Shi X, Wu X Q, Zhong L, *et al*. Dietary protein and lipid levels on growth performance, hepatic antioxidant capacity, and protein-lipid meta bolism of *Pelophylax nigromaculata* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2026, 50(8): 082605. [石旭, 吴雄奇, 钟蕾, 等. 饲料蛋白质和脂肪水平对黑斑蛙生长、肝脏抗氧化能力及蛋脂代谢的影响 [J]. 水生生物学报, 2026, 50(8): 082605.]

饲料蛋白质和脂肪水平对黑斑蛙生长、肝脏抗氧化能力及蛋脂代谢的影响

石 旭 吴雄奇 钟 蕾 胡 毅 戴济鸿

(湖南农业大学水产学院, 长沙 410128)

摘要: 本研究探讨了饲料中不同蛋白质与脂肪水平对黑斑蛙(*Pelophylax nigromaculatus*)生长、肝脏抗氧化能力及蛋脂代谢的影响。设计蛋白质水平(38.5%、41%、43.5%、46%)和脂肪水平(8%、10%)的4×2交互实验, 共配制8种实验饲料, 投喂初始体重为(15.00±0.10) g的黑斑蛙幼蛙8周。实验结果表明: 41P10L组黑斑蛙增重率最高, 但与38.5P10L、41P8L组间并无显著性差异(P>0.05), 且38.5P10L组蛋白质效率最高(P<0.05); 46%蛋白质组黑斑蛙平均血清总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、白蛋白、尿素氮含量最高, 43.5%蛋白质组黑斑蛙平均血清甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇含量最高, 均显著高于38.5%蛋白组(P<0.05)。肝脏油红染色结果表明, 10%脂肪水平时黑斑蛙肝脏脂肪沉积加重, 且43.5%、46%蛋白质水平时肝脏脂肪沉积更明显(P<0.05)。46%蛋白质组血清平均谷丙转氨酶活性和谷草转氨酶活性显著高于38.5%蛋白质组(P<0.05)。肠道消化酶活性、肝脏抗氧化酶活性和丙二醛含量随着饲料蛋白质和脂肪水平的升高均呈现上升趋势。46%蛋白质组肝脏*mtor*、*s6k*表达量显著高于38.5%蛋白质组(P<0.05); 10%脂肪组*cpt1*表达量显著高于8%脂肪组(P<0.05)。综上所述, 在本实验条件下, 41%饲料蛋白质水平下虽然能够获得更高的增重率, 但会导致蛋白质效率降低, 43.5%与46%蛋白质水平则更易引起肝脏脂肪沉积加重和肝脏损伤。综合生长、蛋白质利用效率及肝脏健康等关键指标, 黑斑蛙饲料的适宜蛋白质水平为38.5%, 脂肪水平为10%。

关键词: 饲料蛋白质; 饲料脂肪; 生长性能; 抗氧化能力; 蛋脂代谢; 黑斑蛙

中图分类号: S966.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2026)08-082605-12

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2025.0459 CSTR: 32229.14.SSSWXB.2025.0459

蛋白质和脂肪是水产动物饲料中的主要营养物质[1]。当蛋白质供应不足时, 会导致水产动物生长缓慢, 进而影响养殖经济效益。然而, 当蛋白质水平过高, 不仅会降低动物对蛋白质的利用效率, 增加肝脏等器官的代谢负担, 还会因氮排泄量增加而对环境造成污染[2]。此外, 蛋白质是饲料中价格最高的营养物质, 过高的蛋白质含量会造成原料浪费及养殖效益降低。脂肪作为一种能量密度高且成本相对低廉的营养素, 是水产动物饲料中重要的能量来源。适量的脂肪摄入不仅能促进生长, 还能提高蛋白质的利用效率, 起到蛋白质节约效应[3]。但过量的脂肪摄入同样会带来负面影响, 如导致动物免疫功能降低、生长受阻甚至导致脂肪肝等代谢疾病[4]。因此, 确定水产动物饲料中蛋白质和脂肪的适宜需求量, 对于优化对这两种营养素的利用效率、显著提高养殖经济效益、降低饲料成本和

收稿日期: 2025-12-29; **修订日期:** 2026-01-23

基金项目: 湖南省重点研发计划(2025JK2025); 黑斑蛙、黄颡鱼、甲鱼配方模型的验证以及人才培养(xczx-2024346); 芙蓉计划省企业科技创新创业团队支持计划——新瑞生物特种水产饲料研发创新创业团队资助 [Supprted by the Key Research and Development Program of Hunan Province (2025JK2025); Validation of Formula Models and Personnel Training for *Pelophylax nigromaculatus*, *Pelteobagrus fulvidraco*, and *Pelodiscus sinensis* (xczx-2024346); Hibiscus Plan Provincial Enterprise Technology Innovation and Entrepreneurship Team Support Program - Xinrui Biological Special Aquatic Feed Research and Development Innovation and Entrepreneurship Team]

作者简介: 石旭(2000—), 男, 硕士研究生; 主要从事水产动物营养与饲料研究。E-mail: sx001107@126.com

通信作者: 戴济鸿, E-mail: djhlucky@hunau.edu.cn

©The Author(s) 2026. This is an open access article under the CC-BY 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

资源浪费, 具有重要的现实意义。

黑斑蛙(*Pelophylax nigromaculatus*)隶属于蛙科侧褶蛙属, 是稻蛙生态种养模式中的特色品种, 在水产养殖和生态农业中均具有重要的应用价值。近年来, 凭借投入较少、产出较高且周期较短的优势, 黑斑蛙养殖在全国范围内发展迅速[5, 6]。不同于牛蛙等两栖动物的集约化养殖模式, 生态种养模式下黑斑蛙生存环境更贴近自然生态系统, 活动空间大, 受密度胁迫小, 其对多种营养素的吸收利用效率可能更高。关于黑斑蛙的研究, 目前主要集中于其肌肉营养成分分析、养殖、生理及遗传等领域[5—10]。然而, 国内外关于黑斑蛙营养需求的研究未见报道。因此, 迫切需要开展针对黑斑蛙营养生理的深入研究, 以确保黑斑蛙养殖业能够健康和可持续地发展。本研究旨在通过配制不同蛋白质与脂肪水平的实验饲料, 系统评估其对黑斑蛙生长性能、肝脏抗氧化能力及蛋脂代谢的影响, 不仅有望为黑斑蛙的营养需求补充理论依据, 同时也为养殖实践中制定更经济、高效且环保的饲料配方提供数据支持, 推动黑斑蛙产业的绿色发展。

1　材料与方法

1.1　实验饲料

本实验所用饲料以鱼粉、豆粕、猪肉粉、鸡肉粉、大豆浓缩蛋白等为核心蛋白原料, 豆油为主要脂肪来源。实验设计包含4个蛋白质水平与2个脂肪水平, 共配制8组实验饲料, 每组设置3个平行重复。各组饲料分别命名为 38.5P8L、38.5P10L、41P8L、41P10L、43.5P8L、43.5P10L、46P8L 及 46P10L, 其中“P”对应饲料蛋白质水平, “L”对应脂肪水平, 具体配方详见表 1。所有原料经粉碎后过60目筛, 按配方比例混合均匀, 随后加入油脂并再次搅拌至均匀, 最后加入适量水揉匀成团状, 再通过单螺杆挤压式饲料膨化机加工成直径2.0 mm的颗粒膨化饲料, 于室温下风干至水分含量约10%。将制作好的饲料保存在–20℃直至饲养实验开始使用。使用 AOAC[11]建立的标准方法评估粗蛋白和脂质含量。

1.2　饲养与管理

黑斑蛙来源于湖南益阳赫山区某黑斑蛙养殖场同一批苗种。在正式实验开始前, 将黑斑蛙放入实验用土池中暂养1周, 挑选体质健壮的黑斑蛙进行饲养实验。将2400只规格相近、健康的黑斑蛙(15.00±0.10) g随机分配到24个网箱 (1.0 m × 1.0 m × 3.0 m) 中, 每个网箱100只黑斑蛙。每种饲料随机分配给同一个处理3个网箱的蛙。每天投喂2次(6:30和17:00) 投喂量为各处理组黑斑蛙体重的3%—5%, 喂食45—60min后收集残饵并称重, 实验周期56d, 实验期间, 水温为27—31℃、亚硝酸盐含量低于0.005 mg/L、氨氮含量低于0.5 mg/L、pH 7.8—8.2。本实验方案经湖南农业大学生物伦理委员会批准(2025121), 实验过程中严格遵守湖南农业大学伦理规范。

1.3　样本采集及指标测定

在养殖实验周期结束时, 所有黑斑蛙均禁食24h。随后对每个网箱内的黑斑蛙进行计数、称重及生长指标测量。随后, 从每个网箱中选取3只黑斑蛙进行毁髓处理, 待其完全丧失活动能力后进行后续操作。采用1 mL无菌注射器, 通过围心腔穿刺法采集血液样本, 将采集的血液混合后移入2.0 mL无菌离心管, 于4℃环境静置过夜, 随后离心并分离出上层血清, 存放于–80℃冰箱中备用, 以备后续血清生化指标的测定。对抽血后的黑斑蛙进行解剖, 称取其内脏、肝脏及整个腿部的重量, 以便计算肝体比、脏体比和腿体比等形体指标。每个网箱另取3只黑斑蛙, 摘取肝脏与肠道组织放入1.5 mL离心管, 随即置于–80℃冰箱保存, 供后续酶活性及基因表达测定使用。小心截取肝尖部分, 放入盛有4%中性甲醛固定液的10 mL离心管中, 用于肝脏组织切片的制作与观察。

生长性能指标

存活率(SR, %)=(黑斑蛙终末数量/黑斑蛙初始数量)×100

增重率(WGR, %)=[(黑斑蛙终末平均体重–黑斑蛙初始平均体重)/初始平均体重]×100

饲料系数(FCR)=总投喂饲料量/总增重

蛋白质效率(PER)=总增重/(总投喂饲料量×饲料粗蛋白质含量)

肥满度(CF, g/cm^3)=(体重/体长^3)×100

肝体比(HSI)=(肝脏重量/体重)×100

脏体比(VSI)=(内脏重量/体重)×100

腿体比(LSI) =(腿部重量/体重)×100

肠道消化酶活性测定　在黑斑蛙肠道样品解冻后, 精确称取组织, 按重量(g)与匀浆培养基(mL)的比例为1∶9进行匀浆处理; 随后离心收集上清液用于后续测定。使用Thermo-1510型酶标仪测定黑斑蛙肠道中脂肪酶(LPS, lipase, A054-2-1)、胰蛋白酶(TPS, trypsin, A080-2-2)、淀粉酶(AMS, amylase, C016-1-1)活性, 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

肝脏抗氧化指标测定　在黑斑蛙肝脏样品解冻后, 精确称取组织, 按重量(g)与匀浆培养基

(mL)的比例为1∶9进行匀浆处理; 随后离心收集上清液用于后续测定。使用Thermo-1510型酶标仪测定黑斑蛙肝脏组织中过氧化氢酶(CAT, catalase, A007-2-1)、丙二醛(MDA, malondialdehyde, A003-1-1)、谷胱甘肽(GSH, glutathione, A006-2-1)、超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase, A001-3-2)的活性, 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

血清生化指标测定 使用Thermo-1510型酶标仪测定黑斑蛙血清中高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol, A112-1-1)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol, A113-1-1)、甘油三酯(TG, triglyceride, A110-1-1)、总胆固醇(TC, total cholesterol, A111-1-1)、白蛋白(ALB, albumin, A028-2-1)、尿素氮(BUN, blood urea nitrogen, C013-3-1)、谷草转氨酶(GOT glutamic-oxaloacetic transaminase, C010-2-1)和谷丙

表 1 实验饲料的配方及近似组成

Tab. 1 Formulation and proximate composition of the experimental diets (%)

原料Ingredient	组别Group							
	38.5P8L	38.5P10L	41P8L	41P10L	43.5P8L	43.5P10L	46P8L	46P10L
鱼粉Fish meal	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
猪肉粉Porcine meal	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
鸡肉粉Poultry meal	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
豆粕Soybean meal[1]	27.09	24.99	20.99	18.49	10.29	10.29	10.19	10.19
大豆浓缩蛋白Soy protein concentrate[1]	0.00	2.00	5.00	7.00	13.00	13.00	13.00	13.00
棉籽蛋白Cottonseed protein[1]	0.00	0.00	4.00	4.00	8.00	8.00	12.00	12.00
面粉Wheat meal	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00
赖氨酸渣Lysine residue	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
鱼排粉Fish frame meal	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
玉米蛋白粉Corn gluten meal	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
豆油Soybean oil	4.50	6.50	4.80	6.70	4.80	6.80	4.80	6.80
磷酸二氢钙$Ca(H_2PO_4)_2$	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
鱼油Fish oil	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
水解羽毛粉 Hydrolyzed feather meal	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
麸皮Wheat bran	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.00	0.00
抗氧化剂Antioxidant	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
矿物质预混料Mineral premix[2]	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
维生素预混料Vitamin premix[3]	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
防霉剂Mould inhibitor	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
统糠Rice hull-bran mixture	7.00	5.10	4.80	3.40	3.50	2.50	2.00	0.00
氯化胆碱Choline chloride	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
天然叶黄素(≥2%) Natural lutein (purity≥2%)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
膨润土Bentonite	3.00	3.00	2.00	2.00	2.00	1.00	0.00	0.00
三氧化二钇Yi_2O_3	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
合计Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平Nutrient level[4]								
粗蛋白质Crude protein	38.54	38.47	41.04	41.17	43.62	43.58	46.04	46.10
粗脂肪Crude lipid	7.93	10.17	8.44	9.88	7.92	10.06	8.21	10.15

注: [1]豆粕. 粗蛋白质44.33%, 粗脂肪0.64%; 大豆浓缩蛋白. 粗蛋白质65.25%; 棉籽蛋白. 粗蛋白质60.71%, 粗脂肪1.78%; [2]矿物质预混料(g/kg). 一水硫酸镁32.01、一水硫酸锌12.00、一水硫酸锰8.07、五水硫酸铜4.32、一水硫酸亚铁19.77、一水硫酸钴10.00、碘酸钙2.5、稻壳粉911; [3]维生素预混料. 每千克饲料提供维生素A, 900000 IU; 维生素D_3, 170000 IU; 维生素E. 7500 mg; 维生素K_3. 960 mg; 维生素B_1. 1200 mg; 维生素B_2. 1800 mg; 维生素B_6. 1200 mg; 维生素B_{12}. 6.4 mg; [4]营养水平的测量值为平均值

Note: [1]Soybean meal. crude protein 44.33%, crude lipid 0.64%; Soy protein concentrate. crude protein 65.25%; Cottonseed protein. crude protein 60.71%, crude lipid 1.78%; [2]Mineral premix (g/kg). mineral premix of control group (g/kg diet): magnesium sulfate monohydrate 32.01, zinc sulfate monohydrate 12.00, manga-nese sulfate monohydrate 8.07, copper sulfate pentahydrate 4.32, ferrous sulfate monohydrate 19.77, cobalt sulfate monohydrate 10.00, calcium iodate 2.5, rice husk powder 911; [3]Vitamin premix provided per kilogram diet: vitamin A. 900000 IU; vitamin D_3. 170000 IU; vitamin E. 7500 mg; vitamin K_3. 960 mg; vitamin B_1. 1200 mg; vitamin B_2. 1800 mg; vitamin B_6. 1200 mg; vitamin B_{12}. 6.4 mg; [4]The measured values of nutritional status are the means

转氨酶(GPT glutamic-pyruvic transaminase, C009-2-1)活性, 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

肝脏组织形态的观察　将肝脏组织置于恒冷冰冻切片机中, 制备厚度为5 μm的冰冻切片。随后, 将切片用新鲜配制的油红O (Oil Red O)染液染色10min, 以特异性标记脂质。在染色后, 用蒸馏水快速冲洗切片。接着, 使用60%异丙醇溶液分化, 去除背景中的多余染液, 再用蒸馏水清洗。然后, 使用Mary氏苏木素染液对细胞核进行复染, 时间控制在3—8min, 复染完成后用蒸馏水充分漂洗。最后, 使用甘油或甘油明胶封片剂进行封片。封片后的切片在光学显微镜下观察并拍照, 以评估肝细胞内脂滴的沉积情况。利用ImageJ-win64软件对随机选取的多个视野进行图像分析, 进而对脂滴面积占比进行定量分析。

基因表达水平测定　取 50 mg 左右的肝组织样品, 利用TRIzol试剂 (Yeasen)提取总 RNA, 超微量检测仪测定mRNA纯度及浓度后用Yeasen公司Hifair® Ⅲ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (gDNA digester plus)按其说明书反转录为cDNA。RT-qRCR反应体系为12.5 μL (6 μL Hieff® qPCR SYBR Green Ⅰ Master Mix (No Rox)、5 μL DEPC-treated Water (DNase、RNase free)、0.5 μL Primer forward、0.5 μL Primer reverse和0.5 μL cDNA)。PCR 扩增在罗氏Light Cycle 480 Ⅱ (Roche, Basel, Switzerlad)实时荧光定量PCR仪上进行。反应程序设置: 95℃预变性5min, 随后进行40个循环的两步法扩增, 每个循环包括95℃变性10s和60℃退火延伸30s。在本实验中, β-肌动蛋白(*β-actin*)被用作内参基因。每个样品设3个重复, 使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因的相对表达量。分别选取蛋白质代谢相关基因(*mtor*、*s6k*、*ubb*)、脂肪代谢相关基因(*cpt1*、*fas*、*lpl*)进行检测。具体引物信息见表 2。

表 2　引物信息列表

Tab. 2　Primer information

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5′—3′)
哺乳动物雷帕霉素靶蛋白*mtor*	GCAGCCTTTCTTTGACAACATC TCTTCACTTCGGTTTCTTAGGC
泛素蛋白B *ubb*	TCCATCTTGTGCTCCGTCTG GTGGGATGCCCTCTTTGTCT
核糖体S6激酶*s6k*	CTCGTCTTGGAGCAGGAGTTG CCACAGGGGTCTGTCGTGTAA
乙酰辅酶A羧化酶*fas*	AGGCGAAGACACGGAACGA CGTTTTCGGGGATGCTCTG
肉碱脂酰转移酶1 *cpt1*	TGATTGGCAAAATCAAAGAACATC AATGCTCTGACCCTGGTGAGA
脂蛋白脂肪酶*lpl*	ACAGCAGCACTACCCAGTTTCA CATACATGCCAGTTACCGTCCA
β-肌动蛋白 *β-actin*	GCGTGACATCAAGGAAAAGC TCTCGTTTCCGATGGTGATG

1.4　数据统计与分析

本研究采用SPSS 26.0 (IBM SPSS Statistics)软件进行双因素方差分析(Two-way ANOVA), 以评估两个因素的主效应及其交互作用。组间差异的显著性通过Duncan多重比较法进行事后检验。所有实验数据均以“平均值±标准误”表示, 当$P<0.05$, 则存在显著差异。

2　结果

2.1　饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙生长性能的影响

随着饲料蛋白质水平的提高, 黑斑蛙的增重率表现出先上升后下降的趋势, 而蛋白质效率则显著下降($P<0.05$)。与8%脂肪相比, 10%脂肪显著提高了黑斑蛙的增重率与蛋白质效率, 并降低了饲料系数($P<0.05$; 表 3)。

2.2　饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙形体指标的影响

本研究中, 饲料蛋白质和脂肪水平对黑斑蛙形体指标均无显著影响(表 4)。

2.3　饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙肠道消化酶的影响

随着饲料蛋白质水平的提高, 黑斑蛙肠道胰蛋白酶(TPS)和α淀粉酶(AMS)活性均呈上升趋势。43.5P与46P组的AMS活性显著高于38.5P与41P组($P<0.05$); 38.5P组的TPS活性则显著低于41P、43.5P和46P组($P<0.05$)。随着饲料脂肪水平的增加, 黑斑蛙肠道脂肪酶(LPS)活力呈上升趋势(表 5)。

2.4　饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙肝脏抗氧化能力的影响

随着饲料蛋白质水平的提高, 黑斑蛙肝脏中过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)和还原型谷胱甘肽(GSH)的含量均呈上升趋势。与38.5P组相比, 46P组的CAT、SOD和GSH含量显著升高($P<0.05$), 且43.5P组的GSH和SOD含量也显著高于38.5P组($P<0.05$; 表 6)。

2.5　饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙蛋脂代谢血清指标的影响

在本研究中, 饲料蛋白质水平对黑斑蛙血清生化指标具有显著影响。与38.5P组相比, 46P组的多项指标显著提高, 包括总胆固醇(TC)、谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)、白蛋白(ALB)和尿素氮(BUN)($P<0.05$); 且46P组的甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量及43.5P组的低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量也显著高于38.5P组($P<0.05$)。此外, 随着饲料脂肪水平的增加, 血清中

HDL-C含量也显著升高(P<0.05; 表 7)。

2.6 饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙肝脏切片油红染色影响

油红O染色用于进一步对肝脏脂质分布进行评估。由图 1可知, 随着饲料蛋白水平增加, 黑斑蛙肝脏中脂滴数量和大小呈显著上升趋势, 且10L组中的脂滴数量和大小显著高于8L组。

2.7 饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙肝脏蛋白质代谢相关基因表达的影响

由图 2可知, 饲料蛋白质水平对*mtor*和*s6k*的相对表达量有显著影响(P<0.05); 随着饲料蛋白水平增加, *mtor*和*s6k*的相对表达量呈显著上升趋势; 且43.5P和46P组*mtor*和*s6k*的相对表达量显著高于38.5P组(P<0.05)。

2.8 饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙肝脏脂肪代谢相关基因表达的影响

图 3显示, 与8L组相比, 10L组显著上调了肝脏中*cpt1*的相对表达量(P<0.05), 且*lpl*的相对表达量呈上升趋势, 但差异不显著。

3 讨论

3.1 饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙生长性能及肠道消化酶的影响

本研究结果表明, 随着饲料中蛋白质水平的提高, 黑斑蛙的增重率表现出先上升后下降的趋势, 在41%组增重率达到最高。与本研究结果相似, 在杂交鲈(*Megalobrama terminalis* ♀ × *Erythroculter ilishaeformis* ♂)中的结果表明饲料蛋白质水平增加对杂交鲈增重有显著作用, 在36%组增重率达到最高, 但在40%组增重有所下降[12]; 此外, 在匙吻鲟(*Polyodon Spathula*)中的研究结果表明, 其增重率随着饲料中蛋白水平的增加呈先上升后下降的趋势[13]。这表明在低蛋白情况下, 水产动物的生长和饲料利用受到一定的阻碍, 随着饲料蛋白含量的提高, 水产动物的生长性能和饲料利用也随之提高, 超过一定水平后, 水产动物的生长和饲料利用也会受到一定的影响, 对营养物质的利用率也会降低[12]。然而, 较高的蛋白水平能够提高黑斑蛙的生长, 但

表 3 饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙生长性能的影响(平均值±标准误, n=3)

Tab. 3 Effects of diets with different protein and lipid levels on growth performance in *Pelophylax nigromaculatus* (mean±SE, n=3)

组别Group	末均重FBW(g)	增重率WGR(%)	存活率SR(%)	蛋白质效率PER	饲料系数FCR
38.5P8L	52.12±1.22^{ab}	246.67±8.33^{ab}	95.67±0.67	2.02±0.05^{b}	1.24±0.02^{ab}
38.5P10L	54.20±0.49^{a}	260.67±3.18^{a}	97.00±1.00	2.14±0.02^{a}	1.18±0.01^{b}
41P8L	52.33±0.72^{ab}	248.33±4.84^{ab}	97.00±1.53	1.95±0.04^{b}	1.21±0.02^{b}
41P10L	54.44±0.27^{a}	263.00±2.08^{a}	94.67±1.45	1.99±0.04^{b}	1.18±0.02^{b}
43.5P8L	50.61±1.39^{b}	237.00±9.54^{b}	96.67±0.88	1.74±0.03^{c}	1.28±0.03^{a}
43.5P10L	53.43±0.46^{ab}	255.67±2.85^{ab}	93.67±2.03	1.81±0.05^{c}	1.21±0.01^{b}
46P8L	51.71±1.17^{ab}	244.67±7.84^{ab}	97.67±1.86	1.73±0.02^{c}	1.24±0.02^{ab}
46P10L	52.77±0.33^{ab}	251.33±2.60^{ab}	96.67±1.20	1.73±0.02^{c}	1.22±0.01^{ab}
饲料蛋白质水平Dietary protein level (%)					
38.5P	53.16±0.75	253.67±5.07	96.33±0.62	2.08±0.04^{A}	1.21±0.02
41P	53.38±0.58	255.67±4.04	95.83±1.08	1.97±0.03^{B}	1.20±0.01
43.5P	52.02±0.91	246.33±6.10	95.17±1.20	1.78±0.03^{C}	1.25±0.02
46P	52.24±0.59	248.00±3.98	97.17±1.01	1.73±0.01^{C}	1.23±0.01
饲料脂肪水平Dietary lipid level (%)					
8L	51.69±0.53^{Y}	244.17±3.59^{Y}	96.75±0.61	1.86±0.04^{Y}	1.25±0.01^{X}
10L	53.71±0.26^{X}	257.67±1.79^{X}	95.5±0.75	1.92±0.05^{X}	1.20±0.01^{Y}
Two-way ANOVA					
蛋白质Protein	0.336	0.356	0.551	0.000	0.148
脂肪Lipid	0.004	0.005	0.225	0.045	0.005
交互Interaction	0.786	0.780	0.447	0.483	0.635

注: 数据采用双因素方差分析检验, 同列数据上标不同小写字母(a、b等)代表存在饲料蛋白质和脂肪水平显著交互作用(P<0.05), 同列数据上标不同大写字母(A, B和C)代表在饲料蛋白质水平上差异显著(P<0.05), 同列数据上标不同大写字母(X, Y)代表在饲料脂肪水平上差异显著(P<0.05); n代表每组的平行重复网箱数; 下同

Note: Data are analyzed using Two-way ANOVA, the data with different lowercase (a, b, etc.) in the same column represent significant difference in the interaction (P<0.05), different uppercase (A, B, and C) represent significant difference in the dietary protein level (P<0.05), and different uppercase (X, Y) represent significant difference in the dietary lipid level (P<0.05); "n" represents the number of parallel repeated cages per group; the same applies below

会导致蛋白质效率降低。这与在牛蛙(*Rana catesbeiana*)中的研究结果一致[14]。饲料中的脂肪是动物获取能量的重要途径[15]。本研究结果表明, 黑斑蛙的生长性能随饲料脂肪水平的提高而显著增加。这一现象在克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、血鹦鹉鱼(*Vieja synspila* ♀ × *Amphilophus citrinellus* ♂)及淡黑镊丽鱼(*Labidochromis caeruleus*)的相关研究中也得到了印证[16—18]。此外, 饲料脂肪水平的升高显著提高了蛋白质效率, 展现出了明显的蛋白质节约效应。这与在西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)中的研究结果一致[19]。

肠道消化酶活性是评估水产动物消化生理特征与营养成分消化吸收效率的关键指标之一。在本研究中, 随着饲料蛋白质水平增加, 黑斑蛙肠道的α-淀粉酶和胰蛋白酶活力显著升高; 且随着饲料脂肪水平的增加, 黑斑蛙肠道脂肪酶活性呈上升趋势, 这表明在摄入高水平的蛋白质与脂肪后黑斑蛙能够合成更多消化酶来加强对营养物质的消化与吸收[20]。翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)和皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)中的研究发现, 饲料蛋白质和脂肪水平与肠道消化酶活性呈正相关。其可能的作用机制包括: 首先, 饲料中蛋白质和脂肪作为消化酶的天然底物, 其含量的增加直接为酶的合成提供了更丰富的原料, 从而刺激了酶的合成; 其次, 这些额外摄入的能量和营养物质显著加速了水产动物的整体代谢活动, 这种增强的代谢状态反过来又对消化系统提出了更高的功能需求, 进而促进了消化酶活性的进一步提升, 以确保对这些新增营养成分的高效分解与吸收[21, 22]。

表 4　饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙形体指标的影响(平均值±标准误, *n*=3)

Tab. 4　Effects of diets with different protein and lipid levels on body indices in *Pelophylax nigromaculatus* (mean±SE, *n*=3)

组别 Group	肥满度CF (g/cm^3)	肝体比 HSI	脏体比 VSI	腿体比 LSI
38.5P8L	11.36±0.48	8.18±0.15	36.50±1.51	29.84±1.57
38.5P10L	11.62±0.83	7.98±0.45	37.57±0.75	28.42±0.70
41P8L	11.50±0.77	7.85±0.41	39.69±0.79	28.72±0.49
41P10L	10.23±0.47	7.66±0.30	35.81±2.57	30.78±2.05
43.5P8L	10.86±0.39	7.67±0.38	35.87±1.65	31.57±0.84
43.5P10L	10.85±0.60	7.50±0.25	38.06±0.67	31.55±0.66
46P8L	11.73±0.53	7.56±0.23	38.03±0.82	30.13±0.47
46P10L	11.22±0.53	7.90±0.17	36.04±1.49	31.68±0.88
饲料蛋白质水平Dietary protein level (%)				
38.5P	11.49±0.47	8.08±0.23	37.04±0.83	29.13±0.85
41P	10.87±0.46	7.75±0.25	37.75±1.39	29.75±1.05
43.5P	10.85±0.35	7.58±0.22	36.96±0.9	31.56±0.52
46P	11.47±0.37	7.73±0.14	37.03±0.86	30.91±0.52
饲料脂肪水平Dietary lipid level (%)				
8L	11.36±0.27	7.81±0.15	37.52±0.65	30.07±0.49
10L	10.98±0.31	7.76±0.15	36.87±0.77	30.61±0.62
Two-way ANOVA				
蛋白质 Protein	0.537	0.438	0.938	0.118
脂肪 Lipid	0.366	0.797	0.518	0.486
交互Interaction	0.594	0.779	0.135	0.374

表 5　饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙消化酶活性的影响(平均值±标准误, *n*=3)

Tab. 5　Effects of different protein and lipid levels in diets on digestive enzyme activities of *Pelophylax nigromaculatus* (mean±SE, *n*=3)

组别Group	LPS脂肪酶 (U/g prot)	AMSα-淀粉酶 (U/mg prot)	TPS胰蛋白酶 (U/mg prot)
38.5P8L	4.31±0.36	$0.25±0.02^{c}$	$0.64±0.03^{b}$
38.5P10L	4.44±0.19	$0.25±0.01^{c}$	$0.73±0.03^{b}$
41P8L	4.46±0.09	$0.27±0.00^{bc}$	$1.08±0.06^{a}$
41P10L	5.05±0.51	$0.27±0.01^{bc}$	$1.06±0.09^{a}$
43.5P8L	4.46±0.19	$0.31±0.01^{a}$	$1.13±0.02^{a}$
43.5P10L	4.77±0.12	$0.30±0.00^{ab}$	$1.04±0.05^{a}$
46P8L	4.49±0.1	$0.29±0.00^{ab}$	$1.17±0.06^{a}$
46P10L	4.85±0.39	$0.30±0.01^{ab}$	$1.11±0.06^{a}$
饲料蛋白质水平Dietary protein level (%)			
38.5P	4.37±0.18	$0.25±0.01^{B}$	$0.69±0.03^{B}$
41P	4.76±0.26	$0.27±0.01^{B}$	$1.07±0.05^{A}$
43.5P	4.61±0.12	$0.30±0.01^{A}$	$1.08±0.03^{A}$
46P	4.67±0.2	$0.30±0.01^{A}$	$1.14±0.04^{A}$
饲料脂肪水平Dietary lipid level (%)			
8L	4.43±0.09	0.28±0.01	1.00±0.07
10L	4.77±0.16	0.28±0.01	0.99±0.05
Two-way ANOVA			
蛋白质 Protein	0.581	0.000	0.000
脂肪 Lipid	0.104	0.765	0.658
交互 Interaction	0.883	0.844	0.347

3.2　饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙肝脏抗氧化的影响

在水产动物的生理代谢过程中, 肝脏处于核心地位, 其健康状态是衡量动物生理机能的关键指标。丙二醛(MDA)作为脂质过氧化反应的标志性产物, 具有潜在毒性, 其水平被广泛用作评估机体脂质过氧化程度及细胞受损情况的生物标志物[23]。超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)和过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶类广泛分布于生物体的各种组织中, 它们共同构成了机体重要的抗氧化防御系统, 通过协同作用清除超氧阴离子自由基, 并抑制脂质过氧化物的形成, 从而维持细胞内环境的稳定, 防止其受到氧化应激的损害[24]。本研究结果表明,

表 6 饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙肝脏抗氧化能力的影响(平均值±标准误, *n*=3)

Tab. 6 Effects of different protein and lipid levels in diets on liver antioxidant capacity in *Pelophylax nigromaculatus* (mean±SE, *n*=3)

组别Group	CAT过氧化氢酶 (U/mg prot)	MDA丙二醛 (nmol/mg prot)	SOD超氧化物歧化酶 (U/mg prot)	GSH还原型谷胱甘肽 (μmol/g prot)
38.5P8L	1.76±0.04^{d}	0.83±0.13^{c}	21.00±0.95^{b}	46.70±4.52^{b}
38.5P10L	2.82±0.29^{bc}	0.91±0.02^{bc}	23.61±1.36^{b}	47.16±2.58^{b}
41P8L	3.10±0.16^{abc}	1.09±0.05^{ab}	23.64±1.01^{b}	48.59±4.78^{b}
41P10L	2.54±0.06^{c}	0.92±0.09^{bc}	23.84±1.51^{b}	54.56±4.34^{ab}
43.5P8L	2.78±0.24^{bc}	0.87±0.05^{bc}	29.22±0.46^{a}	58.60±6.30^{ab}
43.5P10L	2.84±0.07^{bc}	1.17±0.04^{a}	29.87±0.83^{a}	58.34±2.51^{ab}
46P8L	3.24±0.23^{ab}	0.99±0.04^{abc}	31.75±1.76^{a}	62.57±6.05^{ab}
46P10L	3.42±0.11^{a}	1.11±0.10^{ab}	30.93±2.61^{a}	64.99±6.08^{a}
饲料蛋白质水平Dietary protein level (%)				
38.5P	2.27±0.27^{B}	0.87±0.06	22.30±0.94^{B}	46.93±2.32^{C}
41P	2.82±0.15^{AB}	1.01±0.06	23.74±0.81^{B}	51.57±3.18^{BC}
43.5P	2.81±0.11^{AB}	1.02±0.07	29.54±0.45^{A}	58.47±3.03^{AB}
46P	3.33±0.12^{A}	1.05±0.06	31.34±1.42^{A}	63.78±3.87^{A}
饲料脂肪水平Dietary lipid level (%)				
8L	2.72±0.19	0.95±0.05	26.40±1.38	54.11±3.07
10L	2.90±0.12	1.03±0.05	27.06±1.25	56.26±2.63
Two-way ANOVA				
蛋白质 Protein	0.000	0.114	0.000	0.015
脂肪 Lipid	0.153	0.145	0.531	0.540
交互Interaction	0.002	0.046	0.691	0.918

表 7 饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙血清生化指标的影响(平均值±标准误, *n*=3)

Tab. 7 Effects of different protein and lipid levels in diets on serum biochemical parameters in *Pelophylax nigromaculatus* (mean±SE, *n*=3)

组别 Group	谷丙转氨酶 GPT (U/L)	谷草转氨酶 GOT (U/L)	高密度脂蛋白胆固醇HDL-C (mmol/L)	低密度脂蛋白胆固醇LDL-C (mmol/L)	总胆固醇T-CHO (mmol/L)	甘油三酯TG (mmol/L)	白蛋白ALB (g/L)	尿素氮BUN (mmol/L)
38.5P8L	40.36±3.83	157.43±3.75^{ab}	1.21±0.12^{cd}	0.44±0.00^{b}	2.30±0.17^{c}	0.67±0.05^{c}	134.82±5.49^{c}	4.76±0.10^{b}
38.5P10L	38.86±3.07	146.93±2.40^{b}	1.04±0.11^{de}	0.45±0.01^{ab}	2.56±0.13^{bc}	0.88±0.03^{ab}	142.71±3.49^{bc}	4.75±0.26^{b}
41P8L	46.71±5.59	169.04±6.22^{ab}	0.93±0.06^{ef}	0.44±0.01^{ab}	2.48±0.11^{bc}	0.80±0.05^{bc}	151.4±3.88^{ab}	5.02±0.18^{ab}
41P10L	45.26±0.67	160.48±7.11^{ab}	1.21±0.12^{cd}	0.46±0.01^{ab}	2.79±0.20^{b}	0.88±0.01^{ab}	151.95±6.34^{ab}	5.33±0.09^{a}
43.5P8L	46.66±3.31	158.91±10.72^{ab}	1.48±0.05^{ab}	0.47±0.01^{ab}	2.82±0.17^{b}	1.04±0.12^{a}	156.79±6.99^{ab}	5.13±0.12^{ab}
43.5P10L	48.68±2.30	166.28±3.46^{ab}	1.31±0.07^{bc}	0.47±0.01^{a}	2.77±0.10^{b}	0.97±0.09^{ab}	152.28±4.29^{ab}	5.29±0.17^{a}
46P8L	48.96±7.05	176.21±11.60^{a}	1.53±0.06^{ab}	0.44±0.00^{ab}	3.35±0.12^{a}	0.95±0.01^{ab}	153.38±3.59^{ab}	5.27±0.05^{a}
46P10L	50.49±2.47	174.63±7.06^{a}	1.63±0.12^{a}	0.46±0.00^{ab}	3.43±0.11^{a}	1.02±0.02^{a}	163.17±3.42^{a}	5.17±0.11^{ab}
饲料蛋白质水平Dietary protein level (%)								
38.5P	39.61±2.22^{B}	152.18±3.08^{B}	0.89±0.08^{B}	0.44±0.01^{B}	2.43±0.11^{C}	0.77±0.05^{B}	138.77±3.40^{B}	4.76±0.13^{B}
41P	45.98±2.54^{AB}	164.76±4.64^{AB}	1.07±0.09^{B}	0.45±0.01^{AB}	2.64±0.12^{BC}	0.84±0.03^{B}	151.67±3.32^{A}	5.18±0.11^{A}
43.5P	47.67±1.86^{AB}	162.60±5.30^{AB}	1.40±0.05^{A}	0.47±0.01^{A}	2.79±0.09^{B}	1.01±0.07^{A}	154.53±3.80^{A}	5.21±0.10^{A}
46P	49.73±1.43^{A}	175.42±6.09^{A}	1.58±0.06^{A}	0.45±0.01^{AB}	3.39±0.08^{A}	0.99±0.02^{A}	158.27±3.12^{A}	5.22±0.06^{A}
饲料脂肪水平Dietary lipid level (%)								
8L	45.67±2.40	165.40±4.37	1.17±0.11^{Y}	0.45±0.00^{Y}	2.74±0.14	0.86±0.05	149.10±3.37	5.05±0.08
10L	45.82±1.66	162.08±3.82	1.30±0.08^{X}	0.46±0.01^{X}	2.89±0.12	0.94±0.03	152.52±2.92	5.13±0.10
Two-way ANOVA								
蛋白质 Protein	0.107	0.042	0.000	0.081	0.000	0.003	0.006	0.019
脂肪 Lipid	0.958	0.527	0.047	0.044	0.163	0.111	0.334	0.416
交互Interaction	0.952	0.611	0.048	0.661	0.588	0.216	0.451	0.549

随着饲料蛋白质和脂肪水平的增加, 黑斑蛙肝脏中的MDA和CAT活力均呈上升趋势, 且饲料蛋白质水平的增加显著提高了SOD和GSH活性。这可能是

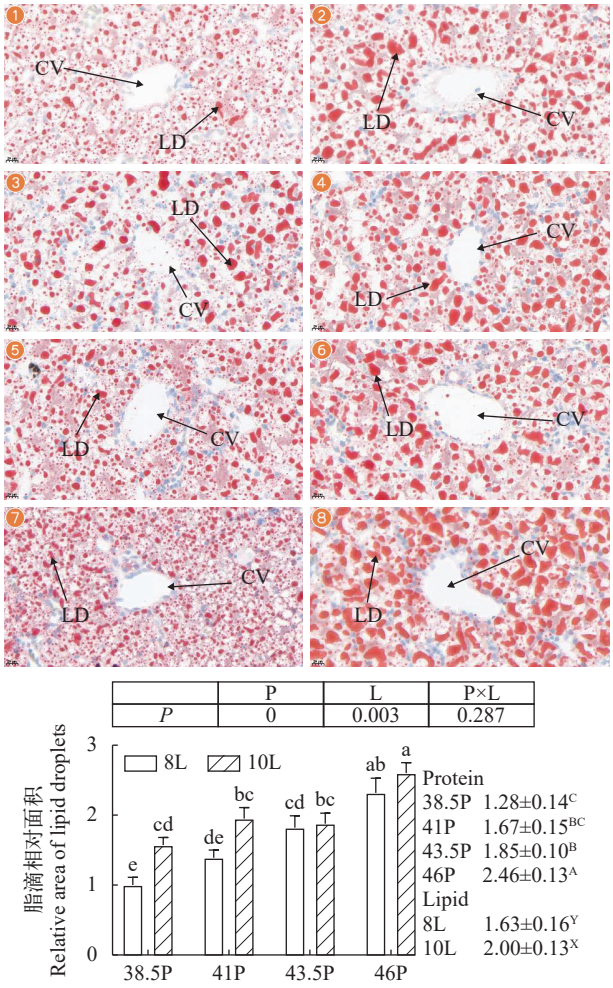


图 1　黑斑蛙肝脏油红O染色结果(400×)

Fig. 1　Results of oil red O staining in the liver of *Pelophylax nigromaculatus* (400×)

1. 38.5P8L组; 2. 38.5P10L组; 3. 41P8L组; 4. 41P10L组; 5. 43.5P8L组; 6. 43.5P10L组; 7. 46P8L组; 8. 46P10L组; CV. 中央静脉, 图示中央空白区域; LD. 脂滴, 图示区域。数据采用双因素方差分析检验, 同列数据上标不同小写字母(a, b, 等)代表存在饲料蛋白质和脂肪水平显著交互作用(P<0.05), 同列数据上标不同大写字母(A、B和C)代表在饲料蛋白质水平上差异显著(P<0.05), 同列数据上标不同大写字母(X, Y)代表在饲料脂肪水平上差异显著(P<0.05); 下同

1. Group 38.5P8L; 2. Group 38.5P10L; 3. Group 41P8L; 4. Group 41P10L; 5. Group 43.5P8L; 6. Group 43.5P10L; 7. Group 46P8L; 8. Group 46P10L; CV. Central Veios, shown in the central blank area. LD. Lipid Droplet, shown in the area. Data are analyzed using two-way ANOVA, the data with different lowercase (a, b, etc.) in the same column represent significant difference in the interaction (P<0.05), different uppercase (A, B, and C) represent significant difference in the dietary protein level (P<0.05), and different uppercase (X, Y) represent significant difference in the dietary lipid level (P<0.05); the same applies below

由于蛋白质含量的增加直接为抗氧化酶的合成提供了更丰富的原料, 从而刺激了抗氧化酶的合成[25]。此外, 蛋白质和脂肪水平的增加也可能造成黑斑蛙肝脏氧化损伤程度的加剧, 从而导致了肝脏中MDA含量的增加。为了应对这种氧化胁迫, 机体可能通过反馈调节机制增强其抗氧化防御能力, 从而表现为抗氧化酶活性的显著升高[14]。

3.3　饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙脂肪代谢的影响

血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的水平是评估机体脂质代谢状态的关键指标[26]。在本研究中观察到, 随着饲料中蛋白质含量的增加, 黑斑蛙血清中上述各项脂质指标的水平均有所上升, 这与在杂交石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus* ♂× *Epinephelus fuscogut-tatus* ♀)和匙吻鲟中的研究结果相似[13, 27]。这可能是由于蛋白质摄入

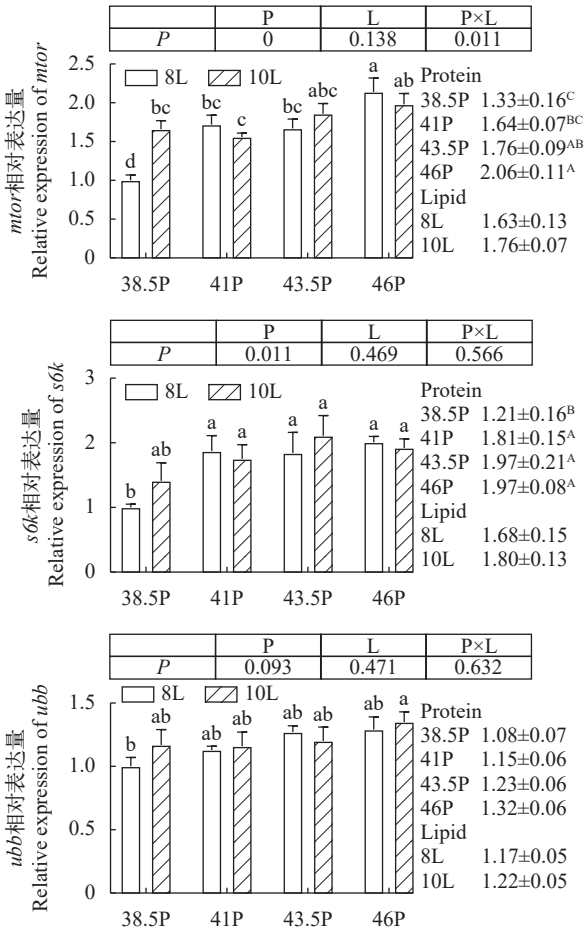


图 2　饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙肝脏蛋白质代谢相关基因的影响

Fig. 2　Effects of diets with different protein and lipid levels on liver protein metabolism-related genes in *Pelophylax nigromaculatus*

的增加促进了脂肪代谢速率的提升, 进而造成了脂肪代谢相关指标的上升[28]。同时, 在本研究中, 饲料脂肪水平的提高显著增加了黑斑蛙血清中HDL-C和LDL-C的含量, 这与在黑脊倒刺鲃(*Spinibarbus caldwelli*)和丝尾鳜(*Hemibagrus wyckioides*)中的研究结果相似[29, 30]。肝脏组织油红染色结果表明, 在10%脂肪水平下, 黑斑蛙肝脏的脂肪沉积加重, 且43.5%、46%蛋白质水平时肝脏脂肪沉积更明显。同时我们也观察到, 黑斑蛙血清中GOT和GPT活性随饲料蛋白质水平升高呈上升趋势, 且46P组GOT活性显著高于38.5P组。这表明肝脏内持续的脂肪蓄积可能会加重肝脏受到的氧化应激, 并诱发脂肪肝及肝脏纤维化等一系列肝脏疾病, 从而干扰其正常功能的发挥[31]。肉碱脂酰转移酶1 (*cpt1*)是脂肪酸β-氧化的关键限速酶, 其表达量和活性直接决定了肝脏利用脂肪供能的效率[32]。在本研究中, 随着饲料脂肪水平的升高, 黑斑蛙肝脏*cpt1*表达量显著上调, 且38.5P10L组肝脏*cpt1*表达量显著高于46P8L组。这可能是因为高蛋白质水平下机体优先利用蛋白质供能, 抑制脂肪酸β-氧化通路; 而适当提高脂肪水平可提供充足能量, 减少蛋白质的分解供能, 且适宜蛋白质−脂肪配比可激活CPT1通路, 促进脂肪分解供能, 优化能量分配模式。此外, 增加脂肪摄入可能会造成肝细胞内未被及时合成甘油三酯的游离脂肪酸积累, 从而诱导机体适应性调节*cpt1*表达量, 提升脂肪酸β-氧化效率[33, 34]。与本研究结果相似的是: 在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中的研究结果表明, 适当增加摄入脂肪, 虹鳟*pparα*和*cpt1*表达量均显著提高[35]。

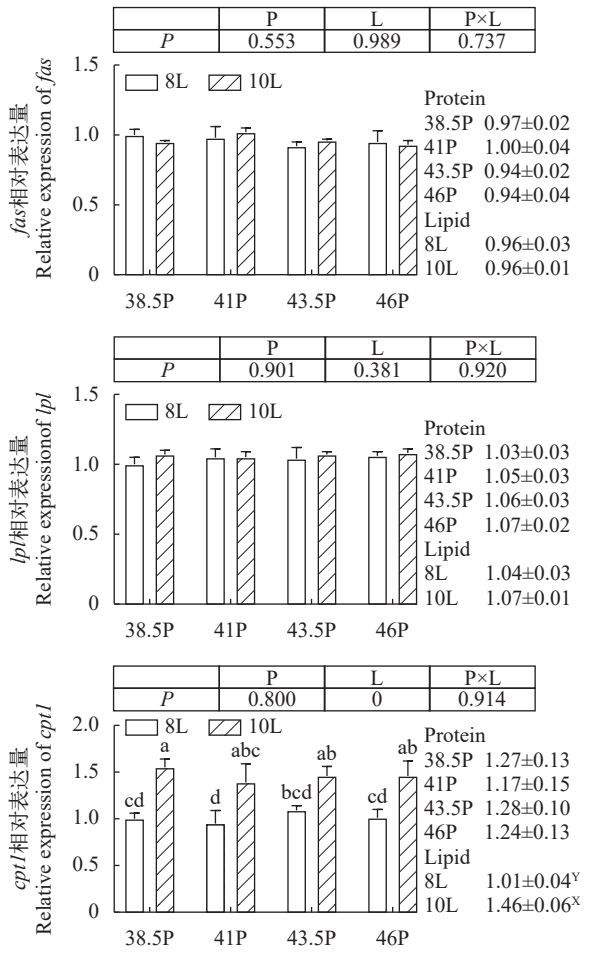


图 3 饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙肝脏脂肪代谢相关基因的影响

Fig. 3 Effects of different protein and lipid levels in diets on liver lipid metabolism-related genes in *Pelophylax nigromaculatus*

3.4 饲料中不同蛋白质和脂肪含量对黑斑蛙蛋白质代谢的影响

尿素氮(BUN)和白蛋白(ALB)是动物体内蛋白质代谢的关键产物, 血清BUN的浓度直接反映“蛋白质摄入−分解−排泄”的动态平衡[36]。ALB是动物血浆中最主要的蛋白质, 由肝脏合成分泌并参与循环, 兼具运输功能与营养储备作用, 可作为评估肝脏蛋白质合成能力的核心生物标志物[37]。在本实验中, 黑斑蛙血清BUN与ALB含量随着饲料蛋白质水平升高而显著增加, 这可能是由于饲料蛋白质含量的提升加速了机体蛋白质的代谢, 从而导致氨基氮代谢产物尿素氮和白蛋白含量累积[38, 39]。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(*mtor*)是介导细胞生长信号、调控蛋白质生物合成的核心调控元件, 其作用靶点直接指向蛋白质合成起始阶段的限速步骤。它通过对核糖体S6激酶(*s6k*)的调控来发挥作用。本研究结果表明, 提高饲料蛋白质水平可显著上调黑斑蛙肝脏中*mtor*和 *s6k* 的表达量, 这提示饲料蛋白质水平的增加有助于增强黑斑蛙体内的蛋白质合成代谢活性。在白沙鮻(*Sillago sihama*)和杂交鳢(*Channa maculata* ♀ × *Channa argus* ♂)的研究中也发现, 饲料蛋白质水平与*mtor*基因相对表达量呈正相关[18, 40]。此外, 剑鲤(*Carassius auratus gibelio* ♀ × *Cyprinus carpio* ♂)和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)的研究表明, 氨基酸水平是调控*mtor*基因表达及蛋白质合成的关键因素[41, 42]; 而饲料氨基酸含量与蛋白质水平呈正相关, 因此饲料蛋白质水平通过改变氨基酸含量, 可能是调控*mtor*和*s6k*表达的重要机制。

4 结论

综上所述, 饲料中适量添加脂肪可以减少蛋白质的添加, 起到蛋白质节约作用, 而过量的蛋白质和脂肪添加会导致黑斑蛙生长性能降低, 肝脏组织形态和健康受到损害。在本研究条件下, 综合生长表

现、蛋白质利用效率及肝脏健康等多方面因素, 黑斑蛙饲料中适宜的蛋白质水平为38.5%, 脂肪水平为10%, 该推荐值适用于规格为15—50 g的育成蛙阶段, 且在类似模拟生态养殖环境中应用效果更优。(作者声明本文符合出版伦理要求)

致谢:

感谢深圳市澳华集团股份有限公司覃笛根博士和肖文富技术员在实验设计阶段提供的技术指导。

参考文献:

[1] Ai Q H, Mai K S, Li H, *et al*. Effects of dietary protein to energy ratios on growth and body composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* [J]. *Aquaculture*, 2004, **230**(1/2/3/4): 507-516.

[2] Barreto-Curiel F, Focken U, D'Abramo L R, *et al*. Assessment of amino acid requirements for *Totoaba macdonaldi* at different levels of protein using stable isotopes and a non-digestible protein source as a filler [J]. *Aquaculture*, 2019(503): 550-561.

[3] Jobling M. National Research Council (NRC): Nutrient requirements of fish and shrimp [J]. *Aquaculture International*, 2012, **20**(3): 601-602.

[4] Zou C, Su N, Wu J, *et al*. Dietary Radix Bupleuri extracts improves hepatic lipid accumulation and immune response of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(88): 496-507.

[5] He Z G, Wu Y A, Xu Y F, *et al*. Comparative analysis on nutritional quality of muscles between wild and cultured black-spotted frog *Rana nigromaculata* [J]. *Fisheries Science*, 2019, **38**(4): 506-513. [何志刚, 伍远安, 徐永福, 等. 野生与养殖黑斑蛙肌肉营养品质的比较分析 [J]. 水产科学, 2019, **38**(4): 506-513.]

[6] Zhong W M, Peng F, Chen K Y, *et al*. Isolation, identification and drug sensitivity of the pathogen causing hemorrhagic disease of *Rana nigromaculata* tadpole [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, **46**(1): 107-115. [钟为铭, 彭芳, 陈康勇, 等. 黑斑蛙蝌蚪出血病病原菌的分离鉴定及药物敏感性 [J]. 水产学报, 2022, **46**(1): 107-115.]

[7] He Z G, Wang D W, Xu Y F, *et al*. Analysis and evaluation of nutritent composition in the muscle of *Rana nigromaculata* [J]. *China Feed*, 2018(17): 74-77. [何志刚, 王冬武, 徐永福, 等. 黑斑蛙肌肉营养成分分析及评价 [J]. 中国饲料, 2018(17): 74-77.]

[8] Ḫağiltay F, Özden Ö, Tosun D D, *et al*. Chemical composition of wild and cultured marsh frog (*Rana ridibunda*) [J]. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 2014, **20**(5): 1250-1254.

[9] Zhang H, Liu W, Chen B, *et al*. Differences in reproductive toxicity of TBBPA and TCBPA exposure in male *Rana nigromaculata* [J]. *Environmental Pollution*, 2018, **243**: 394-403.

[10] Gong J, Lan H, Fang S G, *et al*. Development and characterization of 13 polymorphic microsatellite DNA markers for the pond green frog (*Rana nigromaculata*) [J]. *Journal of Genetics*, 2010, **89**(1): e7-e10.

[11] AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists International. 1995, 16th ed. AOAC Int, Gaithersburg, MD, USA (Rev. 2).

[12] Ma H J, Feng X Y, Liu K, *et al*. Effects of dietary protein and lipid levels on growth performance and feed utilization of juvenile hybrid bream [J]. *Feed Research*, 2020, **43**(10): 52-55. [马恒甲, 冯晓宇, 刘凯, 等. 不同蛋白、脂肪水平对杂交鲂幼鱼生长性能及饲料利用的影响 [J]. 饲料研究, 2020, **43**(10): 52-55.]

[13] Liu Y Y. Study on dietary protein and lipid requirement of *Polyodon spathula* [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2018. [刘阳洋. 匙吻鲟对蛋白质和脂肪营养需求量的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.]

[14] Huang K K, Zhang C X, Wang L, *et al*. Effects of dietary protein and lipid levels on growth of bullfrog (*Rana catesbeiana*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, **38**(6): 877-887. [皇康康, 张春晓, 王玲, 等. 饲料蛋白质和脂肪水平对牛蛙生长性能的影响 [J]. 水产学报, 2014, **38**(6): 877-887.]

[15] Glencross B D. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2009, **1**(2): 71-124.

[16] Mo C Q, Huang K, Cao X S, *et al*. Effects of dietary lipid levels on growth performance and muscle quality of juvenile *Procambarus clarkii* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, **44**(2): 214-223. [莫翠琴, 黄凯, 曹鑫盛, 等. 饲料脂肪水平对克氏原螯虾幼虾生长性能及肌肉品质的影响 [J]. 渔业科学进展, 2023, **44**(2): 214-223.]

[17] Fu X, Cui Q J, Chen B, *et al*. Effects of dietary lipid levels on growth and carotenoid accumulation of freshwater fish cichlid *Labidochromis caeruleus* [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, **35**(1): 56-62. [付旭, 崔前进, 陈冰, 等. 饲料脂肪水平对淡黑镊丽鱼生长及色素蓄积的影响 [J]. 大连海洋大学学报, 2020, **35**(1): 56-62.]

[18] Wu G Q, Wang X J, Mu X D, *et al*. Effects of dietary lipid level on astaxanthin absorbtion, growth performance and serum biochemical indices of *Vieja synspila* ♀ × *Amphilophus citrinellus* ♂ [J]. *Marine Fisheries*, 2022, **44**(1): 67-77. [邬国强, 汪学杰, 牟希东, 等. 饲料脂肪水平对血鹦鹉鱼吸收虾青素效果、生长性能和血清生化指标的影响 [J]. 海洋渔业, 2022, **44**(1): 67-77.]

[19] Wang S H, Wei X H, Qin X Y. Optimization of protein-to-lipid ratio in sturgeon feed and its effects [J]. *Feed Review*, 2025(5): 19-23. [王仕豪, 韦兴黄, 秦秀语. 鲟鱼饲料中蛋白质与脂肪比例优化及其效应研究 [J]. 饲料博览, 2025(5): 19-23.]

[20] Giri S S, Sahoo S K, Sahu A K, *et al*. Effect of dietary protein level on growth, survival, feed utilisation and

body composition of hybrid Clarias catfish (*Clarias batrachus* × *Clarias gariepinus*) [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2003, **104**(1/2/3/4): 169-178.

[21] Tian X X, Huang W, Xie C Y, *et al*. Effects of fermented soybean meal replacing of fish meal on the growth, feed utilization and digestive enzyme activity of juvenile large-mouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, **31**(2): 355-364. [田鑫鑫, 黄卫, 谢春元, 等. 发酵豆粕替代鱼粉对大口黑鲈幼鱼生长、饲料利用和消化酶活力的影响 [J]. 上海海洋大学学报, 2022, **31**(2): 355-364.]

[22] Lü Y Y. Effects of feeding level on growth, body composition and digestive enzymes activity of *Haliotis discus Hannai Ino* [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2022, **44**(3): 16-21. [吕云云. 不同投喂水平对皱纹盘鲍生长、体成分及消化酶活性的影响 [J]. 海洋湖沼通报, 2022, **44**(3): 16-21.]

[23] Zhou X Q, Liang H M. Change in the contents of lipid peroxide, and activity of antioxidant enzymes in the liver of mice under crowding stress [J]. *Zoological Research*, 2003, **24**(3): 238-240. [周显青, 梁洪蒙. 拥挤胁迫下小鼠肝脏脂质过氧化物含量和抗氧化物酶活性的变化 [J]. 动物学研究, 2003, **24**(3): 238-240.]

[24] Zhou X Q, Li S L, Wang X H, *et al*. Effects of vitamin C polyphosphate on liver lipid peroxides and antioxidase activity in mice [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2004, **50**(3): 370-374. [周显青, 李胜利, 王晓辉, 等. 维生素C多聚磷酸酯对小鼠肝脏脂质过氧化物和抗氧化物酶的影响 [J]. 动物学报, 2004, **50**(3): 370-374.]

[25] Wang C L, Zhao Y L, Zhao J F. Recent advances in chemical protein modification via cysteine [J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2022, **42**(9): 2774-2792. [王长流, 赵永丽, 赵军锋. 基于半胱氨酸的蛋白质化学修饰研究进展 [J]. 有机化学, 2022, **42**(9): 2774-2792.]

[26] Hu Y J, Hu Y, Shi Y, *et al*. Effects of dietary methionine on growth, serum biochemical indexes, serum free amino acid and muscle texture of rice field eel (*Monopterus albus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(6): 1155-1163. [胡亚军, 胡毅, 石勇, 等. 不同形式蛋氨酸对黄鳝生长、血清生化、血清游离氨基酸含量及肌肉品质的影响 [J]. 水生生物学报, 2019, **43**(6): 1155-1163.]

[27] Jiang S, Wu X, Li W, *et al*. Effects of dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization, body and plasma biochemical compositions of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂× *Epinephelus fuscoguttatus* ♀) juveniles [J]. *Aquaculture*, 2015(446): 148-155.

[28] Abdel-Tawwab M, Ahmad M H, Khattab Y A E, *et al*. Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) [J]. *Aquaculture*, 2010, **298**(3/4): 267-274.

[29] Wang Y J. Effects of different levels of protein and fat in feed on growth, serum biochemical indexes and liver and intestine health of *Spinibarbus nigricans* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2025. [王玉洁. 饲料中不同蛋白质和脂肪水平对黑脊倒刺鲃生长、血清生化指标以及肝肠健康的影响 [D]. 福州: 福建农林大学, 2025.]

[30] Zhang Y, Xie K, Shi Y, *et al*. Dietary protein and lipid level on growth, serum biochemi-cal index and liver antioxidant capacity of juvenile Asian red-tailed catfish (*Hemibagrus wyckioides*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2024, **48**(6): 968-978. [张姚铮泰, 谢凯, 石勇, 等. 饲料蛋白质和脂肪水平对丝尾鳠幼鱼生长、血清生化指标及肝脏抗氧化能力的影响 [J]. 水生生物学报, 2024, **48**(6): 968-978.]

[31] Pang L X, Huang K, Yu D, *et al*. Potential mechanism of *Sedum sarmentosum* Bunge extract in the intervention effects of *Oreochromis niloticus* fed with high fat based on liver metabonomics [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, **29**(8): 1134-1146. [庞琳星, 黄凯, 于丹, 等. 垂盆草提取物干预罗非鱼脂肪性肝病作用机制的代谢组学研究 [J]. 中国水产科学, 2022, **29**(8): 1134-1146.]

[32] Lu K L, Xu W N, Wang L N, *et al*. Hepatic β-oxidation and regulation of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed a high fat diet [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(3): e93135.

[33] Diehl K L, Vorac J, Hofmann K, *et al*. Kupffer cells sense free fatty acids and regulate hepatic lipid metabolism in high-fat diet and inflammation [J]. *Cells*, 2020, **9**(10): 2258.

[34] Domínguez-Avila J A, González-Aguilar G A, Alvarez-Parrilla E, *et al*. Modulation of PPAR expression and activity in response to polyphenolic compounds in high fat diets [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, **17**(7): 1002.

[35] Coccia E, Varricchio E, Vito P, *et al*. Fatty acid-specific alterations in leptin, PPARα, and CPT-1 gene expression in the rainbow trout [J]. *Lipids*, 2014, **49**(10): 1033-1046.

[36] Figueroa J L, Lewis A J, Miller P S, *et al*. Nitrogen metabolism and growth performance of gilts fed standard corn-soybean meal diets or low-crude protein, amino acid-supplemented diets [J]. *Journal of Animal Science*, 2002, **80**(11): 2911-2919.

[37] Wu L F, Zhou K, Yan L, *et al*. Effects of fermented soybean meal replacement of fishmeal on main biochemical parameters, protease activity and protein metabolism of *Rhynchocypris lagowskii* Dybowski [J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2020, **42**(1): 90-95. [吴莉芳, 周锴, 闫磊, 等. 发酵豆粕替代鱼粉对洛氏鱥血清主要生化指标、蛋白酶活力及蛋白质代谢的影响 [J]. 吉林农业大学学报, 2020, **42**(1): 90-95.]

[38] Zhang X, Liang M Q, Wei Y L, *et al*. Effects of dietary protein content and stocking density on growth performance, nitrogen excretion, and relevant biochemical parameters of juvenile *Takifugu rubripes* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, **42**(1): 74-83. [张晓, 梁萌青, 卫育良, 等. 饲料中蛋白质含量及养殖密度对红鳍东方鲀幼鱼生长性能、氮排泄及相关生化指标的影响 [J]. 渔业科学进展, 2021, **42**(1): 74-83.]

[39] Bibiano Melo J F, Lundstedt L M, Metón I, *et al*. Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of Rhamdia quelen (*Teleostei*: *Pimelodidae*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*: *Molecular & Integrative Physiology*, 2006, 145(2): 181-187.

[40] Zhang Y, Sun Z, Wang A, *et al*. Effects of dietary protein and lipid levels on growth, body and plasma biochemical composition and selective gene expression in liver of hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *Channa argus* ♂) fingerlings [J]. *Aquaculture*, 2017(468): 1-9.

[41] Cai C F, Wang W J, Ye Y T, *et al*. Effect of soybean meal, raffinose and stachyose on the growth, body composition, intestinal morphology and intestinal microflora of juvenile allogynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* ♀ × *Cyprinus carpio* ♂) [J]. *Aquaculture Research*, 2012, **43**(1): 128-138.

[42] Zhou Q L, Habte-Tsion H M, Ge X, *et al*. Growth performance and TOR pathway gene expression of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*, fed with diets replacing fish meal with cottonseed meal [J]. *Aquaculture Research*, 2017, **48**(7): 3693-3704.

DIETARY PROTEIN AND LIPID LEVELS ON GROWTH PERFORMANCE, HEPATIC ANTIOXIDANT CAPACITY, AND PROTEIN-LIPID META BOLISM OF *PELOPHYLAX NIGROMACULATA*

SHI Xu, WU Xiong-Qi, ZHONG Lei, HU Yi and DAI Ji-Hong

(*Fisheries College*, *Hunan Agricultural University*, *Changsha* 410128, *China*)

Abstract: This study was conducted to investigate the effects of different dietary protein and lipid levels on the growth performance, hepatic antioxidant capacity, and protein-lipid metabolism of juvenile *Pelophylax nigromaculatus*. A 4×2 factorial design was used, with dietary protein levels set at 38.5%, 41%, 43.5%, and 46%, and dietary lipid levels of 8% and 10%, resulting in the formulation of 8 experimental diets. Juvenile *P. nigromaculatus* with an initial body weight of (15.00±0.10) g were fed the diets for 8 weeks. The results indicated that the average weight gain rate (WGR) initially increased and then decreased with increasing dietary protein and lipid levels. The 41P10L group achieved the highest WGR, but no significant difference was observed compared with the 38.5P10L and 41P8L groups (P>0.05). Additionally, the 38.5P10L group showed the highest protein efficiency ratio (PER) (P<0.05). Among all groups, the 46% protein group had the highest average contents of serum total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), albumin (ALB), and urea nitrogen (BUN), while the 43.5% protein group exhibited the highest average contents of serum triglycerides (TG) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C)—with these respective indices in both groups being significantly higher than those in the 38.5% protein group (P<0.05). The results of oil red O staining indicated that lipid deposition in the liver of *P. nigromaculatus* was aggravated at the 10% lipid level, particularly under 43.5% and 46% protein levels (P<0.05). The average serum activities of glutamic-pyruvic transaminase (GPT) and glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) in the 46% protein group were significantly higher than those in the 38.5% protein group (P<0.05). Additionally, the average activities of intestinal digestive enzymes, hepatic antioxidant enzymes, and the malondialdehyde (MDA) content increased with the elevation of dietary protein and lipid levels. Regarding gene expression, the relative expression levels of hepatic *mtor* and *s6k* in the 46% protein group were significantly higher than those in the 38.5% protein group (P<0.05), while the hepatic *cpt1* expression level in the 10% lipid group was significantly higher than that in the 8% lipid group (P<0.05). In conclusion, although a dietary protein level of 41% supported higher WGR, it resulted in reduced PER. In contrast, dietary protein levels of 43.5% and 46% were more prone to induce aggravated hepatic lipid deposition and hepatic injury. Considering comprehensive factors including growth performance, protein utilization efficiency, and hepatic health, the optimal dietary protein level for *P. nigromaculatus* was determined to be 38.5%, with an optimal dietary lipid level of 10%.

Key words: Feed protein; Feed Lipid; Growth performance; Antioxidant capacity; Protein-lipid metabolism; *Pelophylax nigromaculatus*