

## 丙氨酰—谷氨酰胺投喂方式对建鲤生长和 抗急性拥挤胁迫能力的影响

王桂芹<sup>1</sup>, 芦洪梅<sup>1,2</sup>, 牛小天<sup>1</sup>, 李子平<sup>1</sup>, 韩宇田<sup>1</sup>, 赵朝阳<sup>3</sup>, 秦贵信<sup>1\*</sup>

(1. 吉林农业大学动物科技学院, 吉林 长春 130118;

2. 长春通威饲料有限公司, 吉林 长春 130456;

3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,

农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081)

**摘要:**以初始体质量为(33.52±0.17) g 建鲤为研究对象,在室内单循环养殖系统中进行8周(w)生长试验,分别配制成添加0.0%(对照)和0.5%(试验)丙氨酰—谷氨酰胺(Ala-Gln)的等氮等能(35% CP、17 kJ/g)饲料,采用5种投喂方式:连续8w投喂对照饲料(I);试验饲料2w间隔投喂(II);前4w投喂试验饲料,后4w投喂对照饲料的间隔投喂(III);前4w投喂对照饲料,后4w投喂试验饲料的间隔投喂(IV);8w连续投喂试验饲料(V)。养殖试验结束时,进行急性拥挤胁迫试验。探讨Ala-Gln投喂方式对建鲤生长和抗急性拥挤胁迫能力的影响。结果表明,Ala-Gln连续投喂和间隔投喂组的生长都显著高于对照组( $P < 0.05$ )。2w间隔投喂的特定生长率都显著高于4w间隔和连续8w投喂的饲料组( $P < 0.05$ );前4w间隔投喂组的特定生长率要显著高于8w连续投喂组( $P < 0.05$ )。血清皮质醇和血糖分别在急性胁迫后恢复0和1h时达到高峰,血清HSP70在胁迫后恢复1~12h都保持较高水平,然后下降,胁迫后恢复48h达到胁迫前的水平。各种投喂方式组的血糖和血清皮质醇含量都显著低于对照组( $P < 0.05$ )。胁迫后恢复期,血糖迅速升高幅度最小的是2w间隔投喂组,最先恢复到胁迫前状态的是2w间隔投喂组和前4w投喂的4w间隔投喂组。胁迫后恢复期,各投喂组的血清HSP70都显著高于对照组( $P < 0.05$ ),胁迫后恢复48和72h时,后4w投喂的4w间隔投喂组和连续8w的投喂组的血清HSP70显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

**关键词:**建鲤;丙氨酰—谷氨酰胺;生长;拥挤胁迫

**中图分类号:**S 963.1

**文献标志码:**A

随着集约化养殖模式的推广,水产养殖业得到了迅猛发展。鱼类是水生低等变温脊椎动物,易受外界环境的影响,如在工厂化养殖、捕捉、分池、药浴和运输,短期或长期的高密度养殖,给鱼类造成应激,使养殖动物不能维持正常的生理状态、生长率下降,免疫力降低,感染疾病的几率大大提高,给水产养殖业带来严重的经济损失<sup>[1-2]</sup>。如何通过营养调控的手段来达到既能增强鱼类的免疫机能和抗病能力,又能减缓免疫应激引起的

生产性能下降的目的,适当的营养调控策略是营养学家日益关注的问题。Montero等<sup>[3]</sup>对金头鲷(*Sparus aurata*)、Cristina等<sup>[4]</sup>对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)分别用维生素E、C以及维生素E和C和HUFA联合使用来抵抗拥挤胁迫。赵敬湘等<sup>[5]</sup>研究表明,丙氨酰—谷氨酰胺(Ala-Gln)二肽有对人脐静脉内皮细胞ECV304缺氧缺糖损伤的保护作用。袁雪波等<sup>[6]</sup>研究表明,Gln及其二肽对早期断奶仔猪的免疫应激具有保护作

收稿日期:2011-06-10 修回日期:2011-10-31

资助项目:中国博士后基金资助(200763016);农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放基金资助(BZ2009-01)

通讯作者:秦贵信,E-mail:qgx@jlau.edu.cn

用。温安祥等<sup>[7]</sup>在中华鳖(*Trionyx sinensis*)的试验中表明 Gln 可通过抑制糖皮质激素和有关细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6等)的分泌,增强机体的抗氧化能力,对免疫应激的中华鳖产生保护作用,因此说明 Gln 有缓解免疫应激的作用。Gln 作为一种氨基酸在日粮中添加,可以促进哲罗鱼(*Hucho taimen*)仔鱼<sup>[8]</sup>和罗非鱼<sup>[9]</sup>、虹鳟稚鱼<sup>[10]</sup>、鲑<sup>[11]</sup>的摄食、生长及抗病能力。在已有的研究中,Gln 或 Gln 二肽作为饲料添加剂用时均为连续投喂。但有研究表明,免疫增强剂的使用效果存在时间效应,在最短的时间内取得最佳的效果是最好的<sup>[12]</sup>。因此,在已有的适宜需求量的基础上,研究其适宜需求量的不同投喂方式对鲤抗急性拥挤胁迫能力的调控,旨在探讨 Gln 对鱼类抗应激的营养保护和调节机理,以确定 Gln 解决环境胁迫的给予方式,具有重要的学术意义,对实际生产中正确使用提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验饲料的配制

以鱼粉为蛋白源,添加 0.0% 和 0.5% 的 Ala-Gln(北京莱瑞森医药科技有限公司,纯度为 99%),以 Ala 调平,配制等氮等能(35% CP、17 kJ/g)的饲料,具体饲料配制、营养测定、饲料配方及营养组成见文献<sup>[13]</sup>。

### 1.2 试验设计

Ala-Gln 添加水平(0.0%、0.5%),即为不添加(对照)和添加(试验)两种饲料,根据投喂方式的不同共分为 5 个处理组,分别用 I(0/0)、II(0/2)、III(4/0)、IV(0/4)和 V(4/4)来表示。其中 8 w 连续投喂对照饲料(I);试验饲料 2 w 间隔投喂(II);前 4 w 投喂试验饲料,后 4 w 投喂对照饲料的间隔投喂(III);前 4 w 投喂对照饲料,后 4 w 投喂试验饲料的间隔投喂(IV);8 w 连续投喂试验饲料(V)。

### 1.3 饲养管理

试验鱼为同一批人工孵化的一龄建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)。试验前暂养于室内水族箱中,挑选健壮、规格均匀的幼鱼 1 000 尾。放室内水族箱中驯化,投喂蛋白含量为 35% 的对照饲料作为驯化饲料,饱食投喂,驯化 15 d。饲养试验为期 8 w。按照试验设计 5 个处理组,每组 3 个重复,试验开始之前,停止投喂 1 d,然后挑选体

格健壮、规格均匀的建鲤( $33.52 \pm 0.17$ ) g,随机放养在室内水族箱(80 cm  $\times$  60 cm  $\times$  50 cm)中,养殖密度平均为 20 g/L,在室内单循环不控温养殖系统中进行 8 w(2010-7-4—2010-8-28)的生长试验,具体饲养管理参见文献<sup>[13]</sup>。

### 1.4 急性拥挤胁迫试验与样品的采集与分析

养殖试验结束时,将各组鱼转移到直径为 50 cm 的塑料桶中,每桶加入 10 L 水,使其密度为 110 g/L,试验鱼在拥挤的环境中胁迫 1 h,然后放回到原来的养殖系统中,并调整到 20 g/L 的养殖密度,同样做 3 个重复,分别在胁迫前(对照)和胁迫后,恢复时间为 0、1、3、6、12、24、48、72 h 时取样,每个时间段每组取 5 尾鱼,采样前,随机快速捞取幼鱼,迅速投入浓度为 200 mg/L 的 MS-222 中作快速深度麻醉,用一次性医用注射器从尾静脉取血,4  $^{\circ}$ C 静置 24 h 后,2 500 r/min 离心 10 min,分离血清,-20  $^{\circ}$ C 保存备用。应激胁迫期间不投饵,应激结束恢复期间正常投饵。

采用葡萄糖氧化酶—过氧化物酶法测定血糖,采用液相平衡竞争放射免疫分析(RIA)法测定血清皮质醇,试剂盒购自南京建成生物研究所。采用酶联免疫分析法(ELISA)测定血清中热休克蛋白-70(HSP70),试剂盒购自上海源叶生物有限公司。

### 1.5 数据处理

试验数据以平均值  $\pm$  标准误表示,采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析,差异显著时,用 Duncan 氏多重比较, $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 Ala-Gln 投喂方式对鲤生长性能的影响

Ala-Gln 投喂方式对建鲤生长性能的影响见表 1。Ala-Gln 采用 4 种不同的投喂方式,特定生长率呈现相同的规律。Ala-Gln 连续投喂和间隔投喂的生长都显著高于对照组( $P < 0.05$ )。各种投喂方式间亦有显著的差异( $P < 0.05$ )。2 w 间隔投喂的特定生长率都显著高于 4 w 间隔和连续 8 w 投喂组( $P < 0.05$ ),4 w 间隔投喂的两组没有显著差异,但前 4 w 投喂后 4 w 不投喂组的特定生长率要高于 8 w 连续投喂组( $P < 0.05$ )。

### 2.2 Ala-Gln 投喂方式对建鲤血糖的影响

Ala-Gln 投喂方式对急性拥挤胁迫建鲤血糖的影响见表 2。急性胁迫前,各组血糖之间没有

显著差异,各组在胁迫后恢复 0 ~ 72 h 的变化趋势相类似,都是胁迫后恢复 1 h 达到高峰,然后 3 h 开始迅速下降,胁迫后恢复 6 h 后缓慢下降,恢复 24 h 还没有完全恢复到胁迫前的水平。拥挤胁迫前,各组的血糖含量没有受到饲料中添加 Ala-Gln 及其投喂方式的影响,即各组血糖含量差异不显著。拥挤胁迫后恢复期间,血糖浓度都迅速上升,各组差异显著 ( $P < 0.05$ )。饲料中添加 Ala-Gln 的各组在胁迫后恢复 1 h 的血糖含量达到高峰且与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ )。各种投喂方式组的峰值都低于对照组,其中 2 w 间隔投喂组和前 4 w 投喂的 4 w 间隔投喂组的血糖含量显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ),其他两组与对照组没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。胁迫后恢复 3、6 和 24 h 时,都是连续 8 w 投喂组的血糖含量与对照组差异不显著,其他各种投喂方式组的血糖含量显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。各种投喂方式组在胁迫后恢复 12 h 的血糖含量均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ),2 w 间隔投喂组和前 4 w 投喂的 4 w

间隔投喂组在胁迫后恢复 48 h 的血糖含量显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ),各组在胁迫后恢复 72 h 均恢复到正常水平,且各组间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。胁迫后血糖迅速升高幅度最小的是 2 w 间隔投喂组,最先恢复到胁迫前状态的是 2 w 间隔投喂组和前 4 w 投喂的 4 w 间隔投喂组。

表 1 Ala-Gln 投喂方式对鲤生长性能的影响  
Tab.1 Effect of feeding modes of Ala-Gln on growth performance of *C. carpio* var. *jian*

组别 group	初始体质量/g initial mean body weight	末体质量/g final mean body weight	特定增长率/ (%/d) specific growth rate
I (0/0)	33.42 ± 0.13	98.33 ± 1.07 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.03 <sup>a</sup>
II (0/2)	33.48 ± 0.15	128.20 ± 1.47 <sup>d</sup>	2.40 ± 0.02 <sup>d</sup>
III (4/0)	33.56 ± 0.11	120.30 ± 1.48 <sup>c</sup>	2.28 ± 0.04 <sup>c</sup>
IV (0/4)	33.51 ± 0.09	115.57 ± 1.08 <sup>bc</sup>	2.21 ± 0.04 <sup>bc</sup>
V (4/4)	33.63 ± 0.10	110.73 ± 1.13 <sup>b</sup>	2.13 ± 0.02 <sup>b</sup>

注:表中同列中不同小写字母者表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ),后同。

Notes: The different superscripts of the same column values are significantly different ( $P < 0.05$ ), the same as following.

表 2 Ala-Gln 投喂方式对急性拥挤胁迫鲤血糖的影响  
Tab.2 Effect of feeding modes of Ala-Gln on serum glucose of *C. carpio* var. *jian* subjected to acute crowding stress

	血清葡萄糖/(mmol/L) serum glucose				
	I	II	III	IV	V
拥挤胁迫前 before crowding stress	3.33 ± 0.67 <sup>a</sup>	3.52 ± 0.40 <sup>a</sup>	2.65 ± 0.85 <sup>a</sup>	3.30 ± 0.65 <sup>a</sup>	3.00 ± 0.45 <sup>a</sup>
拥挤胁迫后恢复时间 recovery time post crowding stress					
0 h	8.48 ± 1.17 <sup>a</sup>	7.80 ± 1.10 <sup>a</sup>	7.60 ± 0.97 <sup>a</sup>	8.56 ± 0.91 <sup>a</sup>	8.27 ± 0.88 <sup>a</sup>
1 h	14.12 ± 0.93 <sup>b</sup>	9.89 ± 0.58 <sup>a</sup>	10.25 ± 0.59 <sup>a</sup>	11.49 ± 0.77 <sup>ab</sup>	11.66 ± 0.87 <sup>ab</sup>
3 h	11.98 ± 0.54 <sup>b</sup>	8.80 ± 0.57 <sup>a</sup>	8.60 ± 0.41 <sup>a</sup>	9.23 ± 0.61 <sup>a</sup>	9.93 ± 0.32 <sup>ab</sup>
6 h	11.05 ± 0.38 <sup>b</sup>	7.73 ± 0.78 <sup>a</sup>	7.37 ± 0.91 <sup>a</sup>	7.63 ± 0.78 <sup>a</sup>	8.10 ± 0.19 <sup>ab</sup>
12 h	9.16 ± 0.42 <sup>b</sup>	6.69 ± 0.48 <sup>a</sup>	7.05 ± 0.35 <sup>a</sup>	6.87 ± 0.56 <sup>a</sup>	6.17 ± 0.43 <sup>a</sup>
24 h	6.96 ± 0.24 <sup>b</sup>	4.19 ± 0.59 <sup>a</sup>	3.50 ± 0.49 <sup>a</sup>	4.20 ± 0.38 <sup>a</sup>	5.25 ± 0.55 <sup>ab</sup>
48 h	4.16 ± 0.19 <sup>c</sup>	2.52 ± 0.25 <sup>ab</sup>	2.25 ± 0.20 <sup>a</sup>	3.53 ± 0.29 <sup>bc</sup>	3.17 ± 0.29 <sup>abc</sup>
72 h	3.16 ± 0.42 <sup>a</sup>	2.54 ± 0.34 <sup>a</sup>	2.35 ± 0.23 <sup>a</sup>	3.07 ± 0.53 <sup>a</sup>	3.15 ± 0.24 <sup>a</sup>

### 2.3 Ala-Gln 投喂方式对建鲤的血清皮质醇的影响

Ala-Gln 投喂方式对急性拥挤胁迫建鲤血清皮质醇的影响见表 3。急性胁迫前,各组血清皮质醇之间没有显著差异 ( $P > 0.05$ ),各组在胁迫后恢复 0 ~ 72 h 的变化趋势相类似,都是胁迫后恢复 0 h 达到高峰,然后 3 h 开始迅速下降,胁迫后恢复 6 h 后下降趋势较缓慢,但到胁迫后恢复

24 h 仍然没有完全恢复到胁迫前的水平,且各投喂方式组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

拥挤胁迫前,各组的血清皮质醇没有受到饲料中添加 Ala-Gln 及其投喂方式的影响,即各组血清皮质醇差异不显著 ( $P > 0.05$ )。饲料中添加 Ala-Gln 的各组在胁迫后恢复 0 h 的血清皮质醇达到高峰且与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ )。各种投喂方式组的峰值都显著低于对照组 ( $P <$

0.05)。胁迫后恢复1和3 h时,都是各投喂组的血清皮质醇显著低于对照组( $P < 0.05$ );胁迫后恢复6 h时,2周间隔投喂组和前4 w投喂的4 w间隔投喂组的血清皮质醇显著低于对照组( $P < 0.05$ );胁迫后恢复12 h时,只有前4 w投喂的4 w间隔投喂组的血清皮质醇显著低于对照组

( $P < 0.05$ );胁迫后恢复24 h时,各组间血清皮质醇无显著差异( $P > 0.05$ ),但仍然没有恢复到胁迫前的水平。胁迫后恢复24到72 h各组血清皮质醇仍在下降,各组间血清皮质醇差异不显著( $P > 0.05$ ),到胁迫后恢复72 h时,各组都恢复到胁迫前的水平,且差异不显著( $P > 0.05$ )。

表3 Ala-Gln投喂方式对急性拥挤胁迫鲤鱼血清皮质醇的影响  
Tab.3 Effect of feeding modes of Ala-Gln on serum cortisol of *C. carpio* var. *jian* subjected to acute crowding stress

	血清皮质醇/(ng/mL) serum cortisol				
	I	II	III	IV	V
拥挤胁迫前 before crowding stress	5.06 ± 0.55 <sup>a</sup>	3.96 ± 0.50 <sup>a</sup>	3.44 ± 0.55 <sup>a</sup>	4.13 ± 0.42 <sup>a</sup>	4.82 ± 0.48 <sup>a</sup>
拥挤胁迫后恢复时间 recovery time post crowding stress					
0 h	539.74 ± 23.55 <sup>b</sup>	368.73 ± 13.93 <sup>a</sup>	391.20 ± 18.95 <sup>a</sup>	426.36 ± 23.17 <sup>a</sup>	419.76 ± 19.03 <sup>a</sup>
1 h	359.83 ± 15.70 <sup>b</sup>	239.15 ± 7.94 <sup>a</sup>	254.13 ± 8.41 <sup>a</sup>	284.23 ± 15.45 <sup>a</sup>	279.84 ± 12.69 <sup>a</sup>
3 h	143.26 ± 8.31 <sup>b</sup>	95.68 ± 3.00 <sup>a</sup>	101.53 ± 3.43 <sup>a</sup>	112.36 ± 4.87 <sup>a</sup>	112.87 ± 6.31 <sup>a</sup>
6 h	85.96 ± 4.99 <sup>c</sup>	57.41 ± 1.80 <sup>a</sup>	60.92 ± 2.06 <sup>ab</sup>	72.42 ± 2.34 <sup>bc</sup>	76.99 ± 3.48 <sup>c</sup>
12 h	54.45 ± 2.84 <sup>b</sup>	42.37 ± 3.23 <sup>ab</sup>	40.16 ± 2.20 <sup>a</sup>	43.73 ± 2.11 <sup>ab</sup>	48.20 ± 2.76 <sup>ab</sup>
24 h	12.44 ± 0.78 <sup>a</sup>	10.59 ± 1.23 <sup>a</sup>	9.21 ± 1.39 <sup>a</sup>	10.93 ± 0.53 <sup>a</sup>	11.97 ± 1.03 <sup>a</sup>
48 h	4.94 ± 1.19 <sup>a</sup>	3.63 ± 0.55 <sup>a</sup>	4.29 ± 0.50 <sup>a</sup>	4.58 ± 1.17 <sup>a</sup>	3.97 ± 0.84 <sup>a</sup>
72 h	4.27 ± 0.17 <sup>a</sup>	4.30 ± 1.04 <sup>a</sup>	3.95 ± 0.82 <sup>a</sup>	5.25 ± 0.31 <sup>a</sup>	4.03 ± 0.78 <sup>a</sup>

#### 2.4 Ala-Gln投喂方式对建鲤的血清HSP70的影响

Ala-Gln投喂方式对急性拥挤胁迫建鲤血清HSP70的影响见表4。胁迫后恢复时,各组在胁迫后恢复0~72 h的变化趋势相类似,都是胁迫后恢复0 h就迅速上升,然后在胁迫后恢复0到12 h都保持较高的水平,然后开始下降,到胁迫后

恢复48 h各组恢复到胁迫前的水平。拥挤胁迫前,各组血清HSP70之间有显著差异( $P < 0.05$ )。2 w间隔投喂HSP70组和前4 w投喂的4 w间隔投喂组差异不显著( $P > 0.05$ ),但后4 w投喂的4 w间隔投喂组和连续8 w的投喂组的血清HSP70显著高于对照组和另两种投喂组( $P < 0.05$ )。

表4 Ala-Gln投喂方式对急性拥挤胁迫鲤鱼血清HSP70的影响  
Tab.4 Effect of feeding modes of Ala-Gln on serum HSP70 of *C. carpio* var. *jian* subjected to acute crowding stress

	血清HSP70/(ng/L) serum HSP70				
	I	II	III	IV	V
拥挤胁迫前 before crowding stress	75.70 ± 3.18 <sup>a</sup>	86.78 ± 3.44 <sup>a</sup>	90.75 ± 2.37 <sup>a</sup>	112.01 ± 6.03 <sup>b</sup>	110.57 ± 1.67 <sup>b</sup>
拥挤胁迫后恢复时间 recovery time post crowding stress					
0 h	238.42 ± 11.19 <sup>a</sup>	283.70 ± 8.63 <sup>a</sup>	291.82 ± 12.52 <sup>ab</sup>	349.28 ± 17.67 <sup>c</sup>	343.28 ± 3.69 <sup>bc</sup>
1 h	244.94 ± 19.66 <sup>a</sup>	331.39 ± 8.78 <sup>b</sup>	327.66 ± 6.77 <sup>b</sup>	349.16 ± 17.81 <sup>b</sup>	345.80 ± 5.99 <sup>b</sup>
3 h	243.00 ± 3.31 <sup>a</sup>	337.07 ± 13.72 <sup>b</sup>	341.07 ± 13.38 <sup>b</sup>	331.11 ± 10.34 <sup>b</sup>	343.20 ± 7.22 <sup>b</sup>
6 h	239.21 ± 4.72 <sup>a</sup>	345.14 ± 7.78 <sup>b</sup>	339.08 ± 9.21 <sup>b</sup>	343.91 ± 11.91 <sup>b</sup>	338.27 ± 9.07 <sup>b</sup>
12 h	241.21 ± 6.40 <sup>a</sup>	349.82 ± 5.33 <sup>b</sup>	342.41 ± 12.40 <sup>b</sup>	332.76 ± 12.41 <sup>b</sup>	342.57 ± 3.91 <sup>b</sup>
24 h	106.94 ± 7.27 <sup>a</sup>	158.58 ± 8.38 <sup>b</sup>	160.54 ± 10.28 <sup>b</sup>	140.05 ± 5.95 <sup>ab</sup>	153.95 ± 6.22 <sup>b</sup>
48 h	82.56 ± 7.11 <sup>a</sup>	95.18 ± 7.01 <sup>ab</sup>	97.41 ± 4.04 <sup>ab</sup>	120.58 ± 7.60 <sup>b</sup>	117.18 ± 7.28 <sup>b</sup>
72 h	77.57 ± 1.51 <sup>a</sup>	90.07 ± 7.02 <sup>ab</sup>	97.40 ± 5.26 <sup>ab</sup>	113.68 ± 7.30 <sup>b</sup>	113.92 ± 5.51 <sup>b</sup>

拥挤胁迫后,后 4 w 投喂的 4 w 间隔投喂组和连续 8 w 的投喂组在胁迫后恢复 0 h 的血清 HSP70 显著高于对照组和两周间隔组 ( $P < 0.05$ );各投喂组在胁迫后恢复 1、3、6 和 12 h 的血清 HSP70 显著高于对照组 ( $P < 0.05$ );胁迫后恢复 24 h 时,除后 4 w 投喂的 4 w 间隔投喂组的血清 HSP70 与对照组差异不显著外,其他各投喂方式组都显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。各组在胁迫后恢复 48 和 72 h 均恢复到胁迫前的水平,且都是后 4 w 投喂的 4 w 间隔投喂组和连续 8 w 的投喂组的血清 HSP70 显著高于对照组和其他投喂组 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 Ala-Gln 投喂模式对建鲤生长性能的影响

Gln 是近年来研究较多的营养素,是动物体内含量最多的非必需氨基酸。Gln 营养强化增强动物的应激反应能力亦称为免疫营养素。关于 Ala-Gln 促进鱼类生长已有一些研究。朱青等<sup>[14]</sup>在德国镜鲤饲料中添加一定量的 Ala-Gln,能够促进鱼类的营养代谢,提高全鱼蛋白质含量。徐奇友等<sup>[8]</sup>研究发现,饲料中添加 Ala-Gln 可提高哲罗鱼仔鱼的生长性能和抗氧化能力。亦有报导 Gln 能够增加草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 肠道对 Leu 和 Pro 的吸收量<sup>[15]</sup>,从而增加了对养分的吸收能力并提高其生产性能。本试验 Ala-Gln 连续投喂和交替投喂的生长都显著高于对照组,表明外源性的 Ala-Gln 不同的投喂方式都可以促进建鲤的生长,几种投喂模式对建鲤生长的促进作用大小依次为 2 w 间隔投喂组 > 前 4 w 投喂且后 4 w 不投喂的间隔组 > 前 4 w 不投喂且后 4 w 投喂的间隔组 > 连续 8 w 投喂组,表明 Ala-Gln 交替投喂要好于连续投喂。

#### 3.2 评定急性拥挤胁迫敏感指标的选择

在环境胁迫条件下,养殖动物的下丘脑—垂体—肾间组织轴 (HPI) 受到连续刺激,从而导致体内激素水平发生明显变化。皮质醇是 HPI 轴受到刺激后所分泌的主要激素之一,在捕捉、惊吓、拥挤、温度和盐度等的剧烈变化情况下,血清中皮质醇水平被认为是反映养殖动物胁迫状态的重要指标。对红色棘鬣鱼 (*Pagrus pagrus*)<sup>[16]</sup>、鲤 (*Cyprinus carpio*)<sup>[17]</sup>、鲫 (*Carassius auratus*)<sup>[18]</sup> 等研究表明,拥挤或高密度养殖均使其血浆皮质

醇水平迅速上升且与养殖密度正相关。在急性胁迫条件下,血液中皮质醇水平是反映动物生理状态的一个敏感指标。与皮质醇分泌密切相关的是血液中葡萄糖水平,它们是胁迫反应的二级产物<sup>[19]</sup>。通常情况下随着血清皮质醇水平的升高,葡萄糖水平也有上升趋势。有关遮目鱼 (*Chanos chanos*) 的研究表明,在冷休克处理条件下,由于糖原异生作用,试验鱼体中葡萄糖水平显著升高<sup>[20]</sup>。在拥挤、捕捉等急性胁迫条件下,红色棘鬣鱼<sup>[16]</sup>和鲤<sup>[21]</sup>血液中的葡萄糖水平也显著升高。由于血液中葡萄糖的测定相对简单,因此,葡萄糖可作为评价胁迫的重要指标。但是它也具有瞬时效应,当胁迫持续一段时间以后,血液中的葡萄糖水平可恢复到胁迫前的水平,因此,它仅能作为急性胁迫的重要指标。应激时细胞热应激蛋白 (HSP70) 的基因表达迅速增加,和糖皮质激素受体 (GR) 结合或作为分子伴侣参与蛋白质的折叠、转运及生物合成以及调节、修复和降解变性等过程,有助于应激过程中受损细胞结构和机能的快速恢复<sup>[22]</sup>。机体应激时,HSP70 通过下调 GR 而抑制 HPI 轴兴奋。HSP70 在正常细胞中水平较低,而在应激状态下显著升高,HSP70 的诱导表达是细胞水平对应激的调控。所以 HSP70 的表达与胁迫的程度有密切关系。从以上分析可选择血糖、血皮质醇和血 HSP70 作为急性应激时的评定指标。

#### 3.3 Ala-Gln 投喂方式对建鲤抗急性拥挤胁迫能力的调控

正常状况下,动物体自身合成的 Gln 能满足生理需要,但在应激、疾病等状态下,机体对 Gln 的需要量大大超过了自身的合成量,从而导致体内 Gln 水平的降低,必需通过外源添加。从本试验得知拥挤胁迫前,各组血糖和血皮质醇的含量没有显著差异,表明拥挤胁迫前各组动物都处在正常的生理状态下,但后 4 周投喂的 4 周间隔投喂组和连续 8 周投喂组的血清 HSP70 显著高于对照组和其他投喂组,表明 Ala-Gln 在正常的状态下,也能诱导体内合成 HSP70。Chow 等<sup>[23]</sup>在体外实验中发现,在应用 Gln 的培养肠上皮细胞中能检测到 HSP70 mRNA 的表达,并且随着 Gln 浓度的增加,其表达的时间更长、程度更高,可减少因为热休克导致的细胞死亡。所以,在应激之前通过添加外源 Gln 来诱导 HSP70 的表达,可提

高细胞的应激能力,抵御各种有害因素的影响,从而达到对应激细胞的保护作用。

急性拥挤胁迫首先引起建鲤血清皮质醇水平发生改变,然后引起了建鲤血糖水平的变化,这些变化的发生正好反映应激的一级神经内分泌的反应和二级物质代谢的反应。但这期间血清 HSP70 的变化趋势与血糖和血清皮质醇不同。血清 HSP70 在 0 h 就迅速上升,然后在 1 h 到 12 h 都保持较高的水平,然后开始下降,到 48 h 各组恢复到胁迫前的水平。建鲤在拥挤胁迫后,可诱导 HSP70 的表达,HSP70 和 GR 结合或作为分子伴侣参与蛋白质的折叠、转运、转位及生物合成等过程,它能快捷、短暂调整应激过程中细胞的存活机能,保护细胞抗损伤,有助于应激细胞在恢复其正常结构和机能的重建,使细胞产生耐受<sup>[22]</sup>。

投喂 Ala-Gln 后,抵抗拥挤胁迫后的恢复期有共同的生理变化。Ala-Gln 各种投喂方式组的血糖和血清皮质醇都低于对照组,尤其是峰值都低于相应时间的对照组,各种投喂方式组的血糖和血清皮质醇恢复的都比对照组要快。血清 HSP70 提高的峰值和之后稳定的时间都高于对照组,表明 Ala-Gln 能通过调控血糖、血皮质醇和血 HSP70 的变化来缓解拥挤胁迫的影响。

#### 参考文献:

- [1] 李爱华. 拥挤胁迫对草鱼血浆皮质醇、血糖及肝脏中抗坏血酸含量的影响[J]. 水生生物学报, 1997, 21(4):384-386.
- [2] Wise D J. Effects of dietary selenium and vitamin E on red blood cell preoxidation, glutathione peroxidase activity, and macrophage superoxide anion production in channel catfish [J]. Aquatic Animal Health, 1993, 5:177-182.
- [3] Montero D, Marrero M, Izquierdo M S, et al. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress [J]. Aquaculture, 1999, 171:269-278.
- [4] Cristina E T, Amalia E, Morales M H. Physiological changes in rainbow trout held under crowded conditions and fed diets with different levels of vitamins E, C and highly unsaturated fatty acids [J]. Aquaculture, 2008, 277(34):293-302.
- [5] 赵敬湘, 赵玉芬, 怀文辉, 等. 丙氨酰-谷氨酰胺二肽对人脐静脉内皮细胞 ECV304 缺氧缺糖损伤的保护作用 [J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(1):6-11.
- [6] 袁雪波, 陈恒灿, 郭荣富, 等. 谷氨酰胺及其二肽在早期断奶仔猪中的应用 [J]. 中国饲料, 2009, 12:28-36.
- [7] 温安祥, 周定刚. GLN 缓解中华鳖免疫应激反应机制的初步研究 [J]. 水生生物学报, 2008, 32(4):449-454.
- [8] 徐奇友, 王常安, 许红, 等. 饲喂丙氨酰-谷氨酰胺对哲罗鱼仔鱼生长和抗氧化能力的影响 [J]. 动物营养学报, 2009, 21(6):1012-1017.
- [9] 杨奇慧, 周歧存. 谷氨酰胺对杂交罗非鱼生长、饲料利用及抗病力的影响 [J]. 中国水产科学, 2008, 15(6):1017-1023.
- [10] 徐奇友, 王常安. 外源性谷氨酰胺对虹鳟稚鱼生长和肠道形态的影响 [J]. 中国粮油学报, 2009, 24(4):98-102.
- [11] 陈巨星, 孙祥明, 张元兴. 谷氨酰胺对鲑鱼胚胎细胞生长和代谢的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(4):442-445.
- [12] 韩加凤, 华雪铭, 黄旭雄, 等. 壳聚糖投喂方式对草鱼抗饥饿胁迫能力的影响 [J]. 水产学报, 2010, 34(3):459-465.
- [13] 王桂芹, 芦洪梅, 牛小天, 等. 丙氨酰-谷氨酰胺对建鲤的适宜投喂模式 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2012, 40(1):1-7.
- [14] 朱青, 徐奇友, 王长安, 等. 谷丙氨酰-谷氨酰胺对德国镜鲤幼鱼血清生化指标及体组成的影响 [J]. 水产学杂志, 2009, 22(4):12-16.
- [15] 叶元土, 王永玲, 蔡春芳, 等. 谷氨酰胺对草鱼肠道 L-亮氨酸、L-脯氨酸吸收及肠道蛋白质合成的影响 [J]. 动物营养学报, 2007, 19(1):28-32.
- [16] Rotllant J, Pavlidis M, Kentouri M, et al. Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress [J]. Aquaculture, 1997, 156(3/4):279-290.
- [17] Ruane N M, Komen H. Measuring cortisol in the water as an indicator of stress caused by increased loading density in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Aquaculture, 2003, 218(2):685-693.
- [18] 王文博, 汪建国, 李爱华, 等. 拥挤胁迫后鲫鱼血液皮质醇和溶菌酶水平的变化及对病原的敏感性 [J]. 中国水产科学, 2004, 11(5):408-412.
- [19] Barton B A, Wama G K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroid [J]. Annual Review of Fish Diseases, 1991, 1:3-26.
- [20] Hsieh S L, Chen Y N, Kuo C M. Physiological

- responses, desaturase activity, and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) under cold acclimation[J]. *Aquaculture*,2003,220:903–918.
- [21] Pottinger. Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in anglers' keepnets [J]. *Journal Fish Biology*,1998,53:728–742.
- [22] Basu N, Todgham A, Eackerman P A. Heat shock protein genes and their functional significance in fish [J]. *Gene*,2002,295:173–183.
- [23] Chow A, Zhang R. Glutamine reduces heat shock induced cell death in rat intestinal epithelial cells [J]. *Journal Nutrition*,1998,128(8):1296–1301.

### Effect of feeding modes of Ala-Gln on growth and resistance to crowding stress of *Cyprinus carpio* var. *jian*

WANG Gui-qin<sup>1</sup>, LU Hong-mei<sup>1,2</sup>, NIU Xiao-tian<sup>1</sup>, LI Zhi-ping<sup>1</sup>, HAN Yu-tian<sup>1</sup>,  
ZHAO Chao-yang<sup>3</sup>, QING Gui-xin<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Changchun Tongwei Feed Limited Company, Changchun 130456, China;

3. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Science, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** The trial was carried out on healthy *Cyprinus carpio* var. *jian* with the initial weight ( $33.52 \pm 0.17$ ) g in a single recirculating system for 8 weeks. Diet was administered at concentrations 0.0% (control diet) and 0.5% (trial diet) Ala-Gln of dietary dry matter, which were fed to the *C. carpio* var. *jian* in five different feeding modes. continuously fed by control diet during eight weeks (I, control group), trail diet at an interval of two weeks (II), trail diet before four weeks at an interval of four weeks (III), trail diet after four weeks at an interval of four weeks (IV), and continuously fed by trail diet during eight weeks (V). Acute crowding stress was implemented at the last of experiment. The trail was conducted to investigate the effects of feeding modes of Ala-Gln on growth and the resistance to acute crowding stress for *C. carpio* var. *jian*. Results indicated that growth of different feeding modes of Ala-Gln was significantly higher than that of control group ( $P < 0.05$ ). Specific growth rate of II was higher than that of III, IV, V groups ( $P < 0.05$ ) and that of III was higher than that of V group ( $P < 0.05$ ). After acute crowding stress, Serum cortisol reached peak at 0 h and glucose at 1 h, serum HSP70 remained high level before 1–12 h then declined, at last, restored the normal level until 48 h. Serum cortisol and glucose were lower in every feeding mode than in control group ( $P < 0.05$ ). The smallest increase of serum glucose was II group, The first recovery occurred in II and III group after stress. Serum HSP70 in every feeding mode was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ), and returned to normal state in 48 h and 72 h. Serum HSP70 in IV and V groups was still significantly higher than the control ( $P < 0.05$ ). In the current experiment, it concluded that adding Ala-Gln could improve the growth and resistance to crowding stress of *C. carpio* var. *jian*. There were significant differences of every feeding mode. Given economic efficiency and practicability, interval feeding modes will be suggested in the practical culture of *C. carpio* var. *jian*.

**Key words:** *Cyprinus carpio* var. *jian*; Ala-Gln; growth; immune; crowding stress

**Corresponding author:** QIN Gui-xing. E-mail: qgx@jlau.edu.cn