

离体草鱼肠道对亮氨酸和酪氨酸的吸收与利用

邝雪梅¹ 叶元土² 蔡春芳² 王永玲² 蒋蓉²

(1. 湛江海洋大学农学院, 湛江 524088; 2. 苏州大学农业科技学院, 苏州 215006)

摘要: 采用同位素示踪和肠道离体灌流方法, 研究了草鱼离体肠道对亮氨酸(Leu)、酪氨酸(Tyr)的吸收转运与利用。实验结果表明: 当 Leu 浓度从 1.0mmol/L 增加到 5.0mmol/L、10mmol/L 时, 肠道吸收转运的速度表现出“高浓度抑制”效应, 运输到肠道外的比例为 83%、66% 和 35%; 合成肠道蛋白质的比例为 2%、5% 和 13%; 肠道组织内游离形式的比例为 9%、28% 和 49%; 其他形式的比例为 6%、1% 和 3%。Tyr 浓度从 0.5mmol/L 增加到 1.5mmol/L、2.5mmol/L 时, 肠道对 Tyr 的吸收转运速度也随之增加, 运输到肠道外的比例为 52%、55% 和 55%; 合成肠道蛋白质的比例为 17%、15% 和 16%; 肠道组织内游离形式的比例为 7%、10% 和 16%; 其他形式的比例为 24%、20% 和 13%。肠道在吸收转运 Leu 和 Tyr 的同时, 也利用它们合成蛋白质的和其他方面, Leu 的吸收利用受灌流试验氨基酸浓度影响较大, 而 Tyr 受影响较小; 随着肠道内灌流的试验氨基酸浓度增加, 吸收转运到肠道外的比例下降、留存于肠道内的比例增加, 肠道合成的蛋白质绝对量也增加。

关键词: 亮氨酸; 酪氨酸; 蛋白质合成; 肠道; 草鱼

中图分类号: S963.16

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2005)04-0424-06

肠道是动物对日粮营养物质消化和吸收的重要器官, 肠道对氨基酸的吸收是耗能的主动吸收。近期的研究结果^[1]发现肠道粘膜组织更新很快, 也是体内能量消耗的主要组织。陆生动物肠道粘膜组织消耗的能量约为体内总能量的 20% 左右, 而且肠道主要以氨基酸如谷氨酰胺作为能量物质而不是葡萄糖, 因此, 肠道将从日粮吸收来的(或从血液来的)氨基酸部分用于肠道组织自身的氧化分解或蛋白质合成。肠道粘膜对日粮来源的必需氨基酸的消耗和利用, 可能影响到日粮氨基酸的营养价值的充分发挥^[2]。目前在水生动物肠道对氨基酸的吸收方面有一些报道^[3,4], 但是在同一条件下将氨基酸的吸收和蛋白质合成利用同时进行研究则很少有报道, 且没有可直接借鉴的成熟的试验方法。本文以草鱼(*Ctenopharyngodon idellus* Cuvier et Valenciennes)为材料, 采用同位素示踪技术研究肠道对 L-亮氨酸(Leu)和 L-酪氨酸(Tyr)的吸收与利用, 探讨水生动物肠道对氨基酸吸收转运、利用的一般规律。

1 材料和方法

1.1 试验草鱼 选用池塘养殖当年草鱼, 体重 115.5—207.0g, 平均 159.5±31.1g, 共 69 尾。试验期间暂养于室内循环养殖系统中, 按 2% 的投饲率, 分 3 次投喂粗蛋白质 30% 的配合饲料。试验前 24h, 停止投喂饲料。

1.2 肠道氨基酸灌流模型和方法 参考叶元土等^[3,5]建立的鱼类肠道离体灌流试验模型, 将试验氨基酸从草鱼完整的离体肠道内灌流, 以衡流泵控制流速在 0.3—0.5mL/min。不同时间定量测定通过肠道吸收转运到肠道外、留存于肠道组织内和肠道蛋白质结合的试验氨基酸量。每个试验重复 3 次以上。实验用 L-Leu 和 L-Tyr 均为日本进口分装生化试剂, 层析纯。放射性氨基酸为 L-[4, 5-³H] Leu、L-[3, 5-³H] Tyr, 比活度均为 60Ci/mol。试验氨基酸浓度参考叶元土等^[3]将 Leu 分别设置为 10.0mmol/L、5.0mmol/L 和 1.0mmol/L, Tyr 参考其溶解度分别设置为 2.5mmol/L

收稿日期: 2004-05-17; 修订日期: 2004-08-28

基金项目: 苏州大学 211 工程资助项目(Q4114021)

作者简介: 邝雪梅(1964—)女, 重庆人; 讲师; 从事淡水鱼类养殖方面的教研工作

通信作者: 叶元土, E-mail: yeyuantu@pub.xa.jinfo.net

L(近于饱和浓度)、1.5mmol/L 和 0.5mmol/L。放射性氨基酸的用量为 0.5μCi/mL, 按照同位素稀释法, 测量样品的 dpm 值来计算相应的氨基酸量。

1.3 肠道对试验氨基酸吸收转运速度的测定 在灌流的氨基酸溶液进入试验肠道时开始记时, 每隔 10min 取样 1 次, 每次取 100μL 用于放射性测定, 持续到 40min, 并补充同样体积的生理盐溶液以保持肠道外培养液总体积恒定。灌流液和培养液样品直接用于放射性测定, 计算单位重量肠道在单位时间内吸收转运的试验氨基酸量。

1.4 肠道组织中试验氨基酸总量测定 灌流持续 40min 时迅速将灌流液换为生理盐溶液, 以恒流泵快速冲洗肠道内壁 5min, 迅速取下肠道用生理盐溶液冲洗肠道外壁, 滤纸吸干水分, 用液氮冷冻以终止蛋白质合成及其他化学反应。

待肠道解冻后用剪刀剪碎肠道, 取新鲜肠道样品 150—200mg, 加入肠道重量 5 倍体积的 HClO₄, 在 70℃消化完全(约 45min)后加入肠道重量 5 倍体积的 H₂O₂ 在 70℃褪色至无色透明。冷却后取消化液测定放射性强度, 计算肠道组织中试验氨基酸总量。每个测定样品作 3 个平行。

1.5 肠道组织中游离试验氨基酸量测定 将剩余的新鲜肠道精确称量, 按样品重量 5 倍体积加入 2% 的 HClO₄ 溶液, 用玻璃匀浆器匀浆, 在 10000r/min 离心 20min, 取上清液测定放射性强度, 计算肠道组织中游离试验氨基酸的含量(设 3 个平行)。

1.6 肠道蛋白质结合的试验氨基酸量测定 取上述离心的沉淀, 用 10mL 2% 的 HClO₄ 溶液洗涤一次。加入 10mL 0.3mol/L 的 NaOH, 搅匀, 置 70℃恒温使沉淀溶解。以 6000r/min 离心 15min, 将上清液转入另一个离心管, 加入 HClO₄ 使终浓度达到 2%, 以沉淀蛋白质。以 10000r/min 离心 20min, 弃去上清液。沉淀物分别用 10mL 的无水乙醇、无水乙醚、丙酮对沉淀蛋白质进行洗涤、脱脂和脱水, 然后在 70℃烘干, 即为纯化的肠道蛋白质。

精确称取纯化的肠道蛋白质, 按样品重量 10 倍体积的 HClO₄, 在 70℃消化完全。再加入样品重 10 倍体积的 H₂O₂, 在 70℃褪色至无色透明。冷却后, 取消化液测量放射性强度, 计算肠道蛋白质结合的试验氨基酸量(设 3 个平行)。

1.7 闪烁液及放射性强度测量 闪烁液的配制参考吴冠芸等^[6] 方法修改, 精确称取 PPO 2.5g、POPO 0.25g 用二甲苯溶解, 加入 TritonX-100 150mL(视样品水分多少可以适当调整用

量), 再用二甲苯定容到 500mL。每个闪烁瓶中取闪烁液 5mL。

放射性强度用 SN-6930 液体闪烁计数器进行测量, 采用内标准方法对 cpm 值进行校正, 得到校正后的 dpm 值。

2 结果

2.1 肠道对氨基酸吸收转运速度

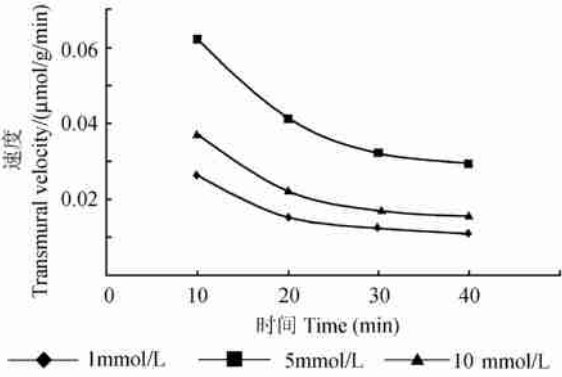


图 1 草鱼肠道对 Leu 的吸收转运速度
Fig. 1 The transmembrane velocity of the leucine through the intestine gut

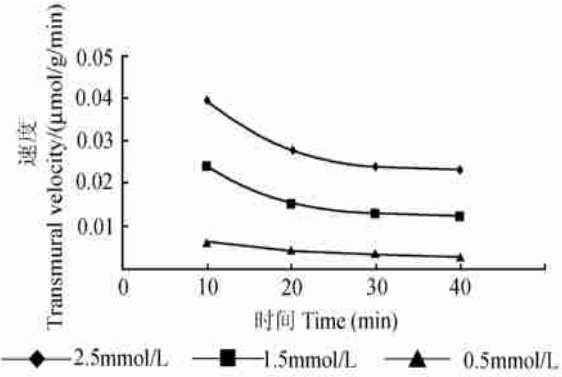


图 2 草鱼肠道对 Tyr 的吸收转运速度
Fig. 2 The transmembrane velocity of the tyrosine through the intestine gut

根据肠道培养液和灌流液 dpm 值, 计算得到肠道对试验氨基酸吸收转运速度, 结果见图 1 和图 2。肠道对 Leu 和 Tyr 的吸收转运速度均随时间的延长而逐渐下降, 在 20min 以后趋于稳定; 两种氨基酸在不同灌流浓度下的吸收转运速度, 经方差分析差异显著($P < 0.05$, $P > 0.01$)。但 Leu 在 5.0mmol/L 的吸收转运速度最高, 10.0mmol/L 次之, 1.0mmol/L 最低, 即在 10.0mmol/L 浓度下吸收转运速度反而显著下降, 而 Tyr 在 0.5mmol/L、1.5mmol/L 和 2.5mmol/L 的吸收转运速度随浓度升高而增加。

2.2 肠道对试验氨基酸的总吸收率

以吸收后留存于肠道组织内和肠道吸收转运到

培养液中的氨基酸量为肠道吸收的氨基酸总量, 计算经肠道吸收氨基酸总量占试验期间流过肠道的试验氨基酸量的百分比, 作为肠道对试验氨基酸总吸收率, 结果见表 1。由表 1 可知: 肠道对 Leu 的总吸收率与灌流的氨基酸浓度的相关关系与肠道对 Leu 吸收转运率的变化规律相同, 最大吸收率依然是

5. 0mmol/L 组。Leu 浓度愈高保留在肠道组织内的比例愈高、而转运到肠道外的比例就愈低; 肠道对 Tyr 总吸收率大小与灌流液 Tyr 浓度成正相关关系; 肠道对 Leu 的总吸收率低于 Tyr。Tyr 保留在肠道内和转运到肠道外的试验氨基酸比例受浓度影响较小。

表 1 草鱼肠道对试验氨基酸总的吸收率
Tab. 1 The ratio of Leu and Tyr in the intestine gut and through the intestine

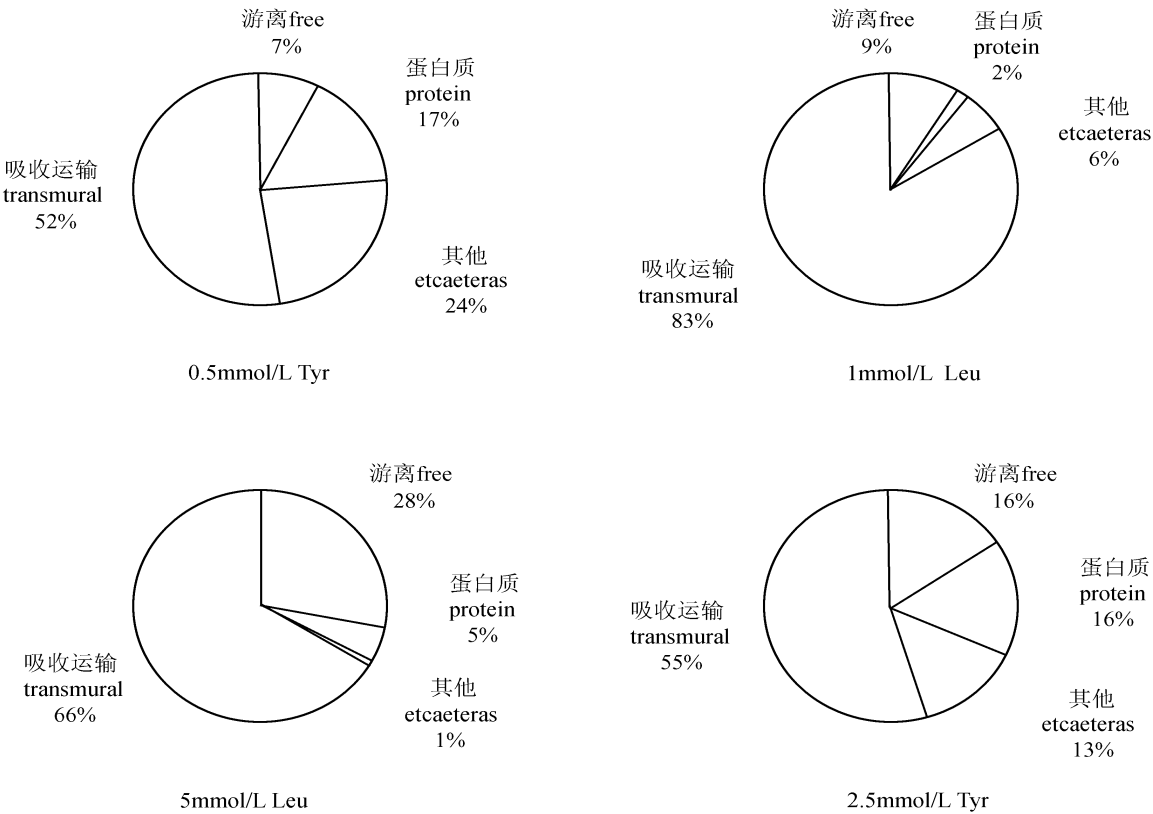
氨基酸 amino acid	浓度 perfusion concentration (mmol/L)	肠道组织 intestinal tissue flux (μ mol/L)	吸收运输量 transmural flux(μ mol/L)	流过肠道量 in intestine flux(μ mol/L)	总吸收率 gross absorption ratio(%)	占吸收总量的比例 percentage(%) 肠道组织 in intestine	吸收转运 transmural
Leu	10. 0	63. 73 ^A	34. 96 ^A	600	16. 45 ^{aA}	65	35
	5. 0	19. 08 ^B	37. 46 ^B	300	18. 85 ^{hA}	34	66
	1	1. 27 ^C	6. 42 ^C	60	12. 83 ^{cB}	17	83
Tyr	2. 5	18. 58 ^A	22. 64 ^A	150	27. 49 ^{aA}	45	55
	1. 5	9. 49 ^B	11. 83 ^B	90	23. 68 ^{abA}	45	55
	0. 5	3. 16 ^C	3. 49 ^C	30	22. 18 ^{hA}	48	52

注: 数值后右上方不同字母表示存在显著差异。a、b、c 为 $P < 0. 05$ 水平, A、B、C 为 $P < 0. 01$ 水平。

2.3 肠道对吸收氨基酸的利用比例

为了进一步分析肠道对试验氨基酸的吸收和利用情况, 测定并计算了肠道组织的游离氨基酸和肠道组织蛋白质中结合的氨基酸量。由于这两者的量

与肠道内留存的氨基酸总量有一定的差值, 将这各差值称之为“其他”量。将肠道的这三种成分的量与吸收转运到肠道外的氨基酸量一起做成分配比例图(图 3)。



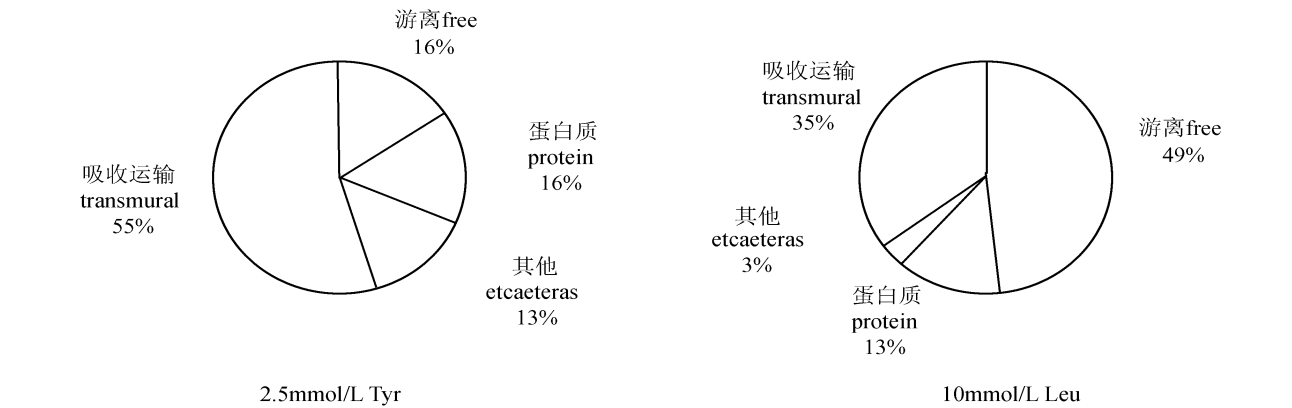


图 3 肠道组织对氨基酸吸收利用的比例

Fig. 3 The percentage of the irradiation amino acids in the intestine tissue, transmural and in protein

由图 3 可知,在不同的试验氨基酸浓度组中,随着 Leu 浓度从 1.0mmol/L、5.0mmol/L 和 10.0mmol/L 逐渐增加,吸收并转运到肠道外的 Leu 占总吸收 Leu 的比例呈现出逐渐降低的负相关变化趋势;游离态 Leu 所占比例呈现出逐渐增加的正相关变化趋势;蛋白质结合态 Leu 所占的比例呈现出逐渐增加的正相关变化趋势。对于 Tyr,浓度从 0.5mmol/L、1.5mmol/L 和 2.5mmol/L 逐渐增加时,肠道吸收并转运到肠道外的 Tyr 比例没有显著性变化;游离态的 Tyr 所占比例呈现出逐渐增加的正相关变化趋势;蛋白质结合态 Tyr 所占的比例没有显著性的变化,其他量所占

比例分别为 24%、20% 和 13%,呈现出逐渐下降的变化趋势。另外,其他量在不同的氨基酸浓度下,其大小有较大的差异,在 Tyr 组达到 13%—24%,而在 Leu 组为 1%—6%,Tyr 组结果明显高于 Leu 组。

2.4 肠道蛋白质结合的氨基酸

表 2 计算了肠道蛋白质结合的氨基酸放射性强度和蛋白质结合的氨基酸含量,可以知道,单位重量肠道结合的氨基酸量随氨基酸浓度不同有显著的变化($P < 0.01$),当灌流的氨基酸浓度增加时,肠道新合成的蛋白质中结合的氨基酸量也显示出逐渐增加的正相关变化关系。

表 2 肠道蛋白质结合的试验氨基酸量

Tab 2 The dpm value in the protein of the intestine gut

氨基酸 amino acid	灌流氨基酸浓度 perfusion concentration(mmol/ L)	纯化蛋白质放射强度 The dpm value of purification protein(dpm/ g)	肠道蛋白质放射强度 The dpm value of fresh intestine protein(dpm/ g)	肠道蛋白质结合的氨基酸量 The quantity of amino acid in fresh intestine protein(μmol/ g)
Leu	10.0	107266±22788	5479±1164	2.28 ^A
	5.0	31000±8770	2064±584	0.86 ^B
	1.0	32266±8285	1180±303	0.08 ^C
	2.5	175333±38041	11010±2389	2.69 ^A
Tyr	1.5	174800±15047	10111±870	1.33 ^B
	0.5	112733±3185	8433±238	0.39 ^C

注:数值后右上方不同的字母表示存在显著差异($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 肠道对氨基酸的吸收转运速度和总吸收率

叶元土等^[4]发现,当肠道内灌流的试验氨基酸浓度增大到一定量时,吸收转运到肠道外的氨基酸量在 10 种必需氨基酸中只有苏氨酸是与灌流氨基

酸浓度成正相关变化,而其他 9 种氨基酸在高浓度组均表现为减低,称之为“高浓度抑制”效应。在本试验中,肠道对 Leu 的吸收转运结果与叶元土等^[4]结果一致,10.0mmol/L 组的吸收转运速度显著($P < 0.05$) 低于 5.0mmol/L 组的结果。

Leu 在高浓度时的吸收转运速度显著下降,是

否有可能只是转运到肠道外的氨基酸量下降,而大部分氨基酸吸收后留存于肠道组织内使总吸收率并不下降呢?结合肠道对氨基酸总吸收率的结果分析,肠道对 Leu 的吸收率也是在 5.0mmol/L 组的结果(18.85%)显著高于 10.0mmol/L 组(16.45%),在 1mmol/L 组的结果最低(12.83%)。因此,本试验结果再次表明:离体草鱼肠道对 Leu 的吸收具有“高浓度抑制”效应。

由于 2.5mmol/L 已近于 Tyr 的饱和浓度,因此无法在更高的浓度上观测草鱼肠道对 Tyr 的吸收利用情况。Tyr 在 0.5mmol/L、1.5mmol/L 和 2.5mmol/L 浓度区间的吸收转运量与灌流氨基酸浓度变化成正相关变化关系,即灌流的 Tyr 增加时,肠道对 Tyr 的吸收转运速度也随之增大。

3.2 肠道对吸收氨基酸的利用

肠道是蛋白质代谢非常活跃的内脏器官。本试验结果表明,离体肠道组织在吸收肠道灌流的氨基酸时,依然在进行着活跃的蛋白质合成代谢或周转代谢,肠道蛋白质中含有氨基酸(图 2)。这表明氨基酸吸收进入了肠道组织氨基酸库,与肠道组织蛋白质分解产生的氨基酸一起被用于新蛋白质的合成。新合成的蛋白质量与氨基酸浓度呈正比例关系,即随着灌流的氨基酸浓度的增加其新合成的蛋白质量也随之增加。

肠道粘膜的能量物质不是常规的以葡萄糖为主^[1],而是以氨基酸为主要能量物质,通过肠道粘膜吸收的日粮必需与非必需氨基酸在肠道作为能源物质被消耗,同时还要吸收通过血液从体内组织转运来的谷氨酰胺等^[7](在大鼠吸收 25%—33% 的谷氨酰胺)氨基酸作为能量物质,以维持肠道粘膜的完整性和肠道的正常生理功能。对于日粮来源的 Leu 在通过肠粘膜时有一定量被截留下来分别用于氨基酸分解代谢和蛋白质的合成,不同的动物这种被截留的比例和分别用于转氨分解、蛋白质合成的比例有很大的不同,狗^[1]有 30% 的 Leu 被截留并分别以 55% 和 45% 的比例用于氨基酸的转氨代谢和新的蛋白质合成,人有 20%—30% 的 Leu 被截留,在仔猪^[2]有 40% 的 Leu 被截留并以小于 20% 的比例用于蛋白质合成,绵羊被截留的 Leu 几乎全部用于蛋白质的合成。在本试验中,在灌流的 Leu 浓度从 1.0mmol/L 增加到 5.0mmol/L、10.0mmol/L 时,留存于肠道内的 Leu 比例从 17% 增加到 34%、65%;用于蛋白质合成的 Leu 比例也从 2% 增加到 5%、13%;留存于肠道内以游离状态存在的 Leu 比例从

9% 增加到 28%、49%;以其他形式存在的比例从 6% 变化为 1%、3%,而通过肠道转运到肠道外的比例则从 83% 下降到 66%、35%。对于 Tyr,灌流的 Tyr 浓度从 0.5mmol/L、1.5mmol/L 和 2.5mmol/L 逐渐增加,通过肠道吸收并转运到肠道外的比例分别为 52%、55% 和 55%;肠道内游离形式的氨基酸所占比例分别为 7%、10% 和 16%;肠道蛋白质结合的试验氨基酸比例为 17%、15% 和 16%;其他类所占比例分别为 24%、20% 和 13%。

实验结果显示,草鱼肠道吸收的 Leu 和 Tyr 较大比例地转运到了肠道外,部分留存于肠道内以游离氨基酸形式存在,部分用于了肠道蛋白质的合成,同时还有部分被分解或转化利用(本试验中的其他部分)。从 Leu 和 Tyr 在 0.5mmol/L—2.5mmol/L 浓度区域的变化趋势来看,草鱼肠道在两种氨基酸吸收效率、用于蛋白质合成和其他部分的比例大小等方面均有很大的差异,表现出氨基酸种类特异性。本试验中 Tyr 用于蛋白质合成和其他部分的比例大于 Leu。从灌流液氨基酸浓度对吸收转运率和蛋白质合成、其他利用等的影响来看,Leu 浓度对吸收及利用的效果影响程度较大,而 Tyr 的影响较小。这些在离体条件下的试验结果反映了肠道对流过肠道内的氨基酸进行吸收和利用的一般特征性变化规律,能否代表活体条件下的结果则需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] Su N, Zhou A G. Intestinal mucosal amino acid catabolism and its implications[J]. *Journal of Sichuan Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*. 2000, 14(2): 47—52[苏宁,周安国 肠粘膜中氨基酸的分解代谢意义. 四川畜牧兽医学院学报, 2000, 14(2): 47—52]
- [2] Stoll B, Henry J, Reeds PJ, et al. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets[J]. *J Nutr* 1998, 128, 606—614
- [3] Ye Y T, Ling S M, Luo L, et al. Study on the Absorption of L-Leucine and L-Phenylalanine by the intestine of Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Acta Zoologica Sinica*. 2000, 46(1): 52—57[叶元土,林仕梅,罗莉,等. 草鱼肠道对亮氨酸和苯丙氨酸的吸收. 动物学报, 2000, 46(1): 52—57]
- [4] Ye Y T, Cai C F, Lin S M, et al. The Perfusion Technique of the Fish Intestine in Vitro[J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2002, 29(6): 26—27[叶元土,蔡春芳,林仕梅,等. 鱼类肠道离体灌流试验系统. 中国畜牧兽医, 2002, 29(6): 26—27]
- [5] Ye Y T, Ling S M, Luo L, et al. The Transmural Fluxes of 10 Essential Amino Acid By the Intestinal Gut of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in Vitro[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(4): 311—317[叶元土,林仕梅,罗莉,等. 草鱼肠道对

- 10种必需氨基酸的吸收. 中国水产科学, 2003, 10(4): 311—317]
- [6] Wu G Y, Pan H Z, Wu H, Data Enchiridion of Biochemistry and biomolecule[M], Beijing: Science Press, 2002, 112—113[吴冠芸, 番华珍, 吴 , 生物化学与分子生物学实验常用数据手册. 北京: 科学出版社, 2002, 112—113]
- [7] Windmueller H G. Glutamine utilization by the small intestine[J]. *Adv. Enzymol*, 1982, 53: 201—237

STUDY ON THE ABSORPTION AND UTILIZATION OF L-LEUCINE AND L-TYROSINE BY THE INTESTINE OF GRASS CARP(*CTENOPHARYNGODON IDELLUS*) IN VITRO

KUANG Xue-Mei¹, YE Yuan-Tu², CAI Chun-Fang², WANG Yong-Ling² and JIANG Rong²

(1. Agriculture College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524088; 2. College of Agriculture Science and Technology in Suchoan University, Suzhou 215006)

Abstract: The transmural fluxes of L-Leucine and L-Tyrosine were measured by in the intestinal gut, using the in vitro perfusion technique. The transmural rates of L-Leucine are 0.026, 0.062 and 0.038($\mu\text{mol/g/min}$) when the concentrations of the perfusion Leucine are 1.0, 5.0 and 10.0mmol/L at the 10 min respectively. The transmural rates of L-Tyrosine are 0.006, 0.024 and 0.039($\mu\text{mol/g/min}$) when the concentrations of the perfusion L-Tyrosine are 0.5, 1.5 and 2.5mmol/L the 10min respectively. The total absorption ratios of the L-Leucine are 12.83%, 18.85% and 16.45% when the concentrations of the perfusion L-Leucine are 1.0, 5.0 and 10.0mmol/L for 40 minutes respectively. The total absorption ratios of the L-Tyrosine are 22.18%, 23.68% and 27.49% when the concentrations of the perfusion L-Tyrosine are 0.5, 1.5 and 2.5mmol/L for 40 minutes respectively.

The percentage of the transmural fluxes through the intestinal gut, the free in intestine, that in new synthesized protein and the remainders in intestine to the total absorbed amino acid were calculated respectively. When the concentration of the perfusion L-Leucine are changed from 1.0mmol/L to 5.0mmol/L and 10.0mmol/L, the transmural ratio are 83%, 66% and 35% respectively. The free in intestine are 9%, 28% and 49% respectively. That in protein are 2%, 5% and 13%. The remainders are 6%, 1% and 3% respectively. When the concentration of the perfusion L-Tyrosine are changed from 0.5mmol/L to 1.5mmol/L and 2.5mmol/L, the transmural ratio are 52%, 55% and 55% respectively. The free in intestine are 7%, 10% and 16% respectively. That in protein are 17%, 15% and 16%. The remainders are 24%, 20% and 13% respectively.

Key words: L-Leucine; L-Tyrosine; Protein synthesizing; Intestine; Grass carp