

DOI: 10.12264/JFSC2021-0258

## 三丁酸甘油酯、 $\alpha$ -酮戊二酸和丙氨酰-谷氨酰胺对罗氏沼虾生长性能、消化酶活性和免疫基因表达的影响

杨欣<sup>1</sup>, 赵静怡<sup>1</sup>, 叶金云<sup>1, 2, 3</sup>, 杨国梁<sup>1, 2, 3</sup>, 徐奇友<sup>1, 2, 3</sup>

1. 湖州师范学院生命科学学院, 浙江 湖州 313000;

2. 水生动物繁育与营养国家地方联合工程实验室, 浙江 湖州 313000;

3. 浙江省水生生物资源养护与开发技术研究重点实验室, 浙江 湖州 313000

**摘要:** 本研究旨在探讨三丁酸甘油酯(tributyrin, TB)、 $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -ketoglutarate, AKG)和丙氨酰-谷氨酰胺(alanyl-glutamine, Ala-Gln)对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)生长性能、消化酶活性和免疫相关基因表达的影响。以添加 40.00%豆粕和 33.70%花生粕两种饲料为对照组(命名为 SM 组和 PM 组), 分别在豆粕饲料中添加 0.10%、0.20%的 TB (TB1 和 TB2 组), 1.00%、2.00%的 AKG (AKG1 和 AKG2 组), 1.00%、2.00%的 Ala-Gln (AGn1 和 AGn2 组), 配制 8 种等氮等能饲料。选取初始体重为(0.10±0.02) g 的罗氏沼虾 640 尾, 随机分为 8 组, 每组 4 个重复, 每个重复 20 尾, 实验期为 8 周。结果表明, 与 SM 组相比, TB、AKG 和 AGn 组对罗氏沼虾生长性能、血清超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量、TOR 和 caspase-3 基因表达无显著影响( $P>0.05$ ), TB、AKG 和 AGn 组的消化酶活性显著提高( $P<0.05$ ), 且 AGn2 组显著高于其他试验组( $P<0.05$ )。此外, AKG1 组 caspase-8 相对表达量显著高于其他饲料组( $P<0.05$ ), PM 组和 TB 组的 TNF- $\alpha$  相对表达量显著降低( $P<0.05$ )。结果可知, 饲料中添加 TB、AKG 和 Ala-Gln 对罗氏沼虾生长性能和抗氧化功能没有显著影响; 添加 TB、AKG 和 Ala-Gln 对罗氏沼虾消化酶活性均具有明显的改善作用, 其中添加 2% Ala-Gln 改善作用最佳; 豆粕与花生粕相比可上调罗氏沼虾 TNF- $\alpha$  的表达, 添加 TB 可以抑制这种基因表达。

**关键词:** 三丁酸甘油酯;  $\alpha$ -酮戊二酸; 丙氨酰-谷氨酰胺; 罗氏沼虾; 生长; 免疫; 消化酶

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)06-0854-10

世界鱼粉产量已满足不了水产养殖快速发展的需要, 豆粕因其含有丰富的粗蛋白质和平衡的氨基酸成为水产饲料中替代鱼粉的最优蛋白质来源。但豆粕中含有抗营养因子, 如胰蛋白酶、大豆抗原蛋白等, 其对水产动物的肠道具有损伤作用, 易导致肠道发生疾病<sup>[1-3]</sup>。基于豆粕这一特性以及维持水产动物肠道健康的理念, 可在豆粕饲料中添加一些功能性添加剂来改善肠道健康。前期研究表明三丁酸甘油酯(tributyrin, TB)、 $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -ketoglutarate, AKG)和丙氨酰-谷氨酰胺

(alanyl-glutamine, Ala-Gln)能够促进肠黏膜发育和改善肠道健康。Volatiana 等<sup>[4]</sup>在高豆粕饲料中添加 TB 可改善黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)幼鱼的生长性能, 维持健康的肠道形态, 增强抗氧化能力。吴桐强等<sup>[5]</sup>在草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)饲料中添加 0.5% Ala-Gln, 可促进草鱼幼鱼营养物质代谢、免疫以及肠道发育, 进而提高生长性能。位莹莹<sup>[6]</sup>在松浦镜鲤(*Cyprinus carpio*)饲料中添加 1.5% AKG, 显著提高肠道蛋白酶和脂肪酶活性。尽管研究表明 TB、AKG 和 Ala-Gln

收稿日期: 2021-06-08; 修订日期: 2021-06-20.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972800).

作者简介: 杨欣(1996-), 男, 硕士研究生, 从事水生动物营养研究. E-mail: yx1174810987@163.com

通信作者: 徐奇友, 研究员, 从事水生动物营养学研究. E-mail: xuqiyu@sina.com

具有促进水产动物肠道健康的作用, 但关于这 3 种功能性添加剂对水产动物生长性能、免疫功能和消化酶活性影响的比较还未见报道。因此, 本研究以罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)为研究对象, 探讨豆粕饲料中添加 TB、AKG 和 Ala-Gln 对罗氏沼虾生长性能、消化酶活性和免疫基因表达的影响, 同时通过与花生粕(基本不含抗营养因子<sup>[7]</sup>)的比较阐明豆粕对罗氏沼虾生长性能、消化酶活性和免疫基因表达的影响机理。旨在为水产动物养殖生产中 3 种添加剂的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

罗氏沼虾购自江苏数丰水产种业有限公司, 饲养于湖州师范学院生命科学学院水生动物养殖

中心。

1.2 实验设计与饲养管理

对照组分别为花生粕(PM)和豆粕组(SM), 分别添加 33.70%花生粕和 40.00%豆粕。并且在花生粕组添加适量的赖氨酸和苏氨酸, 豆粕组添加适量蛋氨酸以保证各组饲料中氨基酸含量一致。参照前期 TB、AKG 和 Gln 的研究结果<sup>[4,8-11]</sup>, 分别在豆粕饲料中添加 0.10%、0.20%的 TB (命名为 TB1 和 TB2 组)、1.00%、2.00%的 AKG (AKG1 和 AKG2 组)和 1.00%、2.00%的 Ala-Gln (AGn1 和 AGn2 组), 共配制 8 种等氮等能的罗氏沼虾实验饲料。各饲料原料均粉碎过 60 目筛, 称重后混匀, 制成直径为 2.50 mm 的颗粒, 热风循环烘箱(常州市创新干燥设备有限公司)中 40 ℃烘干后置于-18 ℃冰箱保存备用, 各试验饲料配方及营养成分含量见表 1。

表 1 饲料配方和营养组成(风干基础)  
Tab. 1 Formulation and proximate composition of basal diets (air-dry basis)

| 原料 ingredient                                   | 饲料组成 composition of diet |        |        |        |        |        |        |        | % |
|-------------------------------------------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|
|                                                 | PM                       | SM     | TB1    | TB2    | AKG1   | AKG2   | AGn1   | AGn2   |   |
| 鱼粉 fish meal                                    | 31.50                    | 31.50  | 31.50  | 31.50  | 31.50  | 31.50  | 31.50  | 31.50  |   |
| 豆粕 soybean meal                                 | 0.00                     | 40.00  | 40.00  | 40.00  | 40.00  | 40.00  | 40.00  | 40.00  |   |
| 花生粕 peanut meal                                 | 33.70                    | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   |   |
| 预糊化淀粉 pregelatinized starch                     | 10.00                    | 10.00  | 10.00  | 10.00  | 10.00  | 10.00  | 10.00  | 10.00  |   |
| 豆油 soybean oil                                  | 0.00                     | 2.00   | 2.00   | 2.00   | 2.00   | 2.00   | 2.00   | 2.00   |   |
| 大豆磷脂 soy lecithin                               | 2.00                     | 2.00   | 2.00   | 2.00   | 2.00   | 2.00   | 2.00   | 2.00   |   |
| 鱼油 fish oil                                     | 1.35                     | 2.00   | 2.00   | 2.00   | 2.00   | 2.00   | 2.00   | 2.00   |   |
| 磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$      | 2.00                     | 1.92   | 1.92   | 1.92   | 1.92   | 1.92   | 1.92   | 1.92   |   |
| 蛋氨酸 Met                                         | 0.00                     | 0.08   | 0.08   | 0.08   | 0.08   | 0.08   | 0.08   | 0.08   |   |
| 赖氨酸 Lys                                         | 0.12                     | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   |   |
| 苏氨酸 Thr                                         | 0.10                     | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   |   |
| 维生素预混料 <sup>1</sup> vitamin premix <sup>1</sup> | 1.00                     | 1.00   | 1.00   | 1.00   | 1.00   | 1.00   | 1.00   | 1.00   |   |
| 矿物质预混料 <sup>2</sup> mineral premix <sup>2</sup> | 0.20                     | 0.20   | 0.20   | 0.20   | 0.20   | 0.20   | 0.20   | 0.20   |   |
| 氯化胆碱 choline chloride                           | 0.50                     | 0.50   | 0.50   | 0.50   | 0.50   | 0.50   | 0.50   | 0.50   |   |
| 硫酸镁 $\text{MgSO}_4$                             | 0.30                     | 0.30   | 0.30   | 0.30   | 0.30   | 0.30   | 0.30   | 0.30   |   |
| 胆固醇 cholesterol                                 | 0.50                     | 0.50   | 0.50   | 0.50   | 0.50   | 0.50   | 0.50   | 0.50   |   |
| 微晶纤维 microcrystalline cellulose                 | 10.73                    | 2.00   | 1.90   | 1.80   | 1.00   | 0.00   | 1.00   | 0.00   |   |
| 羧甲基纤维素 carboxy cellulose                        | 3.00                     | 3.00   | 3.00   | 3.00   | 3.00   | 3.00   | 3.00   | 3.00   |   |
| 酵母水解物 yeast hydrolysate                         | 3.00                     | 3.00   | 3.00   | 3.00   | 3.00   | 3.00   | 3.00   | 3.00   |   |
| 三丁酸甘油酯 tributyrin                               | 0.00                     | 0.00   | 0.10   | 0.20   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   |   |
| $\alpha$ -酮戊二酸 $\alpha$ -ketoglutarate          | 0.00                     | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 1.00   | 2.00   | 0.00   | 0.00   |   |
| 丙酰胺-谷氨酰胺 alanyl-glutamine                       | 0.00                     | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 1.00   | 2.00   |   |
| 合计 total                                        | 100.00                   | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |   |

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab. 1 continued)

| 原料 ingredient             | 饲料组成 composition of diet |       |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                           | PM                       | SM    | TB1   | TB2   | AKG1  | AKG2  | AGn1  | AGn2  |
| 营养成分 nutrient composition |                          |       |       |       |       |       |       |       |
| 粗蛋白质 crude protein        | 39.03                    | 39.03 | 39.03 | 39.03 | 39.03 | 39.03 | 39.03 | 39.03 |
| 粗脂肪 ether extract         | 9.97                     | 9.97  | 9.97  | 9.97  | 9.97  | 9.97  | 9.97  | 9.97  |
| 总能/(kJ/g) total energy    | 14.40                    | 14.40 | 14.40 | 14.40 | 14.40 | 14.40 | 14.40 | 14.40 |

注: 1. 每千克饲料中维生素的添加量分别为: 维生素 A 30000 IU, 维生素 C 4 g, 维生素 D<sub>3</sub> 18000 IU, 维生素 E 300 mg, 维生素 K<sub>3</sub> 25 mg, 维生素 B<sub>1</sub> 50 mg, 维生素 B<sub>2</sub> 100 mg, 维生素 B<sub>6</sub> 80 mg, 维生素 B<sub>12</sub> 0.2 mg, 烟酰胺 400 mg, D-生物素 0.8 mg, 肌醇 1 g, 叶酸 25 mg, D-泛酸钙 250 mg; 2. 每千克饲料中矿物元素的添加量分别为: MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 35.80 mg、CoCl<sub>2</sub> 29.94 mg、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 9.54 mg、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 30.23 mg、ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 15.76 mg、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 0.89 mg、KI 1.06 mg。  
Note: 1. The vitamin premix provided the following per kg of diets: vitamin A 30000 IU, vitamin C 4 g, vitamin D<sub>3</sub> 18000 IU, vitamin E 300 mg, vitamin K<sub>3</sub> 25 mg, vitamin B<sub>1</sub> 50 mg, vitamin B<sub>2</sub> 100 mg, vitamin B<sub>6</sub> 80 mg, vitamin B<sub>12</sub> 0.2 mg, nicotinamide 400 mg, D-biotin 0.8 mg, inositol 1 g, folic acid 25 mg, D-calcium pantothenate 250 mg; 2. The mineral premix provided the following per kg of diets: MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 35.80 mg, CoCl<sub>2</sub> 29.94 mg, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 9.54 mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 30.23 mg, ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 15.76 mg, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 0.89 mg, KI 1.06 mg.

预先将养殖桶消毒, 冲洗干净。罗氏沼虾先暂养 14 d, 挑选规格整齐、健康无病的实验虾, 饲养于宽 0.6 m、高 0.4 m、长 0.5 m 的养殖水箱中, 共 8 组, 每组 4 个重复, 每个重复放养 20 尾虾。每天投喂 2 次(7:30, 18:00), 饱食投喂。实验为期 56 d, 实验期间 24 h 充气, 溶解氧≥6 mg/L, 水温为 26~30 ℃, 氨氮≤0.3 mg/L, pH7.8~8.3。

1.3 生长性能测定和样品采集

养殖试验结束, 分别统计每缸虾尾数并称重, 生长性能计算公式如下:

成活率(SR, %)=100×N<sub>2</sub>/N<sub>1</sub>;  
增重率(WGR, %)=100×(W<sub>t</sub>-W<sub>0</sub>)/W<sub>0</sub>;  
特定生长率(SGR, %/d)=100×(lnW<sub>t</sub>-lnW<sub>0</sub>)/T;  
饵料系数(FCR)=F/(W<sub>t</sub>-W<sub>0</sub>)

式中, N<sub>1</sub> 为初始尾数, N<sub>2</sub> 为终末尾数; W<sub>0</sub> 为初始体重(g); W<sub>t</sub> 为末体重(g); F 为摄入饲料(g); T 为试验天数(d)。

每缸取 3 尾虾抽取血淋巴于离心管中, 置于 4 ℃冰箱中静置 24 h 后, 于 10000 r/min 离心 10 min, 并取上清液, 于-80 ℃的冰箱保存, 用于血淋巴抗氧化指标的检测。同时分别取肝胰腺和肠道, 用铝箔纸包裹, 于-80 ℃保存, 用于测定消化酶活性。每缸随机选取 6 尾虾, 每尾虾切取肠道, 每 3 个为 1 个样品, 于-80 ℃保存, 用于研究肠道基因表达变化。

1.4 消化酶活性和抗氧化指标的测定

脂肪酶、α-淀粉酶、胰蛋白酶、超氧化物歧

化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。

1.5 荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析基因表达

取-80℃冰箱中保存的各待测组织样本, 参照北京艾德莱生物科技有限公司细胞 RNA 快速提取试剂盒操作说明书提取总 RNA。提取的总 RNA 用超微量紫外分光光度计测定, 测定浓度高于 100 ng/μL, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 在 1.8~2.2 之间, 则认为 RNA 可用。用反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)将 RNA 反转录为 cDNA, 并保存在-20 ℃用于 qRT-PCR 分析。

采用在线 Primer3 设计 TOR、caspase-3、caspase-8、TNF-α 基因 qRT-PCR 所用引物, 引物序列见表 2, 参照 TaKaRa RR047A 说明书进行反转录, 根据 TaKaRa RR420A 试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR。检测罗氏沼虾各待测基因, 使用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 比较 C<sub>t</sub> 值方法对目的基因相对表达水平进行分析。

1.6 统计分析

数据以平均值和标准误( $\bar{x} \pm SE$ )表示, 采用 SPSS25.0 对所得数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 若差异达到显著水平, 则进行 Tukey 法多重比较, 显著性水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 对罗氏沼虾生长性能的影响

试验结果见表 3。不同饲料组的增重率、存

活率、特定生长率和饲料系数均无显著性差异 ( $P>0.05$ )。

表 2 qRT-PCR 引物序列  
Tab. 2 Primer sequences for qRT-PCR

| 引物名称<br>primer<br>name | 引物序列(5'-3')<br>primer sequence (5'-3') | 引物类型<br>primer<br>type |
|------------------------|----------------------------------------|------------------------|
| TOR                    | GCTTTGAACCCCTCGCCTTAT                  | 正向<br>forward          |
|                        | TCTCCTCTCGTTCTTCCTCTTC                 | 反向<br>reverse          |
| caspase-3              | TGAGGCACTGGTCTTGCCAGAAT                | 正向<br>forward          |
|                        | GGCACTGCATTGACTGCTGGATT                | 反向<br>reverse          |
| caspase-8              | ACATCTGAAGGCAGCGAGT                    | 正向<br>forward          |
|                        | CTTCCTCGTCGAGAACCTTG                   | 反向<br>reverse          |
| TNF- $\alpha$          | CGCGGATCCGATGTTACCGACACCTAT            | 正向<br>forward          |
|                        | CCGGAATTCTTCCAACCTTGCCTTTAC            | 反向<br>reverse          |
| $\beta$ -actin         | GAGACCTTCAACACCCCAGC                   | 正向<br>forward          |
|                        | GTAAGTGGTCTCGTGAATGCC                  | 反向<br>reverse          |

表 3 不同处理对罗氏沼虾生长性能的影响  
Tab. 3 Growth performance of *Macrobrachium rosenbergii* fed with different diets

| 组别<br>group | 指标 index              |                 |                    |                   |
|-------------|-----------------------|-----------------|--------------------|-------------------|
|             | 增重率<br>WGR/%          | 饲料系数<br>FCR     | 特定生长率<br>SGR/(%/d) | 成活率<br>SR/%       |
| PM          | 3120.69 $\pm$ 148.59  | 2.89 $\pm$ 0.57 | 6.17 $\pm$ 0.09    | 48.75 $\pm$ 12.42 |
| SM          | 3295.63 $\pm$ 387.67  | 2.95 $\pm$ 0.74 | 6.27 $\pm$ 0.25    | 40.00 $\pm$ 7.74  |
| AKG1        | 2769.83 $\pm$ 355.26  | 3.09 $\pm$ 0.70 | 5.99 $\pm$ 0.19    | 60.00 $\pm$ 12.75 |
| AKG2        | 2926.61 $\pm$ 147.58  | 4.19 $\pm$ 0.30 | 6.04 $\pm$ 0.10    | 58.75 $\pm$ 8.98  |
| AGn1        | 2473.39 $\pm$ 111.44  | 4.50 $\pm$ 0.54 | 5.79 $\pm$ 0.08    | 66.25 $\pm$ 8.26  |
| AGn2        | 2354.00 $\pm$ 349.87  | 4.93 $\pm$ 0.37 | 5.71 $\pm$ 0.21    | 66.25 $\pm$ 10.28 |
| TB1         | 4310.24 $\pm$ 1352.84 | 3.40 $\pm$ 0.95 | 6.55 $\pm$ 0.48    | 51.25 $\pm$ 14.34 |
| TB2         | 2782.28 $\pm$ 191.44  | 2.92 $\pm$ 0.28 | 5.99 $\pm$ 0.12    | 63.75 $\pm$ 10.28 |

2.2 对罗氏沼虾消化酶活性的影响

试验结果表明(表 4), 与 SM 组相比, PM 组的肝胰腺和肠道消化酶活性均显著提高( $P<0.05$ )。AGn2 组与 SM 组相比, 肠道和肝胰腺的脂肪酶、胰蛋白酶和  $\alpha$ -淀粉酶活性显著提高( $P<0.05$ ), 肝

胰腺中胰蛋白酶、 $\alpha$ -淀粉酶活性和肠道中脂肪酶活性显著高于其他试验组( $P<0.05$ )。AKG2 组肠道中胰蛋白酶仅次于 PM 组, 显著高于其他饲料组( $P<0.05$ ); AKG1 组肠道中  $\alpha$ -淀粉酶活性最高且显著高于其他饲料组( $P<0.05$ )。

表 4 不同处理对罗氏沼虾肝胰腺和  
肠道消化酶活性的影响

Tab. 4 Digestive enzyme activities in hepatopancreas and intestines of *Macrobrachium rosenbergii* fed with different diets

|                       |             | 指标 index                        |                                  |                                |
|-----------------------|-------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
|                       | 组别<br>group | 淀粉酶活性<br>(U/mg prot)<br>amylase | 胰蛋白酶活性<br>(U/mg prot)<br>trypsin | 脂肪酶活性<br>(U/mg prot)<br>lipase |
| 肝胰腺<br>hepatopancreas | PM          | 0.601±0.005 <sup>b</sup>        | 338.26±1.82 <sup>a</sup>         | 19.89±0.20 <sup>a</sup>        |
|                       | SM          | 0.520±0.007 <sup>d</sup>        | 211.37±2.39 <sup>c</sup>         | 13.29±0.27 <sup>c</sup>        |
|                       | AKG1        | 0.496±0.003 <sup>c</sup>        | 226.51±0.85 <sup>d</sup>         | 16.68±0.20 <sup>b</sup>        |
|                       | AKG2        | 0.558±0.006 <sup>c</sup>        | 264.96±2.34 <sup>c</sup>         | 19.67±0.22 <sup>a</sup>        |
|                       | AGn1        | 0.419±0.002 <sup>f</sup>        | 173.61±0.35 <sup>f</sup>         | 15.04±0.09 <sup>d</sup>        |
|                       | AGn2        | 0.652±0.003 <sup>a</sup>        | 279.98±2.16 <sup>b</sup>         | 19.49±0.23 <sup>a</sup>        |
|                       | TB1         | 0.514±0.003 <sup>c</sup>        | 218.47±1.57 <sup>c</sup>         | 15.16±0.14 <sup>c</sup>        |
|                       | TB2         | 0.515±0.002 <sup>c</sup>        | 230.78±0.69 <sup>d</sup>         | 19.89±0.22 <sup>a</sup>        |
| 肠道<br>intestines      | PM          | 0.470±0.009 <sup>c</sup>        | 249.77±2.95 <sup>a</sup>         | 16.36±0.26 <sup>c</sup>        |
|                       | SM          | 0.426±0.004 <sup>c</sup>        | 162.26±1.65 <sup>f</sup>         | 10.52±0.13 <sup>c</sup>        |
|                       | AKG1        | 0.537±0.004 <sup>a</sup>        | 210.41±0.95 <sup>c</sup>         | 16.67±0.23 <sup>c</sup>        |
|                       | AKG2        | 0.511±0.008 <sup>b</sup>        | 230.58±3.38 <sup>b</sup>         | 19.26±0.28 <sup>b</sup>        |
|                       | AGn1        | 0.448±0.001 <sup>c</sup>        | 187.37±1.15 <sup>d</sup>         | 14.09±0.03 <sup>d</sup>        |
|                       | AGn2        | 0.493±0.001 <sup>b</sup>        | 195.52±0.38 <sup>d</sup>         | 20.66±0.07 <sup>a</sup>        |
|                       | TB1         | 0.391±0.001 <sup>c</sup>        | 149.05±0.13 <sup>g</sup>         | 11.01±0.06 <sup>c</sup>        |
|                       | TB2         | 0.460±0.003 <sup>c</sup>        | 176.74±0.78 <sup>c</sup>         | 19.57±0.07 <sup>b</sup>        |

注: 不同小写字母表示组间差异显著( $P<0.05$ ).  
Note: Different lowercase letters indicate significant differences between groups ( $P<0.05$ ).

2.3 对罗氏沼虾抗氧化指标的影响

不同处理对血淋巴抗氧化指标的影响见表 5。不同处理组的 SOD 无显著性差异( $P>0.05$ )。PM 组 MDA 含量最低且与其他饲料组差异显著( $P<0.05$ )。

2.4 对罗氏沼虾 TOR、caspase-3、caspase-8 和 TNF- $\alpha$  基因表达的影响

不同处理对罗氏沼虾 TOR、caspase-3、caspase-8 和 TNF- $\alpha$  基因相对表达量的影响见图 1, SM、AKG1、AKG2 和 AGn1 的 TNF- $\alpha$  相对表达

表 5 不同处理对罗氏沼虾血淋巴超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量的影响  
Tab. 5 SOD and MDA content of *Macrobrachium rosenbergi* fed with different diets

| 组别<br>group | 指标 index              |                         |
|-------------|-----------------------|-------------------------|
|             | 超氧化物歧化酶/(U/mL)<br>SOD | 丙二醛/(nmol/mL)<br>MDA    |
| PM          | 314.17±1.62           | 78.08±0.03 <sup>b</sup> |
| SM          | 310.60±0.15           | 78.82±0.30 <sup>a</sup> |
| AKG1        | 314.47±1.92           | 79.22±0.11 <sup>a</sup> |
| AKG2        | 314.17±2.80           | 79.59±0.20 <sup>a</sup> |
| AGn1        | 317.07±1.79           | 78.97±0.52 <sup>a</sup> |
| AGn2        | 316.10±0.80           | 79.36±0.31 <sup>a</sup> |
| TB1         | 314.73±2.64           | 78.52±0.29 <sup>a</sup> |
| TB2         | 313.03±1.09           | 79.61±0.23 <sup>a</sup> |

注：不同小写字母表示组间差异显著( $P<0.05$ )。  
Note: Different lowercase letters indicate significant differences between groups ( $P<0.05$ ).

量显著高于 PM、AGn2、TB1 和 TB2 ( $P<0.05$ ); AKG1 的 caspase-8 相对表达量显著高于其他饲料组( $P<0.05$ ), 但 PM 与 SM 相比没有显著差异( $P>0.05$ ); 不同处理 TOR 和 caspase-3 相对表达量没有显著性差异( $P>0.05$ )。

3 讨论

3.1 三丁酸甘油酯、 $\alpha$ -酮戊二酸和丙氨酰-谷氨酰胺对罗氏沼虾生长性能的影响

罗氏沼虾具有自相残杀的行为特性, 尤其是在幼虾阶段, 存在打斗致死现象, 造成存活率普遍不高。Hosain 等<sup>[12]</sup>的研究中对照组罗氏沼虾成活率为 61.33%, Wei 等<sup>[13]</sup>的研究中罗氏沼虾成活率为 20%~52.2%, 倪蒙等<sup>[14]</sup>的研究中罗氏沼虾成活率为 35.33%~49.84%。本研究罗氏沼虾成活率为 40%~66%, 也在上述实验结果的范围内。前期的实验表明在水生动物的饲料中添加 TB、AKG 和 Ala-Gln 能够促进水生动物的生长与健康。陈迪<sup>[15]</sup>在杂交鲟(*Acipenser schrenckii*♀×*Acipenser baeri*♂)饲料中添加 AKG 可促进肠道代谢与吸收, 提升生长性能。翟秋玲等<sup>[16]</sup>提出, 随着 TB 添加量提高, 东方鲀(*Tetraodon fluviatilis*)的生长性能, 如蛋白质效率、饲料效率、特定生长速率、增重率等, 出现先增长后趋于平稳的趋势, 认为 TB 对东方鲀具有促进生长的作用。何明<sup>[17]</sup>用豆粕代替

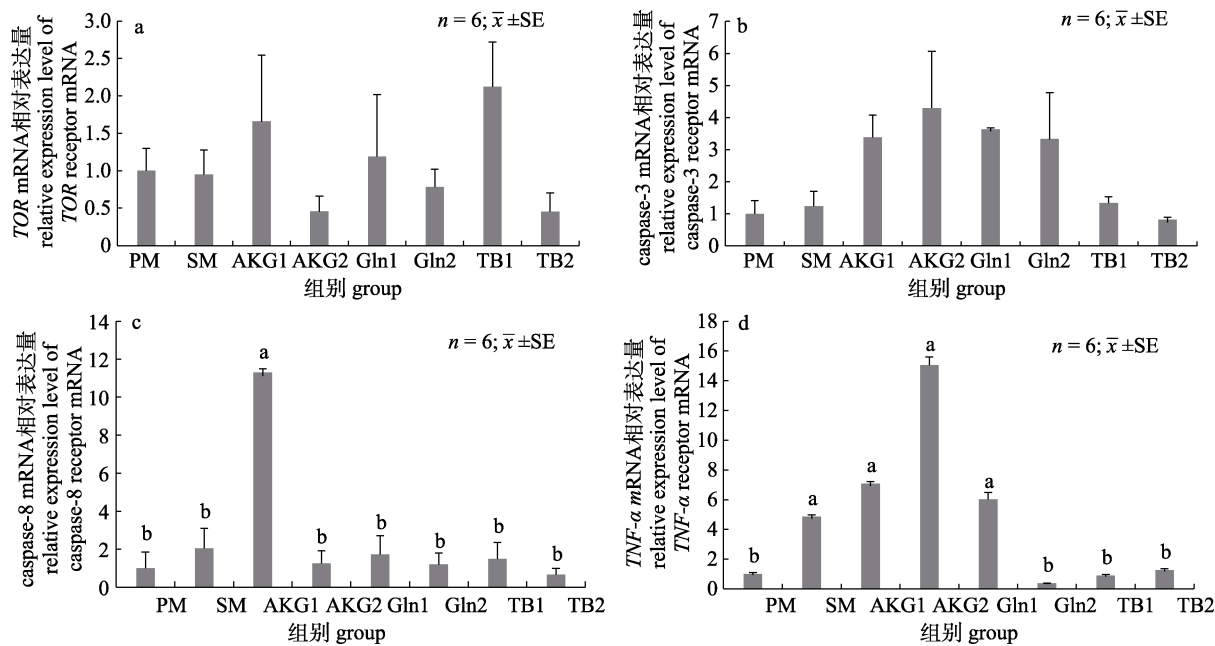


图 1 不同处理罗氏沼虾 TOR (a)、caspase-3 (b)、caspase-8 (c)、TNF- $\alpha$  mRNA (d)在肠道中的相对表达量  
不同小写字母表示组间差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 1 TOR (a), caspase-3 (b), caspase-8 (c), TNF- $\alpha$  (d) receptor mRNA expression levels in intestines of *Macrobrachium rosenbergii* fed with different diets  
Different lowercase letters indicate significant differences between groups ( $P<0.05$ ).

饲料中 40% 的鱼粉, 发现大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 出现明显的生长速率减缓现象, 添加 Ala-Gln 显著提高生长性能, 其中添加 0.9% 时效果最优。但本研究中, Ala-Gln、AKG 和 TB 对罗氏沼虾饲料利用率、特定生长率、存活率、增重率无显著影响。杨耐德等<sup>[18]</sup>用豆粕代替凡纳滨对虾饲料中的鱼粉, 当豆粕替代鱼粉比例低于 33.33% 时, 凡纳滨对虾的相关生长指标(蛋白质效率、FCR、SGR、WGR 等)无明显变化, 说明虾对豆粕等植物蛋白来源具有一定的耐受性; 当豆粕替代鱼粉比例为 50.00% 时, 凡纳滨对虾的 WGR 和 SGR 出现了明显下降趋势。说明凡纳滨对虾饲料中豆粕替代鱼粉比例超过 50.00% 时, 将对其产生不利影响。本研究中, 40.00% 的豆粕替代 25.57% 的鱼粉, 即替代比例为 44.80%, 高于 33.33% 而低于 50.00%, 因此不会对虾类生长性能产生明显的负面影响。因此, 该豆粕饲料中添加 Ala-Gln、AKG 和 TB 未显著提高罗氏沼虾的生长性能。

### 3.2 三丁酸甘油酯、 $\alpha$ -酮戊二酸和丙氨酰-谷氨酰胺对罗氏沼虾消化酶活性的影响

饲料利用率由肠道消化酶的活性所决定。食性和生活习性决定三种酶在不同水生动物之间的差异<sup>[19-20]</sup>, 而消化酶活性的高低与添加剂种类存在相关性, 决定水生动物对营养物质消化和吸收速率。本研究中, 饲喂花生粕饲料的罗氏沼虾比豆粕组消化酶活性显著升高, 表明花生粕对罗氏沼虾消化酶活性影响较小。丁酸具有降低饲料 pH、增加肠道酸度、激活蛋白酶原和提高消化酶活性的作用<sup>[21-22]</sup>。同时丁酸还可诱导产生胰高血糖素和胰岛素<sup>[23]</sup>, 起到调节肠道消化酶活性的效果。本研究中, 添加 0.2% TB 显著提高罗氏沼虾肠道的消化酶活性以及肝胰腺的胰蛋白酶和脂肪酶活性。以草鱼<sup>[24-25]</sup>为研究对象进行的试验中得到相同结论, 即添加 TB 时胰蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶的活性显著提升。表明饲料中添加 TB 可以提高肠道消化酶活性。然而, 本实验中 0.1% TB 组罗氏沼虾肠道的胰蛋白酶活性较豆粕组有一定的下降趋势, 这与李雅敏等<sup>[26]</sup>在草鱼上的试验结果相似, 具体原因需要进一步研究。

在本研究中, 与豆粕组相比添加 AKG 显著提

高消化酶活力, 这与在杂交鲟<sup>[15]</sup>、松浦镜鲤<sup>[27-28]</sup>的研究结果一致, 其机理是, AKG 进入鱼体内经一系列反应生成谷氨酰胺, 谷氨酰胺可以促进肠道的发育和对营养物质的消化吸收。但添加 1% AKG 组  $\alpha$ -淀粉酶活力与豆粕组相比明显下降, 这与以往的研究不同, 具体原因需要进一步研究。

徐奇友等<sup>[29]</sup>在哲罗鱼 (*Hucho taimen*) 仔鱼饲料中添加 0.50%~0.75% Ala-Gln, 结果显示肠道中蛋白酶和脂肪酶的活性在 Ala-Gln 作用下明显提升, 推测这种提升效果与谷氨酰胺能促进动物肠道和肝胰腺组织的发育有关<sup>[29-30]</sup>。在本研究中, 添加 2% Ala-Gln 组与豆粕组相比, 消化酶的活性也呈现出提高的趋势, 这与哲罗鱼的研究结果一致。但 1% AGn 组淀粉酶和胰蛋白酶活性低于对照组, 2% AGn 组淀粉酶和胰蛋白酶活性高于对照组, 造成此结果原因与 Ala-Gln 的添加量有关。这与吴桐强等<sup>[5]</sup>在草鱼的研究结果一致, 低于 0.50% 时脂肪酶和胰蛋白酶活性低于对照组, 而对淀粉酶活性无明显影响; 0.50%~1.00% 时淀粉酶、脂肪酶和胰蛋白酶活性高于对照组。虽然本研究中 Ala-Gln 的添加量较高, 但其影响趋势相同, 产生差异的原因是由于物种的不同。

### 3.3 三丁酸甘油酯、 $\alpha$ -酮戊二酸和丙氨酰-谷氨酰胺对罗氏沼虾免疫功能的影响

正常生理状况下, 水生动物体内产生超氧自由基的能力和 SOD 清除超氧自由基的能力处于动态平衡的状态。当无法清除体内的氧自由基时, 过量的氧自由基会产生过氧化物(例如 MDA)损害细胞, 进而出现氧化应激<sup>[31]</sup>。本研究表明, 添加 Ala-Gln、AKG 和 TB 对罗氏沼虾的 MDA 含量、SOD 活性未产生影响, 这与前期的研究结果不同。原因是本研究中豆粕添加量对于罗氏沼虾生理机能造成的不良作用在自身可调节限度内。

从免疫基因的表达水平而言, caspase-8 和 caspase-3 分别是 caspase 级联反应的启动者和执行者的核心, 是细胞凋亡和凋亡发生的关键步骤, 也是任何凋亡信号传导的共同通路<sup>[32-33]</sup>。本研究结果显示, TB、AKG 和 Ala-Gln 对罗氏沼虾 caspase-3 基因表达无影响, 但与 TB 和 Ala-Gln 相比, 添加 1% AKG 的罗氏沼虾 caspase-8 相对表达

量明显提高。吕小辉等<sup>[34]</sup>在鼠中的研究发现, AKG 可以抑制 caspase 的活化, 这与本研究的结果不一致, 具体原因有待进一步研究。TOR 信号通路可将环境营养信号和代谢过程关联并维持细胞内稳态<sup>[35]</sup>。本研究中, TB、AKG 和 Ala-Gln 对罗氏沼虾的 TOR 表达没有影响, 说明添加 TB、AKG 和 Ala-Gln 对罗氏沼虾物质代谢没有促进作用。TNF- $\alpha$  是活化的单核细胞和巨噬细胞合成和分泌的最重要的炎症因子之一, 具有细胞毒性, 其毒性作用会抑制蛋白质合成功能<sup>[36]</sup>。本研究发现, 与豆粕组相比, 花生粕组 TNF- $\alpha$  表达明显下调, 同时, 添加 TB 后 TNF- $\alpha$  表达明显降低, 说明豆粕相对花生粕更易引起罗氏沼虾炎症相关蛋白的表达, 而添加 TB 可以明显改善这种影响。

#### 4 结论

(1) 豆粕饲料中添加 TB、AKG 和 Ala-Gln 对罗氏沼虾生长性能、抗氧化能力没有影响。

(2) 与花生粕相比, 豆粕明显降低罗氏沼虾消化能力。豆粕饲料中添加 TB、AKG 和 Ala-Gln 可以改善豆粕对罗氏沼虾消化能力的影响, 其中 Ala-Gln 的效果优于 TB 和 AKG。

(3) 与添加花生粕相比, 豆粕促进罗氏沼虾肠道细胞凋亡和相关炎症蛋白的表达, 添加 TB 可以改善豆粕的这种不良影响。

#### 参考文献:

- [1] Carmona P U. Etiology of soybean-induced enteritis in fish[D]. The Netherlands: Wageningen University, 2008.
- [2] Grisdale-helland B, Helland S J, Baeverfjord G, et al. Full-fat soybean meal in diets for Atlantic halibut: Growth, metabolism and intestinal histology[J]. Aquaculture Nutrition, 2002, 8(4): 265-270.
- [3] Krogdahl Å, Bakke-McKellep A M, Baeverfjord G. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. Aquaculture Nutrition, 2003, 9(6): 361-371.
- [4] Volatiana J A, Wang L, Gray N, et al. Tributyrin-supplemented high-soya bean meal diets of juvenile black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*: Study on growth performance and intestinal morphology and structure[J]. Aquaculture Research, 2020, 51(1): 135-146.
- [5] Wu T Q, Zhong L, Liu Z P, et al. Effects of glutamine dipeptide on growth, serum biochemistry, immunity indexes and intestinal morphology of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(8): 3682-3689. [吴桐强, 钟蕾, 刘庄鹏, 等. 谷氨酰胺二肽对草鱼幼鱼生长、血清生化、免疫指标及肠道组织结构的影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(8): 3682-3689.]
- [6] Wei Y Y. Effects of dietary  $\alpha$ -ketoglutarate supplementation on growth performance, serum biochemical indices and intestinal development of songpu mirror carp (*Cyprinus carpio*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014. [位莹莹.  $\alpha$ -酮戊二酸对松浦镜鲤生长性能、血清生化和肠道发育的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.]
- [7] Liu Y, Zhou X W, Gao R F, et al. Effect of soybean meal replacement with peanut meal on growth performance, muscle tissue composition and physiological and biochemical indexes of *Cyprinus carpio* Jian II [J]. Feed Research, 2021, 44(10): 40-44. [刘毅, 周鑫蔚, 高仁法, 等. 花生粕替代豆粕对津新鲤 2 号生长性能、肌肉营养组成和生理生化指标的影响[J]. 饲料研究, 2021, 44(10): 40-44.]
- [8] Fan Z, Peng F, Li J N, et al. Effects of  $\alpha$ -ketoglutarate on growth performance, antioxidant capacity and ammonia metabolism against chronic carbonate alkalinity stress in Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio* Songpu)[J]. Aquaculture Research, 2020, 51(5): 2029-2040.
- [9] Liu Y, Chen Z C, Dai J H, et al. The protective role of glutamine on enteropathy induced by high dose of soybean meal in turbot, *Scophthalmus maximus* L.[J]. Aquaculture, 2018, 497: 510-519.
- [10] Wang L S, Xu Q Y, Wang C A, et al. Effects of dietary  $\alpha$ -ketoglutarate supplementation on the antioxidant defense system and HSP 70 and HSP 90 gene expression of hybrid sturgeon *Acipenser schrenckii* ♀ × *A. baerii* ♂ exposed to ammonia-N stress[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(5): 2266-2277.
- [11] Zhu W L, Tan P, Lou B, et al. Supplementation of a soybean oil-based diet with tributyrin influences growth, muscle composition, intestinal morphology, and expression of immune-related genes of juvenile yellow drum (*Nibea albiflora* Richardson, 1846)[J]. Aquaculture International, 2020, 28(5): 2027-2043.
- [12] Hosain M E, Amin S M N, Kamarudin M S, et al. Effect of salinity on growth, survival, and proximate composition of *Macrobrachium rosenbergii* post larvae as well as zooplankton composition reared in a maize starch based biofloc system[J]. Aquaculture, 2021, 533: 736235.
- [13] Wei J, Tian L, Wang Y K, et al. Effects of salinity, photoperiod, and light spectrum on larval survival, growth, and

- related enzyme activities in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Aquaculture, 2021, 530: 735794.
- [14] Ni M, Chen X F, Gao Q, et al. Comparative experimental study on pond culture of different strains of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Scientific Fish Farming, 2020, (10): 31-33. [倪蒙, 陈雪峰, 高强, 等. 不同品系罗氏沼虾池塘养殖对比实验研究[J]. 科学养鱼, 2020, (10): 31-33.]
- [15] Chen D. Effects of dietary  $\alpha$ -ketoglutarate supplementation on growth performance, antioxidant capacity, digestive enzyme activity and gene expression of hybrid sturgeon (*Acipenser schrenckii* ♀ × *A. baeri* ♂)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015. [陈迪.  $\alpha$ -酮戊二酸对杂交鲟幼鱼生长性能、抗氧化能力、消化酶及相关基因表达的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.]
- [16] Zhai Q L, Zhang C X, Sun Y Z, et al. Effects of tributyrin and mannan-oligosaccharide on growth performance, body composition and intestinal health indices of tawny puffer (*Takifugu flavindus*)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(8): 2197-2208. [翟秋玲, 张春晓, 孙云章, 等. 三丁酸甘油酯和甘露寡糖对菊黄东方鲀生长性能、体组成及肠道健康指标的影响[J]. 动物营养学报, 2014, 26(8): 2197-2208.]
- [17] He M. Study on the effects of fermented soybean meal in fish meal replacement and the improvement of glutamine and *Clostridium butyricum* on its effectiveness in the diet of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [何明. 大口黑鲈饲料中发酵豆粕替代鱼粉的效果及谷氨酰胺、丁酸梭菌提升其效价的营养策略研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [18] Yang N D, Fu G C. Research on substitute of fish meal by fermented soybean meal in feed of *Litopenaeus vannamei*[J]. Feed Industry, 2008, 29(10): 24-26. [杨耐德, 符广才. 凡纳滨对虾饲料中发酵豆粕替代鱼粉的研究[J]. 饲料工业, 2008, 29(10): 24-26.]
- [19] Hidalgo M C, Urea E, Sanz A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities[J]. Aquaculture, 1999, 170(3-4): 267-283.
- [20] Li Y, Wen A X, Luo M L. A preliminary study of *Misgurnus anguillicaudatus* growth mechanism by glutamine[J]. Feed Industry, 2014, 35(2): 37-43. [李源, 温安祥, 骆美琳. 谷氨酰胺促泥鳅生长机理的初步研究[J]. 饲料工业, 2014, 35(2): 37-43.]
- [21] Risley C R, Kornegay E T, Lindemann M D, et al. Effect of feeding organic acids on selected intestinal content measurements at varying times postweaning in pigs[J]. Journal of Animal Science, 1992, 70(1): 196-206.
- [22] Zhu X P, Zhang D F. Effects of several acidifiers on gastric acid secretion, gastrointestinal digestive enzyme activity and microbial flora of weaned piglets[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2007, (3): 31-33. [朱晓萍, 张德福. 几种酸化剂对断奶仔猪胃酸分泌、胃肠道消化酶活性和微生物菌群的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2007, (3): 31-33.]
- [23] Mineo H, Hashizume Y, Hanaki Y, et al. Chemical specificity of short-chain fatty acids in stimulating insulin and glucagon secretion in sheep[J]. The American Journal of Physiology, 1994, 267(2 Pt 1): E234-E241.
- [24] Hou Y B, Hou Y, Yao L, et al. Effects of chromium yeast, tributyrin and bile acid on growth performance, digestion and metabolism of *Channa argus*[J]. Aquaculture Research, 2019, 50(3): 836-846.
- [25] Tian L. Effects of dietary sodium butyrate on intestinal health and the potential mechanisms in young grass carp[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2017. [田莉. 丁酸钠对草鱼肠道、鳃和机体健康及肌肉品质的作用及其机制[D]. 雅安: 四川农业大学, 2017.]
- [26] Li Y M, Liu Y L, Shi Y, et al. Effects of tributyrin on body composition, body index and intestinal digestive enzymes of *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2019(24): 185-187, 189. [李雅敏, 刘艳莉, 石勇, 等. 三丁酸甘油酯对草鱼幼鱼体成分与形体指标及肠道消化酶的影响[J]. 现代农业科技, 2019(24): 185-187, 189.]
- [27] Cheng L, Peng F, Li J N, et al. Effect of different carbonate alkalinity and dietary  $\alpha$ -ketoglutarate levels on intestinal morphology and activity of digestive enzymes of mirror carp[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2020, 33(1): 19-24. [程龙, 彭丰, 李晋南, 等. 不同碱度和 $\alpha$ -酮戊二酸水平对松浦镜鲤肠道形态及消化酶活性的影响[J]. 水产学杂志, 2020, 33(1): 19-24.]
- [28] Wei Y Q. Effects of  $\alpha$ -ketoglutarate supplementation on nitrogen metabolism, antioxidant capacity and intestinal mucosal morphology and function of songpu mirror carp (*Cyprinus carpio*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015. [魏玉强.  $\alpha$ -酮戊二酸对松浦镜鲤氮代谢、抗氧化能力和小肠粘膜形态与功能的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.]
- [29] Xu Q Y, Wang C G, Xu H, et al. Effects of glutamine dipeptide on intestine antioxidant, abilities of digestion and absorption of *Hucho taimen* larvae[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(2): 351-356. [徐奇友, 王常安, 许红, 等. 饲料中添加谷氨酰胺二肽对哲罗鱼仔鱼肠道抗



- 氧化活性及消化吸收能力的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 351-356.]
- [30] Wang L D, Zhang J M, Gao Z C, et al. Effect of dietary glutamine supplementation on trypsin activities in Pancreas and small intestine in the early-weaned piglets[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2003, 23(1): 59-61. [王连娣, 张军民, 高振川, 等. 谷氨酰胺对早期断奶仔猪胰腺及小肠胰蛋白酶活性的影响[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(1): 59-61.]
- [31] Wang X M, Zhang Y, Guo R. The application of tributyrin in carp juveniles compound feed[J]. Hebei Fisheries, 2021(1): 1-3, 16. [王晓明, 张宇, 郭冉. 三丁酸甘油酯在鲤幼鱼配合饲料中的应用[J]. 河北渔业, 2021(1): 1-3, 16.]
- [32] Mao D W, Chen Y Q, Wang L, et al. Relationship of caspase-8 and caspase-3 to apoptosis[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2008, 10(10): 148-150. [毛德文, 陈月桥, 王丽, 等. Caspase-8 及 Caspase-3 与细胞凋亡[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(10): 148-150.]
- [33] Yu G L, Liang X Q, Xie X M, et al. Dynamic changes of cardiomyocyte apoptosis and myocardial fibrosis during the development of cardiac hypertrophy in hypertensive rats[J]. Chinese Journal of Hypertension, 2001, 9(4): 322-325. [余国龙, 梁晓秋, 谢秀梅, 等. 高血压大鼠心脏肥厚过程中心肌细胞凋亡心肌纤维化动态观察[J]. 高血压杂志, 2001, 9(4): 322-325.]
- [34] Lyu X H, Zhang Y X, Li S J, et al. Alpha-ketoglutarate attenuates endotoxin/D-galactosamine-induced acuteliver injury in mice[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2021, 43(2): 319-325. [吕小辉, 张煜鑫, 李思佳, 等.  $\alpha$ -酮戊二酸减轻脂多糖/D-半乳糖胺诱导的小鼠急性肝损伤[J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43(2): 319-325.]
- [35] Song X D, Zhang Y, Zou X. Fungal cell growth and metabolism regulated by the TOR signal pathway[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(10): 1691-1700. [宋晓丹, 张园, 邹祥. TOR 信号调控真菌细胞的生长与代谢[J]. 微生物学报, 2018, 58(10): 1691-1700.]
- [36] Yang B, Wang M M, Sun L, et al. Effect of Fushen recipe on peritoneal function and VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$  in uremic peritoneal dialysis rats[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2021, 31(4): 15-20. [杨波, 王孟孟, 孙林, 等. 扶肾方对尿毒症腹膜透析大鼠腹膜功能及 VEGF、TNF- $\alpha$ 、IL-12、IFN- $\gamma$  的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 15-20.]

## Effects of tributyrin, $\alpha$ -ketoglutarate, and alanyl-glutamine on the growth performance, digestive enzyme activity, and immune gene expression of *Macrobrachium rosenbergii*

YANG Xin<sup>1</sup>, ZHAO Jingyi<sup>1</sup>, YE Jinyu<sup>1,2,3</sup>, YANG Guoliang<sup>1,2,3</sup>, XU Qiyou<sup>1,2,3</sup>

1. College of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou 313000, China;

2. Nation Local Joint Engineering Laboratory of Aquatic Animal Genetic Breeding and Nutrition, Huzhou 313000, China;

3. Zhejiang Province Key Laboratory of Aquatic Resources Conservation and Development, Huzhou 313000, China

**Abstract:** Due to the current low production levels and high price of fish meal, soybean meal has become the best source of protein for replacing fish meal in aquatic feed, as it is rich in crude protein and has a balanced amino acid composition. However, soybeans and their products contain anti-nutritional factors such as trypsin inhibitors, soybean antigen protein, saponins, and oligosaccharides, which cause significant intestinal injury in aquatic animals and are likely to cause intestinal diseases. To maintain the intestinal health of aquatic animals, some functional additives can be added to soybean meal feed to improve intestinal health. Among them, tributyrin (TB),  $\alpha$ -ketoglutarate (AKG), and alanyl-glutamine (Ala-Gln) can promote intestinal development and improve intestinal health. This experiment examines the effects of TB, AKG, and Ala-Gln on the growth, digestive enzyme activity, and immune function gene expression of *Macrobrachium rosenbergii*. Two feeds supplemented with 40% soybean meal and 33.70% peanut meal, respectively, were used as the control groups (named SM group and PM group), while 0.10% and 0.20% TB (TB1 group and TB2 group), 1.00% and 2.00% of AKG (AKG1 group and AKG2 group), 1.00% and 2.00% of Ala-Gln (AGn1 group and AGn2 group) were added to soybean meal feed, respectively, to form 8 kinds of isonitrogenous and isoenergetic feed for *M. rosenbergii*. A total of 640 *M. rosenbergii* with an initial weight of  $(0.10 \pm 0.02)$  g were selected and randomly divided into 8 groups with 4 replicates in each group and 20 tails in each replicate. The trial period was 8 weeks. Compared with the soybean meal group, the TB, AKG, and AGn groups exhibited no significant differences in growth performance, serum superoxide dismutase activity, malondialdehyde content, TOR, or caspase-3 gene expression of *M. rosenbergii* ( $P > 0.05$ ). Intestinal and hepatopancreas lipase, trypsin, and  $\alpha$ -amylase digestive enzyme activities of the TB, AKG, and AGn2 groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ), and these activities were significantly higher in the AGn2 group than in other experimental groups ( $P < 0.05$ ). The trypsin activity in the intestine of the AKG2 group was second and was significantly higher than in the other groups ( $P < 0.05$ ). Although the greatest  $\alpha$ -amylase activity in the intestine was seen in the AKG1 group and was significantly higher than that in the other groups ( $P < 0.05$ ), and the relative expression of caspase-8 was significantly higher in the AKG1 group than in the other groups ( $P < 0.05$ ), the relative expression of TNF- $\alpha$  was significantly lower in the PM group and the TB group ( $P < 0.05$ ). The results show that the addition of TB, AKG, and Ala-Gln had no effect on the growth performance and antioxidant function of *M. rosenbergii*. The addition of TB, AKG, and Ala-Gln can improve digestive enzyme activity and the addition of 2% Ala-Gln significantly improved the activity of digestive enzymes. Soybean meal is more effective than peanut meal for up-regulating the expression of TNF- $\alpha$ . Adding TB can reduce the expression of inflammatory proteins and intestinal cell apoptosis caused by TNF- $\alpha$  in *M. rosenbergii*.

**Key words:** tributyrin;  $\alpha$ -ketoglutarate; alanyl-glutamine; *Macrobrachium rosenbergii*; growth; immunity; digestive enzymes

**Corresponding author:** XU Qiyou. E-mail: xuqiyou@sina.com