmacological action, and medicinal administration. With an in-depth study of its pharmacological action and further elucidating the mechanism of action, curcumin will definitely play a bigger role in the treatment of fish diseases in the future.

Key words: curcumin; CCl₄; *Oreochromis niloticus*; growth; liver injury; lipid peroxidation

Corresponding author: SONG Liping. E-mail: lpsyang1974@126.com