

DOI: 10.11964/jfc.20230714099

以植物蛋白为主的低鱼粉饲料中添加精氨酸对日本沼虾生长、摄食、抗氧化、免疫和肠道结构的影响



王俊保, 郑金仙, 周东生, 李珊珊, 孔有琴, 戚常乐, 刘艳, 徐奇友, 丁志丽*

湖州师范学院生命科学学院, 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

第一作者: 王俊保, 从事水产动物营养与饲料研究, E-mail : 513733646@qq.com



摘要:

【目的】探讨以植物蛋白为主的低鱼粉饲料中补充精氨酸(Arg)对日本沼虾生长、摄食、抗氧化、免疫和肠道结构的影响。

【方法】实验在低鱼粉、高植物蛋白饲料中分别补充0% (实测值为0.80%)、0.60% (1.33%)、1.20% (1.85%)、1.80% (2.24%)和2.40% (2.65%)的精氨酸,形成5组等氮等能的饲料,养殖周期为8周。

【结果】随着精氨酸水平的升高,日本沼虾增重率呈先上升后下降趋势,且在1.85% Arg组达到最高,饲料系数呈相反趋势,1.85% Arg组显著低于0.80%与2.65% Arg组;各组摄食率与存活率无显著差异;1.85% Arg组谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和谷胱甘肽(GSH)含量达到最高且显著高于0.80% Arg组,同时1.85% Arg组超氧化物歧化酶(SOD)活性也达到最高,但该组丙二醛(MDA)含量显著低于其余各组;1.85% Arg组谷草转氨酶(AST)活性显著低于0.80%与1.33% Arg组,同时1.33%与1.85% Arg组谷丙转氨酶(ALT)活性显著低于0.80%、2.24%与2.65% Arg组;1.33% Arg组雷帕霉素靶蛋白基因(*tor*)和神经肽基因(*npy*)相对表达量最高,且显著高于其余组,1.85% Arg组核糖体蛋白S6激酶基因(*s6k*)表达量最高且显著高于2.24%与2.65% Arg组,瘦素基因(*leptin*)相对表达量先下降后上升,且0.80% Arg组相对表达量最高;1.85%与2.24% Arg组肠道微绒毛完整且排列整齐。

【结论】在以植物蛋白为主的日本沼虾低鱼粉饲料中,精氨酸水平为1.85%时,可以提高其生长性能、抗氧化能力及肝胰腺中蛋白质合成和食欲相关基因的表达,改善日本沼虾肠道结构。基于增重率进行二次曲线回归模型分析,在以植物蛋白为主的日本沼虾低鱼粉饲料中精氨酸的适宜水平为1.83%。

关键词:日本沼虾; 植物蛋白; 精氨酸; TOR信号通路; 食欲; 肠道结构

通信作者: 丁志丽, 女, 博士, 教授, 浙江师范大学兼职博士生导师。主要从事淡水虾类营养与饲料研究, 主持国家自然科学基金青年项目、浙江省“领雁”研发攻关计划等项目6项, 发表论文50余篇。E-mail : dingzhili@zjhu.edu.cn



资助项目: 湖州市自然科学基金(2019YZ04); 国家自然科学基金(31972800)

收稿日期: 2023-07-30

修回日期: 2023-10-19

文章编号: 1000-0615(2025)04-049614-12
中图分类号: S 963.73¹
文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)

蛋白质是生命的物质基础, 水产动物从饲料中摄入蛋白质的质、量和各种氨基酸比例, 与机体蛋白质合成量密切相关^[1-2]。水产动物对鱼粉蛋白依赖性强, 对植物蛋白源利用率相对偏低, 因此, 提高植物



蛋白的利用对水产养殖的可持续发展具有重要意义。精氨酸 (Arg) 不仅是蛋白质合成的原料, 而且可通过激活雷帕霉素靶蛋白 (target of rapamycin, TOR) 信号通路来促进机体蛋白质的合成^[3], 因此, 在植物蛋白中补充 Arg 可能是提高水产动物对植物蛋白利用的有效途径之一。对水产动物研究发现, 饲料中 Arg 可以影响团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 的蛋白质沉积和 TOR 通路相关基因的表达, 从而调节其生长^[4]。饲料中补充 3.8% 的 Arg 可促进珍珠龙胆石斑鱼 [*Epinephelus fuscoguttatus*(♀) × *E. lanceolatus*(♂)] 肝脏 TOR 通路中 *tor* 和核糖体蛋白 S6 激酶基因 (ribosomal proteins 6kinase, *s6k*) 的表达, 提高整个机体和肌肉中蛋白的含量^[5]。饲料中补充 1.68% 的 Arg 提高了皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) *tor*、*s6k* 等基因的转录表达和蛋白磷酸化水平^[6]。

精氨酸除了在生长和蛋白质合成方面发挥重要作用以外, 其还可在一氧化氮合酶作用下被分解产生一氧化氮从而调节机体的免疫功能^[3]。研究发现, 适量添加精氨酸显著提高了卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*)^[7]、团头鲂^[8]、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[9] 和中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)^[10] 的抗氧化能力、免疫性能以及对病原和应激的抵抗力, 但过量的精氨酸则产生过量的一氧化氮, 导致氧化应激^[8]。

此外, 精氨酸还可通过其代谢产物一氧化氮和胍丁酸参与动物的摄食调控^[11]。适宜的精氨酸不仅可以提高禽类的摄食^[12], 还可以刺激鱼类的摄食反应^[13]。动物的摄食行为和采食量受中枢和外周内分泌途径的相互作用调节^[14]。食欲刺激因子如神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 和食欲抑制因子如瘦素 (leptin) 可通过感知个体营养摄入时中枢和外周的食欲信号来调节动物的摄食^[15]。因此, 神经肽 Y 和瘦素是水产动物调控其摄食的重要蛋白^[16-18]。然而, 目前有关精氨酸对甲壳动物摄食的研究还未见详细的报道。

日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 又名青虾、河虾, 因其养殖周期短, 营养价值高, 是我国重要的淡水经济虾类。前期对日本沼虾的研究表明, 在以植物蛋白为主要蛋白源的饲料中补充赖氨酸 (Lys)、苏氨酸 (Thr) 和蛋氨酸 (Met) 的混合物不能缓解植物蛋白所引起的生长

抑制、氧化应激及蛋白质合成相关基因表达的降低^[19]。基于精氨酸在调节机体生长、抗氧化以及蛋白合成等方面的重要作用, 本实验拟在以植物蛋白为主要蛋白源的饲料中补充精氨酸, 研究精氨酸对日本沼虾生长、抗氧化能力、肌肉氨基酸组成、肠道结构以及食欲调节和 TOR 信号通路影响, 确定在以植物蛋白为主要蛋白源的本日本沼虾饲料中精氨酸适宜补充水平, 为植物蛋白中精氨酸的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

以体重为 (0.12±0.03) g 的日本沼虾为研究对象, 采用低鱼粉和高植物蛋白 (豆粕、玉米蛋白粉和菜粕) 的策略配制 5 组等氮等能的饲料, 5 组饲料中分别补充 0% (对照组)、0.60%、1.20%、1.80% 和 2.40% 的精氨酸, 饲料中精氨酸实测值分别为 0.80% (0.80% Arg)、1.33% (1.33% Arg)、1.85% (1.85% Arg)、2.24% (2.24% Arg) 和 2.65% (2.65% Arg), 实验饲料配方及营养组成见表 1。

1.2 养殖管理

本实验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, 对养殖期间所使用的器具进行清洗并消毒, 随后选择健康、初始体重为 (0.12±0.03) g 的幼虾, 随机放入 15 个水族箱 (300 L) 中, 每组 3 个平行, 每箱 70 尾实验虾。每天早 (08:00)、晚 (17:00) 分别进行饱食投喂, 投喂 1 h 后对残饵进行收集。同时观察虾状态并记录死虾数目。在实验期间, 监测水质参数, 水温控制在 25~28 °C, 溶解氧含量 >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, 实验持续 8 周。

1.3 样品采集

养殖实验结束后, 停止投喂, 使日本沼虾禁食 24 h, 对各实验组虾进行数量统计和称重并记录, 可为后续计算增重率和成活率提供可用数据。使用通过高压灭菌的解剖器取出实验虾的肝胰腺、肠道、肌肉等组织, 同时利用 1 mL 无菌注射器吸取实验虾血液, 离心后得到血清。最后, 将肝胰腺、肠道、肌肉及血清保

表 1 实验饲料配方及营养组成 (干物质)

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

%

项目 item	精氨酸水平 arginine level				
	0.80%	1.33%	1.85%	2.24%	2.65%
鱼粉 fish meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
豆粕 soybean meal	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
玉米蛋白粉 corn gluten meal	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
菜粕 rapeseed meal	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
L-精氨酸 L-arginine	0.00	0.60	1.20	1.80	2.40
必需氨基酸混合物 ¹⁾ essential amino acid premix ¹⁾	6.70	6.70	6.70	6.70	6.70
非必需氨基酸混合物 ²⁾ non-essential amino acid premix ²⁾	16.20	14.90	13.60	12.20	10.90
玉米淀粉 corn starch	17.00	17.00	17.00	17.00	17.00
鱼油:豆油(2:1) fish oil:soybean oil (2:1)	4.30	4.50	4.60	4.70	5.00
大豆卵磷脂 soybean lecithin	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
胆固醇 cholesterol	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
氯化胆碱 choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
维生素预混合物 ³⁾ vitamin premix ³⁾	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
矿物质预混合物 ⁴⁾ mineral premix ⁴⁾	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
纤维素 cellulose	7.30	7.80	8.40	9.10	9.50
羧甲基纤维素钠 carboxymethylcellulose sodium	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
总计 total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养成分(干物质) proximate composition (dry matter)					
粗蛋白 crude protein	37.15	37.17	37.20	37.15	37.18
粗脂肪 crude lipid	7.07	7.27	7.37	7.47	7.77
粗纤维 crude fiber	9.15	9.65	10.25	10.95	11.35
粗灰分 crude ash	4.67	4.24	4.29	4.35	4.46
无氮浸出物 ⁵⁾ nitrogen-free extract ⁵⁾	41.96	41.67	40.89	40.08	39.24
能量 ⁶⁾ gross energy ⁶⁾	16.23	16.19	16.11	16.01	16.00
精氨酸 arginine	0.80	1.33	1.85	2.24	2.65

注: 1) 每千克必需氨基酸混合物含组氨酸 3.5 g, 异亮氨酸 9.6 g, 亮氨酸 6.9 g, 赖氨酸 20.4 g, 蛋氨酸 6.1 g, 苯丙氨酸 5.5 g, 苏氨酸 5.0 g, 缬氨酸 7.6 g, 色氨酸 2.2 g。2) 每千克非必需氨基酸混合物含天冬氨酸 37.8 g, 胱氨酸 3.5 g, 谷氨酸 54.5 g, 甘氨酸 23.2 g, 丝氨酸 9.5 g, 酪氨酸 12.2 g, 脯氨酸 10.8 g, 丙氨酸 23.7 g。3) 每千克维生素预混合物含VA 1.29 g, VC 57.5 g, VE 20 g, VD₃ 0.63 g, VK₃ 1.8 g, VB₁ 7.5 g, VB₂ 2.63 g, VB₆ 1 g, VB₁₂ 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。4) 每千克矿物质预混合物含KCl 28 g, MgSO₄·7H₂O 100 g, NaH₂PO₄ 215 g, KH₂PO₄ 100 g, Ca (H₂PO₄)₂·H₂O 265 g, CaCO₃ 105 g, C₆H₁₀CaO₆·5H₂O 165 g, FeC₆H₅O₇·5H₂O 12 g, ZnSO₄·7H₂O 4.76 g, MnSO₄·H₂O 1.07 g, AlCl₃·6H₂O 0.15 g, CuCl₂·2H₂O 2.4 g, CoCl₂·6H₂O 1.4 g, KI 0.23 g, α-纤维素 0.043 g。5) 无氮浸出物=干物质(%)-[粗蛋白(%) + 粗脂肪(%) + 粗纤维(%) + 粗灰分(%)]. 6) 能量(MJ/kg)=(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(%). 7) 粗蛋白、粗脂肪、粗灰分为实测值, 粗纤维、无氮浸出物、能量为计算值。

Notes: 1) 1 kg essential amino acid mixture contains histidine 3.5 g, isoleucine 9.6 g, leucine 6.9 g, lysine 20.4 g, methionine 6.1 g, phenylalanine 5.5 g, threonine 5.0 g, valine 7.6 g, tryptophan 2.2 g. 2) 1 kg non-essential amino acid mixture contains aspartic acid 37.8 g, cystine 3.5 g, glutamic acid 54.5 g, glycine 23.2 g, serine 9.5 g, tyrosine 12.2 g, proline 10.8 g, alanine 23.7 g. 3) 1 kg vitamin premix contains VA 1.29 g, VC 57.5 g, VE 20 g, VD₃ 0.63 g, VK₃ 1.8 g, VB₁ 7.5 g, VB₂ 2.63 g, VB₆ 1 g, VB₁₂ 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. 4) 1 kg of mineral premix contains KCl 28 g, MgSO₄·7H₂O 100 g, NaH₂PO₄ 215 g, KH₂PO₄ 100 g, Ca (H₂PO₄)₂·H₂O 265 g, CaCO₃ 105 g, C₆H₁₀CaO₆·5H₂O 165 g, FeC₆H₅O₇·5H₂O 12 g, ZnSO₄·7H₂O 4.76 g, MnSO₄·H₂O 1.07 g, AlCl₃·6H₂O 0.15 g, CuCl₂·2H₂O 2.4 g, CoCl₂·6H₂O 1.4 g, KI 0.23 g, α-cellulose 0.043 g. 5) nitrogen-free extract = dry matter (%) - [crude protein (%) + crude lipid (%) + crude fiber (%) + crude ash (%)]. 6) gross energy = [crude protein (%) × 16.7 kJ/g + crude lipid (%) × 37.6 kJ/g + nitrogen-free extract (%) × 16.7 kJ/g] / dry matter (%). 7) crude protein, crude lipid and crude ash are measured values, and crude fiber, nitrogen-free extract and energy are calculated values.

存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。本研究获得了湖州师范学院动物实验伦理委员会审批(审批号: 20220701), 实验过程中操作人员严格遵守湖州师范学院动物实验伦理委员会规范。

1.4 生长指标测定

根据以下公式统计实验虾的生长性能:

成活率 (SR, %) = $N_t/N_0 \times 100\%$;

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

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

饲料系数 (FCR) = $F/(W_t - W_0)$;

摄食率 (FR, %) = $F/[t \times (W_t + W_0)/2] \times 100\%$ 。

式中, W_0 为初始体重 (g); W_t 为终末体重 (g); F 为摄入饲料 (g); t 为实验天数 (d); N_0 为初始数量 (尾); N_t 为终末数量 (尾)。

1.5 血清生化指标及肝胰腺生化指标的测定

称取肝胰腺质量为 0.5~0.7 g, 按质量体积比 1:9 的比例加入 0.86% 的生理盐水配制为匀浆液 (浓度为 10%), 3 500 r/min 离心 15 min, 按照考马斯亮兰法测定上清液中蛋白浓度, 并根据后续实验需要, 即测定酶活指标的要求将肝胰腺上清液稀释成不同浓度。血清中酸性磷酸酶 (ACP)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 活性, 以及肝胰腺中谷胱甘肽 (GSH) 含量、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。

1.6 实验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 (GB/T 24318—2009) 测定粗蛋白含量 (FOSS, Kjeltac 2200, 丹麦); 采用索氏抽提法 (GB/T 6433—2006) 测定粗脂肪含量 (FOSS, SoxtecTM2043, 丹麦); 采用 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温烘干失重法 (GB/T 6435—2014) 测定水分; 采用马弗炉 $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灼烧法 (GB/T 6438—2007) 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 $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的鼓风干燥箱中恒温 24 h, 然后采用盐酸水解法于日立 L-8900 型氨基酸自动分析仪 (GB/T 5009.124—2003) 测定饲料及肌肉中氨基酸含量。

1.7 荧光定量 PCR(qRT-PCR) 分析

使用总 RNA 提取试剂盒 (北京艾德莱生物

科技有限公司) 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 用于 *tor*、*s6k*、*npv* 和 *leptin* 的 qRT-PCR 分析。采用在线 Primer Premier 5 软件设计, qRT-PCR 所用引物: *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' GGTCTTTGAGG-GCTTTACG 3', 下游引物: 5' GTCCAGCAGA GTTTGGTGTAT 3'; *npv* (登录号: ON693257) 上游引物: 5' CTTCACCCGCCAGACAGT 3', 下游引物: 5' AGCACCATAAGCGCCATA 3'; *leptin* (登录号: ON693256) 上游引物: 5' GGCA CCAATCCCGAGTCTTAT 3', 下游引物: 5' CC AAATGCTGACACCACCAAC 3'。反应体积为 20 μL , 包括 10 μL 的 2 \times SYBR Green Premix Ex Taq (TaKaRa, 日本), 上、下游引物各 0.2 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 2 μL 模板, 7.6 μL ddH₂O。qRT-PCR 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s; 共 40 个循环; PCR 反应后温度以每 5 s 上升 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的速度从 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 上升到 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 绘制熔解曲线, 以判断扩增产物的正确性。qRT-PCR 运行以一式三份进行, 还包括阴性对照 (无 cDNA)。分析基因的扩增效率在 95%~103%。以日本沼虾 *β -actin* 为内参基因, 上游引物: 5' GTGCCCATCTACGAGGGTTA 3', 下游引物: 5' CGTCAGGGAGCTCGTAAGAC 3', 对得到的各样品循环数 (C_t) 值进行均一化处理, 以对照组 mRNA 为基准, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[20] 分析目的基因 mRNA 相对表达水平。

1.8 肠道组织形态结构的观察

养殖结束后, 每组随机选取 3 尾日本沼虾取其肠道置于 4% 多聚甲醛溶液中固定。70% 乙醇洗涤, 石蜡包埋, 切片后用苏木精-伊红 (H.E) 染色, 光学显微镜镜检, 采集图像分析形态变化。

1.9 数据分析

所有数据在 SPSS 25 软件下进行处理, 并对数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 若组间差异显著, 再用 Tukey 氏法多重比较不同蛋白源对日本沼虾生长和生理指标的影响以

及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 (mean \pm SD) 显示。

2 结果

2.1 植物蛋白补充精氨酸对日本沼虾生长性能的影响

随着精氨酸水平的升高, 日本沼虾 WGR 及 SGR 先上升后下降, 1.85% Arg 组达到最高, 且显著高于 0.80% Arg、1.33% Arg 和 2.65% Arg 组 ($P < 0.05$), 但与 2.24% Arg 组无显著差异 ($P > 0.05$); FCR 先下降后上升, 1.85% Arg 组最低且显著低于 0.80% Arg 组与 2.65% Arg 组 ($P < 0.05$), 但与 1.33% Arg、2.24% Arg 组无显著差异 ($P > 0.05$); 各组 SR 与 FR 无显著差异 ($P > 0.05$) (表 2)。基于 WGR 数据进行二次曲线回归模型分析, 以植物蛋白为主的日本沼虾饲料中精氨酸需求量为 1.83%。

2.2 植物蛋白补充精氨酸对日本沼虾肌肉氨基酸组成的影响

0.80% Arg 组谷氨酸含量显著低于 2.24% Arg 与 2.65% Arg 组 ($P < 0.05$), 但与 1.33% Arg、1.85% Arg 组无显著差异 ($P > 0.05$); 半胱氨酸含量在 1.33% Arg 组最高 ($P < 0.05$), 其余组无显著差异 ($P > 0.05$) (表 3)。其余氨基酸含量在各组间无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.3 植物蛋白补充精氨酸对日本沼虾肝胰腺生化指标的影响

随着精氨酸水平的升高, 肝胰腺中 GSH-Px 活性、SOD 活性及 GSH 含量均先上升后降

低, GSH-Px 活性在 1.85% Arg 组达到最高且显著高于 0.80% Arg 和 1.33% Arg 组 ($P < 0.05$), 但与 2.24% Arg、2.65% Arg 组无显著差异 ($P > 0.05$) (表 4); SOD 活性在 1.85% Arg 组达到最高且显著高于 0.80% Arg、1.33% Arg 和 2.65% Arg 组 ($P < 0.05$), 但与 2.24% Arg 组无显著差异 ($P > 0.05$); GSH 含量在 1.85% Arg 组最高显著高于 0.80% Arg 组 ($P < 0.05$); 而 MDA 含量呈相反趋势, 在 1.85% Arg 组 MDA 含量最低, 且显著低于其余四组 ($P < 0.05$)。

2.4 植物蛋白补充精氨酸对日本沼虾血清生化指标的影响

ACP 活性在 2.24% Arg 组最低显著且低于其余组 ($P < 0.05$); AST 活性在 1.85% Arg 组最低且显著低于 0.80% 与 1.33% Arg 组 ($P < 0.05$), 但与 2.24% 与 2.65% Arg 组无显著差异 ($P > 0.05$); ALT 活性在 1.33% 与 1.85% Arg 最低, 且显著低于 0.80%、2.24% 与 2.65% Arg 组 ($P < 0.05$) (表 5)。

2.5 植物蛋白补充精氨酸对日本沼虾的食欲及 TOR 信号通路相关基因表达的影响

在 1.33% Arg 组 *tor* 和 *npv* 相对表达量最高, 且显著高于其余组 ($P < 0.05$)。随着精氨酸水平的升高, *s6k* 的相对表达量先上升后下降, 在 1.85% Arg 组表达量最高且显著高于 2.24% 与 2.65% Arg 组 ($P < 0.05$), 但与 0.80%、1.33% Arg 组无显著差异 ($P > 0.05$); *leptin* 相对表达量出先下降后上升, 在 0.80% Arg 组相对表达量最高 ($P < 0.05$) (表 6)。

2.6 植物蛋白补充精氨酸对日本沼虾肠道形态结构的影响

在显微镜下拍照并观察肠道切片, 1.33%

表 2 植物蛋白补充精氨酸对日本沼虾生长性能的影响

Tab. 2 Effects of plant protein supplemented with arginine on growth performance of *M. nipponense*

项目 item	精氨酸水平 arginine level				
	0.80% Arg	1.33% Arg	1.85% Arg	2.24% Arg	2.65% Arg
增重率/% WGR	243.99 \pm 21.17 ^a	260.11 \pm 18.75 ^{ab}	333.10 \pm 16.40 ^c	300.54 \pm 40.74 ^{bc}	254.97 \pm 9.79 ^{ab}
特定生长率/(%/d) SGR	2.20 \pm 0.11 ^a	2.29 \pm 0.09 ^{ab}	2.62 \pm 0.07 ^c	2.47 \pm 0.19 ^{bc}	2.36 \pm 0.05 ^a
存活率/% SR	76.19 \pm 3.30	76.19 \pm 9.07	79.05 \pm 1.65	71.90 \pm 1.65	75.71 \pm 1.43
饲料系数 FCR	1.69 \pm 0.03 ^b	1.64 \pm 0.01 ^{ab}	1.51 \pm 0.11 ^a	1.64 \pm 0.04 ^{ab}	1.69 \pm 0.02 ^b
摄食率/% FR	6.07 \pm 0.08	5.98 \pm 0.06	6.20 \pm 0.26	6.17 \pm 0.33	6.10 \pm 0.07

注: 同行数据右上角标有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Notes: In the same row, values with different superscript mean significant differences ($P < 0.05$), the same below.

表 3 植物蛋白补充精氨酸对日本沼虾肌肉氨基酸组成的影响 (以鲜样计)

Tab. 3 Effects of plant protein supplemented with arginine on amino acids composition of muscle of *M. nipponense* (fresh weight basis) %

氨基酸 amino acid	精氨酸水平 arginine level				
	0.80%	1.33%	1.85%	2.24%	2.65%
必需氨基酸 essential amino acids, EAA					
苏氨酸 Thr	0.82±0.04	0.77±0.10	0.83±0.01	0.81±0.02	0.82±0.03
精氨酸 Arg	2.14±0.04	1.97±0.31	2.11±0.10	2.09±0.12	2.03±0.10
赖氨酸 Lys	1.95±0.06	1.77±0.22	1.92±0.01	1.91±0.06	1.92±0.08
组氨酸 His	0.51±0.04	0.45±0.04	0.50±0.02	0.50±0.03	0.50±0.01
蛋氨酸 Met	0.64±0.03	0.57±0.07	0.64±0.02	0.65±0.03	0.65±0.03
苯丙氨酸 Phe	0.92±0.03	0.84±0.11	0.91±0.02	0.92±0.02	0.91±0.04
异亮氨酸 Ile	0.98±0.04	0.90±0.11	0.99±0.02	0.97±0.03	0.98±0.03
缬氨酸 Val	0.97±0.03	0.88±0.11	0.97±0.02	0.98±0.03	1.00±0.03
亮氨酸 Leu	1.71±0.07	1.57±0.20	1.72±0.03	1.69±0.06	1.69±0.06
非必需氨基酸 non-essential amino acids, NEAA					
谷氨酸 Glu	2.84±0.14 ^a	2.87±0.08 ^{ab}	2.89±0.09 ^{ab}	3.01±0.13 ^b	3.08±0.11 ^b
甘氨酸 Gly	1.66±0.08	1.57±0.33	1.49±0.16	1.65±0.06	1.61±0.12
丙氨酸 Ala	1.40±0.04	1.25±0.15	1.31±0.01	1.32±0.08	1.34±0.06
半胱氨酸 Cys	0.17±0.01 ^a	0.21±0.02 ^b	0.15±0.00 ^a	0.15±0.02 ^a	0.15±0.02 ^a
丝氨酸 Ser	1.10±0.05	1.02±0.12	1.11±0.05	1.10±0.04	1.11±0.06
酪氨酸 Tyr	0.82±0.02	0.75±0.10	0.81±0.03	0.81±0.01	0.80±0.03
天冬氨酸 Asp	6.46±0.21	5.92±0.78	6.38±0.16	6.36±0.18	6.28±0.23
脯氨酸 Pro	2.58±0.11	2.44±0.20	2.59±0.04	2.55±0.10	2.59±0.07

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 and could not be detected.

表 4 植物蛋白补充精氨酸对日本沼虾肝胰腺生化指标的影响

Tab. 4 Effects of plant protein supplemented with arginine on biochemical indexes in hepatopancreas of *M. nipponense*

指标 index	精氨酸水平 arginine level				
	0.80%	1.33%	1.85%	2.24%	2.65%
谷胱甘肽过氧化物酶/(U/mg prot) GSH-Px	105.48±3.18 ^a	112.17±9.42 ^a	148.68±4.08 ^b	140.54±0.78 ^b	153.04±1.58 ^b
超氧化物歧化酶/(U/mg prot) SOD	33.08±0.87 ^a	40.09±1.56 ^b	47.70±0.05 ^c	44.11±2.20 ^{bc}	32.13±1.83 ^a
丙二醛/(nmol/mg prot) MDA	17.94±0.55 ^c	12.48±0.36 ^b	8.79±0.76 ^a	13.01±0.01 ^b	18.75±0.73 ^c
谷胱甘肽/(mg/g prot) GSH	1.15±0.07 ^a	1.44±0.38 ^{ab}	2.39±0.76 ^b	1.96±0.17 ^{ab}	2.14±0.48 ^{ab}

表 5 植物蛋白补充精氨酸对日本沼虾血清生化指标的影响

Tab. 5 Effects of plant protein supplemented with arginine on serum biochemical indexes of *M. nipponense*

指标 index	精氨酸水平 arginine level				
	0.80%	1.33%	1.85%	2.24%	2.65%
酸性磷酸酶/(U/L) ACP	12.90±0.15 ^c	12.94±0.12 ^c	10.52±0.03 ^b	9.38±0.12 ^a	10.46±0.09 ^b
谷草转氨酶/(U/L) AST	26.63±0.58 ^c	25.41±1.18 ^{bc}	21.88±0.70 ^a	23.39±0.12 ^{ab}	23.34±1.21 ^{ab}
谷丙转氨酶/(U/L) ALT	27.28±0.66 ^c	22.64±0.42 ^a	22.70±0.19 ^a	24.96±0.17 ^b	25.60±0.37 ^b

表 6 植物蛋白补充精氨酸对日本沼虾食欲及 TOR 信号通路相关基因表达的影响

Tab. 6 Effects of plant protein supplemented with arginine on appetite and genes related to TOR signaling pathway expression of *M. nipponense*

基因 gene	精氨酸水平 arginine level				
	0.80%	1.33%	1.85%	2.24%	2.65%
<i>tor</i>	0.79±0.07 ^a	1.28±0.09 ^c	0.90±0.03 ^{ab}	1.04±0.11 ^b	0.81±0.03 ^a
<i>s6k</i>	1.36±0.21 ^{abc}	1.62±0.40 ^{bc}	1.82±0.04 ^c	1.05±0.21 ^a	1.25±0.06 ^{ab}
<i>npv</i>	0.87±0.05 ^{ab}	1.53±0.03 ^c	0.98±0.05 ^b	0.86±0.12 ^{ab}	0.80±0.02 ^a
<i>leptin</i>	0.83±0.03 ^c	0.77±0.03 ^b	0.64±0.01 ^a	0.65±0.06 ^a	0.70±0.01 ^{ab}

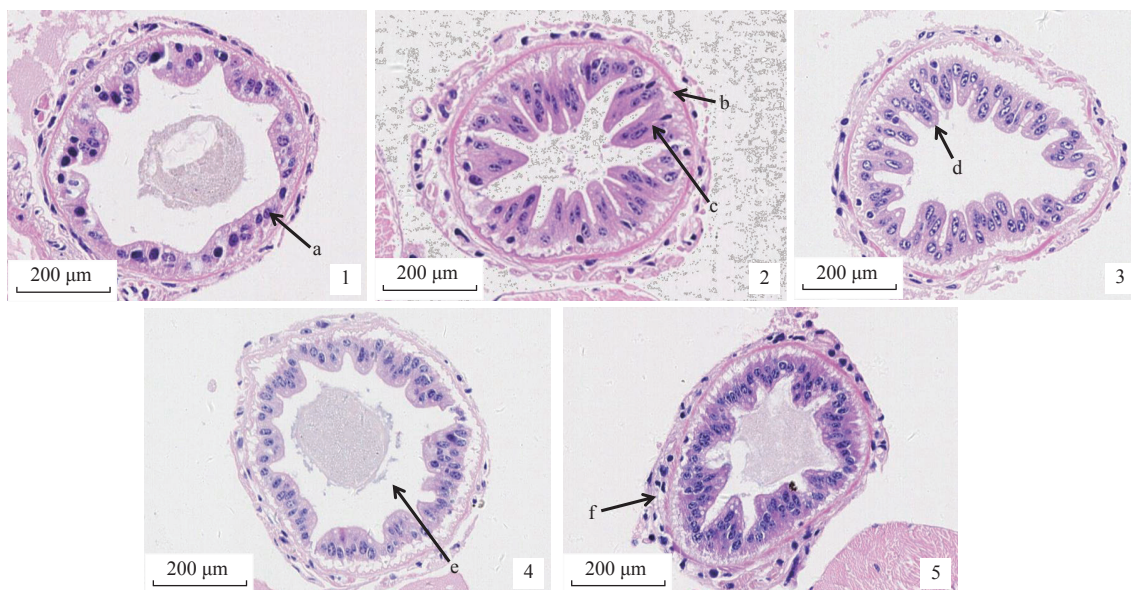
与 1.85% Arg 组肠道微绒毛完整、紧密排列整齐、数量多且细长，而 0.80%、2.24% 与 2.65% Arg 组肠道微绒毛粗且短，数量少 (图版)。

3 讨论

3.1 植物蛋白补充精氨酸对日本沼虾生长性能与肌肉氨基酸组成的影响

精氨酸是水产动物的一种必需氨基酸，对其生长发育起着重要的生理作用^[21]，在本实验中，与对照组相比，饲料中的精氨酸水平为 1.85%~2.24% 时，日本沼虾的 WGR 和 SGR 显著提高，这与大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*)^[22]、凡纳滨对虾^[9] 和中华绒螯蟹^[10] 的研究结果相似，

进一步说明饲料中补充精氨酸对水产动物的重要性。在本实验中，过量精氨酸较对照组对日本沼虾的存活率并无显著影响，在松浦镜鲤 (*Cyprinus carpio* Songpu)^[23]、红拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*)^[24]、真鲷 (*Pagrus major*)^[25] 等研究中也得到了类似结果。但在其他研究中发现，过量的精氨酸会抑制尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)^[26] 的生长并降低其存活率。这可能与不同物种对精氨酸的需求存在差异有关。此外，过量的精氨酸会使凡纳滨对虾^[27] 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[28] 的饲料系数增大，在本实验中得出了类似的结果。这可能是由于过量的精氨酸会与赖氨酸产生拮抗作用，使机体内部受到应激从而导致生长缓慢和生长受到抑制^[29]。目前，



图版 植物蛋白补充精氨酸对日本沼虾肠道形态的影响

1-5 分别为 0.80% Arg、1.33% Arg、1.85% Arg、2.24% Arg 和 2.65% Arg 组。a. 细胞核, b. 上皮细胞, c. 黏膜, d. 小肠微绒毛, e. 肠腔, f. 肌层。

Plate Effects of plant protein supplemented with arginine on intestinal morphology of *M. nipponense*

1-5 illustrate the groups comprising 0.80% Arg, 1.33% Arg, 1.85% Arg, 2.24% Arg, and 2.65% Arg, respectively. a. nucleus, b. epithelium, c. mucosa, d. intestinal microvilli, e. intestinal lumen, f. muscularis.

有关水产动物对精氨酸需求量的相关研究较多, 不同物种对精氨酸的适宜需求量不同。大菱鲆对精氨酸的最适需求量为饲料干物质的 3.17%^[22], 杂交鳢 [*Channa maculata* (♀) × *C. argus* (♂)] 以特定生长率、增重为指标, 其精氨酸适宜需求量分别为 2.91% 和 2.95%^[30]。在甲壳动物的研究中, 凡纳滨对虾的精氨酸需求量为 2.32%^[9]; 在日本沼虾的研究中, 以虾肌肉必需氨基酸组成为参考推测出精氨酸的需求量为 1.83%^[31], 以增重和抗氧化能力为指标, 其精氨酸需求量分别为 2.12% 和 2.27%^[32]。在本实验中, 基于 WG 数据进行线性回归分析, 在以植物蛋白为主的日本沼虾饲料中精氨酸的适宜需求量为 1.83%。综上表明, 同一物种或不同物种对精氨酸适宜需求量存在较大的差异, 这可能与实验物种、实验条件、饲料配方、投喂方式和评价标准等有关。

在本实验中, 饲料中精氨酸的水平显著影响了日本沼虾肌肉中谷氨酸和半胱氨酸的含量, 当精氨酸水平为 2.24%~2.65% 时, 日本沼虾肌肉中谷氨酸含量高于对照组, 而当精氨酸水平为 1.85% 时, 日本沼虾肌肉中半胱氨酸显著高于其余四组, 而其他必需氨基酸和非必需氨基酸并不受精氨酸水平影响。谷氨酸是呈味氨基酸, 适宜的精氨酸含量可以增加呈味氨基酸的含量, 从而改善罗氏沼虾 (*M. rosenbergii*) 肌肉的风味^[33], 但精氨酸水平过高反而使其含量降低从而影响虾的风味^[34]。但有研究显示, 饲料中精氨酸水平仅影响三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 肌肉中精氨酸组成, 对其他的必需氨基酸、非必需氨基酸无影响^[35]。实验结果存在差异可能是物种差异、规格大小和养殖环境不同所致。同时, 饲料精氨酸水平对水产甲壳动物肌肉风味的影响资料不多, 饲料精氨酸能否影响风味还需要进一步的研究。

3.2 植物蛋白补充精氨酸对日本沼虾抗氧化和免疫性能的影响

在本实验中, 随着精氨酸水平的升高, 日本沼虾血清中 ACP、AST 和 ALT 活性先降低后升高, 说明饲料中 1.85% 的精氨酸水平提高了日本沼虾的非特异免疫, 由于血淋巴中 ACP 可以破坏和消除侵入体中的异物, 因此也是反映肝细胞健康程度的重要指标^[36], 同时血清中

转氨酶 (ALT 和 AST) 活性的升高也说明肝细胞遭到损伤^[37-38]。另外, MDA 是脂质过氧化过程中的产物, 也可间接反映细胞损伤程度^[39], GSH 作为机体内最重要的非酶类抗氧化物, 其含量的高低可以反映机体抗氧化能力的大小^[40], SOD 对机体的氧化和抗氧化的平衡至关重要, 可以保护机体细胞免受氧化损伤, 是衡量机体抗氧化能力强弱的标志性酶^[41], 二者是机体抗氧化系统内主要的抗氧化酶和非酶类抗氧化物。在本实验中, 随着精氨酸水平的提高, SOD 活性、GSH-Px 活性与 GSH 含量呈先上升后降低的趋势, MDA 含量呈相反的趋势, 说明 1.85% 的精氨酸水平可以通过增加日本沼虾抗氧化物酶活性从而减少自由基氧化对机体的损伤, 增强机体抗氧化能力。因此, 适宜精氨酸水平提高了日本沼虾的抗氧化能力和免疫性能, 这在鱼类^[7-8, 42] 和其他甲壳动物^[9-10] 也有类似报道。

3.3 植物蛋白补充精氨酸对日本沼虾的食欲及 TOR 信号通路相关基因表达的影响

精氨酸可通过激活 TOR 信号通路调节蛋白质合成^[43], 在本研究中发现精氨酸可以影响 *tor* 及 *s6k* 基因表达, 与对照组相比, 随着精氨酸含量的提高, *tor* 与 *s6k* 表达呈现先上升后降低的趋势。在团头鲂^[4]、珍珠龙胆石斑鱼^[5] 和草鱼^[44] 的研究中同样发现, 随着饲料精氨酸水平的提高, 鱼的肝脏或肌肉中 *tor* 和 *s6k1* 的相对基因表达量呈现先升高后降低的趋势, 与本研究结果类似。说明饲料中精氨酸缺乏或过量都会影响蛋白质的合成, 从而影响水产动物对饲料的利用率, 进而影响水产动物的生长性能。

精氨酸水平与动物摄食也存在相关性^[11], *npv* 是反映水产动物的食欲和摄食量的重要基因^[45]。在金鱼的研究中发现, 禁食期间 *npv* 的表达增加, 而重新喂食后金鱼 (*Carassius auratus*) 的 *npv* 降低到正常水平^[46]。在本研究中发现, 日本沼虾摄食不同水平精氨酸, 肝胰腺中 *npv* 表达水平存在显著差异, 这说明精氨酸水平可以影响 *npv* 在机体内的表达, 饲料中精氨酸的缺乏或过量影响 *npv* 的表达, 进而抑制日本沼虾的摄食。该研究结果与畜禽的研究结果也相似, 精氨酸含量不足显著抑制鸡和鸭的摄食, 而精氨酸含量充足且在适宜范围内可显著促进鸡和鸭的摄食^[47-48]。瘦素在机体内可以

发挥多种生物学功能, 参与水产动物摄食是其功能之一^[49], 其存在于鱼类的多个组织中, 包括肝脏、大脑、脂肪组织、肠道和性腺等组织^[50]。研究发现, 向条纹鲈 (*Morone saxatilis*) 腹腔与脑中注射瘦素后, 其摄食减少且体重下降, 摄食调控相关基因下降^[51], 这说明瘦素参与摄食调控且有抑制摄食的作用。本研究发现, 0.80% Arg 组 (对照组) 的 *leptin* 表达水平显著高于其余 4 组, 且表达水平最高, 说明精氨酸含量不足上调了 *leptin* 表达水平, 影响该虾的摄食。但各实验组虾的摄食率并未表现出显著差异, 具体原因还需进一步研究。

3.4 植物蛋白补充精氨酸对日本沼虾肠道结构的影响

虾肠黏膜屏障的原发部位是肠上皮细胞, 肠上皮细胞与微绒毛的紧密连接与虾的肠道健康密切相关^[52], 肠道组织绒毛高度数量和形态结构可反映肠道消化吸收能力的强弱^[53]。本研究发现 1.33% 与 1.85% Arg 组较其他精氨酸组肠道微绒毛完整、数量多且长, 排列整齐, 说明补充适当的精氨酸可以改善其肠道结构, 进而改善肠道健康, 从而提高日本沼虾对饲料的消化吸收率和生长性能。该实验结果与杂交条纹鲈 (*M. chrysops* × *M. saxatilis*)^[54] 结果相似。

4 结论

综上, 饲料中 1.85% 精氨酸水平可以改善日本沼虾肠道形态结构, 提高日本沼虾生长性能、抗氧化能力及肝胰腺中 *tor*、*s6k* 与 *npv* 的表达, 降低 *leptin* 的表达, 基于 WGR 数据进行回归分析, 在以植物蛋白为主的日本沼虾低鱼粉饲料中, 精氨酸的适宜水平为 1.83%。

参考文献 (References):

- [1] Wu M J, Lu S D, Wu X Y, et al. Effects of dietary amino acid patterns on growth, feed utilization and hepatic IGF-I, TOR gene expression levels of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) juveniles[J]. *Aquaculture*, 2017, 468: 508-514.
- [2] NRC (National Research Council). Nutrient requirements of fish[M]. Washington: National Academy Press, 2011.
- [3] Wang Q C, Xu Z, Ai Q H. Arginine metabolism and its functions in growth, nutrient utilization, and immunonutrition of

- fish[J]. *Animal Nutrition*, 2021, 7(3): 716-727.
- [4] Liang H L, Ren M C, Habte-Tsion H M, et al. Dietary arginine affects growth performance, plasma amino acid contents and gene expressions of the TOR signaling pathway in juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. *Aquaculture*, 2016, 461: 1-8.
- [5] Wu M J, Wu X Y, Lu S D, et al. Dietary arginine affects growth, gut morphology, oxidation resistance and immunity of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) juveniles[J]. *British Journal of Nutrition*, 2018, 120(3): 269-282.
- [6] Liu Y, Yu H X, Guo Y L, et al. Arginine regulates TOR signaling pathway through SLC38A9 in abalone *Haliotis discus hannai*[J]. *Cells*, 2021, 10(10): 2552.
- [7] Lin H Z, Tan X H, Zhou C P, et al. Effect of dietary arginine levels on the growth performance, feed utilization, non-specific immune response and disease resistance of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus*[J]. *Aquaculture*, 2015, 437: 382-389.
- [8] Liang H L, Ji K, Ge X P, et al. Effects of dietary arginine on antioxidant status and immunity involved in AMPK-NO signaling pathway in juvenile blunt snout bream[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 78: 69-78.
- [9] Zhou Q C, Zeng W P, Wang H L, et al. Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2012, 364-365: 252-258.
- [10] Qi C L, Wang X D, Han F L, et al. Arginine supplementation improves growth, antioxidant capacity, immunity and disease resistance of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 463-473.
- [11] 汪超, 黄苇, 谢明, 等. 精氨酸与动物摄食生理调节因子的关系[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(2): 242-247.
- Wang C, Huang W, Xie M, et al. Interaction of arginine and ingesting regulatory factors in animal[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(2): 242-247 (in Chinese).
- [12] Webel D M, Johnson R W, Baker D H. Lipopolysaccharide-induced reductions in body weight gain and feed intake do not reduce the efficiency of arginine utilization for whole-body protein accretion in the chick[J]. *Poultry Science*, 1998, 77(12): 1893-1898.
- [13] Hara T J. Feeding behaviour in some teleosts is triggered by single amino acids primarily through olfaction[J]. *Journal of Fish Biology*, 2006, 68(3): 810-825.
- [14] Gorissen M H A G, Flik G, Huising M O. Peptides and proteins regulating food intake: a comparative view[J]. *Animal Biology*, 2006, 56(4): 447-473.

- [15] Jobling M, Alanärä A, Noble C, *et al.* Appetite and feed intake[M]//Huntingford F, Jobling M, Kadri S. Aquaculture and behavior. Chichester: Wiley-Blackwell, 2012: 183-219.
- [16] Murashita K, Uji S, Yamamoto T, *et al.* Production of recombinant leptin and its effects on food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 150(4): 377-384.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 郑金仙, 周东生, 魏山山, 等. 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 [J]. 水产学报, 2022, 46(10): 1801-1812.
Zheng J X, Zhou D S, Wei S S, *et al.* 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*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(10): 1801-1812 (in Chinese).
- [20] Livak K 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.
- [21] National Research Council. Nutrient requirements of fish and shrimp[M]. National Academies Press, 2011.
- [22] 付丰顺, 刘成栋, 王旋, 等. 大菱鲂对饲料精氨酸的需求量及饲料精氨酸水平对大菱鲂生长和代谢的影响 [J]. 水产学报, 2021, 45(10): 1692-1702.
Fu F S, Liu C D, Wang X, *et al.* Dietary arginine requirement and effects of dietary arginine levels on the metabolism of *Scoptthalmus maximus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(10): 1692-1702 (in Chinese).
- [23] 李晋南, 张圆圆, 范泽, 等. 饲料精氨酸水平对松浦镜鲤幼鱼生长、抗氧化能力和肠道消化酶活性及其组织学结构的影响 [J]. 水产学杂志, 2021, 34(5): 32-39.
Li J N, Zhang Y Y, Fan Z, *et al.* Effects of dietary arginine level on growth, antioxidant capacity, and intestinal digestive enzyme activity and histological structure in juvenile Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio* Songpu)[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2021, 34(5): 32-39 (in Chinese).
- [24] Cheng Z Y, Buentello A, Gatlin III D M. Effects of dietary arginine and glutamine on growth performance, immune responses and intestinal structure of red drum, *Sciaenops ocellatus*[J]. *Aquaculture*, 2011, 319(1-2): 247-252.
- [25] Rahimnejad S, Lee K J. Dietary arginine requirement of juvenile red sea bream *Pagrus major*[J]. *Aquaculture*, 2014, 434: 418-424.
- [26] Murillo-Gurra, Coloso, Borlongan, *et al.* Lysine and arginine requirements of juvenile Asian sea bass (*Lates calcarifer*)[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2001, 17(2): 49-53.
- [27] Li M F, Wen H, Huang F, *et al.* Role of arginine supplementation on muscular metabolism and flesh quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared in freshwater[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 980188.
- [28] Gao Y J, Yang H J, Guo D Q, *et al.* Dietary arginine requirement of juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes in Cuvier & Valenciennes, 1844)[J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(12): 3070-3078.
- [29] Kaushik S J, Fauconneau B, Terrier L, *et al.* Arginine requirement and status assessed by different biochemical indices in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) [J]. *Aquaculture*, 1988, 70(1-2): 75-95.
- [30] 李培佳, 陈晓瑛, 赵红霞, 等. 精氨酸对杂交鳢生长性能、体组成、血浆生化指标及抗氧化能力的影响 [J]. 动物营养学报, 2022, 34(3): 1820-1830.
Li P J, Chen X Y, Zhao H X, *et al.* Effects of arginine on growth performance, body composition, plasma biochemical indexes and antioxidant capacity of hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *C. argus* ♂)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(3): 1820-1830 (in Chinese).
- [31] 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).
- [32] Yang C, Ye L Z, Liu B, *et al.* Dietary arginine requirements of oriental river prawns (*Macrobrachium nipponense*) assessed using growth and biomarkers of antioxidant capacity[J]. *Aquaculture*, 2023, 574: 739697.
- [33] 吴骏. 罗氏沼虾幼虾精氨酸适宜需要量及饲料精氨酸/赖氨酸不同配比试验研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2016.
Wu J. Study on dietary arginine requirement and effects of different Arg/Lys ratio in Juveniles of *Macrobrachium rosenbergii*[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2016 (in Chinese).
- [34] 龚杨帆. 克氏原螯虾幼虾精氨酸的需要量研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
Gong Y F. Study on the requirement of arginine in juveniles of

- Procambarus clarkii*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [35] 金敏. 三疣梭子蟹幼蟹对蛋白质、精氨酸、赖氨酸和蛋氨酸需要量的研究 [D]. 宁波: 宁波大学, 2014.
- Jin M. Study on the requirements of protein, arginine, lysine and methionine for juvenile swimming crab, *Portunustrituberculatus*[D]. Ningbo: Ningbo University, 2014 (in Chinese).
- [36] Giannini E G, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians[J]. *CAMJ*, 2005, 172(3): 367-379.
- [37] 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.
- [38] Pan C H, Chien Y H, Hunter B. The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2003, 297(1): 107-118.
- [39] 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).
- [40] Winterbourn C C, Metodieva D. [7] Reaction of superoxide with glutathione and other thiols[J]. *Methods in Enzymology*, 1995, 251: 81-86.
- [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] 吴俊光, 王连生, 王常安, 等. 饲料中精氨酸水平对杂交鲟幼鱼抗氧化能力及血清生化指标的影响 [J]. *大连海洋大学学报*, 2016, 31(3): 272-279.
- Wu J G, Wang L S, Wang C A, *et al.* Effects of dietary arginine levels on antioxidative state and serum biochemical indices in juvenile hybrid sturgeon[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2016, 31(3): 272-279 (in Chinese).
- [43] Anthony T G, Reiter A K, Anthony J C, *et al.* Deficiency of dietary EAA preferentially inhibits mRNA translation of ribosomal proteins in liver of meal-fed rats[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2001, 281(3): E430-E439.
- [44] Wang B, Liu Y, Feng L, *et al.* Effects of dietary arginine supplementation on growth performance, flesh quality, muscle antioxidant capacity and antioxidant-related signalling molecule expression in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Food Chemistry*, 2015, 167: 91-99.
- [45] Volkoff H, Xu M Y, MacDonald E, *et al.* Aspects of the hormonal regulation of appetite in fish with emphasis on goldfish, Atlantic cod and winter flounder: notes on actions and responses to nutritional, environmental and reproductive changes[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2009, 153(1): 8-12.
- [46] Narnaware Y K, Peter R E. Effects of food deprivation and refeeding on neuropeptide Y (NPY) mRNA levels in goldfish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 129(2-3): 633-637.
- [47] 方勇军. 精氨酸对肉鸭生长性能、免疫功能、胴体品质和血液脂质的影响 [D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2009.
- Fang Y J. Influence of arginine on growth performance, immune action, carcass characteristics and blood lipid of meat duck[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2009 (in Chinese).
- [48] Carew L B, Evarts K G, Alster F A. Growth, feed intake, and plasma thyroid hormone levels in chicks fed dietary excesses of essential amino acids[J]. *Poultry Science*, 1998, 77(2): 295-298.
- [49] Blanco A M, Soengas J L. Leptin signalling in teleost fish with emphasis in food intake regulation[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2021, 526: 111209.
- [50] Zhang Y Y, Chua Jr S. Leptin function and regulation[J]. *Comprehensive Physiology*, 2017, 8(1): 351-369.
- [51] Won E T, Baltzegar D A, Picha M E, *et al.* Cloning and characterization of leptin in a perciform fish, the striped bass (*Morone saxatilis*): control of feeding and regulation by nutritional state[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 178(1): 98-107.
- [52] Zuhl M, Schneider S, Lanphere K, *et al.* Exercise regulation of intestinal tight junction proteins[J]. *British Journal of Sports Medicine*, 2014, 48(12): 980-986.
- [53] 陈伟军, 朱传忠, 杨新冬, 等. 壳寡糖对凡纳滨对虾生长、抗氧化能力和肠道结构的影响 [J]. *饲料研究*, 2019, 42(12): 23-27.
- Chen W J, Zhu C Z, Yang X D, *et al.* Effect of chitosan oligosaccharides on growth performance, oxidation resistance and intestinal structure of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Feed Research*, 2019, 42(12): 23-27 (in Chinese).
- [54] Cheng Z Y, Gatlin III D M, Buentello A. Dietary supplementation of arginine and/or glutamine influences growth performance, immune responses and intestinal morphology of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*)[J]. *Aquaculture*, 2012, 362-363: 39-43.

Effects of arginine supplementation in plant-protein-based low-fishmeal feed on growth, feeding, antioxidant, immune and intestinal structure of *Macrobrachium nipponense*

WANG Junbao, ZHENG Jinxian, ZHOU Dongsheng, LI Shanshan, KONG Youqin, QI Changle, LIU Yan, XU Qiyu, DING Zhili*

Key Laboratory of Aquatic Animal Genetic Breeding and Nutrition, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Aquatic Resources Conservation and Development, School of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou 313000, China

Abstract: Arginine (Arg) plays a vital role in regulating of body growth, antioxidant defense, and protein synthesis. The study aimed to evaluate the effects of plant-protein-based low-fishmeal feed supplemented with arginine on feeding, antioxidant capacity, immunity and intestinal morphology in *Macrobrachium nipponense*. Five isonitrogenous and isoenergetic dietary groups were formulated to contain varying levels of dietary arginine (0%, 0.60%, 1.20%, 1.80% and 2.40%, respectively) under low fish meal content and high plant protein inclusion. The measured arginine concentrations in diets were 0.80% (0.80% Arg), 1.33% (1.33% Arg), 1.85% (1.85% Arg), 2.24% (2.24% Arg) and 2.65% (2.65% Arg), respectively. The feeding trial lasted for 8 weeks. The results showed that the weight gain initially increased with higher dietary arginine levels before declining. The peak values were observed in the group receiving 1.85% Arg, which significantly surpassed those recorded for the groups receiving diets with 0.80%, 1.33%, or 2.65% Arg ($P < 0.05$). Conversely, the feed conversion ratio (FCR) exhibited an inverse trend, reaching its lowest point in the group fed with a diet containing 1.85% Arg, this value was significantly lower than that of the groups receiving diets with either 0.80% or 2.65% Arg ($P < 0.05$). No significant differences were found regarding survival rate (SR) or feeding rate (FR) among all experimental groups ($P < 0.05$). With the increase in arginine levels, the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) and the content of glutathione (GSH) in the 1.85% Arg group were higher than those observed in the 0.80% Arg group ($P < 0.05$). Additionally, the activity of superoxide dismutase (SOD) in the 1.85% Arg group was also more significant than that found in the 0.80%, 1.33%, and 2.65% Arg groups ($P < 0.05$). The malondialdehyde (MDA) content in the 1.85% Arg group was notably lower than that of all other groups, reaching statistical significance ($P < 0.05$). Furthermore, aspartate aminotransferase (AST) activity was lowest in the 1.85% Arg group and significantly lower compared to both of the 0.80% and 1.33% Arg groups ($P < 0.05$). The alanine aminotransferase (ALT) activity recorded for both of the 1.33% and 1.85% Arg groups was also at its lowest level, significantly less than that in the 0.80%, 2.24% and 2.65% groups ($P < 0.05$). The target of rapamycin (*tor*) and neuropeptide Y (*npy*) mRNA expression level in hepatopancreas was upregulated in 1.33% Arg group and higher than that in the other four groups ($P < 0.05$). The ribosomal protein 6kinase (*s6k*) mRNA expression level in the 1.85% Arg group was the highest and significantly higher than that in 2.24% Arg and 2.65% Arg groups ($P < 0.05$). The leptin mRNA expression level decreased first and then increased, and its expression level was the highest in the 0.80% Arg group. The intestinal microvilli in the 1.85% and 2.24% Arg groups appeared intact, closely arranged, numerous, and slender. It was shown that Arg at a level of 1.85% in plant-protein-based low-fishmeal feed can enhance intestinal morphology, growth performance, antioxidant capacity, and the mRNA levels of genes related to tor signalling pathway and appetite regulation in *M. nipponense*. Based on second-order regression analysis of weight gain vs. dietary Arg level, the ideal dietary Arg level for *M. nipponense* was 1.83%.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; plant protein; arginine; TOR signaling pathway; appetite; intestinal morphology

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

Funding projects: Huzhou Natural Science Foundation (2019YZ04); National Natural Science Foundation of China (31972800)