

谷氨酰胺二肽对日本对虾血清生化指标、肝胰腺细胞凋亡及肠粘膜形态的影响*

叶均安¹ 王冰心¹ 孙红霞² 李瑞丽¹ 伊祥华³
周奕毅¹ 吴旧生¹ 刘波静¹

(1. 浙江大学动物科学学院 杭州 310029; 2. 浙江省象山县农林局 宁波 315700;
3. 宁波象山大目涂经济开发总公司 宁波 315700)

提要 采用饲养对比试验方法,研究了谷氨酰胺二肽(Gln 二肽)对日本对虾血清生化指标、肝胰腺细胞凋亡和肠绒毛的影响及对虾体健康的作用。结果表明,饲喂 Gln 二肽各组的 PO、LSZ、ACP 含量均显著($P<0.05$)高于对照组,添加 0.5%和 1.0% Gln 二肽组的 SOD 和 ALP 含量也显著($P<0.05$)高于对照组;添加 1.0% Gln 二肽的 TP 含量显著($P<0.05$)高于其它各组。血清 TP、PA、UN、CHO、PO、LSZ、SOD、ALP、ACP 和 LDH 等各项指标均随 Gln 二肽添加量的提高而呈现增加趋势。试验建立了流式细胞术检测对虾肝胰腺细胞凋亡率的方法;肝胰腺细胞凋亡率随着日粮 Gln 二肽添加量的增加而显著降低($P<0.05$)。肠道切片显微观测结果表明,添加 1.0%的 Gln 二肽能显著增加日本对虾肠绒毛高度($P<0.05$)。饲料中添加 Gln 二肽可显著提高日本对虾血清中的溶菌酶、抗氧化酶及磷酸酶活性,降低肝胰腺细胞凋亡率,增加肠绒毛高度,改善虾体健康状况。

关键词 谷氨酰胺二肽, 日本对虾, 总蛋白, 抗氧化酶, 细胞凋亡, 肠粘膜形态
中图分类号 Q955

谷氨酰胺(Glutamine, Gln)是机体一些快速分裂细胞的主要能量来源,在维持肠道和免疫系统的正常形态和功能方面有着重要的作用。肝脏作为机体最重要的解毒和代谢器官,在疾病、应激、外伤、氧化自由基大量生成等情况下,往往出现功能异常或损伤。大量研究证实,补充 Gln 有助于减少机体的蛋白质分解,改善体内氮平衡,对肝脏具有保护作用(Yu *et al*, 1999; Babu *et al*, 2001);而虾体肝胰腺是病毒侵袭的主要部位,保持肝胰腺的健康有利于提高对虾的抵御病害能力(黄灿华等, 1999);肠道是虾体对饲料物质消化、吸收的重要器官,也是重要的免疫防御器官(苏宁等, 2000)。而谷氨酰胺二肽(Gln dipeptide)以其稳定性好、水溶性高以及体内利用效率高的特点,已在临床医学和畜禽生产中有较多的应用研究(Yu *et al*, 1999; Babu *et al*, 2001; 果磊等, 2002; 席鹏彬等,

2007; Rosangela *et al*, 2003)。流式细胞术(Flow cytometry, FCM)具有对细胞分析和分选的功用,开创了生物细胞研究的新领域,是近年来临床医学、兽医学上分析评价生物细胞增殖与凋亡的主要方法。综观国内研究报道,尚未见流式细胞术及 Gln 在对虾中的应用研究。本试验通过检测日本对虾血清总蛋白、前白蛋白及氧化酶、溶菌酶、磷酸酶等生化指标,建立流式细胞术检测日本对虾肝胰腺的细胞凋亡率方法以及观测肠道粘膜形态,探讨饲料中添加谷氨酰胺二肽对虾体健康状况的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

丙氨酰谷氨酰胺(Ala-Gln, 即 Gln 二肽)购于上海旭新化工科技有限公司,纯度为 99.6%;胰蛋白酶为

* 国家科技部项目“对虾生物防病制剂及稳产养殖技术规模化应用示范”, 04EFN213310124 号;宁波市重大农业攻关专项, 2007C10026 号。叶均安, 副教授, E-mail: yja@zju.edu.cn

收稿日期: 2008-03-12, 收修改稿日期: 2008-05-19

Sigma 公司产品, RPMI.1640 培养液购于杭州昊天生物技术有限公司, 超级小牛血清为杭州四季青公司产品。Binding Buffer、Annexin V-FITC、Propidium Iodide 购自杭州联科生物技术有限公司。FACSCalibur 型流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 试验动物及饲料

选用体长为 9—10cm、体重 11—14g 的健康日本对虾 240 尾, 随机分为四组, 每组设三个重复, 每个重复 20 尾, 饲养于 60cm × 45cm × 30cm 水族箱中, 底部铺沙 6cm, 水温(25 ± 1) °C, pH 7.6 ± 0.2, 日换水二分之一, 晚间投料三次。各组分别饲喂基础饲料(0% Gln 二肽组), 基础饲料添加 0.25% Gln 二肽组、添加 0.5% Gln 二肽组和添加 1.0% Gln 二肽组。试验期为 16 天, 试验结束时, 从心腔采血, 分离血清, 每一重复组制备 3 个样本; 同时采集肝胰腺, 制备单细胞悬液, 制备 3 个样本; 并随机抽取 5 只虾采集肠道, 制备切片。

基础饲料组成(%): 去皮豆粕 18.0、进口鱼粉 40.0、花生粕 10.0、啤酒酵母 4.0、谷元粉 1.5、高筋面粉 15.5、鱼油 1.5、黑乌贼膏 4.0、磷脂油 1.5、磷酸二氢钙 1.5、甜菜碱 0.2、复合维生素 1.0、矿物质 1.0、粘合剂 0.3。营养水平(%): CP 45.0、EE 7.0、CF 1.10、Ash 11.8、Ca 2.10、P 1.39、AP 1.28、Lys 2.86、Arg 2.65、Met+Cys 1.40、Cl 0.73、Na 0.40。添加 Ala-Gln 各组的啤酒酵母用量相应减少。各组饲料用 2mm 孔径的绞肉机制成颗粒, 80 °C 通风烘干备用。

1.2.2 血清生化指标

总蛋白(TP)采用双缩脲法, 尿素氮(UN)采用脲酶连续监测法; 前白蛋白(PA)采用免疫比浊测定法, 测定试剂由上海复星长征医学科学有限公司生产; 胆固醇(CHO)采用氧化酶法, 测定试剂由宁波赛克生物技术公司生产。酚氧化酶(PO)采用甲基邻苯二酚法, 溶菌酶(LSZ)采用对照比浊法, 碱性磷酸酶(ALP)采用对硝基苯磷酸二钠法, 酸性磷酸酶(ACP)采用磷酸苯二钠法。超氧化物歧化酶(SOD)采用黄嘌呤氧化酶法, 测定试剂由南京建成生物工程研究所第一分所生产。乳酸脱氢酶(LDH)采用连续监测法 L-P。所用仪器为英国朗道公司生产的 RX-DAYTONA 型全自动生化测定仪。

1.2.3 制备单细胞悬液

参照左连富(1991), 取活体对虾, 冰水麻醉 30min, 75%酒精体表消毒 10min, 采集肝胰腺, 去外层包膜, 研磨, 然后加入 6ml 含 0.25%胰蛋白酶 Hanks 溶液消化 5min, 400 目尼龙网过滤, 滤液 3000r/min 离心 10min, 去上清液, 再加

4ml Hanks 液冲洗, 轻柔震荡悬浮细胞, 3000r/min 离心 5min。去上清液, 加 2ml 细胞含 10%小牛血清、100IU/ml 青霉素、100IU/ml 链霉素的 RPMI1640 完全培养液(pH=7.4), 震荡悬浮细胞。于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱培养 24h。

1.2.4 流式细胞术检测肝胰腺细胞凋亡率

细胞培养液 3000r/min 离心 5min, 弃上清液, 加 1ml 预冷的 PBS 冲洗, 吸取 100μl 溶液, 加 500μl Binding Buffer, 再加 5μl Annexin V-FITC、10μl Propidium Iodide, 避光反应 20min, 上流式细胞仪分析, 通过计算机程序计算细胞凋亡百分数。

1.2.5 肠道粘膜形态测定

采集活体对虾的肠道, 固定标本, 常石蜡包埋切片, 切片厚 5—8μm, 经二甲苯脱蜡, 下行梯度酒精脱水后, 苏木精复染色 20min, 盐酸酒精分化, 自来水兰化 2h 后, 上行梯度酒精脱水, 并在 90%伊红酒精中染色 40s, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜观察拍照, 测量小肠绒毛高度。

1.2.6 统计学方法

血液生化指标数据采用 SAS 6.12 软件的 GLM 程序进行单因子方差分析, 并用 DUNCAN 氏新复级差法进行多重比较分析。细胞凋亡测定数据用 Cell Quest Plot 软件程序(美国 BD 公司生产)进行处理, 计量资料采用均数 ± 标准差表示, 应用 SPSS11.0 统计软件, 用 Bonferroni 法进行两两比较, 以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。肠道切片图像用 ImageJ (NIH 共享软件)进行图像分析, 肠绒毛数据用 ANOVA 法进行比较。

2 结果

2.1 血清 TP、PA、UN 和 CHO 含量

由表 1 可见, 添加 1.0% Gln 二肽的 TP 含量显著 ($P < 0.05$) 高于其它各组外, PA、UN 和 CHO 含量各組间无差异 ($P < 0.05$)。但随 Gln 二肽添加量提高, 血清 TP、PA、UN 和 CHO 含量等各项指标均呈现增加趋势。

2.2 血清 PO、LSZ、SOD、ALP、ACP 和 LDH 含量

由表 2 可见, 饲喂 Gln 二肽各组的 PO、LSZ、ACP 含量均显著 ($P < 0.05$) 高于对照组, Gln 二肽添加量高于 0.5% 以上各组的 SOD 和 ALP 含量也显著 ($P < 0.05$) 高于对照组; 而添加不同水平 Gln 二肽对 LDH 影响不显著 ($P > 0.05$)。血清 PO、LSZ、SOD、ALP、ACP 和 LDH 含量等各项指标均随 Gln 二肽添加量提高而呈现增加趋势。

2.3 肝胰腺细胞凋亡率

由表 3 可见, 肝胰腺细胞凋亡率随着日粮 Gln 二

表 1 饲喂不同水平 Gln 二肽对日本对虾的血清 TP、PA、BUN 和 CHO 含量的影响

Tab.1 Effect of oral administration of glutamine dipeptide on serum TP, PA, BUN and CHO in *P. japonicus*

项 目	Gln 二肽				SEM
	0%	0.25%	0.5%	1.0%	
总蛋白 TP (g/L)	53.02 ^b	53.05 ^b	54.86 ^b	62.51 ^a	2.058
前白蛋白 PA (mg/L)	4.20	4.82	5.15	5.34	0.390
尿素氮 UN (mmol/L)	2.09	2.11	2.40	2.67	0.188
胆固醇 CHO (mmol/L)	1.19	1.28	1.29	1.49	0.107

注: 同行上标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同

表 2 饲喂不同水平 Gln 二肽对日本对虾血清 PO、LSZ、SOD、ALP、ACP 和 LDH 含量的影响

Tab.2 Effect of oral administration of glutamine dipeptide on serum PO, LSZ, SOD, ALP, ACP and LDH in *P. japonicus*

项 目	Gln 二肽				SEM
	0%	0.25%	0.5%	1.0%	
酚氧化酶 PO (U/ml)	2.05 ^c	2.63 ^b	3.04 ^{ab}	3.22 ^a	0.141
溶菌酶 LSZ (U/g)	0.74 ^c	0.84 ^b	0.92 ^a	0.97 ^a	0.025
碱性磷酸酶 ALP (IU/L)	49.71 ^b	54.70 ^b	74.07 ^a	79.91 ^a	2.949
酸性磷酸酶 ACP (IU/L)	30.08 ^c	42.93 ^b	52.60 ^a	54.32 ^a	2.058
超氧化物歧化酶 SOD (U/L)	126.65 ^b	134.34 ^b	172.94 ^a	182.22 ^a	10.275
乳酸脱氢酶 LDH (U/L)	2.13	2.30	2.30	2.61	0.228

表 3 Gln 二肽对日本对虾肝胰腺细胞凋亡率的影响

Tab.3 Effect of glutamine dipeptide on hepatopancreas apoptosis in *P. japonicus*

项 目	Gln 二肽			
	0%	0.25%	0.5%	1.0%
平均凋亡率(%)	24.92±2.43 ^a	19.56±2.23 ^b	16.80±1.35 ^{bc}	13.47±2.29 ^c
<i>n</i>	9	9	9	9

肽添加量的增加显著性降低($P<0.05$)。

2.4 肠道粘膜形态

通过细微结构观测比较, 0%、0.25% 和 0.5% Gln 二肽添加组的日本对虾肠道粘膜相对萎缩, 部分上皮细胞脱落, 绒毛水肿, 绒毛排列紊乱、稀疏, 1.0% Ala-Gln 添加组的日本对虾的肠结构较其它三组完整, 肠道粘膜增厚, 未见明显上皮细胞脱落, 绒毛轻度水肿, 绒毛排列整齐、致密, 肠绒毛高度显著增加($P<0.05$), 见图 1 和表 4。

3 讨论

3.1 Gln 二肽对虾体血液中的成分及免疫状态的影响

谷氨酰胺作为一种特殊的营养物质, 已经引起人们的普遍关注。Gln 是一种条件必需氨基酸, 参与多种代谢必需物质的合成, 具有促进正氮平衡和蛋白质合成、

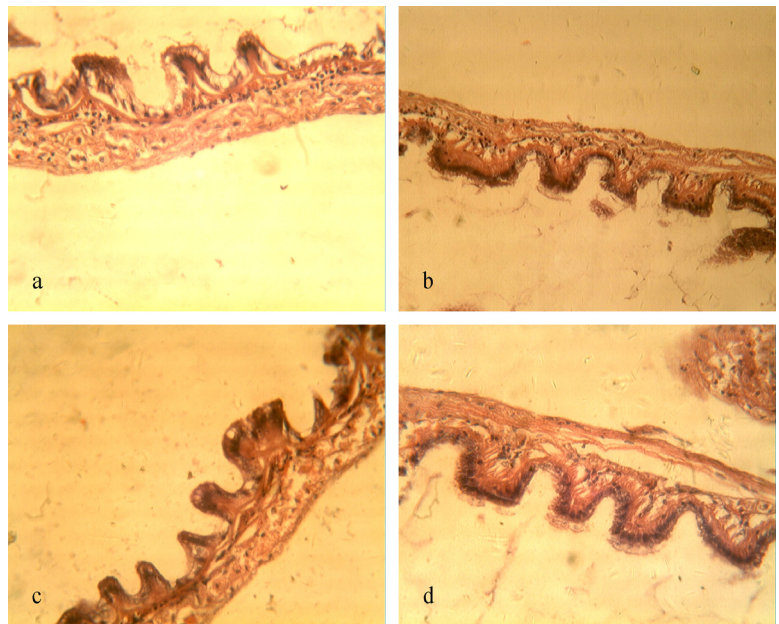


图 1 肠道粘膜形态

Fig.1 Morphology of intestinal mucosa

a. 0% Gln 二肽组样本, b. 0.25% Gln 二肽组样本, c. 0.5% Gln 二肽组样本, d. 1.0% Gln 二肽组样本

表4 日本对虾小肠绒毛测量结果
Tab.4 Height of intestinal villi in *P. Japonicus*

项目	Gln 二肽			
	0%	0.25%	0.5%	1.0%
肠绒毛高度(μm)	76.15 \pm 4.43	81.01 \pm 3.40	73.47 \pm 2.43	104.49 \pm 4.29
<i>n</i>	89	124	110	104

维持肠粘膜屏障、改善机体营养状况、增强机体免疫能力等多种功能。肝脏维持机体谷氨酰胺平衡,既能合成谷氨酰胺,也消耗谷氨酰胺,在生理代谢中起重要作用。ALP广泛存在于高等动物的各个组织中,在多种软体动物的体内也发现ALP,与贝类壳角蛋白等蛋白质的分泌相关,并可参与蛋白质的合成(高风英等,2005)。本试验发现Gln二肽对血清中的TP、PA、BUN和CHO合成具有一定促进作用,而PO、LSZ、SOD、ALP、ACP和LDH等酶活力的提高是Gln二肽促进了这些酶的合成还是对原有物质的激活或是双重作用,尚有待深入研究。

本试验结果表明:在饲料中添加Gln二肽显著提高血清中PO、LSZ、SOD、ALP和ACP等酶活力。PO作为类补体系统,在识别异物、释放调理素、促进血细胞的吞噬和包囊以及产生杀灭和排除异物的凝集素和溶菌酶等免疫功能方面发挥着重要作用(Philippe, 1999)。LSZ是吞噬细胞杀菌的物质基础,能水解革兰氏阳性细菌的细胞壁中粘肽的乙酰氨基多糖并使裂解被释放出来,形成一个水解酶体系,破坏和消除侵入体内的异物,从而担负起机体防御的功能(孟凡伦等,1999)。当体内吞噬细胞吞噬细菌等异物时,产生大量超氧阴离子、 H_2O_2 与 OH^- ,及其衍生物如脂质过氧化产物及单线氧 $^1\text{O}_2$,这些物质攻击周围生物分子,引起蛋白变性、脂类过氧化以及DNA断裂等,若不及时清除,可导致机体老化,抗病能力下降甚至死亡(Halliwell *et al*, 1989)。SOD通过消除体内多余的自由基,使自由基的形成和消除处于动态平衡,免除对生物体的伤害,增强吞噬细胞的防御能力,在预防机体衰老、抵抗生物分子损伤及改善机体的免疫功能等方面具有极为重要的作用。由此可见,在饲料中添加Gln二肽可显著改善对虾的防御能力,提高非特异性免疫功能。

3.2 制备对虾肝胰腺单细胞悬液条件

本试验在分离肝胰腺组织时尝试过研磨法,剪碎法和酶解法。研磨法指用研磨研,移液枪反复吹打,流式细胞仪检测发现细胞破裂严重,细胞碎片很多,

严重影响检测准确性。剪碎法即用剪刀剪碎,移液枪反复吹打,结果第一次离心沉淀较多,造成第二次离心后单细胞极少,流式细胞仪检测也发现有较多细胞碎片,影响试验结果。试验最后选取0.25%的胰蛋白酶消化5min,在倒置显微镜下观察细胞分离比较彻底,有利于流式细胞仪检测凋亡率。

制备对虾肝胰腺单细胞悬液还有两个重要的条件,一是pH值,二是离心速度。由于分泌消化液,日本对虾的肝胰腺内部偏碱性,其细胞在碱性条件下应该生长得更好,经比较分析在pH7.6的条件下,制备的肝胰腺单细胞生长良好;离心速度以3000r/min较为合适,既能较多的分离出肝胰腺单细胞,又不破坏其细胞结构。为进一步研究虾肝胰腺细胞凋亡奠定了基础。

3.3 谷氨酰胺影响肝胰腺细胞凋亡作用机制

Gln二肽可使对虾保持一个较高的免疫状态,那么长期处于较高免疫状态的对虾是否是健康呢?这一问题尚未引起广泛关注。FCM具有对细胞分析和分选的功用,是近年来评价生物细胞健康状况的新方法。本试验通过FCM发现随着Gln二肽添加水平的增加,日本对虾肝胰腺的细胞凋亡率显著降低,表明细胞健康状况得到了显著改善。但作用机制仍未完全阐明,目前研究的可能机制有:(1)分子执行机制:Gln能活化促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、细胞凋亡信号调节激酶(apoptosis signal-regulating kinase-1, ASK-1)、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、JUN-核激酶和P38MAPK,激活MAPK细胞信号传导途径,从而使活化蛋白-1(active protein-1, AP-1)水平增高,调节细胞的增生和凋亡(Conzales *et al*, 2005)。(2)Bcl-2:Bcl-2是一种抑制凋亡的基因,主要分布于细胞内膜,如线粒体膜等,通过抗凋亡作用延长细胞寿命。而Gln能使Bcl-2基因表达增强,从而抑制细胞凋亡(王剑明等,2000)。(3)GSH:谷胱甘肽(GSH)是一种由半胱氨酸、甘氨酸和谷氨酸组成的三肽小分子化合物,在谷胱甘肽过氧化物酶的作用

下,自身氧化,对抗氧自由基诱导的细胞凋亡。Gln 是 GSH 合成的必需物质,补充 Gln 可以增加细胞总 GSH、还原型 GSH 的含量,发挥抗氧化、抗凋亡的作用(Wasa *et al*, 2005)。(4) 热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs): 热休克蛋白是一种因环境温度升高诱导细胞合成的特殊蛋白质,在应激时某些 HSPs 具有抗凋亡的作用。Wischnmeyer 等(2003)发现 Gln 能通过增加 HSP-70(热休克蛋白-70)对抗氧化应激诱导的细胞凋亡。(5) NF- κ B: NF- κ B 是一种普遍存于细胞浆的快反应转录因子,在正常情况下 NF- κ B 与抑制蛋白 I κ B 结合以非活性的状态存在于大多数细胞的胞浆中。但是在应激状态下, NF- κ B 可以被激活,与 DNA 启动子上特定的认知序列结合,使凋亡基因 P53 转录表达增多。于如同等研究表明 Gln 的产物 GSH 可以抑制 NF- κ B 活性,从而抑制应激所导致的凋亡和炎症反应(于如同等, 2003)。综上所述,关于 Gln 二肽影响对虾细胞凋亡的作用机制尚待进一步研究。

3.4 谷氨酰胺对日本对虾肠道粘膜形态的影响

谷氨酰胺不仅是肠道粘膜细胞代谢活动的主要能源,也是维持肠道粘膜结构和功能完整的不可缺少的特殊氨基酸。Potsic 等(2002)研究发现外源性谷氨酰胺缺乏和内源性谷氨酰胺合成受阻,均引起大鼠肠绒毛萎缩和数目减少,电镜下可见肠细胞间连结被破坏。国内外许多试验证明,添加外源性的谷氨酰胺可明显促进猪、鸡等动物的生长发育、改善小肠的吸收功能,促进营养物质的吸收(席鹏彬等, 2007; 戴四发等, 2005)。从本试验结果中可以发现,添加 1.0%的 Gln 二肽可以显著增加日本对虾肠绒毛高度,肠结构也较其它三组完整,肠道粘膜增厚,绒毛排列整齐、致密,表明 1.0%的 Gln 二肽对日本对虾肠道有良好的营养作用。

本研究结果表明:在饲料中添加 Gln 二肽显著提高日本对虾血清中的溶菌酶、抗氧化酶及磷酸酶活性,降低肝胰腺细胞凋亡率,显著增加小肠绒毛高度,有利于维持肠道结构和功能的完整,改善虾体健康状况,从而提高对虾抵御病害的能力,对实际生产有一定的指导意义。但其作用机制、最适添加量仍有待进一步研究。

参 考 文 献

于如同,李 祥,高立达等, 2003. 氧化应激诱导神经细胞凋亡与 C-myc、Fas-Fast、NF- κ B 关系的研究. 中华创伤杂志, 6(19): 344—347

- 王剑明,孙宏武,邹 倩等, 2000. 阻塞性黄疸大鼠肝组织细胞凋亡及相关基因 Bcl-2、Bax 的表达. 中华实验外科杂志, 17(1): 32—33
- 左连富, 1991. 流式细胞样本制备技术(第 1 版). 北京: 华夏出版社, 11—16
- 苏 宁,周安国, 2000. 肠粘膜中氨基酸的分解代谢意义. 四川畜牧兽医学院学报, 14(2): 47—52
- 果 磊,贺光照,黄崇本, 2002. 谷氨酰胺(GLN)对烧伤大鼠肠道粘膜损伤的保护作用. 重庆医科大学学报, 27(4): 403—405, 412
- 孟凡伦,张玉臻,孔 健, 1999. 甲壳动物中的酚氧化酶原激活系统研究评价. 海洋与湖沼, 30(1): 110—116
- 高凤英,叶 星,白俊杰, 2005. 两种沼虾溶菌酶基因 ORF 的克隆和罗氏沼虾溶菌酶基因的组织表达. 水生生物学报, 29(6): 615—620
- 席鹏彬,林映才,蒋宗勇等, 2007. 谷氨酰胺二肽对断奶仔猪生长、免疫、抗氧化力和小肠粘膜形态的影响. 动物营养学报, 19(2): 135—141
- 黄灿华,陈棣华, 1999. 中国对虾病虾体内同工酶表型变化的初步研究. 中国水产科学, 6(1): 45—49
- 戴四发,李有志,李如兰等, 2005. 外源性谷氨酰胺对肉仔鸡空肠形态结构的影响. 畜牧兽医学报, 36(1): 100—104
- Babu R, Eaton S, Drake D P *et al*, 2001. Glutamine and glutathione counteract the inhibitory effects of mediators of sepsis in neonatal hepatocytes. *Ann Surg*, 36(2): 282—286
- Conzales S, Polizio A H, Erario M A *et al*, 2005. Glutamine is highly effective in preventing *in vivo* cobalt-induced oxidative stress in rat liver. *World J Gastroenterol*, 11(23): 3533—3538
- Halliwell B, Gutteridge J M C, 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine* (2nd ed). Oxford: Clarendon Press, 85
- Philippe R, 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 172: 125—145
- Potsic B, Holliday N, Lewis P *et al*, 2002. Glutamine supplementation and deprivation: effect on artificially reared rat small in testinal morphology. *Pediatr Res*, 52(3): 430—436
- Rosangela P J M, Luis B P, Raquel M M T *et al*, 2003. Effect of glutamine dipeptide on hepatic regeneration in partially hepatectomized malnourished rats. *Nutrition*, 19(12): 930—935
- Wasa M, Soh H, Shimizu Y *et al*, 2005. Glutamine stimulates amino acid transport during ischemia-reperfusion in human intestinal epithelial cells. *J Surg Res*, 123(1): 75—81
- Wischnmeyer P E, Van den Hoek T L, Li C *et al*, 2003. Glutamine preserves cardiomyocyte viability and enhances recovery of contractile function after ischemia-reperfusion injury. *J Parenter Enteral Nutr*, 27(2): 116—122
- Yu J C, Jiang Z M, Li D M, 1999. Glutamine: a precursor of glutathione and its effect on liver. *World J Gastroentero*, 5(2): 143—146

BIOCHEMICAL EFFECTS OF GLUTAMINE DIPEPTIDE ON *PENAEUS JAPONICUS*

YE Jun-An¹, WANG Bing-Xin¹, SUN Hong-Xia², LI Rui-Li¹, YI Xiang-Hua³,
ZHOU Yi-Yi¹, WU Jiu-Sheng¹, LIU Bo-Jing¹

(1. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou, 310029; 2. Xiangshan Agriculture and Forest Bureau, Ningbo, 315700;
3. Xiangshan Damutu Economics Development Limited Company, Ningbo, 315700)

Abstract The effects of glutamine dipeptide on serum biochemical parameters, wither of pancreas cells, morphology of intestinal mucosa in *Penaeus japonicus* are studied. 240 individuals in 9—10cm in length and 11—14g in body weight were randomly assigned to four treatments in three replicates and 20 prawns in each tank. The groups received in oral administration the same basal diet supplemented of 0%, 0.25%, 0.5% or 1.0% glutamine dipeptide, respectively. The trial lasted for 16 days. The results show that adding glutamine-dipeptide significantly increased serum phenoloxidase, lysozyme, and acid phosphatase activity ($P<0.05$). The serum superoxide dismutase and alkaline phosphatase activity was significantly higher in with 0.5% or 1.0% groups than the control ($P<0.05$), and significantly higher total protein concentration in plasma of the 1.0% group than the control and others ($P<0.05$). In addition, increases were also found in plasma total protein, prealbumin, uric nitrogen, cholesterol, phenoloxidase activity, lysozyme activity, superoxide dismutase activity, alkaline phosphatase activity, acid phosphatase activity, and lactate dehydrogenase. The apoptosis of the hepatopancreas cells was established in flow cytometry, showing that the apoptosis was significantly reduced ($P<0.05$); adding 1.0% glutamine dipeptide significantly increased the intestinal villi height ($P<0.05$). Therefore, glutamine dipeptide could enhance the activity of lysozyme, antioxidant enzyme, and phosphatase in plasma, decrease the rate of apoptosis of hepatopancreatic cells, and increase intestinal villi height in *P. japonicus*; in other words, the healthy of prawns were improved.

Key words Glutamine dipeptide, *Penaeus japonicus*, Total protein, Antioxidant enzyme, Apoptosis of hepatopancreatic cells, Intestinal mucosa morphology