

文章编号:1000-0615(2009)01-0146-05

鳀肝脏水解物对大鼠脂肪代谢的影响

王玉明, 王静凤, 薛长湖

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要:研究鳀肝脏水解物对大鼠脂肪代谢的影响,以提高低值水产品废弃物的利用价值。采用高果糖饲料饲喂SD大鼠,建立高脂血症大鼠模型,实验组大鼠饲料中分别添加5%和10%鳀肝脏酶解物(KPLH)。分别测定大鼠血清甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白、游离脂肪酸浓度。同时还测定了肝脏甘油三酯、胆固醇、磷脂浓度以及肝脏脂肪代谢相关酶(G6PDH, ME, FAS, CPT)活性。结果显示,5%和10%KPLH添加均不同程度地明显降低大鼠血清TG浓度($P < 0.05$),增加血清高密度脂蛋白浓度($P < 0.05$),降低动脉硬化指数($P < 0.01$),降低肝脏TG浓度($P < 0.001$)。5%KPLH明显降低大鼠肝脏ME, G6PDH和FAS活性($P < 0.05$, $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。鳀肝脏水解物具有降血脂,抗动脉硬化以及预防脂肪肝的作用。

关键词:鳀; 肝脏水解物; 脂肪代谢; 酶活性; 高脂血症; 脂肪肝

中图分类号:S 986

文献标识码:A

鳀(*Katsuwonus pelamis*)属鲈形目鲭科鳀属鱼类,主要产于太平洋、印度洋和大西洋,我国东海和南海也有大量分布^[1-2]。其主要用途除了直接食用外,还可以用于加工成鳀鱼罐头。在日本鳀主要用于加工生产“鳀节”,食用时将其刨成木鱼花,是日本传统的调味品,也可制作成生鱼片食用。在鳀加工过程中内脏作为废弃物除掉,用途只有制作鱼粉,利用价值低。鳀加工废弃物中因为肝脏蛋白质含量高、含有高活性蛋白质分解酶,并且新鲜原料杂菌含量少,因此,适宜于开发蛋白质自溶酶解产品^[3]。目前,国内外以海产品为原料开发功能性多肽的研究较多,但未见以鳀加工过程中内脏废弃物为原料的相关研究。为了充分地利用天然水产资源,本研究从鳀加工过程中产生的内脏废弃物中选取肝脏进行水解,并通过动物实验对其生理活性进行研究,目的在于开发调节脂肪代谢的新产品,提高低值水产品废弃物的利用价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 Spague-Dawley 大鼠,雄性,5周龄,体质

量(120 ± 5)g, SPF级。由青岛市实验动物中心提供,合格证号 SCXK(鲁)20030010。

1.2 主要仪器和药品

分光光度计(日本岛津 UV-2550),血清 TC、TG、HDL-C 试剂盒(北京中生生物工程高技术公司),磷脂(PL)、游离脂肪酸(NEFA)和葡萄糖试剂盒(日本和光纯药株式会社),其余试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

鳀肝脏酶解物的制备 新鲜的鳀购自石岛港(山东威海),采取后肝脏切碎匀浆,25℃条件下搅拌12h,利用肝脏内蛋白质分解酶进行充分消化。消化后产物经过滤得到水溶液,然后减压浓缩得到浓缩物作为实验样品(以下称鳀肝脏酶解物-KPLH)。

饲料的配制 含10%玉米油和65%果糖,其它成分按AIN-76标准配方配制而成,各组蛋白质含量用酪蛋白调至相同^[4]。

动物分组及实验方法 SD大鼠随机分为3组:正常对照组、KPLH 5%添加组和KPLH 10%添加组,每组7只,单笼饲养。饲养条件为:室温(23 ± 2)℃,光暗周期为(12:12),自由摄食

收稿日期:2007-12-18

修回日期:2008-01-30

资助项目:国家“八六三”目标导向项目(2006AA09Z444)

通讯作者:薛长湖, Tel: 0532-82032597, E-mail: xuech@ouc.edu.cn

和饮水,连续喂食 28 d。于末次饲喂后,大鼠禁食不禁水 12 h,乙醚麻醉后,腹部大动脉放血处死大鼠。剥离肝脏,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用;收集血液,分离血清。

血清各项指标测定 按照试剂盒操作说明步骤测定血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、磷脂(PL)、游离脂肪酸(NEFA)浓度。

肝脏脂质测定 肝脏 TC、TG、总磷脂分别按 Folch 等^[5]、Fletcher 等^[6]和 Bartlett^[7]的方法测定。

肝脏脂肪代谢相关酶活性测定 用含有 0.25 mol/L 蔗糖和 1 mmol/L EDTA 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下制备肝匀浆,700 × g 离心 10 min,去除沉淀。得到上清液后先以 10 000 × g 离心 10 min,收集线粒体沉淀,用于肉毒碱棕榈酰转移酶(CPT, EC 2.3.1.21)活性测定^[8]。去除线粒体的上清液再以 45 000 × g 离心 60 min,获得上清液用来测定苹果酸酶(ME, EC

1.1.1.40)、葡萄糖-6 磷酸脱氢酶(G6PDH, EC 1.1.1.49)和脂肪酸合成酶(FAS, EC 2.3.1.85)活性^[8-9]。

1.4 统计分析

实验结果用 $\bar{x} \pm \text{SE}$ 表示。采用 SPSS 11.0 软件进行分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 鯉肝脏酶解物对大鼠体重、肝脏组织和脂肪组织重量的影响

鯉肝脏酶解物(KPLH)对大鼠摄食量、体质量增加和肝脏重量没有显著影响(表 1 和表 2)。饲养期间,动物成长良好,状态正常,解剖观察各器官均正常。脂肪组织重量称量结果表明, KPLH 对大鼠精巢上部、肾脏周围、肠系膜周围等内脏脂肪组织重量有轻微的抑制作用,但未见统计学差异。

表 1 KPLH 对大鼠各生长指标的影响

	初始体质量(g) initial B W	最终体质量(g) final B W	摄食量(g/d) food intake	肝脏重量(g) liver weight
对照 control	197 ± 2	305 ± 4	24.8 ± 0.5	12.1 ± 0.7
5% KPLH	197 ± 2	309 ± 4	24.8 ± 0.2	12.4 ± 0.6
10% KPLH	196 ± 2	310 ± 2	24.6 ± 0.3	12.6 ± 0.7

表 2 KPLH 对大鼠脂肪组织重量的影响

	总白色脂肪 total WAT	精巢脂肪 epididymal	肾脏脂肪 perirenal	肠系膜脂肪 omental	皮下脂肪 subcutaneous
对照 Control	5.62 ± 0.38	1.27 ± 0.06	1.39 ± 0.13	1.02 ± 0.07	1.93 ± 0.15
5% KPLH	5.29 ± 0.22	1.18 ± 0.04	1.23 ± 0.07	0.93 ± 0.06	1.95 ± 0.11
10% KPLH	5.22 ± 0.25	1.15 ± 0.07	1.21 ± 0.06	0.89 ± 0.05	1.98 ± 0.13

2.2 鯉肝脏酶解物对大鼠血清脂肪浓度的影响

5% KPLH 添加组大鼠血清 TG 浓度较对照组下降了 28% ($P < 0.05$)、高密度脂蛋白增加了 18% ($P < 0.05$)、动脉硬化指数(AI)明显降低 ($P < 0.01$),总胆固醇虽下降了 10.3%,但未见统

计学差异 ($P > 0.05$)。与 5% KPLH 添加比较, 10% KPLH 添加对大鼠血清 TG 浓度及动脉硬化指数的降低效果更为显著(表 3)。以上结果表明 KPLH 具有降血脂,抗动脉硬化的作用。

表 3 KPLH 对大鼠血清脂肪浓度的影响

	甘油三酯 triglyceride	总胆固醇 total Cholesterol	高密度脂蛋白 HDL-Cholesterol	游离脂肪酸 NEFA	动脉硬化指数 AI
对照 control	143 ± 14	88.7 ± 7.0	51.7 ± 4.2	0.45 ± 0.04	0.70 ± 0.13
5% KPLH	103 ± 13*	79.6 ± 9.2	60.9 ± 3.4*	0.43 ± 0.04	0.31 ± 0.08#
10% KPLH	96 ± 10#	75.7 ± 8.3	61.6 ± 4.2*	0.41 ± 0.04	0.23 ± 0.05#

注:与对照组相比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$

Notes: * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ compared with control group

2.3 鯉肝脏酶解物对大鼠肝脏脂肪浓度的影响

肝脏脂肪浓度和脂肪代谢状态对血脂浓度有很大影响,为了明确 KPLH 降低血中 TG 浓度的原因,本实验进一步研究了 KPLH 对肝脏的脂肪代谢的影响。肝脏脂质浓度测定结果显示,饲料中 5% 及 10% KPLH 的添加均显著降低了肝脏 TG

含量($P < 0.001$),不同的 KPLH 添加量对降低大鼠肝脏 TG 浓度无显著性差异。另外,不同添加量 KPLH 对大鼠肝脏总胆固醇和总磷脂含量无显著影响。该结果显示,摄食 KPLH 可降低肝脏中性脂肪蓄积,对脂肪肝有一定的预防和改善作用(表 4)。

表 4 KPLH 对大鼠肝脏脂肪浓度的影响

Tab. 4 Effects of KPLH on concentrations of hepatic lipid in SD rats $n = 7, \bar{x} \pm SE, \text{mg/g}$

	甘油三酯 triglyceride	胆固醇 liver cholesterol	磷脂 phospholipid
对照 control	37.4 ± 7.1	3.60 ± 0.20	34.6 ± 0.9
5% KPLH	23.2 ± 1.4 *	3.61 ± 0.09	35.5 ± 1.0
10% KPLH	21.1 ± 1.2 *	3.54 ± 0.11	36.2 ± 1.2

注: * 表示与对照组相比较, $P < 0.001$

Notes: $P < 0.001$, * means comparison with control group

2.4 鯉肝脏酶解物对大鼠肝脏脂肪酸代谢酶活性的影响

肝脏脂肪浓度与其合成和分解速度密切相关,本实验为了进一步明确 KPLH 对脂肪代谢影响的机制,分别对肝脏脂肪酸代谢相关酶的活性进行了测定。结果显示,为脂肪酸合成提供 NADPH 的 ME 和 G6PDH 两酶活性在 5% KPLH 添加大鼠肝脏明显处于被抑制状态,分别低于对

照组 20% 和 35% ($P < 0.05, P < 0.01$),脂肪酸合成酶活性也明显降低(30%, $P < 0.05$)。但 5% KPLH 对脂肪酸 β 氧化关键酶 CPT 的活性无明显影响。以上结果表明,大鼠摄食 KPLH 可显著抑制肝脏脂肪酸合成,从而降低 TG 合成速度和能力。另一方面, KPLH 不影响肝脏脂肪酸的正常降解和利用(图 1)。

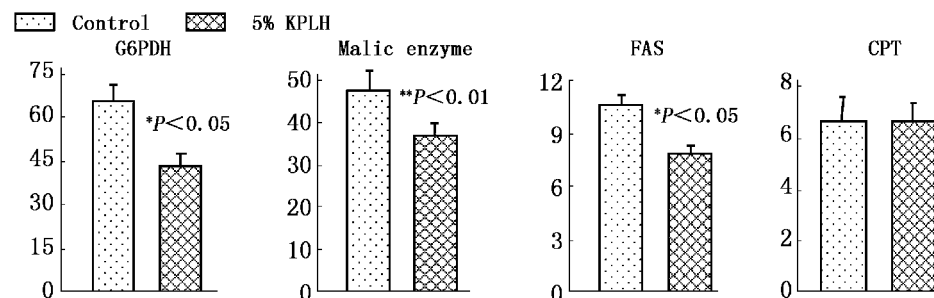


图 1 KPLH 对大鼠肝脏脂肪酸代谢酶活性的影响

Fig. 1 Effect of KPLH on the activities of hepatic fatty acid metabolic enzyme in rat

3 讨论

目前为止,已有大量研究报告了蛋白质分解物和多肽具有抗氧化、降血压等生理功能^[10-16],但是有关其降血脂、影响脂肪代谢方面的报告并不多见。本实验初步研究了鯉肝脏酶解物对大鼠血脂和肝脏脂肪浓度的影响,结果显示食物中添加 5% 和 10% 鯉肝脏酶解物均可明显降低血清和

肝脏甘油三酯浓度及动脉硬化指数,提示鯉肝脏酶解物具有降血脂、抗动脉硬化及预防脂肪肝的功能。由于鯉肝脏酶解物的主要成分为多肽,因此以上活性可能起源于活性多肽,其化学结构尚有待进一步的实验确定。

肝脏合成脂肪主要是以脂蛋白形式分泌到血液中,所以肝脏的脂肪代谢状态直接影响血脂水平。有研究显示高果糖饲料可显著提高肝脏和血

清 TG 浓度,肝脏脂肪合成和脂蛋白分泌处于亢奋状态^[17-19],并且,Nagai 等^[20]研究表明高果糖摄食明显提高脂肪酸合成酶和降低 CPT 活性。为了解明 KPLH 降低血清和肝脏 TG 浓度的原因,本实验测定了肝脏 TG 合成相关酶的活性。肝脏葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)和苹果酸酶(ME)存在于细胞质,可以为脂肪酸合成提供 NADPH,G6PDH 和 ME 的活性变化与肝脏脂肪酸合成速度密切相关。图 1 结果显示,KPLH 明显降低大鼠肝脏细胞质 G6PDH 和 ME 酶的活性,并且对肝脏脂肪酸合成关键酶 FAS 的活性亦有显著的降低作用,该结果与肝脏 TG 浓度降低结果一致,表明 KPLH 摄食导致大鼠血清和肝脏 TG 浓度降低的原因是通过抑制肝脏脂肪合成相关酶活性,降低肝脏脂肪酸合成能力,减少肝脏向血中的 TG 分泌实现的。另外,肝脏脂肪酸分解(β 氧化)的关键酶-CPT 的活性无显著影响,表明 KPLH 的降低肝脏和血脂中 TG 浓度并非由脂肪酸分解增加而引起的。

综上所述,鳀肝脏酶解物具有降低血液和肝脏甘油三酯浓度、预防和治疗高血脂、降低动脉粥样硬化的功能,本研究为其高效高值利用提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 冯启浩,但乐平. 一种新的风味和营养兼备的食品配料——柴鱼制品[J]. 中国食品添加剂,2002, 2: 74-77.
- [2] 赵荣兴,缪圣赐. 中西太平洋鳀鱼 *Katsuwonus pelamis* (Linnaeus) 的资源状况及产量[J]. 现代渔业信息,2005,20(3): 13-14.
- [3] Sumi H, Nakajima N, Yatagai C, *et al.* A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack "Shiokara", a Japanese traditional fermented food [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1995, 112(3):543-547.
- [4] Clarke H E, Coates M E, Eva J K, *et al.* Dietary standards for laboratory animals: report of the laboratory animals centre diets advisory committee [J]. *Lab Anim*, 1977, 11(1):1-28.
- [5] Folch J, Lees M, Slane-Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues[J]. *J Biol Chem*,1957, 226: 497-506.
- [6] Fletcher M J. A colorimetric method for estimating serum triglyceride [J]. *Clin Chem Acta*, 1968, 22: 393-397.
- [7] Bartlett G R. Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glyceric acids [J]. *J Biol Chem*,1958, 234: 466-469.
- [8] Wang Y M, Nagao K, Inoue N, *et al.* Isomer-specific anti-obese and hypolipidemic properties of conjugated linoleic acid in obese OLETF rats [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70:355-362.
- [9] Inoue N, Nagao K, Hirata J, *et al.* Conjugated linoleic acid prevents the development of essential hypertension in spontaneously hypertensive rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323: 679-684.
- [10] Fujita H, Yoshikawa M. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein [J]. *Immunopharmacology*, 1999, 44(1-2): 123-127.
- [11] Gutierrez O G Jr, Ikeda K, Nara Y, *et al.* Fish protein-rich diet attenuates hypertension induced by dietary NG-nitro-L-arginine in normotensive Wistar-Kyoto rats[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1994, 21(11): 875-879.
- [12] Matsufuji H, Matsui T, Seki E, *et al.* Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58(12): 2244-2245.
- [13] Kohama Y, Kuroda T, Iida K, *et al.* Inhibitory effect of tuna peptide on endothelin production in cultured endothelial cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(7): 886-888.
- [14] 付雪艳,薛长湖,宁岩,等. 中国毛虾酶解多肽降压作用的初步探讨[J]. 海洋科学,2005,29: 20-23.
- [15] 刘萍,陈黎斌,杨严俊,酶解玉米蛋白制备降血压肽的研究[J]. 食品工业科技,2006, 27: 117-119.
- [16] 邱春江,苏洁荣,薛长湖,贻贝酶解物体外抗氧化试验研究[J]. 食品科技,2006, 31: 54-56.
- [17] Havel P J. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism [J]. *Nutr Rev*,2005, 63(5): 133-157.
- [18] Vasdev S, Prabhakaran V M, Whelan M, *et al.* Fructose-induced hypertension, hypertriglyceridemia and elevated cytosolic calcium in rats: prevention by deuterium oxide[J]. *Artery*, 1994, 21(3):124

- 147.
- [19] 赵玉岩,卢庆华,都健,等. 高果糖诱导 IR 大鼠模型血清脂质代谢的改变及意义[J]. 中国医科大学学报, 2004, 33: 12-13.
- [20] Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, *et al.* Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR α [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282(5):1180-1190.

The effect of the hydrolyte of *Katsuwonus pelamis* liver on lipid metabolism in rats

WANG Yu-ming, WANG Jing-feng, XUE Chang-hu

(College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In order to utilize the waste effectively in *Katsuwonus pelamis* processing, we studied the effects of the enzymatic hydrolyte of *Katsuwonus pelamis* liver (KPLH) on lipid metabolism in rats. Fresh *Katsuwonus pelamis* liver was homogenized and auto-enzymatic hydrolyzed at 25 °C for 12 hours. After percolation, the enzymatic hydrolyte of *Katsuwonus pelamis* liver was freeze-dried. The male SD rats were fed high fructose basic diet (AIN 76) for 1 week. Then rats were randomly divided into 3 groups and fed 5% or 10% freeze-dried KPLH containing high fructose basic diet (KPLH group) or high fructose basic diet (control group). After 4 weeks, serum triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), free fatty acid (NEFA) levels, and hepatic lipid concentrations (TG, TC) were determined. To resolve the mechanism of lipids lowering effect of KPLH in rats, the activities of key enzymes related in lipids metabolism, malic enzyme (ME), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), fatty acid synthase (FAS) and carnitin palmitoyl transferase (CPT) were determined. After 4 weeks feeding, KPLH did not affect the food intake, body weight gain, liver weight in rats. The abdominal white adipose tissue weights were lower in KPLH group compared with the control group (no statistical difference, $P > 0.05$). The serum TG levels and atherogenic index (AI) were significantly decreased in KPLH group compared with the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the serum HDL-C levels were significantly up-regulated by KPLH ($P < 0.05$). The concentration of serum total cholesterol was lower in KPLH group than that in control group, but there was no significant difference between KPLH group and control group ($P > 0.05$). On the other hand, KPLH did not alter serum glucose and NEFA levels in rats. Those results showed that the enzymatic hydrolyte of *Katsuwonus pelamis* liver is beneficial to prevent hyperlipidemia and atherosclerosis. In liver, KPLH decreased significantly the TG concentration ($P < 0.001$) but not total cholesterol and phospholipids levels. Furthermore, the activities of G6PDH, ME and FAS were decreased by 5% KPLH in liver ($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.05$). On the other hand, KPLH did not alter the activity of CPT in liver. These suggested that the serum lipids lowering effect of KPLH is related to the down-regulation of hepatic fatty acid synthesis. This study indicated that the KPLH has anti-atherogenic and anti-fatty liver effects by reduced hepatic fatty acid synthesis.

Key words: *Katsuwonus pelamis*; liver hydrolyte; lipid metabolism; enzyme activity; hyperlipidemia; fatty liver