

饥饿胁迫对鲤肠道与肝脏蛋白酶和淀粉酶活性的影响

王爱民^{1,2}, 方永清¹, 韦信健¹, 李 静¹, 许杭峰¹, 韩光明²

(1. 盐城工学院海洋技术系, 江苏 盐城 224051; 2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘要:在水温 18~22 ℃ 的流水循环条件下, 研究了饥饿胁迫对鲤(*Cyprinus carpio*) 内脏蛋白酶和淀粉酶活性的影响。实验设计为 4 组, 每组 3 个重复, 鲤分别饥饿 0、10、20、30 d。试验结果表明, 随着饥饿时间的延长, 体重、含肉率变化呈现下降趋势并趋向稳定; 饥饿对鲤肠道和肝胰脏蛋白酶有显著影响($P < 0.05$), 随着饥饿时间的延长, 前、中、后肠及肝胰脏内蛋白酶活性呈现先升高后下降的趋势; 前肠淀粉酶活性变化显著($P < 0.05$), 呈现下降趋势, 其余淀粉酶变化均不显著。

关键词:鲤; 饥饿胁迫; 蛋白酶; 淀粉酶

中图分类号: Q55 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2009)06-0094-04

鲤(*Cyprinus carpio*)是我国最主要的淡水养殖品种之一, 属于底栖杂食性鱼类, 具有品种最多、分布最广、养殖历史最悠久、产量高等特点, 在鲤科鱼类中具有一定的代表性。近几年, 鱼类消化酶活性影响因素的研究在鱼类的食性、生长阶段以及生活环境的温度、pH、盐度和昼夜变化等方面较多(吴婷婷和朱晓鸣, 1994; 王重刚等, 1999; 王琨和叶继丹, 2007; 王立波等, 2007; 董孝国, 2008; 田相利等, 2008; Kuz'mina, 1996), 鱼类具有补偿生长(compensatory growth)也可能影响鱼体内的消化酶的活性, 而饥饿胁迫也是影响鱼体消化酶的因素之一(吴立新和董双林, 2000)。对黑鲷、翘嘴红鲌、千年笛鲷、虎鲨、麦瑞加拉鲛鱼幼鱼、大口黑鲈的研究表明, 短时间的饥饿能增加鱼体消化酶活性(郑曙明等, 2003; 王志铮等, 2006; 区又君和刘泽伟, 2007; 关胜军等, 2007; 龙章强等, 2008; 樊启学等, 2008), 长时间的饥饿胁迫不同程度地降低其消化酶活性(高露姣等, 2004), 但饥饿胁迫鲤消化酶活性影响在国内外的研究报道很少。鉴于此, 本文研究了饥饿对鲤肝胰脏和肠道消化酶活性的影响, 旨在探讨其饥饿状态下消化酶活性的变化规律, 为鱼类生理学研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验鱼

试验鲤(*Cyprinus carpio*)购自江苏省盐城市射

阳某人工养殖的池塘, 平均体重(316.39 ± 15.73) g。选择体质健壮的鲤 200 尾, 用 5% 的食盐水消毒后备用。

1.2 试验饲料

驯化期间饲喂由盐城市殷氏饲料有限公司提供粗蛋白含量为 32% 的鲤配合饲料, 饲养过程中严格遵循“四定”、“三看”及“八成饱”的原则。

1.3 试验设计与管理

鲤驯化饲养 20 d, 饥饿 24 h, 挑选大小均匀、体质健壮的 120 尾鲤随机分为 4 组(饥饿 0、10、20、30 d 组), 每组设置 3 个重复, 每个重复 10 尾鱼, 放养于规格为 100 cm × 80 cm × 60 cm 水族箱, 采用流水循环养殖, 试验期间保持流水, 各试验池的水体每天交换量为 30%, 正式饥饿试验时间 30 d(2007 年 5 月 1~30 日)。室温 18~23 ℃, 水温 18~22 ℃, pH 6.5~7.8, 溶解氧 5~7 mg/L。4 组分别于饥饿 0、10、20、30 d, 随机从每个水族箱抽取 2 尾鲤, 用纱布擦干鱼体表水分, 量体长、称体重, 放置于 -20 ℃ 冰箱冷冻保藏, 为测定含肉率及肠道、肝胰脏内原酶活性备用。

1.4 体重及含肉率测定

1.3.1 取样方法 分别在鲤饥饿 0、10、20、30 d 后, 随机取 6 尾。称重、量体长, 取出鱼的肌肉、肝脏及肠道进行称重或测量长度, 放入 -20 ℃ 的冰箱中保存待测。

1.3.2 含肉率测定 用纱布擦干鱼体表水分, 依次测量体长、体重。解剖后去除内脏称出空壳重, 分离鳃、皮肤、鳍和骨骼等非肉质部分, 分别称重。骨骼在称重前要进行处理, 将全部骨骼放在热水中烫 2~3 min 后, 除去附着物, 清洗风干, 称重。含肉率

收稿日期: 2009-05-02

基金项目: 2007 年江苏省高等学校大学生实践创新训练计划(编号: 561)。

作者简介: 王爱民, 1975 年生, 男, 湖南武冈人, 讲师, 主要从事水产动物营养与饲料的教研工作。E-mail: blueseam@ycit.cn

的计算公式(董宏伟等,2007)如下:

含肉率 = (空壳重 - 皮重 - 骨骼重) / 体重 × 100%

1.5 酶活性测定

1.5.1 酶液制备 取活鱼样品解剖,取出肝胰脏和肠道,肠道以长度等分为3段,分别为前肠、中肠及后肠,用4℃去离子水冲洗擦干净,称重后剪碎,根据重量加10倍的4℃缓冲液,在高速组织匀浆机中冰浴匀浆,匀浆液经离心(4 500 r/min)10 min,取上层清液保存在4℃冰箱中,用于测定蛋白酶和淀粉酶活性,每批样品均在24 h内测试完毕。整个酶液制备过程均处于4℃低温。

1.5.2 蛋白酶活性的测定 将2%的酪蛋白溶液放入30℃恒温水浴锅中预热3~5 min,每个样品取2个重复(每个酶液样品设一个空白对照),各取1 mL酶液注入试管中,在30℃恒温水浴锅中预热1~2 min,加入2%的酪蛋白1 mL,准确反应10 min,加2 mL 0.4 mol/L 三氯乙酸终止反应,在水浴锅中静置10 min后离心,取上清液1 mL,加5 mL 0.4 mol/L 碳酸钠溶液和福林试剂1 mL摇匀,在30℃恒温水浴中显色20 min,取出放入720分光光度计,680 nm的波长下测定吸光度值(OD)。利用下列公式计算酶活性:

$$\text{蛋的酶活性} [\text{U/g}] = \frac{7\text{mL}}{10\text{min}} \times \frac{K \times \text{OD}(\text{g/mL})}{N \times m(\text{g})}$$

式中:7 mL是反应总体积;10 min是反应时间;K值是酪氨酸浓度标准曲线常数;N为酶液稀释倍数;m为样品质量。

蛋白酶活性单位定义:在pH 7.2、30℃条件下水浴10 min,蛋白质水解每1 min产生1 μg分子酪氨酸所需的酶量为1个蛋白酶的活力单位。

1.5.3 淀粉酶活性的测定 淀粉酶活性的测定使用南京建成生物的试剂盒,取底物缓冲液1 mL于30℃预热5 min,加入20 μL酶液混匀,准确反应7.5 min,再加入碘应用液1 mL终止反应并显色,随后加入6.0 mL去离子水(空白管加6.02 mL),放在720分光光度计,650 nm下测定吸光度,用蒸馏水调零。计算公式为:

$$\text{淀粉酶} [\text{U/g}] = \frac{4}{m(\text{g})} \times \frac{0.4 \times 1 \times (\text{OD}_{\text{空白}} - \text{OD}_{\text{测定}})}{1 \times 7.5\text{min} \times 0.2 \times \text{OD}_{\text{空白}}}$$

式中:OD_{空白}指空白测得的吸光度;OD_{测定}是指样品及平行所测得的吸光度;7.5为反应时间(min);其中4/m是指酶液的稀释倍数即匀浆时取蒸馏水和样品重量的比值。

淀粉酶活性单位定义:pH 7.2、30℃条件下水浴30 min,淀粉水解每1 min产生1 μg分子葡萄糖所需的酶量为1个淀粉酶的活力单位。

1.6 数据统计与分析

原始数据经Excel 2007初步整理后,采用SAS 6.12中单因子方差分析(One-way ANOVA)进行HSD法多重比较。试验数据以平均值±标准误表示,差异显著水平为P<0.05。

2 结果与讨论

2.1 饥饿胁迫对鲤体重变化及含肉率的影响

饥饿对鲤体重、含肉率变化见表1。随着饥饿时间的延长,体重呈现下降趋势并趋向稳定。与第0天相比,饥饿10、20、30d后,鱼体重没有显著变化(P>0.05),分别为0d的97.94%、95.03%、87.97%。鱼体含肉率随着饥饿时间的延长也呈现下降趋势,各个饥饿时间点之间差异不显著(P>0.05)。研究表明,饥饿30 d内,随着饥饿时间的延长,体重呈现下降趋势并趋向稳定,说明在饥饿期间,鲤动用体内储能物质来弥补无食物的恶劣环境,进行有限的调节;当鲤适应了这种恶劣环境后,能量消耗减少又趋向稳定。

表1 饥饿胁迫对鲤体重及含肉率的影响

Tab.1 Effect of starvation on the weight gain and Muscle Contents of *Cyprinus carpio*

饥饿时间/d	体重/g	含肉率/%
0	316.39 ± 15.73 ^a	47.14 ± 2.77 ^a
10	309.87 ± 13.52 ^a	43.77 ± 4.86 ^a
20	300.69 ± 16.23 ^a	44.15 ± 1.18 ^a
30	278.34 ± 14.32 ^a	38.89 ± 11.15 ^a

注:表中所标字母相同者表示差异不显著(P>0.05),不相同者差异显著(P<0.05)。

Notes: Mean with same small letters within columns were not significantly different(P>0.05), mean with the different small letters within columns was significantly different(P<0.05).

2.2 饥饿胁迫对鲤肠道、肝胰脏蛋白酶活性的影响

由表2可知,随着饥饿时间的延长,前、中、后肠及肝胰脏内蛋白酶活性呈现先升高、后下降的趋势且差异显著(P<0.05),中间略有波动,其规律与关胜军等(2007)对大口黑鲈的研究相类似,大口黑鲈在饥饿期间,胃蛋白酶活力在第3~10天呈上升趋势,从第10天开始下降;原因可能是因饥饿前期缺少食物,短暂的饥饿刺激鱼为适应新的情况促进蛋白酶分泌,从而导致其活性上升,尔后活力又下降;鲤饥饿20~30 d,肠道和肝胰脏中的蛋白酶活性下降幅度较大,均差异显著(P<0.05),随着饥饿时间的延长,鲤肠道和肝胰脏蛋白酶活性逐渐降低至平

衡,这与在鲈、千年笛鲷、大口黑鲈的研究结果相似的(钱云霞,2002;区又君和刘泽伟,2007;关胜军等,2007)。可能的原因有2个方面:一是鲤在饥饿状态下,整个消化道没有受到食物蠕动的机械刺激,导致消化酶的分泌量显著下降(谢小军等,1998);二是食物可以通过鱼类嗅觉、视觉等感觉器官影响中枢神经系统对消化腺的分泌调控(Bisliak & Bengtson,

1995),当长时间没有食物刺激作用时,消化腺分泌的消化酶减少。在饥饿10 d后,前肠蛋白酶活性出现1个上升的值,中肠和后肠在饥饿20 d后蛋白酶活性明显反弹,比饥饿前的活性还要高,原因可能是机体条件性反射提高了机体消化酶活性,增强了营养物质的吸收,从而弥补无食物带来的饥饿状态。具体原因尚需进一步研究。

表2 饥饿胁迫对鲤鱼肠道、肝胰脏蛋白酶活性的影响

Tab.2 Effect of starvation on the the activity of protease in intestine and hepatopancreas of *Cyprinus carpio*

饥饿时间/d	前肠/ $U \cdot g^{-1}$	中肠/ $U \cdot g^{-1}$	后肠/ $U \cdot g^{-1}$	肝胰脏/ $U \cdot g^{-1}$
0	270.23 $\pm$ 34.28 ^b	286.34 $\pm$ 43.42 ^b	327.23 $\pm$ 54.16 ^a	274.62 $\pm$ 49.39 ^{ab}
10	372.19 $\pm$ 77.83 ^a	329.95 $\pm$ 66.96 ^b	329.32 $\pm$ 71.90 ^a	391.74 $\pm$ 96.79 ^a
20	271.19 $\pm$ 26.18 ^b	423.83 $\pm$ 55.12 ^a	421.45 $\pm$ 74.79 ^a	231.84 $\pm$ 53.81 ^b
30	142.43 $\pm$ 35.21 ^c	200.18 $\pm$ 52.44 ^c	170.38 $\pm$ 50.55 ^b	103.68 $\pm$ 41.60 ^c

注:表中所标字母相同者表示差异不显著($P > 0.05$),不相同者差异显著($P < 0.05$)。

Notes: Mean with same small letters within columns were not significantly different($P > 0.05$), mean with the different small letters within columns was significantly different($P < 0.05$).

表3 鲤不同饥饿时间的肠道、肝胰脏内淀粉酶活性

Tab.3 Effect of starvation different time for the activity of amylase in intestine and hepatopancreas of *Cyprinus carpio*

饥饿时间/d	前肠/ $U \cdot g^{-1}$	中肠/ $U \cdot g^{-1}$	后肠/ $U \cdot g^{-1}$	肝胰脏/ $U \cdot g^{-1}$
0	37.93 $\pm$ 5.72 ^a	33.18 $\pm$ 3.70 ^a	32.02 $\pm$ 2.22 ^a	27.97 $\pm$ 6.37 ^{ac}
10	34.16 $\pm$ 1.14 ^{ab}	34.92 $\pm$ 2.82 ^a	32.53 $\pm$ 2.85 ^a	33.57 $\pm$ 1.87 ^a
20	31.61 $\pm$ 1.73 ^{bc}	37.06 $\pm$ 7.73 ^a	35.21 $\pm$ 4.56 ^a	29.90 $\pm$ 3.83 ^{ac}
30	27.79 $\pm$ 4.36 ^c	33.70 $\pm$ 6.58 ^a	33.71 $\pm$ 6.58 ^a	26.63 $\pm$ 4.46 ^{bc}

注:表中所标字母相同者表示差异不显著($P > 0.05$),不相同者差异显著($P < 0.05$)。

Notes: Mean with same small letters within columns were not significantly different($P > 0.05$), mean with the different small letters within columns was significantly different($P < 0.05$).

2.3 饥饿胁迫对鲤肠道、肝胰脏淀粉酶活性的影响

由表3可知,随着饥饿时间的延长,前肠淀粉酶活性变化显著($P < 0.05$),总体呈现下降趋势,其余均不显著。饥饿或食物不足时,动物体消耗自身贮存的能量以维持生命活动。

一般认为,鱼类饥饿状态下主要消耗脂肪和糖元,对蛋白质的利用较少而且一般是在脂肪被大量消耗以后,张波等(2000)在实验中发现真鲷幼鱼饥饿过程中主要是消耗蛋白质作为身体的能量来源;宋昭彬和何学福(2000)在对南方鲇仔稚鱼消化系统的形态和组织学的研究中发现,饥饿易于在肠上体现,然后是肝、胰和骨骼肌等,而肠和肝胰脏最先受到影响,主要因为它们与贮存能量物质有关;王燕妮等(2001)研究鲤补偿生长对淀粉酶的影响发现在饥饿过程中淀粉酶活性提高;王志铮等(2006)研究表明,麦瑞加拉鳗鱼幼鱼各消化酶活力在各饥饿阶段的相对损失量均呈现为淀粉酶远高于蛋白酶。本试验结果表明,鲤除了前肠的淀粉酶活性显著下降外,中、后肠和肝胰脏中淀粉酶活性几乎没有变

化,这一结果与与王志铮等(2006)的研究结果部分相同,与王燕妮等(2001)的研究结果不一致,原因可能与饥饿胁迫提高或降低淀粉酶活性与鱼的种类、食性、年龄、饥饿时间及测定方法不同有关(周兴华等,2003;黎军胜等,2004)。饥饿胁迫引起鱼类体内消化酶活性的变化,除了因为缺乏食物和减少能量消耗的应激反应之外,是否与鱼类本身的能量分配机制及体内的生物储能分子的利用比例和顺序有关,有待进一步研究。

参考文献:

- 董宏伟,韩志忠,康志平,等. 2007. 匙吻鲟含肉率及肌肉营养成分分析[J]. 淡水渔业, 37(4): 49-52.
- 董孝国. 2008. 不同 pH 和温度对泥鳅消化道淀粉酶活性的影响[J]. 商丘师范学院学报, 24(12): 102-105.
- 樊启学,程鹏,刘文奎. 2008. 饥饿和再投喂对翘嘴鲌幼鱼消化酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 15(3): 439-445.
- 高露姣,陈立侨,赵晓勤,等. 2004. 施氏鲟幼鱼的饥饿和补偿生长研究——对消化器官结构和酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 11(5): 413-418.
- 关胜军,吴锐全,谢骏,等. 2007. 饥饿对大口黑鲈消化器官、蛋

- 白酶和淀粉酶活力的影响[J]. 南方水产, 3(2): 25-29.
- 黎军胜, 李建林, 吴婷婷. 2004. 样品处理对罗非鱼和银鲫肠道消化酶活性测定的影响[J]. 水产学报, 28(6): 738-740.
- 龙章强, 彭士明, 陈立侨, 等. 2008. 饥饿与再投喂对黑鲷幼鱼体质量变化、生化组成及肝脏消化酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 15(4): 606-612.
- 钱云霞. 2002. 饥饿对养殖鲈蛋白酶活力的影响[J]. 水产科学, 21(3): 6-7.
- 区又君, 刘泽伟. 2007. 饥饿和再投喂对千年笛鲷幼鱼消化酶活性的影响[J]. 海洋学报, 29(1): 86-91.
- 宋昭彬, 何学福. 2000. 饥饿对南方鲇仔稚鱼消化系统的形态和组织学影响[J]. 水生生物学报, 24(2): 155-160.
- 田相利, 任晓伟, 董双林, 等. 2008. 温度和盐度对半滑舌鳎幼鱼消化酶活性的影响[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 38(6): 895-901.
- 王琨, 叶继丹. 2007. 不同温度、pH值对鳗鱼消化道蛋白酶和淀粉酶活性的影响[J]. 安徽农业科学, 35(33): 10 727-10 729.
- 王立波, 刘伟, 潘伟志, 等. 2007. 温度、pH对怀头鲇幼鱼胃和肠道蛋白酶、淀粉酶活力的影响[J]. 大连水产学院学报, 22(4): 311-314.
- 王燕妮, 张志蓉, 郑曙明. 2001. 鲤的补偿生长及饥饿对淀粉酶的影响[J]. 水利渔业, 21(5): 6-7.
- 王志铮, 施建军, 吕敢堂, 等. 2006. 受短期饥饿胁迫下麦瑞加拉鲢鱼(*Cirrhina mrigola*)幼鱼的生长、肌体组分及其内脏消化酶活力的变化特征[J]. 海洋与湖沼, 37(3): 218-224.
- 王重刚, 陈品健, 郑森林. 1999. 真鲷幼鱼消化酶活性的昼夜变化[J]. 水产学报, 23(2): 199-201.
- 吴立新, 董双林. 2000. 水产动物继饥饿或营养不足后的补偿生长研究进展[J]. 应用生态学报, 11(6): 943-946.
- 吴婷婷, 朱晓鸣. 1994. 鳊鱼、青鱼、草鱼、鲤、鲫、鲢消化酶活性的研究[J]. 中国水产科学, 1(2): 10-17.
- 谢小军, 邓利, 张波. 1998. 饥饿对鱼类生理生态学影响的研究进展[J]. 水生生物学报, 22(2): 181-188.
- 张波, 孙耀, 唐启升. 2000. 饥饿对真鲷生长及生化组成的影响[J]. 水产学报, 24(3): 206-210.
- 郑曙明, 王燕妮, 聂迎霞. 2003. 虎鲨饥饿后的补偿性生长及淀粉酶活性的研究[J]. 华中农业大学学报, 22(5): 483-487.
- 周兴华, 向泉, 叶元土, 等. 2003. 中华倒刺鲃、黄颡鱼和华鲮消化酶活性的比较研究[J]. 安徽农业大学学报, (1): 19-21.
- Bisliak G A, Bengtson D A. 1995. Description of the starting condition in summer flounder, *Paralichthys dentatus*, early life history stages[J]. Fish Bull, 93: 217-230.
- Kuz'mina V V. 1996. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts [J]. Aquaculture, 148(1): 25-37.

(责任编辑 万月华)

Effect of Starvation Stress on the Activity of Protease and Amylase in Intestine and Hepatopancreas of *Cyprinus carpio*

WANG Ai-min^{1,2}, FANG Yong-qing¹, WEI Xin-jian¹, LI Jing¹, XU Hang-feng¹, HAN Guang-ming²

(1. Department of Ocean Technology, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224051, China;

2. Wuxi College of Fisheries, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China)

Abstract: The aim of the present study was to determine the effect of starvation on digestive enzymes activity of the carp (*Cyprinus carpio*) at the water temperature 18~20°C in the cycle and flow water aquarium. The experiment was designed for four groups with three replication, which were 0 day (control), 10 days, 20 days, 30 days group. The results showed that there was a trend to drop first and keep stabilization for *Cyprinus carpio* body weight and Meat Content with the prolongation of starvation, and that Effect of starvation stress on the activity of protease in intestine and hepatopancreas of *Cyprinus carpio* was significant, with the prolongation of starvation, there was a trend to increase then drop for the activity of protease in fore-gut, mid-gut hind-gut and hepatopancreas of *Cyprinus carpio*. And that the variation for activity of amylase in fore-gut was significant but that of the others was no significant.

Key words: *Cyprinus Carpio*; Starvation Stress; Protease; Amylase