



## 动植物蛋白对日本沼虾生长、肌肉组成、抗氧化、TOR 信号通路及食欲调节相关基因表达的影响

郑金仙, 周东生, 魏山山, 熊云凤, 孔有琴, 张易祥,  
赵建华, 刘艳, 戚常乐, 丁志丽\*

(湖州师范学院, 浙江省水生生物资源养护与开发技术研究重点实验室,  
中国水产科学研究院水生动物繁育与营养重点实验室, 浙江 湖州 313000)

**摘要:** 为探讨动植物蛋白对日本沼虾生长、肌肉组成、抗氧化、TOR 信号通路及食欲调节相关基因表达的影响, 实验配制了 3 组等氮等能饲料, 分别为鱼粉组 (FM)、混合植物蛋白组 (豆粕, 菜粕, 玉米蛋白粉) (PPB) 和混合植物蛋白添加氨基酸组 (PPB/Aa), 投喂饲养日本沼虾 8 周。结果发现, PPB 和 PPB/Aa 组日本沼虾增重率和摄食率显著低于 FM 组, 而饲料系数显著高于 FM 组, 各组之间成活率和肌肉必需氨基酸组成无显著差异; FM 组肝胰腺丙二醛 (MDA) 含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性显著低于 PPB 组和 PPB/Aa 组, 各组谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT) 无显著差异, PPB 与 PPB/Aa 组血清碱性磷酸酶 (AKP)、酸性磷酸酶 (ACP) 和 ALT 的活性均显著高于 FM 组; 与 FM 组相比, PPB 与 PPB/Aa 组显著降低了雷帕霉素靶蛋白 (TOR)、核糖体蛋白 S6 激酶 (S6K) 及神经肽 (NPY) 基因的表达, 但各组瘦素 (leptin) 基因的表达无显著差异。研究表明, 鱼粉与混合植物蛋白对日本沼虾肌肉中氨基酸组成无显著影响, 但混合植物蛋白源降低了虾的生长和抗氧化能力及 TOR 信号通路及 NPY 基因表达, 且添加氨基酸不能缓解混合植物蛋白所引起的生长抑制、氧化应激及蛋白质合成和食欲相关基因表达的降低。

**关键词:** 日本沼虾; 鱼粉; 混合植物蛋白源; 肌肉氨基酸; TOR 信号通路; 食欲

**中图分类号:** S 963.32

**文献标志码:** A

近年来, 随着水产养殖业的迅速发展, 水产动物对鱼粉<sup>[1]</sup>的需求量逐渐增大, 鱼粉供需紧张, 价格居高不下。为有效解决该现状, 研究者们尝试寻找合适的蛋白源来取代鱼粉以促进水产养殖业的可持续发展。其中, 植物蛋白因来源广泛、供应稳定、价格低廉但蛋白质含量较高, 已成为水产饲料中常用的蛋白源<sup>[2]</sup>。目前, 水产养殖常

用的植物蛋白源有豆粕、菜粕、玉米蛋白粉等<sup>[3]</sup>。然而, 单一植物蛋白源由于氨基酸不平衡或含有抗营养因子, 限制了其在饲料中的大量应用, 将不同植物蛋白源进行混合则可改善单一植物蛋白氨基酸不平衡的缺陷<sup>[4]</sup>。同时, 在混合饲料中添加某些氨基酸 (蛋氨酸、赖氨酸、甘氨酸等), 将有利于饲料中氨基酸平衡, 提高动物摄食, 改善

收稿日期: 2022-06-23 修回日期: 2022-07-31

资助项目: 湖州市自然科学基金 (2019YZ04)

第一作者: 郑金仙 (照片), 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: 2577038071@qq.com

通信作者: 丁志丽, 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: dingzhili@zjhu.edu.cn



动物生长性能<sup>[5-6]</sup>。其次,水产动物的生长在很大程度上依赖于蛋白质沉积,而蛋白质沉积又依赖于蛋白质合成和降解之间的平衡<sup>[7]</sup>。在蛋白质代谢研究中发现,雷帕霉素靶蛋白(target of rapamycin, TOR)信号通路在水产动物蛋白质合成代谢中起着关键作用<sup>[8]</sup>,它通过调控核糖体蛋白 S6 激酶(ribosomal proteins 6 kinase, S6K)和真核翻译起始因子蛋白(eukaryotic initiation factor 4E binding protein, 4E-BP)调控蛋白质的合成<sup>[9]</sup>。研究发现,动植物蛋白会显著影响 TOR 信号通路相关基因的表达,从而影响机体蛋白质合成,且不同物种、不同动植物蛋白会对 TOR 信号通路产生的影响不同<sup>[10-12]</sup>。

食欲对水产动物的生长也起着至关重要的作用,且食欲与摄食直接相关,摄食调控是由内分泌系统通过在器官之间(下丘脑和周围器官)传递信息来调节细胞活动<sup>[13]</sup>。目前,众多参与食欲调控的激素和神经递质已被发现<sup>[14]</sup>。在鱼类中,已经发现了食欲激素神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)和瘦素(leptin)等参与摄食调控<sup>[15-16]</sup>。NPY 在刺激摄食方面起着重要作用<sup>[13]</sup>。有研究表明,大豆浓缩蛋白可通过 NPY 基因表达水平的高低来调控瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)的摄食<sup>[17]</sup>。而 leptin 常常作为一种抑制鱼类摄食的厌食症基因<sup>[18]</sup>。在花鲈(*Lateolabrax japonicus*)摄食调控研究中发现,leptin 具有抑制摄食的作用<sup>[19]</sup>。同时,在大西洋鲷(*Sparus aurata*)的研究中发现,leptin 基因表达水平与营养状况和饲料营养成分密切相关<sup>[20]</sup>。然而,迄今为止,leptin 和 NPY 在水产动物上的研究主要集中于鱼类,在经济甲壳动物上仅见对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)<sup>[21]</sup>与中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)<sup>[22]</sup>。

日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)俗称青虾、河虾,具有适应能力较强、分布广、经济价值高的特点,是我国重要的淡水养殖品种之一。日本沼虾食性为杂食偏肉食性,在饲料配方中,其对鱼粉需求较高,因此较多的研究关注于植物蛋白替代鱼粉问题。但相关的研究<sup>[23-24]</sup>往往使用单一蛋白源,且未探讨混合植物蛋白影响该虾生长和摄食的机制。本实验以日本沼虾为研究对象,探讨鱼粉与混合植物蛋白源(豆粕,菜粕和玉米蛋白粉)对日本沼虾生长、抗氧化、TOR 信号通路与食欲调节相关基因表达的影响,为日本沼虾对植物蛋白利用率提高、营养配方的优化提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 饲料的配制

以鱼粉或植物蛋白为蛋白源,鱼油和豆油为脂肪源,配制了 3 种等氮等能的饲料(表 1),其中以粗蛋白含量为 37.78% 的鱼粉蛋白为对照组(命名为 FM),用混合植物蛋白(豆粕、玉米蛋白粉和菜籽粕)完全替代鱼粉饲料(命名为 PPB),在混合植物蛋白中添加赖氨酸、苏氨酸和蛋氨酸,使氨基酸含量尽量与 FM 组相近(命名为 PPB/Aa)。饲料实测氨基酸含量见表 2。

### 1.2 实验对象及养殖管理

日本沼虾幼虾购于浙江吴越农业股份有限公司。在养殖实验之前,对养殖使用的所有器具进行清洗和消毒处理,在每个水族箱中放置一定量的蓝色水管和网片作为虾的隐藏地,以减少虾蜕壳时遭到攻击和争夺饲料而产生的伤亡。先将虾放置于暂养桶中以基础饲料喂养一周,使其适应条件。随后选择健康、大小均匀、初始体质量为(0.123±0.03)g 的日本沼虾幼虾,随机放入 18 个水族箱(300 L)中,每组 6 个平行,每箱 70 尾虾。每日两次(08:00 和 17:00)定时饱食投喂,在投喂 1 h 后收集残饵,同时在每日 15:00 观察虾状态并统计死虾数目。在期间,监测水质参数,水温范围在 25~28 °C,溶解氧>6.5 mg/L,氨和硝酸盐含量<0.1 mg/L。为确保水质,每个水箱中每天更换 30% 的水,持续 8 周。

### 1.3 样品采集

养殖结束,日本沼虾饥饿 24 h 后,称重、统计各组虾的成活率。用无菌解剖器取出虾的肝胰腺和肌肉,同时用无菌注射器取出血液,离心后得到血清。最后,将肝胰腺、肌肉及血清保存于-80 °C 备用。

### 1.4 指标测定

生长性能的测定与计算

成活率(survival rate, SR, %)= $100 \times N_2/N_1$ ;

增重率(weight gain, WG, %)= $100 \times (W_t - W_0)/W_0$ ;

特定生长率(specific growth rate, SGR, %)= $100 \times (\ln W_t - \ln W_0)/t$ ;

饲料系数(feed conversion ratio, FCR, %)= $100 \times F/(W_t - W_0)$ ;

表 1 饲料配方及营养组成 (干物质,%)

Tab. 1 Ingredient and proximate composition of experimental diets (dry matter,%)

原料 ingredients	FM	PPB	PPB/Aa
鱼粉 fish meal	58.00		
豆粕 soybean meal		45.80	44.50
玉米蛋白粉 corn gluten meal		23.00	21.00
菜粕 rapeseed meal		9.00	8.00
赖氨酸 lysine			1.400
苏氨酸 threonine			0.388
蛋氨酸 methionine			0.399
预糊化淀粉 pregelatinized starch	26.00	9.00	9.00
鱼油:豆油(2:1) fish oil:soybean oil(2:1)	4.00	4.70	5.00
大豆卵磷脂 soybean lecithin	0.50	0.50	0.50
胆固醇 cholesterol	0.50	0.50	0.50
氯化胆碱 choline chloride	0.50	0.50	0.50
维生素预混物 <sup>1)</sup> vitamin premix <sup>1)</sup>	2.00	2.00	2.00
矿物质预混物 <sup>2)</sup> mineral premix <sup>2)</sup>	3.00	3.00	3.00
纤维素 cellulose	3.50		1.81
羧甲基纤维素钠 carboxymethylcellulase sodium	2.00	2.00	2.00
合计 total	100.00	100.00	100.00
<b>营养成分(干物质) proximate composition (dry matter)</b>			
粗蛋白 crude protein	37.78	37.73	37.73
粗脂肪 crude lipid	8.22	8.23	8.33
粗灰分 crude ash	6.63	3.38	3.20
无氮浸出物 <sup>3)</sup> nitrogen-free extract <sup>3)</sup>	37.30	41.32	39.78
能量 <sup>4)</sup> gross energy <sup>4)</sup>	16.68	17.29	17.09

注: 1. 每千克维生素预混料含有: VA 1.29 g, VC 57.5 g, VE 20 g, VD<sub>3</sub> 0.63 g, VK<sub>3</sub> 1.8 g, VB<sub>1</sub> 7.5 g, VB<sub>2</sub> 2.63 g, VB<sub>6</sub> 1 g, VB<sub>12</sub> 0.15 g, 烟酸 5 g, 叶酸 0.19 g, 肌醇 60 g, 生物素 0.75 g, 泛酸钙 5 g, 对氨基苯甲酸 5 g, α-纤维素 831.56 g。2. 每千克矿物质预混料含有: KCl 28 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 100 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 215 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 g, Ca (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 265 g, CaCO<sub>3</sub> 105 g, C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>CaO<sub>6</sub>·5H<sub>2</sub>O 165 g, FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·5H<sub>2</sub>O 12 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4.76 g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1.07 g, AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.15 g, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.4 g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.4 g, KI 0.23 g, α-纤维素 0.043 g。3. 无氮浸出物=干物质%-(粗蛋白%+粗脂肪%+粗纤维%+粗灰分%)。4. 能量=(粗蛋白%×16.7 kJ/g+粗脂肪%×37.6 kJ/g+无氮浸出物%×16.7 kJ/g)/干物质%。

Notes: 1. Contained the following per kg of vitamin premix: VA 1.29 g, VC 57.5 g, VE 20 g, VD<sub>3</sub> 0.63 g, VK<sub>3</sub> 1.8 g, VB<sub>1</sub> 7.5 g, VB<sub>2</sub> 2.63 g, VB<sub>6</sub> 1 g, VB<sub>12</sub> 0.15 g, nicotinic acid 5 g, folic acid 0.19 g, inositol 60 g, biotin 0.75 g, calcium pantothenate 5 g, aminobenzoic acid 5 g, α-cellulose 831.56 g。2. Contained the following per kg of mineral premix: KCl 28 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 100 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 215 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 g, Ca (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 265 g, CaCO<sub>3</sub> 105 g, C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>CaO<sub>6</sub>·5H<sub>2</sub>O 165 g, FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·5H<sub>2</sub>O 12 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4.76 g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1.07 g, AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.15 g, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.4 g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.4 g, KI 0.23 g, α-cellulose 0.043 g。3. Nitrogen-free extract = dry matter % - (crude protein % + crude lipid % + crude fiber % + crude ash %)。4. gross energy = (crude protein % × 16.7 kJ/g + crude lipid % × 37.6 kJ/g + nitrogen-free extract % × 16.7 kJ/g)/dry matter %。

表 2 饲料氨基酸组成 (干物质, %)

Tab. 2 Amino acid content of experimental diets (dry matter, %)

氨基酸 amino acids	组别 groups		
	FM	PPB	PPB/Aa
<b>必需氨基酸 EAA</b>			
苏氨酸 Thr	2.13±0.04 <sup>b</sup>	1.93±0.04 <sup>a</sup>	2.22±0.04 <sup>b</sup>
蛋氨酸 Met	1.25±0.08 <sup>c</sup>	0.64±0.05 <sup>a</sup>	0.89±0.03 <sup>b</sup>
赖氨酸 Lys	3.34±0.06 <sup>b</sup>	2.00±0.03 <sup>a</sup>	3.27±0.11 <sup>b</sup>
缬氨酸 Val	2.26±0.07 <sup>b</sup>	2.18±0.03 <sup>b</sup>	1.93±0.06 <sup>a</sup>
异亮氨酸 Ile	1.81±0.01 <sup>b</sup>	1.93±0.02 <sup>c</sup>	1.73±0.05 <sup>a</sup>
亮氨酸 Leu	3.23±0.05 <sup>a</sup>	5.34±0.03 <sup>c</sup>	4.76±0.13 <sup>b</sup>
组氨酸 His	1.31±0.02 <sup>c</sup>	1.04±0.01 <sup>b</sup>	0.93±0.03 <sup>a</sup>
精氨酸 Arg	2.52±0.03 <sup>b</sup>	2.54±0.03 <sup>b</sup>	2.28±0.06 <sup>a</sup>
苯丙氨酸 Phe	1.81±0.02 <sup>a</sup>	2.58±0.02 <sup>c</sup>	2.32±0.06 <sup>b</sup>
<b>非必需氨基酸 NEAA</b>			
天冬氨酸 Asp	9.70±0.21 <sup>b</sup>	9.85±0.23 <sup>b</sup>	9.02±0.18 <sup>a</sup>
甘氨酸 Gly	2.81±0.03 <sup>a</sup>	1.87±0.02 <sup>b</sup>	1.68±0.04 <sup>c</sup>
丝氨酸 Ser	1.67±0.03 <sup>a</sup>	2.33±0.03 <sup>c</sup>	2.11±0.04 <sup>b</sup>
丙氨酸 Ala	2.94±0.02 <sup>a</sup>	3.03±0.03 <sup>a</sup>	2.71±0.08 <sup>b</sup>
酪氨酸 Tyr	1.26±0.02 <sup>a</sup>	1.87±0.01 <sup>c</sup>	1.70±0.04 <sup>b</sup>
谷氨酸 Glu	3.40±0.92	3.90±2.09	2.63±1.38
半胱氨酸 Cys	0.42±0.05 <sup>a</sup>	0.63±0.05 <sup>b</sup>	0.58±0.05 <sup>b</sup>
脯氨酸 Pro	6.03±0.07 <sup>a</sup>	8.52±0.13 <sup>c</sup>	7.82±0.12 <sup>b</sup>

注: 1. 同行数据上标不同字母表示差异显著(P<0.05), 相同字母或无字母表示差异不显著(P>0.05), 下同。2. 色氨酸在酸水解过程中被破坏, 未能检测。

Notes: 1. in the same row, values with different superscripts mean significant differences (P<0.05) same letter superscript or no letter superscript mean no significant differences (P>0.05). The same below. 2. Tryptophan was destroyed during hydrolyzation by the hydrochloric acid. EAA. essential amino acids, NEAA. non-essential amino acids.

$$\text{摄食率 (feeding rate, FR, \%)} = 100 \times F/[t \times (W_t + W_0)/2]$$

式中, W<sub>0</sub> 为初始体质量 (g); W<sub>t</sub> 为终末体质量 (g); F 为摄入饲料 (g); t 为天数 (d); N<sub>1</sub> 为初始尾数; N<sub>2</sub> 为终末尾数。

饲料常规营养成分及肌肉氨基酸含量检测

采用杜马斯定氮仪测定粗蛋白含量 (FOSS, Kjelttec 2200, 丹麦); 采用索氏抽提法测定粗脂肪含量 (FOSS, Soxtec<sup>TM</sup>2043, 丹麦); 采用 105 °C 恒温烘干失重法测定水分; 采用马弗炉 550 °C 灼烧法测定粗灰分; 称取饲料样品和肌肉样品加 6 mol/L 的盐酸置于 110 °C 的鼓风干燥箱中恒温 24 h, 样品预处理后用日立 L-8900 型氨基酸自动分析仪测定饲料及肌肉中氨基酸含量。

免疫指标及抗氧化性能的测定 用电子



天平准确称取肝胰腺约 0.5 g, 按质量体积比 1 : 9 加入预冷 0.86% 的生理盐水制成 10% 匀浆液, 3 500 r/min 离心 15 min, 采用考马斯亮兰法测定上清液中蛋白浓度, 同时根据各种酶活性的测定要求将肝胰腺上清液稀释成不同浓度。血清中酸性磷酸酶 (acid phosphatase, ACP)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性, 以及肝胰腺中 ALT、AST、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性以及谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性的测定步骤参照南京建成生物工程研究所试剂盒说明书进行。

基因表达的荧光定量 PCR(qRT-PCR) 分析

使用总 RNA 提取试剂盒 (艾德莱, 北京) 提取肝胰腺总 RNA, 具体操作过程按试剂盒说明书进行, 检测 RNA 的完整性及其浓度。用反转录试剂盒 (TaKaRa, 日本) 将 RNA 反转录为 cDNA, cDNA 保存在  $-20^{\circ}\text{C}$  用于 TOR、S6K、NPY 和 leptin 的 qRT-PCR 分析。采用在线 Primer 5 设计引物, qRT-PCR 所用引物如下: TOR(登录号: ON693258) 上游引物 5'-TCTTCCAGAACTGCCACC-3', 下游引物 5'-CATGCTCTTTGCCTGATTG-3'; S6K(登录号: ON693253) 上游引物 5'-GGTCTTTGAGGGCTTTACG-3', 下游引物 5'-GTCCAGCAGAGTTTGGTGTAT-3'; NPY(登录号: ON693257) 上游引物 5'-CTTACCCGCCAGACAGT-3', 下游引物 5'-AGCACCATAAGCGCCATA-3'; leptin(登录号: ON693256) 上游引物 5'-GGCACCAATCCCGAGTCTTAT-3', 下游引物 5'-CCAAATGCTGACACCACCAAC-3'。反应体积为 20  $\mu\text{L}$ , 包括: 10  $\mu\text{L}$  的 2 $\times$  SYBR Green Premix Ex Taq(TaKaRa, 日本), 上、下游引物各 0.2  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  模板, 7.6  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。qRT-PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 94  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  20 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  20 s; 共 40 个循环; PCR 反应后温度以每 5 s 上升 5  $^{\circ}\text{C}$  的速度从 60  $^{\circ}\text{C}$  上升到 95  $^{\circ}\text{C}$ , 绘制熔解曲线, 以判断扩增产物的正确性。以日本沼虾  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin, 上游引物 5'-GTGCCCATCTACGAGGGTGA-3', 下游引物 5'-CGTCAGGGAGCTCGTAAGAC-3') 为内参, 对得到的各样品循环数 (C<sub>t</sub>) 值进行均一化处理, 以对照组 (FM 组) mRNA 为基准, 使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  比较 C<sub>t</sub> 值

方法<sup>[25]</sup>对目的基因 mRNA 相对表达水平进行分析。

## 1.5 数据分析

数据用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 若组间差异显著, 再用 Tukey 氏法进行多重比较不同蛋白源对日本沼虾生长和生理指标的影响, 用最小显著差异法 (LSD) 检验不同处理条件下各个指标的差异显著性, 以  $P < 0.05$  为差异显著标准, 结果采用平均值  $\pm$  标准差显示。

## 2 结果

### 2.1 动、植物蛋白对日本沼虾生长性能的影响

结果显示, FM、PPB、PPB/Aa 3 组之间日本沼虾成活率 (SR) 无显著差异 ( $P > 0.05$ ); FM 组的增重率 (WGR)、特定生长率 (SGR) 及摄食率 (FR) 均显著高于 PPB、PPB/Aa 组 ( $P < 0.05$ ), 同时饲料系数 (FCR) 呈相反结果, 即 FM 组 FCR 显著低于其余两组 ( $P < 0.05$ ); 成活率与特定生长率在 PPB 与 PPB/Aa 组间均无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (表 3)。

表 3 动植物蛋白对日本沼虾生长性能的影响

Tab. 3 Effects of animal and plant proteins on growth performance of *M. nipponense*

项目 items	FM	PPB	PPB/Aa
增重率/% WGR	324.99 $\pm$ 31.05 <sup>b</sup>	201.84 $\pm$ 17.99 <sup>a</sup>	200.60 $\pm$ 12.52 <sup>a</sup>
特定生长率/(%/d) SGR	2.62 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	2.01 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	2.01 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
成活率/% SR	78.10 $\pm$ 5.78	71.43 $\pm$ 1.43	75.24 $\pm$ 5.02
饲料系数 FCR	1.69 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	1.99 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	2.20 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>
摄食率/% FR	5.32 $\pm$ 0.71 <sup>b</sup>	3.77 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	4.41 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>

### 2.2 动、植物蛋白对日本沼虾肌肉氨基酸组成的影响

实验结束后, 检测各组日本沼虾肌肉氨基酸组成 (表 4), 除 FM 组甘氨酸含量显著低于 PPB 组外 ( $P < 0.05$ ), 其余氨基酸 (包括赖氨酸、苏氨酸和蛋氨酸) 在各组之间均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 动、植物蛋白对日本沼虾血清生化指标的影响

3 种饲料组对日本沼虾血清中谷草转氨酶 (AST) 活性无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 但 FM 组谷丙转氨酶 (ALT) 活性显著低于其余两组 ( $P < 0.05$ ); 日本沼虾血清中碱性磷酸酶 (AKP) 与酸性磷酸酶 (ACP) 的活性在各组间均存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 且 FM 组显著低于其余两组 ( $P < 0.05$ ) (表 5)。

表 4 动、植物蛋白对日本沼虾肌肉氨基酸组成的影响 (以鲜样计)

Tab. 4 Effects of animal and plant proteins on amino acids composition of muscle of *M. nipponense* (fresh weight basis) %

氨基酸 amino acids	FM	PPB	PPB/Aa
天冬氨酸 Asp	6.30±0.28	6.44±0.16	6.55±0.38
苏氨酸 Thr	0.80±0.03	0.80±0.02	0.82±0.05
丝氨酸 Ser	1.10±0.05	1.10±0.02	1.11±0.05
谷氨酸 Glu	3.06±0.12	2.97±0.10	2.94±0.17
甘氨酸 Gly	1.57±0.07 <sup>a</sup>	1.75±0.05 <sup>b</sup>	1.67±0.07 <sup>ab</sup>
丙氨酸 Ala	1.38±0.11	1.30±0.03	1.30±0.08
半胱氨酸 Cys	0.15±0.01	0.14±0.00	0.15±0.01
缬氨酸 Val	0.99±0.04	0.97±0.02	0.98±0.06
蛋氨酸 Met	0.64±0.03	0.64±0.01	0.65±0.05
异亮氨酸 Ile	0.99±0.05	0.98±0.02	0.99±0.06
亮氨酸 Leu	1.71±0.09	1.70±0.04	1.73±0.11
酪氨酸 Tyr	0.81±0.04	0.83±0.02	0.83±0.05
苯丙氨酸 Phe	0.92±0.04	0.94±0.03	0.94±0.05
赖氨酸 Lys	1.98±0.12	1.90±0.05	1.93±0.12
组氨酸 His	0.48±0.02	0.49±0.01	0.53±0.05
精氨酸 Arg	2.22±0.06	2.06±0.03	2.16±0.20
脯氨酸 Pro	2.51±0.08	2.51±0.04	2.56±0.15
必需氨基酸 EAA	10.72±0.44	10.49±0.23	10.72±0.76
非必需氨基酸 NEAA	16.86±0.74	17.03±0.40	17.12±0.86
总氨基酸 TAA	27.58±1.18	27.52±0.63	27.84±1.62

注: 色氨酸在酸水解过程中被破坏, 未能检测  
Notes: Tryptophan was destroyed during hydrolyzation by the hydrochloric acid. EAA. essential amino acids, NEAA. non-essential amino acids. TAA. total amino acids

2.4 动、植物蛋白对日本沼虾肝胰腺氨基酸转运和抗氧化能力的影响

各组日本沼虾的肝胰腺中谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 活性均无显著差异 ( $P>0.05$ )。不同蛋白源对抗氧化酶活性也存在显著影响, FM

表 5 动、植物蛋白对日本沼虾血清生化指标的影响

Tab. 5 Effects of animal and plant proteins on serum biochemical indices of *M. nipponense*

项目 items	FM	PPB	PPB/Aa
碱性磷酸酶/(U/L) AKP	11.29±0.09 <sup>a</sup>	17.88±0.23 <sup>c</sup>	14.53±0.09 <sup>b</sup>
酸性磷酸酶/(U/L) ACP	8.60±0.20 <sup>a</sup>	11.90±0.10 <sup>c</sup>	10.68±0.13 <sup>b</sup>
谷丙转氨酶/(IU/L) ALT	20.66±1.79 <sup>a</sup>	26.71±0.73 <sup>b</sup>	26.11±0.93 <sup>b</sup>
谷草转氨酶/(IU/L) AST	20.72±2.10	22.64±3.07	24.62±2.96

组丙二醛 (MDA) 的含量与超氧化物歧化酶 (SOD) 活性均显著低于 PPB 和 PPB/Aa 组 ( $P<0.05$ ), 且 FM 组谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活性也显著低于其余两组 ( $P<0.05$ ) (表 6)。

2.5 动、植物蛋白对日本沼虾 TOR 信号通路及食欲调节相关基因表达的影响

TOR 与 S6K 在 FM 组的相对表达量最高, 且显著高于 PPB 组与 PPB/Aa 组 ( $P<0.05$ ), NPY 相对表达量在 FM 组最高, 且显著高于 PPB 组与 PPB/Aa 组 ( $P<0.05$ ), 而 leptin 的相对表达量在各组之间无显著差异 ( $P>0.05$ ) (图 1)。

3 讨论

3.1 动、植物蛋白对日本沼虾生长性能的影响

提高水产动物对植物蛋白源的利用率, 是目前水产饲料行业的一个研究热点。相对于单一植物蛋白源, 混合植物蛋白可改善单一植物蛋白源的不足<sup>[7]</sup>。但是混合植物蛋白源在饲料中的比例需要控制在一定范围内才不会对水产动物生长性能产生负面影响, 对比莫桑比克尼罗罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 在混合植物蛋白源组与鱼粉组的研究结果中发现, 鱼体增重率、特定生长率、饲料系数显著升高, 鱼体的生长性能受到显著影响<sup>[26]</sup>; 在凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 研究

表 6 动、植物蛋白对日本沼虾肝胰腺氨基酸转运和抗氧化能力的影响

Tab. 6 Effects of animal and plant proteins on amino acids transport and antioxidant capacity in hepatopancreas of *M. nipponense*

项目 items	FM	PPB	PPB/Aa
谷草转氨酶/(U/g prot) AST	3.91±0.19	4.22±0.19	4.53±0.77
谷丙转氨酶/(U/g prot) ALT	5.19±0.69	4.94±1.20	6.35±1.65
丙二醛/(nmol/mg prot) MDA	5.76±0.54 <sup>a</sup>	7.47±0.85 <sup>b</sup>	8.11±0.59 <sup>b</sup>
超氧化物歧化酶/(U/mg prot) SOD	23.58±1.27 <sup>a</sup>	30.69±1.81 <sup>b</sup>	32.89±3.65 <sup>b</sup>
谷胱甘肽过氧化物酶/(U/mg prot) GSH-PX	122.78±1.92 <sup>a</sup>	133.74±1.98 <sup>b</sup>	135.77±6.72 <sup>b</sup>

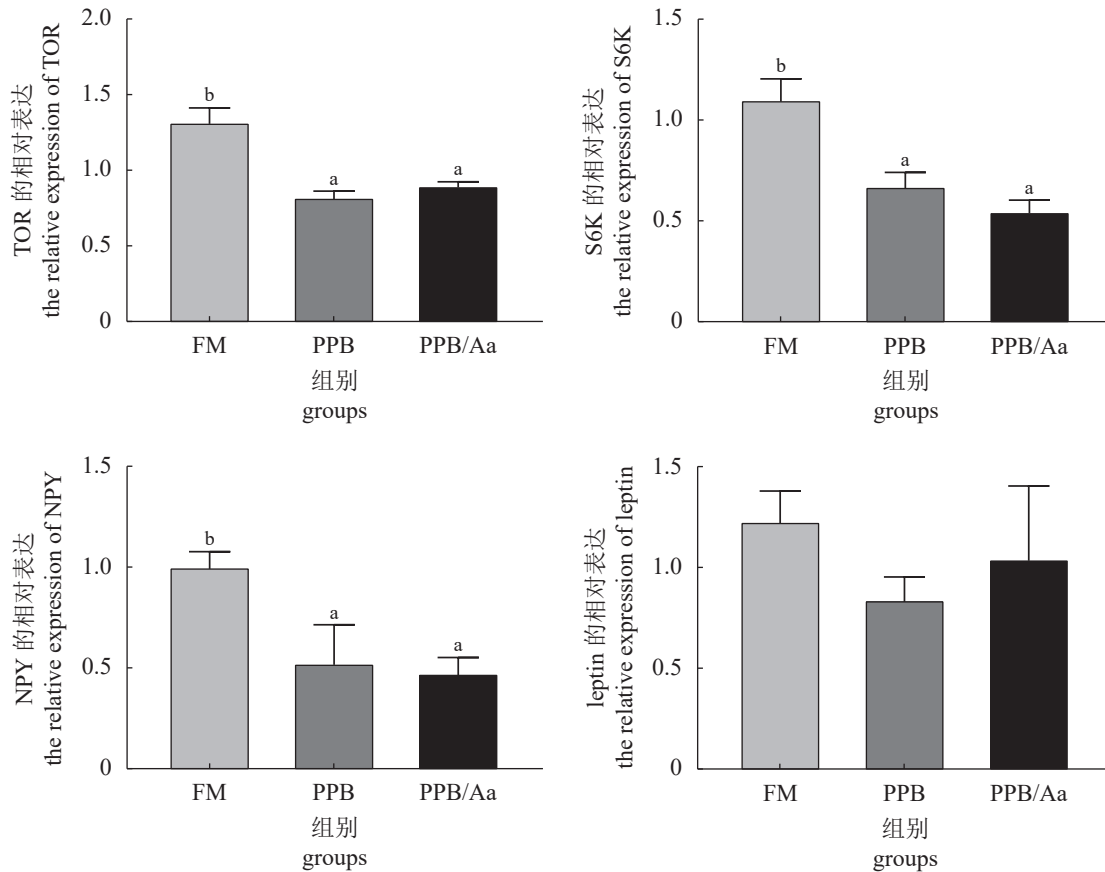


图 1 动、植物蛋白对日本沼虾 TOR 信号通路及食欲调节相关基因表达的影响

数据柱形标注不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 相同字母或无字母表示无显著差异 ( $P > 0.05$ )

Fig. 1 Effects of animal and plant proteins on TOR signaling pathway and genes related to appetite regulation expression of *M. nipponense*

Value columns with different small letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ), values columns with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference ( $P > 0.05$ )

中同样发现全复合植物蛋白导致凡纳滨对虾的生长率显著降低<sup>[27]</sup>。在本实验中, 同样发现在全植物蛋白组 (PPB) 饲料中, 出现增重率显著低于鱼粉组, 但饲料系数显著高于鱼粉组的现象, 这可能是植物蛋白缺乏鱼粉所含有的必需氨基酸, 如蛋氨酸、赖氨酸及苏氨酸等缺乏而导致日本沼虾的生长性能受到抑制。

为解决植物蛋白氨基酸不平衡, 可在植物蛋白中补充晶体氨基酸以改善植物蛋白源中氨基酸的组成<sup>[28]</sup>。研究发现, 在克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 幼虾的研究中植物蛋白中添加赖氨酸和蛋氨酸可提高其生长性能<sup>[29]</sup>; 在团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 上也得到类似结果, 与鱼粉组相比较, 植物蛋白源棉粕和菜粕作为饲料主要蛋白源时, 鱼的增重率显著降低, 饵料系数显著增大, 但是添加赖氨酸和蛋氨酸后, 这一负面影响就得

到消除<sup>[30]</sup>。以上研究说明, 在混合植物蛋白的基础上补充氨基酸使其氨基酸组成与鱼粉相似, 可使生长性能得到提高或改善。而本实验发现, 即使混合植物蛋白补充氨基酸 (PPB/Aa 组), 使赖氨酸和苏氨酸含量得以改善, 但日本沼虾生长性能仍显著低于鱼粉组, 这可能与该虾不能很好地利用晶体氨基酸有关。值得注意的是, 尽管 PPB/Aa 组补充了一定量的蛋氨酸, 但 PPB/Aa 组蛋氨酸实测值仍然低于鱼粉蛋白组, 根据日本沼虾最佳蛋氨酸需求量<sup>[31]</sup>, PPB/Aa 组和 FM 组蛋氨酸的含量都达到了该虾的最佳需求, 因此蛋氨酸的差异对该虾生长产生的影响相对较少。另外, 混合植物蛋白组虾的生长性能下降可能与植物蛋白存在抗营养因子有关, 本研究所用混合植物蛋白源 (豆粕, 菜粕, 玉米蛋白粉) 豆粕中含有蛋白酶抑制因子、凝集素、植酸等抗营养因子<sup>[32]</sup>, 菜粕中

也含有多种抗营养因子, 如硫代葡萄糖甙、芥酸、植酸和单宁等, 这些抗营养因子都容易影响动物摄食和对饲料的利用<sup>[33]</sup>。此外, 该虾食性为杂食性偏肉食性, 对鱼粉依赖性强, 而含抗营养因子的全植物蛋白容易引起其食欲下降, 从而导致其生长受到抑制, 这从本实验中混合植物蛋白组 (PPB) 以及混合植物蛋白补充氨基酸组 (PPB/Aa) 具有较低的摄食率可得到印证。

### 3.2 动、植物蛋白对日本沼虾氨基酸转运和肌肉氨基酸组成的影响

氨基酸组成在一定程度上反映了动物对不同蛋白质利用程度<sup>[34]</sup>。本实验发现, 除 FM 组肌肉中甘氨酸含量显著低于 PPB 组, 其余非必需氨基酸与必需氨基酸包括赖氨酸、苏氨酸和蛋氨酸的含量在植物蛋白组、植物蛋白添加氨基酸组以及鱼粉组之间差异并不显著, 说明尽管饲料氨基酸存在差异, 但并不影响该虾肌肉中氨基酸特别是必需氨基酸的组成。同样, 在对尼罗罗非鱼幼鱼<sup>[26]</sup>的研究中也发现, 100% 混合植物蛋白组肌肉中除组氨酸和甘氨酸含量显著低于对照组外, 其余必需和非必需氨基酸含量与对照组无显著差异。然而, 在对凡纳滨对虾混合植物蛋白替代鱼粉<sup>[27]</sup>的研究中发现, 替代组虾肌肉氨基酸含量与鱼粉组比较, 无论是必需氨基酸还是非必需氨基酸, 都无显著差异。以上研究说明, 肌肉组织中氨基酸含量的差异可能与不同物种利用动植物蛋白的效率有一定关联。虽然不同饲料组之间氨基酸存在差异, 但饲料氨基酸的实测值均接近日本沼虾对氨基酸的需求<sup>[35]</sup>, 即饲料中氨基酸已经满足了该虾对氨基酸的需求, 这可能是导致肌肉中大部分氨基酸无差异的原因之一。有研究表明, 动物体内的氨基酸主要在转氨酶和脱氨酶的作用下进行代谢与转化<sup>[36]</sup>。AST 与 ALT 是体内重要的氨基酸转移酶<sup>[37]</sup>, 而本试验发现 PPB 组与 PPB/Aa 组的肝胰腺中 AST 与 ALT 活性与 FM 组无显著差异, 因此, 转氨酶与该虾各组无显著差异的肌肉氨基酸组成 (甘氨酸除外) 是否存在潜在的关系, 值得进一步研究。

### 3.3 动、植物蛋白对日本沼虾肝胰腺抗氧化能力和血清生化指标的影响

评价蛋白质替代是否有效主要取决于健康状况, 而反映健康状况的重要标志之一是抗氧化性

能<sup>[38-39]</sup>。机体在正常的生理活动中会进行氧化反应, 从而代谢出活性氧 (ROS)<sup>[40]</sup>。如果机体缺乏营养就会导致 ROS 生成的增加, 如果这种增加超过机体的抗氧化防御能力, 就易扰乱氧化还原稳态, 导致氧化应激, 从而破坏机体正常代谢<sup>[41]</sup>。SOD 和 GSH-Px 是广泛存在于机体内的抗氧化酶, 参与机体氧化损伤的防御, 这些酶可以结合起来清除活性氧 ROS, 保护机体免受损伤<sup>[33, 42]</sup>。同时, 过量的自由基会导致机体脂质过氧化, MDA 是脂质过氧化产物, 其含量的高低能间接反映机体细胞的氧化损伤程度<sup>[43]</sup>。因此, 通常将 SOD 与 MDA 一起使用来评价动物肝胰腺的氧化应激程度。本实验结果发现, PPB 和 PPB/Aa 组 SOD 与 GSH-Px 活性及 MDA 含量均显著高于 FM 组, 说明混合植物蛋白饲料中添加氨基酸与否与机体的抗氧化能力无关, 全植物蛋白引起了机体的氧化应激, 可能是植物蛋白中抗营养因子较多<sup>[32-33]</sup>, 机体代谢出过多的自由基, 导致机体脂质过氧化, 机体为了清除体内过量的自由基防止机体脂质过氧化, 从而提高机体抗氧化能力, 但具体原因还需进一步研究。

甲壳动物与脊椎动物的免疫系统不同, 前者主要以非特异性体液免疫为主, 因为不具有免疫球蛋白, 所以免疫反应主要依靠血淋巴 (血清) 中的一些酶<sup>[44]</sup>, 例如 AKP 和 ACP, 两者与溶菌酶一样是吞噬细胞杀菌的物质基础, 形成水解酶体系, 破坏和消除侵入体中的异物, 两者活性的升高是肝病病理学原因之一<sup>[45-46]</sup>。本实验结果发现, PPB 组与 PPB/Aa 组血清中 AKP 及 ACP 的活性均显著显著高于 FM 组, 说明植物蛋白使得日本沼虾肝胰腺受到一定损害。同时, ALT 和 AST 活性与肝胰腺功能也有密切联系, 转氨酶和脱氨酶主要在肝脏细胞中, 只有少量被释放到血清中, 当肝细胞遭到损伤时, 血清中转氨酶活性升高, 因此常用来反映肝胰腺的损伤程度<sup>[47]</sup>。本实验结果发现, PPB 组与 PPB/Aa 组血清 ALT 活性显著高于 FM 组, 进一步证实了全植物蛋白引起了肝脏受损。类似的结果在青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*)<sup>[48]</sup>的研究中也有发现。

### 3.4 动、植物蛋白对日本沼虾 TOR 信号通路及食欲调节相关基因表达的影响

TOR 是一种进化上十分保守的丝氨酸 (Ser)/苏氨酸 (Thr) 蛋白激酶, 能够激活下游信号传导通



路, 通过 4E-BP 与 S6K 等翻译调节因子的磷酸化作用来传递信息, 因此细胞可以感知外界营养状况、能量、生长因子等信号, 从而调节细胞的生长、增殖和凋亡等生理过程<sup>[10, 49]</sup>。在黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*)<sup>[50]</sup> 的研究中发现, TOR 与生长存在关联。本实验结果显示, 与 FM 组相比, PPB 组和 PPB/Aa 组肝胰腺中 TOR 与 S6K 基因表达下调, 同样, 在甲壳类动物中也有关于蛋白源与 TOR 信号通路基因表达之间关系的研究, 如凡纳滨对虾摄食混合植物蛋白 (玉米蛋白粉, 棉粕, 大米浓缩蛋白) 后, 肝胰腺中 TOR 和 S6K 基因表达显著低于鱼粉组<sup>[51]</sup>; 与鱼粉组相比较, 豆粕使用比例高达 75% 时显著降低了罗氏沼虾 TOR 和 S6K1 基因的表达<sup>[11]</sup>; 豆粕比例增加、鱼粉比例减少提高了中华绒螯蟹肝胰腺中 S6K1 的表达<sup>[12]</sup>。在鱼类的研究中发现, 当菜粕和棉粕等植物蛋白源中添加氨基酸后可上调团头鲂肝脏中 TOR 基因表达, 而 S6K 基因表达与添加氨基酸与否没有关系<sup>[30]</sup>。以上结果说明, 不同物种摄食不同或相同的蛋白源或不同氨基酸组成的饲料都会不同程度地影响 TOR 信号通路相关基因的表达。这说明, 混合植物蛋白和混合植物蛋白添加氨基酸抑制日本沼虾的生长可能与蛋白质合成相关基因的表达有关。

另外, 生长与水生动物的食欲息息相关<sup>[18]</sup>。食欲的调节是一个涉及大量外周信号与大脑相互作用的过程, 而这些信号可影响动物的细胞内代谢<sup>[52]</sup>。在哺乳动物中, (NPY) 在增加食物摄入的机制中起着重要作用<sup>[20]</sup>, leptin 也参与了摄食、代谢、生长等调节<sup>[53]</sup>, NPY 和 leptin 在鱼类和甲壳类动物上都有相关研究<sup>[21, 54]</sup>。在斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 的研究中发现, 在蛋白水平相同的情况下, 全植物蛋白组脑中 NPY 基因表达水平低于植物蛋白部分替代鱼粉组<sup>[54]</sup>。本实验也得到类似的结果, FM 组的日本沼虾肝胰腺中 NPY 基因表达显著高于 PPB 组和 PPB/Aa 组。有研究表明, leptin 抑制动物对食物的摄入<sup>[19]</sup>, 且能抑制 NPY 的表达<sup>[55]</sup>。在中华绒螯蟹<sup>[22]</sup> 的研究中发现, 不同水平棉籽粕水解蛋白对瘦素受体 (leptin receptor) 和 NPY 在不同组织器官 (胸神经胶质细胞、大脑神经节和中肠) 的表达水平呈相反趋势。但本实验中, leptin 基因表达没有显著差异, 说明日本沼虾肝胰腺中 leptin 基因对动植物蛋白的变化并不敏感, 但其他组织是否敏感值得进一步探讨。

## 4 结论

鱼粉与混合植物蛋白源 (豆粕, 菜粕, 玉米蛋白粉) 对日本沼虾肌肉中氨基酸组成无显著影响, 但混合植物蛋白源降低了虾的生长和抗氧化能力及 TOR 信号通路与 NPY 基因表达, 添加氨基酸不能缓解混合植物蛋白所引起的生长抑制、氧化应激及蛋白质合成和食欲相关基因表达的降低, 这可能与混合植物蛋白中存在高含量的抗营养因子有关。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

## 参考文献 (References):

- [1] Gatlin III D M, Barrows F T, Brown P, *et al.* Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review[J]. *Aquaculture Research*, 2007, 38(6): 551-579.
- [2] Hua K, Cobcroft J M, Cole A, *et al.* The future of aquatic protein: implications for protein sources in aquaculture diets[J]. *One Earth*, 2019, 1(3): 316-329.
- [3] 周歧存, 麦康森, 刘永坚, 等. 动植物蛋白源替代鱼粉研究进展[J]. *水产学报*, 2005, 29(3): 404-410.  
Zhou Q C, Mai K S, Liu Y J, *et al.* Advances in animal and plant protein sources in place of fish meal[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(3): 404-410 (in Chinese).
- [4] Watanabe T, Pongmaneerat J, Sato S, *et al.* Replacement of fish meal by alternative protein sources in rainbow trout diets[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1993, 59(9): 1573-1579.
- [5] 姚俊鹏, 谭青松, 朱艳红, 等. 植物蛋白替代鱼粉对克氏原螯虾生长和繁殖的影响[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(3): 479-484.  
Yao J P, Tan Q S, Zhu Y H, *et al.* Effects of dietary fish meal replacement with vegetable protein on reproduction performance of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(3): 479-484 (in Chinese).
- [6] Jin Y, Liu F J, Tian L X, *et al.* Effect of dietary alanine and glycine supplementation on growth performance, body composition and apparent nutrient digestibility of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *The Israeli journal of aquaculture - Bamidgheh*, 2016, 68: 1268-1276.
- [7] Tu Y Q, Xie S Q, Han D, *et al.* Dietary arginine require-



- ment for gibel carp (*Carassis auratus gibelio* var. CAS III) reduces with fish size from 50g to 150g associated with modulation of genes involved in TOR signaling pathway[J]. *Aquaculture*, 2015, 449: 37-47.
- [8] Weisman R. Target of rapamycin (TOR) regulates growth in response to nutritional signals[J]. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(5), doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0006-2016.
- [9] Wullschleger S, Loewith R, Hall M N. TOR Signaling in growth and metabolism[J]. *Cell*, 2006, 124(3): 471-484.
- [10] Zhou Q L, Habte-Tsion H M, Ge X P, *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.
- [11] Ding Z L, Zhou D S, Zheng J X, *et al.* Replacing fishmeal with soybean meal affects survival, antioxidant capacity, intestinal microbiota, and mRNA expression of TOR and S6K1 in *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2022, 40(2): 805-817.
- [12] Xu C Y, Liu W B, Zhang D D, *et al.* Effects of partial fish meal replacement with two fermented soybean meals on the growth of and protein metabolism in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 17: 100328.
- [13] Bertucci J I, Blanco A M, Sundarajan L, *et al.* Nutrient regulation of endocrine factors influencing feeding and growth in fish[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2019, 10: 83.
- [14] Fukada H, Hosomi N, Morino H, *et al.* Nutrients regulate gene expression levels of neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone 1, and cholecystokinin in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 535: 736401.
- [15] Rønnestad I, Gomes A S, Murashita K, *et al.* Appetite-controlling endocrine systems in teleosts[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2017, 8: 73.
- [16] Hoskins L J, Volkoff H. The comparative endocrinology of feeding in fish: Insights and challenges[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 176(3): 327-335.
- [17] 杨英豪. 大豆浓缩蛋白调控瓦氏黄颡鱼幼鱼摄食和蛋白质代谢的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- Yang Y H. Study about regulation of dietary soy protein concentrate on feed intake and protein metabolism in juvenile darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014 (in Chinese).
- [18] Volkoff H. The role of neuropeptide Y, orexins, cocaine and amphetamine-related transcript, cholecystokinin, amylin and leptin in the regulation of feeding in fish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2006, 144(3): 325-331.
- [19] 梁晓芳. 花鲈利用鱼粉和植物蛋白源的选择性摄食调控机制研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- Liang X F. Mechanism on feed intake regulation of *Lateolabrax japonicus* when fishmeal was replaced by plant protein[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017 (in Chinese).
- [20] Babaei S, Sáez A, Caballero-Solares A, *et al.* Effect of dietary macronutrients on the expression of cholecystokinin, leptin, ghrelin and neuropeptide Y in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2017, 240: 121-128.
- [21] Poljaroen J, Tinikul Y, Tinikul R, *et al.* Leptin-like immunoreactivity in the central nervous system, digestive organs, and gonads of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Acta Histochemica*, 2017, 119(5): 569-581.
- [22] Cheng H H, Liu M Y, Yuan X Y, *et al.* Cottonseed meal protein hydrolysate stimulates feed intake and appetite in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2019, 25(5): 983-994.
- [23] Ding Z L, Zhang Y X, Ye J Y, *et al.* An evaluation of replacing fish meal with fermented soybean meal in the diet of *Macrobrachium nipponense*: growth, nonspecific immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(1): 295-301.
- [24] 丁志丽, 张易祥, 叶金云, 等. 鱼粉蛋白与发酵酶解豆粕蛋白不同配比对日本沼虾生长及免疫性能的影响[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(1): 154-164.
- Ding Z L, Zhang Y X, Ye J Y, *et al.* Effects of different protein ratios of fish meal to fermented and enzymolysis soybean meal on growth and immune performance of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(1): 154-164 (in Chinese).
- [25] Livak J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

- [26] 仲维玮, 文华, 蒋明, 等. 混合植物蛋白源对罗非鱼幼鱼生长、体组成及表观消化率的影响[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(3): 356-362.  
Zhong W W, Wen H, Jiang M, *et al.* Effect of plant protein sources on growth performance, body composition and apparent digestibility in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2010, 29(3): 356-362 (in Chinese).
- [27] 徐田田, 王婧, 许丹, 等. 复合植物蛋白替代鱼粉对凡纳滨对虾生长及体组成的影响[J]. *饲料工业*, 2021, 42(22): 47-51.  
Xu T T, Wang J, Xu D, *et al.* Effects of replacing fish meal with compound vegetable proteins on growth performance and body composition of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Feed Industry*, 2021, 42(22): 47-51 (in Chinese).
- [28] Chen H Y, Leu Y T, Roelants I. Effective supplementation of arginine in the diets of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon*[J]. *Aquaculture*, 1992, 108(1-2): 87-95.
- [29] Tan Q, Song D, Chen X, *et al.* Replacing fish meal with vegetable protein sources in feed for juvenile red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*: effects of amino acids supplementation on growth and feed utilization[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2018, 24(2): 858-864.
- [30] 周群兰. 棉粕和菜粕经 TOR、AAR 信号通路调控团头鲂生长及肠道微生态的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2016.  
Zhou Q L. Cottonseed meal and canola meal regulate growth performance via TOR and AAR pathway and affect gut microflora of blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [31] 朱杰, 蒋广震, 徐维娜, 等. 日本沼虾的蛋氨酸需求量[J]. *经济动物学报*, 2014, 18(3): 151-158.  
Zhu J, Jiang G Z, Xu W N, *et al.* Optimal dietary methionine level of *Macrobrachium nipponense*[J]. *Journal of Economic Animal*, 2014, 18(3): 151-158 (in Chinese).
- [32] 宋霖, 王权. 植物蛋白源中抗营养因子对水产动物的影响[J]. *中国高新区*, 2017(6): 122,143.  
Song L, Wang Q. Effects of antinutritional factors in plant protein sources on aquatic animals[J]. *Science & Technology Industry Parks*, 2017(6): 122,143 (in Chinese).
- [33] 彭凯, 罗锦伟, 黄文. 植物蛋白原料替代鱼粉在水产饲料中的研究进展 [J/OL]. *饲料研究*, 2022. (2022-06-13).<https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2114.S.20220612.1008.002.html>.  
Peng K, Luo J W, Huang W. Research progress of plant protein ingredients replacing fish meal in aquatic feed[J/OL]. *Feed Research*, 2022. (2022-06-13).<https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2114.S.20220612.1008.002.html> (in Chinese).
- [34] 林建伟. 基于氨基酸平衡的鸡肉粉替代鱼粉的配合饲料对凡纳滨对虾生长性能的影响 [D]. 厦门: 集美大学, 2015.  
Lin J W. Complete replacement of fish meal by poultry by-product meal in practical diets based upon an amino acid balance for pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[D]. Xiamen: Jimei University, 2015 (in Chinese).
- [35] 孙丽慧, 沈斌乾, 陈建明, 等. 日本沼虾对饲料赖氨酸的需要量研究[J]. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(1): 100-104.  
Sun L H, Shen B Q, Chen J M, *et al.* Studies on dietary lysine requirement of *Macrobrachium nipponense*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(1): 100-104 (in Chinese).
- [36] Berge G E, Sveier H, Lied E. Nutrition of Atlantic salmon (*Salmo salar*); the requirement and metabolic effect of lysine[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 1998, 120(3): 477-485.
- [37] 曹俊明, 严晶, 王国霞, 等. 家蝇蛆粉替代鱼粉对凡纳滨对虾消化酶、转氨酶活性和肝胰腺组织结构的影响[J]. *南方水产科学*, 2012, 8(5): 72-79.  
Cao J M, Yan J, Wang G X, *et al.* Effects of replacement of fish meal with housefly maggot meal on digestive enzymes, transaminases activities and hepatopancreas histological structure of *Litopenaeus vannamei*[J]. *South China Fisheries Science*, 2012, 8(5): 72-79 (in Chinese).
- [38] 伍代勇, 叶元土, 张宝彤, 等. 棉籽粕和菜籽粕对凡纳滨对虾生长、非特异免疫和体成分的影响[J]. *中国饲料*, 2009(23): 27-30.  
Wu D Y, Ye Y T, Zhang B T, *et al.* Effects of cotton seed meal and rapeseed meal on growth performance, non-specific immune indexes and body compositions of *Litopenaeus vannamei*[J]. *China Feed*, 2009(23): 27-30 (in Chinese).

- [39] He Y F, Guo X W, Tan B P, *et al.* Partial fishmeal protein replacement with peptides from swine blood modulates the nutritional status, immune response, and intestinal microbiota of hybrid groupers (female *Epinephelus fuscoguttatus* × male *E. lanceolatus*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 533: 736154.
- [40] Zhang C N, Li X F, Xu W N, *et al.* Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(5): 1380-1386.
- [41] Shen W Y, Fu L L, Li W F, *et al.* Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth, performance, immune response and antioxidant activities of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(11): 1691-1698.
- [42] Pastor A, Medina J, Del Ramo J, *et al.* Determination of lead in treated crayfish *Procambarus clarkii*: accumulation in different tissues[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1988, 41(3): 412-418.
- [43] 曹广力, 朱越雄, 许宏庆, 等. 四种甲壳动物超氧化物歧化酶活性检测初报[J]. *水产养殖*, 1999(1): 15-16.
- Cao G L, Zhu Y X, Xu H Q, *et al.* The activity of superoxide dismutase in four crustaceans[J]. *Journal of Aquaculture*, 1999(1): 15-16 (in Chinese).
- [44] 管晓娟. 甲壳动物体液免疫相关酶及免疫因子研究概况[J]. *生命科学仪器*, 2009, 7(6): 3-7.
- Guan X J. Progress on the researches of humoral immunity of crustacean[J]. *Life Science Instruments*, 2009, 7(6): 3-7 (in Chinese).
- [45] 魏克强, 许梓荣. 对虾的免疫机制及其疾病预防策略的研究[J]. *中国兽药杂志*, 2004, 38(9): 25-29.
- Wei K Q, Xu Z R. Studies on immune mechanism in shrimp and strategies for disease prevention[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2004, 38(9): 25-29 (in Chinese).
- [46] Giannini E G. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians[J]. *Canadian Medical Association Journal*, 2005, 172(3): 367-379.
- [47] Chien Y H, Pan C H, Hunter B. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin[J]. *Aquaculture*, 2003, 216(1-4): 177-191.
- [48] 林一帆, 邵仙萍, 金燕, 等. 复合动植物蛋白质源替代鱼粉对青鱼幼鱼形体指标、组织脂肪酸组成、血清生化指标及肝脏组织形态的影响[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(2): 732-745.
- Lin Y F, Shao X P, Jin Y, *et al.* Effects of fish meal replacement by animal and plant protein mixture on morphology indexes, tissue fatty acid composition, serum biochemical indexes and hepatic histology of juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(2): 732-745 (in Chinese).
- [49] Corradetti M N, Guan K L. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR?[J]. *Oncogene*, 2006, 25(48): 6347-6360.
- [50] Irm M, Taj S, Jin M, *et al.* Influence of dietary replacement of fish meal with fish soluble meal on growth and TOR signaling pathway in juvenile black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 101: 269-276.
- [51] Yang P, He C Q, Qin Y W, *et al.* Evaluation of composite mixture of protein sources in replacing fishmeal for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): based on the changing pattern of growth performance, nutrient metabolism and health status[J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 21: 100914.
- [52] Volkoff H, Canosa L F, Unniappan S, *et al.* Neuropeptides and the control of food intake in fish[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 142(1-2): 3-19.
- [53] 丁兆坤, 李培, 刘富娟, 等. 营养素对水生动物瘦素基因表达的影响、瘦素的作用及其机理[J]. *饲料工业*, 2017, 38(6): 1-6.
- Ding Z K, Li P, Liu F J, *et al.* Effect of nutrients on the expression of leptin gene in aquatic animal, function and its mechanism of leptin[J]. *Feed Industry*, 2017, 38(6): 1-6 (in Chinese).
- [54] Abasubong K P, Cheng H H, Li Z Q, *et al.* Effects of replacing fish meal with plant proteins at different dietary protein levels on growth and feed intake regulation of juvenile channel catfish *Ictalurus punctatus*[J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(10): 4911-4922.
- [55] Schwartz M W, Seeley R J, Woods S C, *et al.* Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus[J]. *Diabetes*, 1997, 46(12): 2119-2123.



## Effects of animal and plant proteins on growth, muscle composition, antioxidant abilities, mRNA expressions of genes related to TOR signaling pathway and appetite regulation in *Macrobrachium nipponense*

ZHENG Jinxian, ZHOU Dongsheng, WEI Shanshan, XIONG Yunfeng, KONG Youqin, ZHANG Yixiang, ZHAO Jianhua, LIU Yan, QI Changle, DING Zhili\*

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Aquatic Resources Conservation and Development, Key Laboratory of Aquatic Animal Genetic Breeding and Nutrition, College of Life Science, Huzhou University, Huzhou 313000, China)

**Abstract:** This study aimed to evaluate the effects of animal and plant proteins on growth, muscle composition, antioxidant abilities, and mRNA expressions of genes related to TOR signaling pathway and appetite regulation in juvenile oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*. Three isonitrogenous and isoenergetic diets were formulated in this experiment. A basal diet containing 58 % fishmeal was used as the control (named as FM), whereas 100 % of fishmeal was replaced with a plant protein blend (soyabean meal, corn gluten meal and rapeseed meal, named as PPB) as the second diet, and lysine, threonine and methionine were added to the PPB diet to balance the amino acid content (named as PPB/Aa) as the third diet. Juvenile oriental river prawn *M. nipponense* with an average weight of  $0.123 \pm 0.03$  g was randomly divided into three groups, and each diet was fed to prawns twice daily to apparent satiation in six replicates. The experiment lasted for 8 weeks. The growth, muscle composition, antioxidant abilities, mRNA expressions related to TOR signaling pathway and appetite regulation were evaluated. The results showed that no significant difference in survival rate (SR) among three groups. The specific growth rate (SGR), weight gain (WG) and feeding rate (FR) in prawns fed PPB and PPB/Aa were significantly lower than those fed FM ( $P < 0.05$ ), and the feed conversion ratio (FCR) in PPB and PPB/Aa groups was significantly higher than FM group ( $P < 0.05$ ). The glycine content in the muscle of prawns fed FM was significantly lower than that of prawns fed PPB ( $P < 0.05$ ), but there were no significant differences of the other amino acids content (including lysine, threonine and methionine) among the three groups ( $P > 0.05$ ). The hepatopancreas content of malondialdehyde (MDA) and activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in FM were significantly lower than those in PPB and PPB/Aa ( $P < 0.05$ ), while there were no significant differences of activities of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) among the three groups ( $P > 0.05$ ). The serum activities of alkaline phosphatase (AKP), acid phosphatase (ACP) and ALT in PPB and PPB/Aa group were significantly higher than those of FM group ( $P < 0.05$ ), however, no significant difference of activities of AST was observed among the three groups ( $P > 0.05$ ). The mRNA levels of target of rapamycin (TOR), ribosomal proteins 6kinase (S6K) and neuropeptide Y (NPY) were significantly down-regulated in PPB and PPB/Aa groups compared with that in FM group ( $P < 0.05$ ), while no significant difference was observed about mRNA expression of leptin among all groups ( $P > 0.05$ ). Taken together, muscle amino acids composition, except for glycine, was not affected by dietary fishmeal and plant protein blend in *M. nipponense*, but the antioxidant capacity of prawns was significantly decreased by plant protein blend, and the addition of amino acids could not alleviate the growth inhibition and oxidative stress caused by plant protein blend, and the reduced mRNA levels of genes related to TOR signaling pathway and appetite regulation caused by plant protein blend. This study could provide a theoretical basis and technical support for improving the utilization rate of plant protein and optimizing the nutritional formula of *M. nipponense*.

**Key words:** *Macrobrachium nipponense*; fish meal; plant protein blend; muscle amino acids composition; TOR signaling pathway; appetite

**Corresponding author:** DING Zhili. E-mail: dingzhili@zjhu.edu.cn

**Funding projects:** Natural Science Foundation of Huzhou City (2019YZ04)