

文章编号 :1000 - 0615(2002)01 - 0073 - 06

灌喂必需氨基酸模式溶液对草鱼全鱼 和肌肉、肝胰脏蛋白质合成代谢的影响

罗 莉, 叶元土, 林仕梅

(西南农业大学水产系, 重庆 400716)

摘要: 采用大剂量食道灌喂 DL-[4-³H]-Phe, 研究不同 EAA 模式下, 20~30g 体重草鱼种的全鱼和肌肉、肝胰脏的蛋白质合成代谢。结果表明: 分别缺乏 Lys、Met、Trp、Arg 的 4 种极端不平衡 EAA 模式, 同草鱼肌肉 EAA 模式即相对平衡的基础模式相比, 肌肉、肝胰脏及全鱼的蛋白质合成速率(FSR)均显著降低, 其降低程度高低依次为 Met、Lys、Arg、Trp; 肝胰脏、肌肉的蛋白质合成代谢与整体蛋白质合成代谢对 EAA 模式的改变产生相同的变化趋势, 并且三者蛋白质合成代谢速率为肝胰脏 > 全鱼 > 肌肉; EAA 模式的 Lys、Met、Trp、Arg 4 因素中, 对肌肉、肝胰脏蛋白质合成速率影响最大的是 Met, 其余依次为 Lys、Arg、Trp。

关键词: 草鱼; 蛋白质周转代谢; 肌肉; 肝胰脏; 必需氨基酸模式

中图分类号: Q591.2 **文献标识码:** A

Effects of infusing EAA pattern solution on protein synthesis in whole body, muscle and hepatopancreas of *Ctenopharyngodon idellus*

LUO Li, YE Yuan-tu, LIN Shi-mei

(Department of Fisheries, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China)

Abstract: The experiment adopts oesophageal infusion with large dose DL-[4-³H]-Phe to research protein synthesis metabolism in whole body, muscle and hepatopancreas of 20~30g grass carp in different essential amino acid(EAA) patterns. The results show that: 1. Four imbalance EAA patterns, respectively short of Lys, Met, Trp, Arg, compared with EAA pattern of muscle, result in remarkable fractional protein synthesis rate (FSR) decrease of muscle, hepatopancreas and whole body, which shows the decreasing by Met > Lys > Arg > Trp. 2. Following the variation of EAA pattern, FSR of muscle, hepatopancreas and whole body has a similar change, and shows FSR by: hepatopancreas > whole body > muscle. 3. In Met, Lys, Arg and Trp four factors of EAA pattern, from Met to Trp have gradually and orderly weakened impact on protein synthesis in muscle and hepatopancreas of grass carp, in other words, Met has the largest impact.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; protein synthesis; muscle; hepatopancreas; essential amino acid pattern

必需氨基酸(Essential Amino Acid, EAA)模式, 即指十种 EAA 的比例关系。满足动物需要的氨基酸

收稿日期: 2001-07-27

基金项目: 重庆市科委攻关项目(97-4767)

作者简介: 罗莉(1972-), 女, 四川宜宾人, 讲师, 主要从事水产动物营养研究。Tel: 023-68256241, E-mail: luolilui@cta.cq.cn

的理想比例则称为理想氨基酸模式(Ideal Amino Acid Pattern, IAAP),是目前动物营养研究的一个热点。水生动物在这方面的研究刚起步。动物 EAA 平衡状态的改变对动物蛋白质合成的影响国内外研究不多,有关草鱼的研究未见报道。本研究运用同位素示踪的生物大剂量法,研究不同 EAA 模式的氨基酸溶液对草鱼肌肉、肝胰脏和全鱼蛋白质合成代谢的影响,同时探讨肌肉、肝胰脏的蛋白质合成代谢与整体蛋白质合成代谢的关系。从而为草鱼 IAAP 的研究和水生动物蛋白质、氨基酸代谢动力学方面的研究提供一些理论基础数据和一种研究方法。

1 材料与方 法

1.1 试验鱼和示踪氨基酸溶液

试验草鱼种由西南农业大学水产系鱼场提供,体重 20~30g,小网箱中投喂浮萍暂养。水温 20~25。溶氧充足,pH 6.5。示踪氨基酸溶液用鱼用生理盐水山本液配制^[1],含有 ³H 标记混旋苯丙氨酸(DL-[4-³H]-Phe)40mci L⁻¹,和左旋苯丙氨酸(L-Phe)150mmol L⁻¹[2-4]。

1.2 试验设计及方法

采用食道灌喂的大剂量法研究 ³H-Phe 掺入草鱼体的时间过程。本研究目标是确定研究蛋白质合成的时间点,证明食道灌喂的生物大剂量法研究蛋白质合成的有效性。取暂养草鱼 27 尾,饥饿两天,排空肠道内容物。第 3 天上午 9:00,用微量进样器通过输液软管插入食道,1min 内一次性大剂量灌喂示踪氨基酸溶液每 100g 鱼重 1mL^[2-4]。设置进入鱼体后 2、5、10、20、30、40、50、60min 共 8 个时间组,每组 3 尾,液氮速冻。冰盘中打开腹腔取出肠道,用冰冷生理盐水冲出内容物,滤纸吸干,随后肠道和鱼体一并放入预冷研钵中,剪碎研细并混匀。此过程随时滴加液氮,-20 保存制备样品,测定全鱼中与蛋白质结合的和游离 Phe 的含量和放射强度,计算比放射性。

设计 5 种 EAA 模式液,研究极端不平衡的 EAA 模式对草鱼种肌肉、肝胰脏及全鱼蛋白质合成的影响(表 1)。模式 1 与肌肉中 10 种 EAA 比例关系完全相同,设定为平衡 EAA 模式。模式 2、3、4、5 是在模式 1 基础上,分别缺乏赖氨酸(Lys)、蛋氨酸(Met)、色氨酸(Trp)、精氨酸(Arg)的极端不平衡模式。这 4 种氨基酸是淡水鱼饲料中最容易出现的限制性氨基酸。

模式液中 EAA 量的确定:以草鱼 20~30g 体重,投饲率 4%,饲料粗蛋白含量 32%,确定每天供给的蛋白质总量。再根据草鱼肌肉 EAA 比例关系确定每天鱼体需要的 10 种 EAA 的量。每天每 100g 体重用 8mL EAA 模式液食道灌喂,满足每天鱼体 EAA 的需要量推算而得。

食道灌喂 EAA 模式液量的确定:以草鱼投饲率 4%计,每天每 100g 体重供给饲料 4g,灌喂模式液的量则以其 2 倍(8mL)满足。

表 1 5 种必需氨基酸模式

Tab.1 5 patterns of Essential Amino Acid(EAA)

(mmol L⁻¹)

氨基酸 Amino acid	模式 1 Pattern 1	模式 2 Pattern 2	模式 3 Pattern3	模式 4 Pattern4	模式 5 Pattern5
赖氨酸 Lys	75	0	75	75	75
蛋氨酸 Met	22	22	0	22	22
色氨酸 Trp	7.5	7.5	7.5	0	7.5
精氨酸 Arg	50	50	50	50	0
组氨酸 His	18.5	18.5	18.5	18.5	18.5
亮氨酸 Leu	60	60	60	60	60
异亮氨酸 Ile	41	41	41	41	41
苯丙氨酸 Phe	34	34	34	34	34
苏氨酸 Thr	43.5	43.5	43.5	43.5	43.5
缬氨酸 Val	47.5	47.5	47.5	47.5	47.5

试验时取暂养草鱼,饥饿两天,分为5组,每组3尾,第3、4天按每100g鱼重每天8mL分别食道灌喂EAA模式液1~5,一天分3次定时灌喂满足(9:00, 14:00, 19:00)。第5天9:00灌喂EAA模式液,12:00灌喂示踪氨基酸溶液,30min后液氮速冻鱼体,冰盘中分割肝胰脏和肌肉。测定肌肉、肝胰脏、全鱼游离的和与蛋白质结合的Phe的含量和放射强度,计算比放射性和蛋白质合成速率。

采用 $L_9(3^4)$ 正交设计,研究EAA模式中Lys、Met、Trp、Arg4种限制性氨基酸对蛋白质合成的影响。在表2中,Lys、Met、Trp、Arg4个营养因素的3水平为:第一水平如表1中模式1按肌肉EAA组成推算而得;第二和第三水平分别为第一水平基础上减少和增加20%。其余6种EAA与表1的模式1相同。按前述方法测定9种模式下肌肉、肝胰脏游离的和与蛋白质结合的Phe的比放射性,计算蛋白质合成速率。

表2 正交试验设计表 $L_9(3^4)$
Tab.2 $L_9(3^4)$ orthogonal trial design (mmol L^{-1})

组别 group	赖氨酸 Lys	蛋氨酸 Met	色氨酸 Trp	精氨酸 Arg
1	75(1)	22(1)	7.5(1)	50(1)
2	60(2)	17.6(2)	6.0(2)	50(1)
3	90(3)	26.4(3)	9.0(3)	50(1)
4	60(2)	26.4(3)	7.5(1)	40(2)
5	90(3)	22(1)	6.0(2)	40(2)
6	75(1)	17.6(2)	9.0(3)	40(2)
7	90(3)	17.6(2)	7.5(1)	60(3)
8	75(1)	26.4(3)	6.0(2)	60(3)
9	60(2)	22(1)	9.0(3)	60(3)

1.3 测定指标和样品分析方法

1.3.1 测定指标

蛋白质合成速率或分率(Fractional Protein Synthesis Rate, FSR % = $\frac{S_b}{S_a} \times \frac{1440}{t} \times 100$)^[5]。

上式中, S_b 、 S_a 分别为与蛋白质结合的Phe和游离Phe的比放射性($dpm \mu mol^{-1}$);1440为一天的分钟数; t 为测定时间。

$S_b(dpm \mu mol^{-1}) = \text{蛋白结合 Phe 放射强度}(dpm \cdot g^{-1}) / \text{蛋白结合 Phe 含量}(\mu mol \cdot g^{-1})$

$S_a(dpm \mu mol^{-1}) = \text{游离 Phe 放射强度}(dpm \cdot mL^{-1}) / \text{游离 Phe 含量}(\mu mol \cdot mL^{-1})$

1.3.2 样品分析方法

(1) 蛋白质的纯化及游离氨基酸的分离。取肌肉、肝胰脏及全鱼1g左右,按5倍重量体积加入冰冷的10%三氯醋酸(TCA)于玻璃匀浆器匀浆,按参考文献[6]的方法分离蛋白质和游离氨基酸,并纯化蛋白质,70℃烘至恒重。

(2) 游离的和与蛋白质结合的Phe放射强度测定。称取一定量前述制备好的纯蛋白质,加入30倍重量体积高氯酸($HClO_4$)和过氧化氢(H_2O_2),70℃反应至消化液透明无色。取400 μL 消化液于闪烁瓶,加入5mL闪烁液(5%的丁基-PBD二甲苯溶液),5mL无水乙醇,使闪烁液被乳化至刚好澄清,液体闪烁计数仪测定放射强度,内标法作淬灭校正。游离氨基酸直接取400 μL 于闪烁瓶,测定放射强度。

(3) 纯化蛋白和游离氨基酸中Phe含量用BECKMAN-6300高效氨基酸自动分析仪测定。

1.4 统计分析

对试验结果进行Duncan最小显著极差法进行各组平均数的显著性检验,在每个平均数的右上方标上小写英文字母,具有不同标记字母的即为差异显著($P < 0.05$);并进行正交试验极差分析。

2 结果

2.1 ^3H phe 掺入草鱼体随时间变化规律

由图1、图2可知,饥饿状态下,草鱼种灌喂示踪氨基酸液后30min,全鱼蛋白质和游离氨基酸的比放射性随时间的递增而显著增加($P < 0.05$),灌喂后30min时,游离Phe比放射性达最高值($P < 0.05$)。灌喂30~60min,游离Phe比放射性随时间的递增缓慢下降,保持一相对稳定状态,说明从肠道吸收而来的 ^3H Phe在这段时间开始分解;而蛋白结合Phe的比放射性(y , $\text{dpm} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$)随时间(t)线性上升($y = -0.2487 + 0.5239t$; $r = 0.9992$) (图2),这一过程说明 ^3H Phe掺入新合成的蛋白质中的过程。灌喂后2min时,与蛋白质结合Phe的比放射性值很低,没纳入 r 的计算。根据以上结果,我们确定测定蛋白质合成的时间点为引入示踪氨基酸后30min,此值与Habib^[4]采用 ^3H Phe腹腔注射欧洲真鲈测得的适宜时间为40min相近。

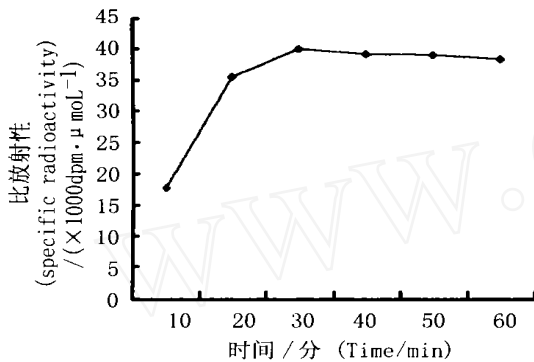


图1 全鱼游离Phe比放射性

Fig. 1 Specific radioactivity of free phenylalanine in whole body

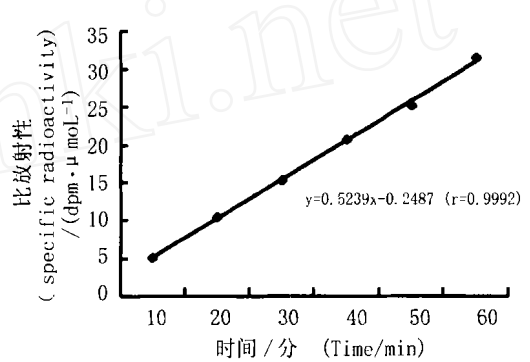


图2 全鱼蛋白质结合Phe比放射性

Fig. 2 Specific radioactivity of protein-bound phenylalanine in whole body

2.2 极端不平衡EAA模式溶液对草鱼种肌肉、肝胰脏及全鱼蛋白质合成速率的影响

从表3可知,同一EAA模式下,肌肉、肝胰脏及全鱼的蛋白质合成速率大体顺序为:肝胰脏,全鱼,肌肉,而且,肌肉、肝胰脏的蛋白质合成速率与全鱼蛋白质合成速率对EAA模式变化的反应具有相似的趋势;不同EAA模式下,肌肉、肝胰脏及全鱼的蛋白质合成速率大小顺序为:模式1(平衡EAA),模式4(缺Trp),模式5(缺Arg),模式2(缺Lys),模式3(缺Met)。该结果表明:(1)引入体内的极端不平衡的EAA模式溶液,对草鱼体蛋白质合成速度产生了直接的影响。(2)EAA模式溶液在缺少某一种AA下,体蛋白合成还在继续进行,这说明体内AA代谢库的AA参与了体内蛋白质的周转。(3)在Lys、Met、Trp、Arg 4个EAA中,缺乏Met的模式溶液对蛋白质合成影响最大,其次是缺乏Lys,再次为缺乏Arg,最后为缺乏Trp。

表3 极端不平衡EAA模式对蛋白质合成速率的影响

Tab. 3 Extremely imbalance EAA pattern effects on fractional protein synthesis rate (FSR) ($\% \cdot \text{d}^{-1}$)

	模式1 (Pattern 1) (肌肉模式) muscular pattern	模式2 (Pattern 2) (缺Lys) deficiency of Lys	模式3 (Pattern 3) (缺Met) deficiency of Met	模式4 (Pattern 4) (缺Trp) deficiency of Trp	模式5 (Pattern 5) (缺Arg) deficiency of Arg
肌肉 muscle	5.06 ^a	2.51 ^{cd}	1.92 ^d	4.25 ^b	3.06 ^c
肝胰脏 hepatopancreas	12.28 ^a	8.08 ^c	6.64 ^d	10.56 ^{ab}	9.60 ^{bc}
全鱼 whole-body	7.15 ^a	3.53 ^d	2.88 ^d	5.90 ^b	4.65 ^c

2.3 EAA 模式溶液中 Lys、Met、Trp、Arg 四因素对蛋白质合成的影响

根据表 4 结果经极差分析,肌肉蛋白质合成速率 R 值大小分别为:Met (1.38),Lys (1.22),Arg (0.79),Trp (0.17);肝胰脏蛋白质合成速率 R 值大小分别为:Met (3.31),Lys (2.94),Arg (1.93),Trp (0.44)。同时,统计分析而得,肌肉、肝胰脏蛋白质合成速率最大的 4 个因素的水平分别为:Lys (75mmol L^{-1} , 第 1 水平),Met (26.4mmol L^{-1} , 第 3 水平),Trp (6.0mmol L^{-1} , 第 2 水平),Arg (60mmol L^{-1} , 第 3 水平)。由这 4 个水平组合而成的试验 8 组的肌肉、肝胰脏蛋白质合成速率均达最高,分别为 6.45,15.66,该组被认为是这 4 种 EAA 的最佳组合。

该结果表明:(1) 个别 EAA (Lys、Met、Trp 和 Arg) 的含量变化对草鱼肌肉、肝胰脏蛋白质合成产生了直接影响。(2) 在 Lys、Met、Trp 和 Arg 4 种限制性 EAA 中,对肌肉、肝胰脏蛋白质合成影响最大的是 Met,其次是 Lys,再次为 Arg,Trp 对蛋白质合成影响最小。(3) 采用食道灌喂 EAA 模式液,并通过食道引入示踪氨基酸研究,得到了蛋白质合成速率最高的 4 种 EAA (Lys、Met、Trp、Arg) 的最佳组合模式。该模式与肌肉中的模式相比:Lys 同肌肉模式水平,Met、Trp 和 Arg 分别为肌肉模式水平基础上增加 20%、减少 20%和增加 20%。表明采用食道灌喂大剂量法有望成为研究 EAA 模式和验证 EAA 模式平衡程度的一种新方法。至于这种构想的实现,亦有待进一步更系统的研究。

表 4 不同 EAA 模式下肌肉、肝胰脏蛋白质合成速率
Tab.4 FSR of muscle and hepatopancreas in different EAA pattern (% d^{-1})

	组 别 (group)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
肌肉 muscle	5.06	3.98	4.27	5.74	4.30	4.55	3.82	6.45	5.41
肝胰脏 hepatopancreas	12.18	9.68	10.35	13.90	10.45	11.04	9.26	15.66	13.09

3 讨论

3.1 食道灌喂的大剂量法测定鱼体蛋白质合成的有效性

测定动物蛋白质周转的方法主要有 3 种:恒速连续灌注法,大剂量一次性注入法和动静脉稀释法。Habib^[4]认为大剂量法用于测定鱼体蛋白质合成最适合。该法已用于鲤、虹鳟、鲈蛋白质合成代谢研究中。Loughna 和 Gouldspink^[7]在虹鳟试验中证明了大剂量 Phe 不影响蛋白质合成;而且 Rooyacker 和 Wagenmaker^[8]在测定鼠活体单个组织的蛋白质合成时,又进一步证实了 $^3\text{H-Phe}$ 示踪的大剂量法的可靠性和优越性。另外,示踪物引入动物体常采用静脉注射,如 Peragon^[9]研究日粮蛋白水平对虹鳟肌肉和肝胰脏蛋白质周转时采用了该法。静脉注射其优点为示踪氨基酸很快分布到各器官组织,达到基本均匀一致的状态,测定时间短,通常为 2~10min,且较灵敏;其缺点为鱼体的静脉难以找到。Habib^[4]研究欧洲真鲈整体蛋白质周转时采用了腹腔注射,亦证明有效。其优点为容易操作,其缺点为易使组织间放射性同位素交叉污染。本研究采用的食道灌喂法均可避免静脉和腹腔注射两种方法的不足。而且,本试验测得的蛋白质合成速率与 Habib^[4]测得真鲈蛋白质合成速率的值相近,并能反映出 EAA 模式的变化,这进一步证实了食道灌喂的大剂量法的可靠性。

3.2 EAA 模式中限制性氨基酸对草鱼体蛋白质合成的影响

Lys、Met、Trp、Arg 容易成为鱼饲料中的限制性氨基酸^[10],故选取这 4 种 EAA 的缺乏作为极端不平衡模式研究;同时,进一步正交试验考查了这 4 个因素对肌肉、肝胰脏蛋白质合成的影响。结果证明,缺乏 Lys、Met、Trp、Arg 的极端不平衡 EAA 模式,同肌肉模式(相对平衡模式)相比,显著降低了肌肉、肝胰脏及全鱼的蛋白质合成速率。说明平衡氨基酸具有促进蛋白质合成的效果,这与 Garlick 和 Grant^[11]

报道的结果一致。而且,极端不平衡模式试验和正交试验均又证明:Met 的缺乏对蛋白质合成速率影响最大,其次是 Lys,再次是 Arg,Trp 的缺乏影响最小。这与下述原因有关:Met 在蛋白质合成中有非常重要的作用,所有蛋白质合成的第一步,核糖体结合 mRNA 在起始位置结合的氨基酸是 Met;当 Met 缺乏时,由于 Met 自身氧化速度较快,重利用 Met 减少,体内单位 RNA 所合成的蛋白质减少,合成速度降低^[12]。Lys 的主要去路是参与蛋白质合成而分解较少,它对蛋白质合成影响较大,有研究发现,随 Lys 量的增加,肝胰脏、肌肉蛋白质合成量也随之增加。Arg 可能是胰岛素的促泌素^[13],而胰岛素本身参与蛋白质合成中肽链的延长,促进蛋白质合成。Trp 不仅是合成蛋白质的原料,而且参与调节蛋白质合成,从而影响蛋白质合成速率。

3.3 肌肉、肝胰脏的蛋白质合成代谢与全鱼蛋白质合成代谢的关系

肝胰脏蛋白质代谢旺盛,对营养状态的变化非常灵敏;肌肉是蛋白质沉积的主要组织;全鱼能反映草鱼整体蛋白质代谢状况。研究表明,草鱼种肌肉、肝胰脏和全鱼蛋白质合成速率分别与 EAA 模式的平衡呈正相关关系,而且肌肉、肝胰脏的蛋白质合成代谢速率与整体蛋白质合成代谢速率对 EAA 模式变化的反应具有相似的趋势。这证实了外周组织(特别是肌肉、皮肤),内脏器官(特别是肝脏)的蛋白质合成与营养摄入的关系和全身的模式基本相似的观点^[14]。再者,较多研究证明,在动物的器官组织中,肝脏和胰腺蛋白质合成速度最快,肌肉和心脏最慢。在本试验中,同一 EAA 模式下,肝胰脏、肌肉和全鱼三者蛋白质的合成速率大小次序为:肝胰脏,全鱼,肌肉。这与相关的试验结果一致。而且,Peragon^[9]亦观察到虹鳟肝胰脏蛋白质合成速率显著高于白肌。

参考文献:

- [1] Jiangshang Xingxiang. Experimental animal of fish[M]. Beijing:Ocean Press,1992.55 - 56. [江上信雄.鱼类实验动物[M].北京:海洋出版社,1992.55 - 56.]
- [2] Garlick P J. A rapid and convient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissue by injection of [³H]phenylalanine[J]. Biochem J, 1980, 192:719 - 723.
- [3] Goldspink D F. Protein synthesis during the developmental growth of the small and large intestine of the rat[J]. Biochem J, 1984, 217:527 - 534.
- [4] Habib L. Augmentation of protein synthesis and degraation by poor dietary amino acid balance in European sea bass[J]. J Nutr, 1993, 123(10):1754 - 1761.
- [5] Houlihan D F. Growth rates and protein turnover in Atlantic cod, *Gadus morhua*[J]. Can J Fish Aquac Sci, 1988, 45:951 - 964.
- [6] Mai K S, Li A J, Yin Z F. Studies on the absorbtion and utilization of amino acids in the test diets by the prawn *Penaeus orientalis*[J]. Acta Oceanologica sinica, 1988, 7(4):621 - 629.
- [7] Loughna P T, Goldspink G. The effects of starvation upon protein turnover in red and white myotomal muscle of rainbow trout[J]. J Fish Biol, 1984, 25:223 - 230.
- [8] Rooyackers O E, Wagenmakers A J M. Tracer Kinetics are limited value to measure in vivo protein synthesis and degradation rates in muscle of anethetized rats[J]. Metabolism Clinical and Experimental, 1996, 45:10.
- [9] Peragon J. Dietary protein effects on growth and fractional protein synthesis and degradation rates in liver and white muscle of rainbow trout[J]. Aquac, 1994, 1 - 4,35 - 46,124.
- [10] Richard T L. Dietary nutrition allowance for fish[J]. Aquac, 1998, 2 - 15.
- [11] Garlick P J, Grant I. Amino acid infusion increases the sensitivity of muscle tissue protein in vivo to insulin: effect of branch-chain amino acids[J]. Biochem J, 1988, 254:578 - 584.
- [12] Kino K, Okumura J L. Whole-body protein turnover in chicks fed control, histine or methionine plus cystine-free diets[J]. Poult Sci, 1987, 66:1392 - 1397.
- [13] Funabiki R. In vivo effect of L-leucine administration on protein synthesis in mice[J].J Nutr Biochem, 1992, 3:401 - 407.
- [14] Liu S M. Method of measuring protein turnover and relationship between nutrition and turnover of ruminant[A]. Advance on study of animal nutrition[C]. China Agricultural University Press, Beijing, 1996.201 - 222. [刘世民.反刍动物蛋白质周转的测定方法和营养与周转的关系[A].动物营养研究进展[C].北京:中国农业大学出版社,1996.201 - 222.]