

文章编号:1005-8737(2001)04-0018-05

草鱼肠道离体培养的适宜条件

曾端,叶元土,罗莉,林仕梅
(西南农业大学水产系,重庆400716)

摘 要:取1龄草鱼(体长20~25 cm)肠道制成常规肠囊样本,分别使用 Ringer's 液、山本液、今村液以及1 mmol/L 亮氨酸(Leu)溶液和1 uci/ml H^3 -Leu 溶液进行体外培养,并设定培养条件分别为:培养温度20、25、30和37℃,培养时间5、10、30及60 min。测定在各条件下草鱼肠道碱性磷酸酶(AKP)活性和Leu的吸收积累量。结果显示,1龄草鱼肠道离体培养最佳条件为:培养液为山本液(NaCl 0.75%, KCl 0.02%, $CaCl_2$ 0.02%, $NaHCO_3$ 0.002%),培养时间为5 min,培养温度为25℃。此时,草鱼肠道 AKP 活性为51.61 金氏单位,对Leu的吸收速率为0.047 2 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$ 。

关键词:草鱼;肠道;离体培养;适宜条件;碱性磷酸酶;亮氨酸吸收积累量

中图分类号:Q959.468;S963

文献标识码:A

自20世纪50年代末采用离体培养方法研究肠道对糖类物质的吸收状况起,动物器官的离体培养在动物对营养物质吸收和代谢的研究中已得到广泛应用^[1~6]。离体培养的关键是保持动物器官组织具有正常的生理活性。碱性磷酸酶(AKP)是一种与多种营养物质主动运输相关的酶^[7,8],因此众多学者测定其活性来衡量消化器官的吸收状况^[9~15]。本实验以 AKP 活性作为判定肠道组织生理活性的指标确定适宜的培养条件,同时还测定了亮氨酸(Leu)在草鱼肠道中的吸收积累量,从另一个方面证实培养条件的适宜性。通过这两个衡量指标筛选出最适的草鱼肠道离体培养条件,为进一步研究草鱼肠道对营养物质的吸收状况作前期准备。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验用鱼为1龄草鱼,购自歇马农贸市场,体长

20~25 cm,暂养于水槽中,养鱼用水为经晾晒脱氯的自来水,供水为微流水,用气泵充气供氧。驯化及实验期间水温控制在15~25℃,以浮萍为饵料。

1.2 培养液

1.2.1 培养用生理盐水 选择在动物及鱼类器官组织培养中经常使用的3种溶液进行研究,它们分别是:

(1) Ringer's 液: NaCl 128 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L; $CaCl_2$ 2.5 mmol/L, $NaHCO_3$ 20 mmol/L, KH_2PO_4 1.2 mmol/L, $MgSO_4$ 1.2 mmol/L。

(2) 山本液: NaCl 0.75%, KCl 0.02%, $CaCl_2$ 0.02%, $NaHCO_3$ 0.002%。

(3) 今村液: NaCl 0.75%, KCl 0.01%, $CaCl_2$ 0.01%, $NaHCO_3$ 0.02%。

1.2.2 其他培养液 Leu 溶液 1 mmol/L,以山本液配制; H^3 -Leu 溶液 1 uci/ml,以山本液配制 0.02 mol/L。

1.2.3 试剂 pH7.4 磷酸缓冲液。磷酸苯二钠、高氯酸、 H_2O_2 皆为分析纯。

1.3 肠囊制备

草鱼脊髓捣毁后,立即取出整个肠道,去除内容物及附着物,将肠道翻转,结扎肠道两端,制成常规

收稿日期:2000-11-24

基金项目:重庆市科委资助项目(97-4967)

作者简介:曾端(1973-),女,理学硕士,助研,现工作于北京营养源研究所。

使用的肠囊样本。

1.4 实验步骤

1.4.1 培养条件对草鱼肠道 AKP 酶活性影响

(1)培养温度 培养皿中加入 10 ml 山本液,放入水浴锅中,分别采用 20、25、30、37℃ 水浴加热,充氧 5 min 后,将肠囊放入培养皿进行试验;培养 5 min 后取出肠囊,剪去结扎外部分,称重,加入量为样品体积 10 倍(10 mg:ml)的磷酸盐缓冲液匀浆,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,采用磷酸苯二钠为底物的金氏法^[16]测定 AKP 酶活力,并规定 30℃ 下每 15 min 生成 1 μ mol 酚所需酶量为 1 个金氏单位。每个试验做 3 个平行。

(2)培养时间 培养皿中加入 10 ml 山本液,放入水浴锅中,25℃ 水浴加热,充氧 5 min 后,放入肠囊,分别培养 5、10、30、60 min 后取出肠囊,剪去结扎外部分,称重,测 AKP 酶活力方法同上。每个试验做 3 个平行。

(3)培养液种类 培养皿中分别加入 10 ml Ringer's 液、今村液、山本液,放入 25℃ 水浴锅中水浴加热,充氧 5 min 后放入肠囊,培养 10 min 后取出,剪去结扎外部分,称重,测 AKP 酶活力方法同上。每个试验做 3 个平行。

1.4.2 培养条件对草鱼肠道吸收 Leu 的影响 培养皿中加 10 ml 的 Leu 溶液,其中每 ml 含有 $1\mu\text{Ci } \text{H}^3\text{-Leu}$,充氧 5 min 后放入肠囊,通过水浴锅调节不同培养温度,在不同培养时间后取出肠囊,山本液冲洗肠囊,剪去结扎外部分,称重,加入量为样品体积 5 倍(5 mg:ml)高氯酸,量为样品体积 7 倍(7 mg:ml) H_2O_2 ,70℃ 消化至透明无杂质,取 50 μl 消化液于闪烁瓶中,通过液体闪烁计数器测量其放射性强度。每个试验做 3 个平行。

1.5 数据处理

各组间的差异显著性采用单因素方差检验,并用新复极差法进行两两之间的多重比较。

2 结果分析

2.1 单因素培养条件对草鱼肠道 AKP 酶活性影响

2.1.1 培养温度 结果如图 1 所示,4 个温度梯度中,草鱼肠道在 25℃ 时,其 AKP 酶活性最高,在 37℃ 时酶活性较最高值降低了近 25% ($P < 0.05$)。

2.1.2 培养时间 试验结果如图 2 所示,草鱼肠道 AKP 酶活性在 10 min 内变化不大,随着培养时间的增加,30 min 后 AKP 酶活性降低 7%,1h 后酶活

性降低了近一半($P < 0.05$)。

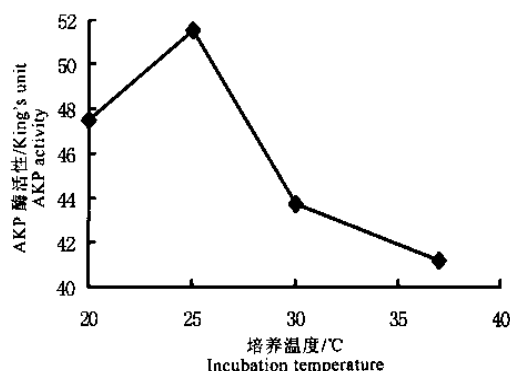


图 1 AKP 酶活性随培养温度变化的曲线

Fig.1 AKP activity curve at different incubation temperature

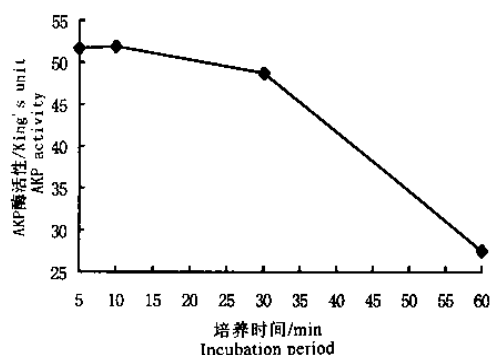


图 2 AKP 酶活性随培养时间变化的曲线

Fig.2 AKP activity curve in different incubation period

2.1.3 培养液种类 Ringer's 液、今村液、山本液培养的肠囊,其 AKP 酶活性分别为 55.94、62.40、61.46。今村液与山本液对 AKP 酶活性影响无显著区别,而 Ringer's 液培养的肠囊 AKP 酶活性较低。可见 Ringer's 液对于鱼类组织培养不太适合。

2.2 双因素培养条件对草鱼肠道 AKP 酶活性影响

温度和时间 2 因素作交叉组合试验研究 AKP 酶活性,其结果见表 1。肠道 AKP 酶在 25℃ 时 10 min 内活性变化不大,且酶活性最高($P < 0.05$)。

2.3 双因素培养条件对草鱼肠道吸收 Leu 的影响

由表 2 可看出,随着培养时间的增加,草鱼肠道对 Leu 的吸收量在不断积累,10 min 内增加速率较快,至 30 min 时仍在增加,但速率减慢($P < 0.01$)。叶元士^[17]在草鱼等鱼类肠道吸收实验中发现,在 120 min 后,离体肠道对 Leu 等氨基酸的吸收仍在

继续。本实验选择肠道 Leu 吸收速率较快(5 min)的时间段作为培养时间,使草鱼离体肠道在更接近活体的条件下进行研究。由表 2 可知,温度对草鱼肠道吸收 Leu 量也有较大影响。为了更接近正常生长条件,确定 25℃ 为培养温度。

表 1 双因素培养条件对肠道 AKP 酶活性的影响

Table 1 Effects of doublefactor incubation condition on intestinal AKP activity 金氏单位 King's unit

培养时间/min Incubation time	培养温度/℃ Incubation temperature		
	20	25	30
5	37.79	51.64	49.56
10	42.97	51.86	41.74
30	36.39	48.67	39.14

表 2 双因素培养条件对肠道 Leu 的吸收速率的影响

Table 2 Intestinal absorption rate of Leu affected by two factors of incubation condition

培养时间/min Incubation time	培养温度/℃ Incubation temperature		
	20	25	30
5	0.043	0.0472	0.0442
10	0.0488	0.0505	0.036
30	0.0252	0.023	0.0172

3 讨论

器官组织在离体条件下的生理活性的衡量指标,不同的动物,不同研究者有着不同的方法。Karasov 等^[3]测定大鼠离体肠道的长度、重量和表面积作为器官活力的指标,以此确定了大鼠肠道的培养条件。麦康森^[18]以自发节律性蠕动次数衡量中国对虾离体中肠的活力,并以 90 min 内中国对虾中肠的生理状态基本稳定为标准确定了培养条件。然而本实验前期研究中发现,鱼类肠道收缩性极大,有时在短时间内同一肠道其长度测定值相差达 3 cm 以上,肠重随肠道附着物、肠内容物多少变化也很大,因此这 3 个指标用于鱼类实验中其准确性都较低。实验中还发现草鱼肠道没有明显的蠕动,因此,要测定草鱼离体肠道活性也不能采用自发节律性蠕动次数为指标。

目前对 AKP 研究较多, Sastry^[9]通过测定 AKP 活性研究了 2 种真骨鱼肠道的吸收部位; Stroband^[10]利用 AKP 活性以及其他一些组织化学方法研究了草鱼不同部位的功能。在使用肠道刷状

缘细胞培养法(BBM 法)研究营养物质的吸收时,也以 AKP 活性指标来衡量 BBM 的纯度和活性^[11~15]。本实验以 AKP 活性及 Leu 在草鱼肠道中的吸收积累量综合评价草鱼离体肠道的生理活性。

不同动物离体肠道的培养温度不同。Karasov^[2,3]在 37℃ 培养大鼠、小鼠肠道以研究氨基酸的吸收,兔子^[11~15]、猪^[19]、人^[20]等哺乳类动物的肠道培养通常也采用 37℃;中国对虾^[18]肠道培养温度为(25±0.1)℃;变色门齿鲷、鲈鱼^[21]肠道培养温度为(23±1)℃;底鳉^[5]肠道培养温度为 15℃。不同动物消化道适宜的培养温度不同,这可能与动物种类、生活环境有关。人、小鼠等哺乳类属于恒温动物,体温最高;中国对虾、门齿鲷、鲈鱼属于温水性变温动物,体温较低;底鳉属于冷水性鱼类,体温最低。适宜的培养温度更能保证离体器官的活性。草鱼属于温水性鱼类,本实验选择 25℃ 为其肠道培养温度。

培养时间对动物肠道的活力影响较大。麦康森^[18]认为在适宜培养条件下,90 min 内中国对虾中肠生理状态变化不大,而 Ronaldo^[22,23]发现小鼠肠道细胞破坏量随培养时间的增加而增加。Ronaldo 将小鼠肠道置于培养液(Ringer's 液+EDTA 1.5 mmol/L+DDT 0.5 mmol/L+BSA 1 mg/ml)中,加热(37℃)震荡(90、30HZ)分别培养 10~115 min 后,取出肠道脱水包埋切片,光镜观察。Ronaldo 将肠粘膜由上至下分为 5 部分:绒毛顶部、上部、中部、下部、隐窝。培养 10 min 后,绒毛顶部细胞脱落,而其他部位无影响;35 min 后,所有的上部细胞和大多数中部细胞脱落,隐窝无影响;115 min 后,几乎所有细胞都脱落,只剩下 1 个裸露的肠粘膜,且无胞质的空泡和异形细胞所占比例也大大高于新鲜肠细胞。这与本研究结果一致,本实验中,草鱼肠道培养 60 min 后,肠道活力降低了一半。Ronaldo 在实验中还发现,培养 40 min 内,肠道的 AKP、蔗糖酶等酶类活性变化不大。这与本实验结果也近似,即 30 min 内草鱼肠道 AKP 变化不大。Ronaldo 认为其主要原因是肠细胞虽然脱落,但仍然粘附在肠粘膜上,因此对酶活力影响不大。这可能是肠道离体培养 2 h 后仍在吸收氨基酸的原因之一^[17]。

培养液对离体肠道的影响也较大,不同种类动物需要不同的培养液。淡水鱼类也有其自己适宜的培养液,用于生理溶液需要尽可能地使离体器官所

处的环境因素相近似,包括离子成分及比例、渗透压、酸碱度、温度、溶氧及营养水质等。

4 结论

(1)从肠道 AKP 酶活性及其对 Leu 吸收的研究可以表明,适宜条件下培养草鱼离体肠道,对肠道 AKP 酶活性以及 Leu 吸收量的影响都不大。

(2)综合实验结果,1 龄草鱼肠道离体培养条件为:培养温度 25℃,培养时间 5 min,培养液为山本液。

参考文献:

- [1] Matthews D, Leonard Laster. Competition for intestinal transport among five neutral amino acids[J]. Am J Physiol, 1965, 208(4): 601 - 605.
- [2] Karasov W H, Solberg D H, Diamond J M. Dependence of intestinal amino acid uptake on dietary protein or amino acid levels[J]. Am J Physiol, 1987, 252(G15): 614 - 625.
- [3] Karasov W, Solberg D, Carter S, et al. Uptake pathways for amino acids in mouse intestine[J]. Am J Physiol, 1986, 251(G14): 501 - 508.
- [4] Huang K C, Rout W R. Intestinal transport of sugar and aromatic amino acids in Killifish, *Fundulus heteroclitus* [J]. Am J Physiol, 1967, 212(4): 799 - 803.
- [5] Miller S, William B. Pathways of cycloleucine transport in killifish small intestine[J]. Am J Physiol, 1979, 237(E6): 567 - 572.
- [6] Koll A. Intestinal transport of the amino acids L-Valine, L-Leucine and L-Isoleucine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [R]. Berlin: Thesis, Ludwig - Maximilians - Universitat Munchen. 1993. 62.
- [7] Linscheer W, Malagelada G J R, Fishman, W H. Diminished oleic acid absorption in man by L-phenylalanine inhibition of an intestinal phosphohydrolase[J]. Nature, 1971, 231: 116 - 117.
- [8] Kaltenbach J C, Libson M J, Wang C H K. Histochemical study of the amphibian digestive tract during normal and thyroxineinduced metamorphosis. 1 Alkaline phosphatase [J]. J Exp Zool, 1977, 202: 103 - 120.
- [9] Sastry V K. Alkaline and acid phosphatase in the digestive system of two teleost fishes[J]. Anat Anz Bd, 1975, 137: 159 - 165.
- [10] Stroband H W J, Meer V D, Timmermans P M. Regional functional differentiation in the gut of the grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.) [J]. Histochemistry, 1979, 64: 235 - 249.
- [11] Ganapathy V, Leibach H. Is intestinal peptide transport energized by a proton gradient[J]. Am J Physiol, 1985, 249(G12): 153 - 160.
- [12] Ganapathy V, Leibach F H. Role of pH gradient and membrane potential in dipeptide transport in intestinal and renal brush - border membrane vesicles from the rabbit [J]. J Bio Chem, 1983, 258(23): 14 189 - 14 192.
- [13] Ganapathy V, Leibach F H. Peptide transport in intestinal and renal brush border membrane vesicles[J]. Life Sciences, 1982, 30: 2 137 - 2 146.
- [14] Ganapathy V, Mendicino J F, Leibach F H. Effect of papain treatment on dipeptide transport into rabbit intestinal brush border vesicles[J]. Life sciences, 1981, 29: 2 451 - 2 457.
- [15] Ganapathy V, Mendicino J F, Leibach F H. Transport of glycyll-proline into intestinal and renal brush border vesicles from rabbit [J]. J Bio Chem, 1981, 246(1): 118 - 124.
- [16] 北京农业大学. 动物生物化学实验指导[M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [17] 叶元土. 南方大口鲇胃肠道在离体条件下对亮氨酸的吸收 [A]. 中国水产学会水产动物营养与饲料研究会论文集(第 I 集) [C]. 北京: 海洋出版社, 1997. 73 - 78.
- [18] 凌康森. 中国对虾中肠对氨基酸运输的动力学研究[J]. 海洋与湖沼, 1987, 18(5): 426 - 430.
- [19] Rhoads Jm, Keku E, Woosely J, et al. L-glutamine stimulates jejuna sodium and chloride absorption in pig rotavirus enteritis[J]. Gastroenterology, 1991, 100: 683 - 691.
- [20] Malo C. Multiple pathways for amino acid transport in brush border membrane vesicles isolated from the human fetal small intestine[J]. Gastroenterology, 1991, 100: 1 644 - 1 652.
- [21] Neff S S, Musacchia M J. Intestinal absorption of L-Leucine in vitro in fish (*Stenotomus versicolor* and *Ictalurus Nebulosus*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1967, 21: 337 - 343.
- [22] Ronaldo P F, Gregory A A. Sugar and amino acid transport in fish intestine[J]. Comp Biochem Physia, 1984, 69a: 99 - 111.
- [23] Ronaldo P F, Villenas S A, Diamond J. Regulation of brush - border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine[J]. Am J Physiol, 1992, 262(G25): 1 047 - 1 059.

Optimum condition of intestinal incubation in vitro of grass carp, *Ctenoparyngoden idellus*

ZENG Duan, YE Yuan-tu, LUO Li, LIN Shi-mei

(Fisheries Department, Southwest Agriculture University, Chongqing 400716, China)

Abstract: The routine intestine sample was prepared from 1-year-old grass carp (*Ctenoparyngoden idellus*, body length 20~25 cm). Using Ringer's solution, Yamamoto solution, Yimura solution as well as 1 mmol/L Leu solution and 1 uci/ml H^3 -Leu solution as the culture solutions, the experiment conditions were designed as: culture temperature 20, 25, 30 and 37°C; culture time 5, 10, 30 and 60 min. Under each double-factor condition the activity of AKP and the accumulated absorption of Leu were tested and the results show that the optimum condition for intestinal incubation in vitro of 1-year-old grass carp is: culture temperature 25°C, culture time 5 min, culture medium Yamamoto solution (NaCl 0.75%, KCl 0.02%, $NaHCO_3$ 0.002%). Under this condition, the AKP activity is 51.64 King's unit; the Leu-aborbing rate is 0.047 2 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$.

Key words: *Ctenoparyngoden idellus*, intestine; in vitro incubation; optimum condition; ALK; Leu accumulated absorption

[写作知识]

科技论文的摘要

摘要可分为报道性摘要和指示性摘要。科技论文的摘要通常是报道性的,它高度概括了正文中叙述的内容,突出正文的重点,是正文内容最完整的浓缩。它包括论文中的研究目的、研究对象、研究条件和方法、主要结果和结论,以及有关定量数据。

摘要本身应完全独立于正文,它与正文不应有参照关系与互补关系,最好不分段,尽量用文字叙述而避免使用公式或特殊符号。不要对论文内容作诠释和评论。为保证摘要的信息量,摘要的文字最好在 300 字左右。英文摘要原则上应与中文摘要相对应,但有时为了便于对外交流,本刊鼓励英文摘要更详细些。

(王民生 供稿)

[会讯]

国家重点野外科学观测试验站

——珠江口海域渔业生态环境野外观测工作站授牌仪式

2001 年 10 月珠江口海域渔业生态环境野外观测工作站获得授牌,授牌仪式由科技部主办并在延安召开的“国家重点野外台站(试点站)工作会议”上隆重举行。该站位于广州市芳村区白鹤洞西朗,是目前国内唯一被授牌的渔业生态环境野外观测站,其依托单位为中国水产科学研究院珠江水产研究所,以农业部渔业环境监测中心珠江流域监测站为基础组成。该观测站设立了 30 多个监测点,以长期监测珠江口及下游流域渔业生态环境和生物资源变动状况,其主要内容包括对主要养殖水域环境及鱼类主要产卵场生态环境、渔药和重要污染物残留的监测,调查水产品卫生质量,处理渔业水域污染事故以及宣传、贯彻渔业环境保护法律法规,从而为政府有关部门提供科学依据。

(刘 聪 供稿)