

精氨酸和赖氨酸对瓦氏黄颡鱼幼鱼生长和非特异性免疫力的影响

封福鲜, 艾庆辉*, 徐玮, 麦康森, 张文兵

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:以初始体质量(2.12 ± 0.01) g 的瓦氏黄颡鱼为研究对象,在室内流水系统中进行为期 56 d 的摄食生长实验,探讨饲料中精氨酸、赖氨酸水平及其交互作用对瓦氏黄颡鱼幼鱼生长和非特异性免疫力的影响。采用 3×3 双因子实验设计,制作 9 种 Arg 和 Lys 不同配比的饲料(粗蛋白 42%、粗脂肪 10%),其中 Arg 水平为 2.41%、4.86% 和 6.81% (饲料蛋白),在每个 Arg 水平分别设 1.95%、5.84% 和 8.27% (饲料蛋白)3 个 Lys 水平。每种饲料随机投喂 3 桶(养殖桶规格:40 L),每桶 30 尾实验鱼。实验结果表明,饲料中 Arg、Lys 水平对瓦氏黄颡鱼生长和头肾巨噬细胞呼吸爆发活性均有显著影响($P < 0.05$),当 Arg/Lys 为 6.81/5.84(饲料蛋白)时,实验鱼生长最佳,而头肾巨噬细胞活性最高值出现在 Arg/Lys 为 4.86/8.27(饲料蛋白)水平。饲料中 Arg 水平对瓦氏黄颡鱼血清一氧化氮合酶(NOS)活性有显著影响($P < 0.05$),且在适中和高 Arg 水平时,血清 NOS 活性均高于低水平 Arg 组。饲料中 Arg、Lys 水平对血清精氨酸酶(ARG)活性和过氧化氢酶(CAT)活性无显著影响($P > 0.05$)。饲料中 Arg 和 Lys 对瓦氏黄颡鱼的生长存在交互作用,而对体组成、肝指数、头肾巨噬细胞呼吸爆发活性、血清中 NOS、ARG 和 CAT 活性均无交互作用。

关键词:瓦氏黄颡鱼;精氨酸;赖氨酸;生长;非特异性免疫力

中图分类号:S 963

文献标志码:A

精氨酸(arginine, Arg)和赖氨酸(lysine, Lys)是鱼体蛋白中含量较高的氨基酸^[1-3]。在常用的植物性蛋白原料中,Arg 和 Lys 则是最易缺乏的必需氨基酸^[4],其含量不足或过高会导致氨基酸不平衡,影响鱼类对饲料蛋白源的利用,不利于鱼类的生长^[5]。在鸟类和哺乳动物中,Lys-Arg 拮抗现象普遍存在,但鱼类是否存在 Lys-Arg 拮抗现象目前还存在争论^[6]。在大吻鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[7]、杂交狼鲈(*Morone saxatilis* × *M. chrysops*)^[8]和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[9]中没有发现 Arg 和 Lys 的拮抗作用,而在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[10-11]中,研究者发现二者存在明显的拮抗作用。

营养学研究证明,Arg 作为免疫增强剂的功效可能会比其他氨基酸更加有效,且免疫机制可能在于其抗氧化作用^[12];在人类骨髓细胞中,一氧化氮合酶(NOS)和精氨酸酶(ARG)通过竞争性利用 Arg 来调节免疫细胞类群的机能^[13],而作

为 ARG 的强抑制剂,Lys 有可能间接影响机体的免疫状况^[14]。对雄性 Wistar 大鼠的体外实验表明,静脉注射一定量的 Arg-Lys 盐后,胸腺迷走神经放电频率和胸腺淋巴细胞的释放均得到增强,进而提高雄性 Wistar 大鼠的免疫力^[15]。在鱼类中,尚无通过摄食生长实验来探讨 Arg 和 Lys 对其非特异性免疫力影响的相关报道。

瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)俗称江颡、江黄颡鱼,属于鲇形目(Siluriformes)、鲿科(Bagridae)、黄颡鱼属(*Pelteobagrus*),是长江干、支流中主要的渔业养殖对象之一^[16]。目前,瓦氏黄颡鱼营养生理的研究已有报道^[17-18],但未见饲料中必需氨基酸对其非特异性免疫力影响的相关报道。

1 材料与amp;方法

1.1 实验饲料

本实验采用 3×3 双因子实验设计。以鱼粉、

收稿日期:2011-03-25 修回日期:2011-05-11
资助项目:国家重点基础研究发展计划(2009CB118702)
通讯作者:艾庆辉,E-mail:qhah@ouc.edu.cn

玉米蛋白粉为主要蛋白源,鱼油、豆油为脂肪源,小麦粉为糖源,并补充矿物质、维生素配制出基础饲料(粗蛋白 42%、粗脂肪 10%)(表 1)。以瓦氏黄颡鱼鱼体的氨基酸含量为标准,添加相应的晶体氨基酸,使基础料中除 Arg 和 Lys 以外的其它各种氨基酸含量均达到鱼体中的含量,在基础饲料中分别添加晶体 L-Arg·HCL 和晶体 L-Lys·HCL,以甘氨酸作为等氮替代物,配制成 9 种等氮等能的实验饲料,其中 Arg 为 2.41%、4.86% 和 6.81% (饲料

蛋白),在每个 Arg 水平分别设 1.95%、5.84% 和 8.27% (饲料蛋白)3 个 Lys 水平,其中适中水平的 Arg 和 Lys 根据瓦氏黄颡鱼幼鱼鱼体中的对应含量设定。在饲料制作过程中,所有原料粉碎后过 60 目筛网,各原料按配比定量后混合均匀,加入适量的水揉匀,经双螺杆挤条机[华南理工大学 F-III(26)]加工成 3.0 mm×3.0 mm 的颗粒状饲料,50℃烘干后保存于 -20℃冰柜中备用,饲喂时破碎成大小适合瓦氏黄颡鱼幼鱼进食的颗粒。

表 1 实验饲料配方以及营养组成

原料 ingredient	Arg/Lys									
	2.41/ 1.95	2.41/ 5.84	2.41/ 8.27	4.86/ 1.95	4.86/ 5.84	4.86/ 8.27	6.81/ 1.95	6.81/ 5.84	6.81/ 8.27	
鱼粉 fish meal ¹	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	
玉米蛋白粉 corn gluten meal ¹	32.00	32.00	32.00	32.00	32.00	32.00	32.00	32.00	32.00	
啤酒酵母 yeast meal ¹	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	
晶体氨基酸 mixed amino acids ²	5.61	5.61	5.61	5.61	5.61	5.61	5.61	5.61	5.61	
鱼油 fish oil	4.65	4.65	4.65	4.65	4.65	4.65	4.65	4.65	4.65	
豆油 soybean oil	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	
小麦粉 wheat meal ¹	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	
多维 vitamin premix ³	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	
多矿 mineral premix ⁴	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	
甜菜碱 betaine	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	
抗氧化剂乙氧基喹啉 ethoxyquin	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	
丙酸钙 calcium propionic acid	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	
甘氨酸 Gly	4.41	2.81	1.81	3.40	1.80	0.80	2.60	1.00	0.00	
赖氨酸 Lys	0.80	2.40	3.40	0.80	2.40	3.40	0.80	2.4	3.4	
精氨酸 Arg	0.99	0.99	0.99	2.00	2.00	2.00	2.80	2.80	2.80	
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	4.62	4.62	4.62	4.62	4.62	4.62	4.62	4.62	4.62	
总计 total					100.00					
营养组成 chemical proximate analysis (n = 3)										
粗蛋白 crude protein(DM%)	42.14	41.98	40.79	41.88	42.22	42.18	41.68	41.63	42.30	
粗脂肪 crude lipid(DM%)	9.87	9.95	10.02	9.82	10.00	9.93	10.10	10.05	9.93	
灰分 ash(DM%)	4.80	4.28	4.51	4.54	4.65	4.71	4.67	4.47	4.37	

注:1. 鱼粉,玉米蛋白粉,啤酒酵母,小麦粉均来自七好生物科技公司(中国 山东),其中粗蛋白粗脂肪分别为 72.48% 和 6.63%,61.31% 和 1.52%,51.01% 和 1.05%,16.44% 和 1.04% (占干物质)。2. 晶体氨基酸混合物组成(g/100 g 饲料):异亮氨酸,0.92; 组氨酸,0.31; 蛋氨酸,0.32; 苯丙氨酸,0.21; 苏氨酸,0.59; 缬氨酸,0.70; 丙氨酸,0.27; 天冬氨酸,1.96; 脯氨酸,0.46; 丝氨酸,0.11; 酪氨酸,0.22。3. 维生素混合物组成(mg 或 g/kg 饲料):硫胺素,25 mg;核黄素,45 mg;盐酸吡哆醇,20 mg;维生素 B₁₂,10 mg;维生素 K₃,10 mg;肌醇,800 mg;泛酸,60 mg;叶酸,200 mg;烟酸,20 mg;生物素,60 mg;维生素 A,32 mg;维生素 D,5 mg;维生素 E,80 mg;维生素 C,700 mg;氯化胆碱(50%),2.5 g;微晶纤维素,18.43 g。4. 矿物元素混合物组成(mg 或 g/kg 饲料):NaF,2 mg;Ca(IO₃)₂,180 mg;CoCl₂·6H₂O(1%),50 mg;CuSO₄·5H₂O,10 mg;FeSO₄·H₂O,80 mg;ZnSO₄·H₂O,50 mg;MnSO₄·H₂O,60 mg;MgSO₄·7H₂O,1 200 mg;Ca(H₂PO₄)₂·H₂O,3 000 mg;NaCl,100 mg;Zeolite,18.24 g。

Notes:1. Fish meal, Corn gluten meal, Beer yeast and Wheat meal were obtained from Great seven Bio-tech (Shandong, China), crude protein and crude lipid are 72.48% and 6.63% dry matter, 61.31% and 1.52% dry matter, 51.01% and 1.05% dry matter, 16.44% and 1.04% dry matter, respectively. 2. Mixed amino acids (g/100 g diet): Isoleucine, 0.92; Histidine, 0.31; Methionine, 0.32; Phenylalanine, 0.21; Threonine, 0.59; Valine, 0.70; Alanine, 0.27; Aspartic acid, 1.96; Proline, 0.46; Serine, 0.11; Tyrosine, 0.22. 3. Vitamin premix (mg or g/kg diet): thiamin, 25 mg; riboflavin, 45 mg; Pyridoxine·HCl, 20 mg; vitamin B₁₂, 10 mg; vitamin K₃, 10 mg; inositol, 800 mg; pantothenic acid, 60 mg; niacin acid, 200 mg; folic acid, 20 mg; biotin, 60 mg; retinol acetate, 32 mg; cholecalciferol, 5 mg; α-tocopherol, 80 mg; ascorbic acid, 700 mg; choline chloride, 2.5 mg; wheat middling, 18.43 g. 4. Mineral premix (mg or g/kg diet): NaF, 2 mg; Ca(IO₃)₂, 180 mg; CoCl₂·6H₂O(1%), 50 mg; CuSO₄·5H₂O, 10 mg; FeSO₄·H₂O, 80 mg; ZnSO₄·H₂O, 50 mg; MnSO₄·H₂O, 60 mg; MgSO₄·7H₂O, 1 200 mg; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 3 000 mg; NaCl, 100 mg; Zeolite, 18.24 g.

1.2 实验用鱼和养殖管理

瓦氏黄颡鱼购自四川眉山,为当年人工孵化的同一批鱼苗,养殖实验在四川通威原种场内进行,为期 56 d。用对照组饲料(Arg/Lys 为 2.41%/1.95% 饲料蛋白)投喂驯化 1 星期后,挑选规格一致、健康无病的幼鱼进行分组实验[初始平均体质量(2.12 ± 0.01) g],实验鱼随机分成 9 组,每组 3 个重复,每个重复 30 尾,分别放养于 40 L 的养殖桶中。每天 07:00 和 17:30 手工缓慢投喂至表现饱食,养殖过程中保持常流水(0.4 L/min),水温 24~30 °C, pH 8.0~8.9,溶解氧 > 7 mg/L,采用自然光照。

1.3 样品处理

实验结束前,对实验鱼禁食 24 h,然后分别对每个养殖桶计数、称重。每桶随机抽取 13 尾实验鱼,保存于 -20 °C 冰箱中,用于常规分析;随机抽取 4 尾实验鱼,取肝脏称重,测定肝指数(heptosomatic index, HSI);随机抽取 4 尾实验鱼,用于头肾呼吸爆发的测定;其余用于血液取样,用 1 mL 注射器从尾静脉取血,转移至 1.5 mL 离心管中,4 °C 静置 6 h,4 000 r/min 离心 10 min,分离血清保存于 -80 °C 备用。

头肾分离采用 SECOMBES 等^[19]的方法,即无菌条件下解剖瓦氏黄颡鱼,取其头肾,立刻放到 L-15(Gibco)培养基中[添加 100 IU/mL 青霉素(Sigma)、100 μg/mL 链霉素(Sigma)、10 IU/mL 肝素(Sigma)和 2% 的小牛血清(HyClone)],然后挤压通过 100 μm 的金属筛网,将得到的细胞悬液小心放入准备好的 34%/51% 的 Percoll(Sigma)溶液中,进行不连续梯度密度离心(4 °C, 600 × g 离心 5 min),分离位于交界处的巨噬细胞带,用 L-15 培养基冲洗 2 次,并调整细胞悬液浓度为 1×10^7 /mL,细胞的成活率用 0.01% 的胎盘兰测定,保证其成活率在 95% 以上。

1.4 饲料以及鱼体营养成分分析

饲料原料、饲料及鱼体样品均在 105 °C 烘干至恒重后,求得干物质含量,然后进行常规分析(参照 AOAC^[20]方法)。采用凯氏定氮法测定蛋白含量($N \times 6.25$);采用索氏抽提法,以乙醚为抽提剂测定粗脂肪含量;将样品在电炉上炭化后,在马福炉中灼烧(550 °C)8 h 后测得样品灰分含量。氨基酸前期处理按照 GB/T 14965-1994 测定食物中氨基酸的方法,采用氨基酸自动分析仪测定

(Biochrom 30, England)。

1.5 头肾呼吸爆发活性的测定

取 100 μL 已制备好的头肾细胞悬液,加到 96 孔酶标板中,然后分别加入 100 μL 1 mg/mL NBT(Sigma)[含 100 mL 1 μg/mL 佛波醇肉豆蔻(PMA, Sigma)],25 °C 反应 45 min。然后加入无水甲醇终止反应并固定巨噬细胞(macrophage),再用 70% 的甲醇溶液冲洗两次,自然晾干,分别加入 120 μL 2 mol/L KOH 和 140 μL 二甲基亚砷(DMSO, Sigma)溶液溶解生成的蓝色沉淀,以 KOH/DMSO 为空白,使用酶标仪在 630 nm 下测定吸光值。

1.6 血清中免疫指标的测定

血清精氨酸酶(ARG)采用酶联免疫分析方法,试剂盒购自上海越研生物科技有限公司(美国 Rapidbio 公司分装品),单位为 U/mL。一氧化氮合酶(NOS)、过氧化氢酶(CAT)均采用南京建成试剂盒方法测定。血清 NOS 单位定义为 37 °C 下,每毫升血清每分钟生成 1 nmol NO 为一个酶活力单位。CAT 单位定义为 37 °C 下,每毫升血清每分钟分解 1 μmol H₂O₂ 的量为一个酶活力单位。

1.7 计算以及统计分析

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

肝指数(HSI, %) = $W_L/W_B \times 100$;

式中, W_t 、 W_0 分别为实验鱼的终末体重和初始体重, t 为实验天数, W_L 、 W_B 分别为肝重和体重。

采用 SPSS 16.0 对所得数据进行方差分析(ANOVA),若差异显著($P < 0.05$),则用 Tukey 氏检验进行双因素方差分析。

2 结果

2.1 饲料中 Arg、Lys 水平对瓦氏黄颡鱼生长和肝指数的影响

从表 2 可知,在低 Arg 水平(2.41% 饲料蛋白)时,随着饲料中 Lys 水平升高,瓦氏黄颡鱼特定生长率(SGR)逐渐升高,且在高 Lys 水平(8.27% 饲料蛋白)时显著高于对照组($P < 0.05$);在 Arg 较高水平(4.86% 和 6.81% 饲料蛋白)时,SGR 随饲料中 Lys 水平的升高呈现先升高后降低的趋势,且均在适中 Lys 水平(5.84% 饲料蛋白)组显著高于其他两组(1.95% 和 8.27% 饲料蛋白)($P < 0.05$)。

表 2 饲喂实验饲料对瓦氏黄颡鱼生长和肝指数的影响
 Tab. 2 Initial weight, final weight, SGR and HSI of darkbarbel catfish fed the experimental diets for 8 weeks

饲料组 dietary treatments		初始体质量/g initial weight	终末体质量/g final weight	特定生长率/(%/d) SGR	肝指数 HSI
Arg	Lys				
2.41	1.95	2.10 ± 0.01	4.73 ± 0.21 ^a	1.16 ± 0.08 ^a	2.59 ± 0.68
	5.84	2.12 ± 0.00	5.12 ± 0.26 ^{ab}	1.26 ± 0.07 ^{ab}	2.38 ± 0.20
	8.27	2.13 ± 0.01	7.03 ± 0.36 ^c	1.70 ± 0.07 ^c	1.92 ± 0.25
4.86	1.95	2.12 ± 0.01	4.94 ± 0.20 ^{ab}	1.21 ± 0.06 ^{ab}	2.62 ± 0.20
	5.84	2.12 ± 0.01	7.36 ± 0.18 ^c	1.78 ± 0.03 ^c	2.52 ± 0.12
	8.27	2.11 ± 0.01	6.38 ± 0.79 ^{abc}	1.56 ± 0.19 ^{abc}	2.11 ± 0.37
6.81	1.95	2.11 ± 0.02	5.12 ± 0.29 ^{ab}	1.26 ± 0.07 ^{ab}	2.74 ± 0.20
	5.84	2.13 ± 0.01	7.58 ± 0.35 ^c	1.81 ± 0.07 ^c	1.89 ± 0.12
	8.27	2.10 ± 0.01	6.58 ± 0.34 ^{bc}	1.63 ± 0.07 ^{bc}	2.12 ± 0.13
双因素方差分析 P 值					
Arg		0.964	0.043	0.039	0.790
Lys		0.262	0.000	0.000	0.072
Arg × Lys		0.141	0.005	0.008	0.680

注:数据为 3 个重复的平均值 ± 标准误; a, b, c, d 表示相同列中的平均值差异显著 ($P < 0.05$)。

Notes: Values are means of three replicate ± SEM ($n = 3$); Superscripts such as a, b, c and d represent significant differences among dietary treatments in the same column ($P < 0.05$).

在 Lys 低水平 (1.95% 饲料蛋白) 和高水平 (8.27% 饲料蛋白) 时, 饲料中 Arg 水平对瓦氏黄颡鱼 SGR 无显著影响 ($P > 0.05$); 在适中 Lys 水平 (5.84% 饲料蛋白) 时, SGR 随着 Arg 水平的升高也有升高的趋势, 且在高水平 Arg 组显著高于其他两组 ($P < 0.05$)。

双因素统计分析表明, 饲料中 Arg 和 Lys 水平对瓦氏黄颡鱼的生长有显著的交互作用 ($P < 0.05$); 当 Arg/Lys 为 6.81/5.84 (饲料蛋白) 时, 实验鱼生长最佳。

饲料中 Arg、Lys 水平及其交互作用对瓦氏黄颡鱼的肝指数没有显著影响 ($P > 0.05$)。

2.2 饲料中 Arg、Lys 水平对瓦氏黄颡鱼体组成的影响

从表 3 可知, 饲料中 Lys 水平为 8.27% (饲料蛋白) 时, 瓦氏黄颡鱼鱼体粗蛋白随着 Arg 水平的升高有先上升后下降的趋势, 且在适中 Arg 水平 (4.86% 饲料蛋白) 时, 鱼体粗蛋白含量最高, 显著高于 6.81% (饲料蛋白) 组 ($P < 0.05$)。饲料中 Arg、Lys 水平对瓦氏黄颡鱼鱼体水分、粗脂肪和灰分均无显著影响 ($P > 0.05$)。

饲料中 Arg 和 Lys 水平对瓦氏黄颡鱼鱼体水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分均无显著交互作用 ($P > 0.05$)。

2.3 饲料中 Arg、Lys 水平对瓦氏黄颡鱼非特异性免疫力及其相关指标的影响

饲料中 Arg、Lys 水平对瓦氏黄颡鱼头肾巨噬细胞呼吸爆发活性的影响 从表 4 可知, 当 Arg 在低水平 (2.41% 饲料蛋白) 和高水平 (6.81% 饲料蛋白) 时, 饲料中 Lys 水平对瓦氏黄颡鱼头肾巨噬细胞的呼吸爆发活均无显著影响 ($P > 0.05$); 适中 Arg 水平 (4.86% 饲料蛋白) 时, 头肾巨噬细胞呼吸爆发活性随着 Lys 水平的升高有升高趋势, 且在高水平 Lys (8.27% 饲料蛋白) 时显著高于低 Lys 水平 (1.95% 饲料蛋白) 组 ($P < 0.05$)。

当 Lys 在较低水平 (1.95% 和 5.84% 饲料蛋白) 时, 饲料中 Arg 水平对瓦氏黄颡鱼头肾巨噬细胞呼吸爆发活性无显著影响 ($P > 0.05$); 高 Lys 水平 (8.27% 饲料蛋白) 时, 随着 Arg 水平的升高, 呼吸爆发活性呈现先升高后下降的趋势, 且 Arg 为 4.86% (饲料蛋白) 时显著高于低 Arg 水平 (2.41% 饲料蛋白) 组 ($P < 0.05$)。

饲料中 Arg 和 Lys 水平对瓦氏黄颡鱼头肾巨噬细胞呼吸爆发活性无显著交互作用 ($P > 0.05$)。当 Arg/Lys 为 4.86/8.27 (饲料蛋白) 时, 瓦氏黄颡鱼头肾巨噬细胞呼吸爆发活性最高。

表3 饲喂实验饲料对瓦氏黄颡鱼体组分的影响
Tab.3 Final body composition of darkbarbel catfish fed the experimental diets for 8 weekss

饲料组 dietary treatments		水分/% moisture	粗蛋白/(% WW) ² crude protein	粗脂肪/(% WW) crude lipid	灰分/(% WW) ash
Arg	Lys				
2.41	1.95	70.97 ± 0.44	12.84 ± 0.26 ^{ab}	11.71 ± 0.16	3.40 ± 0.09
	5.84	70.77 ± 0.30	13.48 ± 0.12 ^{ab}	11.56 ± 0.20	3.40 ± 0.02
	8.27	70.13 ± 0.14	13.24 ± 0.13 ^{ab}	12.63 ± 0.09	3.27 ± 0.07
4.86	1.95	71.32 ± 1.07	13.82 ± 0.12 ^{ab}	11.51 ± 0.41	3.19 ± 0.04
	5.84	69.85 ± 0.69	13.33 ± 0.21 ^{ab}	12.48 ± 0.59	3.39 ± 0.09
	8.27	70.31 ± 0.33	13.87 ± 0.48 ^b	12.26 ± 0.49	3.33 ± 0.06
6.81	1.95	70.23 ± 0.61	13.06 ± 0.32 ^{ab}	12.25 ± 0.29	3.32 ± 0.02
	5.84	71.38 ± 0.83	12.8 ± 0.13 ^{ab}	11.75 ± 0.43	3.28 ± 0.07
	8.27	71.64 ± 0.49	12.48 ± 0.39 ^a	11.40 ± 0.34	3.20 ± 0.11
双因素方差分析 P 值					
Arg		0.453	0.003	0.639	0.325
Lys		0.922	0.976	0.668	0.337
Arg × Lys		0.194	0.162	0.067	0.256

注:数据为3个重复的平均值 ± 标准误;a、b、c、d表示相同列中的平均值差异显著(P < 0.05)。

Notes: Values are means of three replicate ± SEM (n = 3); Superscripts such as a, b, c and d represent significant differences among dietary treatments in the same column (P < 0.05).

表4 饲喂实验饲料对瓦氏黄颡鱼血清精氨酸酶,过氧化氢酶,一氧化氮合酶以及头肾呼吸爆发的影响

Tab.4 Effects of darkbarbel catfish fed the experimental diets on serum ARG, CAT, NOS activities and respiratory burst activity of head kidney

饲料组 dietary treatments		呼吸爆发活性 respiratory burst activity	过氧化氢酶/(U/mL) CAT	一氧化氮合酶/(U/mL) NOS	精氨酸酶/(U/mL) Arg
Arg	Lys				
2.41	1.95	0.20 ± 0.03 ^a	2.83 ± 0.70	6.67 ± 2.05 ^a	2.71 ± 0.41
	5.84	0.25 ± 0.01 ^{abc}	3.95 ± 1.53	10.76 ± 0.20 ^{ab}	2.68 ± 0.39
	8.27	0.23 ± 0.04 ^{ab}	2.8 ± 0.01	13.00 ± 2.95 ^{ab}	2.9 ± 0.25
4.86	1.95	0.25 ± 0.01 ^{abc}	5.89 ± 2.16	17.40 ± 0.14 ^b	2.7 ± 0.15
	5.84	0.46 ± 0.02 ^{cd}	2.93 ± 0.58	16.86 ± 2.55 ^{ab}	2.33 ± 0.21
	8.27	0.52 ± 0.03 ^d	2.12 ± 0.54	17.36 ± 1.29 ^b	2.49 ± 0.05
6.81	1.95	0.34 ± 0.02 ^{abcd}	3.27 ± 0.11	12.74 ± 1.45 ^{ab}	3.05 ± 0.21
	5.84	0.34 ± 0.12 ^{abcd}	4.58 ± 0.96	20.57 ± 2.75 ^b	2.36 ± 0.37
	8.27	0.44 ± 0.03 ^{bcd}	3.09 ± 0.35	16.33 ± 2.93 ^{ab}	2.55 ± 0.36
双因素方差分析 P 值					
Arg		0.000	0.821	0.001	0.553
Lys		0.008	0.245	0.080	0.332
Arg × Lys		0.075	0.193	0.248	0.767

注:数据为3个重复的平均值 ± 标准误;a、b、c、d表示相同列中的平均值差异显著(P < 0.05)。

Notes: Values are means of three replicate ± SEM (n = 3); Superscripts such as a, b, c and d represent significant differences among dietary treatments in the same column (P < 0.05).

饲料中 Arg、Lys 水平对瓦氏黄颡鱼血清 CAT 活性的影响 饲料中 Arg、Lys 水平及其交互作用对瓦氏黄颡鱼血清 CAT 活性均无显著影响(P < 0.05)(表4)。

饲料中 Arg、Lys 水平对瓦氏黄颡鱼血清

NOS 活性的影响 从表4可知,在各 Arg 水平,饲料 Lys 水平对瓦氏黄颡鱼血清 NOS 活性均无显著影响(P > 0.05)。

当 Lys 在低水平(1.95% 饲料蛋白)时,血清 NOS 活性随着 Arg 水平的升高有先降低后升高

的趋势,且在适中水平 Arg (4.86% 饲料蛋白) 时显著高于低 Arg 水平 (2.41% 饲料蛋白) ($P < 0.05$); 在较高 Lys 水平 (5.84% 和 8.27% 饲料蛋白) 时,饲料中 Arg 水平对瓦氏黄颡鱼血清 NOS 活性均无显著影响 ($P > 0.05$)。

饲料中 Arg 和 Lys 水平对瓦氏黄颡鱼血清 NOS 活性无显著交互效应 ($P > 0.05$)。当 Arg/Lys 为 6.81/5.84 (饲料蛋白) 时血清 NOS 活性最高。

饲料中 Arg、Lys 水平对瓦氏黄颡鱼血清 ARG 活性的影响 在各 Arg 水平,血清 ARG 活性随着 Lys 水平的升高有先降低后升高的趋势,但各组间无显著差异 ($P > 0.05$) (表 4)。

同样,在各 Lys 水平,血清 ARG 活性随着 Arg 水平的升高有先降低后稍微升高的趋势,但各组间也无显著差异 ($P > 0.05$) (表 4)。

饲料中 Arg 和 Lys 水平对瓦氏黄颡鱼血清 ARG 活性无显著交互效应 ($P > 0.05$) (表 4)。

3 讨论

当饲料中 Arg 和 Lys 都处于低水平时,瓦氏黄颡鱼生长均随另一种氨基酸水平的升高而升高,这与在大西洋鲑 (*Salmo salar*) 中的研究相似^[21]。Arg 处于适中和高水平时,相对于适中 Lys 水平,高水平时能引起瓦氏黄颡鱼 SGR 下降,这说明过量 Lys 对瓦氏黄颡鱼的生长表现出一定的抑制作用。这可能由于过量的 Lys 引起 Arg 缺乏,进而引起氨基酸新的不平衡^[22]。也有可能是饲料 Lys 含量过高,抑制了对 Arg 或其它氨基酸的吸收,从而影响了蛋白质的合成。BERGE 等^[23]指出 Arg 和 Lys 的吸收利用共用载体,所以在肠道的吸收存在竞争抑制现象,具体的机理有待于进一步研究。

在鱼体中,抗体的产生过程较为缓慢,因此非特异性免疫发挥着重要的免疫防御作用^[24]。巨噬细胞是鱼体中最重要的免疫活性细胞,其活性是反映和评价鱼类免疫水平的重要指标^[25]。在适中和高 Arg 水平时,瓦氏黄颡鱼头肾呼吸爆发活性均高于低 Arg 组,说明 Arg 对头肾呼吸爆发活性有促进作用,机理可能在于 Arg 通过氧依赖型途径产生大量的活性氧 (ROIs),从而加强了巨噬细胞的杀菌力^[26]。在 Lys 适中和高水平时,高 Arg 水平 (6.81% 饲料蛋白) 处理组的呼吸爆发活

力有所降低,这说明饲料中 Arg 和 Lys 水平对瓦氏黄颡鱼头肾巨噬细胞活性氧的产生有一定的拮抗作用。

CAT 以机体代谢废物 H_2O_2 为底物,催化其电子转移生成 H_2O 和 O_2 ,清除 ROS 保护生物体组织免受毒害,是体内一种重要的抗氧化酶^[27]。本研究表明,饲料中 Arg 和 Lys 以及它们的交互作用对瓦氏黄颡鱼血清 CAT 活性均无显著影响 ($P > 0.05$),可能由于瓦氏黄颡鱼血清中 CAT 活性对饲料 Arg 和 Lys 水平不敏感^[28]。

Arg 的主要代谢途径之一是在 NOS 的催化作用下,与分子氧反应生成一氧化氮 (NO),NO 具有杀菌和抑菌作用,能刺激巨噬细胞对肿瘤细胞、真菌、病原菌和原生生物的杀伤力^[29]。当饲料中 Lys 处于适中水平时,瓦氏黄颡鱼血清 NOS 活性随 Arg 水平的升高而升高,且在适中和高 Arg 组,NOS 活性均高于低水平 Arg 组,原因可能在于较高水平 Arg 时,外源性 Arg 的增加为 NOS 提供了足够合适的底物^[30],催化 Arg 产生较多 NO,进而增强鱼体的免疫力。当饲料中 Arg 和 Lys 都处于高水平时,瓦氏黄颡鱼血清 NOS 活性有所降低,这说明饲料中 Arg 和 Lys 水平对其有一定的拮抗作用。

Arg 在 ARG 的作用下分解产生尿素,进而参与蛋白质的合成^[31],当机体受到疾病入侵时,体内 Arg 除了通过 NOS 降解外,通过 ARG 的分解途径也会得到增强^[32]。本实验发现饲料中 Arg 水平对瓦氏黄颡鱼 ARG 活性没有产生显著影响,MÉNDEZ^[33]对小鼠的研究中也发现,口服 L-Arg 对 ARG 活性无显著影响,原因可能在于实验鱼处于正常生长环境,Arg 通过 ARG 的分解途径没有产生显著变化,且实验中还发现饲料中 Lys 水平以及 Arg 和 Lys 交互作用对血清中 ARG 活性也无显著影响,可能在于饲料中 Arg、Lys 水平及其比例均在 ARG 正常活性的要求范围,具体的生理机制有待于进一步研究。

衷心感谢杨英豪和王庆超在养殖实验过程中给予的帮助。

参考文献:

- [1] WILSON R P, COWEY C B. Amino acid and protein requirements of fish [M] // COWEY C B, MACKIE A M, BELL J G. Eds. Nutrition and

- Feeding in Fish. London: Academic Press, 1985: 1-5.
- [2] WILSON R P, POE W E. Relationship of whole body and egg essential amino acid patterns to amino acid requirement patterns in channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Comparative Biochemistry Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1985, 80(2): 385-388.
- [3] National Research Council. Nutrient Requirement of Fish [M]. Washington, D C, National Academy of Press, 1993.
- [4] SMALL B C, SOARES J H. Quantitative dietary lysine requirement of juvenile striped bass *Morone saxatilis* [J]. Aquaculture Nutrition, 2000, 6(4): 207-212.
- [5] 周贤君, 谢绶启, 谢从新, 等. 异育银鲫幼鱼对饲料中赖氨酸的利用及需要量研究 [J]. 水生生物学报, 2006, 30(3): 247-255.
- [6] BUENTELLO J A, GATLIN D M III. The dietary arginine requirement of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) is influenced by endogenous synthesis of arginine from glutamic acid [J]. Aquaculture, 2000, 188(3-4): 311-321.
- [7] TIBALDI E, TULLI F, LANARI D. Arginine requirement and effect of different dietary arginine and lysine levels for fingerling sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. Aquaculture, 1994, 127(2-3): 207-218.
- [8] GRIFFIN M E, WHITE M R, BROWN P B. Total sulfur amino acid requirement and cysteine replacement value for juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. Saxatilis*) [J]. Comparative Biochemistry Physiology, Part A: Physiology, 1994, 108(2-3): 423-429.
- [9] ALAM M S, SHINICHI T, SHUNSUKE K, et al. Arginine requirement of juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) estimated by growth and biochemical parameters [J]. Aquaculture, 2002, 205(1-2): 127-140.
- [10] KAUSHIK S J, FAUCONNEAU B. Effects of lysine administration on plasma arginine and on some nitrogenous catabolites in rainbow trout [J]. Comparative Biochemistry Physiology, Part A: Physiology, 1984, 79(3): 459-462.
- [11] KIM K I, KAYES T B, AMUNDSON G H. Requirements for lysine and arginine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture, 1992, 106(3-4): 333-344.
- [12] BUENTELLO A J, GATLIN III D M. Effects of elevated dietary arginine on resistance of channel catfish to exposure to *Edwardsiella ictaluri* [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2001, 13(3): 194-201.
- [13] GORDON S. Alternative activation of macrophages [J]. Native Reviews Immunology, 2003, 3: 23-35.
- [14] SALEH A M, AFAF S F, TAREK M M, et al. Urea cycle of *Fasciola gigantica*: Purification and characterization of arginase [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 142(3): 308-316.
- [15] AKIRA N, MICHAEL M. Influence of systemic arginine-lysine on immune organ function: An electrophysiological study [J]. Brain Research Bulletin, 1998, 45(5): 437-441.
- [16] 段中华, 孙建怡. 瓦氏黄颡鱼年龄与生长的研究 [J]. 水生生物学报, 1999, 23(6): 617-623.
- [17] 罗运仙, 冷向军, 李小勤, 等. 饲料中补充晶体或微囊赖氨酸对草鱼生长和血浆总游离氨基酸的影响 [J]. 水产学报, 2010, 34(3): 466-473.
- [18] 袁立强, 马旭洲, 王武, 等. 饲料脂肪水平对瓦氏黄颡鱼生长和鱼体色的影响 [J]. 上海海洋大学学报, 2008, 17(5): 577-584.
- [19] SECOMBES C J. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity [M] // STOLEN J S, FLETCHER T C, ANDERSON D P, et al. Eds. Techniques in Fish Immunology. Fair Haven: SOS Publications, 1990: 137-154.
- [20] Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists International [M]. 16th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- [21] BERGE G E, SVEIER H, LIED E. Effects of feeding Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) imbalanced levels of lysine and arginine [J]. Aquaculture Nutrition, 2002, 8(4): 239-248.
- [22] ACHEAMPONG-MENSAH D K, HILL D C. Effect of excess dietary lysine on the weanling rat [J]. Nutrition Report International, 1970, 2: 2-17.
- [23] BERGE G E, BAKKE-MCKELP A M, LIED E. *In vitro* uptake and interaction between arginine and lysine in the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Aquaculture, 1999, 179(1-4): 181-193.
- [24] MAGOR B G, MAGOR K E. Evolution of effectors and receptors of innate immunity [J]. Developmental

- and Comparative Immunology, 2001, 25 (8 - 9) : 651 - 682.
- [25] DALMO R A, INGEBRIGTSEN K, BOGWALD J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES) [J]. Journal of Fish Disease, 1997, 20 (4) : 241 - 273.
- [26] ADAMS M R, CO V P, ROLAND S, *et al.* Lack of antioxidant activity of the antiatherogenic compound L-arginine [J]. Atherosclerosis, 1999, 146 (2) : 329 - 335.
- [27] FRANK V, EVA V, JAMES F D. The role of active oxygen species in plant signal transduction [J]. Plant Science, 2001, 161 (3) : 405 - 414.
- [28] BUENTELLO J A, MARTHA R B. Effects of Dietary arginine on hematological parameters and innate Immune function of channel catfish [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2007, 19 (3) : 195 - 203.
- [29] CARMELO N J, BOBBI L H. Arginine and immunity: a unique perspective [J]. Biomed Pharmacother, 2002, 56 (10) : 471 - 482.
- [30] ELISA P, ILARIA M, LUIGI D, *et al.* Role of arginine metabolism in immunity and immune pathology [J]. Immunobiology, 2008, 212 (9 - 10) : 795 - 812.
- [31] NIVES Z, MARC E R. The arginine-arginase balance in asthma and lung inflammation [J]. European Journal of Pharmacology, 2006, 533 (1 - 3) : 253 - 262.
- [32] JOSE D M, ADRIANA S, MARTIN P M. Effect of l-arginine on arginase activity in male accessory sex glands of alloxan-treated rats [J]. Reproductive Toxicology, 2002, 16 (6) : 809 - 813.
- [33] WALTON M J, COWEY C B, COLOSO R M, *et al.* Dietary requirements of rainbow trout for tryptophan, lysine and arginine determined by growth and biochemical measurements [J]. Fish Physiology Biochemistry, 1986, 2 (1 - 4) : 161 - 169.

Effects of dietary arginine and lysine on growth and non-specific immune responses of juvenile darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*)

FENG Fu-xian, AI Qing-hui*, XU Wei, MAI Kang-sen, ZHANG Wen-bing

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: An 8-week feeding trial was conducted to estimate the effects of dietary arginine (Arg) and lysine (Lys) on growth and non-specific immune responses of juvenile darkbarbel catfish. Nine diets (42% crude protein and 10% crude lipid) were formulated to contain three Arg levels (2.41%, 4.86% and 6.81% of dietary protein), and each with three Lys levels (1.95%, 5.84% and 8.27% of dietary protein). Each diet was randomly fed to triplicate groups of darkbarbel catfish [initial body weight: (2.12 ± 0.01) g] to apparent satiation and each group was stocked with 30 fish. At the termination of the feeding trial, growth and non-specific immune parameters were monitored. The results showed dietary arginine and lysine had significant effects on the specific growth rate (SGR) and the respiratory burst activity of head kidney macrophages of juvenile darkbarbel catfish ($P < 0.05$). The appropriate content of diet arginine/lysine was 6.81/5.84 dietary protein based on the growth, but the respiratory burst activity of head kidney macrophages was the highest when arginine/lysine was 4.86/8.27 dietary protein. Dietary Arg had significant effects on the serum nitric oxide synthase (NOS) activity of juvenile darkbarbel catfish ($P < 0.05$). The activity of NOS was higher in fish fed appropriate or high Arg levels than low Arg levels. No significant differences were found in the serum arginase (ARG) and catalase (CAT) ($P > 0.05$) among dietary treatments. In the present study, significant interactions of dietary arginine and lysine were found on growth of juvenile darkbarbel catfish, but not on the body composition, hepatosomatic index (HSI), and serum NOS, ARG and CAT activity.

Key words: darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*); arginine; lysine; growth; non-specific immune responses

Corresponding author: AI Qing-hui. E-mail: qhai@ouc.edu.cn