

“油料油脂适度加工技术规范制定与实施”特约专栏文章之二

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2020.01.002

花生营养油对中老年 SD 大鼠 大脑皮层单胺氧化酶活性及 肝脏细胞的影响研究

赵康宇^{1,2}, 曹健^{1,2}, 田华^{1,2}, 张立伟^{1,2}, 郑竟成^{1,2}, 罗质^{1,2}, 何东平^{1,2}

(1. 武汉轻工大学 食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023;

2. 大宗粮油精深加工教育部重点实验室(武汉轻工大学), 湖北 武汉 430023)

摘要: 为了初步探究添加二十二碳六烯酸(DHA)藻油和花生四烯酸(AA)油脂的花生营养油的功能性,分别以不同DHA藻油和AA油脂剂量的花生营养油灌喂的中老年SD大鼠,持续饲喂8周后,检测对其大脑皮层组织中单胺氧化酶活性和肝脏细胞组织的影响。结果表明,饲喂花生营养油的对照组与饲喂普通花生调和油组相比,具有显著差异($P<0.01$),含DHA藻油和AA油脂的花生营养油可显著降低中老年SD大鼠大脑皮层中的单胺氧化酶活性,有效改善中老年SD大鼠的肝脏水肿及细胞炎症等症状,减缓细胞衰亡的速度。由此推测,摄入适量的DHA和AA在一定程度上能降低老年人肝硬化和肝纤维化等疾病的风险,达到保护肝脏的作用。

关键词: 花生营养油; 中老年SD大鼠; 大脑皮层; 单胺氧化酶; 肝脏细胞

中图分类号: TS221 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2020)01-0006-05

Effects of peanut nutrition oil on monoamine oxidase activity and liver in cerebral cortex of SD rats

ZHAO Kang-Yu^{1,2}, CAO Jian^{1,2}, TIAN Hua^{1,2}, ZHANG Li-wei^{1,2},
ZHENG Jing-cheng^{1,2}, LUO Zhi^{1,2}, HE Dong-ping^{1,2}

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan Hubei 430023;

2. Key Laboratory for Deep Processing of Major Grain and Oil (Wuhan Polytechnic University),
Ministry of Education, Wuhan Hubei 430023)

Abstract: To study the function of peanut nutrient oil supplemented with DHA algae oil and AA oil, SD rats were gavaged with peanut oil supplemented with different dose of DHA algae oil and AA oil, respectively the effects on monoamine oxidase activity in cerebral cortex and liver cell were examined after 8 weeks of continuous feeding. The results showed that the control group fed with peanut nutrient oil had significant difference compared with the normal peanut blending oil group ($P<0.01$). Peanut nutrient oil containing DHA algae oil and AA oil can significantly reduce the activity of monoamine oxidase in the cerebral cortex of SD rats, and effectively improve the symptoms of liver edema and cell inflammation in middle-aged SD rats, and slow down the rate of cell death. It can be speculated that the intake of appropriate amounts of DHA and AA can potentially reduce the risk of liver cirrhosis and fibrosis in the elderly people, and achieve the role of protecting the liver.

收稿日期: 2019-11-11

基金项目: “十三五”国家重点研发项目(2016YFD0401405-5)—油料油脂适度加工技术规范制定与实施

作者简介: 赵康宇, 1995年出生, 男, 硕士, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白。

通讯作者: 何东平, 1957年出生, 男, 教授, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白。

Key words: peanut nutrient oil; middle-aged SD rat; cerebral cortex; monoamine oxidase; liver cell

二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid ,DHA , C22 6n-3), 属于 ω -3 不饱和脂肪酸, 花生四烯酸(arachidonic acid , AA , C20:4 n-6), 属于 ω -6 不饱和脂肪酸, 这两种脂肪酸是人脑中主要的长链多不饱和脂肪酸(Long-chain polyunsaturated fatty acids , LCPUFA), 是人体大脑和视神经发育的重要物质, 对提高智力和增强视敏度具有重要作用^[1-3]。DHA 是神经系统细胞生长及维持的一种主要脂肪酸, 约占人脑总脂的 10%, 是大脑和视网膜的重要构成成分, 促进大脑细胞发育生长, 并延缓脑细胞的衰老和凋亡, 有利于婴幼儿提高记忆及学习能力, 同时也能减少中老年期痴呆症、脑瘫、中风等疾病的发生^[4-6]。AA 是合成前列腺素 E₂、前列腺环素、血栓烷素 A₂ 和白细胞三烯直接前体, 这些生物活性物质对人体心血管系统及免疫系统具有十分重要的作用, 具有抗炎、抗癌、酯化胆固醇, 增加血管弹性、降低血液粘度, 调节血细胞功能等一系列生理活性^[7-10]。DHA 藻油是以裂壶藻(*schizochytrium* sp.) 或者吾肯氏壶藻(*ulkeniaamoeboida*) 或者寇氏隐甲藻(*cryptocodiniumcohnii*) 等藻种为原料经生物发酵、提取、精炼等工艺制取的一种可供食用富含 DHA 的油脂^[11-12]。花生四烯酸油是以高山被孢霉(*mortierellaalpina*) 或者缺刻叶球藻(*lobosphaeraincisaReisigl*) 等藻种为原料经生物发酵、提取、精炼等工艺制取的一种可供食用富含 AA 的油脂^[13-15]。目前 DHA 藻油和 AA 油脂主要以微胶囊粉剂添加在婴幼儿奶粉等产品中, 如果将直接添加到大众食用植物油中, 不仅简化了 AA 油脂的加工工艺过程, 节约生产成本, 而且为普通大众及婴幼儿补充 DHA 及 AA 提供了一条极为便利的途径^[16-17]。

单胺氧化酶(monoamine oxidase , MAO) 为催化单胺氧化脱氨反应的酶, 也称为含黄素胺氧化酶, 主要分布于人体内的肝、肾、脑组织中,

组织中的 MAO 主要存在于线粒体上和膜紧密结合, 以脂肪醇氧化酶(fatty-alcohol oxidase , FAO) 为辅酶参与儿茶酚胺的分解代谢^[18-19]。实验的花生营养油是在前期研究基础上以浓香花生油为基油, 添加其他植物油以及 AA 油脂, 按营养成分的科学配比调制而成。以中老年 SD 大鼠为实验对象, 考察含 DHA 藻油和 AA 油脂的花生营养油对 SD 大鼠大脑皮层单胺氧化酶活性及肝脏细胞的影响, 初步探究花生营养油的生理活性, 为含 DHA 藻油和 AA 油脂的植物营养油开发提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

18 月龄中老年 SD 大鼠雌雄各半: 购于湖北省试验动物研究中心; 含 DHA 藻油和 AA 油脂花生营养油: 由油谷生物科技南京有限公司提供; 大鼠单胺氧化酶 ELISA 试剂盒、苏木素伊红(HE) 染色试剂盒: 购于上海邦奕生物科技有限公司; 其它化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

352 型酶标仪: 芬兰 LabsystemsMultiskan MS 公司; AC8 洗板机: 芬兰 Thermo Labsystems 公司; TG16W 微量高速离心机: 长沙湘智离心机仪器有限公司; L5S 紫外可见分光光度计: 上海仪电分析仪器有限公司; CX40 型生物显微镜: 宁波舜宇仪器有限公司; Agilent 7890A 气相色谱仪: 安捷伦科技(中国) 有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组与饲喂

将 18 月龄中老年 SD 大鼠随机分为 5 组, 每组 7 只。CK1 为阴性对照组(饲喂普通花生调和油)、CK2 为阳性对照组[DHA 藻油和 AA 油脂混合油(DHA AA=1 0.83)]、以 200、320、640 mg DHA 和 170、270、530 mg AA 分别调配后添加至 60 g 花生调和油中, 作为 DHA 及 AA 低、

中、高剂量调配油的处理组。从饲喂第一天起,全部 SD 大鼠在相同的自然条件下,定时定量进食,自由饮水,保证自然光照,良好通风,以及一定室温,饲养 1 周以使 SD 大鼠适应实验环境。待大鼠生长活动正常后,每日上午通过灌胃饲喂,饲喂剂量均为 1 mL 调配油/100 g 体重·d,其余时间自由饮水,持续饲喂 8 周。

1.3.2 处置方法

SD 大鼠饲喂 8 周后,采取注射麻醉法,在 SD 大鼠腹腔注射 10% (V/V) 水合氯醛对大鼠进行麻醉后迅速将脑组织及肝脏组织剥离,于 -20 °C 冻存,用于后续大鼠脑组织及肝脏组织有关成分的检测。

1.3.3 MAO 活性测定

采用酶联免疫吸附剂测定法 (ELISA) 测定^[20]。将 MAO 标准品稀释到不同浓度,分别为 180、120、60、30、15 U/L,稀释后各孔加样量都为 50 μL。分别设空白孔(空白对照孔不加样品及酶标试剂,其余各步操作相同)、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL,然后再加待测样品 10 μL (样品最终稀释度为 5 倍)。将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀。用封板膜封板后,于 37 °C 条件下,温育 30 min。揭掉封板膜,倒尽板孔中液体,加满洗涤液重复洗涤 5 次后,用吹风机吹干。每孔加入酶标试剂 50 μL,重复温育、洗涤。加显色剂 37 °C 避光显色 15 min,再加终止液 50 μL,终止反应。以空白空调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD 值)。以 MAO 标准品的浓度为纵坐标,OD 值为横坐标,得到标准曲线,将样品的 OD 值代入计算出样品浓度。

1.3.4 肝脏细胞形态结构观测

按照苏木素伊红 (HE) 染色试剂盒内附的说明书进行操作。

1.3.5 花生营养油脂肪酸组成成分分析

色谱柱: Agilent 19091F-433 (30 m×250 μm×

0.25 μm); 升温程序: 开始时为 140 °C, 以 2 °C/min, 22.5 min 升至 185 °C, 保留 5 min, 以 4 °C/min, 10 min 升至 225 °C, 保留 3 min; 载气 (N₂) 压力: 6.1 psi; 氢气流速: 30 mL/min, 空气流速: 300 mL/min; 分流比: 30:1。脂肪酸百分含量用面积归一法确定 (以峰面积百分比表示)。

1.3.6 数据处理

所有数据用平均数±标准差表示。采用 SPSS11.0 软件进行分析,采用单因素方差 *t* 检验进行组间比较, *P*<0.05 表示在统计学上具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 中老年 SD 大鼠大脑皮层 MAO 活性检测

各实验组 SD 大鼠大脑 MAO 活性数据如表 1 所示。

表 1 各实验组 SD 大鼠大脑皮层单胺氧化酶酶活力原始记录数据

组别	OD 值	总酶活	酶活单位/ (U/mg)
空白	0.063		
阴性对照组 CK ₁	0.610	18.32	540.00
阳性对照组 CK ₂	0.400	12.25	367.95
低剂量 DHA、AA 调配花生油组	0.370	10.84	331.63
低剂量 DHA、AA 调配花生油组	0.370	10.67	328.94
低剂量 DHA、AA 调配花生油组	0.390	11.13	342.76

各实验组 SD 大鼠大脑皮层 MAO 酶活水平比较如表 2 所示。由表 2 可知,当向小鼠饲喂含 DHA 藻油和 AA 油脂混合油 8 周时,阳性对照组 CK₂ 的 SD 大鼠大脑皮层中的 MAO 活性相比于阴性对照组显著降低,当向小鼠饲喂含 DHA、AA 调配花生油 8 周时,低、中、高剂量调配花生油组 SD 大鼠大脑皮层中的 MAO 活性与阳性对照组和阴性对照组相比,MAO 活性均显著降低。临床上判断肝纤维化的程度,诊断肝硬化的重要指标之一就是 MAO 活性的高低,MAO 活性增高,说明可能患有肝硬化和肝纤维化等疾病^[21-22]。在摄入 DHA 和 AA 后,中老年大鼠大脑皮层中的 MAO 活性明显降低,表明 DHA 和 AA 的摄入有助于防

止肝硬化和肝纤维化等疾病的发生。总的来说, 机体肝硬化等疾病的重要指标之一为 MAO 的活性高低的体现, 随着机体 DHA、AA 摄入量的升高, MAO 活性显著下降, 说明该花生营养油能显著降低中老年 SD 大鼠体内 MAO 活性量, 从而降低患肝硬化等疾病的风险。

表 2 各组大鼠大脑皮层单胺氧化酶 (MAO) 酶活水平的比较 ($\bar{X} \pm S$)

组别	动物例数 (n)/只	MAO/ (U/mg)
阴性对照组 CK ₁	7	540.00±67.12
阳性对照组 CK ₂	7	171.33±19.69 [#]
低剂量 DHA、AA 调配花生油组	7	405.92±40.19 ^{#*}
中剂量 DHA、AA 调配花生油组	7	319.74±19.00 ^{#*}
高剂量 DHA、AA 调配花生油组	7	248.59±40.16 ^{#*}

注: #代表与空白组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$); *代表与阳性药物组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$)。

2.2 中老年 SD 大鼠肝脏细胞形态结构观测结果

各组大鼠肝脏组织细胞切片如图 1 所示。图 1 中肝脏组织细胞的细胞核被苏木精染成鲜明的

蓝色, 软骨基质、钙盐颗粒呈深蓝色, 粘液呈灰蓝色。细胞浆被伊红染成深浅不同的粉红色至桃红色, 胞浆内嗜酸性颗粒呈反光强的鲜红色。胶原纤维呈淡粉红色, 弹力纤维呈亮粉红色, 红血球呈橘红色, 蛋白性液体呈粉红色。

从图 1 可以看出: 阴性对照组中肝脏汇管区胆管及小叶间静脉扩张, 纤维间质增生, 伴有炎症细胞浸润。汇管区周围肝细胞水肿, 空泡变性。阳性对照组为较正常肝小叶。处理 1 组中肝细胞广泛水肿, 空泡变性伴气球样变, 可见肝细胞核固缩, 凋亡坏死。处理 2 组中肝细胞排列较密集, 部分区域可见肝细胞水肿, 胞浆空泡样改变。处理 3 组中肝细胞排列稍紊乱, 局部可见肝窦扩张淤血, 肝细胞形态较正常。通过对中老年 SD 大鼠肝脏的切片染色观察结果可知, 灌喂花生营养油能有效改善中老年 SD 大鼠的肝脏水肿及细胞炎症等症状, 减缓细胞衰亡的速度, 从而达到保护肝脏的作用。且 DHA 与 AA 含量越高, 对肝脏的保护效果越明显。

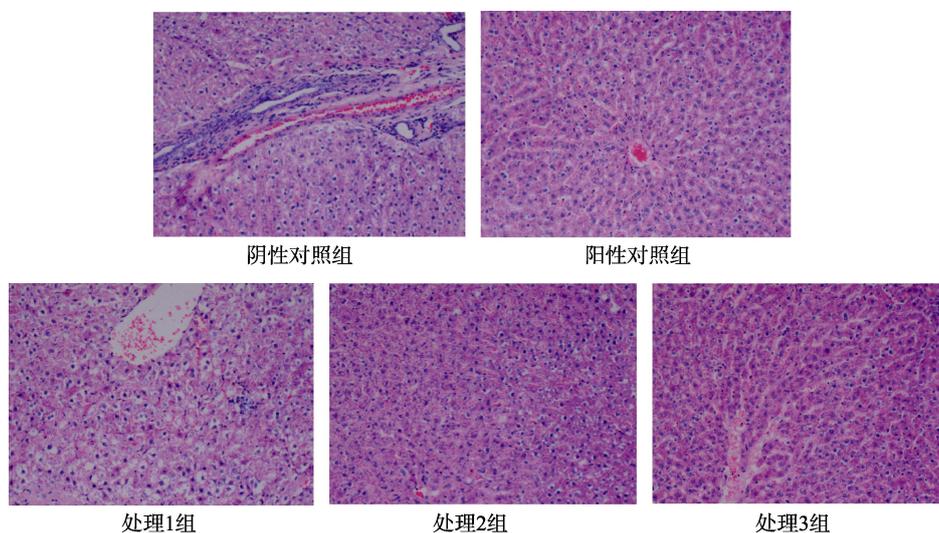


图 1 不同组中老年 SD 大鼠肝脏组织细胞切片图 (200X)

2.3 花生营养油脂肪酸组成成分分析

花生营养油主要脂肪酸组成成分分析结果见表 3。

由中老年 SD 大鼠大脑皮层 MAO 活性及肝脏细胞切片观测结果可知, 饲喂高剂量 DHA、AA

调配油组的 MAO 活性最低, 且肝细胞形态较正常。所以, 采用高剂量组调配油中的比例, 对花生营养油进行脂肪酸组成分析。从表 3 中可知, 其 $\omega 6/\omega 3 \approx 4.1$, 符合《中国居民膳食营养素参考摄入量》中建议的推荐值。这种油品不但具有花生油

表 3 花生营养油脂肪酸组成

脂肪酸名称	简写	各脂肪酸百分比/%
棕榈酸	C16:0	10.50
硬脂酸	C18:0	3.30
油酸	C18:1	40.90
亚油酸	C18:2	29.90
α -亚麻酸	C18:3	6.52
AA	C20:4	0.89
DHA	C22:6	1.07

风味，而且具有更好的营养生理功能。同时，可使 ω -3 系多不饱和脂肪酸在总脂肪酸中所占比例增加，完善膳食中各类脂肪酸比例构成，使人体摄入营养更加均衡。

3 结论

中老年 SD 大鼠饲喂花生营养油，可显著降低 SD 大鼠中老年鼠大脑皮层中的 MAO 活性，且其活性与花生营养油中所含的 DHA 和 AA 含量呈正相关，在一定程度上能降低老年人肝硬化和肝纤维化等疾病的风险。根据对中老年 SD 大鼠的肝脏组织切片染色观察结果可知，饲喂花生营养油可以有效改善中老年 SD 大鼠的肝脏水肿及细胞炎症等炎症，减缓细胞衰亡的速度，从而达到保护肝脏的作用。

因此，在食用油中添加适量的 DHA 和 AA，有利于增强大鼠肝脏抗肝硬化的能力以及抑制肝组织的过氧化程度。

参考文献：

[1] CARLSON S E, COLOMBO J. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid nutrition in early development[J]. *Advances in Pediatrics*, 2016: S0065310116300111.

[2] 金青哲. 功能性脂质[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2013 : 109-115.

[3] 何东平, 陈明锴, 闫子鹏. 微生物油脂发酵与加工技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2016: 2-4.

[4] CAROL C, KELLY S. Synergistic effects of human milk nutrients in the support of infant recognition memory: an observational study[J]. *Nutrients*, 2015, 7(11): 9079-9095.

[5] CARDOSO C, CLÁUDIA AFONSO, BANDARRA N M. Dietary DHA and health: cognitive function ageing[J]. *Nutrition Research Reviews*, 2016, 29(2): 1-14.

[6] 曹维, 尹佳, 陈明锴, 等. DHA 藻油与植物食用油调配及其生理活性研究(I)DHA 藻油与植物食用油的研制[J]. *中国粮油学报*, 2017, 32(6): 107-112.

[7] ROMAN R J. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function[J]. *Physiological Reviews*, 2002, 82(1): 131.

[8] BROCK T G, MCNISH R W, PETERS-GOLDEN M. Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandinE2[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(17): 11660-11666.

[9] 柳泽深, 姜悦, 陈峰. 花生四烯酸、二十二碳六烯酸和二十碳五烯酸在炎症中的作用概述[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(10): 3890-3899.

[10] KEVIN H, ALAN R, STEWART F, et al. The essentiality of arachidonic acid in infant development[J]. *Nutrients*, 2016, 8(4): 216-.

[11] 林源锋, 谢鑫磊, 付杰, 等. 化学添加剂对裂壶藻突变株发酵产 DHA 的影响[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(22): 125-129.

[12] 王澍, 曹维, 付杰, 等. 寇氏隐甲藻发酵产 DHA 藻油的动力学模型研究[J]. *中国粮油学报*, 2016, 31(9): 81-85.

[13] 周正雄, 卢英华, 班甲, 等. 微生物发酵法生产花生四烯酸油脂的研究进展[J]. *生物加工过程*, 2013, 11(4): 72-78.

[14] 唐鑫, 陈海琴, 姚青蔚, 等. 高产花生四烯酸高山被孢霉的诱变育种研究[J]. *中国油脂*, 2018, 43(8): 104-108.

[15] 孟鸽, 黄罗冬, 高保燕, 等. 氮源类型和水平对 3 株球状绿藻生长、油脂和花生四烯酸积累的影响[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(12): 2624-2638.

[16] 吴泽柱, 盛艳. DHA 微胶囊稳定性的对比研究[J]. *农产品加工*, 2019(19): 19-21.

[17] 沈雷, 唐俊, 张云霞, 等. 花生四烯酸油微胶囊配方优化及稳定性研究[J]. *中国油脂*, 2016, 41(4): 14-18.

[18] 陈剑峰, 王恩多. 单胺氧化酶[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000(5): 504-508.

[19] SHIH J C, GRIMSBY J, CHEN K. Molecular biology of monoamine oxidase A and B: Their role in the degradation of serotonin[M]. *Serotonergic Neurons and 5-HT Receptors in the CNS*. 2000.

[20] ALHABBAB R Y. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert[M]//Basic Serological Testing||Enzyme Immunoassay (EIAs) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). 2018.

[21] 曾广冰. 单胺氧化酶的研究进展[J]. *中国民族民间医药*, 2010, 19(12): 18.

[22] 王彩凤, 齐发梅, 袁秀梅. 249 例肝病患者血清单胺氧化酶活性变化的分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(14): 2091-2092

备注：本文的彩色图表可从本刊官网(<http://lspkj.ijournal.cn/ch/index.aspx>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。

(审核：林家永)