

doi:10.12301/spxb202300073

文章编号:2095-6002(2024)03-0092-12

引用格式:张静,黄文婷,曹文红,等.龙趸石斑鱼肝脏维生素A的形态分布及其对干眼症细胞模型的影响[J].食品科学技术学报,2024,42(3):92-103.



ZHANG Jing, HUANG Wenting, CAO Wenhong, et al. Speciation distribution of vitamin A from liver of *Epinephelus drummondhayi* and its effect on xerophthalmia cell model[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024,42(3):92-103.

龙趸石斑鱼肝脏维生素A的形态分布及其对干眼症细胞模型的影响

张静^{1,2}, 黄文婷¹, 曹文红^{1,2,*}, 陈忠琴^{1,2}, 郑惠娜^{1,2}, 高加龙^{1,2}, 章超桦^{1,2}

(1. 广东海洋大学 食品科技学院/国家贝类加工技术研发分中心(湛江)/广东省水产品加工与安全重点实验室/广东省海洋食品工程技术研究中心/广东省海洋生物制品工程实验室/水产品深加工广东普通高等学校重点实验室, 广东 湛江 524088;

2. 大连工业大学 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁 大连 116034)

摘要:为探究龙趸石斑鱼肝脏中天然维生素A的形态分布特征及其与合成维生素A对干眼症改善效果的差异,采用水浴皂化法结合反相色谱法测定龙趸石斑鱼肝脏各脂质组分中维生素A含量,并从中性脂中分离得到天然维生素A棕榈酸酯含量较高的F3组分,分别研究了F3组分与合成维生素A棕榈酸酯对苯扎氯铵诱导的干眼症细胞模型的影响及二者的差异。实验设置角膜上皮细胞正常组(NC)、干眼症细胞模型组(MC)、F3实验组[低剂量组(LF3)、中剂量组(MF3)、高剂量组(HF3)]及合成维生素A棕榈酸酯标准品对照组[低剂量组(LVAP)、中剂量组(MVAP)、高剂量组(HVAP)]。采用CCK-8法检测细胞活性及毒性,采用实时荧光定量法检测细胞内炎症因子(IL-6、IL-1 β 及TNF- α)的基因表达。结果表明:龙趸石斑鱼肝脏中99.57%的维生素A以结合态形式存在,主要是维生素A棕榈酸酯,且在肝脏中性脂中含量最多。从中性脂中分离纯化得到了含天然维生素A棕榈酸酯的F3组分,当F3组分质量浓度高于286.00 pg/mL时,HCE-T存活率显著下降。F3组分及合成维生素A棕榈酸酯均能显著提高苯扎氯铵诱导的干眼症细胞存活率,降低其凋亡率,且低、中剂量的F3组细胞活力高于高剂量F3组及低、中、高剂量的合成维生素A棕榈酸酯组。在白介素(IL-6)相对表达量中,低、中剂量的F3组及低剂量的合成维生素A棕榈酸酯组显著高于中、高剂量的合成维生素A棕榈酸酯组($P < 0.05$);在肿瘤坏死因子- α (TNF- α)相对表达量中,低、中、高剂量的F3组显著低于低剂量合成维生素A棕榈酸酯组($P < 0.05$)。F3组分及合成维生素A棕榈酸酯均能下调苯扎氯铵诱导的干眼症细胞模型中IL-6及TNF- α 的基因表达($P < 0.05$),缓解干眼病导致的炎症。

关键词:龙趸石斑鱼;维生素A;形态分布;干眼症;细胞模型

中图分类号:TS201.4;TS254.1

文献标志码:A

维生素A是维持人体生长、繁殖、免疫,保持上皮组织完整及功能正常所必需的脂溶性维生素,缺乏

时会导致生长迟缓、夜盲症、干眼症、免疫下降等^[1]。哺乳动物自身不能合成维生素A,需要通过

收稿日期:2023-02-07

基金项目:国家重点研发计划课题(2018YFD0901105)。

Foundation: National Key Research and Development Project of China(2018YFD0901105)。

第一作者:张静,女,高级实验师,主要从事水产品精深加工方面的研究。

*通信作者:曹文红,男,教授,博士,主要从事海洋生物资源利用方面的研究。

饮食摄入。维生素 A 的饮食来源有天然维生素 A 和合成维生素 A 两种,天然的与合成的维生素 A 除在来源上不同之外,它们在化学结构、生物活性及人体的吸收利用上都有差距^[2]。人体可以通过消化系统直接分解利用动物性来源的天然维生素 A。鱼类肝脏含有丰富的天然维生素 A,是获取天然维生素 A 的优质原料。目前,人们主要是从鳕鱼及鲨鱼肝脏中提取鱼肝油并将其作为优质的天然维生素 A 补充剂。但近年来国内的鳕鱼主要依赖进口,来源受限,且价格昂贵,而鲨鱼肝自然资源日渐匮乏,因而人们转向我国出产较多的一些鱼类进行研究^[3]。龙趸石斑鱼(*Epinephelus drummondhayi*)在广东养殖产量大,受消费饮食习惯影响,人们通常将龙趸石斑鱼内脏丢弃。龙趸石斑鱼肝脏的天然维生素 A 含量丰富^[4],如何有效利用这部分资源亟待解决。目前维生素 A 酯的研究对象多为小鼠肝脏、配方奶粉、动物乳等,仅有一些针对鱼肝油^[5-6]的研究,少见对鱼肝脏天然维生素 A 酯的研究和开发。

外用维生素 A 棕榈酸酯滴眼液治疗能改善干眼症状,提高角膜染色评分和小泡细胞密度,对各种原因引起的角膜干燥症均有良好的治疗效果^[7]。苯扎氯铵诱发的干眼症模型是一种药物毒性诱发的干眼症模型,具有眼表细胞损伤和炎症,可用于评估一些新疗法或药物对干眼症的治疗或保护效果^[8]。本研究拟选用我国沿海地区产量较大的龙趸石斑鱼肝脏为原料,分析其肝脏中天然维生素 A 的形态及分布;以合成维生素 A 棕榈酸酯为对照,选用 CCK-8 法检测鱼肝脏中性脂中分离得到天然维生素 A 棕榈酸酯含量较高的 F3 组分对人角膜上皮细胞的毒性;采用实时荧光定量法检测细胞内炎症因子(IL-6、IL-1 β 及 TNF- α)的基因表达,探究天然与合成维生素 A 棕榈酸酯对苯扎氯铵诱导的干眼症细胞模型的影响及二者的差异,以评估龙趸石斑鱼肝脏中天然维生素 A 酯的安全性及其对干眼症的辅助治疗作用。本研究旨在探索天然维生素 A 棕榈酸酯与合成维生素 A 棕榈酸酯生理活性之间的差异,为石斑鱼肝脏中天然维生素 A 的开发和利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

龙趸石斑鱼(湛江南三岛人工养殖),购于广东

省湛江霞山水产品批发市场。鱼肝脏样品制作方法:现杀鱼后将肝脏取出,去除表面脂肪及结缔组织,用预冷的生理盐水清洗后吸干表面水分,匀浆后立即冻存于-80℃冰箱。

三氯甲烷,广州化学试剂公司;丙酮,中国国药集团;抗坏血酸、无水硫酸钠、氢氧化钾、石油醚、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)、氯化钙、异丙醇、氯化钾,汕头西陇公司;乙腈,美国 Thermo Fisher 公司;甲醇,美国 Sigma-Aldrich 公司。以上试剂除乙腈、甲醇为色谱纯外,其他试剂均为分析纯。维生素 A 棕榈酸酯标准品(VAP),纯度 $\geq 96\%$,上海源叶生物科技有限公司。

人角膜上皮细胞(HCE-T),广州赛库生物公司;DMEM/F-12 培养基,美国 HyClone 公司;0.25%胰酶(含 EDTA)、双抗,美国 Gibco 公司;重组人胰岛素,北京索莱宝公司;人表皮生长因子,上海爱必信公司;胎牛血清(中南美)、磷酸缓冲盐溶液(PBS),美国 Biological Industries 公司;苯扎氯铵(纯度 $\geq 95\%$),美国 Sigma-Aldrich 公司;CCK-8 试剂盒,日本同仁化学公司;Trizol 试剂,美国 Invitrogen 公司;DNase、PrimeScript RT-PCR 试剂盒,北京 Takara 公司。

1.2 仪器与设备

e2695 型高效液相色谱仪(配置 2489 紫外检测器)、XEVO G2-XS QTOF 型质谱仪,美国 Waters 公司;DU-1100 型真空冷冻干燥机、N-1300 型旋转蒸发仪、MGS-2200H 型氮吹仪,上海爱朗公司;FD-MI4000B 型倒置荧光显微镜,日本 Olympus 公司;SW-CJ-2FD 型超净工作台,苏州净化公司;5810R 型离心机,德国 Eppendorf 公司;Varioskan Flash 型酶标仪、Forma 370 型 CO₂ 恒温培养箱、NanoDrop 2000 型 RNA 测定仪,美国 Thermo Fisher 公司;7500 型应用生物系统,美国应用生物系统公司;HGC-8 型固相萃取仪,上海禾工公司;GCMS-TQ8050NX 型气相色谱-质谱联用仪、LC-20A 型液相色谱仪,日本岛津公司;Vulcan3-550 型马弗炉,美国 Neytech 公司;Vapodest-450 型全自动凯氏定氮仪,德国 Gerhardt 公司;QuikSep-50D 型层析系统,北京慧德易公司。

1.3 实验方法

1.3.1 龙趸石斑鱼肝脏中游离维生素 A 的提取

参考侯利南等^[9]游离维生素 A 的提取方法,并稍加改动。准确称取肝脏 2 g,加入 40 mL 甲醇超声

(超声功率为 240 W, 频率为 40 kHz) 15 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液对游离维生素 A 进行检测。

1.3.2 龙趸石斑鱼肝脏中维生素 A 的测定

采用水浴皂化法结合反相色谱法测定龙趸石斑鱼肝脏脂质中各组分维生素 A 的含量^[4]。准确称取 1.6 g 龙趸石斑鱼肝脏于棕色锥形瓶中, 加入 20 mL 水混匀, 加入 1.0 g 抗坏血酸和 0.1 g BHT 作为抗氧化剂。向锥形瓶中加入 30 mL 无水乙醇, 并加入 10 mL 质量分数为 50% 的氢氧化钾溶液作为皂化液, 混匀后盖上瓶塞于 80 ℃ 恒温水浴振荡皂化 30 min, 皂化后立即用冰水冷却。将皂化液用 30 mL 水转入 250 mL 棕色分液漏斗中, 加入石油醚振荡萃取 5 min。将下层水相移至另一分液漏斗中进行第二次提取, 合并醚相并水洗至中性后经 3 g 无水硫酸钠滤入 1 L 旋转蒸发瓶中, 并在旋转蒸发仪上浓缩至近干。用甲醇分次溶解残留物后定容至 10 mL, 过 0.22 μm 滤膜后待测。

将配置好的维生素 A1 和 A2 混合标准系列工作液在反相色谱进样制得标准曲线。反相色谱法条件: BEH C18 型色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇与水 (二者体积比为 96:4), 流速 0.8 mL/min, 进样量 10 μL。

1.3.3 龙趸石斑鱼肝脏中总脂的提取及脂质分级

采用 Floch 法提取龙趸石斑鱼肝脏的总脂, 参考黎崎均等^[10]的方法对脂质进行分级。将样品加入氯仿-甲醇 (二者体积比为 2:1) 混合溶剂中, 样品与混合溶剂的料液比 (g: mL) 为 1:30。在磁力搅拌器中浸提 30 min, 过滤。向过滤得到的固体中分次加入 20 mL 混合溶剂冲洗, 再加入 10 mL 0.05 mol/L 的氯化钙溶液。将下层氯仿溶液于 25 ℃ 旋转蒸发仪上浓缩至干, 以氮气吹扫至恒重, 称重即获得总脂。将龙趸石斑鱼肝脏总脂用氯仿溶解至 0.05 g/mL, 使用固相萃取仪进行萃取, 流速控制在 1 mL/min, 每次上样量为 1 mL。上样前先用 10 mL 甲醇活化 Sep-PakTM 固相萃取小柱, 再使用 30 mL 氯仿平衡柱子。随后先使用 25 mL 氯仿, 冲出中性脂组分, 然后使用 20 mL 丙酮, 冲出糖脂组分, 再使用 15 mL 甲醇冲出磷脂组分。

1.3.4 龙趸石斑鱼肝脏中脂质组分的质谱鉴定

参考 Rocchi 等^[5]和顾霄等^[6]的方法并稍加改动, 对龙趸石斑鱼肝脏脂质组分进行质谱测定。龙趸石斑鱼肝脏脂质的 3 种甘油酯样品及维生素 A

棕榈酸酯标准品均采用流动相稀释至约 50 μg/mL, 超声 10 min (超声功率为 240 W, 频率为 40 kHz), 过滤后待上机。流动相为乙腈与甲醇混合液 (二者体积比为 85:15), 检测波长为 328 nm, 采用 UPLC BEH C18 型色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm)。采用电喷雾正离子化 (ESI⁺) 检测, 一级锥孔电压为 20 V, 破碎电压为 20~30 V, 干燥气流为 700 L/h, 干燥器温度为 450 ℃, 扫描范围 m/z 为 100~1 000。

1.3.5 龙趸石斑鱼肝脏中性脂组分制备液相的分离鉴定

在制备液相中, 样品以质量浓度为 30 mg/mL 进样, 采用 BEH C18 型色谱柱 (250 mm × 10 mm, 5 μm), 以乙腈与异丙醇 (二者体积比 85:15) 混合液为流动相, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 328 nm, 进样量为 0.1 mL。

1.3.6 干眼症细胞模型的建立

参考文献 [11], 取对数生长的 HCE-T (在含 10% 的胎牛血清, 5 μg/mL 的胰岛素, 10 ng/mL 人表皮生长因子, 1% 双抗的 DMEM/F12 培养基中, 于 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中培养), 以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μL。于 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后, 更换新的完全培养液。以 1 μg/mL 的苯扎氯铵作用于细胞, 建立干眼症细胞模型。

1.3.7 样品浓度的筛选

取对数生长的 HCE-T, 按照 1.3.6 的条件培养 24 h, 更换新的完全培养液。选取质量浓度为 2.86、14.30、28.60、85.80、143.00、200.00、286.00 pg/mL 的 F3 组分作用于 HCE-T, 每组 5 个复孔。培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂继续培养 1.5 h, 在酶标仪 450 nm 波长处测定吸光值。按照 CCK-8 试剂说明书计算细胞存活率, 计算方法见式 (1)。

$$\text{细胞存活率} = (A_s - A_b) / (A_c - A_b) \times 100\% \quad (1)$$

式 (1) 中, A_s 为实验孔吸光度 (含细胞、培养基、CCK-8 溶液、药物溶液), A_b 为空白孔吸光度 (含培养基、CCK-8 溶液, 不含细胞、药物溶液), A_c 为对照孔吸光度 (含细胞、培养基、CCK-8 溶液, 不含药物溶液)。

1.3.8 细胞活性的检测

根据低、中、高剂量 F3 组分中维生素 A 棕榈酸酯的含量计算出相应维生素 A 棕榈酸酯标准品的剂量。实验设置 8 个组: 正常情况下培养的 HCE-T 为正常组 (NC)、干眼症细胞模型组 (MC)、低剂量

F3 实验组 LF3(干眼症模型 + 28.60 pg/mL 的 F3)、中剂量 F3 实验组 MF3(干眼症模型 + 85.80 pg/mL 的 F3)、高剂量 F3 实验组 HF3(干眼症模型 + 286.00 pg/mL 的 F3)、低剂量维生素 A 棕榈酸酯标准品对照组 LVAP(干眼症模型 + 35.60 pg/mL 的维生素 A 棕榈酸酯)、中剂量维生素 A 棕榈酸酯标准品对照组 MVAP(干眼症模型 + 106.0 pg/mL 的维生素 A 棕榈酸酯)、高剂量维生素 A 棕榈酸酯标准品对照组 HVAP(干眼症模型 + 356.00 pg/mL 的维生素 A 棕榈酸酯),每组 5 个复孔。培养 24 h 后更换新的完全培养基,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,继续培养 1.5 h,在酶标仪 450 nm 波长处测定吸光值。按照式(1)计算细胞存活率。

1.3.9 细胞内炎症因子的检测

因荧光定量法检测所需要的细胞数量较多,因而此方法的细胞接种条件略有不同。取对数生长的 HCE-T,以 1×10^6 个/mL 的密度接种于 6 孔培养板中,每孔 2.5 mL,于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,更换新的完全培养液。实验分组与 1.3.8 相同。细胞培养 24 h 后,用 PBS 润洗 3 次,再用 Trizol 试剂从细胞中提取总 RNA,在 1.0% 变性琼脂糖凝胶上电泳检测提取 RNA 的完整性。用 RNA 测定仪测定 RNA 的纯度和浓度,合格的 RNA 用无 RNA 的 DNase 试剂处理以去除 DNA 污染物,并根据 Novizan R223 逆转录试剂盒说明书,用 PrimeScript RT-PCR 试剂盒逆转录 cDNA。通过实时荧光定量聚合酶链反应(QPCR)检测细胞中炎症因子相关基因的表达。QPCR 反应在应用生物系统 7500 中用 SYBR Premix ExTaqTM II 套件进行。根据炎症因子的序列设计引物,引物序列见表 1,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内部参考基因,定量 PCR 反应体系组成:10 μ L 的 2 $\times$ ChamQ SYBR qPCR Master Mix,0.4 μ L 的 PCR Forward Primer(10 μ mol/L),0.4 μ L 的 PCRR everse Primer(10 μ mol/L),4 μ L 的 cDNA 模板和 5.2 μ L ddH₂O。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 70 s;95 $^{\circ}$ C、5 s;60 $^{\circ}$ C、15 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,40 个循环。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目标基因的表达水平。

1.4 数据处理

所有实验重复 3 次,数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。使用 One-way ANOVA 进行单因素方差分析,若差异显著则采用 Duncan 法进行多重比较,以 $P < 0.05$ 作为差异显著性的判断标准。

表 1 炎症因子对应的基因引物、探针序列

Tab. 1 Gene primer and probe sequence corresponding to inflammatory factors

各基因 对应序列	序列 (5'-3')
β -actin	
引物正向序列	TTGGCAATGAGCGTTC
引物反向序列	AGACAGCACTGTGTTGGCGTAC
IL-1 β	
引物正向序列	AACAGGCTGCTCTGGGATTC
引物反向序列	GTGGTGCTCGGAGATTCGTAG
TNF- α	
引物正向序列	GCTTGCCAGGATGCCAATGAGT
引物反向序列	TGCCTCTTTGCTGCTTTCACACA
IL-6	
引物正向序列	ACCTCTTCAGAACGAATTGACAAAC
引物反向序列	TTTGCTGCTTTCACACATGTTACTC

2 结果与分析

2.1 维生素 A 形态分析

维生素 A 主要有两种存在形式,结合态和游离态。按 1.3.2 的方法测得龙趸石斑鱼肝脏中游离态维生素 A 的含量。结合态维生素 A 含量的计算方法参考 Gupta 等^[12]的方法,以总维生素 A 含量减去游离状态的维生素 A 含量,计算结果见图 1。

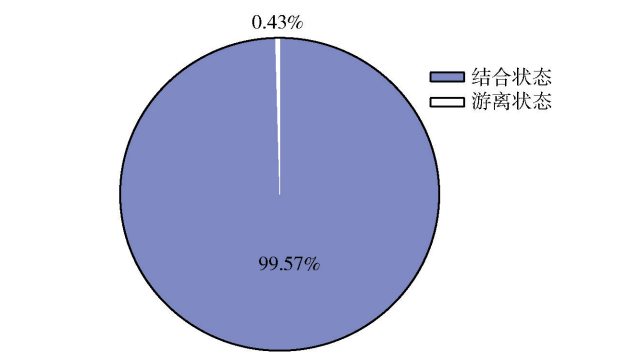


图 1 龙趸石斑鱼肝脏中结合态及游离态维生素 A 含量

Fig. 1 Content of bound and free vitamin A in liver of *Epinephelus drummondhayi*

由图 1 可知,龙趸石斑鱼肝脏中 99.57% 的维生素 A 以结合态形式存在,游离态维生素 A 仅占 0.43%。在大鼠和人类中,通过食物吸收进入体内的维生素 A,80% 以上是以酯化结合形式储存于体内组织器官中的,其主要与长链饱和脂肪酸酯化,且 90% 以上存在于肝脏中,肝脏中几乎所有的维生素

A 都是以维生素 A 结合酯化的形式存在的,只有少数为游离态维生素 A^[5]。脂肪结合态有助于防止体内维生素 A 过量时的中毒现象,维生素 A 酯还具有抵抗体内维生素 A 循环中自由基氧化的作用^[13]。不同的维生素 A 酯因结合的脂肪酸不同,对于机体的作用也会有所不同,主要由其结合的脂肪酸种类所决定,其同时具有维生素 A 的生理功能及对应脂肪酸所具有的功能^[14]。

2.2 脂质组分维生素 A 含量分析

维生素 A 是脂溶性维生素,所以先提取龙趸石斑鱼肝脏总脂,再对总脂进行分级。鱼肝脏油脂主要成分为甘油酯,根据极性和结构的差异,甘油酯又分为中性脂、糖脂和磷脂。将提取的龙趸石斑鱼肝脏总脂进行分级,得到各脂质占比,结果见图 2。由图 2 可知,龙趸石斑鱼肝脏总脂中中性脂质量分数最高,为 86.84%;糖脂为 9.85%;磷脂最少,为 0.73%。深海长尾鲨鱼肝脏脂质中性脂质量分数最高,为 50.0%;其次是磷脂,为 17.5%^[15]。

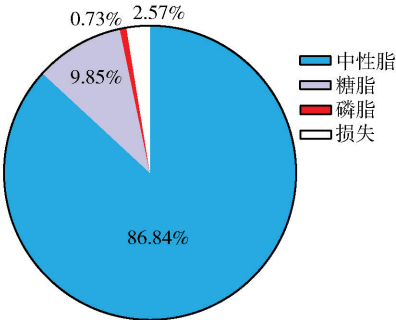


图 2 龙趸石斑鱼肝脏 3 种甘油酯组分在总脂中的占比

Fig.2 Proportion of three triglyceride fractions in the total lipids extracted from liver of *Epinephelus drummondhayi*

鲷鱼肝脏总脂中磷脂质量分数最高,为 28.3%;其次是中性脂,为 26.0%;糖脂含量最少^[16]。不同鱼类肝脏中的脂质组成各具特征,对鱼肝脏资源开发利用时应结合鱼肝自身特征进行定向利用。

对龙趸石斑鱼肝脏 3 种酯质组分中维生素 A 含量及总维生素 A 进行分析,结果见表 2。

表 2 龙趸石斑鱼肝脏各脂质组分维生素 A 含量

Tab.2 Contents of vitamin A of different lipid fractions in liver of <i>Epinephelus drummondhayi</i>			μg/100 g
酯质组分	w(维生素 A ₁)	w(维生素 A ₂)	w(总维生素 A)
中性脂	2 561.69 ± 304.70 ^a	3 985.61 ± 635.53 ^a	6 546.97 ± 934.55 ^a
糖脂	548.74 ± 91.67 ^b	138.29 ± 81.12 ^b	568.98 ± 91.67 ^b
磷脂	605.59 ± 99.90 ^b	189.88 ± 191.80 ^b	795.47 ± 283.76 ^b
总脂	7 708.17 ± 770.23	4 689.79 ± 429.71	12 397.96 ± 1 188.91

不同小写字母表示组间数据差异显著(P<0.05)。

由表 2 可知,中性脂的总维生素 A 含量最高,磷脂次之,糖脂最低。总脂中维生素 A₁ 的含量高于 A₂。维生素 A₁ 在改善夜盲症上有较大的帮助,对于眼睛干涩、视物不清以及皮肤的角质层损伤等症状具有一定的缓解作用。维生素 A₂ 可以在一定程度上缓解由于用眼过度引起的眼疲劳,保证指甲和头发的正常生长;对于皮肤烧伤,维生素 A₂ 也可以起到抑制感染,加快皮肤组织的再生、代谢等作用^[17]。维生素 A₁ 常见于哺乳动物和海水鱼体内,而维生素 A₂ 则多存在于淡水鱼体内。随着研究的深入,人们发现不少海水鱼体中也存在维生素 A₂^[4]。不同鱼类肝脏中维生素 A 种类及含量的不同,与鱼种类、个体大小、自身的食性及饲养管理水平等多方面因素相关^[18]。黄文婷等^[4] 检测了 9 种常见的经济鱼类肝脏中的维生素 A,发现除了乌鳢和大口黑鲈外,其他鱼类的肝脏中维生素 A 的总质量分数均达 200 μg/100 g 以上,其中海水龙趸石斑鱼肝脏中维生素 A 的总质量

分数最高,达 14.4 mg/100 g,也远高于金枪鱼肝脏的维生素 A 的质量分数(6.65 mg/100 g)^[16],说明龙趸石斑鱼肝脏可作为获取天然维生素 A 的优良原料。

2.3 维生素 A 酯质谱分析

维生素 A 相关的脂肪酸酯由于其双键的共轭系统而具有强烈的紫外线吸收的特点,因此通常采用反相色谱紫外检测器串联质谱分离和鉴定维生素 A 酯^[5]。本研究通过质谱分析,对维生素 A 棕榈酸酯标准品及龙趸石斑鱼肝脏中 3 种甘油酯成分进行一级质谱测定,得到色谱峰的质谱图,结果见图 3。由图 3 可知:维生素 A 棕榈酸酯标准品主要在 m/z 为 363 处有一个信号峰;中性脂组分在 m/z 为 338 和 363 处各有一个高的信号峰;糖脂组分的高峰出现在 m/z 为 338 和 357 处,而磷脂质荷比主要集中在 800 附近。对照标准品质谱结果,推测中性脂组分含维生素 A 棕榈酸酯。维生素 A 主要以长链维生素

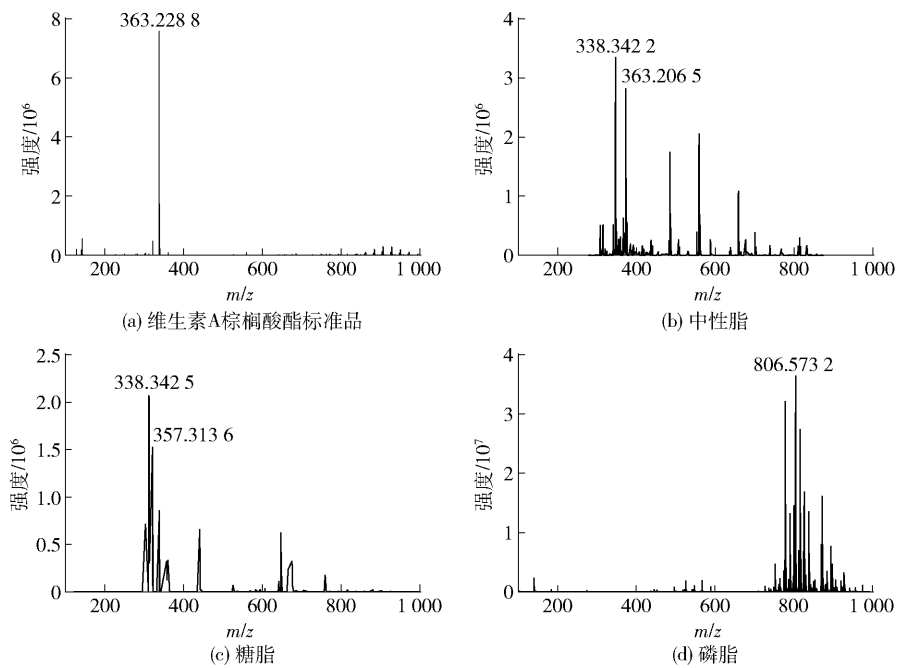


图 3 维生素 A 棕榈酸酯标准品及龙趸石斑鱼肝脏 3 种甘油酯组分质谱

Fig. 3 Mass spectra of vitamin A palmitate standard and three glyceride fractions in liver of *Epinephelus drummondhayi*

A 酯的形式存在于动物性来源的食品中^[17]。哺乳动物体内存在的维生素 A 酯主要是维生素 A 棕榈酸酯,也有少量维生素 A 油酸酯、维生素 A 硬脂酸酯、维生素 A 肉豆蔻酸酯等其他维生素 A 酯^[14]。

2.4 中性脂组分维生素 A 棕榈酸酯的分离及鉴定

由图 2 可知,龙趸石斑鱼肝脏的中性脂组分占总脂比例最高,3 个组分中中性脂所含维生素 A 含量最高,因此选择中性脂组分进行分离纯化。采用制备液相进行分离,结果见图 4 和图 5。

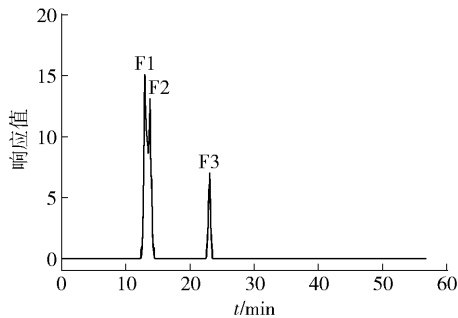


图 4 中性脂组分的制备液相色谱

Fig. 4 Preparative liquid chromatogram of neutral lipid fraction

由图 4 可知,中性脂组分分离出了 3 个峰:F1、F2、F3,对 3 个峰进行质谱鉴定。3 个峰中 F3 组分具有与维生素 A 棕榈酸酯标准品一致的信号峰(图 5),因此推测 F3 中含维生素 A 棕榈酸酯。收集制备液相分离出的 F3 组分并测得维生素 A 棕榈

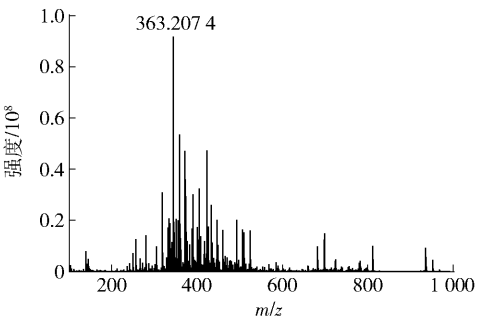


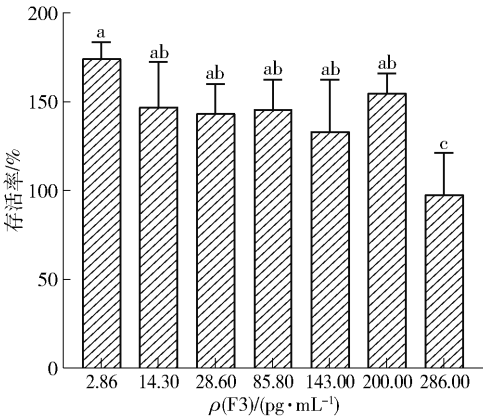
图 5 F3 组分质谱

Fig. 5 Mass spectra of F3 fraction

酸酯占比 68%。顾霄等^[6]同样通过一级质谱对维生素 A 酯标准品与金枪鱼肝油样品进行分析,根据特征离子检测鉴定得到金枪鱼肝油的多种维生素 A 酯,其中相对含量较高的是维生素 A 油酸酯,质量分数为 28.6%,维生素 A 棕榈酸酯,质量分数为 13.6%。天然鳕鱼肝油主要含维生素 A 棕榈酸酯^[6],本研究发现龙趸石斑鱼肝脏所含维生素 A 也主要是维生素 A 棕榈酸酯,因此可用于替代鳕鱼肝脏作为开发天然维生素 A 的优质原料。

2.5 F3 组分对 HCE-T 的毒性分析

为了检测 F3 组分对 HCE-T 是否有毒性以及对 HCE-T 生长的影响,将不同质量浓度的 F3 组作用于 HCE-T,培养 24 h 后用 CCK-8 法进行毒性检测,计算细胞存活率,结果见图 6。由图 6 可知,不同质量浓度的 F3 组分对细胞存活率的影响无显著



不同小写字母表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

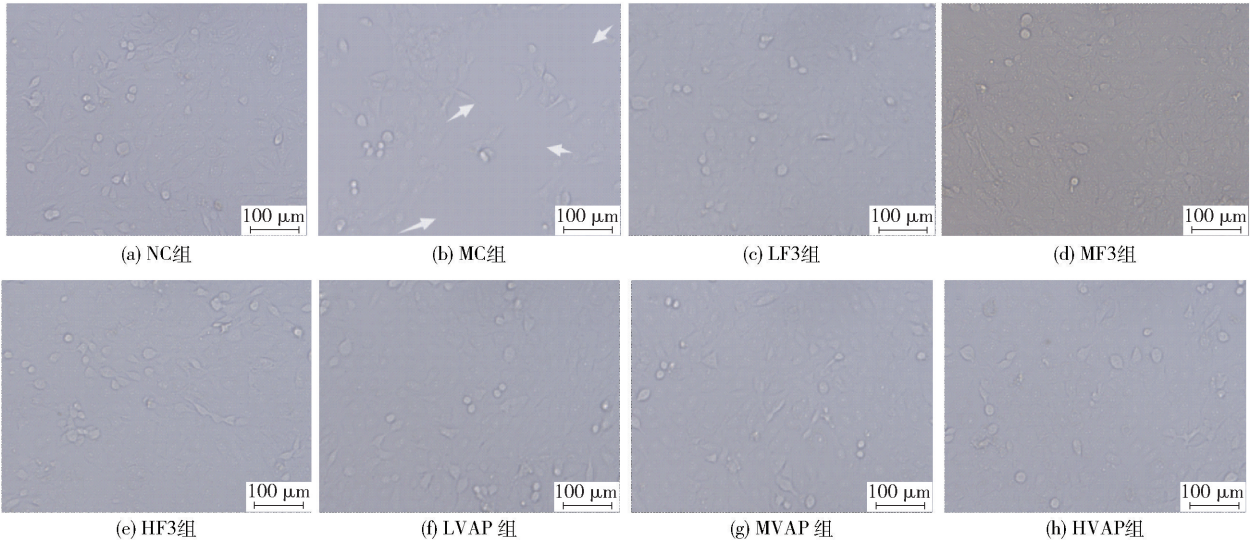
图6 F3组分对HCE-T的毒性分析

Fig.6 Toxicity of F3 fraction on HCE-T

差异($P > 0.05$),都可促进HCE-T增殖。当F3组分质量浓度达到286.00 pg/mL时,细胞存活率显著下降($P < 0.05$),说明F3组分质量浓度低于286.00 pg/mL时对HCE-T没有明显的毒性作用。参考吴文玉等^[19]在维生素A对糖基化终末产物诱导的HCE-T损伤的作用及机制研究中选择的维生素A的浓度^[19],选取F3质量浓度为28.60、85.80、286.00 pg/mL为低、中、高浓度用于后续干眼症模型实验。

2.6 F3组分对干眼症细胞模型形态及活性的影响

按照实验分组将8组细胞进行培养,在加入CCK-8之前使用倒置显微镜对各组细胞形态进行拍照,结果见图7。



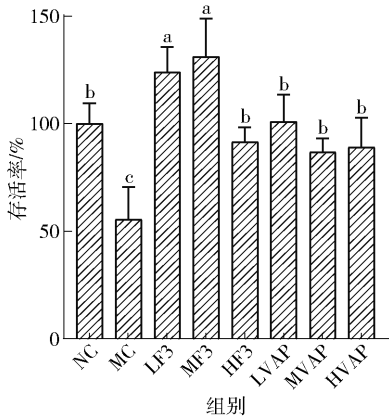
(b)图中箭头指示的区域表示细胞显著减少。

图7 F3组分对干眼症细胞模型形态的影响

Fig.7 Effect of F3 fraction on morphology of xerophthalmia cell model

细胞形态可以作为判定细胞生理功能是否紊乱和样品对细胞是否具有毒性的重要指标之一^[20]。由图7可知,MC组[图7(b)]细胞数量相比于NC组[图7(a)]细胞连接不再紧密,细胞缩小且部分细胞出现透明,并呈悬浮状态,该现象表示细胞已经死亡,且细胞数量出现显著减少,造模成功^[11]。LF3组[图7(c)]、MF3组[图7(d)]的细胞长势较好,和NC细胞一样连接紧密,HF3组[图7(e)]细胞数相较于LF3和MF3组有所减少,出现漂浮现象。LVAP和MVAP组[图7(f)、图7(g)]细胞长势好于HVAP组[图7(h)]。这表明,龙趸石斑鱼肝脏中的天然维生素A棕榈酸酯在适当浓度下对干眼症细胞具有较好的修护作用。王多梅等^[21]的研究亦证实,在动物体内天然维生素A代谢的中间产物全反式维甲酸可以通过上调大鼠角膜上皮细胞中的凋亡抑制蛋白Bcl-2以及下调促凋亡抑制蛋白Bax和Caspase-3来抑制角膜细胞损伤愈合过程中细胞凋亡的发生,同时也可有效促进损伤修复后期细胞紧密连接结构的重塑。Zhang等^[22]在苯扎氯铵诱导的小鼠干眼症模型中,发现维生素A可以减少角膜上皮细胞的凋亡,起到治疗干眼症的作用。

将8组细胞进行细胞活性检测,结果见图8。维生素A是通过抑制诱导的JNK和NF- κ B的磷酸化而起到提高糖基化终末端产物诱导HCE-T的存活率。在适当浓度的维生素A干预后,苯扎氯铵诱导的干眼症模型细胞存活数量明显增加到空白对照组的10倍左右^[21]。由图8可知:与MC组相比,各



不同小写字母表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$)。

图 8 F3 组分对干眼症细胞模型活性的影响

Fig. 8 Effect of F3 fraction on activity of xerophthalmia cell model

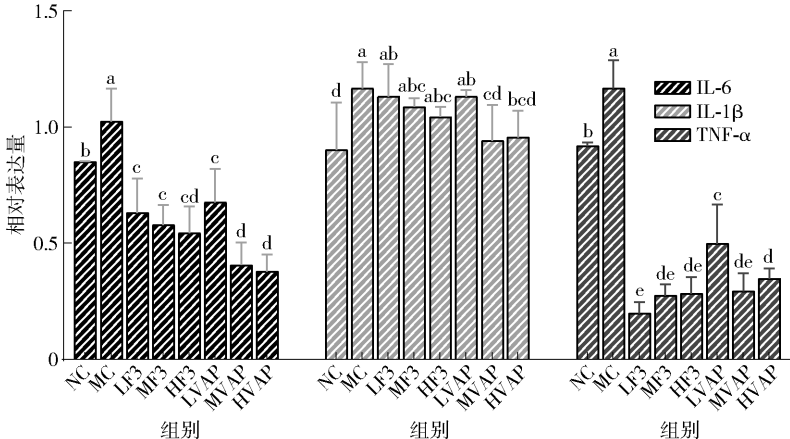
组细胞存活率都有不同程度的提高,其中 LF3 和 MF3 组显著高于 HF3 组及 LVAP、MVAP 和 HVAP 组 ($P < 0.05$); HF3 组与 LVAP、MVAP 和 HVAP 组之间细胞存活率无显著差异 ($P > 0.05$)。F3 组分及合成维生素 A 棕榈酸酯均显著提高了苯扎氯铵诱导的干眼症细胞存活率,降低了细胞凋亡率,且 LF3 和 MF3 组细胞活力高于 HF3 组及 LVAP、MVAP 和 HVAP 组。维生素 A 棕榈酸酯对热、光、空气和湿度敏感,稳定性极差,维生素 A 棕榈酸酯的稳定性随着甘油三酯浓度的增加而升高^[23]。本研究从中性脂中分离出的 F3 组分含 68% 的天然维生素 A 棕榈酸酯,F3 组分中的其他脂质成分的保护作用让维生素 A 棕榈酸酯更趋于稳定,从而保证了 F3 组分的保护活性,提高了细胞存活率。刘云凤等^[2]

在对天然维生素和合成维生素的活性与标识分析中指出,对维生素 E 和作为维生素 A 源的类胡萝卜素来说,合成的与天然的除在来源上不同之外,它们在化学结构、生物活性及人体的吸收利用上都有差距。天然维生素 E 在生物活性上优于合成维生素 E,天然维生素 E 的利用率高于合成维生素 E,天然维生素 E 与合成维生素 E 中异构体的形式和数量决定了其在吸收后的不同的转运效率,进而影响生物学功能的发挥^[24]。维生素 A 尚未见此类研究,天然维生素 A 与合成维生素 A 在空间构象上是否有差异以及其生物活性差异是否与构像差异有关还需要进一步深入研究。

2.7 F3 组分对干眼症细胞模型炎症因子的影响

近年来,关于泪腺、泪液以及结膜内炎症细胞和炎症介质等免疫因素的研究发现,炎症是干眼发病的核心因素。干眼症发病期间,白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子(TNF- α)等多种细胞因子及受体水平在干眼症患者的泪液中明显升高。这些细胞因子刺激角膜、结膜和泪腺上皮细胞分泌更多的炎症介质和细胞因子,从而引起眼部组织的炎症反应和损伤^[25-26]。这些炎症因子可以作为早期识别干眼症严重程度的客观、敏感和可靠的有效指标^[27]。按照实验分组将细胞培养后检测各组细胞内炎症因子,检测结果见图 9。

干眼症与 T 细胞介导的炎症有关,在角膜细胞中炎症因子的高表达,使得免疫细胞向角结膜聚集,导致炎症出现^[28]。IL-6 是一种多变性的细胞因子,在 B 细胞中发挥关键作用,诱导浆细胞分化和产



不同小写字母表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$)。

图 9 F3 组分对干眼症细胞模型 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 相对表达量的影响

Fig. 9 Effect of F3 fraction on relative expression of IL-6、IL-1 β and TNF- α in xerophthalmia cell model

生抗体^[29],促进炎症的产生。白细胞介素 1(IL-1)又称淋巴细胞活化因子,由激活的单核巨噬细胞和上皮细胞产生。IL-1 β 是 IL-1 的主要活性形式^[30],其会降低受神经调控的泪液分泌功能,降低其神经递质的释放,从而导致干眼症。IL-1 β 在多种慢性炎症中有表达,是机体的重要免疫介质。TNF- α 是由单核巨噬细胞分泌的一种多向性细胞因子,是干眼炎症反应中活跃的炎症因子,其促进产生泪腺组织中的胶原酶,而胶原酶会破坏腺泡结构,这一现象易诱发眼部炎症^[31]。干眼患者泪液中 TNF- α 的含量高于正常人,且泪液中 TNF- α 的含量与角膜上皮的损伤程度呈正相关^[32-33]。在一定程度上,TNF- α 干预泪腺上皮细胞更具备干眼模型的特征^[11]。

在图 9 中,对于 IL-6 相对表达量,MC 组相对于 NC 组显著上升,F3 组及合成维生素 A 棕榈酸酯组相对于 MC 组表达量都显著下降,其中 LF3、MF3 组及 LVAP 组显著高于 MVAP、HVAP 组($P < 0.05$)。对于 IL-1 β 相对表达量,MC 组相对于 NC 组出现显著上升,3 个剂量的 F3 组与 LVAP、MVAP 组无显著差异,NC 组与 MVAP、HVAP 组无显著差异($P > 0.05$)。在 TNF- α 相对表达量中,3 个剂量的 F3 组及合成维生素 A 棕榈酸酯组均显著低于 MC 组,其中 LF3 组显著低于 LVAP 和 HVAP 组,3 个剂量的 F3 组显著低于 LVAP 组($P < 0.05$),MF3 和 HF3 组与合成维生素 A 棕榈酸酯组无显著差异($P > 0.05$)。Li 等^[34]探讨了虾青素在高渗诱导的体内外干眼模型中的抑炎作用及其作用机制,结果发现,虾青素能通过下调干眼症模型中高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)和炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 的表达来抑制炎症。在本研究中,F3 组及维生素 A 棕榈酸酯组均能下调 IL-6 及 TNF- α 的表达,缓解干眼病导致的炎症。Rolando 等^[35]研究表明,患者在干眼症的最早阶段,眼睛仍然是湿润的,几乎没有眼表损伤的迹象,但结膜上皮的炎症标志物的表达高于正常人。到目前为止,干眼症与炎症系统激活之间的确切关系还没有被阐明。但可以肯定的是,抗炎治疗可以减少干眼症的症状^[36]。不同干眼症模型及培养条件导致的研究结果不一致,维生素 A 对于干眼症的影响机制还有待进一步探究。

3 结 论

龙趸石斑鱼肝脏中 99.57% 的维生素 A 以结合

态存在,主要是维生素 A 棕榈酸酯,且在肝脏中性脂中含量最多。从龙趸石斑鱼肝脏中性脂中分离纯化得到含天然维生素 A 棕榈酸酯的 F3 组分,当 F3 质量浓度高于 286.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,HCE-T 细胞存活率显著下降。F3 组分及合成维生素 A 棕榈酸酯均能显著提高苯扎氯铵诱导的干眼症细胞存活率,减少细胞凋亡,且低、中剂量的 F3 组细胞存活率优于合成维生素 A 棕榈酸酯组。F3 组分及合成维生素 A 棕榈酸酯均能下调苯扎氯铵诱导的干眼症细胞模型中 IL-6 及 TNF- α 的基因表达,缓解干眼病导致的炎症。本研究旨在探索天然维生素 A 棕榈酸酯与合成维生素 A 棕榈酸酯生理活性之间的差异,为龙趸石斑鱼肝脏中天然维生素 A 资源的开发提供理论参考。

参考文献:

- [1] MANUSEVICH E W, SHIMRIT D B, RAM R. The vicious cycle of vitamin A deficiency: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(17):3703-3714.
- [2] 刘云凤,邵斌.天然维生素和合成维生素的活性与标识[J].中国食品添加剂,2004,15(2):32-37.
LIU Y F, SHAO B. The activity and their mark of nature and synthetic vitamin [J]. China Food Additives, 2004, 15(2):32-37.
- [3] 林春波,吴鹏,唐旭,等.我国鱼肝油产品开发现状、存在问题及发展策略[J].中国油脂,2021,46(6):21-24.
LIN C B, WU P, TANG X, et al. Development status, existing problems and development strategy of cod liver oil products in China[J]. China Oil and Fat, 2021, 46(6):21-24.
- [4] 黄文婷,曹文红,章超桦,等.鱼类肝脏天然维生素 A 提取、检测方法的比较及应用研究[J].中国油脂,2022,47(6):141-147.
HUANG W T, CAO W H, ZHNG C H, et al. Comparison and application of extraction and detection methods of natural vitamin A in fish liver [J]. China Oils and Fat, 2022, 47(6):141-147.
- [5] ROCCHI S, CARETTI F, GENTILI A, et al. Quantitative profiling of retinyl esters in milk from different ruminant species by using high performance liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2016, 211(15):455-464.

- [6] 顾霄,李煜. 非水反相色谱-飞行时间质谱法对鱼肝油中维生素 A 酯的分离与鉴定[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(1): 181-185.
- GU X, LI Y. Separation and identification of retinyl esters in fish liver oil by NARP-TOF/MS[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2018, 38(1):181-185.
- [7] 陆桢媛,任洁,葛潇虹,等. 维生素 A 棕榈酸酯眼用凝胶辅助治疗对干眼症患者泪膜稳定性及炎症因子水平的影响[J]. 国际眼科杂志, 2018, 18(6): 1135-1138.
- LU Y Y, REN J, GE X H, et al. Effect of vitamin A palmitate ophthalmic gel adjunctive therapy on tear film stability and inflammatory cytokines in patients with dry eye[J]. International Eye Science, 2018, 18(6): 1135-1138.
- [8] 杨延婷,张丹,吴丽洁,等. 东莨菪碱与苯扎氯铵干眼症大鼠造模方法研究[J]. 动物医学进展, 2017, 38(10):43-50.
- YANG Y T, ZHANG D, WU L J, et al. Study on dry eye modeling by scopolamine and benzalkonium chloride in rats[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2017, 38(10):43-50.
- [9] 侯俐南,李彬,乔亚森,等. 甲醇超声提取法测定保健食品中维生素 A[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(3): 938-944.
- HOU L N, LI B, QIAO Y S, et al. Determination of vitamin A in health foods by ultrasonic extraction with methanol[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(3): 938-944.
- [10] 黎崎均,周真真,张东梅,等. 微拟球藻总脂中甘油酯组成定量分析及 EPA 的存在形式研究[J]. 中国油脂, 2021,46(6):119-124.
- LI Q J, ZHOU Z Z, ZHANG D M, et al. Quantitative analysis of glycerides composition and existence form of EPA in total lipid of *Nannochloropsis* sp. [J]. China Oils and Fat, 2021, 46(6):119-124.
- [11] 李玲,朱梦晨,李点,等. 兔干眼细胞模型的建立与生物学特征评价[J]. 国际眼科杂志,2021,21(2): 217-221.
- LI L, ZHU M C, LI D, et al. Establishment of rabbit dry eye cells model and evaluation of its biological characteristics[J]. International Journal of Ophthalmology, 2021, 21(2): 217-221.
- [12] GUPTA C, ARORA S, SYAMA M A, et al. Preparation of milk protein-vitamin A complexes and their evaluation for vitamin A binding ability[J]. Food Chemistry, 2017, 237(15): 141-149.
- [13] XIA Q, YIN J J, CHERNG S H, et al. UVA photoirradiation of retinyl palmitate-formation of singlet oxygen and superoxide, and their role in induction of lipid peroxidation[J]. Toxicology Letters, 2006, 163(1): 30-43.
- [14] MAJCHRZAK D, FABIAN E, ELMADFA I. Vitamin A content (retinol and retinyl esters) in livers of different animals[J]. Food Chemistry, 2006, 98(4): 704-710.
- [15] 杨思静,刘小芳,刘建志,等. 不同品种鲨鱼肝脂质组成特征分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(12): 307-312.
- YANG S J, LIU X F, LIU J Z, et al. Analysis of components characteristics of lipid in different kinds of shark livers[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020,41(12):307-312.
- [16] 侯钦帅,刘小芳,张学超,等. 鳕鱼鱼肝营养成分分析与评价[J]. 青岛大学学报(自然科学版), 2017, 30(3):29-34.
- HOU Q S, LIU X F, ZHANG X C, et al. Analysis and evaluation of nutritional components of *Katsuwonus pelamis* liver[J]. Journal of Qingdao University (Natural Science Edition), 2017,30(3):29-34.
- [17] GESTO M, CASTRO L F C, REIS-HENRIQUES M A, et al. Tissue-specific distribution patterns of retinoids and didehydroretinoids in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 2012, 161(1): 69-78.
- [18] 连雪原,陈乃松,王孟乐,等. 大口黑鲈维生素 A 需求量[J]. 动物营养学报. 2017, 29(10): 3819-3830.
- LIAN X Y, CHEN N S, WANG M L, et al. Dietary vitamin A requirement of *Largemouth bass* [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2017, 29(10): 3819-3830.
- [19] 吴文玉,钟健文,李卓芸,等. 维生素 A 对糖基化终末产物诱导的角膜上皮细胞损伤的作用及机制研究[J]. 今日药学, 2020, 30(2): 121-123.
- WU W Y, ZHONG J W, LI Z Y, et al. Effects and the underlying mechanism of vitamin A against damage induced by advanced glycation end products (AGEs)[J]. Pharmacy Today, 2020, 30(2):121-123.
- [20] XIANG P, LIU R Y, LI C, et al. Effects of organophosphorus flame retardant TDCPP on normal human corneal epithelial cells: implications for human health[J]. En-

- vironmental Pollution, 2017, 230: 22 – 30.
- [21] 王多梅, 宋梦, 汪枫, 等. 全反式维甲酸对角膜上皮损伤修复过程中细胞凋亡的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(04): 575 – 579.
- WANG D M, SONG M, WANG F, et al. Effect of all-trans retinoic acid on apoptosis in corneal epithelial wound healing[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2019, 54(04): 575 – 579.
- [22] ZHANG W, LI W, ZHANG C, et al. Effects of vitamin A on expressions of apoptosis genes Bax and Bcl-2 in epithelial cells of corneal tissues induced by benzalkonium chloride in mice with dry eye[J]. Medical Science Monitor, 2019, 25: 4583 – 4589.
- [23] MOCCAND C, MARTIN F, MARTIEL I, et al. Vitamin A degradation in triglycerides varying by their saturation levels[J]. Food Research International, 2016, 88(3): 3 – 9.
- [24] 刘玉兰, 肖勘. 天然维生素 E 和合成维生素 E 在猪营养中的研究进展[J]. 动物营养学报, 2020, 32(6): 2449 – 2453.
- LIU Y L, XIAO K. Research progress of natural vitamin E and synthetic E in pig nutrition[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(6): 2449 – 2453.
- [25] 王方, 王珊, 石玉恒, 等. 淫羊藿总黄酮含药血浆对干眼症泪腺上皮细胞模型 IL-6 表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(9): 167 – 169.
- WANG F, WANG S, SHI Y H, et al. Effect of total flavonoids of Yinyanghuo (*Herba Epimedii*) on IL-6 expression in dry eye Lacrimal Gland epithelial cell model[J]. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine, 2020, 47(9): 167 – 169.
- [26] 李进良, 胡双飞, 蒙奋兆, 等. 夏桑菊防治干眼症的网络药理学机制及实验验证[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2024, 63(1): 56 – 65.
- LI J L, HU S F, MENG F Z, et al. Exploring the mechanism and function of Xiasangu in the treatment of xerophthalmia based on network pharmacology and experimental validation[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2024, 63(1): 56 – 65.
- [27] 李海辉, 王彦荣, 刘洋, 等. 门诊干眼患者炎症因子表达水平及干眼相关危险因素研究[J]. 中国医药导报, 2016, 13(21): 127 – 130.
- LI H H, WANG Y R, LIU Y, et al. Study on the inflammatory factor expression level and risk factors of patients with dry eye in outpatient clinic[J]. China Medical Herald, 2016, 13(21): 127 – 130.
- [28] KYUNG C Y, CHANG S P, YOU I C, et al. Expression of CXCL9, -10, -11, and CXCR3 in the tear film and ocular surface of patients with dry eye syndrome[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2010, 51(2): 643 – 650.
- [29] KANG S, TANAKA T, NARAZAKI M, et al. Targeting interleukin-6 signaling in clinic[J]. Immunity, 2019, 50(4): 1007 – 1023.
- [30] ARITA R, ITOH K, MAEDA S, et al. A newly developed noninvasive and mobile pen-shaped meibography system[J]. Cornea, 2013, 32(3): 242 – 247.
- [31] KANELLOPOULOS, JOHN A, ASIMELLIS, et al. *In vivo* 3-dimensional corneal epithelial thickness mapping as an indicator of dry eye: preliminary clinical assessment[J]. American Journal of Ophthalmology, 2014, 157(1): 63 – 68.
- [32] ANNAN J E, GOYAL S, QIANG Z, et al. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) regulates T cell chemotaxis in dry eye-associated corneal inflammation[J]. Investigative Ophthalmology Visual Science, 2010, 51(7): 3418 – 3423.
- [33] BIKKER A, WOERKOM J V, KRUIZE A A, et al. Increased expression of interleukin - 7 in labial salivary glands of patients with primary sjgren's syndrome correlates with increased inflammation[J]. Arthritis Rheumatism, 2014, 62(4): 969 – 977.
- [34] LI H, LI J, HOU C, et al. The effect of astaxanthin on inflammation in hyperosmolarity of experimental dry eye model *in vitro* and *in vivo*[J]. Experimental Eye Research, 2020, 197: 108113.
- [35] ROLANDO M, BARABINO S, MINGARI C, et al. Distribution of conjunctival HLA-DR expression and the pathogenesis of damage in early dry eyes[J]. Cornea, 2005, 24(8): 951 – 954.
- [36] BARABINO S, LABETOUILLE M, ROLANDO M, et al. Understanding symptoms and quality of life in patients with dry eye syndrome[J]. The Ocular Surface, 2016, 14(3): 365 – 376.

Speciation Distribution of Vitamin A from Liver of *Epinephelus drummondhayi* and Its Effect on Xerophthalmia Cell Model

ZHANG Jing^{1,2}, HUANG Wenting¹, CAO Wenhong^{1,2,*}, CHEN Zhongqin^{1,2},
ZHENG Huina^{1,2}, GAO Jialong^{1,2}, ZHANG Chaohua^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology/National Research and Development Branch Center for Shellfish Processing (Zhanjiang)/Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety/Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center of Seafood/Guangdong Province Engineering Laboratory for Marine Biological Products/ Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Product of Guangdong Higher Education Institution, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;
2. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: To investigate the speciation distribution characteristics of natural vitamin A in the liver of *Epinephelus drummondhayi* and its difference in improve effects on xerophthalmia compared with synthetic vitamin A, the saponification method combined with reverse-phase chromatography was used to determine the vitamin A components in the liver lipids of *Epinephelus drummondhayi*. F3, a fraction rich in natural vitamin A palmitate, was isolated from the neutral lipids. Using synthetic vitamin A palmitate as a control, the effects of natural vitamin A palmitate from *Epinephelus drummondhayi* liver on a benzalkonium chloride-induced xerophthalmia cell model and their differences were explored. The experiment included normal corneal epithelial cell group (NC), xerophthalmia cell model group (MC), F3 experimental group [low dose (LF3), medium dose (MF3), and high dose (HF3)], and vitamin A palmitate standard control group [low dose (LVAP), medium dose (MVAP), and high dose (HVAP)]. CCK-8 method was used to assess cell viability and toxicity, and real-time quantitative PCR was used to measure the gene expression of inflammatory factors (IL-6, IL-1 β , and TNF- α) in cells. The results showed that 99.57% of vitamin A in *Epinephelus drummondhayi* liver existed in a bound form, mainly as vitamin A palmitate, with the highest content in the liver neutral lipids. The F3 fraction, isolated and purified from the neutral lipids, contained natural vitamin A palmitate, and when the mass concentration of F3 exceeded 286.00 pg/mL, the cell viability of HCE-T cells significantly decreased. Both F3 and synthetic vitamin A palmitate significantly improved the cell survival rate induced by benzalkonium chloride in the xerophthalmia cell model, reduced cell apoptosis, and the cell viability of the low and medium dose F3 group was higher than that of the high dose F3 group and all doses of synthetic vitamin A palmitate group. In terms of the relative expression level of interleukin (IL-6), the low and medium dose F3 group and the low dose synthetic vitamin A palmitate group were significantly higher than the medium and high dose synthetic vitamin A palmitate group ($P < 0.05$). In the relative expression level of tumor necrosis factor- α (TNF- α), the low, medium, and high dose F3 groups were significantly lower than the low dose synthetic vitamin A palmitate group ($P < 0.05$). Both F3 and synthetic vitamin A palmitate could downregulate the gene expression of IL-6 and TNF- α in HCE-T cells of the benzalkonium chloride-induced xerophthalmia cell model ($P < 0.05$), alleviating the inflammation caused by xerophthalmia.

Keywords: *Epinephelus drummondhayi*; vitamin A; speciation distribution; xerophthalmia; cell model

(责任编辑:叶红波)