

脱氢醋酸钠对断奶仔猪抗氧化能力的影响

屈长波, 王恬*

(南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 研究食品添加剂脱氢醋酸钠对动物抗氧化能力的影响。以仔猪作为实验动物模型, 选用10日龄哺乳仔猪(杜×长×大)192头, 随机分成4组(每组4个重复, 每重复12头), 饲喂不含脱氢醋酸钠的基础日粮(对照组)、基础日粮中分别添加脱氢醋酸钠0.02%(实验组I)、0.1%(实验组II)和0.2%(实验组III)的日粮, 实验期42 d。结果表明: 与对照组相比, 1) 仔猪51 d体重, III组显著降低13.26% ($P < 0.05$), I、II组无显著差异 ($P > 0.05$); 2) III组仔猪血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力极显著降低 ($P < 0.01$), 总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)显著降低 ($P < 0.05$), 而I、II组仔猪血清抗氧化指标均无显著差异 ($P > 0.05$); 3) 仔猪肝脏丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量, 除III组外, I ($P < 0.01$)、II ($P < 0.05$)组均有明显升高。因此, 日粮中添加0.2%脱氢醋酸钠, 明显降低仔猪的抗氧化能力, 食品中使用高剂量脱氢醋酸钠存在一定的健康风险。

关键词: 脱氢醋酸钠; 断奶仔猪; 抗氧化能力

Effects of Sodium Dehydroacetate on Antioxidant Capacity in Weaned Piglets

QU Chang-bo, WANG Tian*

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

Abstract: The effects of sodium dehydroacetate on antioxidant capacity in weaned piglets were investigated. A total of 192 crossbreds (Duroc × Landrace × Yorkshire) piglets at 10 days of age were randomly divided into 4 groups with 4 replicates consisting of 12 animals each. They were weaned and fed with basal diet (control group), basal diet supplemented with 0.02% (group I), 0.1% (group II) and 0.2% (group III) sodium dehydroacetate, respectively. The experiment lasted for 42 days. The results showed that when comparing with the control group: 1) the weight of the 51-day-old piglets in group III was significantly decreased by 13.26% ($P < 0.05$), while groups I and II had no significant difference ($P > 0.05$); 2) the serum total superoxide dismutase (T-SOD) in group III was decreased highly significantly ($P < 0.01$), in addition to a significant reduction in serum total antioxidant capacity (T-AOC) ($P > 0.05$). But the serum antioxidant indices in groups I and II had no significant difference; and 3) the liver malondialdehyde (MDA) contents in groups I ($P < 0.01$) and II ($P < 0.05$) but not in group III were increased significantly. These results indicate that the diet containing 0.2% sodium dehydroacetate could significantly decrease the TAC in piglets. Thus some potential health risks may be caused by using high levels of sodium dehydroacetate in food.

Key words: sodium dehydroacetate; weaned piglets; antioxidant capacity

中图分类号: TS202.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)11-0054-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201411011

脱氢醋酸钠(又名脱氢乙酸钠)(sodium dehydroacetate)对霉菌、细菌和酵母菌有很强的抑制能力^[1], 是联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization, FAO)和世界卫生组织(World Health Organization, WHO)认可的一种安全型食品防腐、防腐保鲜剂。在日本, 脱氢醋酸钠被添加在奶酪、黄油、面

包等食品中, 其法定最高添加量为0.05%^[2], 我国食品添加剂标准化技术委员会在1998年已将脱氢醋酸列为食品添加剂新品种^[3], 由于高剂量脱氢醋酸钠可能存在的潜在危害性, 我国将其列为限量使用的添加剂^[4]。由于人与动物的生长发育过程中, 存在许多环境因素都能引起机体自由基的过量生成, 导致氧化应激, 而人与动物的

收稿日期: 2013-10-15

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 屈长波(1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail: changboqu@163.com

*通信作者: 王恬(1958—), 男, 教授, 博士, 研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail: twang18@163.com

抗氧化防御体系与健康存在着密切的关系^[5]。在本实验室开展对脱氢醋酸钠防霉功能的前期研究基础上,本实验以仔猪作为实验动物模型,进一步探讨脱氢醋酸钠对仔猪抗氧化功能的影响,为脱氢醋酸钠作为食品添加剂的科学应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物及日粮

选用健康的体质量接近的杜×长×大三元杂交哺乳仔猪192头(平均体质量为 (3.57 ± 0.42) kg),公母各半,参照美国国家研究委员会(National Research Council, NRC)仔猪营养需要配制日粮。对照组饲喂基础日粮,实验组分别在基础日粮中加入0.02%、0.1%和0.2%的脱氢醋酸钠。基础日粮组成见表1。

表1 断奶仔猪实验日粮组成及营养水平
Table 1 Ingredients and nutrient levels of the diet for weaned piglets

日粮组成/%		营养水平	
玉米	60	消化能/(MJ/kg)	18.29
豆粕	24	粗蛋白/%	18.47
蒸汽鱼粉	4.86	钙/%	0.78
葡萄糖	4.05	总磷/%	0.6
油粉	1		
脂肪粉	1.2		
预混料	4.89		
合计	100		

注:营养水平除DE外均为实测值;每kg全价料中含有:VA15 000 IU、VD₃3 000 IU、VE100 mg、VK₃3 mg、VB₁3 mg、VB₂8 mg、VB₆5 mg、VB₁₂40 μg、生物素300 μg、叶酸2 mg、烟酸45 mg、泛酸20 mg、胆碱450 mg、VC160 mg。

1.2 试剂与仪器

脱氢醋酸钠($C_8H_7NaO_4$, 产品纯度99.8%) 江苏天成动物保健公司;谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛、超氧化物歧化酶、总抗氧化能力等抗氧化指标试剂盒 江苏南京建成生物工程研究所。

DK-98-II电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司;TECAN InfiniteTM M200多功能荧光酶标仪 上海宝特生命科学有限公司;5804R高速台式冷冻离心机德国Eppendorf公司。

1.3 方法

1.3.1 实验设计与饲养管理

选自24窝的10日龄杜×长×大三元杂交哺乳仔猪192头(平均体质量为 (3.57 ± 0.42) kg),按遗传基础一致性原则,分别将来自各同窝的8头随机分为4组,最终分成每组48头。每组再随机分4个重复(每个重复12头,公母各半)。对照组饲喂基础日粮(日粮中不含脱氢醋酸钠),I、II、III组为实验组(分别在基础

日粮中加入0.02%、0.1%和0.2%的脱氢醋酸钠),实验期42 d。实验猪自由采食,自动饮水器供水,每天早晚各清粪一次,每天饲喂4次(7:00、11:00、15:00、18:00),免疫程序按常规方法进行。仔猪10、23、35、51 d时,对其进行空腹称质量并记录体质量与耗料。

1.3.2 样品采集

在仔猪51 d时,分别从每个重复随机选1头仔猪前腔静脉采血,静置10~15 min后,3 500 r/min离心5 min,取上清液,置于-20℃冰箱贮藏待测。实验结束时,每个重复随机选1头仔猪,共16头仔猪,经颈部放血致死,取肝脏样品液氮罐保存待测。

1.3.3 样品处理与测定

10%肝脏组织匀浆液制备方法:取肝脏组织0.5 g,按质量比1:9加入预冷的生理盐水,在冰水浴中匀浆破碎1~2 min,组织匀浆液3 500 r/min离心15 min,取上清液于-20℃冰箱保存待测。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)采用还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)氧化法测定,超氧化物歧化酶(SOD)采用黄嘌呤氧化法测定,总抗氧化能力(T-AOC)采用Fe³⁺还原法测定,丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定。上述指标均按南京建成生物工程研究所试剂盒说明书测定。

1.3.4 肝脏组织形态学观察

取肝右叶组织置于10%中性甲醛液中固定,石蜡包埋、切片,HE染色,在光学显微镜下观察肝组织形态学变化情况。

1.4 数据处理

实验数据经Excel 2010处理后,采用SPSS17.0软件中的One-Way ANOVA进行单因素方差分析,差异显著性用Duncan法进行组间多重比较,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 脱氢醋酸钠对断奶仔猪体质量的影响

表2 不同水平脱氢醋酸钠对断奶仔猪体质量的影响
Table 2 Effects of dietary supplementation of sodium dehydroacetate on body weight in weaned piglets

组别	仔猪体质量/kg			
	10日龄	23日龄	35日龄	51日龄
对照组	3.57±0.20	7.13±0.33	9.88±0.37	14.83±0.55 ^a
I	3.56±0.18	6.92±0.21	9.77±0.33	14.45±0.48 ^{ab}
II	3.57±0.18	7.29±0.26	9.73±0.31	14.12±0.55 ^{ab}
III	3.56±0.18	7.25±0.16	9.15±0.28	12.87±0.48 ^b

注:同行数据肩标不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。下同。

由表2可知,仔猪35日龄平均体质量,I、II、III组较对照组分别降低了1.11%、1.51%、7.39%,但均未达到生

物统计显著性标准 ($P>0.05$)；仔猪51日龄平均体质量，I、II组较对照组降低了2.58%、4.83%，差异均不显著 ($P>0.05$)，III组较对照组显著降低了13.26% ($P<0.05$)。

2.2 脱氢醋酸钠对断奶仔猪血清抗氧化功能的影响

表3 脱氢醋酸钠对断奶仔猪血清抗氧化功能指标的影响

Table 3 Effects of dietary supplementation of sodium dehydroacetate on serum antioxidative indices in weaned piglets

指标	组别			
	对照	I	II	III
GSH-Px活力/(U/mL)	1118.48±59.96	1071.28±46.20	1057.40±100.27	947.61±84.14
MDA含量/(nmol/mL)	3.59±0.15	3.97±0.26	3.07±0.19	4.58±1.74
SOD活力/(U/mL)	160.48±2.61 ^A	162.76±2.80 ^A	171.22±6.53 ^A	124.91±12.24 ^B
T-AOC水平/(U/mL)	2.54±0.21 ^A	1.97±0.25 ^{AB}	1.89±0.22 ^{AB}	1.64±0.17 ^B

注：不同大写字母表示组间差异极显著 ($P<0.01$)。下同。

由表3可知，与对照组相比较，III组仔猪血清SOD活力极显著降低 ($P<0.01$)，T-AOC显著降低 ($P<0.05$)。I、II组仔猪血清抗氧化指标与对照组比较均无显著变化 ($P>0.05$)。血清MDA含量，I、II、III组较对照组差异均不显著 ($P>0.05$)。

2.3 脱氢醋酸钠对断奶仔猪肝脏抗氧化功能的影响

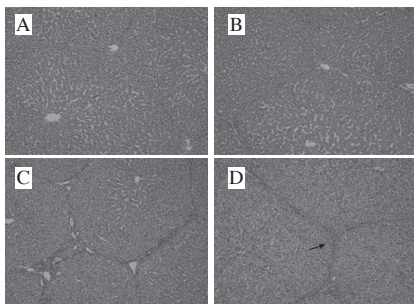
表4 脱氢醋酸钠对断奶仔猪肝脏抗氧化功能的影响

Table 4 Effects of dietary supplementation of sodium dehydroacetate on hepatic antioxidative indices in weaned piglets

指标	组别			
	对照	I	II	III
GSH-Px活力/(U/mg pro)	41.35±3.40	38.94±3.79	44.01±2.55	47.85±5.42
MDA含量/(nmol/mg pro)	1.52±0.18 ^{Bb}	2.41±0.18 ^{Aa}	2.16±0.24 ^{AB}	1.94±0.14 ^{ABb}
SOD活力/(U/mg pro)	130.75±17.82	154.49±11.07	169.15±9.2	150.19±3.62
T-AOC水平/(U/mg pro)	4.05±0.28	3.98±0.28	3.87±0.31	3.60±0.06

由表4可知，与对照组相比，I组仔猪肝脏MDA含量极显著升高 ($P<0.01$)，II组显著升高 ($P<0.05$)，III组无显著变化 ($P>0.05$)。GSH-Px、SOD、T-AOC等抗氧化指标，I、II、III组较对照组均无显著变化 ($P>0.05$)。

2.4 脱氢醋酸钠对断奶仔猪肝脏组织形态的影响



A.对照组；B. I组；C. II组；D. III组。

图1 肝脏病理切片 (×100)

Fig.1 Pathological section images of liver (×100)

由图1可知，III组肝脏组织中央静脉和门管区严重充血；I、II组与对照组比较无显著变化。

3 讨论

3.1 脱氢醋酸钠对断奶仔猪体质量的影响

国外关于脱氢醋酸钠的毒性实验已经有较多研究^[6-7]。有研究报道称在小鼠的饲料中加入0.1%~0.2%剂量的脱氢醋酸，105 d后，小鼠没有出现任何中毒现象，但是小鼠的体质量增加迟缓；猴子每千克体质量饲喂0.018%添加量的脱氢醋酸钠，每周5次，经过一年以上未见损害，但是当添加量为0.02%时会引起生长紊乱和器官的病理变化^[3]。猪作为实验动物模型在人类医学上的应用已十分普遍^[8-9]，本实验采用仔猪作为动物模型的研究结果显示，随着日粮中脱氢醋酸钠添加量的增加，仔猪51日龄平均体质量有逐渐降低的趋势，日粮中添加脱氢醋酸钠达0.2%时，51日龄仔猪体质量降低明显 ($P<0.05$)，表明脱氢醋酸钠添加量不宜过高，这与Zhang Yumei等^[3]的研究结果一致。另外，Sakaguchi等^[10]研究表明，脱氢醋酸钠会导致小鼠出现体质量减轻和肠道出血，并进一步提出这可能是由于脱氢醋酸钠导致小鼠体内缺乏VK引起的。本实验中脱氢醋酸钠明显降低了仔猪体质量，而且在解剖仔猪时发现高剂量脱氢醋酸钠添加组仔猪肝脏组织充血，这也与Sakaguchi等^[10]的研究结果一致，其具体的生物学机制尚待进一步探究。

3.2 脱氢醋酸钠对断奶仔猪抗氧化功能的影响

正常情况下，动物机体都存在一个完整的抗氧化系统，当动物在应激状态下机体抗氧化酶活性降低，消除氧化代谢产物的能力下降^[11-13]。超氧化物歧化酶 (SOD) 能有效清除自由基，减轻自由基链式反应对机体的损害^[14]。总抗氧化能力 (T-AOC) 的大小反应机体抗氧化系统对外来刺激的代偿能力以及机体自由基代谢的状况，是衡量机体抗氧化系统功能状况的综合性指标^[15]。有学者指出脱氢醋酸钠会很快地被人或者动物机体吸收，并分布在血浆和各个器官中，有抑制多种酶的作用^[16]。本实验结果显示随着脱氢醋酸钠添加量的增加，仔猪血清SOD活力有先升高后降低的趋势，T-AOC有逐渐降低的趋势，特别是，0.2%脱氢醋酸钠添加组仔猪的血清SOD比对照组极显著降低 ($P<0.01$)，T-AOC显著降低 ($P<0.05$)，MDA含量升高 ($P<0.05$)，表明日粮中添加高剂量脱氢醋酸钠会降低仔猪血清抗氧化酶活力，这一结果也支持骆萌的观点^[16]，当脱氢醋酸钠进入仔猪肠道后很可能被迅速吸收，并抑制多种抗氧化酶活性，仔猪的抗氧化系统被破坏，抵御外来刺激的能力也下降，健康水平受到严重威胁。

MDA是自由基作用于生物膜中的不饱和脂肪酸产生的脂质过氧化物，其含量常常可以反映机体内脂质过氧化的程度，间接地反映出细胞损伤的程度，也可以间接反映机体细胞受自由基攻击的严重程度^[17]。Sugihara等^[18]

研究了脱氢醋酸钠等4种常用防霉剂对正常培养的大鼠肝脏细胞MDA含量的影响,结果显示这4种防霉剂均没有增加肝脏细胞MDA含量。这提示脱氢醋酸钠可能并不直接造成肝脏组织氧化损伤。本实验结果显示,与对照组比较,0.02%与0.1%两个添加量实验组的仔猪肝脏MDA含量均升高,这与Sugihara的研究结果不一致。这可能是因为与体外培养细胞相比,动物体内的代谢环境比较复杂,脱氢醋酸钠在动物体内有可能代谢为其他产物发挥负面作用^[19]。也有可能是脱氢醋酸钠导致仔猪体内缺乏VK,间接地影响了仔猪的正常代谢,从而造成肝脏的氧化损伤^[10]。本实验结果还显示,随着脱氢醋酸钠添加量的增加,仔猪肝脏MDA含量有降低的趋势,这可能是因为当脱氢醋酸钠达到一定剂量后,一部分脱氢醋酸钠发挥了抑制或延缓肝脏氧化损伤的作用。国外有研究表明,脱氢醋酸钠对于小鼠并没有致畸性和致癌性,并有抑制肝癌发生或延缓的作用^[20]。在国内目前还没有关于脱氢醋酸钠对肝脏抗氧化功能影响的详细研究报道,特别是在本实验基础上继续增加脱氢醋酸钠添加量梯度组别,进一步延长实验期,进一步研究其对人和动物抗氧化功能的影响与添加量上限十分有必要。脱氢醋酸钠对机体抗氧化功能影响的作用机理尚须进一步深入研究,以便为食品添加剂脱氢醋酸钠的科学应用,提供更加翔实的实验依据。

4 结 论

本研究表明日粮中添加0%~0.2%脱氢醋酸钠时,随着脱氢醋酸钠的剂量的增加,仔猪体质量和总的抗氧化能力逐渐降低。因此食品中添加高剂量的脱氢醋酸钠存在一定的健康风险。

参考文献:

- [1] 段会轲,周辉.脱氢醋酸钠复合保鲜在低温肉食品中的应用[J].肉类工业,2008(9):14-16.
- [2] UCHIDA O, NAITO K, YASUHARA K, et al. Studies on the acute oral toxicity of dehydroacetic acid, sorbic acid and their combination compound in rats[J]. Eisei Shikenjo hōkoku. Bulletin of National Institute of Hygienic Sciences, 1985, 103: 166-171.
- [3] ZHANG Yumei, DU Yufeng, YIN Jun, et al. Determination and depletion of dehydroacetic acid residue in chicken tissues[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2012, 29(6): 918-924.
- [4] 李青,白梅,蒋素,等.脱氢乙酸在食品中残留量检测方法的研究进展[J].中国卫生工程学,2009,8(2):116-117.
- [5] 马玉娥,占秀安,朱巧明,等.饲料色氨酸水平对黄羽肉种鸡生产性能、抗氧化功能及血清生化指标的影响[J].动物营养学报,2011,23(12):2177-2182.
- [6] SPENCER H C, ROWE V K, MCCOLLISTER D D. Dehydroacetic acid (DHA) I. acute and chronic toxicity[J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1950, 99(1): 57-68.
- [7] SEEVERS M H, SHIDEMAN F E, WOODS L A, et al. Dehydroacetic acid (DHA) II. General pharmacology and mechanism of action[J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1950, 99(1): 69-83.
- [8] 赵斌.小型猪在口腔牙周医学研究中的应用[J].口腔医学研究,2013,29(2):194-196.
- [9] 张贺,王承利,王洋,等.小型猪动物模型在医学领域中的应用[J].中国畜牧兽医,2012,39(7):263-266.
- [10] SAKAGUCHI Y, SUGA S, OSHIDA K, et al. Anticoagulant effect of sodium dehydroacetate (DHA-S) in rats[J]. Journal of Applied Toxicology, 2008, 28(4): 524-529.
- [11] VALAVANIDIS A, VLAHOIANNI T, DASSENAKIS M, et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2006, 64(2): 178-189.
- [12] MIGLIORE L, COPPEDE F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging[J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2009, 674(1): 73-84.
- [13] 刘显军,杨营,边连全,等.日粮 $\omega 6/\omega 3$ 多不饱和脂肪酸构成比对育肥猪背最长肌脂肪酸组成和血清抗氧化指标的影响[J].食品科学,2013,34(1):272-276.
- [14] MEDEIROS M H G, WEFERS H, SIES H. Generation of excited species catalyzed by horseradish peroxidase or hemin in the presence of reduced glutathione and H_2O_2 [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1987, 3(2): 107-110.
- [15] 赵林,黄新华.创伤与机体总抗氧化能力的关系初探[J].实用临床医药杂志,2003,7(1):82-84.
- [16] 骆萌.脱氢醋酸及其相关化合物生产技术[J].化工中间体:科技产业版,2004,1(7):31-32.
- [17] 张勇,汪微,林东康.苜蓿总甙对肉仔鸡抗氧化性能的影响[J].中国畜牧兽医,2007,34(11):11-15.
- [18] SUGIHARA N, SHIMOMICHI K, FURUNO K. Cytotoxicity of food preservatives in cultured rat hepatocytes loaded with linolenic acid[J]. Toxicology, 1997, 120(1): 29-36.
- [19] 彭武厚.脱氢醋酸的合成及其在食品方面的应用实验[J].化学世界,1983,24(5):137-139.
- [20] ACID D. Final report on the safety assessment of sodium dehydroacetate and dehydroacetic acid[J]. International Journal of Toxicology, 1985, 4(3): 123-159.