DOI号: 10.3724/SP.J.0000.2008.40501

鲫鱼、草鱼离体肠道利用酪氨酸和脯氨酸合成蛋白质与脂肪的研究

白 燕[1] 叶元土[2] 王高学[3]
(1. 辽宁医学院动物科学技术学院, 锦州 121001; 2. 苏州大学, 苏州 215006; 3. 西北农林科技大学, 杨凌 712100)

摘要: 该试验采用同位素示踪技术和肠道离体灌流模型分别测定了鲫鱼、草鱼肠粘膜中结合在蛋白质与脂类中的酪氨酸、脯氨酸的量。结果表明: 用于合成脂肪的酪氨酸和脯氨酸比例在鲫鱼和草鱼均极显著高于用于合成蛋白质的相应氨基酸比例($P<0.01$), 但草鱼用于合成脂肪的酪氨酸和脯氨酸比例均显著高于鲫鱼($P<0.05$)。在酪氨酸各浓度组中鲫鱼肠道利用其合成蛋白质与脂肪的绝对量几乎都高于草鱼, 但从相对量上看, 鲫鱼利用酪氨酸合成蛋白质和脂肪的能力显著不如草鱼($P<0.05$)。对于每一浓度组的脯氨酸, 鲫鱼肠道利用其合成蛋白质的绝对量和相对量均显著高于草鱼($P<0.05$), 说明鲫鱼利用脯氨酸合成蛋白质的能力显著高于草鱼; 但从相对量来看, 除了 1.0 mmol/L试验组外, 鲫鱼利用脯氨酸合成脂肪的能力显著低于草鱼($P<0.05$)。

关键词: 鲫鱼; 草鱼; 离体肠道; L酪氨酸(L-Tyr); L脯氨酸(L-Pro); 蛋白质合成; 脂肪合成
中图分类号: S963.73+1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)04-0501-08

近期的研究结果发现肠道粘膜是更新很快的组织, 也是体内代谢最为活跃的组织, 且肠道主要以氨基酸如谷氨酰胺作为能量物质的原料而不是葡萄糖[1—3]。因此, 肠道将从日粮吸收来的(或从血液来的)氨基酸部分用于肠道组织自身的氧化分解或蛋白质、脂肪等物质合成[4], 而肠道粘膜对日粮来源的氨基酸的消耗和利用就可能影响到日粮氨基酸的平衡和氨基酸营养价值的充分发挥。本文主要从鲫鱼、草鱼肠道对吸收的氨基酸利用角度出发, 研究鱼类肠道利用吸收的氨基酸合成蛋白质和脂肪的初步情况, 从而为配制氨基酸平衡的理想蛋白质饲料提供必要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验用鱼 池塘养殖草鱼种, 体重 85.5—155.3 g平均体重(120.4±34.9) g鲫鱼为市售商品鱼种, 体重 75.5—116.7 g平均体重(96.1±20.6) g。试验期间暂养于室内循环养殖系统中, 按照 2%的投饲率投饲粗蛋白质 30%的配合饲料。试验前 24 h停止投喂饲料。

1.1.2 试验氨基酸溶液 试验氨基酸选用 L脯氨酸、L酪氨酸, 由上海生化试剂厂生产, 分析纯。放射性氨基酸为 L-[4,5-^{3}H]酪氨酸、L-[2,3,4,5-^{3}H]脯氨酸, 放射性浓度均为 0.5 mCi/mL。试验氨基酸浓度依据其溶解度并参考文献[5]将脯氨酸设置为 10.0 mmol/L、5.0 mmol/L和 1.0 mmol/L, 酪氨酸设置为 2.5 mmol/L、1.5 mmol/L和 0.5 mmol/L。放射性氨基酸的用量为取 100 μL放入相应的 100 mL试验氨基酸溶液中。各种浓度的氨基酸均用生理盐溶液进行配制, 生理盐溶液的配制配方: NaCl 0.65%、无水 $NaHCO_3$ 0.02%、KCl 0.02%、无水 $CaCl_2$ 0.02%。氨基酸溶液采用先配制高浓度的母液进行短期保存, 使用时根据需要进行逐级稀释的方法配制。

为防止微生物干扰, 所使用的氨基酸溶液中按青霉素和硫酸链霉素各 150 IU/mL的浓度加入抗生素(简称"双抗")。

1.1.3 试验装置及模型 参考文献[6]建立的鱼类肠道离体灌流试验模型和生化恒温培育箱进行试验, 将试验氨基酸从离体肠道内灌流, 在灌流 40 min时定量测定通过肠道吸收转运到肠道外和留存于肠道内的试验氨基酸的量。灌注每种试验氨基酸分别单独进行, 灌流速度用衡流泵控制在 2.0 mL/min, 根据试验结果每个试验重复至少 2次以上得到稳定可

收稿日期: 2007-10-08; 修订日期: 2008-02-28
基金项目: 苏州大学 211工程项目(Q4114021)资助
作者简介: 白燕(1973—), 女, 辽宁昌图人; 讲师; 主要从事鱼类营养与饲料学的研究与教学。E-mail: yan_bai@cnpc.com.cn
?通讯作者: 叶元土(1964—), 男, 四川广安人; 教授; 主要从事鱼类营养与饲料学的研究。E-mail: yeyuantu@pub.sz.jsinfo.net

靠的数据。由氧气瓶从灌流开始前 5 min就向培养液中充入医用氧气以保持肠道组织活性。

1.1.4 离体肠道的制备 将鲫鱼、草鱼称重后捣毁脊髓处死,立即解剖取出肠道,在生理盐溶液浸渍下剔除肠道外壁上的脂肪、血污等,在灌流系统中用生理盐溶液冲洗干净肠道内容物,置于生理盐溶液中待用。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 在灌流 40 min时测定通过肠道吸收并转运到肠道外的试验氨基酸的量;对肠道组织蛋白质、脂肪进行分离纯化,并测定肠道组织内游离试验氨基酸放射性强度,分别计算结合在蛋白质、脂肪中的试验氨基酸的量和游离形式的试验氨基酸的量;以这 4种存在方式的试验氨基酸量作为总量按照百分比进行比较分析以探讨肠道组织对试验氨基酸的利用比例。按照同位素稀释方法通过测量的 cpm(每分钟的计数次数)值计算各样品中试验氨基酸的量。

1.2.2 肠道内脂肪结合的试验氨基酸量的测定方法 灌流持续 40 min时迅速将灌流液换为生理盐溶液,以衡流泵快速(速度档 50)灌流、冲洗肠道 5 min后,迅速取下肠道用生理盐溶液冲洗肠道外壁,滤纸吸干水分并用镊子将肠道内的液体从肠道两端开口处挤压出来,将肠道精确称重后用液氮冷冻 5 min以终止蛋白质、脂肪合成反应及其他化学反应。

待肠道解冻后用剪刀剪碎肠道、混合均匀,定量取新鲜肠道样品 150—200 mg加入 2 mL C-M液(三氯甲烷∶甲醇为 2∶1),浸泡 24 h,然后将 C-M液加至 4 mL以 3000 r/min离心 10 min,将上清液转入另一离心管,在残渣中再加入 2 mL C-M液,再离心一次,上清液仍转入同一离心管。在盛上清液的离心管中取 100 μL于闪烁瓶中用于脂肪结合试验氨基酸放射性强度的测定。每个测定样品作 3个平行,取其平均值。

1.2.3 肠道内游离试验氨基酸量测定方法 将剩余的新鲜肠道精确称量,按照样品重量 5倍体积加入 2%的 $HClO_4$溶液,玻璃匀浆器匀浆,以 10000 r/min离心 20 min,取上清液 100 μL于闪烁瓶中用于游离试验氨基酸放射性强度的测定。每个测定样品作 3个平行,取其平均值。

1.2.4 肠道内蛋白质结合的试验氨基酸量的测定方法 取上述离心样品,弃去上清液、保留沉淀,用 10 mL 2%的 $HClO_4$溶液洗涤沉淀 1次(即离心)。取 10 mL 0.3 mol/L的 NaOH于含蛋白质沉淀的离心管中,搅匀,置 70℃恒温使沉淀溶解,6000 r/min离心 15 min,将上清液转入另一个离心管中,弃去沉淀。在上清液中加入 $HClO_4$使其终浓度达到 2%以沉淀蛋白质,以 10000 r/min离心 20 min,弃去上清液,保留沉淀。先后用无水乙醇、无水乙醚、丙酮各 10 mL洗涤沉淀 3次。离心均在 2—4℃、10000 r/min离心 20 min。将纯化的蛋白质在 70℃烘干。精确称重干的肠道蛋白质置于试管中,加入样品重量 10倍体积的浓 $HClO_4$,在 70℃消化完全。再加入样品重量 10倍体积的 H_2O_2在 70℃褪色至无色透明。冷却后定量取消化液 100 μL于闪烁瓶中测量蛋白质的放射强度,设 3个平行,取平均值。

1.2.5 闪烁液的配制及放射性强度测定 闪烁液的配制参考文献[7]方法修改,精确称取 PPO 2.5 g POPOP 0.25 g用二甲苯溶解,加入 Triton X-100 150 mL(视样品水分多少可以适当调整用量),再用二甲苯定容到 500 mL。每个闪烁瓶中取闪烁液 5 mL。

放射性强度用 SN-6930液体闪烁计数器进行测量,得到 cpm值。

1.3 数据的表示与处理 由于鱼体大小差异使肠道长度和重量有一定的差异,为减小试验误差,统一比较标准,我们把鲫鱼、草鱼肠道对试验氨基酸的跨壁运输量表示为单位肠道组织重量(g)对试验氨基酸的跨壁运输量,计算公式如下:

跨膜转运量(μmol/g)=(培养液 cpm值−空白培养液 cpm值)×灌流试验氨基酸浓度(mmol/L)×培养液体积(L)×1000/(灌流液 cpm值×肠道重量(g))。

数据统计分析采用 Dumcan氏多重比较法进行差异显著性检验,$P<0.05$为存在显著性差异,$P<0.01$为存在极显著性差异。

2 结 果

2.1 肠道对氨基酸的跨膜转运比例

在本试验条件下,肠道对吸收的试验氨基酸一部分保留在肠道内,另一部分则通过肠道转运到肠道外的培养液中。分析表 1和表 2中留存在肠道内和转运到肠道外的试验氨基酸的比例可以获得很有价值的结果。对于 Tyr和 Pro这两种相应浓度的试验氨基酸,草鱼比鲫鱼留存在肠道内的比例均极显著偏高($P<0.01$),即吸收转运到肠道外的比例比鲫鱼极显著偏低。此外,除了鲫鱼脯氨酸试验组,鲫鱼酪氨酸试验组和草鱼酪氨酸、脯氨酸试验组中两

个高浓度组转运到肠道外的氨基酸比例均差别很小, 而且, 随着氨基酸灌流浓度的降低, 跨膜转运的比例越来越高, 低浓度组的比例显著高于其他两高浓度组 ($P<0.05$)。

表 1　鲫鱼肠道对试验氨基酸的吸收与转运比例

Tab. 1　The propotions of absorption and transportation of amino acids used in the test across the intestines of C. auratus

试验氨基酸及其浓度 Experimental amino acid (AA) and its concentration (mmol/L)		跨膜转运量 Transmural flux across intestines (μmol/g)	肠道保留量 AA quantity retained in gut (μmol/g)	单位重量肠道总吸收量 AA total absorption by gut of 1 g (μmol/g)	总吸收量 AA total absorption by gut (μmol)	占吸收总量的比率 The AA ratio taking up total absorption by gut (%)	
						肠道内 AA ratio retained in gut	跨膜转运 AA transmural ratio across intestines
Tyr	2.5	9.845±0.104	8.696±0.067	18.541±0.037	5.40	46.89	53.11
	1.5	3.894±0.010	2.619±0.007	7.512±0.008	2.77	46.88	53.12
	0.5	1.763±0.005	1.245±0.002	3.008±0.007	0.98	41.40	58.60
Pro	10	19.775±0.564	26.398±0.363	46.173±0.927	14.74	57.17	42.83
	5	9.890±0.153	6.959±0.110	16.848±0.456	6.10	41.30	58.70
	1	2.028±0.013	1.237±0.004	3.266±0.005	0.62	37.89	62.11

表 2　草鱼肠道对试验氨基酸的吸收与转运比例

Tab. 2　The propotions of absorption and transportation of amino acids used in the test across the intestines of Grass carp

试验氨基酸及其浓度 Experimental amino acid (AA) and its concentration (mmol/L)		跨膜转运量 Transmural flux across intestines (μmol/g)	肠道保留量 AA quantity retained in gut (μmol/g)	单位重量肠道总吸收量 AA total absorption by gut of 1 g (μmol/g)	总吸收量 AA total absorption by gut (μmol)	占吸收总量的比率 The AA ratio taking up total absorption by gut (%)	
						肠道内 AA ratio retained in gut	跨膜转运 AA transmural ratio across intestines
Tyr	2.5	1.348±0.065	4.626±0.011	5.974±0.054	3.66	77.44	22.56
	1.5	0.705±0.009	2.128±0.000	2.833±0.009	2.885	75.12	24.88
	0.5	0.401±0.008	0.520±0.002	0.926±0.006	1.221	56.18	43.82
Pro	10	6.942±0.232	21.986±0.109	28.928±0.341	36.87	76.00	24.00
	5	7.381±0.083	22.980±0.494	30.361±0.424	32.58	75.69	24.31
	1	0.465±0.001	1.213±0.003	1.678±0.001	1.18	72.31	27.69

2.2　肠道对吸收的试验氨基酸的利用比例

为了分析肠道对试验氨基酸的利用情况, 将肠道内游离的试验氨基酸及蛋白质、脂肪中结合的试验氨基酸与吸收转运到肠道外培养液中的试验氨基酸作为总量作成分配比例图 (图 1、图 2)。

由图 1可知, 对于鲫鱼来说, 在不同的 Tyr浓度组中, 肠道蛋白质结合的 Tyr比例没有显著性的变化 ($P>0.05$); 肠道脂肪结合的 Tyr氨基酸比例以 1.5 mmol/L浓度组最高 (40.03%), 三组之间有显著性差异 ($P<0.05$)。

对于 Pro, 鲫鱼肠道蛋白质结合的 Pro以 5.0 mmol/L浓度组比例最低 (1.73%) 其他两组差异不显著, 但合成蛋白质的比例均显著高于 Tyr相应的试验组 ($P<0.05$); 肠道脂肪结合的 Pro呈现出随浓度逐渐降低的正相关变化趋势; 肠道内游离的试验氨基酸所占比例呈现出逐渐降低的与试验氨基酸浓度正相关变化趋势。

由图 2可知, 对于草鱼来说, 肠道蛋白质结合的 Tyr比例以 0.5 mmol/L浓度组的比例最高 (3.05%), 各组间的比例差异显著 ($P<0.05$)。同鲫鱼相比, 草鱼肠道用于合成蛋白质的 Tyr比例显著高于鲫鱼 ($P<0.05$)。草鱼肠道脂肪结合的 Tyr比例以 0.5 mmol/L浓度组比例最低 (45.72%) 与其他两组差异极显著, 而其他两组间差异不显著, 且均显著高于鲫鱼相应的浓度组。

由图 2还可知, 草鱼肠道蛋白质结合的 Pro比例以 5.0 mmol/L浓度组比例最高 (0.87%), 与其他两组差异不显著 ($P>0.05$), 但合成蛋白质的比例显著低于鲫鱼相应浓度组。草鱼肠道脂肪结合的 Pro比例以 1.0 mmol/L浓度组比例最低 (44.70%), 与其他两组差异极显著, 而其他两组间差异不显著, 且均极显著高于鲫鱼相应的浓度组 ($P<0.01$)。

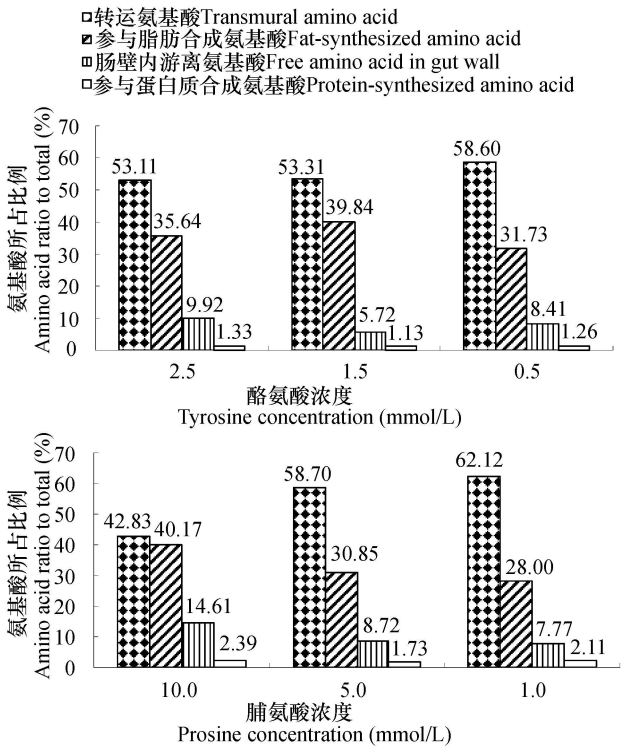

图 1 鲫鱼肠道对试验氨基酸吸收利用的比例

Fig. 1 The percentage of the experimental amino acids absorbed and utilized by the intestines of *C. auratus*

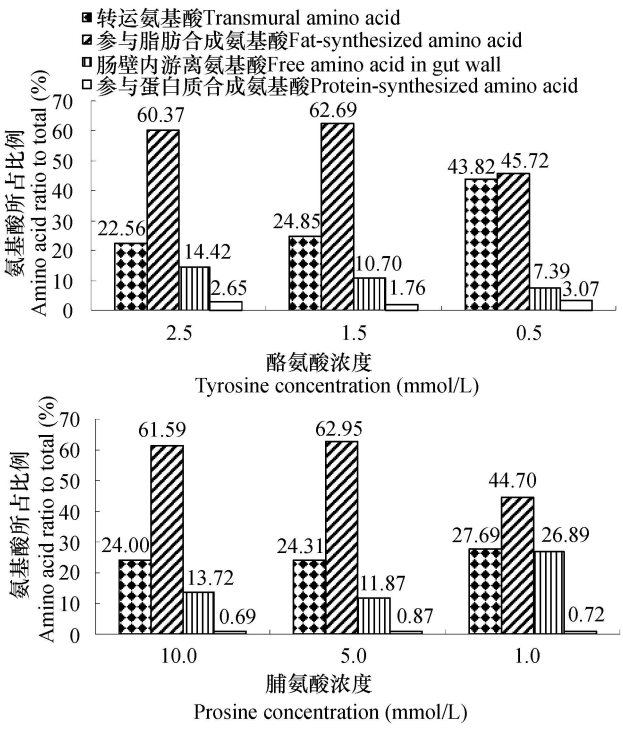

图 2 草鱼肠道对试验氨基酸吸收利用的比例

Fig. 2 The percentage of the experimental amino acids absorbed and utilized by the intestines of Grass carp

2.3 肠道内试验氨基酸的各种存在形式之间的比例关系

前面的结果显示出草鱼、鲫鱼肠道在灌流试验氨基酸浓度逐渐增加或下降时，不同浓度组 Pro和 Tyr的各种存在形式有一个绝对比例，这个比例对于鱼类肠道吸收、利用氨基酸情况能说明一定的问题。为了进一步分析肠道对实验氨基酸的利用情况，将肠道内蛋白质、脂肪各自结合的试验氨基酸及肠道中游离的试验氨基酸之间的相对比例列于表 3内。

由表 3可以看出，鲫鱼肠道随着 Tyr Pro浓度及草鱼肠道随着 Tyr浓度的逐渐下降，肠道内蛋白质、脂肪结合的试验氨基酸的绝对量也呈逐渐减少的趋势，唯独草鱼 5.0 mmol/L Pro试验组肠道内蛋白质、脂肪结合的试验氨基酸的绝对量高于其他两试验组。从绝对量上来看，鲫鱼肠道蛋白质、脂肪结合的 Tyr的量基本上均显著高于草鱼结合的量（$P<0.05$）；鲫鱼除了 5.0 mmol/L Pro试验组肠道内脂肪结合的试验氨基酸的绝对量显著低于草鱼结合的量外，其他浓度 Pro试验组肠道内蛋白质、脂肪结合的试验氨基酸的绝对量均高于草鱼相应浓度试验组。

从相对量来看，对于不同浓度的 Tyr，鲫鱼肠道 P/Free AA比值以 1.5 mmol/L试验组最高，而 0.5 mmol/L试验组也高于 2.5 mmol/L试验组；草鱼此比值随 Tyr浓度的减小而逐渐增加，尤以 0.5 mmol/L试验组极显著高于其他浓度组（$P<0.01$）；鲫鱼除了 1.5 mmol/L试验组肠道内 P/Free AA略高于草鱼外，其他两组均显著低于草鱼。关于 P/F比值，鲫鱼和草鱼对于不同浓度的 Tyr试验组，其变化情况很相似，即都以 1.5 mmol/L试验组的比值最小，其次是 2.5 mmol/L试验组，比值最高的是 0.5 mmol/L试验组；不难看出，草鱼三个 Tyr浓度组的 P/F比值均显著高于鲫鱼（$P<0.05$），而且以 0.5 mmol/L试验组此比值极显著高于鲫鱼（$P<0.01$）。关于 Free AA/F比值，草鱼随 Tyr浓度的下降而呈下降趋势，而鲫鱼以 1.5 mmol/L试验组比值最小，其他两试验组比值与浓度成正相关并且除了 1.5 mmol/L试验组外，鲫鱼其他两组此比值均极显著高于草鱼相应试验组（$P<0.01$）。

对于不同浓度的 Pro，从相对量上来看，鲫鱼肠道 P/Free AA比值随着 Pro浓度的减小而逐渐增加，呈现出与试验氨基酸浓度负相关变化趋势，尤其是 1.0 mmol/L试验组与前两组差异显著（$P<0.05$）；与鲫鱼不同，草鱼以 5.0 mmol/L试验组的比

表 3　鲫鱼、草鱼肠道内各种存在形式的试验氨基酸之间的比例

Tab. 3　Percentages among experimental amino acids existing in different way in intestines of C. auratus and Grass carp

试验鱼类 Fishes used for experiment	试验氨基酸及其浓度 Experimental amino acid (AA) and its concentration (mmol/L)		蛋白质/游离氨基酸 P/Free AA (protein/free amino acid) (%)	蛋白质/脂肪 P/F (protein/fat) (%)	游离氨基酸/脂肪 Free AA/F (free amino acid/fat) (%)	蛋白质结合的试验氨基酸的量 Experimental amino acids bound in protein (μmol/g fresh intestines)	脂肪结合的试验氨基酸的量 Experimental amino acids bound in fat (μmol/g fresh intestines)
鲫鱼 C. auratus	Tyr	2.5	13.47	3.75	29.36	0.247	6.609
		1.5	23.02	2.77	13.07	0.082	2.970
		0.5	15.04	3.99	26.51	0.038	0.954
	Pro	10.0	16.68	5.87	36.36	1.104	18.549
		5.0	19.88	5.62	28.29	0.292	5.196
		1.0	27.18	7.55	27.76	0.069	0.914
草鱼 Grass carp	Tyr	2.5	18.37	4.38	23.88	0.158	3.607
		1.5	22.46	3.20	17.01	0.050	1.776
		0.5	41.54	6.72	16.17	0.028	0.423
	Pro	10.0	5.03	1.24	22.29	0.199	17.817
		5.0	7.30	1.30	18.88	0.263	19.112
		1.0	2.66	1.60	60.14	0.012	0.750

值最高，1.0 mmol/L试验组的比值最低；从表 3可看出，鲫鱼 P/Free AA比值极显著高于草鱼（$P<0.01$）。关于 P/F比值，鲫鱼和草鱼对于不同浓度的 Pro试验组，其变化情况很相似，即都以 1.0 mmol/L试验组的比值最高，前两组比值差异甚小，但鲫鱼此比值极显著高于草鱼（$P<0.01$）。关于 Free AA/F比值，鲫鱼随 Pro浓度的下降而呈下降趋势，草鱼总的趋势同鲫鱼类似，但不同的是以 1.0 mmol/L试验组比值最高且极显著高于鲫鱼相应浓度组比值，而其他两试验组，此比值均显著低于鲫鱼。

此外，将每种鱼 Pro和 Tyr之间合成蛋白质、脂肪的情况相比较，对于鲫鱼，Pro高、中、低三个浓度组的 P/Free AA、P/F、Free AA/F比值基本上高于 Tyr相应高、中、低三个浓度组比值，只是 Pro 5.0 mmol/L试验组的 P/Free AA比值低于 Tyr 1.5 mmol/L试验组比值。因此，无论从绝对量上看还是从相对量上看，鲫鱼利用 Pro合成蛋白质和脂肪的能力均显著高于 Tyr。而草鱼与鲫鱼情况正好相反，Pro高、中、低三个浓度组的 P/Free AA、P/F、Free AA/F比值基本上低于 Tyr相应高、中、低三个浓度组比值，只是 Pro 5.0 mmol/L和 1.0 mmol/L试验组的 Free AA/F比值高于 Tyr 1.5 mmol/L和 0.5 mmol/L试验组比值。从绝对量上看，草鱼肠道蛋白质结合 Pro的量要高于 Tyr，尤其是肠道脂肪结合 Pro的量要显著高于 Tyr，但从相对量上看，草鱼利用游离 Pro合成蛋白质的能力显著低于 Tyr，利用游离 Pro合成脂肪的能力基本上也低于 Tyr。

3　讨　论

3.1　转运到肠道外的氨基酸比例与氨基酸灌流浓度的关系

从表 1和表 2可以看出，鲫鱼、草鱼肠道随着灌流氨基酸浓度的降低，吸收运输到肠道外的比例却在增加，而保留在肠道内的比例在减少，这与邝雪梅等[8]的结果较一致。值得注意的是，所有低浓度组吸收运输到肠道外的比例均显著高于前两高浓度组，而前两高浓度组吸收运输到肠道外的比例大多较为接近。这种现象的出现可解释为，随着肠道内外源氨基酸量的逐渐减少，鱼类机体为了维持生长、发育或其他重要脏器功能的正常而使保留在肠道内的氨基酸比例逐渐减少，从而使转运到其他组织器官中的比例逐渐增多以供其利用，这也是机体对外界刺激的一种保护性反应。我们还注意到对于 Tyr和 Pro这两种相应浓度的试验氨基酸，草鱼比鲫鱼留存在肠道内的比例均显著偏高，也就是吸收运输到肠道外的比例草鱼比鲫鱼显著偏低，这一区别也反映了鱼类之间不同的遗传特性和代谢机制。

Stoll et al.[9]研究发现，食糜中的脯氨酸在通过仔猪肠粘膜时有 38%被截留，因此饲料中大量的脯氨酸不能被肠外组织利用。本试验中，草鱼、鲫鱼肠道对酪氨酸和脯氨酸也有较大的留存比例，而且两种氨基酸被截留的比例差异很大，所以在确定水生动物理想蛋白质的氨基酸平衡模式时，应考虑到这些因素的影响。

3.2 肠道对吸收的氨基酸的利用

近 20年的研究表明,必需氨基酸和非必需氨基酸在小肠粘膜内广泛参与代谢。据报道,哺乳仔猪体内被摄取的日粮赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸和苏氨酸等必需氨基酸有 1/3被小肠粘膜代谢,其中小于 20%被用于肠粘蛋白合成,哺乳仔猪日粮丝氨酸和甘氨酸的 40%和 50%留存于肠道内,其中少于 20%用于合成肠蛋白质[9];在成年人,膳食精氨酸的 38%在肠道内留存,其中绝大多数被小肠粘膜利用[10],这些结果表明日粮精氨酸有相当部分不被肠外组织利用。有研究表明,0—58日龄仔猪和鼠小肠上皮细胞内存在相当高活性的线粒体脯氨酸氧化酶,由脯氨酸合成了较大量的鸟氨酸、瓜氨酸和精氨酸,占代谢脯氨酸的 80%—90%[11];类似的研究也表明,食糜中的脯氨酸在通过仔猪肠粘膜时有 38%被截留,因此饲料中大量的脯氨酸不能被肠外组织利用[8],这样肠粘膜可能在启动脯氨酸在体内的降解中起了主要作用。

本试验结果表明,鲫鱼、草鱼肠道组织在吸收肠道灌流的氨基酸溶液时,依然在进行着活跃的蛋白质、脂肪合成代谢,且其代谢强度大多与氨基酸浓度成正相关变化关系。即随着灌流的试验,氨基酸浓度的增加其肠道蛋白质、脂肪结合的试验氨基酸的绝对量也随之增加,也就是说新合成的蛋白质、脂肪量也随之增加。其中例外的是草鱼以 Pro 5.0 mmol/L试验组合成蛋白质和脂肪的量最多,但与高浓度 10.0 mmol/L组差异不显著。

本试验各试验氨基酸浓度组中鲫鱼肠道蛋白质结合 Tyr的绝对量均高于草鱼,尤其是脂肪结合的 Tyr的绝对量显著高于草鱼。但从相对量上看,鲫鱼利用游离 Tyr合成蛋白质和脂肪的能力不如草鱼,这一情况也为柱形图 1和柱形图 2中 Tyr结合在蛋白质、脂肪中的绝对比例所印证。对于 Pro,鲫鱼肠道蛋白质结合的绝对量和相对量均高于草鱼,说明鲫鱼利用 Pro合成蛋白质的能力高于草鱼,而鲫鱼利用 Pro合成脂肪的能力大体上不如草鱼。总之,这一氨基酸的利用特点可能是由不同鱼类对同一氨基酸的代谢特性所决定的。

另一特点是,从柱形图 2中可看出,草鱼 Tyr 0.5 mmol/L组肠蛋白质结合的试验氨基酸的比例(3.07%)高于 2.5 mmol/L(2.65%)和 1.5 mmol/L(1.76%)试验组,而肠道脂肪结合的试验 Tyr以 0.5 mmol/L组(45.72%)远低于前两组,且前两组差异不显著(1.5 mmol/L为 62.69%, 2.5 mmol/L为 60.37%)。从柱形图 1中可看出,鲫鱼情况类似于草鱼,Tyr 0.5 mmol/L组肠蛋白质结合的试验氨基酸比例(1.26%)虽不高于 2.5 mmol/L(1.33%)但二者差异很小,以 1.5 mmol/L(1.13%)试验组比例最低,肠道脂肪结合的试验 Tyr也以 0.5 mmol/L组(31.73%)最低,与前两组差异显著。这种状况同样也适用于鲫鱼、草鱼对 Pro的利用。这一结果可能表明在外源氨基酸逐渐减少的情况下,肠道利用氨基酸合成蛋白质的机能增强,同时还会自发调节抑制肠道脂肪的合成,以保证饲料氨基酸流向肠道重要物质的合成。

还有,对于每一种鱼来讲,由图 1、图 2以及表 3所示,无论从绝对量上看还是从相对量上看,鲫鱼利用 Pro合成蛋白质和脂肪的能力均显著高于 Tyr;从相对量上看,草鱼利用游离 Pro合成蛋白质的能力显著低于 Tyr,利用游离 Pro合成脂肪的能力基本上也低于 Tyr。鲫鱼和草鱼这一迥然相异的特点可能是由不同氨基酸与不同鱼类之间的生物学特性所决定的。

消化道具有相当高的蛋白质合成速度,在常见的各种哺乳动物,生长家畜的蛋白质周转速度至少是外周体组织的 10倍,在成年动物这一差别则高达 30倍。在消化道合成的蛋白质主要用于分泌,在分泌的蛋白质中主要是粘蛋白,而肠粘蛋白的核心部分富含半胱氨酸、脯氨酸、苏氨酸和丝氨酸,后三者构成了粘蛋白肽链的重复片断。粘蛋白具有保护性生理机能,在肠粘膜受到损伤或发生炎症时分泌量增加,使消化道代谢的氨基酸增加,所以粘蛋白的大量分泌对这些氨基酸的需要量应有可测的影响[12]。同时本实验结果显示肠道灌流氨基酸有较大比例用于肠粘膜脂肪的合成,这同样会阻碍饲料氨基酸进入门脉循环供肠外组织利用,并会打破饲料原有的氨基酸平衡。因此在配制鱼类配合饲料时,应考虑肠道对饲料氨基酸的利用情况,设置一定的保险系数。本试验只是对鱼类肠道合成蛋白质和脂肪的情况做一初浅的尝试,而鱼类肠道对氨基酸具体细致的代谢情况尚需深入研究。

参考文献:

[1] Windmueller H G, Spaeth A E. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood[J]. Arch. Biochem. Biophys., 1975, **171**: 662—672

[2] Windmueller he H G, Spaeth A E. Metabolism of absorbed aspiarte asparagine and arginine by rat small intestine in vivo[J]. Arch. Biochem. Biophys., 1976, **175**: 670—676

[3] Windmueller H G. Glutamine utilization by the small intestine [J]. Adv Enzymol, 1982, 53: 201—237

[4] Sun J, Zhou A G. Intestinal mucosal amino acid catabolism and its implications[J]. Journal of Sichuan Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2000, 14(2): 47—52 [苏宁, 周安国. 肠粘膜中氨基酸的分解代谢意义. 四川畜牧兽医学院学报, 2000, 14(2): 47—52]

[5] Ye Y T, Lin S M, Luo L, et al. The transmural fluxes of 10 essential amino acids by the intestines of Grass carp (Ctenopharyngodon idellus) in vitro[J]. Journal of Fishery Science of China, 2003, 10(4): 311—317 [叶元土, 林仕梅, 罗莉, 等. 草鱼肠道对10种必需氨基酸的吸收. 中国水产科学, 2003, 10(4): 311—317]

[6] Ye Y T, Cai C F, Lin S M. The perfusion technique of the fish intestine in vitro[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2002, 29(6): 26—27 [叶元土, 蔡春芳, 林仕梅, 等. 鱼类肠道离体灌流试验系统. 中国畜牧兽医, 2002, 29(6): 26—27]

[7] Wu G Y, Pan H Z, Wu H. Data enchiridion of biochemistry and biomolecule[M]. Beijing: Science Press, 2002. 112—113 [吴冠芸, 潘华珍, 吴翠. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册. 北京: 科学出版社. 2002. 112—113]

[8] Kuang X M, Ye Y T, Cai C F, et al. Study on the absorption and utilization of L-Leucine and L-Tyrosine by the intestine of Grass carp (Ctenopharyngodon Idellus) in vitro[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(4): 424—429 [邝雪梅, 叶元土, 蔡春芳, 等. 离体草鱼肠道对亮氨酸和酪氨酸的吸收与利用. 水生生物学报, 2005, 29(4): 424—429]

[9] Stoll B, Henry J, Reeds P J, et al. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets[J]. J Nutr, 1998, 128: 606—614

[10] Castillo L, Derojas T C, Chapman T E, et al. Splanchnic metabolism of dietary arginine in relation to nitric oxide synthesis in normal adult man[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90: 193—197

[11] Wu G. Synthesis of citrulline and arginine from proline in enterocytes of postnatal pigs[J]. Am J Physiol, 1997, 272: 1382—1390

[12] Bertolo F, Chen C Z, G Law, et al. Threonine requirement of neonatal piglets receiving total parenteral nutrition is considerably lower than that of piglets receiving an identical diet intragastrically[J]. J Nutr, 1998, 128: 1752—1759

THE STUDIES ON PROTEIN AND FAT SYNTHESIZED FROM L-TYROSINE AND L-PROLINE BY THE INTESTINES OF C. AURATUS AND GRASS CARP IN VITRO

BAI Yan1, YE Yuan-Tu2 and WANG Gao-Xue3

(1. Animal Science and Technology College of Liaoning Medicinal College, Jinzhou 121001;
2. Suzhou University, Suzhou 215006; 3. Northwest A&F University, Yangling 712100)

Abstract: Recent researches discover that the mucous membrane of gut renews frequently and it is the main tissue which consumes energy in vivo. The energy used by the mucosa of terrestrial animal gut accounts for 20% of the total energy in the body and amino acids such as Glutamine rather than Glucose are the leading energy material utilized by intestines. Therefore, amino acids absorbed from daily ration (or from blood) are partly used for oxidative decomposition or protein synthesis by intestines itself. Thus, the utilization of essential amino acids from daily ration by the mucosa of gut may be influence the full development of nutrition value of daily ration. For the moment, a few articles which state the absorption of amino acids by intestines of aquatic animals have been delivered, but the studies in which the absorption, protein synthesis and liquid synthesis of amino acids by intestines are measured at the same time in identical conditions are few reported.

The studies were conducted to determine protein and fat synthesized from L-Tyrosine and L-Proline by the intestines of C. auratus and Grass carp in vitro by using L-[4, 5-^{3}H] Tyrosine and L-[2, 3, 4, 5-^{3}H] Proline as tracers and adopting the in-vitro perfusion technique, and then approach general laws about both amino acids absorption and utilization by aquatic animals intestines and also offer necessary theoretical basis for formulating ideal feedstuff of amino acids balance. In this experiment, the concentrations of L-Tyr are designed 0.5 mmol/L, 1.5 mmol/L and 2.5 mmol/L and the concentrations of L-Pro are 1.0 mmol/L, 5.0 mmol/L and 10.0 mmol/L respectively according to the respective solvency of the two different amino acids. Experimental amino acids are infused into the whole in-vitro gut of fishes, meantime, the flux was controlled at the invariable speed of 2.0 mL/min by pump. At the 40 min of perfusion, transmural amino acids across gut wall, free amino acids retained in gut wall, protein-synthesized amino acids and fat-synthesized amino acids are meas-

ured accurately.

The results indicated that most amino acids retained in intestines compound fat and the others partly existed freely in guts, partly used for protein synthesis and so on. The percentage of amino acids used for fat synthesis was extremely markedly higher than that of amino acids used for protein synthesis in both C. auratus and Grass carp($P<0.01$), and the percentage of amino acids for fat synthesis in Grass carp was markedly higher than that in C. auratus($P<0.05$).

Experimental results showed that the absolute amount of L-Tyr of every concentration team used for protein synthesis in C. auratus was on the whole higher than that in corresponding Grass carp, and so was especially the absolute amount for fat synthesis, but the ability of C. auratus utilizing L-Tyr for protein synthesis and fat synthesis was markedly lower than that of Grass carp($P<0.05$). To every Pro concentration team, the absolute amount and relative percentage of protein-bound L-Pro in C. auratus were all markedly higher than those in corresponding Grass carp($P<0.05$), which indicated that the ability of C. auratus using L-Pro for protein synthesis was markedly higher than that of Grass carp($P<0.05$); but the ability of C. auratus using L-Pro for fat synthesis was markedly lower than that of corresponding Grass carp except for 1.0 mmol/L experimental team($P<0.05$).

Key words: C. auratus; Grass carp; Intestines in vitro; L-Tyrsine; L-Proline; Protein-synthesis; Fat-synthesis