

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00815

饲料脂肪水平对瓦氏黄颡鱼生长及脂蛋白脂酶基因表达的影响

郑珂珂^{1,2} 朱晓鸣¹ 韩冬¹ 杨云霞¹ 雷武¹ 解绶启^{1,3}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 上海高校 E-研究院, 上海 200025)

摘要: 研究采用脂肪水平分别为 4.7%、7.9%、10.9%、15.4%、18.9%的五种等氮配合饲料饲喂瓦氏黄颡鱼早期幼鱼, 进行了为期 30d 的生长实验, 探讨了瓦氏黄颡鱼早期幼鱼的脂肪需求。并克隆了瓦氏黄颡鱼脂蛋白脂酶(LPL) cDNA 序列片段, 采用实时荧光定量 PCR 研究了饲料脂肪水平对肝脏 LPL 基因表达水平的影响。结果表明, 饲料脂肪水平从 4.7%增加到 10.9%显著促进了瓦氏黄颡鱼早期幼鱼的生长($P<0.05$)。饲料脂肪水平显著影响了实验鱼的鱼体成分, 随着饲料脂肪水平的升高, 鱼体干物质和脂肪含量显著增加而蛋白含量显著下降($P<0.05$)。高脂诱导了瓦氏黄颡鱼肝脏 LPL 基因表达, 摄食 15.4%、18.9%这两组较高脂肪水平的实验鱼肝脏 LPL mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$)。根据特定生长率通过折线回归分析得出瓦氏黄颡鱼早期幼鱼最适脂肪水平为 11.2%。

关键词: 脂肪; 脂蛋白脂酶; 基因表达; 瓦氏黄颡鱼

中图分类号: S963.73 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)04-0815-07

脂蛋白脂酶(Lipoprotein lipase, LPL)是脂质代谢的关键酶, 主要催化乳糜微粒和极低密度脂蛋白中的甘油三酯水解, 产生甘油并释放出游离脂肪酸以供贮脂器官贮存, 或诸如肌肉等其他器官氧化^[1]。研究表明 LPL 是哺乳类肥胖基因借以调节机体脂质代谢的重要功能蛋白。LPL 通过控制其在脂肪组织与其他组织器官表达水平的高低直接决定脂肪组织与其他组织器官脂质底物配额的相对量, 从而间接决定从食物中摄入脂类的代谢前途: 以体脂形式贮备起来或作为能源底物消耗掉, 并最终对机体脂质蓄积状况产生决定性影响^[2]。肝脏是鱼类随营养状况而改变脂肪蓄积的主要调节性贮脂器官^[3], 并存在 LPL 活性^[4], 研究肝脏 LPL 表达有助于进一步理解鱼类肝脏脂肪调控机制, 了解脂肪肝的发生机制和预防手段, 促进养殖渔业的健康发展。

瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*), 又称江黄颡, 隶属于鲇形目(Siluriformes)、鲿科(Bagridae)、

黄颡鱼属(*Pelteobagrus bleeker*)。其肉质细嫩, 味道鲜美, 营养丰富, 具有较高的经济价值。随着人工养殖规模的不断扩大, 对瓦氏黄颡鱼苗种需求日见增加, 培育高质量的苗种成为一个重要环节。在本研究中, 我们通过生长实验探讨瓦氏黄颡鱼早期幼鱼的脂肪需求, 并克隆了 LPL 的 cDNA 片段, 研究不同饲料脂肪水平对肝脏 LPL 基因表达的影响, 为鱼类肝脏脂肪蓄积调控机制提供新信息。

1 材料与方法

1.1 实验鱼和实验条件

实验用鱼苗购于华中农业大学水产学院黄颡鱼繁养基地, 鱼苗开口摄食后投喂枝角类等自然湖水中捕捞的浮游动物, 之后逐渐转为投喂人工配合饲料(粗脂肪: 5.0%)。

实验初始瓦氏黄颡鱼为 21 日龄, 生长实验在室内循环水养殖系统内进行。实验鱼被随机分入 15 个

收稿日期: 2009-04-22; 修订日期: 2009-11-25

基金项目: 国家 973 计划(2009CB118702)资助

作者简介: 郑珂珂(1980—), 女, 汉族, 山东济宁人; 博士; 主要从事鱼类营养生理学研究。E-mail: zhengk@ysfri.ac.cn

通讯作者: 解绶启, Tel: 027-68780667, E-mail: sqxie@ihb.ac.cn

体积为 120 L(直径 70 cm×高 30 cm)的圆形钢化玻璃缸内, 每缸 100 尾。同时随机取三组实验鱼, 每组 100 尾, 滤干水分后称重, 用于计算初始平均体重。实验设五个处理组, 投喂 4.7%—18.9%五种不同脂肪水平的饲料, 每个处理组三个重复, 随机对应三个实验缸。实验期间, 每天手工饱食投喂三次(08:00, 14:00, 19:00), 投喂后 1h 用虹吸法移去残饵和粪便。实验缸进水流速为 10 L/min。实验期间水温变动范围为 21—25℃, pH 为 6.5±0.1, 溶氧高于 6 mg/L, 氨氮低于 0.5 mg/L, 余氯低于 0.05 mg/L。光照周期为 12h 光照:12h 黑暗。生长实验持续 30d。

1.2 实验饲料

实验使用脂肪水平为 4.7%—18.9%的五组等氮

不等能饲料, 以白鱼粉, 鱿鱼粉和水解酪蛋白为主要蛋白源, 以鱼油为主要脂肪源。实验饲料的配方和化学成分(表 1)。所有饲料原料送至江苏昆山强威精密粉碎机厂粉碎成粒径小于 50 μm 的粉料, 再送至上海渔家傲饲料有限公司加工制作。饲料采用微黏合工艺, 以明胶为黏合剂, 制作方法参照 Hardy & Barrows^[5]。饲料经不同目数的筛网分级后分别保存于-18℃备用。本实验所投喂饲料颗粒为 20—40 目(粒径为 380—830 μm)。

1.3 取 样

实验开始时, 随机取 15 尾实验鱼, 解剖镜下解剖取肝脏, 所有样品混合在一起作为瓦氏黄颡鱼肝脏 LPL mRNA 测定初始样品, 解剖后的肝脏立即放

表 1 实验饲料配方(g/100g 干物质)和化学成分

Tab. 1 Formulation (g/100g in dry matter) and chemical composition of the experimental diets

原料 Ingredient	饲料编号 Diet number				
	D1	D2	D3	D4	D5
白鱼粉 White fish meal (USA)	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0
水解酪蛋白 Casein hydrolysate ¹	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
鱿鱼粉 Squid meal	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
鱼油 Fish oil	—	4.5	9.0	13.5	18.0
a-淀粉 a-starch	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
纤维素 Cellulose	18.1	13.6	9.1	4.6	0.1
大豆卵磷脂 Soy lecithin	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
矿物盐预混物 Mineral premix ²	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
维生素预混物 Vitamin premix ³	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
氯化胆碱 Choline chloride	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
明胶 Gelatin	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
化学成分 Chemical composition (g/100g dry matter)					
干物质 Dry matter	89.9	87.8	90.2	89.9	89.9
粗蛋白 Crude protein	45.0	44.3	42.8	44.5	45.9
粗脂肪 Crude lipid	4.7	7.9	10.9	15.4	18.9
灰分 Ash	11.8	11.6	12.9	12.7	12.3
能量 Gross energy (kJ/g)	17.9	18.9	18.5	19.5	21.5

注: 1 水解酪蛋白: 购自 Sigma 公司(A-2427, Sigma, St Louis, MO, USA); 2 矿物盐预混物(mg/kg 饲料): 氯化钠, 500.0; 硫酸镁, 4575.0; 磷酸二氢钠, 12500.0; 磷酸二氢钾, 16000.0; 磷酸二氢钙, 6850.0; 硫酸亚铁, 1250.0; 乳酸钙, 1750.0; 硫酸锌, 111.0; 硫酸锰, 61.4; 硫酸铜, 15.5; 硫酸钴, 0.5; 碘酸钾, 1.5; 淀粉, 6385.1; 3 维生素预混物(每千克饲料含): 维生素 A, 5500 IU; 维生素 D₃, 1000 IU; 维生素 E, 50 IU; 维生素 K, 10 mg; 烟酸, 100 mg; 维生素 B₂, 20 mg; 维生素 B₆, 20 mg; 维生素 B₁, 20 mg; 生物素, 0.1 mg; 叶酸, 5 mg; 泛酸钙, 50 mg; 维生素 B₁₂, 20 mg; 维生素 C, 100 mg; 肌醇, 100 mg

Note: 1 Casein hydrolysate: A-2427, Sigma, St Louis, MO, USA; 2 Mineral premix (mg/kg diets): NaCl, 500.0; MgSO₄·7H₂O, 4575.0; NaH₂PO₄·2H₂O, 12500.0; KH₂PO₄, 16000.0; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 6850.0; FeSO₄, 1250.0; C₆H₁₀CaO₆·5H₂O, 1750.0; ZnSO₄·7H₂O, 111.0; MnSO₄·4H₂O, 61.4; CuSO₄·5H₂O, 15.5; CoSO₄·6H₂O, 0.5; KI, 1.5; Starch, 6385.1; 3 Vitamin premix (per kg diets): vitamin A, 5500 IU; vitamin D₃, 1000 IU; vitamin E, 50 IU; vitamin K, 10 mg; niacin, 100 mg; riboflavin, 20 mg; pyridoxine, 20 mg; thiamin, 20 mg; biotin, 0.1 mg; folic acid, 5 mg; calcium pantothenate, 50mg; B₁₂, 20 mg; ascorbic acid, 100 mg; inositol, 100 mg

入液氮中速冻, 保存于 -80°C 。实验结束时, 每缸随机捞取 3 条实验鱼, 冰盘上解剖取肝脏, 三尾鱼肝脏合为一个样品, 迅速投入液氮中速冻, 之后保存于 -80°C 用于 *LPL* 基因表达的分析。生长实验结束时计数每缸剩余的实验鱼, 并滤干称重, 计算终末每缸实验鱼平均体重, 实验鱼保存于 -20°C 用于鱼体成分分析。

1.4 肝脏 *LPL* mRNA 测定

引物 根据 Genbank 中现有的其他鱼类的 *LPL* 保守序列设计兼并引物: 正向引物为 5'-ACAT(C/T)TACCCCAA(C/T)GG(A/T)GG-3'; 反向引物为 5'-TGCGAATGTGGAAAGTGT C-3'。β-肌动蛋白基因引物为特异引物: 正向引物为 5'-CACTGTGCCCATCTACGAG-3'; 反向引物为 5'-CCATCTCCTGCTCGAAGTC-3', 扩增片段长度为 200 bp。所有引物均有上海生工公司合成。

总 RNA 的提取和反转录 RT-PCR 总 RNA 提取采用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)根据说明书进行 RNA 抽提。分别测量样品在 260 nm 和 280 nm 波长的吸光度值, 计算 RNA 样品的浓度和纯度。使用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (大连宝生物工程有限公司)将提取的瓦氏黄颡鱼肝脏总 RNA 反转录成 cDNA, 以 Oligo(dT)为引物, 反应条件为: 42°C 30 min, 99°C 5min, 5°C 5min。合成的 cDNA 第一链保存于 -20°C 。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 1min; 94°C 30s, 52°C 30s, 72°C 1min, 30 个循环; 72°C 延伸 2min。

PCR 产物的纯化、克隆和测序 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 切下目的片段, 用凝胶回收试剂盒(玻璃奶方法, BioStar)回收 DNA。纯化的产物与 pGEM[®]-T 载体连接, 转化到大肠杆菌 *E. coli* DH5α, 筛选阳性克隆, 提取质粒由上海联合基因有限公司进行测序。

实时荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR 测定

瓦氏黄颡鱼早期幼鱼肝脏中的 *LPL* mRNA 的相对表达量, 以 β-肌动蛋白为内参基因。根据所得的瓦氏黄颡鱼 *LPL* cDNA 序列利用 Primer 5.0 软件设计荧光定量 PCR 特异引物(表 2)。使用仪器为 Chromo4 Real-Time Detection System (MJ Research), 将 2 μL 模版 cDNA, 1 μL 引物对混合液, 7 μL ddH₂O 和 10 μL SYBR Green qPCR kit (Finnzymes, Finland)构成 20 μL 反应体系。每个样品做三个重复, 以不加模版的 PCR 反应样品作为阴性对照。反应循环参数为: 94°C 预变性 5min; 94°C 变性 20s, 60°C 退火 20s, 72°C 延伸 25s, 40 个循环。使用 Option Monitor software 2.03 version (MJ Research, Cambridge, MA)软件分析溶解曲线。根据 Pfaffl 法^[6]计算肝脏中脂蛋白脂肪酶的相对表达量, 以实验初始样品为对照组。计算公式为: 比率 = $\frac{(E_{\text{脂蛋白脂肪酶}})^{\Delta Ct(\text{对照组}-\text{处理组})}}{[(E_{\beta\text{-肌动蛋白}})^{\Delta Ct(\text{对照组}-\text{处理组})}]}$; $E_{\text{脂蛋白脂肪酶}}$ 为目标基因脂蛋白脂肪酶扩增效率; $E_{\beta\text{-肌动蛋白}}$ 为内参基因 β-肌动蛋白扩增效率; Ct 为 Threshold cycle 临界循环数, 即荧光阈值与扩增曲线相交, 交点对应的循环数。

1.5 生化分析

测定饲料和鱼体的干物质、粗蛋白、粗脂肪、灰分和总能, 参照以下方法进行(AOAC, 1984): 干物质在 105°C 烘干至恒重, 通过失重法测定; 粗蛋白采用 FOSS 定氮仪(2300 Kjeltac Analyzer Unit)测定; 粗脂肪采用索氏抽提仪(Soxtec system HT6, Tecator, Hoganas, Sweden)进行测定; 灰分在马福炉中 550°C 燃烧 3h, 失重法测定; 能值通过氧弹测热仪 (Philipson microbomb calorimeter, Gentry Instruments Inc., Aiken, USA)测定。

1.6 统计分析方法

采用 Statistic 6.0 统计软件进行分析。实验结果进行一元方差分析(One-way ANOVA), 差异显著时进行邓肯多重比较(Duncan's multiple range tests), $P < 0.05$ 被认为差异显著。通过折线法(Broken line),

表 2 本实验中实时荧光定量 PCR 使用的引物
Tab. 2 Real time PCR primers used in this experiment.

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	预期长度 Size (bp)
脂蛋白脂肪酶正向引物 Lipoprotein lipase F	TGGCTACCACAGGTTGAGA	197
脂蛋白脂肪酶反向引物 Lipoprotein lipase R	GACCTCATAGCCCACCTTG	
β-肌动蛋白正向引物 β-actin F	CACTGTGCCCATCTACGAG	200
β-肌动蛋白反向引物 β-actin R	CCATCTCCTGCTCGAAGTC	

根据瓦氏黄颡鱼特定生长率与饲料脂肪水平相关性得出最适的脂肪水平。

2 结果

2.1 生长

由表 3 可以看出,不同脂肪水平对瓦氏黄颡鱼的生长有显著影响,饲料脂肪水平为 4.7%—10.9%时,实验鱼特定生长率随着饲料脂肪水平的增加而升高,投喂 10.9%脂肪水平组的实验鱼特定生长率显著高于投喂 4.7%和 7.9%脂肪水平组($P<0.05$);而当饲料脂肪水平从 10.9%增加到 18.9%时,实验鱼特定生长率维持在同一水平,各组间没有显著差异($P>0.05$)。如图 1 所示,以特定生长率为评价指标,运用折线回归分析,可得 $y = 0.065x + 6.2507$ ($P<0.05$)和 $y = -0.0006x + 6.9827$ ($P>0.05$),两直线相交点为 11.2%,即瓦氏黄颡鱼早期幼鱼(21—51 日龄)最适饲料脂肪水平为 11.2%。本实验中饲料脂肪水平(4.7%—18.9%)对瓦氏黄颡鱼早期幼鱼存活率没

表 3 饲料脂肪水平对瓦氏黄颡鱼早期幼鱼生长和存活的影响(平均值±标准误)*

Tab. 3 Effect of dietary lipid levels on the growth and survival of *Pelteobagrus vachelli* early juvenile (Mean±S.E.)*

实验组 Treatment	终末体重 FBW ¹ (mg)	特定生长率 SGR ² (%/d)	存活率 Survival ³ (%)
Diet 1	518±14 ^a	6.61±0.09 ^a	98.67±0.88
Diet 2	525±12 ^{ab}	6.65±0.08 ^a	98.00±0.58
Diet 3	586±27 ^b	7.02±0.15 ^b	98.67±0.67
Diet 4	562±9 ^{ab}	6.88±0.06 ^{ab}	98.67±0.67
Diet 5	588±26 ^b	7.02±0.14 ^b	100.00±0.00

注:*表中同行数值后不同上标英文字母表示差异显著($P<0.05$),下同 Means in the same row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$), the same below; 实验鱼初始体重(Initial body weight)为(71±5) mg; 1 终末体重 FBW (mg): Final body weight; 2 特定生长率 SGR (%/d) = $100 \times [\ln(\text{末体重}) - \ln(\text{初体重})] / \text{天数}$ Specific growth rate (%/d) = $100 \times [\ln(\text{FBW}) - \ln(\text{IBW})] / \text{d}$; 3 存活率(%) = $100 \times (\text{终末存活鱼数} / \text{初始鱼数})$ Survival rate (%) = $100 \times (\text{Number of final surviving fish} / \text{number of initial fish})$

表 4 饲料脂肪水平对瓦氏黄颡鱼早期幼鱼体成分的影响(%湿重)(平均值±标准误)*

Tab. 4 Effect of dietary lipid level on body composition of *Pelteobagrus vachelli* early juvenile (% in wet weight) (Mean±S.E.)*

实验组 Treatment	水分 Moisture (%)	粗蛋白 Crude protein (%)	粗脂肪 Crude lipid (%)	灰分 Ash (%)	能量 Energy (kJ/g)
D1	85.00±0.11 ^a	10.10±0.03 ^a	2.35±0.32 ^a	2.22±0.03 ^{ab}	2.94±0.03 ^a
D2	83.80±0.18 ^b	10.43±0.02 ^b	3.04±0.07 ^b	2.29±0.01 ^{bc}	3.31±0.09 ^b
D3	82.68±0.27 ^c	10.49±0.08 ^b	3.82±0.14 ^c	2.35±0.02 ^c	3.80±0.09 ^c
D4	82.33±0.14 ^c	10.21±0.06 ^a	4.59±0.12 ^d	2.28±0.03 ^{bc}	3.93±0.10 ^c
D5	81.41±0.04 ^d	10.20±0.10 ^a	5.29±0.16 ^c	2.20±0.03 ^a	4.35±0.06 ^d

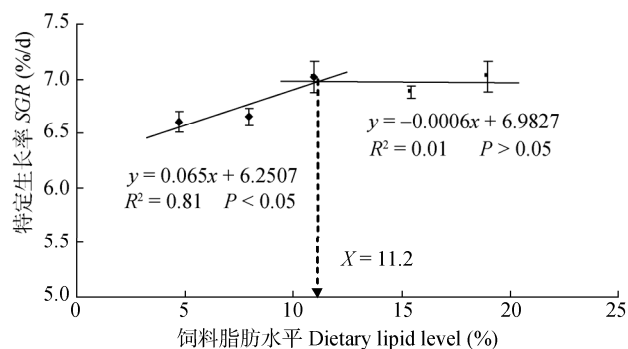


图 1 瓦氏黄颡鱼特定生长率(%/d)和饲料脂肪水平(%)的折线回归关系

Fig. 1 Broken line analysis between specific growth rate (%/d) of *Pelteobagrus vachelli* early juvenile and dietary lipid level (%)

有显著影响($P>0.05$), 各组实验鱼存活率都在 98% 以上。

2.2 体成分组成

饲料脂肪水平显著影响瓦氏黄颡鱼早期幼鱼阶段的鱼体成分(表 4)。随着饲料脂肪水平的增加,鱼体脂肪含量和能值显著增加,鱼体粗脂肪各组之间均差异显著($P<0.05$),鱼体能值除 10.9%和 15.4%脂肪水平组间差异不显著外其余各组之间均有显著差异($P<0.05$)。鱼体水分含量随饲料脂肪水平的增加显著降低($P<0.05$)。鱼体粗蛋白和灰分随着饲料脂肪水平的增加出现先升高后下降的趋势,摄食 7.9%和 10.9%脂肪水平组的实验鱼鱼体粗蛋白显著高于其他三组($P<0.05$),摄食 10.9%脂肪水平组的实验鱼鱼体灰分显著高于投喂 4.7%、18.9%脂肪水平组($P<0.05$)。

2.3 测序结果及同源性分析

PCR 反应得到的序列,经过克隆测序,获得一个长为 528 bp 的序列,序列提交到 NCBI 的 Genbank,登录号为 EU882966。同源性对比可看出所克隆 LPL 片段与斑马鱼(*Danio rerio*)LPL cDNA 全序列(NM131127)相似性最高(81%),与舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)LPL 片段(AM411614)相似性为 79%,与大西洋鲑(*Salmo Salar*)LPL 片段(EG868851)相似性为 78%,与虹鳟(*Oncorhynchus*

mykiss)*LPL*(NP001118076)相似性为 75%。此结果显示我们用于 RT-PCR 的特异引物序列正确并克隆到了需要的 *LPL* 基因。

2.4 肝脏 *LPL* mRNA 表达

饲料脂肪水平显著影响瓦氏黄颡鱼肝脏 *LPL* 基因表达(图 2)。随着饲料脂肪水平的升高, 肝脏 *LPL* mRNA 水平出现升高的趋势。18.9%脂肪水平组 *LPL* 表达显著高于其他各组($P<0.05$), 15.4%水平组显著高于前两组($P<0.05$), 4.7%到 10.9%脂肪水平组无显著差异($P<0.05$)。

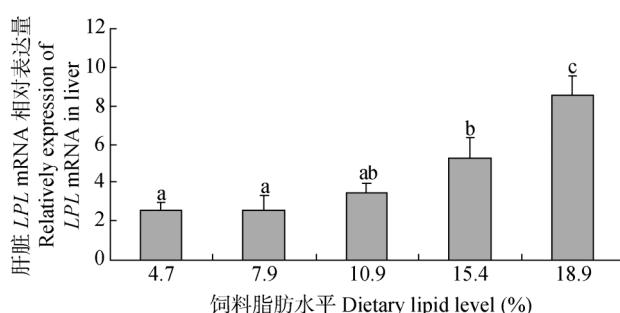


图 2 饲料脂肪水平对瓦氏黄颡鱼肝脏 *LPL* 基因表达的影响

Fig. 2 Effect of dietary lipid on *LPL* mRNA of *Pelteobagrus vachelli* early juvenile

3 讨论

3.1 生长和鱼体组成

脂肪作为必需的营养物质, 为鱼类的生长发育提供能量和必需脂肪酸, 鱼类的营养代谢中, 脂肪作为能量的利用效率最高, 很多研究表明饲料中适量添加脂肪可以减少作为能量消耗的蛋白质, 使之用于生长, 从而提高饲料蛋白质的利用效率, 促进鱼类生长^[7,15]。尤其对于处在快速生长发育时期的仔幼鱼, 脂肪是影响其存活、发育和生长的最重要的营养因素之一^[8,9]。本研究, 在一定水平内增长的饲料脂肪水平促进了瓦氏黄颡鱼早期幼鱼的生长, 摄食较高脂肪水平饲料的实验鱼特定生长率达到 7%/d 左右。袁立强等^[10]对二龄瓦氏黄颡鱼的研究表明, 当饲料脂肪水平从 4.17%升高到 9.99%时, 实验鱼的 SGR 显著升高, 摄食 9.99%、13.0%饲料脂肪水平的实验鱼特定生长率显著高于摄食 4.17%、7.0%、15.7%脂肪水平组。韩庆等^[11]对与瓦氏黄颡鱼同属且食性与摄食习性相似的黄颡鱼(*Pseudobagrus fulvidraco*)的研究表明饲料脂肪的最适含量 11.3%。这些研究与本实验结果一致。本研究中当饲料脂肪水平增加到一定水平后, 瓦氏黄颡鱼的生长不再随

脂肪含量的升高而增长, 维持在同一水平。Kim, *et al.*^[12]对初始体重 0.9 g 左右黄颡鱼的研究表明, 在 22%、32%、42%几个不同的蛋白水平下, 10%和 19%饲料脂肪水平带来的生长效果都是相同的, 与本实验研究结果一致。

饲料脂肪水平的增加通常会带来鱼体脂肪含量的增加。饲料脂肪水平和鱼体总脂肪含量的正相关关系在很多鱼类中都存在^[13,14]。瓦氏黄颡鱼鱼体脂肪含量也表现出随饲料脂肪水平的升高而显著升高的现象。高脂饲料在降低饲料蛋白, 提高生长性能的同时, 往往带来体脂沉积问题^[15]。摄食较高脂肪水平的瓦氏黄颡鱼鱼体干物质含量增加, 水分减少, 这是动物发胖时普遍的现象^[16]。瓦氏黄颡鱼鱼体蛋白含量随着饲料脂肪水平的升高而降低的现象在其他鱼类的研究中也有类似的报道^[17,18]。

3.2 肝脏 *LPL* mRNA 表达

根据 GenBank 记录, 目前已知人、豚鼠、小鼠、大鼠、猪、牛、羊、禽类和鱼类等十几个物种 *LPL* 基因 cDNA 全序列, *LPL* 在不同物种中显示出较高的同源性, 表现出进化过程中的高度保守性^[19]。鱼类中, Arnault, *et al.*^[20]报道了斑马鱼的部分 cDNA 序列, Lindberg and Olivecrona^[4]克隆得到了虹鳟 *LPL* cDNA 全长, Oku, *et al.*^[21]报道了真鲷 *LPL* cDNA 全序列, 全长为 6.3 kb, 编码 511 个氨基酸。研究表明, 与哺乳类不同的是, 鱼类成体肝脏中也存在 *LPL* 表达和活性^[4,22]。哺乳动物肝脏 *LPL* 只在胚胎期和刚出生的动物中表达, 出生后几个星期内 *LPL* mRNA 水平和 *LPL* 活性都会快速降低直到消失。本研究从瓦氏黄颡鱼幼鱼的肝脏中成功克隆得到了 *LPL* cDNA 序列, 这种鱼类肝脏 *LPL* 表达的特异性可能与肝脏为鱼类的主要贮脂器官之一有关。与哺乳类不同, 鱼类缺乏皮下脂肪层, 其主要脂肪蓄积部位是腹腔肠系膜脂肪组织、肝脏及肌肉。由于肝脏是动物脂肪酸 β -氧化代谢的重要部位, 因而它是鱼类随营养状况而改变脂肪蓄积的主要调节性贮脂器官^[23], 相对于长期的脂肪储存部位-肠系膜脂肪组织, 肝脏作为脂肪的短期储存部位, 更容易受到外界环境的影响^[24]。在某些鳉科鱼类和鲷形目鱼类, 有研究表明肝脏是主要的脂肪储存部位, 随着饲料脂肪水平的升高, 肝体指数几乎可呈线性显著增高^[25]。而有些鱼类如真鲷等, 外源脂肪在肝脏并不能自由沉积, 表明这些鱼类中存在某种机制可以调控其肝脏脂肪蓄积稳定^[26]。

LPL 是个短寿命的酶, 其活性受 LPL mRNA 水平的快速调节^[27]。而且, Lindberg, *et al.*^[4]发现虹鳟 LPL 的稳定性比人类和牛的 LPL 在 37℃ 条件下低很多, 鱼类 LPL 在转录水平的调控可能具有重要影响。目前有关饲料脂肪水平对鱼类 LPL 基因表达影响的研究还很少, 梁旭方等^[26]克隆了海水鱼真鲷 (Red sea bream, *Pagrus major*) LPL 基因序列, 并证实了真鲷 LPL 基因在肝脏存在营养诱导性表达, 饥饿、高脂食物均是其表达的诱导因子; 真鲷 LPL 基因腹腔肠系膜脂肪组织存在组成性表达, 其表达水平不受摄食状态的影响。本研究中瓦氏黄颡鱼肝脏 LPL mRNA 表达水平也表现出随饲料脂肪水平的升高而上升的趋势, 特别是摄食 15.4%、18.9% 这两组较高脂肪水平的实验鱼, LPL 基因表达水平显著升高, 表明肝脏可利用 LPL 水解未被其他组织器官利用的过量乳糜微粒和极低密度脂蛋白。鱼类肝脏具有较哺乳类更有效地脂质摄取能力, 真鲷的研究中也表明, 饲喂高脂饲料诱导产生的大量 LPL 为肝脏提供了来源于食物的游离脂肪酸, 使肝脏有可能出现营养诱导性脂肪蓄积^[26]。

综上所述, 在一定范围内(4.7%—10.9%)升高的饲料脂肪水平显著促进了瓦氏黄颡鱼早期幼鱼(21—51 日龄)的生长, 瓦氏黄颡鱼早期幼鱼最适饲料脂肪水平为 11.2%。摄食高脂饲料的瓦氏黄颡鱼鱼体脂肪含量显著上升, 过高脂肪水平的饲料诱导了实验鱼肝脏 LPL 基因表达显著升高。

参考文献:

- [1] Auwerx J, Leroy P, Schoonjans K. Lipoprotein lipase: recent contributions from molecular biology [J]. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 1992, **29**: 243—268
- [2] Zechner R. The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for energy and lipoprotein metabolism [J]. *Current Opinion Lipidology*, 1997, **8**: 77—88
- [3] Ando S, Mori. Characteristics of serum lipoprotein features associated with lipid levels of muscle and liver from five species of fish [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1993, **59**: 1565—1571
- [4] Lindberg A. & Olivecrona G. Lipoprotein lipase from rainbow trout differs in several respects from the enzyme in mammals [J]. *Gene*, 2002, **292**: 213—223
- [5] Hardy R W & Barrow F T. Diet formulation and manufacture [A]. In: Halver J E, Hardy R W (Eds.), *Fish Nutrition* (3rd edition) [C]. Academic Press, San Diego. 2002, 573—579
- [6] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, **29**: e45
- [7] Fu S J, Xie X J, Zhang W B, *et al.* The untrition of *Silurus meridionalis*: III. Protein-sparing effect of dietary lipid [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(1): 70—75 [付世建, 谢小军, 张文兵, 等. 南方鲇的营养学研究 .III. 饲料脂肪对蛋白质的节约效应. 水生生物学报, 2001, **25**(1): 70—75]
- [8] Izquierdo M S, Socorro J, Arantzamendi L, *et al.* Recent advances in lipid nutrition in fish larvae [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2000, **22**: 97—107
- [9] Sargent J, McEvoy L, Estevez A, *et al.* Lipid nutrition of marine fish during early development: Current status and future directions [J]. *Aquaculture*, 1999, **179**: 217—229
- [10] Yuan L Q, Ma X Z, Wang W, *et al.* Effects of dietary lipid levels on growth and body pigmentation of darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli* Richardson) [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, **17**(5): 577—584 [袁立强, 马旭洲, 王武, 等. 饲料脂肪水平对瓦氏黄颡鱼生长和鱼体色的影响. 上海水产大学学报, 2008, **17**(5): 577—584]
- [11] Han Q, Tian Z C, Xia W F. Optimal dietary lipid requirement of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Fisheries Science*, 2005, **24**: 8—11 [韩庆, 田宗城, 夏维福. 黄颡鱼饲料脂肪的最适含量. 水产科学, 2005, **24**: 8—11]
- [12] Kim L O & Lee S M. Effects of the dietary protein and lipid levels on growth and body composition of bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco* [J]. *Aquaculture*, 2005, **243**: 323—329
- [13] Shearer K D. Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids [J]. *Aquaculture*, 1994, **119**: 63—88
- [14] Chou B S & Shiau S Y. Optimal dietary lipid level for growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus* [J]. *Aquaculture*, 1996, **143**: 185—195
- [15] Sargent J R, Tocher D R, Bell J G. The Lipids [A]. In: Halver J E, Hardy R W (Eds.), *Fish Nutrition*(3rd edition) [C]. Academic Press, San Diego. 2002, 181—246
- [16] Maynard L A, Loosli J K, Hintz H F, *et al.* *Animal Nutrition* [M]. McGraw Hill, New York. 1979, 602
- [17] Williams C D & Robinson E H. Response of red drum to various dietary levels of menhaden oil [J]. *Aquaculture*, 1988, **70**: 107—120
- [18] Ozorio R O A, Valente L M P, Pousao-Ferreira P, *et al.* Growth performance and body composition of white seabream (*Diplodus sargus*) juveniles fed diets with different protein and lipid levels [J]. *Aquaculture Research*, 2006, **37**: 255—263
- [19] Raisonnier A, Etienne J, Arnault F, *et al.* Comparison of the cDNA and amino acid sequences of lipoprotein lipase in eight species [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 1995, **111**: 385—398
- [20] Arnault F, Etienne J, Noe L, *et al.* Human lipoprotein lipase last exon is not translated, in contrast to lower vertebrates [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1996, **43**: 109—115

- [21] Oku H, Ogata H Y & Liang X F. Organization of the lipoprotein lipase gene of red sea bream *Pagrus major* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2002, **131**: 775—785
- [22] Liang X F, Oku H & Ogata H Y. The effects of feeding condition and dietary lipid level on lipoprotein lipase gene expression in liver and visceral adipose tissue of red sea bream *Pagrus major* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, **131**: 335—342
- [23] Ando S, Mori Y. Characteristics of serum lipoprotein features associated with lipid levels of muscle and liver from five species of fish [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1993, **59**: 1565—1571
- [24] Sheridan M A. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1994, **107**: 495—508
- [25] Lie O, Lied E & Lambertsen G. Feed optimization in atlantic cod (*Gadus morhua*): Fat versus protein content in the feed [J]. *Aquaculture*, 1988, **69**: 333—341
- [26] Liang X F, Bai J J, Lao H H, *et al.* Ogata Nutritional regulation of lipoprotein lipase gene expression and visceral fat deposition in red sea bream (*Pagrus major*) [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2003, **34**(6): 625—631 [梁旭方, 白俊杰, 劳海华, 等. 真鲷脂蛋白脂肪酶基因表达与内脏脂肪蓄积营养调控定量研究. 海洋与湖沼, 2003, **34**(6): 625—631]
- [27] Vannier C, Amri E Z, Etienne J, *et al.* Maturation and secretion of lipoprotein lipase in cultured adipose cells 1. intercellular activation of the enzyme [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, **260**: 4424—4431

EFFECTS OF DIETARY LIPID LEVEL ON GROWTH AND LIPOPROTEIN LIPASE GENE EXPRESSION IN *PELTEOBAGRUS VACHELLI*

ZHENG Ke-Ke^{1,2}, ZHU Xiao-Ming¹, HAN Dong¹, YANG Yun-Xia¹, LEI Wu and XIE Shou-Qi^{1,3}

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, PR China; 2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, PR China; 3. Aquaculture Divisions, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai 200025, PR China)

Abstract: Dietary lipid plays an important role in commercial diet as a source of energy and essential fatty acids for the growth and development of fish. Darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*) is an important freshwater aquaculture species in China. Due to its high market value, the culture of this specie has increased rapidly in recent years. Lipoprotein lipase (LPL) is considered as a key enzyme in the lipid deposition and metabolism. LPL hydrolyzes triglycerides present in plasma lipoproteins and supplies free fatty acids for storage in adipose tissue, or for oxidation in other tissues. Information on *LPL* gene expression and its regulation in fish remains very scarce. The present study was conducted to investigate the effect of dietary lipid level in early juvenile of darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*) with regards to survival, growth, fish body composition and liver *LPL* gene expression. Five isonitrogenous diets containing 4.7%, 7.9%, 10.9%, 15.4% and 18.9% lipid were formulated respectively. Each diet was randomly assigned to triplicate groups of tanks, and each tank was stocked with 100 fish (21 days after hatchery, with initial average weight 71±5mg). Fish were fed to satiation three times daily for 30 days. During the experimental period, the water temperature fluctuated from 21°C to 25°C. The results showed that dietary lipid significantly affected the growth of darkbarbel catfish ($P<0.05$). Specific growth rates (SGR) of darkbarbel catfish increased with the increase of dietary lipid level from 4.7% to 10.9%, and then showed a threshold. Dietary lipid level significantly affected fish body proximate composition ($P<0.05$). Dry matter and lipid content of whole body significantly increased with increasing dietary lipid level ($P<0.05$) while protein content of whole body significantly declined with increasing dietary lipid level ($P<0.05$). Liver lipoprotein lipase (*LPL*) gene of darkbarbel catfish was cloned. The length of cloned *LPL* cDNA sequence (GenBank accession number: EU882966) was 528 bp. Homologous alignment analysis showed darkbarbel catfish *LPL* gene had 81% homology to that of zebrafish. At the end of growth trial, darkbarbel catfish liver *LPL* mRNA level was examined by real time PCR. High lipid diet drastically stimulated liver *LPL* gene expression in darkbarbel catfish. Fish fed with 15.4% and 18.9% dietary lipid had significantly higher *LPL* mRNA level in liver ($P<0.05$). Broken-line analysis based on *SGR* indicated that the optimal dietary lipid level for the early juvenile of darkbarbel catfish was 11.2%.

Key words: Dietary lipid; Lipoprotein lipase (LPL); Gene expression; *Pelteobagrus vachelli*