

doi: 10.7541/2018.108

异亮氨酸对鳊mTOR信号通路及氮代谢影响

黄康^{1,2} 梁旭方^{1,2} 何珊^{1,2} 李姣^{1,2} 汤树林^{1,2} 张真^{1,2}

(1. 华中农业大学水产学院, 华中农业大学鳊鱼研究中心, 武汉 430070; 2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 农业部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 通过脑室注射异亮氨酸, 探究短期内异亮氨酸对鳊(*Siniperca chuatsi*)雷帕霉素靶蛋白(Mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路及氮代谢影响。结果显示: 脑室注射异亮氨酸后, (1)促进鳊氨氮排泄; (2)谷氨酸脱氢酶基因(Glutamate dehydrogenase, *GDH*)、谷草转氨酶基因(Glutamic oxaloacetic transaminase, *GOT*)和腺苷酸脱氨酶基因(Adenosine monophosphate deaminase, *AMPD*)氮代谢基因相对表达量显著性上调($P < 0.05$); (3)鳊血糖含量在0.5h显著性降低($P < 0.05$); (4)激活了鳊肝脏mTOR信号通路, 促使下游分子核糖体蛋白S6磷酸化($P < 0.05$)。结果表明: 异亮氨酸能够激活鳊肝脏mTOR信号通路, 介导氨基酸代谢, 提高鳊氮代谢基因的转录水平, 促使氨氮排泄增多。

关键词: 鳊; 异亮氨酸; 氮代谢; 雷帕霉素靶蛋白

中图分类号: S965.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2018)05-0879-08

蛋白质是生命体的物质基础, 是生命活动的主要承担者, 在鱼体中, 蛋白质是鱼体的重要组成成分, 占鱼体干重的65%—75%^[1]。蛋白质作为鱼类代谢的主要能源物质之一, 在鱼体中代谢的终产物是氨氮, 其中蛋白质的代谢水平可以通过氨氮排泄间接反映^[2, 3]。因此, 在鱼体内可以通过氨氮的变化间接反映鱼体内蛋白质的转化利用情况^[4, 5]。目前对于影响鱼类氨氮排泄因子的研究主要集中在温度^[6]、摄食^[7]、饥饿^[8]、鱼体大小^[9]等方面, 而且也有通过长期饲喂添加单种氨基酸的饲料来研究氨氮排泄。此外, 在对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的研究发现, 短期内氨基酸通过激活雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路从而影响蛋白质、脂肪和糖类三大营养物质的代谢^[10, 11]。因此, 氨基酸与鱼类氨氮排泄之间的关系值得进一步的探究。

异亮氨酸(Isoleucine, Ile)又称为 α -氨基- β -甲基戊酸, 首先是Ehrlich从甜菜糖浆中分离提取出来的, 后来通过蛋白质水解得到, 由于和亮氨酸的化学组成相同而理化性质不同, 故称为异亮氨酸。异亮氨

酸是鱼类维持生命活动的必需氨基酸, 对鱼类生产性能具有一定的影响, 饲料中适宜水平的异亮氨酸可以降低饵料系数, 提高增重和蛋白沉积水平^[12–15]。异亮氨酸可作为激素、酶类等物质的合成原料, 而且在调控蛋白质代谢上发挥重要的生理功能, 是维持机体正常生长发育不可缺少的营养素。

雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是磷酸肌醇-3-激酶相关的激酶家族的一种大分子、多结构域的丝氨酸/苏氨酸激酶。首先是在芽殖酵母对真菌毒素和免疫抑制剂雷帕霉素(Rapamycin)的抗性突变中发现的^[16]。在机体细胞中, mTOR信号通路通过影响蛋白合成、脂类代谢和能量代谢等来调控细胞的生长和增殖^[17]。研究发现营养素可以激活mTOR信号通路来调控蛋白质的合成, 相关研究主要集中在氨基酸对mTOR信号通路的影响。氨基酸可以直接或者间接作用于mTOR信号通路, 从而介导蛋白质的代谢^[18, 19]。在支链氨基酸中, 亮氨酸研究较为集中, 在人、猪、鼠和鱼类等不同物种中都有报道亮氨酸对mTOR信号通路的作用最为明显, 但是异

收稿日期: 2018-01-30; **修订日期:** 2018-04-13

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-46); 国家重点基础研究(973计划)(2014CB138601); 国家自然科学基金面上项目(31772822)资助 [Supported by the China Agriculture Research System (CARS-46); the National Basic Research Program of China (2014CB138601); the National Natural Science Foundation of China (31772822)]

作者简介: 黄康(1992—), 男, 湖北孝感人; 硕士研究生; 研究方向为鱼类营养与生理。E-mail: 121809296@qq.com

通信作者: 梁旭方(1965—), 男, 博士, 教授; 研究方向为鱼类营养和摄食调控及饲料利用遗传改良。E-mail: xufang_liang@hotmail.com

亮氨酸对mTOR通路的研究相对较少^[20-23]。

鳊(*Siniperca chuatsi*)隶属于鲈形目Perciformes、鲈亚科Sinipercinae, 俗称桂花鱼、桂鱼。鳊肉丰厚坚实, 味鲜肥腴, 是我国特有的久享盛誉的名贵淡水鱼, 经济价值高^[24]。鳊从开口吃食起终身以活鱼虾为食, 是典型的肉食性凶猛鱼类^[25]。本研究以鳊为研究材料, 通过脑室注射异亮氨酸对鳊氨氮排泄、关键氮排泄基因表达及肝脏中mTOR信号通路的影响, 解析异亮氨酸对鱼类代谢的影响, 丰富肉食性鱼类的蛋白质代谢研究的基础资料, 为开发鳊人工饲料提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼和养殖条件

实验用鳊来自于湖北武汉华中农业大学鳊鱼研究中心。实验前鳊暂养于华中农业大学循环水系统7d, 每天饱食投喂饵料鱼麦鲢(*Cirrhinus mrigala*)。水温维持在(25±0.4)℃, pH 6.8—7.2, 溶氧为6.5—6.8 mg/L, 光照周期为自然光照周期。

1.2 实验设计

在正式实验前, 鳊饥饿24h, 实验用的每个圆柱形塑料桶初始水体积为100 L, 并测定初始水体环境的氨氮含量。挑选150尾体质健康, 规格整齐的鳊(20.29±0.61) g随机分成2个组, 每个组3个平行, 每个平行25尾。其中对照组注射5 μL的磷酸盐缓冲盐水(PBS), 实验组注射5 μL溶解的20 μg的异亮氨酸(Sigma, 美国), 本研究中注射异亮氨酸的剂量基于以前研究确定^[26, 27]。注射前将鳊用MS222(浓度为200 mg/L)麻醉, 然后称重。脑室注射(ICV)具体参照Pedro的方法^[28]。将微量注射器针头从鳊的额骨和顶骨的中部连接处插入, 在注射结束后, 创口处涂抹凡士林, 并将已经注射的鳊放入清水中, 待其恢复平衡和正常的游动活力后立即转移到之前准备好的实验用的圆柱形塑料桶中。在实验实施过程中, 实验组注射完毕后投喂足量的饵料鱼麦鲢(0.59±0.01) g, 分别统计注射后0.5h、4h、12h和24h各个时刻的摄食量。在实验组实验结束后, 对照组与实验组相同时刻开始注射, 注射完毕后, 以实验组各时间段饵料鱼摄食量为依据, 分别在注射后0、0.5h、4h和12h投喂与实验组相同量饵料鱼, 实验过程中发现, 对照组各缸在各个时刻均无饵料鱼剩余, 可以保证本次实验中实验组和对照组鳊摄食相同量的饵料鱼。另外, 为了排除饵料鱼对水体氨氮的影响, 准备3个圆柱形塑料桶, 初始水体积为100 L, 并测定初始水体环境的氨氮含量, 各缸分别

只投放实验中相同数量饵料鱼, 投放时间与鳊注射完毕后时间一致, 测定24h后水体氨氮浓度。

1.3 样品收集

在注射后0、0.5h、4h、12h和24h各时间点每缸取水样检测氨氮浓度, 每缸随机取5尾鳊进行麻醉, 待麻醉后, 分别尾静脉取血测定血液血糖含量, 并取鳊肝脏组织用于检测蛋白表达和基因表达分析、肌肉组织用于检测基因表达, 样品采集完后立即液氮速冻并保存于-80℃超低温冰箱。

1.4 氨氮含量和血糖含量测定

氨氮含量的检测采用纳氏试剂比色法, 在多功能酶标仪(BioTek)上测定, 血糖含量用血糖仪(Accu-Chek Performa, Roche)测量。

1.5 基因表达分析

荧光定量引物设计 用Premier 5.0 软件设计荧光定量引物并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 其中谷氨酸脱氢酶基因(Glutamate dehydrogenase, *GDH*)、腺苷酸脱氢酶基因(Adenosine monophosphate deaminase, *AMPD*)、谷草转氨酶基因(Glutamic oxaloacetic transaminase, *GOT*)及内参基因(ribosomal protein L13a, *RPL13A*)的引物序列见表1。

RNA提取 提取注射后0、0.5h、4h、12h和24h时间点肌肉和肝脏RNA, 提取方法主要参照RNAiso Plus(TaKaRa, 日本)说明书操作, 提取出来的总的RNA用多功能酶标仪(BioTek)测定其浓度, 并根据OD₂₆₀/OD₂₈₀比值在1.7—2.1值判断RNA的质量。

RT-qPCR 根据测得的RNA浓度计算所需总RNA量, 用PrimeScript^{RT} reagent Kit (Takara, 日本)试剂盒进行反转录, 合成cDNA第一链。然后用AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix(诺唯赞, 南京)试剂进行Real Time PCR扩增反应, 其中反应体系为: 10 μL AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix、1 μL cDNA、0.4 μL Forward Primer (10 mmol/

表1 荧光定量PCR所用引物序列

Tab. 1 Primers used for real-time polymerase chain reaction (Real-Time PCR)

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'—3')
<i>AMPD</i>	CATTTTCCTTCCCGTGTT
	TCTGTCTGCGGAGTTGGT
<i>GDH</i>	GACGACGACCCCAACTTCT
	GACCCGCTTCTCTTCTGC
<i>GOT</i>	GGCTTTGCGAGTGGAGATA
	GTGGGTTGGAGTAAATGGG
<i>RPL13A</i>	TATCCCCCACCCTATGACA
	ACGCCCAAGGAGAGCGAACT

L)、0.4 μL Reverse Primer (10 mmol/L)、8.2 μL ddH₂O。反应液的配制在冰上进行, 反应程序为: 95℃, 30s; 95℃, 5s; 40×cycles; 58℃, 30s; 溶解曲线: 65—95℃, 每上升0.5℃ 停留 5s。

1.6 Western - Blot

称取适量肝脏样品, 冰上匀浆, 使用Ripa裂解液提取肝脏组织蛋白, 提取后的蛋白用BCA试剂盒测定蛋白浓度。使用Ripa裂解液稀释所得蛋白, 并加入5×蛋白上样缓冲液, 煮沸、离心。配置聚丙烯酰胺凝胶(浓缩胶10%), 浓缩胶中以80 V电压电泳, 分离胶中以200 V电压电泳。以200 mA恒流电转2h, 电转装置放于冰水中进行转膜。转膜结束后用5%脱脂奶粉TBST溶液中封闭, 洗膜。一抗: β -actin为1:15000, P-S6为1:4000, 4℃共孵育过夜; 二抗: 羊抗兔为1:4000, 室温孵育1h, 洗膜。用双色红外激光成像系统(Odyssey Clx, 美国)成像, 成像完毕后得到相应的条带, 用ImageJ软件对条带进行灰度值分析。

1.7 数据分析

实验数据用平均值±标准误的形式表示, 用SPSS 19.0软件进行数据的统计分析, 2个样本之间的比较使用独立样本 t 检验, 多个样本之间的比较使用单因素方差分析(ANOVA)。若 $P<0.05$, 则具有显著差异。基因表达水平以鳊RPL13A为内参基因, 应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式确定基因的相对表达量^[29]。

2 结果

2.1 脑室注射异亮氨酸对鳊氨氮排泄的影响

在实验过程中, 鳊脑室注射异亮氨酸后水体氨氮的变化如图1所示。水体氨氮的含量在24h内随着时间推移逐渐升高, 在注射后0.5h、4h、12h和24h这4个时刻, 脑室注射异亮氨酸组水体的氨氮浓度显著性高于对照组($P<0.05$)。另外, 在实验水体中, 麦鲮对水体氨氮浓度的影响如图2所示。结果表明, 饵料鱼麦鲮24h内氨氮排泄对水体氨氮浓度没有显著性差异($P>0.05$)。

2.2 脑室注射异亮氨酸对鳊mTOR信号通路的影响

在脑室注射异亮氨酸后, 鳊肝脏中mTOR信号通路的下游分子核糖体S6蛋白磷酸化(P-S6)水平的影响如图3所示。在注射12h和24h后, 注射异亮氨酸组与对照组相比, 肝脏P-S6磷酸化水平显著性升高($P<0.05$)。

2.3 脑室注射异亮氨酸对AMPD、GDH、GOT基因表达的影响

鳊脑室注射异亮氨酸后24h内的变化如图4所

示。在注射0.5h、4h、12h和24h后, 注射异亮氨酸组肌肉中AMPD基因相对表达量显著性高于对照组($P<0.05$)。在注射异亮氨酸后, 肝脏中GDH基因相对表达量在注射4h和12h后显著性高于对照组($P<0.05$), 并且在注射4h后, 相对表达显著性升高, 随后下降, 相反的是, 对照组肝脏中GDH基因相对表达量在注射24h后开始显著性升高($P<0.05$)。另外, 在注射异亮氨酸后, 肝脏中GOT基因相对表达量在0.5h、4h和12h后显著性高于对照组($P<0.05$)。

2.4 脑室注射异亮氨酸对鳊血糖的影响

鳊脑室注射异亮氨酸对鳊血糖的变化如图5所示。在注射0.5h后, 注射异亮氨酸后血糖含量显著性高于对照组($P<0.05$), 但是在注射4h后, 血糖含量显著性低于对照组($P<0.05$)。

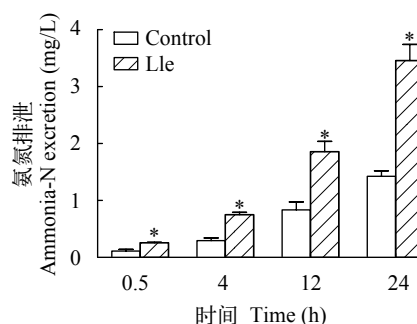


图1 脑室注射异亮氨酸对鳊氨氮排泄的影响

Fig. 1 Effect of ICV injection of isoleucine on ammonia-N excretion of Chinese perch

值用平均数±标准误($n=6$)来表示, 标有星号(*)表示注射异亮氨酸组与注射磷酸盐缓冲盐水的对照组相比有显著性差异($P<0.05$); 下同

Data are presented by mean±standard error of mean (SEM) ($n=6$). Significant level is marked with an asterisk ($P<0.05$), compared with the values obtained from phosphate buffered saline (PBS) injection into the muscle tissues of Chinese perch; the same applies below

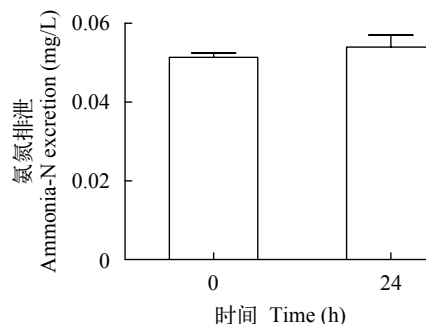


图2 麦鲮氨氮排泄对水体氨氮浓度的影响

Fig. 2 Effect of *Cirrhinus mrigala* on ammonia-N excretion on water ($n=3$)

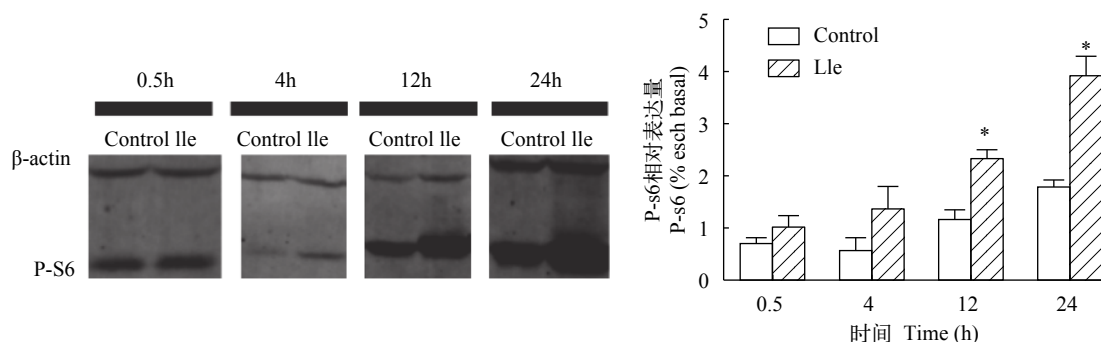


图3 脑室注射异亮氨酸对鳊肝脏P-S6蛋白表达分析

Fig. 3 The expression of liver ribosomal protein S6 of Chinese perch after ICV injection of isoleucine

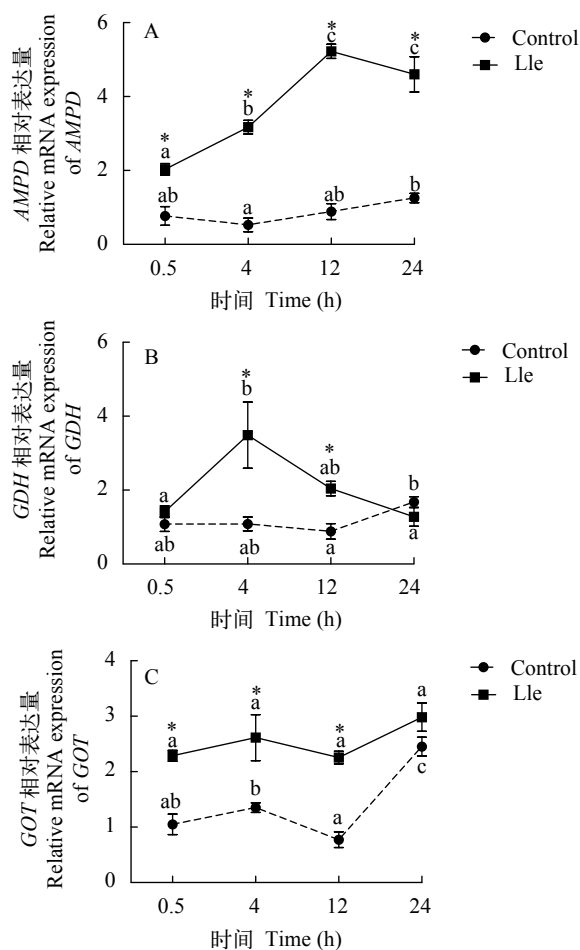


图4 脑室注射异亮氨酸对鳊AMPD、GDH和GOT基因表达的影响

Fig. 4 The expression levels of AMPD, GDH and GOT of Chinese perch after ICV injection of isoleucine

不同字母表示注射磷酸盐缓冲液组和异亮氨酸组各组之间分别各个时刻有显著性差异($P < 0.05$)

Significant level is marked with different letters ($P < 0.05$), compared with the values obtained from injections of isoleucine and PBS into the muscle tissues of Chinese perch, respectively

3 讨论

鱼体内蛋白质代谢后产生最终的代谢废物氨

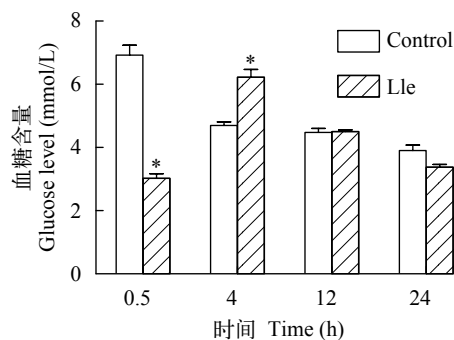


图5 脑室注射异亮氨酸对鳊血糖的影响

Fig. 5 Effect of ICV injection of isoleucine on glucose level of Chinese perch

氮, 主要通过鳃和尿液排出, 占淡水硬骨鱼类排泄总量的80%—90%^[30]。白小丽^[31]从温度和摄食方面解析了鳊和草鱼氨氮排泄与蛋白质代谢之间的关系, 发现氨氮排泄随着蛋白质分解增加而增加。因此, 对鱼类氨氮排泄的研究可以更进一步理解鱼类蛋白质代谢的调节机制。在实验过程中通过检测发现饵料鱼麦鲢在24h内氨氮的排泄对水体氨氮浓度变化几乎没有影响(图2), 因此, 饵料鱼排泄的氨氮对水体氨氮没有影响。在本实验中, 水体氨氮的浓度可以在一定程度上反映鳊氨氮的排泄量。脑室注射异亮氨酸, 在24h内鳊氨氮排泄量显著性提高, 研究证明在鱼体中氨氮的排泄变化可以间接反映出氨基酸代谢变化^[2, 3], 因此, 异亮氨酸能够促进鳊氨氮排泄。该结果和涂永峰在鲫鱼的研究一致, 其结果表明异亮氨酸主要是通过影响鱼体蛋白质分解与合成的代谢水平从而促进鲫鱼氨氮的排泄^[32]。

已有研究表明生物体内基因转录、蛋白质翻译和核糖体合成等生物过程都与mTOR信号通路密切相关^[33]。在机体细胞中, mTOR信号通路能够响应细胞外营养素、生长因子等信号, 调节细胞的合成代谢和分解代谢^[34]。大多数研究证明氨基酸

作为重要的信号,能够激活mTOR信号通路,从而介导相应的生命活动^[18,19]。在本研究中,在注射异亮氨酸12h和24h后,鳃肝脏mTOR信号通路下游P-S6表达水平显著性升高,表明异亮氨酸激活了鳃肝脏mTOR信号通路,该结果与先前研究一致,异亮氨酸能够激活mTOR信号通路^[35,36]。mTOR信号通路下游分子通过调控机体中蛋白合成、脂类代谢和能量代谢的蛋白的合成来调节相应的生命活动。因此,异亮氨酸激活鳃肝脏mTOR信号通路,促使其下游核糖体蛋白S6磷酸化,调控机体相应的蛋白的合成,从而影响了氨基酸代谢。

肝脏是鱼体代谢活动的主要器官,在氨基酸代谢过程中发挥重要作用。谷氨酸脱氢酶(GDH)主要存在于肝脏中,是氨基酸分解代谢关键酶,在氨基酸分解代谢以及维持体内氨氮水平方面起着关键作用^[37]。在哺乳动物和硬骨鱼类的肌肉中,AMPD活性较高,主要参与调控嘌呤核苷酸循环和能量代谢^[38,39]。天冬氨酸转氨酶(GOT)是碳水化合物和蛋白质代谢的纽带^[40],参与联合脱氨作用产生氨^[41]。机体内氨基酸代谢过程中的转氨基和脱氨基作用起到主要作用的是谷氨酸脱氢酶和腺苷酸脱氨酶,另外辅助转氨基的主要关键酶有天冬氨酸转氨酶。在脑室注射异亮氨酸0.5h后,GOT和AMPD基因的相对表达量较对照组显著性升高,而GDH基因变化不大,表明肌肉中AMPD基因调控了嘌呤核苷酸循环^[41],氧化分解生氨活跃,另外,GOT基因调控了谷氨酸与草酰乙酸反应生成天冬氨酸,天冬氨酸参与联合脱氨基作用产生氨^[41],因此,两者共同作用促进机体氨氮生成。在注射异亮氨酸4h和12h后,GDH、GOT和AMPD基因相对表达量显著性高于对照组,三者共同促进氨基酸代谢,从而促进机体产生氨。此外,在注射异亮氨酸24h后,肌肉中AMPD基因相对表达量显著性高于对照组,而肝脏中GDH和GOT基因相对表达量较对照组没有显著性变化,表明肌肉中嘌呤核苷酸循环,氧化分解仍然活跃,促进肌肉产生氨。通过注射异亮氨酸后比较鳃肝脏中GDH和GOT基因相对表达量随时间变化发现,GOT基因相对表达量随时间变化无明显差异,而GDH基因相对表达量在4h显著性升高,随后开始下降,在24h降到最低,相反的是对照组GDH基因相对表达量在24h显著性升高。因此,肝脏中氨基酸分解代谢活动随时间变缓,是由于在异亮氨酸的作用下,mTOR信号通路激活,促使下游信号通路分子核糖体S6蛋白磷酸化,蛋白合成增加,影响到肝脏中氨基酸代谢,氨基酸分解代谢减弱。先前

类似研究发现,支链氨基酸可以调节机体各种功能,很容易穿过血脑屏障,在能量代谢和氮代谢中起到很重要的作用^[42,43]。异亮氨酸作为支链氨基酸,在大鼠的研究发现,异亮氨酸可以调节GDH从而影响代谢活动^[44]。在细胞上的研究也发现,氨基酸作为信号,促使mTOR信号通路下游信号分子磷酸化,进而通过氧化脱羧和激活GDH活性调节线粒体代谢,从而精准的调控细胞生命活动^[45,46]。氨基酸不仅是细胞信号分子,而且是基因表达和蛋白磷酸化级联反应的调节因子^[47],可通过mTOR信号通路调节其下游分子的磷酸化,进而从翻译水平调节基因表达^[48]。在本实验中,异亮氨酸作为信号分子,促使肝脏mTOR信号通路下游核糖体蛋白S6磷酸化,调节了鳃氮排泄基因的表达,从而影响了鳃氨氮排泄。

近年来研究发现,氨基酸参与血糖的代谢调控,通过检测血液葡萄糖含量发现,在脑室注射异亮氨酸后,鳃血糖含量在0.5h显著性降低,表明异亮氨酸有降低血糖含量作用。在对小鼠进行研究发现,小鼠口服异亮氨酸,在0.5h和1h后,血糖含量显著性降低,异亮氨酸主要是通过刺激肌糖原的合成和促进机体对葡萄糖的氧化,从而降低血糖的水平^[49],并且这种作用机制主要是通过位于mTOR上游的PI3K(磷脂酰肌醇-3-激酶)信号传导通路介导完成的^[50]。相关研究发现,激素和生长因子可活化PI3K(磷脂酰肌醇3激酶),通过相应的调节机制,从而促使mTOR通路相关蛋白磷酸化^[51]。此外,在注射异亮氨酸4h后,鳃血糖含量开始升高并且显著性高于对照组,可能异亮氨酸降低血糖作用具有时效性,在短期内异亮氨酸有降低血糖的作用。随着时间推移,机体其他代谢作用加强从而血糖含量升高,具体作用途径有待进一步探究。

综上所述,在本研究中,脑室注射异亮氨酸后,激活鳃肝脏mTOR信号通路,介导氨基酸代谢,氮排泄基因转录水平升高,鳃肝脏和肌肉中代谢活跃,促使鳃氨氮排泄。此外,异亮氨酸能够短时间内降低血糖,可能与PI3K(磷脂酰肌醇-3-激酶)信号传导通路相关,异亮氨酸在mTOR信号传导通路与PI3K信号传导通路之间的联系仍需进一步的研究。

参考文献:

- [1] KIM K I. Re-evaluation of protein and amino acid requirements of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 1997, 151(1-4): 3—7
- [2] Chakraborty S, Chakraborty S. Effect of dietary protein level on excretion of ammonia in Indian major carp,

- Labeo rohita*, fingerlings [J]. *Aquaculture Nutrition*, 1998, **4**(1): 47—52
- [3] Secor S M, Faulkner A C. Effects of meal size, meal type, body temperature, and body size on the specific dynamic action of the marine toad, *Bufo marinus* [J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2002, **75**(6): 557—571
- [4] Jobling M. Some effects of temperature, feeding and body weight on nitrogenous excretion in young plaice *Pleuronectes platessa* L [J]. *Journal of Fish Biology*, 1981, **18**(1): 87—96
- [5] Wang T, Busk M, Overgaard J. The respiratory consequences of feeding in amphibians and reptiles [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2001, **128**(3): 533—547
- [6] Cui Y, Wootton R. Bioenergetics of growth of a cyprinid, *Phoxinus phoxinus*: the effect of ration, temperature and body size on food consumption, faecal production and nitrogenous excretion [J]. *Journal of Fish Biology*, 1988, **33**(3): 431—443
- [7] Paulson L J. Models of ammonia excretion for brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1980, **37**(9): 1421—1425
- [8] Lauff R F, Wood C M. Respiratory gas exchange, nitrogenous waste excretion, and fuel usage during starvation in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 1996, **165**(7): 542—551
- [9] Carter C G, Houlihan D F, Owen S F. Protein synthesis, nitrogen excretion and long-term growth of juvenile *Pleuronectes flesus* [J]. *Journal of Fish Biology*, 1998, **53**(2): 272—284
- [10] Trevino J G, George S A, Hughes S J, *et al.* An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *American Journal of Physiology*, 2008, **295**(2): 329—335
- [11] Lansard M, Panserat S, Plagnes-Juan E, *et al.* Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR [J]. *Amino Acids*, 2010, **39**(3): 801—810
- [12] Santiago C B, Lovell R T. Amino acid requirements for growth of Nile tilapia [J]. *The Journal of Nutrition*, 1988, **118**(12): 1540—1546
- [13] Zhao J, Liu Y, Jiang J, *et al.* Effects of dietary isoleucine on growth, the digestion and absorption capacity and gene expression in hepatopancreas and intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) [J]. *Aquaculture*, 2012, **368**: 117—128
- [14] Rodehutscord M, Becker A, Pack M, *et al.* Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to supplements of individual essential amino acids in a semipurified diet, including an estimate of the maintenance requirement for essential amino acids [J]. *The Journal of Nutrition*, 1997, **127**(6): 1166—1175
- [15] Shang X D, Luo L, Wen H, *et al.* Study on isoleucine requirement for juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, **33**(5): 813—822 [尚晓迪, 罗莉, 文华, 等. 草鱼幼鱼对异亮氨酸的需要量. 水产学报, 2009, **33**(5): 813—822]
- [16] Heitman J, Movva N R, Hall M N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast [J]. *Science*, 1991, **253**(5022): 905—909
- [17] Avruch J, Hara K, Lin Y, *et al.* Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase [J]. *Oncogene*, 2006, **25**(48): 6361—6372
- [18] Kim E. Mechanisms of amino acid sensing in mTOR signaling pathway [J]. *Nutrition Research and Practice*, 2009, **3**(1): 64—71
- [19] Moshel Y, Rhoads R E, Barash I. Role of amino acids in translational mechanisms governing milk protein synthesis in murine and ruminant mammary epithelial cells [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2006, **98**(3): 685—700
- [20] Fulks R M, Li J B, Goldberg A L. Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1975, **250**(1): 290—298
- [21] Moon H Y, Gatlin D M. Total sulfur amino acid requirement of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus* [J]. *Aquaculture*, 1991, **95**(1-2): 97—106
- [22] Ahmed I, Khan M A. Dietary branched-chain amino acid valine, isoleucine and leucine requirements of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) [J]. *British Journal of Nutrition*, 2006, **96**(3): 450—460
- [23] Khan M A, Abidi S F. Dietary isoleucine requirement of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2007, **13**(6): 424—430
- [24] Liang X F. Study on mandarin fish and its culture home and abroad [J]. *Fisheries science & Technology Information*, 1996, (1): 13—17 [梁旭方. 国内外鳊类研究及养殖概况. 水产科技情报, 1996, (1): 13—17]
- [25] Chiang I K. On the biology of mandarin fish, *Siniperca chuatsi* of Liang-Tze Lake [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1959, (3): 375—385 [蒋一珪. 梁子湖鳊鱼的生物学. 水生生物学集刊, 1959, (3): 375—385]
- [26] Izumi T, Kawamura K H, Bungo T. Central administration of leucine, but not isoleucine and valine, stimulates feeding behavior in neonatal chicks [J]. *Neuroscience Lett*

- ters, 2004, **354**(2): 166—168
- [27] Sánchez M S, Barontini M, Armando I, *et al.* Correlation of increased grooming behavior and motor activity with alterations in nigrostriatal and mesolimbic catecholamines after α -Melanotropin and neuropeptide glutamine-isoleucine injection in the rat ventral tegmental area [J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2001, **21**(5): 523—533
- [28] De Pedro N, Pinillos M L, Valenciano A I, *et al.* Inhibitory effect of serotonin on feeding behavior in goldfish: involvement of CRF [J]. *Peptides*, 1998, **19**(3): 505—511
- [29] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402—408
- [30] Eggers D M. Some recent methods for estimating food-consumption by fish-reply [J]. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1979, **36**(8): 1018—1019
- [31] Bai X L. The Studies on ammonia excretions by grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) and the effect of probiotics on the water quality of mandarin fish pond [D]. Thesis for Master of Science. Huazhong Agricultural University, Wuhan. 2013 [白小丽. 草鱼、鳊鱼氨氮排泄研究及微生态制剂对鳊鱼养殖池塘的影响. 硕士学位论文, 华中农业大学, 武汉. 2013]
- [32] Tu Y F. Study on the effect of Ile on the growth and the rule of amino acid transport in *Carassius auratus* [D]. Thesis for Master of Science. Southwest University, Chongqing. 2004 [涂永峰. Ile对鲫鱼生长的影响和鲫鱼氨基酸转运规律的研究. 硕士学位论文, 西南农业大学, 重庆. 2004]
- [33] Polak P, Hall M N. mTOR and the control of whole body metabolism [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2009, **21**(2): 209—218
- [34] Wullschleger S, Loewith R, Hall M N. TOR signaling in growth and metabolism [J]. *Cell*, 2006, **124**(3): 471—484
- [35] Apelo S A, Singer L M, Lin X Y, *et al.* Isoleucine, leucine, methionine, and threonine effects on mammalian target of rapamycin signaling in mammary tissue [J]. *Journal of Dairy Science*, 2014, **97**(2): 1047—1056
- [36] Appuhamy J R N, Knoebel N A, Nayananjali W D, *et al.* Isoleucine and leucine independently regulate mTOR signaling and protein synthesis in MAC-T cells and bovine mammary tissue slices [J]. *The Journal of Nutrition*, 2012, **142**(3): 484—491
- [37] Willett C S, Burton R S. Characterization of the glutamate dehydrogenase gene and its regulation in a euryhaline copepod [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, **135**(4): 639—646
- [38] Kaletha K, Thebault M, Raffin J P. Comparative studies on heart and skeletal muscle AMP-deaminase from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1991, **99**(4): 751—754
- [39] Morisaki T, Sabina R L, Holmes E W. Adenylate deaminase. A multigene family in humans and rats [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, **265**(20): 11482—11486
- [40] Ramaswamy M, Thangavel P, Selvam N P. Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) enzyme activities in different tissues of *Sarotherodon mossambicus* (Peters) exposed to a carbamate pesticide, carbaryl [J]. *Pesticide Science*, 1999, **55**(12): 1217—1221
- [41] Wang J Y, Zhu S G, Xu C F. Biological Chemistry [M]. Beijing: Higher Education Press. 2002, 303—314 [王镜岩, 朱胜庚, 徐长法. 生物化学: 第3版. 北京: 高等教育出版社. 2002, 303—314]
- [42] Oldendorf W H. Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection [J]. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 1971, **221**(6): 1629—1639
- [43] Smith Q R, Momma S, Aoyagi M, *et al.* Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier [J]. *Journal of Neurochemistry*, 1987, **49**(5): 1651—1658
- [44] Zhou X. Glutamine metabolism and function in skeletal muscle [D]. University of British Columbia, Canada. 1961
- [45] Sener A, Malaisse W J. L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase [J]. *Nature*, 1980, **288**(5787): 187
- [46] Xu G, Kwon G, Cruz W S, *et al.* Metabolic regulation by leucine of translation initiation through the mTOR-signaling pathway by pancreatic β -cells [J]. *Diabetes*, 2001, **50**(2): 353—360
- [47] Wu G Y. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition [J]. *Amino Acids*, 2009, **37**(1): 1—17
- [48] Peng T, Golub T R, Sabatini D M. The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, **22**(15): 5575—5584
- [49] Doi M, Yamaoka I, Nakayama M, *et al.* Hypoglycemic effect of isoleucine involves increased muscle glucose uptake and whole-body glucose oxidation and decreased hepatic gluconeogenesis [J]. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 2007, **292**(6): E1683—E1693
- [50] Doi M, Yamaoka I, Fukunaga T, *et al.* Isoleucine, a potent plasma glucose-lowering amino acid, stimulates glu-

cose uptake in C₂C₁₂ myotubes [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, **312**(4): 1111—1117

[51] De Virgilio C, Loewith R. The TOR signalling network from yeast to man [J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2006, **38**(9): 1476—1481

EFFECT OF ISOLEUCINE ON mTOR SIGNALING PATHWAY AND NITROGEN METABOLISM OF CHINESE PERCH (*SINIPERCA CHUATSI*)

HUANG Kang^{1,2}, LIANG Xu-Fang^{1,2}, HE Shan^{1,2}, LI Jiao^{1,2}, TANG Shu-Lin^{1,2} and ZHANG Zhen^{1,2}

(1. Chinese Perch Research Center, College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China)

Abstract: In the present study, the effects of isoleucine on the mammalian target of rapamycin signaling (mTOR) pathway and nitrogen metabolism were investigated through Intraventricular (ICV) administration in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*). In one hand, the ammonia excretion significantly increased, and mRNA levels of nitrogen metabolism genes involving glutamate dehydrogenase (GDH), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), and adenosine monophosphate deaminase (AMPD) remarkably increased after ICV injection of isoleucine as well ($P < 0.05$). On the other hand, the results showed that blood glucose levels markedly decreased at 0.5h post-injection. The expression of liver ribosomal protein S6 was also notably enhanced, demonstrating that mTOR signaling pathway was activated. The results also indicated that isoleucine could activate the mTOR signaling pathway, mediate amino acid metabolism, and enhance ammonia-N excretion via nitrogen metabolism genes in Chinese perch.

Key words: *Siniperca chuatsi*; Isoleucine; Nitrogen metabolism; mTOR