

doi: 10.7541/2021.2021.088

低鱼粉饲料中添加苏氨酸对三倍体虹鳟抗氧化能力、 消化生理及肠道炎症因子基因表达的影响

王亚玲^{1,2} 王常安^{1*} 刘红柏^{1*} 韩世成¹ 陆绍霞¹ 张颖¹

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 研究低鱼粉饲料中不同水平苏氨酸对三倍体虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)生长、抗氧化能力、消化生理及肠道炎症因子基因表达的影响, 以初始体质量(18.42±0.20) g的三倍体虹鳟为研究对象, 在室内200 L流水水族箱中进行摄食生长试验56d。在基础饲料中添加L-苏氨酸, 配制苏氨酸水平分别为0.45%(对照)、0.76%、1.09%、1.29%和1.64%的5种等氮等能饲料。将450尾三倍体虹鳟随机分为5组, 每组处理3个重复, 每个重复30尾鱼。结果表明, 当添加量为1.09%、1.29%和1.64%时, 血清超氧化物歧化酶(SOD)活力显著提高, 同时显著降低了丙二醛(MDA)的含量($P<0.05$), 过氧化氢酶(CAT)在1.29%组含量最高, 相比对照组差异显著($P<0.05$)。在饲料中添加苏氨酸(0.76%—1.64%)时, 肠道脂肪酶(LPS)和胰蛋白酶的消化酶活性显著高于对照组($P<0.05$), 但随着饲料苏氨酸水平达到1.64%时, 消化酶活性有所降低。1.09%和1.65%组的肠道组织形态最佳, 绒毛发达, 排列整齐, 无融合和脱落现象。苏氨酸水平对肠道炎症因子IL-2、IL-8、IL-10、IgM、TNF- α 和PepT1都有显著影响($P<0.05$), 随着苏氨酸水平的增加, IL-2、IgM和PepT1呈现先升高后降低的变化趋势, 在1.29%和1.09%组的表达量达到最高; IL-8呈逐渐升高趋势; 而IL-10和TNF- α 呈下降的变化趋势。研究结果表明, 在低鱼粉饲料(15%)中添加适量水平的苏氨酸, 对提高三倍体虹鳟幼鱼生长、消化酶活性、促进肠道形态结构发育和增强免疫具有积极的作用。

关键词: 低鱼粉饲料; 苏氨酸; 免疫; 肠道组织结构; 消化酶活性; 炎症因子; 三倍体虹鳟

中图分类号: S965.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2022)04-0312-10

在水产养殖业中, 因鱼粉价格上涨, 饲料生产商开始用其他来源的蛋白质替代鱼粉蛋白, 主要为植物蛋白^[1]。但是, 植物蛋白的氨基酸组成不同于鱼粉蛋白。往往出现必需氨基酸缺乏或含量很低, 引起饲料氨基酸不平衡, 导致水生动物不能高效利用饲料蛋白质或氨基酸, 影响机体的相关代谢^[2, 3]。苏氨酸是哺乳动物和鱼类机体不能合成的必需氨基酸, 也是许多饲料原料的第二或第三限制性氨基酸。

鱼类易受氧化损伤, 因为机体组织中不饱和脂肪酸含量高, 易受氧自由基的攻击^[4]。超氧化物歧

化酶作为主要的抗氧化酶, 被认为是生物抗氧化的重要指标。丙二醛作为常用的膜脂过氧化指标, 通过过氧化程度来间接反映机体细胞的受损情况^[5]。已有研究表明, 在饲料中添加苏氨酸可以显著的降低丙二醛的含量和提高超氧化物歧化酶的活性^[6]。肠道是水产动物重要的营养和免疫器官, 但容易受到抗原、微生物和食物有毒元素等外来物的攻击^[7]。苏氨酸及代谢产物可以提高肠道消化酶活性, 促进肠道形态结构的发育, 进而提高鱼类的生长速度^[8]。目前, 苏氨酸促进鱼类消化酶活性的研究较多, 在一些鱼类中已经证实, 但是关于苏氨酸对鱼类肠道

收稿日期: 2021-04-29; 修订日期: 2022-01-16

基金项目: 中央级科研院所基本科研业务费(HSY202202M); 国家现代农业产业技术体系专项资金(CARS-46); 黑龙江省自然科学基金优秀青年项目(YQ2019C036)资助 [Supported by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, HRFRI (HSY202202M); China Agricultural Research System (CARS-46); the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (YQ2019C036)]

作者简介: 王亚玲(1995—), 女, 硕士研究生; 研究方向为水产动物营养与饲料学。E-mail: 1328302404@qq.com

通信作者: 王常安, 副研究员, 硕士生导师; E-mail: gordoncase@126.com 刘红柏, 研究员, 硕士生导师; E-mail: liuhongbai@sina.com

*共同通信作者

免疫的研究较少,有报道称,最佳的苏氨酸水平可以调节促炎和抗炎细胞因子^[9]。对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的研究发现,苏氨酸缺乏组下调了促炎细胞因子 $IL-8$ 和 $TNF-\alpha$ 的基因表达水平,表明苏氨酸缺乏加重了炎症反应;对团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)的研究也有相似的发现,最佳的苏氨酸水平下调了肠道促炎细胞因子 $IL-10$ 的基因表达^[10,11]。然而,关于这方面的研究还缺乏系统性,需要系统地研究苏氨酸与肠道免疫功能的关系,深入探讨苏氨酸在水产动物体内的分子机制。

虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)属鲑形目、鲑科、大麻哈鱼属,因其肉质鲜美、无肌间刺等优点深受欢迎,是我国乃至世界养殖的主要冷水性鱼类,与二倍体相比,三倍体虹鳟具有生长速度快,饲料系数低,含肉率高等优点^[12,13]。快速发展的水产养殖业因养殖环境变化、饲料品质不佳等因素,也面临着巨大的挑战,感染细菌、病毒引发的疾病和饲料中植物蛋白的使用^[14,15]。然而关于低鱼粉饲料中添加苏氨酸对三倍体虹鳟肠道蛋白合成、炎症相关基因的报道较少。在本研究中,以三倍体虹鳟为研究对象,在低鱼粉饲料中添加苏氨酸研究虹鳟血清抗氧化能力和肠道消化生理与炎症因子基因的表达能力,从消化酶活性和肠道炎症因子的表达来探讨苏氨酸促进虹鳟生长和消化的原因^[16-19],旨在为优化三倍体虹鳟人工配合饲料提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

如表1所示,以半纯化饲料为基础饲料,蛋白源为鱼粉、豆粕和明胶,糖源为糊精,脂肪源为鱼油、豆油和磷脂,配制成粗蛋白水平为41.5%,粗脂肪水平为18.7%的基础饲料。如表2所示,测量基础饲料中的氨基酸含量,除了苏氨酸以外其他各种氨基酸含量达到虹鳟鱼体中的含量^[20],在饲料中分别添加不同水平的苏氨酸使5组试验中苏氨酸水平含量达到0.45%、0.76%、1.09%、1.29%和1.64%,其中苏氨酸的增减用等量的甘氨酸代替。所有原料粉碎后经过80目筛后用鼓型混合机混合在一起,按照配比逐级混合均匀后经小型制粒机HKJ-218(无锡同力粮机有限公司)加工成颗粒饲料制成制粒(直径为3 mm),风干后将其密封在真空包装袋中,置于-20℃冰箱中保存备用。

1.2 试验鱼和饲养试验

三倍体虹鳟从中国水产科学研究院黑龙江水产研究所渤海冷水鱼试验站购买,开始试验前,挑选规格一致的健康三倍体虹鳟放入室内循环流水

系统,投喂2周基础饲料,以适应试验设施和条件,2周后开展养殖试验。

在驯化期结束后,先饥饿24h,挑选平均质量为 (18.42 ± 0.02) g的三倍体虹鳟随机分配到200 L的循

表1 基础饲料配方及营养水平

Tab. 1 Ingredients and approximate composition of the experimental diets (air-dry basis, %)

项目Item	饲料Diet				
	G1	G2	G3	G4	G5
原料Ingredient					
糊精Dextrin	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
鱼粉Fish meal	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
豆粕Soybean meal	14.00	14.00	14.00	14.00	14.00
复合氨基酸Compound amino acids ¹⁾	13.68	13.68	13.68	13.68	13.68
大豆油Soybean oil	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
明胶Gelatin	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
鱼油Fish oil	6.82	6.82	6.82	6.82	6.82
啤酒酵母Beer yeast	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
大豆磷脂Soybean phospholipid	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
磷酸二氢钙 $Ca(H_2PO_4)_2$	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
维生素预混剂Vitamin premix ²⁾	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
矿物质预混剂 ³⁾ Mineral premix ³⁾	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
微晶纤维素Microcrystalline vitamin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
苏氨酸Threonine	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00
甘氨酸Glycine	1.00	0.75	0.50	0.25	0.00
合计Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平Nutrient levels ⁴⁾					
总能Gross energy (MJ/kg)	5.07	5.07	5.07	5.07	5.07
粗蛋白质Crude protein	41.54	41.54	41.54	41.54	41.54
粗脂肪Crude lipid	18.68	18.68	18.68	18.68	18.68

注: 1)复合氨基酸的组成Composition of compound amino acids: 精氨酸arginine 0.62%; 赖氨酸lysine 2.13%; 苯丙氨酸phenylalanine 0.90%; 组氨酸histidine 0.46%; 缬氨酸valine 1.72%; 亮氨酸leucine 2.01%; 异亮氨酸isoleucine 1.46%; 半胱氨酸cysteine 0.15%; 蛋氨酸methionine 0.66%; 脯氨酸proline 0.86%; 天冬氨酸aspartic acid 1.78%; 酪氨酸tyrosine 0.82%; 丙氨酸alanine 1.42%; 谷氨酸glutamic acid 3.63%; 甘氨酸glycine 0.72%; 2)维生素预混剂为每千克饲料提供The vitamin premix provided the following per kg of diets: VC 100 mg, VE 60 mg, VK₃ 5 mg, VA 15000 IU, VD₃ 3000 IU, VB₁ 15 mg, VB₂ 30 mg, VB₆ 15 mg, VB₁₂ 0.5 mg, 烟酸nicotinic acid 175 mg, 叶酸folic acid 5 mg, 肌醇inositol 1000 mg, 生物素biotin 2.5 mg, 泛酸钙calcium pantothenate 50 mg; 3)矿物质预混剂为每千克饲料提供The mineral premix provided the following per kg of diets: MgSO₄·7H₂O 2000 mg, KCl 1500 mg, FeSO₄·7H₂O 1000 mg, CuSO₄·5H₂O 20 mg, MnSO₄·4H₂O 100 mg, ZnSO₄·7H₂O 150 mg, KI 3 mg, NaCl 500 mg, CoCl₂ 5 mg, Na₂SeO₃ 3 mg; 4)营养水平为计算值Nutrient levels were calculated values

表 2 基础饲料氨基酸组成

Tab. 2 Amino acids composition of the basal diets(air-dry basis, %)

氨基酸 Amino acid	G1	G2	G3	G4	G5
天门冬氨酸 Asp	4.42	4.42	4.43	3.92	4.2
苏氨酸 Thr	0.45	0.76	1.09	1.29	1.64
丝氨酸 Ser	2.56	2.51	2.47	2.45	2.4
谷氨酸 Glu	5.65	5.60	5.56	5.54	5.49
甘氨酸 Gly	3.47	3.42	3.38	3.36	3.31
丙氨酸 Ala	2.65	2.60	2.66	2.74	2.69
半胱氨酸 Cys	0.84	0.79	0.75	0.73	0.78
缬氨酸 Val	2.01	2.00	2.06	2.02	2.14
蛋氨酸 Met	0.83	0.80	0.86	0.86	0.97
异亮氨酸 Ile	1.46	1.49	1.6	1.58	1.62
亮氨酸 Leu	3.77	3.76	3.87	3.76	3.86
酪氨酸 Tyr	1.73	1.68	1.64	1.62	1.57
苯丙氨酸 Phe	1.85	1.91	2.05	2.04	2.06
赖氨酸 Lys	2.57	2.44	2.38	2.28	2.49
组氨酸 His	1.06	1.08	1.2	1.18	1.22
精氨酸 Arg	2.02	1.97	2	1.94	2.06
脯氨酸 Pro	1.77	1.79	1.83	1.81	1.91
必需氨基酸含量 EAA	16.02	16.21	17.11	16.95	18.06
氨基酸总量 TAA	23.09	22.81	22.72	22.17	22.35

环流水族箱中, 试验分5个处理组(G1—G5), 每个处理3个重复, 每个重复30尾, 分别投喂G1、G2、G3、G4和G5的试验饲料。每天投喂2次(09: 00和16: 00), 达饱食, 养殖周期56d。试验用水为曝气控温后的自来水, 水温(15±1)℃, 溶氧> 6.0 mg/L, 氨氮含量< 0.2 mg/L, pH 7.0—7.2, 试验期间保持光照充足, 每天记录投喂量, 如有死鱼称重并记录数量。在试验结束后, 为减少对鱼的处理压力, 禁食24h, 称每缸鱼的总重, 并分别称每尾鱼的体重和测体长。

1.3 样品采集

养殖试验结束后, 虹鳟饥饿24h, 分别从每个水族箱随机抽取3尾虹鳟, 每个饲料组9尾, 用100 mg/L Ms-222(间氨基苯甲酸乙酯甲硫酸盐)麻醉, 测体长, 称量体重, 放置冰盘上, 尾静脉采血, 在常温下静置4h, 用冷冻离心机3000 r/min离心15min, 取上清液, 装入1.5 mL离心管中, 用于检测血清抗氧化指标。每个处理组取3尾鱼, 编好号后放置-80℃超低冰箱中保存备用, 用于体成分分析。

每个鱼缸随机取7尾鱼, 用100 mg/L Ms-222(间氨基苯甲酸乙酯甲硫酸盐)麻醉, 在解剖之前, 用75%的酒精对鱼体进行消毒, 放置冰盘上迅速取出肠道, 先取2尾鱼剔除肠道内多余的脂肪和内含物, 迅速装入速冻管放入液氮中储存, 随后在-80℃冰箱中保存备用, 用于RNA的提取及分子的检测。之

后取2尾鱼, 取出肠道, 剔除肠道内多余的脂肪和内含物, 用预冷生理盐水清洗肠道内容物, 滤纸吸干水分, 用于消化酶的检测。最后每个处理组取3尾鱼, 解剖后取中肠(幽门盲囊和后肠中间部分), 剔除内容物, 放置用磷酸盐缓冲的4%的福尔马林缓冲溶液中用于肠道组织学观察。

生长性能的测定 生长性能指标计算公式如下:

成活率 (Survival rate, *SR*, %)=100%×终末试验鱼数量/初始试验鱼数量;

摄食率 (Feed intake, *FI*, %/d)=100%×摄食饲料干重×2/[(终末体重+初始体重)×试验天数];

饲料效率 (Feed efficiency, *FE*, %)=100%×(终末体重-初始体重)/摄食量;

蛋白质沉积率 (Protein productive value, *PPV*, %)=100%×(鱼体蛋白增量/摄入蛋白)。

血清抗氧化酶活性的测定 取待测离心好的血清样品放置在4℃解冻后备用。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, *SOD*, 货号: A001-3-2)、过氧化氢酶(Catalase assay kit, *CAT*, 货号: A007-2-1)的活性及丙二醛(Malondialdehyde, *MDA*, 货号: A003-1-2)的含量严格按照南京建成生物工程有限公司试剂盒提供的说明书测定。

肠道消化酶活性的测定 取待测的肠道样品在4℃解冻后称重, 加入0.86%的预冷生理盐水, 加入的生理盐水是质量体积比的1:9, 采用FJ-200高速分散组织匀浆机, 匀浆液4000 r/min离心10min, 取上清液备用。脂肪酶(Lipase assay kit, *LPS*, 货号: A054-2-1)、淀粉酶(Amylase Assay Kit, *AMS*, 货号: C016-1-1)和胰蛋白酶(货号: A080-2-2)含量采用南京建成生物工程有限公司试剂盒测定。胰蛋白酶采用紫外比色法测定, 淀粉酶活性采用淀粉-碘比色法测定, 脂肪酶采用比色法测定, 组织蛋白的含量采用考马斯亮蓝法测定。酶活性单位用每克组织蛋白质的酶活性单位(U/g prot)表示。

组织切片观察 肠道组织切片: 每重复随机取3尾鱼的中肠固定于Bouin's液中。按常规组织切片制备程序, 进行水流冲洗、梯度乙醇脱水, 二甲苯中透明及石蜡包埋。然后采用KD 1508切片机横向切片, 厚度为6 μm, 展片后采用HE染色, 中性树胶封片, 具体方法参考林佳洁的报道^[21]。用显微镜(LeicaMD 4000B)观察后拍片, 每组肠道切片观察10个以上。

RNA提取和荧光定量PCR 总RNA的提取: 取出采集的肠道组织样品, 加入适量的液氮, 在-80℃遇冷过的研钵中研磨至粉末状, 倒入遇冷过

的EP管中, -80℃保存备用。按照TRIzol试剂盒中说明书的方法提取肠道组织中的总RNA。

RNA浓度的检测: 采用超微量紫外可见分光光度计(Thermo Scientific™ NanoDrop 8000)检测总RNA浓度及纯度。

反转录及实时荧光定量PCR: 按照TaKaRa RR047A试剂盒说明书将检测合格的RNA进行反转录为cDNA第一条链。采用Applied Biosystems公司7500实时荧光定量PCR操作系统, 检测三倍体虹鳟肠道待测基因的表达水平。荧光定量结果 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法处理数据^[22]。

引物的设计与合成: 利用NCBI网址及Primier 5.0软件设计引物(表3), 以 β -actin为内参基因, 通过这些基因的扩增显示不同组之间的表达差异。

1.4 统计分析

采用统计软件SPSS for Windows 23.0, 将数据进行单因素方差分析和Duncan's多重比较, 数据用平均值±标准差(mean±SD)表示, $P<0.05$ 表示组内数据差异性显著。

2 结果

2.1 饲料中添加苏氨酸对三倍体虹鳟生长性能的影响

如表4所示, 各组间的成活率差异不显著($P>0.05$), 而终末体质量和饲料效率相比对照组显著增高($P<0.05$), 饲料效率在G3组最高; 与对照组相比, 摄食率和蛋白质沉积率随着苏氨酸水平的增加, 显著降低($P<0.05$), G4组摄食率最低, G3组的蛋白质

表3 荧光定量引物序列

Tab. 3 Primer sequences of Real-time PCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequences (5'—3')	引物效率 Primer efficiency (%)
β -actin	GGACTTTGAGCAGGAGATGG	99.65
	ATGATGGAGTTGTAGGTGGTCT	
IL-2	GAAACCCAATTCCCAGACTC	98
	TCCGTTGTGCTGTTCTCCT	
IL-8	GAATGTCAGCCAGCCTTGTC	92
	TCCAGACAAATCTCCTGACCG	
IL-10	CGACTTTAAATCTCCCATCGAC	96
	GCATTGGACGATCTCTTCTTC	
IgM	CAAACCGGTGGAAGCTACAT	94
	AGACGGCTGCTGCAGATATT	
TNF- α	GGGGACAAACTGTGGACTGA	95
	GAAGTTCTTGCCCTGCTCTG	
PepT1	CCTGTGAATCAACGCTGGT	96
	CACTGCCATAATGAACACG	

沉积率最低。

2.2 饲料中添加苏氨酸对三倍体虹鳟血清抗氧化酶活性的影响

如表5所示, 随着饲料中苏氨酸水平的增加, 虹鳟血清超氧化物歧化酶(SOD)活力明显升高($P<0.05$), 与对照组(0)相比, 1.09%、1.29%组的值增加迅速。血清丙二醛(MDA)的含量随着饲料中苏氨酸水平的增加有所下降($P<0.05$), 当苏氨酸添加量为1.29%时, 丙二醛含量下降显著($P<0.05$)。过氧化氢酶(CAT)在1.29%组活性最高, 差异性显著($P<0.05$)。

2.3 饲料中添加苏氨酸对虹鳟肠道消化生理的影响

饲料中添加苏氨酸对虹鳟肠道消化酶活性的影响 如表6所示, 各组间随着饲料中苏氨酸水平含量的增加, 脂肪酶含量升高($P<0.05$), 但随着苏氨酸的含量达到1.64%时, 脂肪酶活性有所下降。淀粉酶活性也随着苏氨酸含量的增加显著升高($P<0.05$), 1.09%和1.29%组显著高于对照组, 随着

表4 饲料中添加苏氨酸对虹鳟鱼生长性能的影响

Tab. 4 Effects of dietary threonine on growth performance of *O. mykiss* in various groups ($n=3$)

项目Item	组别Group				
	G1	G2	G3	G4	G5
初始体质量 Initial body weight (g)	18.69±0.15	18.42±0.37	18.32±0.15	18.43±0.21	18.47±0.16
终末体质量 Final body weight (g)	49.51±1.06 ^a	52.89±0.93 ^b	52.82±0.32 ^b	53.99±0.60 ^b	53.40±1.12 ^b
成活率 SR (%)	0.90±0.03	0.91±0.05	0.93±0.03	0.97±0.03	0.90±0.03
摄食率 FI (%/d)	0.67±0.07 ^{ab}	0.74±0.17 ^b	0.66±0.10 ^{ab}	0.59±0.10 ^a	0.60±0.07 ^a
饲料效率 FE (%)	85.47±4.26 ^a	86.97±5.95 ^{ab}	89.29±4.56 ^c	87.72±3.64 ^{bc}	86.96±5.37 ^{ab}
蛋白质沉积率 PPV (%)	22.56±3.39 ^c	20.21±6.02 ^{bc}	16.60±3.99 ^a	17.19±3.31 ^{ab}	20.95±1.82 ^{bc}

注: 同行数据不同上标英文字母表示差异显著($P<0.05$); 相同字母或无字母表示差异不显著($P>0.05$)。下同

Note: In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$). The same applies below

表5 饲料中添加苏氨酸对虹鳟血清抗氧化酶活性的影响

Tab. 5 Effects of dietary threonine on serum antioxidant capacity in *O. mykiss* in various groups ($n=3$; $\bar{x}\pm SD$)

指标 Index	组别Group				
	G1	G2	G3	G4	G5
超氧化物歧化酶 SOD (U/mL)	88.69±3.26 ^a	98.00±4.48 ^a	113.64±14.62 ^b	116.72±4.09 ^b	101.85±10.16 ^b
过氧化氢酶 CAT (U/mL)	9.42±0.22 ^b	10.34±0.37 ^b	10.70±0.08 ^b	11.80±0.30 ^c	11.25±0.25 ^c
丙二醛 MDA (nmol/mL)	3.53±1.10 ^c	3.32±0.10 ^b	3.16±0.05 ^b	2.91±0.08 ^a	3.24±0.10 ^b

苏氨酸水平进一步的增加, 淀粉酶活性有下降的变化趋势。相比对照组, 1.09%、1.29%和1.64%组胰蛋白酶含量显著升高($P<0.05$), 1.29%组活性最高。

饲料中添加苏氨酸对三倍体虹鳟肠道组织形态的影响 如表 7 所示, 各组间随着饲料中苏氨酸水平含量的增加, 绒毛宽度和肌层厚度升高($P<0.05$), 但随着苏氨酸的含量达到1.29%时, 绒毛宽度和肌层厚度有所下降。绒毛高度也随着苏氨酸含量的增加显著降低, 在G4组达到最低值($P<0.05$)。

通过光学显微镜观察中肠形态的组织切片发现, 投喂苏氨酸缺乏组, G1和G2组(图 1A和1B)的组织结构不够完整, 组织微绒毛脱落, 形态轮廓模糊, 出现边缘缺刻; 随着苏氨酸水平的增加, G3组(图 1C)肠绒毛有少量脱落; G4和G5组(图 1D和1E)的肠道组织形态最佳, 绒毛发达, 排列整齐, 无融合和脱落现象, 杯状细胞增多, 柱状上皮细胞整齐排列。

2.4 饲料中添加苏氨酸对三倍体虹鳟肠道炎症因子和小肽转运基因表达量的变化

如图 2 所示, 随着苏氨酸水平的增加, *IgM* 基因的相对表达量呈先升高后降低的变化趋势, 在 1.29% 组达到最高值, 与对照组相比, 差异显著($P<0.05$); 而 *TNF- α* 基因的相对表达量呈现降低的变化趋势, 在 1.64% 组有最小值, 差异显著($P<0.05$)。

如图 3 所示, 在饲料中添加苏氨酸对 *IL-2*、*IL-10* 和 *IL-8* 表达量都有显著影响, 与对照组相比, 随着苏氨酸水平的增加, *IL-2* 和 *IL-8* 基因的相对表达量呈先升高后降低的变化趋势, 分别在 1.29% 和

1.64% 组达到最高值, 与对照组相比, 差异显著($P<0.05$); *IL-10* 的基因表达量逐渐降低, 与对照组

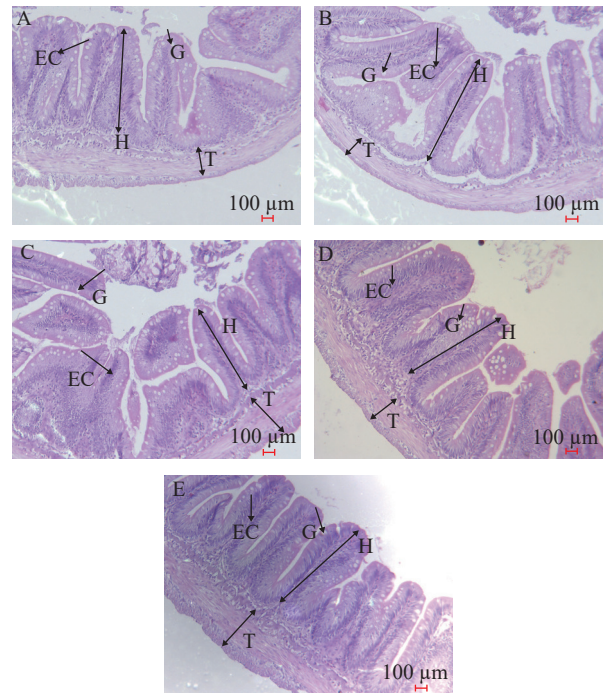


图 1 苏氨酸水平对三倍体虹鳟肠道组织形态的影响

Fig. 1 Effects of dietary threonine level on intestinal tissue morphology of triploid *O. mykiss*

A. 0.45% 的苏氨酸水平中肠组织 100 $\times$; B. 0.76% 的苏氨酸水平中肠组织 100 $\times$; C. 1.09% 的苏氨酸水平中肠组织 100 $\times$; D. 1.29% 的苏氨酸水平中肠组织 100 $\times$; E. 1.64% 的苏氨酸水平中肠组织 100 $\times$; G. 杯状细胞; EC. 上皮细胞; H. 绒毛高度; T. 肌层厚度

A. The midgut tissue of 0.45% threonine level group 100 $\times$; B. The midgut tissue of 0.76% threonine level group 100 $\times$; C. The midgut tissue of 1.09% threonine level group 100 $\times$; D. The midgut tissue of 1.29% threonine level group 100 $\times$; E. The midgut tissue of 1.64% threonine level group 100 $\times$; G. Goblet cells; EC. Epithelial cells; H. Villi height; T. Muscle layer thickness

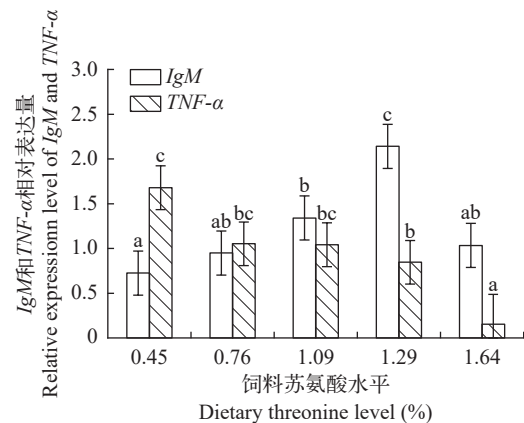


图 2 苏氨酸水平对三倍体虹鳟 *IgM* 和 *TNF- α* 基因表达量的影响

Fig. 2 Effects of dietary threonine level on *IgM* and *TNF- α* gene expression in triploid *O. mykiss*

表 6 饲料中添加苏氨酸对虹鳟肠道消化酶的影响

Tab. 6 Effects of dietary threonine on intestinal digestive enzyme in *O. mykiss* in various groups ($n=3$; $\bar{x}\pm SD$; %)

指标 Index	组别 Group				
	G1	G2	G3	G4	G5
脂肪酶 Lipase (U/g prot)	50.55 $\pm$ 0.12 ^a	50.63 $\pm$ 0.21 ^a	51.41 $\pm$ 0.32 ^b	51.51 $\pm$ 0.32 ^b	50.98 $\pm$ 0.12 ^{ab}
胰蛋白酶 Trypsin (U/mg prot)	544.95 $\pm$ 11.48 ^a	594.18 $\pm$ 12.43 ^b	632.81 $\pm$ 19.88 ^c	671.76 $\pm$ 11.50 ^c	615.28 $\pm$ 24.24 ^{bc}
淀粉酶 Amylase (U/g prot)	114.45 $\pm$ 33.28 ^a	150.09 $\pm$ 47.87 ^b	167.08 $\pm$ 18.57 ^c	156.22 $\pm$ 45.58 ^{bc}	134.51 $\pm$ 33.48 ^{ab}

表 7 饲料中添加苏氨酸对虹鳟肠道形态的影响

Tab. 7 Effects of dietary threonine on intestinal morphology in *O. mykiss* in various groups ($n=3$; $\bar{x}\pm SD$; μm)

指标 Index	组别 Group				
	G1	G2	G3	G4	G5
绒毛高度 Villus length	725.82 $\pm$ 14.51 ^c	738.76 $\pm$ 18.83 ^d	716.29 $\pm$ 15.17 ^b	706.56 $\pm$ 11.86 ^a	718.67 $\pm$ 15.43 ^{bc}
绒毛宽度 Villus width	334.71 $\pm$ 6.55 ^{ab}	332.07 $\pm$ 5.43 ^{ab}	331.29 $\pm$ 4.21 ^a	356.96 $\pm$ 3.45 ^c	348.17 $\pm$ 5.17 ^b
肌层厚度 Muscle thickness	225.90 $\pm$ 4.36 ^a	232.98 $\pm$ 4.76 ^b	249.76 $\pm$ 5.89 ^c	238.52 $\pm$ 3.32 ^{bc}	240.32 $\pm$ 4.41 ^{bc}

相比,差异显著($P<0.05$)。

如图4所示,随着苏氨酸水平的增加,*PepTI*基因的相对表达量呈先升高后降低的变化趋势,在1.29%组达到最高值,与对照组相比,差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 饲料中添加苏氨酸对鱼类血清抗氧化酶活性的影响

前期研究表明,低鱼粉饲料中添加苏氨酸组的生长性能显著高于对照组^[19]。Habte-Tsion等^[23]在团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)幼鱼饲料中添加不同水平的苏氨酸,研究发现,适宜的苏氨酸水平可以显著的改善免疫反应,增强抗氧化酶活性,超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和过氧化氢酶(CAT)的活性均随着饲料苏氨酸水平的增加而升高,当超过苏氨酸最佳含量范围1.58%—2.08%,上升趋势减缓。在本试验中,随着饲料中苏氨酸水平含量的增加,SOD活性显著升高

($P<0.05$),CAT活性呈现先升高后降低的变化趋势,当苏氨酸水平为1.29%时,CAT活性最高,随着苏氨酸含量的进一步增加,CAT活性有所下降。在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的研究中也有相似的发现,添加适量的苏氨酸,增强了肝和肠的SOD、CAT酶活性,这表明苏氨酸水平可提高鱼类抗氧化酶活性^[8]。在本试验中,苏氨酸缺乏组的MDA含量最高,最佳的苏氨酸水平显著降低了MDA含量($P<0.05$)。这表明,苏氨酸通过抑制鱼类的氧化损伤来保护机体,最佳的苏氨酸水平对虹鳟的氧化损伤具有保护作用。本试验同时测得SOD和MDA指标的变化,能更加充分地表明机体的抗氧化能力和受损程度,在饲料中添加适量的苏氨酸可以调节机体的抗氧化状态,降低脂质过氧化反应对细胞的毒害作用,降低细胞中过氧化氢的浓度,使细胞免受毒害^[24—27]。

3.2 饲料中添加苏氨酸对鱼类肠道消化生理的影响

苏氨酸参与了肠的功能和维持^[28—29],动物机体的生长状况与消化酶活性存在正比例关系^[30,31]。对草鱼的研究发现,饲料中添加苏氨酸能显著提高草鱼肠内 α -淀粉酶、脂肪酶、碱性磷酸酶、胰蛋白酶的活性^[8]。对幼建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)的研究发现,苏氨酸能显著提高幼建鲤肠道胰蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的活力,当苏氨酸含量分别达1.5%和1.62%时,肠道的胰蛋白酶和脂肪酶活力最高,苏氨酸含量与肠道脂肪酶和胰蛋白酶活力呈显著的二次相关关系^[30,32]。因此这说明饲料中添加适量的苏氨酸水平有提高肠道消化酶活性和促进营养物质消化吸收的能力,进而提高鱼体的生长发育。在本试验中,随着苏氨酸含量的增加,脂肪酶活性显著提高($P<0.05$),胰蛋白酶和淀粉酶活性随着苏氨酸含量的增加呈现先增加后降低的变化趋势。推测原因可能是,试验鱼的种类和大小、基础饲料的组成(纯化、半纯化实用饲料等)、试验设计和养殖条件等多个原因造成^[33—35]。

有报道称,在幼建鲤饲料中添加适宜水平的苏氨酸可以促进肠道的生长发育,肠道的皱襞高度、肠长、肠长指数、肠体指数及肠道蛋白含量都有增加^[36]。对鲤(*Cyprinus carpio*)肠上皮细胞进行体外培养,研究发现添加适宜水平的苏氨酸能够促进肠道上皮细胞的增殖和分化^[37]。在草鱼中也有相似的发现,生长后期草鱼的肠重、肠长、肠体指数和肠道蛋白都随着苏氨酸水平的增加显著提高,表明苏氨酸对生长后期草鱼肠道的生长发育有着至关重要的作用,但是对肠道相对长度没有显著影响,

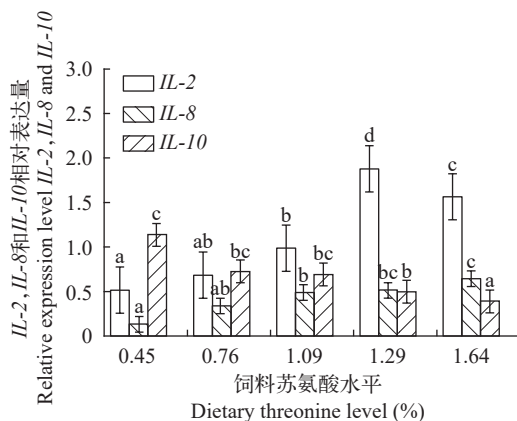


图3 苏氨酸水平对三倍体虹鳟IL-2、IL-8和IL-10基因表达量的影响

Fig. 3 Effects of dietary threonine level on IL-2、IL-8 and IL-10 gene expression in triploid *O. mykiss*

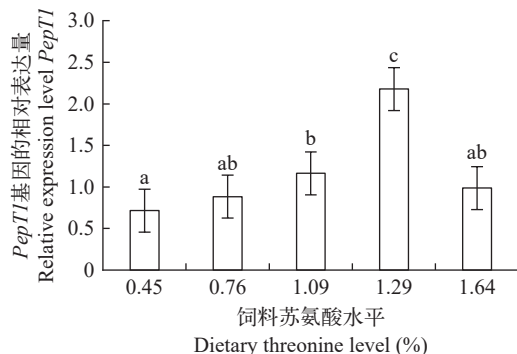


图4 苏氨酸水平对三倍体虹鳟*PepTI*基因表达量的影响

Fig. 4 Effects of dietary threonine level on *PepTI* gene expression in triploid *O. mykiss*

与草鱼的研究不一致,苏氨酸水平的变化可以提高幼建鲤肠道的相对长度,可能与鱼的品种有关^[38]。本试验研究表明,饲料中添加适宜水平的苏氨酸能提高三倍体虹鳟肠道的绒毛高度和肌层厚度,投喂苏氨酸缺乏组的肠道组织微绒毛脱落,随着苏氨酸含量的增加,肠道组织结构完整,绒毛发达。在陆生生物的研究中也有相似发现,苏氨酸缺乏造成肠道结构破坏,微绒毛脱落,黏膜固有层松弛。肠道结构受损会直接影响肠道功能的发挥,导致营养物质的消化吸收^[39-44]。可见,苏氨酸在促进营养物质的消化吸收和保护肠道形态结构方面发挥着重要的作用。

3.3 饲料中添加苏氨酸对三倍体虹鳟肠道炎症因子和小肽转运基因的表达式的影响

小肽转运载体PepT1主要位于肠道上皮细胞,它是一种完整的膜蛋白载体,主要参与肠道内小肽的跨膜转运,通过转运二肽和三肽为机体运输营养物质,促进动物发育,同时也参与炎症反应的免疫应答,在炎症细胞因子通讯中发挥作用^[45,46]。本试验结果显示,随着苏氨酸水平的增加,PepT1呈先升高后降低的变化趋势,在1.29%组为最高,与对照组相比,有显著差异。添加适宜水平的苏氨酸上调了PepT1基因的表达式,促进肠道对营养物质的吸收。

苏氨酸是免疫球蛋白生成中的主要限制性氨基酸,在机体的免疫系统组织、器官中发挥着重要的作用^[47]。苏氨酸缺乏时会抑制免疫球蛋白及T、B淋巴细胞的产生,从而影响免疫功能^[48,49]。在鱼类中,肠道免疫反应的关键组成是炎症反应,该反应主要由细胞因子介导。IL-2由IL-1 β 刺激分泌,是T细胞生长因子,通过活化T细胞和巨噬细胞的表达促进免疫反应,并有效控制免疫应答^[50]。IL-8和TNF- α 是重要的促炎细胞因子。IL-8在白细胞的趋化性和功能中具有重要作用,对恢复感染组织有一定作用。TNF- α 由T细胞和巨噬细胞产生,在炎症反应中刺激免疫细胞并介导免疫应答,具有杀伤或抑制肿瘤细胞的功效^[51]。在我们的研究中发现,饲料苏氨酸缺乏组上调了肠道肿瘤坏死因子TNF- α 基因的表达,随着苏氨酸水平的增加,下调了TNF- α 基因的表达,这表明最佳的苏氨酸水平预防或减轻了肠道炎症反应,而IL-2、IL-8和IgM基因的表达则相反。对草鱼幼鱼的研究也有相似的发现,与最佳苏氨酸补充组相比,苏氨酸缺乏组用嗜水气单胞菌攻击14d后,抗肠炎的能力降低,肠IgM含量都显著降低;上调了肠道促炎细胞因子TNF- α 和IL-8的mRNA水平^[52]。IL-10是重要的抗炎因子,主要被用来抑制免疫反应的过度激活。在本试验中,0.76%和

1.09%组上调了IL-10的表达,随着苏氨酸的进一步增加,下调了IL-10基因的表达。结果表明,苏氨酸水平显著影响三倍体虹鳟肠道炎症因子相关基因的表达,鱼体在投喂不同水平的苏氨酸时,苏氨酸能刺激T细胞和巨噬细胞的增殖,促进免疫反应,随着苏氨酸水平的增加,炎症因子在不同的浓度下达到峰值,说明苏氨酸能够作用于免疫防御系统,通过提高免疫因子的表达式,进而增强机体的免疫功能,保护机体免受损伤,减少死亡率。但是当苏氨酸水平过高时,对免疫反应有抑制作用,各种细胞因子也会适度表达来保护机体,而过度的免疫反应会导致炎症的产生。因此,高水平添加苏氨酸不利于机体内部的动态平衡。

4 结论

在低鱼粉饲料(15%)中添加适量水平的苏氨酸,对提高三倍体虹鳟幼鱼生长、消化酶活性、促进肠道形态结构发育和增强鱼体免疫等方面都具有积极的作用。综合试验结果,建议在低鱼粉饲料中添加1.09%—1.29%的苏氨酸,其生长和免疫效果最佳。在前期研究的基础上,可以进一步探索,植物蛋白替代鱼粉,最适的苏氨酸添加量,旨在为优化三倍体虹鳟人工配合饲料提供理论依据。

参考文献:

- [1] Olsen R L, Hasan M R. A limited supply of fishmeal: impact on future increases in global aquaculture production [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2012, 27(2): 120-128.
- [2] Lin H, Tan X, Zhou C, et al. Effect of dietary arginine levels on the growth performance, feed utilization, non-specific immune response and disease resistance of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus* [J]. *Aquaculture*, 2015, 437(1): 382-389.
- [3] Krishnamoorthy R, Alshatwi Ali A, Subbarayan S, et al. Impact of farm-made liquid organic nutrients jevamirham and fish amino acid on growth and nutritional status in different season of *Abelmoschus esculentus*—a self-sustainable field trial [J]. *Organic Agriculture*, 2019, 9(1): 65-79.
- [4] Wu P, Tang L, Jiang W, et al. The relationship between dietary methionine and growth, digestion, absorption, and antioxidant status in intestinal and hepatopancreatic tissues of sub-adult grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2017, 8(1): 63.
- [5] Wang Y T. Species and research progress of fish immune enhancers [J]. *China Fisheries*, 2018(1): 66-68. [王玉堂. 鱼类免疫增强剂的种类及研究进展(三) [J]. 中国水产, 2018(1): 66-68.]

- [6] Lokesh J, Fernandes J M O, Korsnes K, *et al.* Transcriptional regulation of cytokines in the intestine of Atlantic cod fed yeast derived mannan oligosaccharide or β -glucan and challenged with *Vibrio anguillarum* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, **33**(3): 626-631.
- [7] Taniguchi Y, Yoshioka N, Nakata K, *et al.* Mechanism for maintaining homeostasis in the immune system of the intestine [J]. *Anticancer Research*, 2009, **29**(11): 4855-4860.
- [8] Ou H X. Effects of different feed on digestive enzyme and intestinal morphologic structure of *Micropterus salmoides* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018. [欧红霞. 不同饲料对大口黑鲈消化酶及肠道形态结构的影响 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.]
- [9] Luo J J, Zhang B, Wang J, *et al.* Research progress of threonine in animal production [J]. *Hunan Feed*, 2013(1): 24-26. [罗佳捷, 张彬, 王洁, 等. 苏氨酸在动物生产中的研究进展 [J]. *湖南饲料*, 2013(1): 24-26.]
- [10] Dong Y-W, Feng L, Jiang W D, *et al.* Dietary threonine deficiency depressed the disease resistance, immune and physical barriers in the gills of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) under infection of *Flavobacterium columnare* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018(72): 161-173.
- [11] Habte-Tsion H M, Ren M, Liu B, *et al.* Threonine modulates immune response, antioxidant status and gene expressions of antioxidant enzymes and antioxidant-immune-cytokine-related signaling molecules in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016(51): 189-199.
- [12] Wang J N, Tai D M, An M. Survey on the development of rainbow trout aquaculture [J]. *Hebei Fisheries*, 2015(3): 62-65. [王金娜, 邵定敏, 安苗. 虹鳟鱼养殖发展概况 [J]. *河北渔业*, 2015(3): 62-65.]
- [13] Zhu L, Yuan C, Zhu C K, *et al.* Comparison of nutritional compositions in muscles of diploid and triploid rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2018, **40**(2): 206-208. [朱龙, 袁聪, 朱成科, 等. 二倍体和三倍体虹鳟肌肉营养成分比较及分析 [J]. *营养学报*, 2018, **40**(2): 206-208.]
- [14] Antunes, P, Campos J, Mourão J, *et al.* Inflow water is a major source of trout farming contamination with *Salmonella* and multidrug resistant bacteria [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, **642**(15): 1163-1171.
- [15] Hossain M S, Fawole F J, Labh S N, *et al.* Insect meal inclusion as a novel feed ingredient in soy-based diets improves performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 2021(554): 737096.
- [16] Carter C G, Sajjadi M. Low fishmeal diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using soy protein concentrate treated with graded levels of phytase [J]. *Aquaculture International*, 2011, **19**(3): 431-444.
- [17] Lin S, Mao S H, Guan Y, *et al.* Replacement of fish meal with degossypolled cottonseed protein in low fish meal diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, **23**(12): 2231-2238.
- [18] Bonvini E, Bonaldo A, Mandrioli L, *et al.* Effects of feeding low fishmeal diets with increasing soybean meal levels on growth, gut histology and plasma biochemistry of sea bass [J]. *Animal*, 2018, **12**(5): 923-930.
- [19] Wang Y L, Wang C A, Liu H B, *et al.* Effects of dietary threonine in low fish meal diet on growth performance, body composition, amino acid composition in muscle of triploid *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, **33**(4): 2390-2340. [王亚玲, 王常安, 刘红柏, 等. 低鱼粉饲料中添加苏氨酸对三倍体虹鳟生长性能、体成分及肌肉氨基酸组成的影响 [J]. *动物营养学报*, 2021, **33**(4): 2390-2340.]
- [20] Xu Q Y. Research progress on nutrition feed of rainbow trout [J]. *Feed Industry*, 2010(1): 46-49. [徐奇友. 虹鳟营养与饲料研究进展 [J]. *饲料工业*, 2010(1): 46-49.]
- [21] Lin J J. Effects of replacement of fish meal by fermented soybean meal in diets on growth, immunity and intestinal tissue of *Carassius auratus* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016. [林佳洁. 发酵豆粕替代鱼粉对黄金鲫生长、免疫及肠道组织的影响 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.]
- [22] Cheng L. Effects of dietary methionine on growth performance, digestion, absorption ability and antioxidant ability and gene express of muscle synthesis related pathway of Songpu mirror carp [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [程龙. 蛋氨酸对松浦镜鲤生长性能、消化吸收、抗氧化能力和肌肉合成通路基因表达的影响 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [23] Habte-Tsion H M, Ge X, Liu B, *et al.* A deficiency or an excess of dietary threonine level affects weight gain, enzyme activity, immune response and immune-related gene expression in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, **42**(2): 439-446.
- [24] Luo J B, Feng L, Jiang W D, *et al.* Physical and flavor characteristics, fatty acid profile, antioxidant status and Nrf2-dependent antioxidant enzyme gene expression changes in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets fed dietary valine [J]. *PLoS One*, 2017, **12**(1): e0169270.
- [25] Li J N, Xu Q Y, Wei Y Q. Effect of α -ketoglutarate supplementation in different protein sources of diets on antioxidant capacity of Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio* Songpu) [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2017, **30**(5): 28-32. [李晋南, 徐奇友, 魏玉强. 不同蛋白源饲料中添加 α -酮戊二酸对松浦镜鲤抗氧化能力的影响 [J]. *水产学杂志*, 2017, **30**(5): 28-32.]
- [26] Jobling M. National Research Council (NRC): Nutrient requirements of fish and shrimp [J]. *Aquaculture International*, 2012, **20**(3): 601-602.

- [27] He Z G. Studies on nutritional physiology of threonine and phenylalanine for the large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R. and Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008. [何志刚. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea* R.)和鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)苏氨酸和苯丙氨酸营养生理研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.]
- [28] van der Schoor S R, Wattimena D L, Huijman J, *et al.* The gut takes nearly all: threonine kinetics in infants [J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2007, **86**(4): 1132-1138.
- [29] Feng L, Peng Y, Wu P, *et al.* Threonine affects intestinal function, protein synthesis and gene expression of TOR in Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(7): e69974.
- [30] Wang X X, Zeng B H, Liu L L, *et al.* Effects of feed protein levels on growth, digestive enzyme activities, non-specific immunity and protein metabolism of *Schizothorax o'connori* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(4): 693-706. [王纤纤, 曾本和, 刘乐乐, 等. 饲料蛋白质水平对异齿裂腹鱼生长、消化酶活性、非特异性免疫及蛋白质代谢反应的影响 [J]. 水生生物学报, 2020, **44**(4): 693-706.]
- [31] Azzam M M, Zou X T, Dong X Y, *et al.* Effect of supplemental l-threonine on mucin 2 gene expression and intestine mucosal immune and digestive enzymes activities of laying hens in environments with high temperature and humidity [J]. *Poultry Science*, 2011, **90**(10): 2251-2256.
- [32] Feng L. Effect of threonine on digestive, absorb, immune function and TOR gene expression in organ and tissues of juvenile Jian carp [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2010 [冯琳. 苏氨酸对幼建鲤消化吸收能力和抗病力以及组织器官中蛋白质调控信号分子TOR表达的影响 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2010.]
- [33] Li J M, Zhang X Y, Yuan C, *et al.* Effects of dietary L-threonine levels on antioxidant capacity, digestive enzyme activities, and antibody production of Xinyang green-shell laying hens [J]. *Journal of Applied Poultry Research*, 2016, **25**(3): 422-427.
- [34] Solorzano Y, Viana M T, López L M, *et al.* Response of newly hatched *Octopus bimaculoides* fed enriched *Artemia salina*: growth performance, ontogeny of the digestive enzyme and tissue amino acid content [J]. *Aquaculture*, 2009, **289**(1/2): 84-90.
- [35] Du X, Zhou G Q, Mao J Q. Effects on the activities of digestive enzymes of carp by three kinds of microorganism preparation and its amino acids [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2006, **21**(3): 351-354. [杜宣, 周国勤, 茆健强. 3种微生态制剂的氨基酸组成及对鲤鱼消化酶活性的影响 [J]. 云南农业大学学报, 2006, **21**(3): 351-354.]
- [36] Peng Y. Effects of supplementation of crystalline or coated threonine on growth performance, functions of digestion, absorption and immune of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2009. [彭艳. 晶体和包被处理的苏氨酸对幼建鲤生产性能、消化吸收功能和免疫功能影响的比较研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2009.]
- [37] Hong Y. Studies on effects of dietary threonine on digestive ability and antioxidative ability of sub-adult grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2012. [洪杨. 苏氨酸对生长后期草鱼消化吸收功能和抗氧化能力影响的研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.]
- [38] Kramer D L, Bryant M J. Intestine length in the fishes of a tropical stream: 1. Ontogenetic allometry [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 1995, **42**(2): 115-127.
- [39] Tang Q, Tan P, Ma N, *et al.* Physiological functions of threonine in animals: beyond nutrition metabolism [J]. *Nutrients*, 2021, **13**(8): 2592-2597.
- [40] Starck J M. Phenotypic flexibility of the avian gizzard: rapid, reversible and repeated changes of organ size in response to changes in dietary fibre content [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1999, **202**(22): 3171-3179.
- [41] Teng P Y, Choi J, Yadav S, *et al.* Effects of low-crude protein diets supplemented with arginine, glutamine, threonine, and methionine on regulating nutrient absorption, intestinal health, and growth performance of *Eimeria*-infected chickens [J]. *Poultry Science*, 2021, **100**(11): 101427.
- [42] Roisné-Hamelin G, Moro J, Delahaye N, *et al.* Lysine and threonine restriction reproduced the lower synthesis but not the higher catabolism of liver and muscle protein of severely protein restricted growing rats [J]. *Current Developments in Nutrition*, 2021, **5**(Supplement_2): 519.
- [43] Law G K, Bertolo R F, Adjiri-Awere A, *et al.* Adequate oral threonine is critical for mucin production and gut function in neonatal piglets [J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2007, **292**(5): G1293-G1301.
- [44] Lisnahan C V, Nahak O R. Growth performance and small intestinal morphology of native chickens after feed supplementation with tryptophan and threonine during the starter phase [J]. *Veterinary World*, 2020, **13**(12): 2765-2771.
- [45] None. Regulation of PepT1 by leptin and physiological implications [J]. *Genes & Nutrition*, 2010, **5**(1): 15-17.
- [46] Ingersoll S A, Ayyadurai S, Charania M A, *et al.* The role and pathophysiological relevance of membrane transporter PepT1 in intestinal inflammation and inflammatory bowel disease [J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2012, **302**(5): G484-G492.
- [47] Hu J C, Zou X T, Dong J G. Research advances in effects of threonine on immune function in animal [J]. *China Feed*, 2008(21): 4-6. [胡家澄, 邹晓庭, 董金格. 苏氨酸

- 对畜禽免疫性能的影响研究进展 [J]. *中国饲料*, 2008(21): 4-6.]
- [48] Guo C Y, Xu Z Y, Diao Q Y. Research on the effects of dietary threonine on nutrition and immune function of animal and its different requirement [J]. *Feed Industry*, 2006, **27**(14): 46-48. [国春艳, 许宗运, 刁其玉. 苏氨酸的营养免疫作用及畜禽对其需要量的研究 [J]. *饲料工业*, 2006, **27**(14): 46-48.]
- [49] Huang X H, Zhao X, Dong X H, *et al.* IL-10 is involved in the regulation of macrophage polarization [J]. *Military Medical Sciences*, 2018, **42**(9): 673-677. [黄小会, 赵欣, 董晓惠, 等. IL-10参与调控巨噬细胞的极化 [J]. *军事医学*, 2018, **42**(9): 673-677.]
- [50] Dooms H, Abbas A K. Revisiting the role of IL-2 in autoimmunity [J]. *European Journal of Immunology*, 2010, **40**(6): 1538-1540.
- [51] Risnik D, Podaza E, Almejún M B, *et al.* Revisiting the role of interleukin-8 in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 15714.
- [52] Dong Y W, Jiang W D, Liu Y, *et al.* Threonine deficiency decreased intestinal immunity and aggravated inflammation associated with NF- κ B and target of rapamycin signalling pathways in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) after infection with *Aeromonas hydrophila* [J]. *The British Journal of Nutrition*, 2017, **118**(2): 92-108.

DIETARY THREONINE IN LOW FISH MEAL DIET ON ANTIOXIDANT CAPACITY, DIGESTIVE PHYSIOLOGY AND INTESTINAL INFLAMMATORY FACTOR GENE EXPRESSION OF TRIPLOID *ONCORHYNCHUS MYKISS*

WANG Ya-Ling^{1,2}, WANG Chang-An¹, LIU Hong-Bai¹, HAN Shi-Cheng¹, LU Shao-Xia¹ and ZHANG Yin¹

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To study the effects of threonine in low fish meal diet on growth, antioxidant capacity, digestive physiology, and intestinal inflammatory cytokines gene expression of triploid *Oncorhynchus mykiss*, five isonitrogenous and isenergetic diets containing 0.45% (control), 0.76%, 1.09%, 1.29% and 1.64% threonine were formulated by adding L-threonine in the basal diet to feed fish with an initial body weight of (18.42±0.20) g for a 56-days trial. A total of 450 triploid rainbow were randomly divided into 5 groups with triplicate groups of 30 fish each. Threonine at 1.09%, 1.29% and 1.64% level significantly increased serum superoxide dismutase (SOD) and significantly decreased the content of malondialdehyde (MDA) ($P<0.05$). The highest activity of catalase (CAT) was in the 1.29% group, which was significantly different from that in control group ($P<0.05$). The digestive enzyme activities of intestinal lipase (LPS) and trypsin in diets supplemented with threonine level (0.76%—1.64%) were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$) except threonine level at 1.64% in the activities of digestive enzymes. The intestinal morphology of 1.09% and 1.64% groups were well-developed in villi, orderly arrangement, and no fusion and shedding. The threonine levels had significant effects on *IL-2*, *IL-8*, *IL-10*, *IgM*, *TNF- α* and *PepTI* ($P<0.05$). With the increase of threonine level, *IL-2*, *IgM* and *PepTI* showed a trend of increase first and then decrease, and the expression levels of *IL-2*, *IgM* and *PepTI* reached the highest level in 1.29% and 1.09% groups. *IL-8* showed a gradually increasing trend. *IL-10* and *TNF- α* showed a decrease trend. The low fish meal diet (15%) supplemented with appropriate level of threonine improves the growth, digestive enzyme activity, intestinal morphology and structure development and immune enhancement of juvenile triploid *Oncorhynchus mykiss*.

Key words: Low fishmeal diet; Threonine; Immune; Intestinal tissue structure; Digestive enzyme activity; Inflammatory factor; Triploid *Oncorhynchus mykiss*