

沈珊齐, 钱炳俊, 索 庚, 等. 维生素 B₆ 营养缺乏小鼠模型的构建及其对生长、血糖的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 266–269.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.077

维生素 B₆ 营养缺乏小鼠模型的构建 及其对生长、血糖的影响

沈珊齐¹, 钱炳俊^{1,2}, 索 庚¹, 吕颖芳³, 赵艳云^{1,4}

(1. 上海交通大学食品科学与工程系, 上海 200240; 2. 盐城卫生职业技术学院, 江苏盐城 224000;
3. 上海交通大学药学院, 上海 200240; 4. 美国俄勒冈州立大学食品科学与技术系, 美国科瓦利斯 97331)

摘要:以维生素 B₆ 正常、缺乏、恢复、增强型食物饲喂小鼠, 以血浆中维生素 B₆ 主要形式磷酸吡哆醛水平为评价指标, 以小鼠体质量和血糖水平为考察因素, 通过饮食营养缺乏构建获得维生素 B₆ 营养缺乏小鼠模型。结果表明, 维生素 B₆ 营养缺乏小鼠血浆中磷酸吡哆醛未能检测, 恢复组小鼠血浆中磷酸吡哆醛水平 (215.67 pg/mL) 得到较大的恢复, 与对照组 (157.00 pg/mL) 之间没有显著性差异 ($P>0.05$); 且维生素 B₆ 营养增强组小鼠血浆中磷酸吡哆醛水平 (341.67 pg/mL) 显著高于其他各组 ($P<0.05$); 维生素 B₆ 营养缺乏 4 周后小鼠平均体质量 (15.62 g) 显著低于维生素 B₆ 正常小鼠 (18.31 g), 补充维生素 B₆ 后小鼠体质量迅速恢复; 同时, 缺乏期维生素 B₆ 营养缺乏小鼠的空腹血糖水平始终低于正常小鼠, 补充维生素 B₆ 后其水平恢复缓慢。

关键词: 维生素 B₆; 缺乏模型; 小鼠; 生长; 血糖

中图分类号: S852.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0266-03

维生素 B₆ 是一种水溶维生素, 包括吡哆醇 (pyridoxine, PN)、吡哆醛 (pyridoxal, PL) 和吡哆胺 (pyridoxamine, PM) 3 种形式, 活化形式主要是 5-磷酸吡哆醛 (Pyridoxal 5'-phosphate, PLP)。它是维持人体生理功能必需的微量营养素, 以辅酶形式参与糖、蛋白质和脂肪酸的正常代谢, 并与白细胞、血红蛋白的合成相关。近年来研究还显示, 维生素 B₆ 有一定的抗氧化能力, 能够清除氧自由基^[1]。在生活中, 维生素 B₆ 的摄入常被忽视, 维生素 B₆ 缺乏在中国人群中比较普遍, 2012 年深圳市居民膳食结构调查显示, 人们对核黄素、硫胺素、维生素 B₆、叶酸和钙等微量元素摄入量偏低, 其中维生素 B₆ 缺乏最为严重, 仅为推荐摄入量的 16%^[2-3]。维生素 B₆ 缺乏虽然不会直接造成严重症状, 但会导致虚弱、失眠、神经紊乱、唇干裂、舌炎、口腔炎、动脉硬化、贫血以及细胞介导免疫损伤等一系列容易被忽视的慢性健康问题。通常, 维生素 B₆ 亦是糖代谢、氨基酸和 DNA 合成不可或缺的辅酶^[4], 对人体生长发育具有重要的影响。因此, 阐述维生素 B₆ 对人体免疫等生理功能的影响的分子机制, 获得其营养缺乏型的小鼠模型尤为重要。本研究采用自建配方, 手工烘焙加工维生素 B₆ 正常、缺乏、恢复、增强型小鼠饲料, 通过 4 周的缺乏饲喂和 4 周的恢复饲喂试验, 以血浆中维生素 B₆ 活化形式磷酸吡

哆醛水平为评价指标, 以小鼠体重和血糖水平为考察因素, 通过饮食营养缺乏构建获得维生素 B₆ 营养缺乏小鼠模型, 进一步丰富维生素 B₆ 在生理功能调节中作用的理论。

1 材料与方法

1.1 材料

正常雄性 3 周龄 Blab/c 小鼠 28 只购自上海史莱克动物中心。

1.2 试剂

饲料中的蔗糖、盐、植物油等均为食品级, 购自欧尚超市, 纤维素购自阿拉丁 (试剂) 上海有限公司, 维生素 A、D、E、B₁、B₂、B₆、B₁₂ 购自上海信谊药业有限公司, 烟酸和泛酸来自上海捷瑞生物技术有限公司, 硒和微生素选用美国斯旺森公司保健品, 矿质元素为相应化学纯试剂。强生稳豪型血糖试纸 (ONETOUCH Ultra Test Strips) 购自强生公司, 标准品磷酸吡哆醛购自美国 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 试验设计 将 28 只雄性 3 周龄 BALB/c 小鼠随机分为 2 组: 缺乏组 (21 只) 和对照组 (7 只)。分别采用维生素 B₆ 缺乏和正常的自制饲料饲喂 4 周。然后, 将缺乏组随机再分为 3 组: 缺乏组、恢复组和增强组, 每组 7 只, 分别采用维生素 B₆ 缺乏、正常、增强的自制饲料继续饲喂 4 周, 对照组喂完全饲料, 构建维生素 B₆ 缺乏小鼠模型。

1.3.2 维生素 B₆ 缺乏饲料的配制 参照 Miller 等试验配方^[5-7] 和国家标准 GB 14924.3—2001《实验动物 小鼠大鼠配合饲料》, 在小鼠饲料基本营养构成的基础上, 根据饲料成品的特性, 对饲料中的成分比例进行调整, 添加了淀粉, 最终形成的配方见表 1。

收稿日期: 2014-10-13

基金项目: 上海市自然科学基金 (编号: 11ZR1416200)。

作者简介: 沈珊齐 (1989—), 女, 湖北荆州人, 硕士研究生, 主要从事食品营养、保藏与加工研究。Tel: (021) 34206613; E-mail: asd@sztu.edu.cn。

通信作者: 钱炳俊, 博士, 助理研究员, 主要从事食品营养研究。Tel: (021) 34206613; E-mail: bjqianfd@sztu.edu.cn。

表 1 Balb/c 小鼠饲料主要成分

饲料类别	饲料组成(%)									维生素 B ₆ 含量(mg/kg)
	蔗糖	酪蛋白	淀粉	纤维素粉	大豆油	矿物质混合物	维生素混合物	甲硫氨酸	酒石酸氢胆碱	
维生素 B ₆ 完全饲料	40	20	18	8	5	3.5	1	0.3	0.2	0.70
维生素 B ₆ 缺失饲料	40	20	18	8	5	3.5	1	0.3	0.2	0.00
维生素 B ₆ 增强饲料	40	20	18	8	5	3.5	1	0.3	0.2	7.00

注:1% 维生素混合物含有 7 mg/kg 的维生素 B₆,增强饲料中维生素 B₆ 的含量为每日推荐摄入量的 10 倍。

除维生素 B₆ 外,其他矿物质和维生素组成则参照国家标准 GB 14924.3—2001《实验动物 小鼠大鼠配合饲料》,具体见表 2 和表 3。水溶性维生素片研磨成粉末后,溶解于水中;化学级矿物质试剂原料称量后溶解于水中。在蛋白、糖、油等组要成分按比例混合后,加入适当比例维生素水和矿物质水,加入适量脂溶性维生素,同时加入各组对应的维生素 B₆ 的量,补充一定水分,捏成面团,分割成直径 1 cm 的粗棒状或者长圆柱形的颗粒,微波加热,淀粉糊化后冷却成型,每日早上投喂。由于水溶性维生素加热易分解,在饮用水也按照相同配方添加水溶性维生素,定时定量补充。

小鼠饲养在上海交通大学实验动物中心完成,饲养环境条件为:光照/黑暗时间为 12 h/12 h,温度(24±1)℃,湿度(60±5)%。

表 2 饲料维生素组成

维生素名称	含量	维生素名称	含量
维生素 A	14 000 IU/kg	烟酸	60 mg/kg
维生素 D	1 500 IU/kg	泛酸	24 mg/kg
维生素 E	1 200 IU/kg	生物素	0.2 mg/kg
维生素 K	5 mg/kg	维生素 B ₁₂	0.022 mg/kg
维生素 B ₁	13 mg/kg	叶酸	6 mg/kg

表 3 饲料矿物质组成

矿物质名称	含量(mg/kg)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2 000
KCl	5 000
NaCl	2 000
FeCl ₃ ·3H ₂ O	120
MnCl ₂ ·4H ₂ O	75
CuSO ₄ ·5H ₂ O	10
ZnCl ₂	30
硒片	0.2

1.3.3 小鼠生长指标的测定 小鼠饲养期间,每周四下午对所有小鼠进行称质量,比较不同组小鼠质量变化。

1.3.4 小鼠血糖的测定 小鼠饲养期间,每周五上午投喂饲料前,尾部取血,采用强生血糖仪(强生稳豪倍易型血糖仪)配合强生试纸测定空腹血糖。

1.3.5 小鼠血浆磷酸吡哆醛水平分析 饲喂 8 周后,参考 Miduttun 等对 B 族维生素的测定方法^[8],使用液相色谱串联质谱(LC/MS/MS)分析小鼠血浆中维生素 B₆ 活化形式磷酸吡哆醛含量。仪器采用上海交通大学分析测试中心的超高效液相色谱(ACQUITY UPLC system, MA, USA)串联三段四级质谱仪(AB SCIEX, Toronto, Ontario, Canada)。

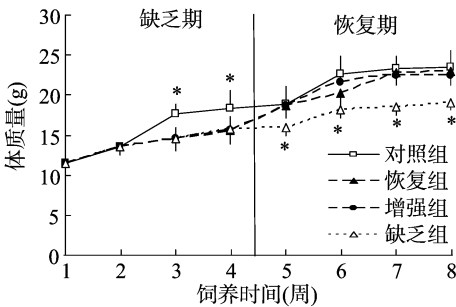
采样:每组小鼠取 3 个平行,毛细管眼眶取血,冰上保存,1 h 内 2 000 g、4℃离心 10 min,取上清。样品的前处理:60 μL 血样加入等体积三氯乙酸(TCA, 60 g/L),冰上混合 1 h,5 800 g、4℃离心 15 min。转移上清至新的 EP 管中,氮吹吹干后 100 μL 甲醇定容。

色谱条件如下,色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈。测定离子对:246.00/97.00。流动相:组分 A,650 mmol/L 乙酸;组分 B,100 mmol/L 七氟丁酸溶解于流动相 A;组分 C,90% 乙腈。流速,1.3 mL/min。标准品用甲醇溶解,配制 100 ng/mL,半数稀释制作标准曲线。得到 R²=0.997 5,0.304~100 ng/mL 的检测限。

2 结果与分析

2.1 不同处理小鼠生长水平差异

由图 1 可见,饲养初期,各组小鼠体质量基本一致。饲养 3 周,缺乏组各组小鼠体质量都显著低于对照组小鼠(P<0.05),第 4 周继续保持该趋势。当恢复组和增强组小鼠恢复维生素 B₆ 补充后,小鼠体质量迅速增长,接近对照组水平。此时,缺乏组小鼠体质量仍然显著低于其他各组。维生素 B₆ 增强饲养 2 周后,增强组体质量高于恢复组,但差异不明显。最后 2 周,恢复组和增强组小鼠体质量基本没有差别,略低于对照。说明补充日常所需维生素 B₆ 即可以满足生长需求,迅速恢复生长水平。



*表示与其他各组相比存在显著差异(P<0.05)
图1 不同维生素B₆水平小鼠体质量的差异

2.2 维生素 B₆ 缺乏对小鼠血糖的影响

由图 2 可见,试验初期,维生素 B₆ 缺乏组小鼠空腹血糖水平低于正常的对照组小鼠。第 2 周时,这种现象最为明显,对照组小鼠的空腹血糖水平显著高于其他各组小鼠。整个试验期,维生素 B₆ 缺乏小鼠的平均血糖水平都低于对照组。当缺乏小鼠开始补充维生素 B₆ 时 1 周(试验第 5 周),可以看到,其他各组小鼠平均空腹血糖水平仍低于对照组。但之后

的6~8周,增强组小鼠空腹血糖水平始终略高于对照组,恢复组小鼠与对照组基本一致,只有缺乏组小鼠平均空腹血糖水平始终低于其他各组。可见,维生素B₆对于机体维持空腹血糖水平有一定影响,缺乏后再补充可逐渐回复正常水平。

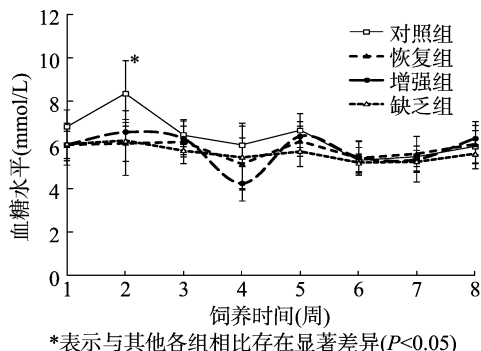


图2 维生素B₆对小鼠血糖的影响

2.3 维生素B₆缺乏对血浆中PLP的影响

PLP是体内维生素B₆水平的重要指标。图3结果显示,在维生素B₆缺乏饮食小鼠中,PLP没有检测到。其他3组,PLP含量从大到小依次为增强组(341.67 pg/mL) > 恢复组(215.67 pg/mL) > 对照组(157.00 pg/mL),表明在4周的恢复期后,小鼠体内的维生素B₆水平得到了很好的恢复,甚至是伴随大剂量增强得到提升。但是,10倍增强的饮食并未在PLP水平上体现出相应的放大倍数。同时,恢复组的小鼠血浆中PLP水平表现要优于对照组。结果表明维生素B₆缺乏后,补充日常饮食建议维生素B₆剂量即可。

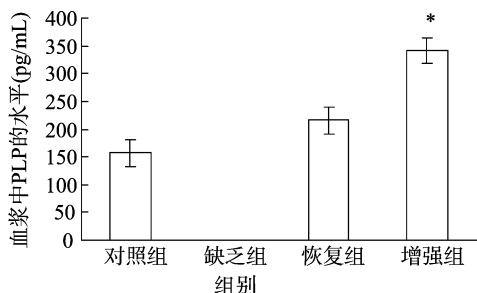


图3 饲喂不同剂量维生素B₆的小鼠血浆中PLP水平

3 结论与讨论

由于维生素B₆是碳水化合物、脂肪、蛋白质代谢的重要辅酶,维生素B₆对机体健康生长有重要影响。早在1945年,对维生素B₆进行饲喂研究发现,维生素B₆缺乏小鼠体质量会低于正常小鼠^[5]。近期Doke等的研究也显示维生素B₆缺乏会影响组织生长^[6]。本试验也发现维生素B₆缺乏小鼠体质量显著低于正常小鼠,这与Lewicka等研究认为补充维生素B₆可以显著增加大鼠的体质量^[9]类似。Huge等研究也发现缺乏维生素B₆会导致大鼠的生长率比正常饮食低一半^[10],而本研究则进一步阐明,缺乏维生素B₆导致的生长缓慢,是可以及时补充日常所需的维生素B₆得到迅速改善的。

碳水化合物代谢在2种类型的糖尿病中都有重要影响。血糖主要由胰岛素调控。维生素B₆的缺乏会导致胰腺和血

循环中的胰岛素量减少^[11]。空腹血糖的水平主要可以反映胰岛素对血糖的调节作用。空腹血糖量越低,表明胰岛素对血糖的调节能力减弱,胰岛素功能下降。维生素B₆可能对血糖调节有影响。Solomon等研究表明补充吡哆醇可以降低链霉素引起的糖尿病动物的血糖水平^[12];在高血糖症的情况下,磷酸吡哆醛和总的维生素B₆及其衍生物水平也会显著下降^[13];在机理上,Toyota等的研究则显示,维生素B₆缺乏小鼠胰岛素B细胞的功能会退化^[14]。可以看到在缺乏期,缺乏维生素B₆的小鼠空腹血糖含量普遍低于对照组。维生素B₆缺乏小鼠胰岛素调节能力下降。

维生素B₆缺乏小鼠血液循环中磷酸吡哆醛缺失,体质量生长变缓,血糖调节能力下降,试验采取的饲料和饲养方法可以有效得到维生素B₆缺乏小鼠模型。在维生素B₆长期缺乏的情况下,继续缺乏、恢复维生素B₆供应、10倍增强维生素B₆可以补充每日饮食所需的维生素B₆,就能逐渐恢复正常生长和提高血糖调节能力。

参考文献:

- [1] Bilski P, Li M Y, Ehrenshaft M, et al. Vitamin B₆ (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants[J]. Photochemistry and Photobiology, 2000, 71(2): 129-134.
- [2] 潘柳波, 王舟, 黄薇, 等. 深圳市居民户膳食模式调查[J]. 中国预防医学杂志, 2011, 12(11): 953-955.
- [3] 翟凤英, 何宇娜, 王志宏, 等. 中国城乡居民膳食营养素摄入状况及变化趋势[J]. 营养学报, 2005, 27(3): 181-184.
- [4] Hellmann H, Mooney S. Vitamin B₆: a molecule for human health? [J]. Molecules, 2010, 15(1): 442-459.
- [5] Baumann C A. Relative effects of casein and tryptophan on the health and xanthurenic acid excretion of pyridoxine-deficient mice [J]. Journal of Biological Chemistry, 1945, 157(2): 551-562.
- [6] Doke S, Inagaki N, Hayakawa T, et al. Effect of vitamin B₆ deficiency on an antibody production in mice [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1997, 61(8): 1331-1336.
- [7] Inubushi T, Okada M, Matsui A, et al. Effect of dietary vitamin B₆ contents on antibody production [J]. BioFactors, 2000, 11(1/2): 93-96.
- [8] Midttun Ø, Hustad S, Ueland P M. Quantitative profiling of biomarkers related to B-vitamin status, tryptophan metabolism and inflammation in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009, 23(9): 1371-1379.
- [9] Lewicki S, Zdanowski R. The effect of vitamin B₆ supplementation of protein deficiency diet on hematological parameters in the blood of rats subjected/non subjected to physical exertion - a pilot study [J]. Central European Journal of Immunology, 2012, 37(3): 187-192.
- [10] Hugh D R, Nina M, Paul R T, et al. The effects of a primary nutritional deficiency (vitamin B study) [J]. Food and Nutrition Sciences, 2012, 3(9): 1238-1244.
- [11] Gershoff S. Insulin sensitivity in vitamin B₆-deficient rats [J]. Annals of Nutrition and Metabolism, 1974, 16(6): 337-351.
- [12] Solomon L R, Cohen K. Erythrocyte O₂ transport and metabolism and effects of vitamin B₆ therapy in type II diabetes mellitus [J].

王庆容,王福群. 埃里格孢的生物学特性及致病性初步研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):269-271.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.078

埃里格孢的生物学特性及致病性初步研究

王庆容,王福群

(遵义师范学院生命科学学院/贵州省赤水河流域植物资源保护与应用研究特色重点实验室,贵州遵义 563002)

摘要:从患病鳊鱼鳃部分离到 1 个菌株,通过分子鉴定和形态鉴定,初步鉴定为埃里格孢(*Embellisia allii*)。将该菌株在不同温度和不同 pH 值条件下培养,根据二者对其生长速率的影响来进行生物学特性初步研究;再以草鱼和鲤鱼为感染对象,用该菌进行回复感染,对其致病性作初步研究。结果表明:埃里格孢在 pH 值为 5.0~11.0 下均能生长,以 pH 值为 9.0~11.0 时生长最佳;在 5~35 ℃ 时,该菌都能生长,以 20 ℃ 时生长最快,温度为 40 ℃ 时该菌几乎不能生长。在实验室条件下,单一菌株对草鱼和鲤鱼不具有致病性。

关键词:埃里格孢(*Embellisia allii*);生物学特性;致病性;鳊鱼;草鱼;鲤鱼

中图分类号:S941.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)02-0269-03

埃里格孢(*Embellisia allii*)属于暗色砖格分生孢子真菌埃里格孢属,它可以寄生于大蒜鳞茎,引起黑褐色病斑,后期病斑凹陷失水干燥,表面密生黑色霉层,菌丝体表生至埋生;在 PDA 和 PCA 培养基上生长迅速,菌落呈正圆形、黑色,产生大量分生孢子,菌丝部分细胞可膨大形成厚垣孢子。其分生孢子在水中,25 ℃ 下 4 h 左右即可萌发。萌发时主要从两端细胞开始,也可以从中间细胞开始,萌发芽管生长迅速,48 h 左右萌发的芽管即可分化形成菌丝或次生分生孢子梗,产生次生分生孢子。萌发的分生孢子细胞可产生 1 至数个芽管,分生孢子梗亦可萌发产生芽管,亦可很快转变成次生分生孢子梗^[1]。

埃里格孢通常是从植物体表分离,本研究首次从患病鳊鱼鳃部分离到,未见从其他动物体表分离到的报道。通过不同温度和不同 pH 值对其生长速率影响来进行生物学特性初步研究后,再以草鱼和鲤鱼为感染对象,用该菌进行回复感染,对其致病性进行初步研究,进一步了解埃里格孢对动物的影响。

1 材料与方法

收稿日期:2015-01-29

基金项目:贵州省科技创新人才团队建设项目[编号:黔科合人才团队(2012)4004];贵州省遵义市科技项目[编号:遵市科合社字(2009)26号]。

通信作者:王庆容(1972—),女,贵州遵义人,教授,研究方向为动物分子生物学、养殖动物疾病的中草药防治。E-mail:610194977@qq.com。

1.1 材料

从鳊鱼的鳃部分离到的菌株,在 PDA 培养基上纯培养,将纯培养的菌种保存于 4 ℃ 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离鉴定 提取菌株 DNA,扩增其 18S rRNA 基因。扩增使用的引物是通用引物 NS1 与 NS6^[2],将菌株的 18S rRNA 基因序列输入 GenBank 数据库中,查找相似菌种。将真菌接种到 PDA 培养基上,25 ℃ 恒温培养 3~12 d,每天观察菌落形态与颜色。再在显微镜下观察其产孢结构,分生孢子梗着生情况,孢子形态、大小与颜色等。采用分子鉴定和形态鉴定方法与步骤,具体步骤见文献[3]。

1.2.2 不同 pH 值对埃里格孢的影响 供试 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0 的 PDA 平板,共 7 个处理,平行做 3 次。切取菌龄一致的菌饼(直径 8 mm),将其置于平板中央,在 28 ℃ 下恒温培养,观察并记录菌落的生长速率,培养 24 h 后采用十字交叉法测定菌落直径^[4],试验周期为 7 d。

1.2.3 不同温度对埃里格孢的影响 供试温度为 5、10、15、20、25、30、35、40 ℃ 共 8 个温度梯度,平行培养 3 次,切取菌龄一致的菌饼(直径 8 mm),将其置于平板中央,在 28 ℃ 下恒温培养,观察并记录菌落的生长速率,培养 24 h 后采用十字交叉法测定菌落直径,试验周期为 7 d。

1.2.4 埃里格孢的致病性 用埃里格孢回复感染草鱼和鲤鱼,提前买一批供试鱼,等到供试鱼在自然条件下生长稳定,开始进行回复感染。将鱼分装到养鱼箱中,每箱数量为 10 尾,平行做 3 次,1 箱对照组,2 箱试验组。对照组不进行任何处理;试验组用浸泡法(在鱼的胸鳍处用小刀割 1 个 3~5 cm

Diabetes,1989,38(7):881-886.

[13] She Q B, Nagao I, Hayakawa T, et al. A simple HPLC method for the determination of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rat tissues; the effect of vitamin B₆ deficiency on these concentrations in rat liver[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994, 205(3): 1748-1754.

[14] Toyota T, Kai Y, Kakizaki M, et al. The endocrine pancreas in pyri-

doxine deficient rats[J]. The Tohoku Journal of Experimental Medicine, 1981, 134(3): 331-336.

[15] Jain S K. Vitamin B₆ (pyridoxamine) supplementation and complications of diabetes[J]. Metabolism, 2007, 56(2): 168-171.

[16] Chen A S, Taguchi T, Aoyama S, et al. Antioxidant activity of a Schiff base of pyridoxal and aminoguanidine[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2003, 35(11): 1392-1403.