

文章编号: 1000-0615(2018)06-0968-07

DOI: 10.11964/jfc.20170710903

带鱼酶解蛋白亚铁螯合物对泥鳅免疫特性的影响

林慧敏, 袁宁, 李颖杰, 邓尚贵*,
张宾, 霍健聪

(浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江舟山 316000)

摘要: 为探究带鱼酶解蛋白亚铁螯合物对泥鳅免疫特性的影响及其在泥鳅体内的代谢分布情况, 通过在泥鳅饲料中添加不同比例带鱼酶解蛋白亚铁螯合物, 喂养40 d, 检测泥鳅消化酶活性、血清和肝脏生理生化指标, 运用活体成像技术检测FITC标记的带鱼酶解蛋白亚铁螯合物在泥鳅体内的分布。结果显示, 亚铁螯合物添加量为2 g/kg时, 脂肪酶活性极显著高于对照组; 添加量为1 g/kg时, 淀粉酶和胃蛋白酶活性显著高于正常对照组; 各实验组胰蛋白酶活性相比于对照组无显著性差异。血清指标中超氧化物歧化酶和溶菌酶在添加量为2 g/kg时, 活性显著高于正常对照组; 相对与正常对照组, 过氧化氢酶在添加量为1 g/kg表现为显著性差异, 2 g/kg的添加量表现为极显著性差异; 丙二醛在添加量为2 g/kg显著低于正常对照组。活体成像技术发现FITC标记的带鱼酶解蛋白亚铁螯合物会较长时间滞留在泥鳅体内, 荧光强度主要集中在泥鳅身体上部, 推测带鱼酶解蛋白亚铁螯合物被泥鳅吸收后主要分布在肝脏、胆囊等器官内。研究表明, 饲料中添加1~2 g/kg的带鱼酶解蛋白亚铁螯合物能提高养殖泥鳅的消化道酶活性, 增强泥鳅的非特异性免疫。

关键词: 带鱼; 泥鳅; 亚铁螯合物; 消化道酶; 免疫

中图分类号: S 963.7

文献标志码: A

铁元素是鱼类生长的必需微量元素, 在鱼类的骨骼生长、神经发育、免疫增强等方面非常重要^[1]。在自然条件下, 鱼类可从天然食物中获得铁, 也能通过鳃和肠黏膜吸收水溶性的铁, 不会发生铁缺乏症^[2], 但在商业化的精养体系中, 饲料几乎是鱼类唯一的铁源, 若其中含铁不足或者铁的吸收受到不利影响, 则可能导致鱼类的铁缺乏症, 使其生长减慢, 抗病能力下降^[3]。许多研究表明, 在饲料中添加适量的铁元素可改善养殖鱼类的免疫指标, 如饲料中补充适量的铁可明显加快美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)^[4]、幼建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)^[5]的生长及增强血清免疫指标的活性, 促进消化酶的分泌, 增强营养物质的吸收效率。但饲料中游离的矿物铁离子会受到饲料中的成分、机体消化

道环境等的影响, 降低铁的吸收率。而近年来研究发现, 氨基酸或蛋白水解肽与可溶性矿物微量元素以共价键结合形成的络合物不仅可以改善动物的生长性能, 提高免疫力与抗应激能力, 同时也可以减少微量元素的过量添加, 相应减少畜禽排泄物中的排泄量, 缓解环境压力^[6]。本团队研究了复合酶解带鱼(*Trichiurus lepturus*)蛋白制备亚铁螯合物多肽的工艺, 并采用超滤法制备高抗菌抗氧化活性带鱼蛋白亚铁螯合物(Fe^{2+} -HPH); 又研究了带鱼蛋白酶解物不同分子量的肽段与 Fe^{2+} 螯合产物的红外光谱及对贫血模型大鼠的抗贫血及抗疲劳机制, 发现带鱼酶解蛋白亚铁螯合物可改善大鼠贫血症状, 同时具有调节大鼠肠道微生物菌群等功效^[7-8]。Zhang等^[9]和王晓玲等^[10]研究发现在饲养中添加适量的蛋白

收稿日期: 2017-07-15 修回日期: 2017-10-26

资助项目: 国家自然科学基金(31471609); 浙江省自然科学基金(LY18C200007, LY18C200008, LY17C200011)

通信作者: 邓尚贵, E-mail: dengshanggui@163.com

水解肽-Fe²⁺配合物会提高克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)的生长性能及非特异性免疫酶活性。

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)是重要的淡水经济鱼类之一,且已成为新一代市场潜力大、发展前景广阔的水产品,在国内外消费市场的需求量不断增加^[1],提高饲养过程中泥鳅的免疫力将会推动泥鳅加工、养殖、育苗等产业不断完善发展。

本实验以泥鳅为研究对象,在泥鳅饲料中添加不同量的带鱼蛋白亚铁螯合物,探究其对泥鳅消化道酶及非特异性免疫相关指标的影响,同时研究带鱼蛋白亚铁螯合物在泥鳅体内的代谢情况,为制备泥鳅饲料微量元素添加剂提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与试剂

泥鳅[个体质量(15±2.0)g、体长(13±2.0)cm],购自舟山南珍菜市场;泥鳅饲料,舟山西蜀水族人家;肝素钠,上海生物工程有限公司;异硫氰酸荧光素(FITC),Sigma公司;0.5 ku分子量透析袋,美国雷布斯;淀粉酶等试剂盒,南京建成生物工程研究所。

1.2 实验设备

A-1502分光光度计,上海谱元;Freezone 4.5plus冷冻干燥机,美国Labconco;UPT-11-60L超纯水机,上海优普;HWS-12电热水浴锅,上海齐欣;CF-16RN高速冷冻离心机,日本日立;MDF-U53V型超低温冰箱,日本SANYO。

1.3 实验方法

饲料制作 带鱼酶解蛋白亚铁螯合物的制备方法参考文献[7, 12]。制备的亚铁螯合物为灰白色粉末,分子量为1~3 ku,亚铁离子螯合率为80.46%。泥鳅饲料成分与含量见表1,将其粉碎后加入亚铁螯合物,于中草药粉碎机中混匀,加入适量的水,放入小型饲料颗粒机中,制作成小型颗粒的下沉饲料,然后放入25℃烘箱中烘干。制得饲料中亚铁螯合物的含量分别为0、0.5、1、2和4 g/kg。

实验泥鳅的养殖管理 购买实验泥鳅前用高锰酸钾溶液对塑料水箱(60 cm×44 cm×36 cm)进行消毒杀菌,泥鳅购买后用1.5%氯化钠溶液消毒

表1 泥鳅饲料组分及含量

Tab. 1 Composition and content of *M. anguillicaudatus* feed

饲料组分 feed ingredient	含量/% content
粗蛋白 crude protein	42.0
灰分 ash	16.0
粗纤维 crude fiber	6.0
钙 calcium	1.0~4.0
总磷 total phosphorus	1.0~2.5
食盐 salt	3.0
赖氨酸 lysine	1.8
粗脂肪 crude fat	3.0
水分 moisture	12.0

10 min后,于塑料水箱中自然水温驯养10 d。驯养结束后,挑选健康、体表无损伤的泥鳅,分成5组,每组3个平行,共30只,放养于消毒的塑料水箱中,每天8:30和16:30投料,投料量为体质量的1%~2%,剩余量及时吸出,水温25~30℃,每天换水量为1/3左右,饲养40 d。实验结束前一天停止喂食。

样品采集 用含有适量肝素钠抗凝血剂的注射器对泥鳅进行静脉取血,4℃冰箱内静置2 h后,于4℃下3 500 r/min离心15 min,收集上层血清,-20℃保存,以备测血清中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和溶菌酶活性。再将泥鳅解剖取肝胰脏和肠道,样品分置于不同的离心管中,在-80℃冰箱中保存,以备测消化酶(脂肪酶、淀粉酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶及肝脏的SOD、CAT、MDA)活性。测消化酶活性之前先解冻样品,称重后按质量体积比加入4倍生理盐水,用玻璃匀浆器进行匀浆,3 500 r/min离心30 min后取上清液用于消化酶活性测定。

胃肠道消化酶指标测定 脂肪酶、淀粉酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶检测方法参考文献[13]。

非特异性免疫功能指标测定 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。溶菌酶活性采用自身对照法(μg/mL)测定^[14],MDA含量采用硫代巴比妥酸比色法(TBA法)(nmol/mg prot)测定^[10],SOD活性采用黄嘌呤氧化酶法测定^[4],CAT活性采用紫外比色法测定^[15]。

FITC标记亚铁螯合肽 FITC标记亚铁螯合肽参考Jullian^[6]及张弛等^[7], 稍作改动: 称取1~5 ku亚铁螯合肽粉500.0 mg与FITC 10.0 mg加入50.0 mL浓度为0.2 mol/L、pH值为9.0的碳酸盐缓冲液中(浓度比为50:1), 置于磁力搅拌器上, 室温黑暗条件下充分搅拌溶解, 之后移入4 °C冰箱, 16 h后将其装入分子截留量为0.5 ku的透析袋中进行常温去离子水透析48 h, 前10 h每1 h换1次去离子水, 直至无荧光透出。冷冻干燥, 得到的粉状物于-20 °C保存。

亚铁螯合肽荧光标记物在泥鳅体内的分布 亚铁螯合肽荧光标记粉用去离子水配置, 浓度为5 mg/mL, 以灌胃的方式注入泥鳅体内200 μ L, 采样时间分别为0、0.5、1、2、4和8 h, 泥鳅活体直接取出, 放在超低温冰箱中速冻致死, 检测前除去泥鳅表面水分, 放入IVIS Kinetic动物活体成像系统的记录暗箱中, 激发波长和发射波长分别设定为485和520 nm, 每个时间点2~3个重复。

数据分析 实验结果以mean \pm SD表示, 通过SPSS 17.0软件以单因素方差分析法对比多组数据间的平均差异, $P>0.05$ 表示无显著性差异, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 饲料中亚铁螯合肽的添加对泥鳅胃肠道消化酶活性的影响

泥鳅消化酶活性的强弱在其生长发育中发挥至关重要的作用, 但同时易受饲料中营养成分的影响。亚铁螯合肽的添加量为1和4 g/kg时, 脂肪酶活性组显著高于正常对照组($P<0.05$), 添加量为2 g/kg则极显著高于正常对照组($P<0.01$); 淀粉酶活性组中, 添加量为1 g/kg组显著高于正常对照组($P<0.05$); 胃蛋白酶活性组中, 添加量为2 g/kg组显著高于正常对照组($P<0.05$); 各实验组在胰蛋白酶活性中相比于正常对照组无显著性差异($P>0.05$)(表2)。

表2 泥鳅胃肠道消化酶活性

Tab. 2 Digestive enzyme activities in the digestive tract of *M. anguillicaudatus*

饲料中亚铁螯合肽含量/(g/kg) content of ferrous chelating peptide in feed	脂肪酶/(U/g prot) lipase	淀粉酶/(U/mg prot) amylase	胃蛋白酶/(U/mg prot) pepsin	胰蛋白酶/(U/mg prot) trypsin
0	53.34 \pm 6.40	2.18 \pm 0.14	2.72 \pm 1.01	1 574.11 \pm 60.55
0.5	61.20 \pm 5.13	2.20 \pm 0.23	3.63 \pm 0.37	1 583.33 \pm 70.93
1	67.56 \pm 5.62*	3.08 \pm 0.34*	3.81 \pm 0.29*	1 561.56 \pm 37.82
2	88.97 \pm 6.27**	2.56 \pm 0.15	4.40 \pm 0.69**	1 769.33 \pm 1.05
4	67.75 \pm 8.57*	2.34 \pm 0.15	3.47 \pm 0.20	1 576.22 \pm 28.39

注: “*”和“**”分别为与正常对照组相比具有显著性($P<0.05$)和极显著性($P<0.01$)差异, 下同

Notes: “*” meant the significance compared with the control group ($P<0.05$), “**” meant extreme significance compared with the control group ($P<0.01$), the same below

2.2 饲料中亚铁螯合肽的添加对泥鳅免疫特性的影响

血清中SOD活性在添加量为2 g/kg时, 显著高于对照组($P<0.05$); CAT在添加量为1 g/kg时, 显著高于对照组($P<0.05$), 添加量为2 g/kg时为极显著性差异($P<0.01$); 溶菌酶在添加量为1和2 g/kg时分别极显著高于($P<0.01$)和显著高于($P<0.05$)对照组; MDA在添加量为2 g/kg时显著低于对照组($P<0.05$)(表3)。

肝脏中SOD活性在添加量为2 g/kg时, 显著高于对照组($P<0.05$); 相比正常对照组, CAT在添加量为1和4 g/kg时显著高于对照组($P<0.05$), 4 g/kg时为极显著性差异($P<0.01$); MDA在添加量为

1、2和4 g/kg时均显著低于对照组($P<0.05$)(表4)。

2.3 亚铁螯合肽在泥鳅体内代谢分布

动物活体成像技术利用生物发光与荧光可动态观察标记物在活体动物体内的发展进程, 不仅能客观地提供实验相应数据, 确切地展示分子生物特性, 同时还因操作简便、灵敏度高优点, 在生物、医学研究、药物治疗等相关领域广泛应用^[18-19]。本实验将FITC标记亚铁螯合肽注入泥鳅体内, 探究其在机体内的代谢分布。标记物在刚注入体内时充满整个消化道, 但随着时间的推移, 发现大部分标记物会被肠道逐渐排除, 而残留在体内的标记物主要集中在泥鳅身体的中上部, 且荧光极强, 8 h后, 泥

表 3 泥鳅血清免疫指标

Tab. 3 Related enzyme activities of non-specific immune of *M. anguillicaudatus*

饲料中亚铁螯合肽含量/(g/kg) content of ferrous chelating peptide in feed	SOD/(U/mL)	CAT/(U/mg prot)	MDA/(nmol/mg prot)	溶菌酶/(μ g/mL) lysozyme
0	47.39 \pm 1.18	6.67 \pm 0.31	7.12 \pm 0.14	1.39 \pm 0.56
0.5	49.99 \pm 0.89	6.92 \pm 0.15	6.97 \pm 0.12	2.04 \pm 0.70
1	52.29 \pm 2.78	7.32 \pm 0.23	6.74 \pm 0.11	3.61 \pm 0.73**
2	61.44 \pm 1.71*	12.09 \pm 0.19**	4.21 \pm 0.00*	2.69 \pm 0.42*
4	48.98 \pm 0.94	7.21 \pm 0.21	6.79 \pm 0.08	2.08 \pm 0.69

表 4 泥鳅肝脏免疫指标

Tab. 4 Antioxidant indexes of liver of *M. anguillicaudatus*

饲料中亚铁螯合肽含量/(g/kg) content of ferrous chelating peptide in feed	SOD/ (U/mL)	CAT/ (U/mg prot)	MDA/ (nmol/mg prot)
0	61.17 \pm 5.23	7.87 \pm 0.15	4.28 \pm 0.54
0.5	62.14 \pm 4.65	8.72 \pm 0.27	3.98 \pm 0.39
1	66.82 \pm 2.98	10.83 \pm 0.47*	3.27 \pm 0.15*
2	73.55 \pm 3.25*	14.47 \pm 1.33**	3.16 \pm 0.21*
4	59.59 \pm 4.69	9.08 \pm 0.73*	3.43 \pm 0.06*

鳅体内仍有荧光存在, 说明亚铁螯合肽被泥鳅消化道吸收且在体内滞留时间较长, 而泥鳅身体上部荧光的富集, 恰为心、肝脏、胆囊等器官所处部位, 说明亚铁螯合肽在泥鳅消化道吸收后, 主要分布在肝脏、胆囊处(图1)。这些器官是否含有亚铁螯合肽以及含量的多少, 还需进一步探究。

3 讨论

饲料中添加铁与抗菌肽均会影响消化酶活性^[20], 相关研究报道指出, 饲料中添加铁对幼建鲤胰蛋白酶、脂肪酶等消化酶活性有明显的增强作用, 并通过分析饲料效率与肝胰脏重量和肝胰脏蛋白含量的相关性, 证实肠道消化酶活性的提高可能是铁促进幼建鲤肝胰脏的生长, 进而增加肝胰脏消化酶原的分泌引起的^[5]。白建勇等^[20]在分析添加抗菌肽可明显提高消化道酶活性的现象时推测: 抗菌肽可以抑制肠道有害菌的生长繁殖, 增强肠黏膜免疫力和完整性, 间接影响胰腺消化酶合成及分泌量的增加, 进而增强营养吸收能力。该实验饲料中添加1~2 g/kg亚铁螯合肽时, 脂肪酶、淀粉酶和胃蛋白酶活性显著或极显著高于正常对照组, 胰蛋白酶活

性相比于正常对照组无显著性差异($P>0.05$)。目前普遍认为, 金属螯合物能利用肽的吸收机制使其整体被肠黏膜细胞吸收, 可提高金属元素的吸收, 说明亚铁螯合肽可以和铁增强幼建鲤消化酶活性一样发挥作用; 同时亚铁螯合肽的抗菌活性也可以抗菌肽的方式促进消化酶活性的提高。关于亚铁螯合肽是以铁的方式、抗菌方式或是二者先后作用共同提高消化酶活性, 还需进一步探究。本实验条件下饲料中添加1~2 g/kg的亚铁螯合肽能提高泥鳅消化酶活性, 促进饲料中营养物质的吸收利用。

鱼类作为低等脊椎动物, 其特异性免疫机制不是很完善, 因此主要依赖非特异性免疫抵御外界病原体或细菌的侵袭, 促进机体生长并保证健康。溶菌酶是水产动物特别是鱼体内非特异性免疫防御的重要成员, 其活性的大小意味着吞噬细胞活性是否增强, 进而表现为鱼体免疫防御的强弱^[9]。SOD、CAT等抗氧化酶在机体内可以稳定氧化剂和抗氧化剂的动态平衡, 维持生物大分子活动, 在细胞正常代谢过程中发挥极其重要的作用, 当平衡受到破坏后, 抗氧化酶会迅速清除多余的自由基, 以维持机体健康。MDA可指示机体的氧化性应激, 含量越高表明活性氧自由基含量越高, 组织细胞过氧化性越强, 对机体损害越大。郭存荣等^[21]研究发现, 在奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)日粮中补充适量的多肽—锌配合物也会显著提高血清中溶菌酶含量和总SOD活性, 说明肽—微量元素金属配合物可在一定水平增强水生动物的免疫机制。本实验中, 饲料中添加1~2 g/kg的亚铁螯合肽能增强泥鳅血清与肝脏中SOD及血清溶菌酶活性, 该结果与王晓玲等^[10]对克氏原螯虾的研究结果相似, 同时MDA随着亚铁螯合肽含量增加, 先降低后升高的趋势与Huang等^[8]对大鼠的

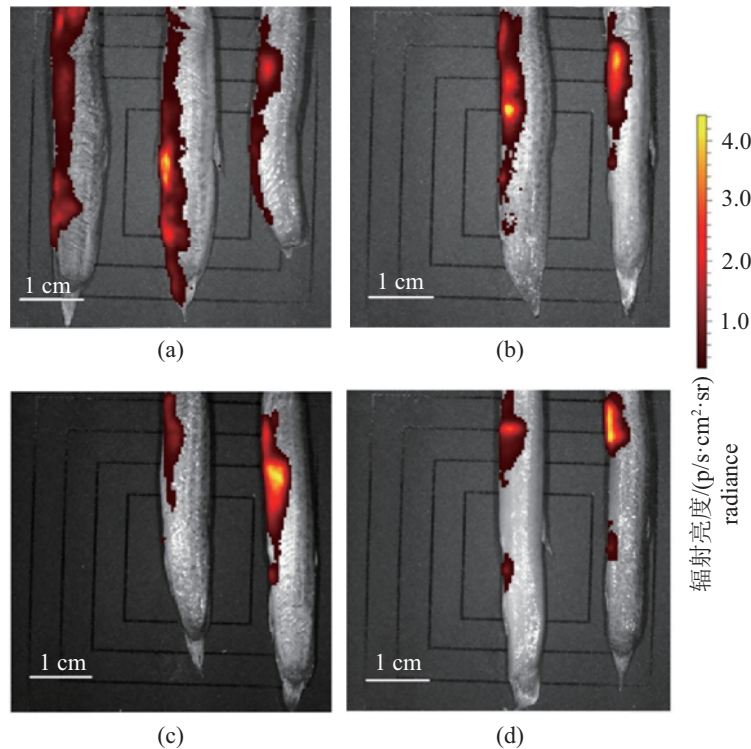


图1 泥鳅活体成像图

(a) 注入标记物0 h后; (b) 注入标记物2 h后; (c) 注入标记物4 h后; (d) 注入标记物8 h后

Fig. 1 *In vivo* imaging of *M. anguillicaudatus* after injection of ferrous chelating peptide at different time

(a) 0 h after injection; (b) 2 h after injection; (c) 4 h after injection; (d) 8 h after injection

研究结果类似, 基于以上结果以及CAT活性在亚铁螯合肽添加后显著提高, 说明泥鳅饲养中添加亚铁螯合肽能促进其免疫力的提高, 增强防御体系。饲料中添加量表现出的显著差异, 可能受配合物分子量差异、水产动物的种类及不同微量元素元素等的影响。尽管无机铁微量元素可在一定程度上增强鱼类免疫力, 但有报道指出氨基酸结合的铁微量元素在增强罗非鱼的非特异性免疫方面要优于无机微量元素^[22]。其原因可能是氨基酸结合铁后更易被机体吸收, 铁元素的吸收利用率提高。

综上所述, 饲料中添加适量的带鱼酶解蛋白亚铁螯合肽不仅有利于提高泥鳅消化酶活性, 在免疫功能方面也有显著的效果。且根据本实验条件, 饲料中1~2 g/kg的带鱼酶解蛋白亚铁螯合肽添加量在各实验组中表现出对泥鳅消化吸收功能的促进作用, 并提高其免疫特性。各实验组泥鳅肝脏组织及肠道组织未发生病变, 说明带鱼酶解蛋白亚铁螯合肽在本实验用量范围内是安全的, Li等^[23]通过急性经口毒性实验显示带鱼酶解蛋白亚铁螯合肽LD₅₀ 95%的可信

限为6 259~9 022 mg/kg, 属于实际无毒型, 对实验动物肝脏及肠道等组织无影响, 与本实验的结果相似。利用活体成像技术观察, 发现泥鳅消化道吸收亚铁螯合肽后, 会较长时间滞留在体内, 推测亚铁螯合肽被机体吸收后主要分布在肝脏、胆囊等器官内。

参考文献:

- [1] Carriquiriborde P, Handy R D, Davies S J. Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets[J]. The Journal of Experimental Biology, 2004, 207(Pt 1): 75-86.
- [2] Kwong R W M, Niyogi S. The interactions of iron with other divalent metals in the intestinal tract of a freshwater teleost, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 150(4): 442-449.
- [3] Riche M. Nitrogen utilization from diets with refined and blended poultry by-products as partial fish meal replacements in diets for low-salinity cultured Florida pompano, *Trachinotus carolinus*[J]. Aquaculture, 2015, 435: 458-466.

- [4] 周立斌, 王安利, 马细兰, 等. 饲料中铁对美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)生长和免疫的影响[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 663-668.
Zhou L B, Wang A L, Ma X L, *et al.* Effects of dietary iron on growth and immune response of red drum *Sciaenops ocellatus*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(5): 663-668(in Chinese).
- [5] 凌娟. 铁对幼建鲤消化吸收功能、免疫功能和抗氧化能力的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2009.
Ling J. Effect of iron on functions of digestion, absorption, immune and antioxidative of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *jian*)[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2009(in Chinese).
- [6] 黄丹萍, 胡巧玲, 李奎, 等. 有机微量元素氨基酸络(螯)合物评定研究进展[J]. 饲料研究, 2015(14): 27-31.
Huang D P, Hu Q L, Li Q, *et al.* Progress in the evaluation of organic trace elements amino acid complex[J]. *Feed Research*, 2015(14): 27-31(in Chinese).
- [7] Lin H M, Deng S G, Huang S B, *et al.* The effect of ferrous-chelating hairtail peptides on iron deficiency and intestinal flora in rats[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(8): 2839-2844.
- [8] Huang S B, Lin H M, Deng S G. Study of anti-fatigue effect in rats of ferrous chelates including hairtail protein hydrolysates[J]. *Nutrients*, 2015, 7(12): 9860-9871.
- [9] Zhang B, Shi Z R, Wang X L, *et al.* Depuration of cadmium from blue mussel (*Mytilus edulis*) by hydrolysis peptides and chelating metal elements[J]. *Food Research International*, 2015, 73: 162-168.
- [10] 王晓玲, 张宾, 马路凯, 等. 蛋白水解肽-Fe²⁺配合物对克氏原螯虾生长及非特异性免疫的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(11): 71-78.
Wang X L, Zhang B, Ma L K, *et al.* Effect of protein Hydrolysate-Fe²⁺ complex on the growth performance and non-specific immune parameters of *Procambarus clarkii*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(11): 71-78(in Chinese).
- [11] 党晓妍, 王茵, 吴成业, 等. 泥鳅高值化开发利用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(1): 20-26.
Dang X Y, Wang Y, Wu C Y, *et al.* Research progress on the high-value development and utilization of loach[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2017, 8(1): 20-26(in Chinese).
- [12] 林慧敏, 邓尚贵, 庞杰, 等. 超滤法制备高抗菌抗氧化活性带鱼蛋白亚铁螯合肽(Fe-HPH)的工艺研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(6): 16-21.
Lin H M, Deng S G, Pang J, *et al.* Preparing ferrous chelating of hairtail protein hydrolysate (Fe-HPH) with high antibacterial and antioxidant activity by ultrafiltration[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2012, 12(6): 16-21(in Chinese).
- [13] 柳旭东, 梁萌青, 张利民, 等. 饲料中添加水解鱼蛋白对半滑舌鳎稚鱼生长及生理生化指标的影响[J]. 水生生物学报, 2010, 34(2): 242-249.
Liu X D, Liang M Q, Zhang L M, *et al.* Effect of fish protein hydrolysate levels on growth performance and biological and physiological parameters in tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) post-larva[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(2): 242-249(in Chinese).
- [14] 肖艳翼, 夏永涛, 刘腾飞, 等. 壳聚糖对俄罗斯鲟幼鱼生长性能及免疫功能的影响[J]. 水生生物学报, 2017, 41(1): 114-120.
Xiao Y Y, Xia Y T, Liu T F, *et al.* Effects of chitosan on growth performance and immunity of juvenile russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(1): 114-120(in Chinese).
- [15] 马广智, 徐军, 方展强, 等. 臭氧对草鱼鱼种超氧化物歧化酶和Na⁺-K⁺-ATPase活性的影响[J]. 水产学报, 2003, 27(6): 575-581.
Ma G Z, Xu J, Fang Z Q, *et al.* Effect of ozone on the activities of superoxide dismutase and Na⁺-K⁺-ATPase in *Ctenopharyngodon idellus* fingerling[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2003, 27(6): 575-581(in Chinese).
- [16] Jullian M. N-terminus FITC labeling of peptides on solid support: the truth behind the spacer[J]. *Tetrahedron Letters*, 2009, 50(3): 260-263.
- [17] 张驰, 宋锡瑾, 王杰, 等. FITC标记脂肪酶的稳定性和荧光光谱[J]. 应用化学, 2008, 25(12): 1381-1384.
Zhang C, Song X J, Wang J, *et al.* Stability and fluorescence spectra of lipase labeled with FITC[J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2008, 25(12): 1381-1384(in Chinese).
- [18] Hoetker M S, Kiesslich R, Diken M, *et al.* Molecular *in vivo* imaging of gastric cancer in a human-murine xenograft model: targeting epidermal growth factor receptor[J]. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2012, 76(3): 612-620.
- [19] Iqbal H, Pan Q. Image guided surgery in the management of head and neck cancer[J]. *Oral Oncology*, 2016,

- 57: 32-39.
- [20] 白建勇, 宦海琳, 闫俊书, 等. 抗菌肽对发酵床饲养仔猪抗氧化指标、免疫指标及肠道主要菌群数量的影响[J]. 家畜生态学报, 2015, 36(5): 66-70.
- Bai J Y, Huan H L, Yan J S, *et al.* Effect of antimicrobial peptides on antioxidant indices, immune indices and intestinal main microbial flora number in piglets raised in fermentation bed[J]. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2015, 36(5): 66-70(in Chinese).
- [21] 郭存荣, 郭清泉, 方细娟, 等. 多肽-锌配合物对奥尼罗非鱼生长性能和血清生化指标的影响[J]. 中国饲料, 2010(23): 35-37.
- Guo C R, Guo Q Q, Fang X J, *et al.* Effects of Zn-peptides complexes on growth performance and serum biochemical indexes[J]. *China Feed*, 2010(23): 35-37(in Chinese).
- [22] 李同刚. 罗非鱼下脚料蛋白酶解物锌螯合盐的制备及其抗氧化活性研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2013.
- Li T G. Study on the preparation and properties of zinc chelating protein hydrolysates from tilapia scraps[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2013(in Chinese).
- [23] Li Y J, Lin H M, Huang S G, *et al.* Genotoxicity and acute oral toxicity of peptides ferrous chelates of Hairtail protein[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2016, 9(2): 4047-4052.

Effect of ferrous chelate *Trichiurus lepturus* protein on the immune characteristics of *Misgurnus anguillicaudatus*

LIN Huimin, YUAN Ning, LI Yingjie, DENG Shanggui*,
ZHANG Bin, HUO Jiancong

(College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

Abstract: The test of the digestive enzyme activity, observation of intestinal tissue and the living imaging technology were applied to investigate the effect of the ferrous chelating peptide on the digestive tract. The test of indexes of biochemical indexes of serum and liver, and observation of the liver were used to investigate the effect of the ferrous chelating peptide on immunological characteristics of *Misgurnus anguillicaudatus*. The result showed lipase activity was significantly higher than that of the control group when the ferrous chelating peptide was 2 g/kg; amylase activity of pepsin was significantly higher than the normal control group when the ferrous chelating peptide was 1 g/kg; trypsin activity in each experimental group compared with the control group had no significant difference. SOD and lysozyme in serum were significantly higher than those of normal control group when the ferrous chelating peptide was 2 g/kg; compared with the normal control group, CAT at ferrous chelating peptide concentration of 1 g/kg showed significant difference. Compared with control group, the morphological structure of each experimental group had no change. With the application of living imaging technology, complexes of ferrous chelating peptide with FITC marked stayed in *M. anguillicaudatus* for a long time and fluorescence intensity was mainly enriched in the upper body of *M. anguillicaudatus*, hence, after absorption, the ferrous chelating peptide was speculated to be distributed in the liver, gallbladder and other organs. The results showed that the hydrolysis of ferrous chelate peptide could improve the digestive enzyme activities of loach and enhance non-specific immunity of loach.

Key words: *Trichiurus lepturus*; *Misgurnus anguillicaudatus*; iron chelate peptide; digestive tract enzyme; immunity

Corresponding author: DENG Shanggui. E-mail: dengshanggui@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31471609); Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (LY18C200007, LY18C200008, LY17C200011)