

L-苹果酸对吉富罗非鱼肠道结构功能及 肝脏 TCA 循环效率的影响

李 赞, 罗 莉*, 陈任孝, 白富瑾, 敬 婷, 孙玉轩, 钱 前

(西南大学动物科技学院,淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室,
水产科学重庆市市级重点实验室,重庆 400715)

摘要:实验选取体质量为 (37.94 ± 0.09) g 吉富罗非鱼幼鱼 420 尾,随机分为 7 个处理(每个处理 3 个重复,每个重复 20 尾鱼),分别饲喂添加 0(对照)、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 和 32.0 g/kg L-苹果酸的饲料,进行为期 154 d 的生长实验,研究 L-苹果酸对罗非鱼肠道组织结构和功能及肝脏 TCA 循环效率的影响。结果发现,随着 L-苹果酸水平的增加,前肠和中肠绒毛高度、密度、肌层厚度均在 16.0 g/kg 组达到最大值且显著高于对照组($P < 0.05$);后肠绒毛高度、密度和肌层厚度逐渐降低($P < 0.05$)。肠道淀粉酶和脂肪酶活性均在 1.0 g/kg 组达到最大值且显著高于对照组($P < 0.05$);肠道蛋白酶、肝脏 ATP 含量随着 L-苹果酸水平的增加逐渐升高($P < 0.05$);肠 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶活力、肠表皮生长因子(EGF)和肠表皮生长因子受体(EGFR)含量在 16.0 g/kg 组达到最高值;肝脏柠檬酸合酶活力在 8.0 g/kg 到达最大值。研究表明吉富罗非鱼饲料中适量添加 L-苹果酸(1.0~8.0 g/kg),能改善罗非鱼前肠和中肠的形态结构,促进肠粘膜上皮细胞的增殖,提高肠消化和吸收能力,同时提高肝脏 TCA 循环效率。

关键词:吉富罗非鱼; L-苹果酸; 肠道; 肝; TCA 循环

中图分类号: Q 591; S 965

文献标志码: A

当前,随着人们对食品安全和抗生素存在的负面效应的日益关注,世界上许多国家都开始寻求可以促进动物生长的抗生素替代品。酸化剂作为其中一类,受到极大关注。大量研究也证实,酸化剂对鱼类具有促进生长,提高饲料利用率^[1-5];提高消化酶活性^[1,3,5-6]等作用。

L-苹果酸作为一种重要的天然有机酸,在生物体三羧酸(TCA)循环代谢中具有重要作用。目前,L-苹果酸在动物方面,尤其是反刍动物方面的研究表明,苹果酸对提高动物的生产性能^[7-9],胃的 pH 值^[10-12],养分消化率及其代谢^[7,9,13]等均有影响。但在水产动物中研究甚少。本实验以吉富罗非鱼(*Oreochromis nibticus*)为研究对象,在基础饲料中添加不同水平的 L-苹果酸,研究 L-

苹果酸对肠形态指标、肠消化酶、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的含量,肝脏柠檬酸合酶(citrate synthase, CS)及 ATP 产生量等指标的影响,为揭示 L-苹果酸对罗非鱼肠道结构功能及肝脏 TCA 循环代谢的调控规律及作用机理提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼及饲养管理

实验用鱼为吉富罗非鱼幼鱼,购自重庆北碚歇马鱼种场。实验鱼经浓度 3% 的食盐溶液消毒后,暂养于水族缸中,再用基础饲料进行 10 d 驯化。正式实验开始前,选择体质健壮、个体均匀

收稿日期:2013-07-02

修回日期:2013-11-27

资助项目:国家自然科学基金项目(31101909);重庆市自然科学基金(cstc2011jjA80021);中央高校基本科研业务费专项资金资助(XDJK2011C019)

通信作者:罗 莉, E-mail: luoli1972@163.com

[体质量(37.94 ± 0.09) g]的罗非鱼随机分为 7 个处理,每个处理 3 个重复,每个重复 20 尾鱼,饲养在室内淡水循环玻璃水族箱(有效体积 0.32 m³)中。每天按体质量的 3%~4%(根据鱼体大小适时调整投饲量)分 4 次投喂(8:00、11:00、15:00 和 18:00),养殖周期为 154 d。

1.2 实验饲料

根据罗非鱼的营养参数^[14],以秘鲁鱼粉、肉粉、豆粕、棉籽粕、菜籽粕等为主要原料配制基础饲料,其组成及营养水平见表 1。实验饲料分别在基础饲料中添加 0(对照组)、1、2、4、8、16、32 g/kg L-苹果酸(购于 Sigma 公司),制成粒径为 2.0 mm 的颗粒饲料,置于 -20 ℃ 冰箱保存备用。

表 1 基础饲料组成及营养水平
Tab.1 Formulation and nutrient composition of basal diet(DM basis)

项目 items	含量/% content
原料 ingredients	
秘鲁鱼粉 Peru fishmeal	12.0
国产肉粉 meat meal	6.0
豆粕 soybean meal	20.0
棉籽粕 cottonseed meal	10.0
菜籽粕 rapeseed meal	19.0
次粉 wheat middling	16.7
米糠 ricebran	12.0
磷酸二氢钙 calcium biphosphate	2.0
豆油 soybean oil	1.0
氯化胆碱 choline chloride	0.3
预混料 vitamin & mineral premix	1.0
合计 total	100.0
营养水平 nutrient levels	
水分 moisture	7.22 ± 0.04
粗蛋白 crude protein	36.94 ± 0.08
粗脂肪 crude lipid	4.31 ± 0.01
灰分 ash	8.69 ± 0.03

注:添加剂预混料为每千克全价饲料提供:铁 150 mg;铜 3.2 mg;锌 34.1 mg;锰 13.0 mg;碘 5.7 mg;硒 0.3 mg;钴 12.4 mg;维生素 A 2 000.0 IU;维生素 D 2 000.0 IU;维生素 E 100.0 mg;维生素 K₃ 10.0 mg;维生素 B₁ 5.0 mg;维生素 B₂ 10.0 mg;烟酸 100.0 mg;维生素 B₆ 10.0 mg;泛酸钙 40.0 mg;叶酸 5.0 mg;维生素 B₁₂ 0.02 mg;生物素 1.0 mg;维生素 C 300 mg,肌醇 100 mg
Notes:Premix provided per kg of diet:Fe 150 mg;Cu 3.2 mg;Zn 34.1 mg;Mn 13.0 mg;I 5.7 mg;Se 0.3 mg;Co 12.4 mg;VA 2 000.0 IU;VD 2 000.0 IU;VE 100.0 mg;VK₃ 10.0 mg;VB₁ 5.0 mg;VB₂ 10.0 mg;niacin 100.0 mg;VB₆ 10.0 mg;calcium pantothenate 40.0 mg;folic acid 5.0 mg;VB₁₂ 0.02 mg;biotin 1.0 mg;VC 300 mg,inositol 100 mg

1.3 测定方法

肠道和肝脏生理生化指标测定 实验结束时,使鱼空腹 24 h 后,每组随机取 15 尾,立即杀死,在冰盘中解剖,取出罗非鱼的整个肠道组织(包括前、中、后肠)和肝脏组织,用滤纸吸干水分称重。称重后剪碎,按 1:9(g/mL)加入生理盐水(4 ℃),迅速转入玻璃匀浆器匀浆(匀浆过程在冰水浴中进行),将匀浆液离心(4 ℃,3 500 r/min)10 min,取上清液制得粗酶液,-20 ℃ 保存备用。肠道淀粉酶活性测定采用碘-淀粉比色法,肠道 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性采用化学比色法,试剂均购于南京建成生物工程研究所。肝脏柠檬酸合酶[citrate(Si)-synthase,CS]采用 CS 定量检测试剂盒(ELISA)测定,ATP 采用定量检测试剂盒(ELISA)测定。肠道 EGF 和 EGFR 分别采用 EGF 定量检测试剂盒(ELISA)和 EGFR 定量检测试剂盒(ELISA)测定,以上试剂盒均购自上海拜力生物科技有限公司。肠道蛋白酶活力采用福林酚法测定^[15]。脂肪酶分别参照 Iijima 等^[16]的实验方法测定。

肠道组织切片的观察 养殖实验结束后,每组随机取 6 尾鱼,取肠道前、中、后肠(前肠取材于距胃 7 cm 处,中肠取材于距肠的第一弯曲部位 10 cm 处,后肠取材于距肛门 10 cm 处)2~3 cm,用 Bouin 氏液固定,常规法脱水,石蜡包埋,连续切片(厚度 7.0 μm),用苏木精-伊红(H.E)染色,树胶封片,拍照,所有样本均在 4 倍物镜 10 倍目镜下观察,用显微镜微尺测量肠壁肌层厚度(每个样本随机选取 10 个点测定该处肌层厚度,取平均值)和肠绒毛高度(一个肠道横切面的所有肠绒毛高度平均值)、密度(1 个肠道横切面的绒毛数量)。

1.4 数据处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因子方差分析(One-Way ANOVA),同时进行 Duncan 氏多重比较,P<0.05 为差异水平。所有数据均以平均值 ± 标准差(mean ± SD)表示。

2 结果

2.1 L-苹果酸对罗非鱼肠道组织形态结构的影响

随着 L-苹果酸水平的增加,前肠和中肠绒毛高度、密度、肌层厚度都呈先升高后降低的

趋势,在 16.0 g/kg 组达到最大,分别较对照组提高了 86.89%、41.94%、104.59% 和 115.42%、29.00%、19.40% (表 2)。后肠绒毛高度、密度和肌层厚度则随着 L-苹果酸水平的增加显著降低 ($P < 0.05$),在 32.0 g/kg 组达到最小值且显著低于对照组 ($P < 0.05$)。由此可知,L-苹果酸对吉富罗非鱼肠道形态结构的促进作用主要体现在前肠和中肠的绒毛高度和前肠的肌层厚度上,而对后肠的发育有一定抑制作用(图版)。

2.2 L-苹果酸对罗非鱼肠道消化酶及 Na⁺-K⁺-ATP 酶的影响

随着 L-苹果酸水平的增加,肠道淀粉酶和脂肪酶活性均呈先升高后下降的趋势,在 1.0 g/kg 组达到最大,分别比对照组增加了 63.21% 和 37.22%;脂肪酶活性在 2.0 ~ 32.0 g/kg 组间差异不显著 ($P > 0.05$);肠蛋白酶呈逐渐升高趋势;Na⁺-K⁺-ATP 酶活性呈先升后降的趋势,在 16.0 g/kg 组达到最大,较对照组增加了 74.54% (表 3)。

2.3 L-苹果酸对罗非鱼肠道 EGF 和 EGFR 的影响

EGF 和 EGFR 随 L-苹果酸水平的增加显著升高 ($P < 0.05$),均在 16.0 g/kg 达到最大,分别较对照组增加了 35.21% 和 58.73% (表 4)。

2.4 L-苹果酸对罗非鱼肝脏柠檬酸合酶和 ATP 含量的影响

随着 L-苹果酸水平的增加,柠檬酸合酶活力呈先升后降的趋势,8.0 g/kg 组活性达到最高,较对照组增加 23.49%;ATP 含量随 L-苹果酸的增加而逐渐增加(表 5)。

表 2 L-苹果酸对罗非鱼肠道形态指标的影响

Tab.2 The effects of dietary L-malic acid on intestinal morphology of tilapia

L-苹果酸水平/ (g/kg) L-malic acid level	前肠 foregut		
	绒毛高度/ μm	绒毛密度/个	肌层厚度/ μm
	villus height	villus density	muscular thickness
0	55.16 $\pm$ 7.77 ^a	41.80 $\pm$ 1.30 ^b	7.88 $\pm$ 1.97 ^a
1.0	59.79 $\pm$ 9.60 ^b	39.50 $\pm$ 6.30 ^b	8.59 $\pm$ 2.93 ^a
2.0	62.41 $\pm$ 8.87 ^b	39.67 $\pm$ 1.86 ^b	9.92 $\pm$ 1.82 ^b
4.0	67.46 $\pm$ 8.70 ^c	43.25 $\pm$ 1.50 ^b	11.12 $\pm$ 3.74 ^c
8.0	85.02 $\pm$ 8.11 ^c	48.89 $\pm$ 5.16 ^c	13.88 $\pm$ 2.01 ^d
16.0	103.09 $\pm$ 9.63 ^f	59.33 $\pm$ 2.31 ^d	16.12 $\pm$ 2.04 ^e
32.0	77.48 $\pm$ 7.92 ^d	33.78 $\pm$ 2.11 ^a	8.11 $\pm$ 1.66 ^a

L-苹果酸水平/ (g/kg) L-malic acid level	中肠 midgut		
	绒毛高度/ μm	绒毛密度/个	肌层厚度/ μm
	villus height	villus density	muscular thickness
0	28.27 $\pm$ 4.58 ^a	23.00 $\pm$ 1.41 ^a	10.05 $\pm$ 2.39 ^a
1.0	40.34 $\pm$ 4.97 ^b	24.56 $\pm$ 1.42 ^b	10.49 $\pm$ 4.41 ^{ab}
2.0	40.33 $\pm$ 4.58 ^b	26.13 $\pm$ 0.92 ^c	10.79 $\pm$ 3.21 ^{ab}
4.0	43.94 $\pm$ 7.19 ^c	27.80 $\pm$ 0.79 ^d	10.83 $\pm$ 2.71 ^{ab}
8.0	52.55 $\pm$ 4.18 ^d	28.33 $\pm$ 1.51 ^d	11.76 $\pm$ 2.14 ^{ab}
16.0	60.90 $\pm$ 8.12 ^e	29.67 $\pm$ 2.12 ^e	12.00 $\pm$ 3.27 ^b
32.0	40.02 $\pm$ 6.52 ^b	22.63 $\pm$ 0.92 ^a	11.11 $\pm$ 2.24 ^{ab}

L-苹果酸水平/ (g/kg) L-malic acid level	后肠 hindgut		
	绒毛高度/ μm	绒毛密度/个	肌层厚度/ μm
	villus height	villus density	muscular thickness
0	36.38 $\pm$ 6.27 ^d	15.73 $\pm$ 1.90 ^d	9.87 $\pm$ 1.92 ^c
1.0	36.98 $\pm$ 7.03 ^d	15.80 $\pm$ 1.57 ^d	9.18 $\pm$ 1.29 ^{bc}
2.0	32.05 $\pm$ 8.65 ^c	16.00 $\pm$ 1.63 ^d	8.70 $\pm$ 2.09 ^b
4.0	31.63 $\pm$ 7.99 ^c	15.21 $\pm$ 1.43 ^{cd}	7.26 $\pm$ 2.83 ^a
8.0	28.77 $\pm$ 6.96 ^b	14.33 $\pm$ 1.00 ^{bc}	7.25 $\pm$ 1.21 ^a
16.0	27.95 $\pm$ 7.95 ^b	13.29 $\pm$ 0.76 ^b	6.68 $\pm$ 1.32 ^a
32.0	25.12 $\pm$ 5.71 ^a	11.67 $\pm$ 0.52 ^a	6.44 $\pm$ 0.89 ^a

注:同列中字母不同代表差异显著 ($P < 0.05$)。下同
Notes:The different letters mean the significant difference. The same as the following

表 3 L-苹果酸对罗非鱼肠道消化酶及 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力的影响

Tab.3 The effects of dietary L-malic acid on intestinal digestive enzyme and Na⁺-K⁺-ATPase activity of tilapia

L-苹果酸水平/(g/kg) L-malic acid level	淀粉酶/(U/mg prot) amylase	脂肪酶/(U/g) lipase	蛋白酶/(U/g) protease	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶/(U/mg prot) Na ⁺ -K ⁺ -ATPase
0	25.44 $\pm$ 0.29 ^a	3.95 $\pm$ 0.39 ^a	205.93 $\pm$ 0.96 ^a	5.38 $\pm$ 0.30 ^a
1.0	41.52 $\pm$ 0.29 ^f	5.42 $\pm$ 0.40 ^b	240.11 $\pm$ 1.93 ^b	5.57 $\pm$ 0.28 ^a
2.0	39.18 $\pm$ 0.29 ^e	4.34 $\pm$ 0.72 ^a	261.94 $\pm$ 0.47 ^c	6.11 $\pm$ 0.21 ^b
4.0	35.19 $\pm$ 0.45 ^c	4.25 $\pm$ 0.91 ^a	279.56 $\pm$ 2.45 ^d	6.66 $\pm$ 0.50 ^c
8.0	35.87 $\pm$ 0.45 ^d	4.20 $\pm$ 0.69 ^a	297.51 $\pm$ 0.41 ^e	8.98 $\pm$ 0.36 ^e
16.0	35.19 $\pm$ 0.17 ^c	4.36 $\pm$ 0.41 ^a	309.27 $\pm$ 2.62 ^f	9.39 $\pm$ 0.49 ^e
32.0	32.55 $\pm$ 0.45 ^b	4.39 $\pm$ 0.12 ^a	353.47 $\pm$ 2.09 ^g	7.96 $\pm$ 0.25 ^d

表 4 L-苹果酸对罗非鱼肠道 EGF 和 EGFR 的影响
Tab.4 The effects of dietary L-malic acid on intestinal EGF and EGFR of tilapia

L-苹果酸水平/ (g/kg)	表皮生长因子/ (ng/L)	表皮生长因子抗体/ (ng/mL)
L-malic acid level	EGF	EGFR
0	59.78 ± 1.20 ^a	1.89 ± 0.04 ^a
1.0	64.04 ± 0.39 ^b	2.15 ± 0.03 ^b
2.0	67.98 ± 1.50 ^c	2.39 ± 0.03 ^c
4.0	67.13 ± 0.17 ^c	2.51 ± 0.03 ^d
8.0	75.27 ± 0.14 ^e	2.78 ± 0.04 ^e
16.0	80.83 ± 0.43 ^f	3.00 ± 0.05 ^f
32.0	73.28 ± 0.33 ^d	2.52 ± 0.02 ^d

表 5 L-苹果酸对罗非鱼肝柠檬酸合酶和 ATP 含量的影响
Tab.5 The effects of dietary L-malic acid on CS and the content of ATP in hepatopancreas of tilapia

L-苹果酸水平/ (g/kg)	柠檬酸合酶/ (nmol/L)	ATP 含量/ (nmol/L)
L-malic acid level	CS	the content of ATP
0	393.63 ± 1.75 ^b	679.31 ± 6.58 ^a
1.0	423.62 ± 1.44 ^c	700.48 ± 10.73 ^b
2.0	440.17 ± 1.72 ^d	729.06 ± 7.71 ^c
4.0	439.27 ± 1.19 ^d	800.52 ± 12.85 ^d
8.0	486.09 ± 4.18 ^e	817.31 ± 12.92 ^e
16.0	390.00 ± 3.50 ^b	881.40 ± 12.89 ^f
32.0	202.13 ± 2.62 ^a	947.89 ± 10.81 ^g

3 讨论

3.1 L-苹果酸对罗非鱼肠道形态和功能的影响

肠道的正常结构与功能是营养物质被充分消化与吸收的基本保证。一般将鱼类肠道由前至后分为前、中、后 3 段。前肠和中肠是消化吸收营养物质的主要部位^[17]。在水生动物上常用肠道绒毛高度、绒毛密度等来反映鱼类肠道消化吸收能力^[18-20]。绒毛高度、密度的提高,有利于肠道吸收面积的增加和营养物质消化利用率的提高。从本实验得知,饲料中添加适量 L-苹果酸(1.0 ~ 16.0 g/kg)后,罗非鱼前肠绒毛高度、密度、肌层厚度和中肠绒毛高度、密度均显著增高,说明 L-苹果酸的添加改善了前肠和中肠的组织形态,从而为肠道消化和吸收能力的提高提供了保证。该研究结果与已有的关于酸化剂添加可改善断奶仔猪、肉鸡等的肠绒毛高度^[21-24]的研究相吻合。但 L-苹果酸过量添加(32.0 g/kg)后,吉富罗非鱼前肠、中肠和后肠的绒毛高度和密度均出现下降的趋势,可能是因为过量的酸进入肠道后,超出机体调节能力,破坏了肠道的 pH 环境^[17-18],因而抑制了肠绒毛的

生长。

一般进入肠道的食糜受肠道运动的机械性消化作用和消化道分泌的消化酶化学性消化作用^[25]。肠道的化学性消化作用与肠道消化酶活性密切相关。肠道消化酶活性高低可以反映动物消化能力的强弱。饲料中添加酸化剂对肠道消化酶的影响前人已有研究,潘庆等^[1]发现,添加柠檬酸和乳酸可显著提高肠道淀粉酶活性;在不同水平柠檬酸实验中,肠蛋白酶和肝胰脏淀粉酶活性均较对照组有提高,在 0.2% 添加组活性最高^[5]。王纪亭等^[3]发现,添加 0.3% 复合酸显著提高了肝胰脏、前肠和中肠的蛋白酶活性;随着酸的添加,淀粉酶和脂肪酶也有升高的趋势。Li 等^[26]发现在饲料中添加 1% 的柠檬酸,可提高肝胰脏和肠道的淀粉酶活性。本实验表明,饲料中添加 1.0 g/kg L-苹果酸可显著提高肠道淀粉酶、脂肪酶和肠蛋白酶的活性,与上述研究结果一致。但是随着 L-苹果酸水平的提高,淀粉酶和脂肪酶活性会降低而肠蛋白酶活性逐渐提高。可能是因为研究表明奥尼罗非鱼肠道淀粉酶最适 pH 值为 6.5 ~ 7.0,肠道脂肪酶最适 pH 值为 7.0 ~ 7.5^[18],随着 L-苹果酸水平的提高,肠道内 pH 降低从而抑制了淀粉酶和脂肪酶的活性。而肠蛋白酶活性的适宜 pH 范围也偏碱性但是其活性却仍显著升高,出现该现象的原因可能是饲料中 L-苹果酸的添加使胃内 pH 值下降,从而激活胃蛋白酶原为胃蛋白酶,提高胃蛋白酶活性,增加了蛋白质消化产物,消化产物进入肠道后,又作为一种信号因子刺激肝胰脏分泌蛋白酶。胃蛋白酶消化产物进入小肠能够刺激胰腺分泌蛋白水解酶^[27-28]。Thaela 等^[29]研究发现,在日粮中补充 2.5% 乳酸,可以提高猪胰蛋白酶和糜蛋白酶的分泌。

Na⁺-K⁺-ATP 酶(又称钠钾泵),一种由 ATP 提供动力的离子泵,可作为反映肠粘膜吸收能力的一项指标。本实验中肠道 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性呈先升后降的趋势,说明 L-苹果酸在改善肠道组织形态和提高消化能力的同时,提高了肠道的吸收能力,但过量(32.0 g/kg)的酸会产生抑制作用。

肠道的消化吸收能力与肠粘膜上皮生长发育密切相关^[30-31]。EGF 是动物体内重要的生长因子之一,在胃肠道中,EGF 通过与细胞膜上的 EGFR 结合,启动、催化、维持与表皮细胞等多种细胞生长增殖有关的一系列生化过程^[32-33]。而

且 Lupton^[34],晏家友等^[35]的研究发现消化道的酸碱度能影响细胞生长,刺激消化器官的发育等。本实验结果显示,肠道 EGF 和 EGFR 随着 L-苹果酸水平的增加都呈先升后降的趋势。可见 L-苹果酸的适量(1.0 ~ 16.0 g/kg)添加对肠道上皮细胞发育有明显促进作用。

因此,饲料中适宜添加 L-苹果酸能促进吉富罗非鱼肠粘膜上皮细胞的生长增殖,促进前肠和中肠粘膜绒毛的发育,提高肠道消化酶活性,从而促进营养物质的消化和吸收。反过来,消化产物的增多,又促进消化酶的分泌和肠粘膜的发育。这样,就形成了一种良性循环,促进了肠道的发育,并增强了肠道的功能。

3.2 L-苹果酸对罗非鱼肝脏 TCA 循环效率影响

苹果酸是生物体代谢三羧酸循环的重要中间产物,直接参与线粒体的能量代谢,在生物体代谢过程中处于一种枢纽位置。柠檬酸合酶(CS)是 TCA 循环过程中影响其效率的限速酶。研究证实,给大鼠小剂量补充外源性苹果酸,可提高线粒体苹果酸浓度,从底物的供给和能量的转移两个方面推动线粒体的代谢^[36-37];Bendahan 等^[38]也发现,给人体补充适量苹果酸可以显著提高 ATP 的生成。本实验结果表明,吉富罗非鱼饲料中添加 1.0 ~ 8.0 g/kg L-苹果酸,显著提高了肝脏 CS 的活性和 ATP 的产生,反映出 L 苹果酸的适量添加具有促进罗非鱼肝脏 TCA 循环效率的作用。但高剂量组(16.0 和 32.0 g/kg)的 CS 活性降低,而 ATP 产生量持续增加,可能是在三羧酸循环中柠檬酸合成酶的调节主要通过产物的负反馈来实现,大剂量苹果酸导致线粒体内产生过量柠檬酸,从而抑制 CS 的活性;ATP 的持续上升可能与其他产生途径有关,其原因有待进一步研究。

4 小结

在本试验条件下,吉富罗非鱼饲料中 L-苹果酸适量添加为 1.0 ~ 8.0 g/kg 时,可改善罗非鱼前肠和中肠的形态结构,促进肠粘膜上皮细胞的增殖,提高肠消化和吸收能力,同时提高肝脏 TCA 循环效率。结合其生长性能结果,在本试验条件下其最适添加量为 8.0 g/kg。

参考文献:

[1] Pan Q, Tan Y G, Bi Y Z, *et al.* Effects of acid supplements on growth and feed utilization in tilapia

Oreochromis niloticus × *O. aureus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(6): 682 - 688. [潘庆, 谭永刚, 毕英佐, 等. 酸制剂对罗非鱼生长和饲料利用的影响. 水产学报, 2004, 28(6): 682 - 688.]

[2] Balamurali R S, Aravindan C M. Citric acid as a feed stimulant [J]. Society of Fisheries Technologists (India), 1997, 34(1): 9 - 12.

[3] Wang J T, Li H T, Song J Y, *et al.* Effects of acidifier on growth and digestive enzyme activity of common carp *Cyprinus carpio* [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2009, 29(1): 21 - 25. [王纪亭, 李海涛, 宋憬愚, 等. 复合酸化剂对鲤生长及消化酶活性的影响. 广东海洋大学学报, 2009, 29(1): 21 - 25.]

[4] Leng X J, Lun F, Li X Q, *et al.* Effects of citric acid on growing performance and nutrients digestibility of allogynogenetic crucian carp [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2006, 15(2): 178 - 181. [冷向军, 伦锋, 李小勤, 等. 柠檬酸对异育银鲫生长及营养物质消化率的影响. 上海水产大学学报, 2006, 15(2): 178 - 181.]

[5] Pan Q, Tan Y G, Bi Y Z, *et al.* Effects of citric acid on growth, whole body composition and activities of digestive enzymes in hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2004, 11(4): 344 - 348. [潘庆, 谭永刚, 毕英佐, 等. 柠檬酸对罗非鱼生长、体成分和消化酶活性的影响. 中国水产科学, 2004, 11(4): 344 - 348.]

[6] Li J S, Li J L, Wu T T. Effects of exogenous enzyme and citric acid on activities of endogenous digestive enzyme of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2005, 28(3): 97 - 101. [黎军胜, 李建林, 吴婷婷. 外源酶和柠檬酸对奥尼罗非鱼内源消化酶活性的影响]. 南京农业大学学报, 2005, 28(3): 97 - 101.]

[7] Sniffen C J, Ballard C S, Carter M P, *et al.* Effects of malic acid on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of rumen contents and on performance of mid-lactation dairy cows [J]. Animal Feed Science and Technology, 2006, 127(1): 13 - 31.

[8] Wang C, Liu Q, Yang W Z, *et al.* Effects of malic acid on feed intake, milk yield, milk components and metabolites in early lactation Holstein dairy cows [J]. Livestock Science, 2009, 124(2): 182 - 188.

[9] Liu Q, Wang C, Yang W Z, *et al.* Effects of malic acid on rumen fermentation, urinary excretion of

- purine derivatives and feed digestibility in steers[J]. *Animal*, 2008, 3(1): 32 – 39.
- [10] Khampa S, Wanapat M, Wachirapakorn C, *et al.* Effects of levels of sodium DL-malate supplementation on ruminal fermentation efficiency of concentrates containing high levels of cassava chip in dairy steers[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 2006, 19(3): 368 – 375.
- [11] Foley P A, Kenny D A, Callan J J, *et al.* Effect of DL-malic acid supplementation on feed intake, methane emission, and rumen fermentation in beef cattle[J]. *Journal of Animal Science*, 2009, 87(3): 1048 – 1057.
- [12] Castillo C, Benedito J L, Pereira V, *et al.* Malic acid supplementation in growing/finishing feedlot bull calves: Influence of chemical form on blood acid – base balance and productive performance[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 135(3 – 4): 222 – 235.
- [13] Wang C, Liu Q, Dong Q, *et al.* Effects of malic acid supplementation on rumen fermentation, nutrient digestion and metabolism in simmental steer[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2009, 18(3): 224 – 231. [王聪, 刘强, 董群, 等. 日粮补充苹果酸对牛瘤胃发酵和养分消化代谢的影响. 草业学报, 2009, 18(3): 224 – 231.]
- [14] Committee on the Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, National Research Council. Nutrient requirements of fish and shrimp[M]. America: National Academies Press, 2011.
- [15] Biochemistry section of Biology Department of Peking University. Biological chemistry experiment instruction[M]. Beijing: People's Education Press, 1980. [北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导. 上海: 人民教育出版社, 1980.]
- [16] Iijima N, Tanaka, Ota Y. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1998, 18(1): 385 – 400.
- [17] 尾崎久雄. Fish digestive physiology (Volume 1, 2) [M]. Wu S Z, translate. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1985. [吴尚忠(译). 鱼类消化生理(上、下册). 上海: 上海科学技术出版社, 1985.]
- [18] Li J S, Li J L, Wu T T. Distribution and properties of amylase and lipase in alimentary tract of tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(5): 473 – 477. [黎军胜, 李建林, 吴婷婷. 奥尼罗非鱼淀粉酶、脂肪酶的分布与特性. 中国水产科学, 2004, 11(5): 473 – 477.]
- [19] Nie G X, Wang J L, Zhu M W, *et al.* The influences of xylanase added in wheat basal diet on intestine chyme viscosity and the development of villi and microvilli of tilapia nilotica[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(1): 54 – 61. [聂国兴, 王俊丽, 朱命炜, 等. 小麦基础饲料添加木聚糖酶对尼罗罗非鱼肠道食糜粘度和绒毛、微绒毛发育的影响. 水产学报, 2007, 31(1): 54 – 61.]
- [20] Farhangi M, Carter C G, Hardy R W, *et al.* Growth, physiological and immunological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different dietary inclusion levels of dehulled lupin (*Lupinus angustifolius*) [J]. *Aquaculture Research*, 2001, 32(1): 329 – 340.
- [21] Bosia P, Sarlib G, Casinia L, *et al.* The influence of fat protection of calcium formate on growth and intestinal defence in *Escherichia coli* K88-challenged weanling pigs [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 139(3 – 4): 170 – 185.
- [22] Lin Y C, Chen J X, Jiang Z Y, *et al.* Effects of compound acidifier, serum biochemistry indices, intestinal morphology and microbial flora on performance of weaned piglets [J]. *Swine Production*, 2001(1): 13 – 16. [林映才, 陈建新, 蒋宗勇, 等. 复合酸化剂对早期断奶仔猪生产性能、血清生化指标、肠道形态和微生物区系的影响. 养猪, 2001(1): 13 – 16.]
- [23] Li P, Wu S G, Zhang H J, *et al.* Effects of acidifiers on small intestine morphology, intestinal microbial flora and immune response of weaned pigs [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2009, 45(9): 28 – 32. [李鹏, 武书庚, 张海军, 等. 复合酸化剂对断奶仔猪肠黏膜形态和肠道微生物区系及免疫功能的影响. 中国畜牧杂志, 2009, 45(9): 28 – 32.]
- [24] Saki A A, Eftekhari S M, Zamani P, *et al.* Effects of an organic acid mixture and methionine supplements on intestinal morphology, protein and nucleic acids content, microbial population and performance of broiler chickens [J]. *Animal Production Science*, 2011, 51(11): 1025 – 1033.
- [25] Z hu H W. Histology [M]. Beijing: People's Education Press, 1983. [朱洪文. 组织学. 北京: 人民教育出版社, 1983.]
- [26] Li J S, Li J L, Wu T T. Effects of non-starch

- polysaccharides enzyme, phytase and citric acid on activities of endogenous digestive enzymes of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) [J]. Aquaculture Nutrition, 2009, 15(4): 415 – 420.
- [27] Meyer J H, Kelly G A. Canine pancreatic response to intestinally perfused proteins and protein digests [J]. American Journal of Physiology-Legacy Content, 1976, 231(3): 682 – 691.
- [28] Meyer J H, Kelly G A. Canine pancreatic response to intestinally perfused oligopeptides [J]. American Journal of Physiology-Legacy Content, 1976, 231(3): 678 – 681.
- [29] Thaela M J, Jensen M S, Pierzynowski S G, *et al.* Effect of lactic acid supplementation on pancreatic secretion in pigs after weaning [J]. Journal of Animal and Feed Sciences, 1998, 7(suppl. 1): 181 – 183.
- [30] Chen M Y, Zhang X M. Development of the digestive system in larval, juvenile and young turbot *Scophthalmus maximus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2006, 30(2): 236 – 240. [陈慕雁, 张秀梅. 大菱鲆仔稚鱼消化系统发育的组织学研究. 水生生物学报, 2006, 30(2): 236 – 240.]
- [31] Yan J Y. Effects of slow-release compound acidifiers on gastrointestinal pH and intestinal function in weaning piglets [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2009. [晏家友. 缓释复合酸化剂对断奶仔猪消化道酸度以及肠道形态和功能的影响. 成都: 四川农业大学, 2009.]
- [32] Le Z P. The relationship between Receptor protein function and transformation of epidermal growth factor [J]. Chemistry of Life (China biochemistry Communications), 1989, 9(2): 9 – 12. [乐志培. 表皮生长因子的受体功能与转化蛋白质的关系. 生命的化学(中国生物化学会通讯), 1989, 9(2): 9 – 12.]
- [33] Dvorak B, Kolinska J, Mewilliam D L, *et al.* The expression of epidermal growth factor and Transforming growth factor- α mRNA in the small intestine of suckling rats: organ culture study [J]. Febs Letters, 1998, 435(1): 119 – 124.
- [34] Lupton J R, Jacobs L R. Fiber supplementation results in expanded proliferative zones in rat gastric mucosa [J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1987, 46(6): 980 – 984.
- [35] Yan J Y, Jia G, Wang K N. Effects of slow-release compound acidifiers on gastrointestinal pH and digestive tract in weaning piglets [J]. Swine Production, 2009, (3): 5. [晏家友, 贾刚, 王康宁. 缓释复合酸化剂对断奶仔猪消化道酸度以及消化道发育的影响. 养猪杂志, 2009(3): 5.]
- [36] Valentina B G, Henry A L. The role of malate in exercise-induced enhancement of mitochondrial respiration [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1986, 245(2): 470 – 476.
- [37] Valentina B G, Robert S W, Henry A L. The role of malate in hormone-induced enhancement of mitochondrial respiration [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1986, 245(2): 477 – 482.
- [38] Bendahan D, Mattei J P, Ghattas B, *et al.* Citrulline/ malate promotes aerobic energy production in human exercising muscle [J]. British Journal of Sports Medicine, 2002, 36(4): 282 – 289.

Effects of L-malic acid on intestinal histology and function, and TCA cycle efficiency of the liver of Gift tilapia (*Oreochromis niloticus*)

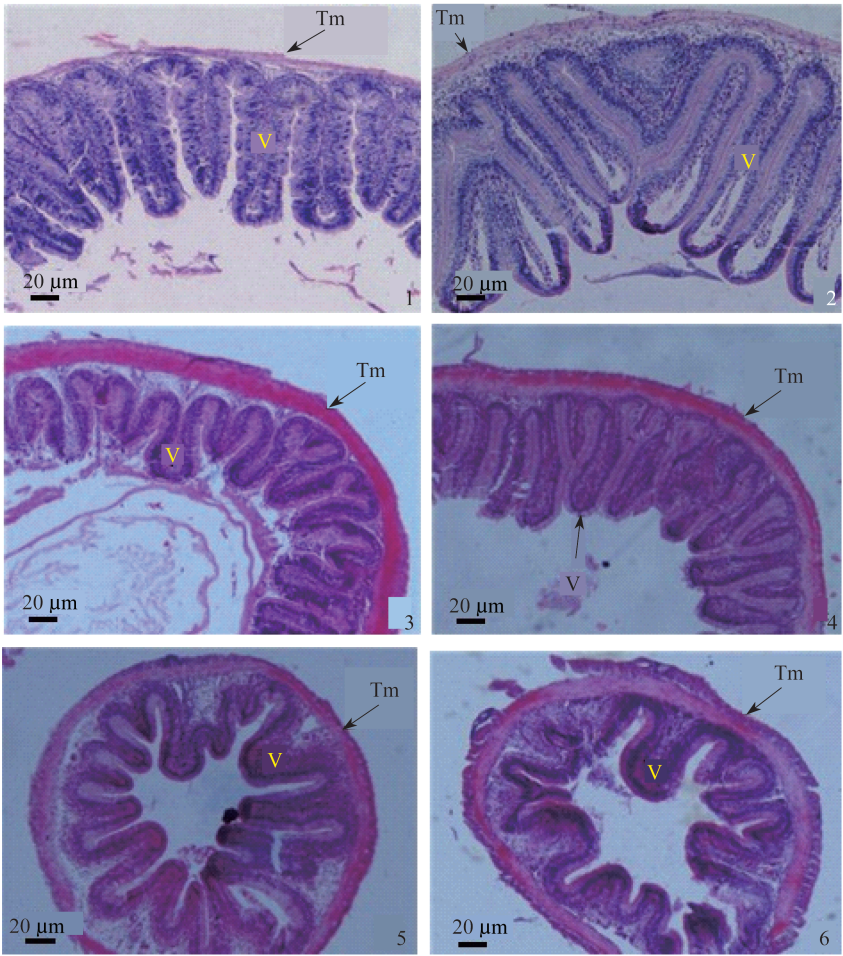
LI Zan, LUO Li*, CHEN Renxiao, BAI Fujing, JING Ting, SUN Yuxuan, QIAN Qian

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the effects of dietary L-malic acid levels on intestinal histology and function, and TCA cycle efficiency in liver of Gift tilapia. The experimental diets supplemented with 0 (control group), 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 and 32.0 g/kg L-malic acid had been fed to juvenile tilapia with initial body weight of (37.94 ± 0.09) g for 154 days. 420 juvenile tilapia were randomly divided into seven groups and each group had three replicates (20 fishes for each replicate). The results showed that: With the increment of L-malic acid supplement, the villus height, villus density and muscular thickness of foregut and midgut reached the highest in 16.0 g/kg group which was significantly higher than those in control group ($P < 0.05$), and the villus height, villus density and muscular thickness of hindgut gradually decreased ($P < 0.05$). Intestinal amylase and lipase activities reached the highest in 1.0 g/kg group which were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). The protease activity, and the content of ATP increased gradually with the increased level of L-malic acid ($P < 0.05$). The activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, and the intestinal content of EGF and EGFR reached the highest in 16.0 g/kg group, meanwhile citrate synthase activity reached the highest in 8.0 g/kg group. This study indicates that in the dietary of Gift tilapia, a proper addition of L-malic acid (1.0 – 8.0 g/kg) can improve the morphology of foregut and midgut, promote the proliferation of intestinal mucosal epithelial cell, and improve the ability of intestinal digestion and absorption and the efficiency of liver TCA cycle.

Key words: *Oreochromis niloticus*; L-malic acid; intestine; liver; TCA cycle

Corresponding author: LUO Li. E-mail: luoli1972@163.com



图版

1.0 g/kg 组(对照组)吉富罗非鱼前肠(40 ×); 2.16.0 g/kg 组吉富罗非鱼前肠(40 ×); 3.0 g/kg 组(对照组)吉富罗非鱼中肠(40 ×); 4.16.0 g/kg 组吉富罗非鱼中肠(40 ×); 5.0 g/kg 组(对照组)吉富罗非鱼后肠(40 ×); 6.16.0 g/kg 组吉富罗非鱼后肠(40 ×); Tm 示肠肌层; V 示肠绒毛

Plate

1. Foregut of FIGT tilapia in 0 g/kg(control group) (40 ×) , tunica muscularis(Tm) , villus(V) ; 2. Foregut of FIGT tilapia in 16.0 g/kg (40 ×) ; 3. Midgut of FIGT tilapia in 0 g/kg(control group) (40 ×) ; 4. Midgut of FIGT tilapia in 16.0 g/kg (40 ×) ; 5. Hindgut of FIGT tilapia in 0 g/kg(control group) (40 ×) ; 6. Hindgut of FIGT tilapia in 16.0 g/kg (40 ×) ; Tm;tunica muscularis; V; villus