

枯草芽孢杆菌对草鱼肝脏脂质代谢的调节作用

罗燕儿 赵慧 郭道远 王欢 陈孝煊 吴志新

EFFECTS OF *BACILLUS SUBTILIS* ON THE HEPATIC LIPID METABOLISM OF *CTENOPHARYNGODON IDELLUS*

LUO Yan-Er, ZHAO Hui, GUO Dao-Yuan, WANG Huan, CHEN Xiao-Xuan, WU Zhi-Xin

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2020.059>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

草鱼树突状细胞的分离鉴定及益生芽孢杆菌对其免疫功能的影响

IDENTIFICATION OF GRASS CARP DENDRITIC CELLS (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS*) AND REGULATORY EFFECTS OF *BACILLUS SUBTILIS* ON THE IMMUNE FUNCTIONS

水生生物学报. 2020, 44(2): 245–251 <https://doi.org/10.7541/2020.029>

益生芽孢杆菌对草鱼肠黏膜结构的保护作用

THE PROTECTIVE EFFECT OF PROBIOTIC *BACILLUS* ON THE INTESTINAL MUCOSAL STRUCTURE OF *CTENOPHARYNGODON IDELLUS*

水生生物学报. 2017, 41(4): 774–780 <https://doi.org/10.7541/2017.96>

日本沼虾肌抑素前体肽在枯草芽孢杆菌的表达及其对生长效果的影响

THE EXPRESSION OF MYOSTATIN PROPETIDE IN *BACILLUS SUBTILIS* AND ITS EFFECT ON THE GROWTH OF *MACROBRACHIUM NIPPONENSE*

水生生物学报. 2020, 44(1): 44–49 <https://doi.org/10.7541/2020.006>

不同脂肪源对细鳞鲑生长、脂质代谢及抗氧化性能的影响

EFFECTS OF DIFFERENT LIPID SOURCES ON THE GROWTH, LIPID METABOLISM AND ANTIOXIDANT ABILITY OF *BRACHYMYSTAX LENOK*

水生生物学报. 2018, 42(3): 533–541 <https://doi.org/10.7541/2018.067>

共轭亚油酸对草鱼肝脏和肌肉组织的细胞学形态、抗氧化能力以及脂肪代谢相关基因表达的影响

EFFECTS OF DIETARY CLA ON CYTOLOGICAL MORPHOLOGY, ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES, AND GENE EXPRESSIONS OF LIPID METABOLISM IN THE LIVER AND MUSCLE OF GRASS CARP

水生生物学报. 2019, 43(4): 708–722 <https://doi.org/10.7541/2019.084>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2020.059

枯草芽孢杆菌对草鱼肝脏脂质代谢的调节作用

罗燕儿^{1,2} 赵慧^{1,3} 郭道远^{2,3} 王欢^{1,4} 陈孝煊^{3,4} 吴志新^{1,4}

(1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 湖北省水生动物病害防控工程技术研究中心, 武汉 430070; 3. 华中农业大学池塘健康养殖湖北省工程实验室, 武汉 430070; 4. 华中农业大学水产养殖国家级实验教学示范中心, 武汉 430070)

摘要: 为研究益生枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)肝脏脂质代谢及抗氧化功能的影响, 实验设置对照组(Con组)、*Aeromonas hydrophila*组(Ah组)、*Aeromonas hydrophila*+*Bacillus subtilis*组(Ah+Bs组)、*Bacillus subtilis*+*Aeromonas hydrophila*组(Bs+Ah组), 三个实验组均腹腔注射 1×10^5 CFU/fish嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*), 枯草芽孢杆菌饲料含菌量为 1×10^7 CFU/g, 实验周期为56d, 并于第28和第56天取样。结果表明, 与Ah组相比, 投喂枯草芽孢杆菌饲料后, (1)体增重率、特定生长率显著增加($P < 0.05$); (2) 28d时肝脏油红O染色脂滴面积及脂肪含量显著下降($P < 0.05$); (3)调节血脂代谢及缓解肝脏损伤: 血清胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇含量升高, 谷草转氨酶和谷丙转氨酶活性显著降低($P < 0.05$); (4)调节脂质代谢: 28d时乙酰辅酶A羧化酶的表达水平下调, 脂蛋白脂酶及脂肪甘油三酯脂肪酶的表达水平上调; (5)增强肝脏抗氧化能力、减少脂质过氧化物的发生: 肝脏超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽、总抗氧化能力提高; 丙二醛及过氧化氢含量降低。综上, 在饲料中添加益生枯草芽孢杆菌可以增强草鱼的抗氧化能力, 缓解机体因嗜水气单胞菌感染造成的肝脏损伤, 调节肝脏脂质代谢功能, 减少脂质在肝脏中的积累, 并促进草鱼的生长。

关键词: 草鱼; 嗜水气单胞菌; 枯草芽孢杆菌; 脂质代谢; 抗氧化功能

中图分类号: S965.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2020)03-0485-09

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国重要的淡水养殖鱼类之一^[1,2], 随着集约化养殖的发展, 脂肪肝在养殖草鱼中发病率不断上升, 已成为水产养殖业关注的严重问题^[3]。“二次打击”学说在脂肪肝病的发病机制中受到认可并得到深入研究, 学说表明氧化应激在脂肪肝发生发展进程中起重要作用^[4]。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)广泛存在于养殖水体中, 是淡水鱼类养殖过程中的主要致病菌。本实验室研究表明, 感染嗜水气单胞菌可降低草鱼抗氧化能力, 诱发肝脏脂质过氧化^[5]和肝脏脂质沉积^[6]。研究表明, 益生菌可显著减轻哺乳动物肝脏脂肪肝等症状, 改善肝功能^[7,8]。益生枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)广泛应用于水产养殖, 可调节水质^[9]、增强水产动物的免疫力和抗氧化能力^[5,10]、调节肠道菌群及增强消化酶活性^[11,12]等,

但对其在鱼类肝脏脂质代谢方面研究甚少。

因此, 本研究分别在感染嗜水气单胞菌前后投喂含益生枯草芽孢杆菌的饲料, 探究枯草芽孢杆菌对肝脏脂质代谢的作用及可能机制, 为益生菌在草鱼“保肝护肝”方面的作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

实验用嗜水气单胞菌Ah1菌株分离自细菌败血症银鲫; 枯草芽孢杆菌Ch9菌株分离自草鱼肠道。以上菌株均有由华中农业大学水产学院水产动物医学实验室提供和保存。

1.2 实验饲料

本实验两种饲料配方及营养成分实测值见表1, 饲料原料购自湖北海大饲料有限公司。饲料原料

收稿日期: 2019-04-18; 修订日期: 2019-11-23

基金项目: 国家自然科学基金(31472310); 湖北省技术创新专项(2018ABA103); 企业基金资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31472310); the Technical Innovation Project of Hubei Province (2018ABA103); Enterprise Fund]

作者简介: 罗燕儿(1993—), 女, 硕士研究生; 主要研究方向为鱼类病害防控。E-mail: luoyaner216@163.com

通信作者: 吴志新(1962—), 女, 教授; 主要从事鱼类病理与免疫。E-mail: wuzhixin@mail.hzau.edu.cn

表 1 实验饲料配方及基本成分

Tab. 1 Compositions of experimental diets

原料Ingredient	含量Content (g/kg)	营养成分 Composition	含量Content (% DM)
鱼粉Fish meal	80	基础饲料Basal diet	
豆粕Soybean meal	240	粗蛋白Crude protein	29.83
菜粕Rapeseed meal	340	粗脂肪Crude lipid	4.39
小麦粉Wheat Flour	250	水分Moisture	10.16
豆油Soybean oil	6	灰分Ash	8.32
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	20		
维生素预混料 ¹ Vitamin premix ¹	1	枯草芽孢杆菌 饲料 <i>B. subtilis</i> diet	
矿物质预混料 ² Mineral premix ²	3	粗蛋白Crude protein	29.74
氯化钠NaCl	2	粗脂肪Crude lipid	4.37
氯化胆碱 Choline chloride	2	水分Moisture	10.13
纤维素 Cellulose	56	灰分Ash	8.39
总量Total	1000		

注: ¹ 维生素预混料(mg/kg): 维生素A, 6500 IU; 维生素D₃, 4500 IU; 维生素C, 120 mg; 维生素E, 25 mg; 维生素K₃, 5 mg; 维生素B₁, 12.5 mg; 维生素B₂, 12.5 mg; 维生素B₆, 15.0 mg; 维生素B₁₂, 0.025 mg; 烟酰胺, 50 mg; 泛酸, 40 mg; 肌醇, 75 mg; 叶酸, 2.5 mg; 生物素, 0.08 mg; ² 矿物质预混料(mg/kg): 氯化钠, 1.0; 硫酸镁, 15.0; 磷酸二氢钠, 25.0; 六水合氯化铝, 0.06; 磷酸二氢钾, 32.0; 磷酸二氢钙, 20.0; 柠檬酸铁, 2.5; 乳酸钙, 3.5; 七水硫酸锌, 0.353; 四水硫酸锰, 0.162; 五水硫酸铜, 0.031; 六水合氯化钴, 0.001; 碘酸钾, 0.003; 纤维素, 0.39

Note: ¹ Vitamin premix (mg/kg): vit. A 6500 IU, vit. D₃ 4500 IU, vit. C 120 mg, vit. E 25 mg, vit. K₃ 5 mg, vit. B₁ 12.5 mg, vit. B₂ 12.5 mg, vit. B₆ 15.0 mg, vit. B₁₂ 0.025 mg, niacinamide 50 mg, pantothenate 40 mg, inositol 75 mg, folic acid 2.5 mg, biotin 0.08 mg; ² Mineral premix (mg/kg): NaCl 1.0; MgSO₄ 15.0; NaH₂PO₄·2H₂O 25.0; AlCl₃·6H₂O 0.06; KH₂PO₄ 32.0; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O 20.0; C₆H₅FeO₇·10H₂O 2.5; CaC₆H₁₀CaO₆·5H₂O 3.5; ZnSO₄·7H₂O 0.353; MnSO₄·4H₂O 0.162; CuSO₄·5H₂O 0.031; CoCl₂·6H₂O 0.001; KIO₃·6H₂O, 0.003; cellulose, 0.39

经粉碎后过60目筛, 制作含枯草芽孢杆菌的饲料时将枯草芽孢杆菌菌液代替无菌水, 所有原料混合均匀后经小型制粒机加工成直径为2.0 mm的颗粒饲料, 风干后置于-20℃冰箱中保存。采用平板计数法测定饲料中枯草芽孢杆菌的含量约为1×10⁷ CFU/g。

1.3 实验设计

实验用草鱼购自湖北省黄冈市团风县百容水产良种有限公司。暂养4周后选取外观健康、规格一致的草鱼(50.53±0.70) g随机分配到12个容量为300 L的养殖缸(一共4个组, 每组3个重复), 每个缸投放密度为25尾。

实验分为4个组, 具体分组情况如表2所示, 实验开始时对照组每尾鱼腹腔注射0.1 mL 0.01mol/

L灭菌PBS, 其余各组每尾鱼腹腔注射0.1 mL 1.0×10⁶ CFU/mL 嗜水气单胞菌菌液。嗜水气单胞菌的浓度为LC50的10%(半致死浓度为1×10⁶ CFU/fish)。实验用鱼均在华中农业大学水产学院养殖实验基地进行循环水养殖, 整个实验期间水质条件: 水温(25±1)℃、pH 7.5±0.3、溶解氧(7±0.45) mg/L、氨氮含量(0.015±0.002) mg/L以及亚硝酸盐氮(0.05±0.008) mg/L, 光周期为自然光周期。养殖实验持续56d, 每天饱食投喂饲料2次(8:30和16:30), 未吃完的剩余饲料在投喂之后的2h使用虹吸管收集, 并将其在烘箱中以60℃干燥12h至恒重, 以确定各组实验鱼的实际摄食量。

1.4 样品采集

分别在感染嗜水气单胞菌后的第28和第56天, 将草鱼饥饿24h。用MS-222(10 mg/L)麻醉后, 将每缸鱼计数并称重。每组随机选择24尾鱼, 其中6尾鱼测量个体的体长、体重、内脏重量和肝脏重量, 及从尾静脉取血以获得血清; 6尾鱼用于总RNA提取及抗氧化酶的测定; 6尾鱼用于肝脏脂质含量的测定; 6尾鱼取得的肝脏放入多聚甲醛固定液固定以备后续冰冻切片。

1.5 样品分析

脂肪含量的测定及油红染色分析 脂肪含量的测定: 将肝脏样品在-50℃冷冻干燥24h, 然后用索氏抽提法测定肝脏的粗脂肪含量。

油红O染色分析: 用于油红O染色的肝脏样本用多聚甲醛固定48h后, 进行脱水、包埋、切片(厚度8 μm)、染色和拍照。从每个样本中随机选取10个视野, 用Image-Pro Plus 6.0软件计算肝组织中染成红色的脂滴的相对面积, 采用双盲法统计各图, 汇总得到结果。

血清生化指标测定 血清胆固醇(CHO)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量以及血清谷草转氨

表 2 实验分组设计

Tab. 2 The experimental design

分组 Group	暂养期间饲料Diet during the temporary rearing period	腹腔注射 Intraperitoneal injection	注射后投喂饲料Diet after intraperitoneal injection
对照 Control	基础饲料	PBS	基础饲料
Ah	基础饲料	1×10 ⁵ CFU/fish <i>A. hydrophila</i>	基础饲料
Ah+B _s	基础饲料	1×10 ⁵ CFU/fish <i>A. hydrophila</i>	<i>B. subtilis</i> 饲料
B _s +Ah	<i>B. subtilis</i> 饲料	1×10 ⁵ CFU/fish <i>A. hydrophila</i>	基础饲料

酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)活性采用荷兰威图全自动生化分析仪测定, 试剂盒均购自中生北控生物科技股份有限公司。

脂质代谢相关基因表达分析 从草鱼肝脏中提取RNA, 然后反转录为cDNA, 以 β -肌动蛋白(*β-actin*)为内参, 使用Roche Light Cycler 480 real-time PCR仪进行实时荧光定量PCR, 引物见表3(由武汉天一辉远生物科技有限公司合成)。反应总体积为20 μ L, 包括cDNA 2 μ L、上下游引物各0.5 μ L、焦碳酸二乙酯(Diethylpyrocarbonate, DEPC)水7 μ L、2 $\times$ SYBR Green qPCR Mix 10 μ L(Aidlab, PC5902)。

抗氧化指标测定 取得的肝脏样品在冰上

表3 RT-PCR引物序列

Tab. 3 Primers used for real-time PCR

基因Gene	登录号 GenBank accession No.	引物序列Primer sequence(5'—3')	退火温度 Annealing temperature (°C)
脂肪酸合酶FAS	HM802556.1	GTCCACAGGGTGT CGTTC GAGGTCTTGGGCT CTTTATT	58
乙酰辅酶A羧化酶 α ACC α	GU908475	AGTATCGCAGTGG CATCA TGTCCTCTTGT TCCT	58
肉碱棕榈酰基转移酶I α 1a CPT1a1a	KJ816747	TTTACGACGGACG GTTGC GCTTGTCTTCCCA CGACT	58
脂蛋白脂酶LPL	FJ436077	AGCCCTGTATGAA CGAGA CACATCCTTGCCCA CTAG	58
脂肪甘油三酯脂肪酶ATGL	HQ845211	TATTGTGGTTTAAT CCCTCC CAGTGCCCTGCTCA GTCT	58
激素敏感脂酶HSL	FJ843081	CCGACAAGGACAG GACAGT ATGACCAGGCAGG GAGAA	58
肝型脂肪酸结合蛋白L-FABP	EU220990.1	GGGAAAACCATCA CTAACTC TCAGGGTCTCAAC CATCTC	58
脂肪酸移位酶FAT/CD36	KU821103.1	CTTCCCCACTTCCT CTATG TAATCGGTTCCAC ATCCA	58
固醇调控元件结合蛋白-1c SREBP-1c	GU339498	GGATTGAGGTGAG CCGACAT TGAGGAAAGCCAT TGACTACATT	58
过氧化物酶体增殖物激活受体 γ PPAR γ	GQ220296	AATGCACCTTTCGT TATCC GAGCGTCACTGG TCGTTC	58
过氧化物酶体增殖物激活受体 α PPAR α	FJ595500	TGTCAATACTGCC GTTTCC GACTGGTGCTCCTC TTTCC	58
肌动蛋白 β -actin	M25013	CCTTCTTGGGTATG GAGTCTTG AGAGTATTTACGC TCAGGTGGG	T

解冻后, 制成匀浆液, 用于测定总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、氧化氢酶(CAT)、还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、过氧化氢(H_2O_2), 以上指标均按照试剂盒说明书进行检测, 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

生长性能及形体指标数据计算 成活率(Survival rate, SR, %)=100 $\times$ (终尾数/初尾数)

体增重率(Weight gain rate, WGR, %)=100 $\times$ (末体重-初体重)/初体重

特定生长率(Special growth rate, SGR, %/d)=100 $\times$ (Ln末体重-Ln初体重)/饲养天数

摄食量(Feed intake, FI, g/fish)=饲料消耗量(g, 干重)/鱼数量

饲料系数(Feed conversion rate, FCR)=每缸投喂饲料总量/每缸鱼体总增重量

肥满度(Condition factor, CF, g/cm³)=100 $\times$ 体重(g)/[体长(cm)]³

肝胰脏指数(Hepatosomatic index, HSI, %)=100 $\times$ 肝重(g)/体重(g)

内脏指数(Viscera index, VSI, %)=100 $\times$ 内脏重(g)/体重(g)

1.6 统计分析

实验数据用平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SEM)表示, 采用SPSS 22.0软件进行处理, 相同取样天数的不同分组采用单因素方差分析, 差异显著时通过Duncan's检验方法进行多重比较, 以 $P<0.05$ 为差异显著性标准。比较同一分组的两个取样时间点之间的显著性采用独立样本 T 检验, 以 $P<0.05$ 为差异显著性标准。

2 结果

2.1 枯草芽孢杆菌对草鱼生长性能、摄食量及形态学参数的影响

如表4所示, Ah+B_s组及B_s+Ah组WGR、SGR于第28d和第56天时, 均显著高于Ah组($P<0.05$), 并于第56天时显著高于对照组($P<0.05$), 且Ah+B_s组FCR显著低于Ah组($P<0.05$)。在两个取样时间点, CF、HSI和VSI在各组之间无显著差异($P>0.05$, 表5)。

2.2 枯草芽孢杆菌对草鱼肝脏脂肪含量的影响

经染色后, 脂质呈红色, 细胞核呈蓝色。图1中油红O染色结果(A-H)及对油红O染色的脂滴所占相对面积统计结果(图1-I)显示, 28d时油红O染色的脂滴面积在Ah组显著增加($P<0.05$), 而在B_s+Ah组及Ah+B_s组变化无统计学差异($P>0.05$); 第56天时各组脂滴面积无显著差异($P>0.05$)。图1-J为肝脏脂肪含量测定结果: 第28天时, Ah组的脂肪

表 4 益生枯草芽孢杆菌对草鱼生长性能及摄食量的影响

Tab. 4 Effects of *B. subtilis* on growth performance and food intake of grass carps

指标 Index	对照Control	Ah	Ah + Bs	Bs + Ah
28d				
<i>IW</i>	50.77±0.83	50.61±0.60	50.34±0.38	50.42±1.26
<i>SR</i>	98.67±2.31	96.00±4.00	98.67±2.31	97.33±4.62
<i>FW</i>	68.76±1.62	67.53±2.66	70.97±1.06	70.69±2.73
<i>WGR</i>	35.46±3.49 ^{ab}	33.42±4.16 ^a	40.98±1.28 ^b	40.17±1.89 ^b
<i>SGR</i>	1.08±0.09 ^{ab}	1.03±0.11 ^a	1.23±0.03 ^b	1.21±0.05 ^b
<i>FI</i>	31.45±0.26	30.62±1.57	31.74±1.19	32.31±1.04
<i>FCR</i>	1.76±0.14 ^{ab}	1.83±0.20 ^b	1.54±0.01 ^a	1.60±0.07 ^{ab}
56d				
<i>SR</i>	97.31±2.57	95.98±1.09	97.37±0.54	96.71±0.61
<i>FW</i>	103.77±2.17 ^{ab}	102.71±3.86 ^a	115.36±6.31 ^c	110.87±2.98 ^{bc}
<i>WGR</i>	104.37±0.98 ^a	102.96±7.21 ^a	129.12±11.00 ^b	119.91±1.71 ^b
<i>SGR</i>	1.28±0.01 ^a	1.26±0.06 ^a	1.48±0.09 ^b	1.41±0.01 ^b
<i>FI</i>	104.70±0.83 ^a	105.14±7.41 ^a	123.34±15.76 ^b	121.30±4.92 ^b
<i>FCR</i>	1.98±0.05 ^{ab}	2.02±0.01 ^b	1.89±0.07 ^a	2.01±0.03 ^b

注: 表中数值(平均值±标准误)为样本的平均值($n=3$ 重复缸)。每行数值后上标的不同字母表示差异显著($P<0.05$); 下同Note: Values are the mean±SEM ($n=3$). Values within the same row with different letters are significantly different ($P<0.05$); The same applies below

表 5 益生枯草芽孢杆菌对草鱼形态学参数的影响

Tab. 5 Effects of *B. subtilis* on morphological parameters of grass carps

指标Index	对照Control	Ah	Ah + Bs	Bs + Ah
28d				
<i>CF</i>	1.91±0.05	1.84±0.07	1.90±0.17	1.86±0.03
<i>HSI</i>	2.13±0.13	2.03±0.09	2.06±0.09	2.15±0.06
<i>VSI</i>	10.30±1.06	10.50±1.64	11.84±1.31	10.23±1.15
56d				
<i>CF</i>	2.00±0.09	1.90±0.16	1.94±0.06	1.96±0.18
<i>HSI</i>	2.49±0.23	2.39±0.11	2.53±0.17	2.43±0.10
<i>VSI</i>	11.83±1.05	11.15±1.48	10.93±1.19	11.10±1.43

注: 表中数值(平均值±标准误)为样本的平均值($n=6$)Note: Values are the mean ± SEM ($n=6$)

含量显著高于对照组($P<0.05$), Ah+Bs和Bs+Ah组脂肪含量与Ah组相比显著降低($P<0.05$)。第56天时, 各组肝脏脂肪含量均无统计学差异($P>0.05$)。对照组、Bs+Ah组及Ah+Bs组在第56天时的肝脏脂肪含量显著高于第28天时的脂肪含量($P<0.05$)。

2.3 枯草芽孢杆菌对草鱼血清生化指标的影响

如表 6 所示, 第28天时, TG和HDL-C含量在Ah+Bs组较Ah组有升高的趋势, 在Bs+Ah组显著高于Ah组($P<0.05$); AST活性在Ah+Bs组较Ah组显著降低($P<0.05$); 此外, TG、HDL-C含量及AST活性

在Ah+Bs及Bs+Ah组与对照组均无显著差异($P>0.05$)。第56天时, CHO、HDL-C和LDL-C含量在Bs+Ah组较Ah组显著升高($P<0.05$), 在Ah+Bs组有升高的趋势, 且均与对照组无显著差异($P>0.05$)。AST和ALT活性在Ah组显著高于对照组($P<0.05$), 而在Ah+Bs和Bs+Ah组则与对照组无显著差异($P>0.05$)。

2.4 枯草芽孢杆菌对草鱼肝脏脂代谢相关基因表达的影响

如图 2 所示, 第28天时, Ah组ACCα表达水平较对照组显著上调($P<0.05$), LPL、ATGL、SREBP-1c、PPARγ表达水平显著下调($P<0.05$), 但这些基因表达水平在Ah+Bs及Bs+Ah组较对照组无显著差异($P>0.05$)。PPARα表达水平在Ah+Bs和Bs+Ah组均较Ah组显著上调($P<0.05$)且与对照组比无显著差异($P>0.05$)。第56天时, FAS、ACCα、CPT1α、HSL、SREBP-1c、PPARγ、PPARα的表达水平在Ah组显著下调($P<0.05$), 但在Ah+Bs和Bs+Ah组较Ah组显著上调或有上调的趋势。与对照组比, ATGL表达水平在Ah组有下调的趋势; 但在Ah+Bs组和Bs+Ah组较Ah组显著上调($P<0.05$)。

2.5 枯草芽孢杆菌对草鱼肝脏抗氧化能力的影响

如图 3 所示, 第28天时CAT、SOD活性及第56天时T-AOC, 在Ah组较对照组显著降低($P<0.05$), 在Ah+Bs组和Bs+Ah组较Ah组显著升高($P<0.05$)。第28天时, GSH含量在Bs+Ah组较Ah组显著升高($P<0.05$); H₂O₂含量在Ah组显著升高($P<0.05$), 在Bs+Ah组显著低于Ah组($P<0.05$)。Ah组MDA含量在两个取样时间点均显著高于对照组($P<0.05$), 在Ah+Bs组和Bs+Ah组与对照组无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 枯草芽孢杆菌对草鱼生长性能及形态学参数的影响

本研究表明, 感染嗜水气单胞菌28d后, 草鱼WGR、SGR有下降的趋势, FCR有增加的趋势。非洲鲶(*Clarias gariepinus*)在感染嗜水气单胞菌后, 其SGR显著下降, FCR显著增加^[13], 与本研究结果一致。本研究投喂益生菌饲料的草鱼表现出更好的生长性能, 且在第56天时Ah+Bs组的FCR最小, 表明在饲料中添加枯草芽孢杆菌Ch9能促进草鱼生长, 提高饲料的效率。在点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[14]、里海鲱(*Salmo caspius*)^[15]等鱼类也有类似的报道。这可能是与芽孢杆菌能够提高消化酶活性以及能产生酶, 减少抗营养因子, 提高动物对

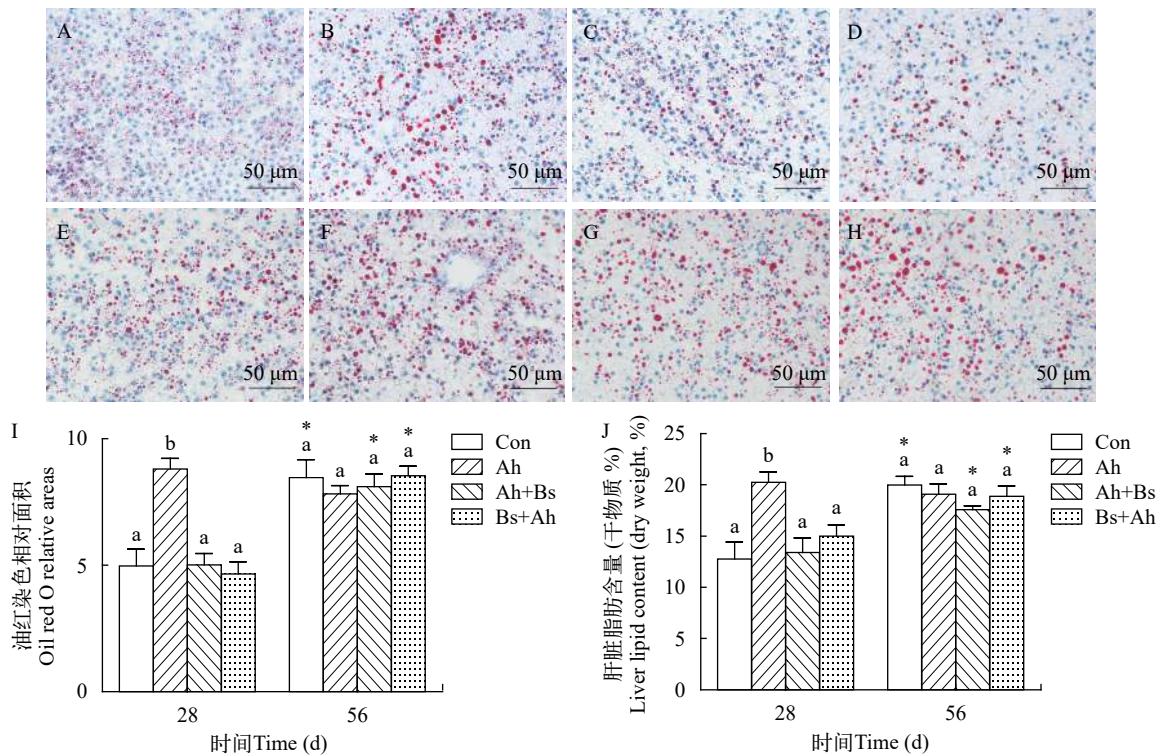


图1 益生枯草芽孢杆菌对草鱼肝脏脂质沉积的影响

Fig. 1 The effect of *B. subtilis* on hepatic lipid content in grass carp

A—H(400×). 分别为第28天(A—D图)和第56天(E—H)的对照组、Ah组、Ah+Bs组和Bs+Ah组油红染色结果; I图. 用Image-Pro Plus 6.0软件统计的油红染色区域面积结果; J图. 肝脏的脂肪含量; 图中数值(平均值±标准误)为样本的平均值($n=6$); 不同的上标字母表示不同处理组间差异显著($P<0.05$); *表示28d和56d之间有显著差异($P<0.05$), 下同

A—H. The oil red O staining of the control group, Ah group, Ah+Bs group and Bs+Ah group on the 28d (A—D) and 56d (E—H); I. The relative areas of the lipid droplets after oil-red O staining analysed by Image-Pro Plus 6.0; J. The effect of the *B. subtilis* diet on the hepatic lipid content in grass carp. Values are the mean±SEM ($n=6$). Different letters indicate significant differences among groups ($P<0.05$). Asterisks indicate significant differences between 28d and 56d ($P<0.05$). The same applies below

表6 益生枯草芽孢杆菌对草鱼血液生化参数的影响

Tab. 6 Effects of *B. subtilis* on blood biochemical parameters of grass carps

指标Index	对照Control	Ah	Ah+Bs	Bs+Ah
28d				
CHO (mmol/L)	6.52±0.17 ^{ab}	6.05±0.26 ^a	6.29±0.43 ^a	6.79±0.16 ^b
TG (mmol/L)	5.76±0.38 ^b	5.14±0.31 ^a	5.59±0.47 ^{ab}	5.73±0.42 ^b
HDL-C (mmol/L)	2.25±0.25 ^{ab}	1.89±0.16 ^a	2.22±0.21 ^{ab}	2.47±0.20 ^b
LDL-C (mmol/L)	2.39±0.40	2.27±0.13	2.43±0.28	2.29±0.25
AST (U/L)	52.83±12.69 ^{ab}	67.04±9.31 ^b	49.50±7.32 ^a	55.93±14.13 ^{ab}
ALT (U/L)	6.59±0.25	6.85±0.33	6.69±0.92	6.96±0.15
56d				
CHO (mmol/L)	6.07±0.49 ^b	5.39±0.49 ^a	5.86±0.54 ^{ab}	6.02±0.34 ^b
TG (mmol/L)	5.56±0.42	6.02±0.70	5.79±0.42	5.56±0.49
HDL-C (mmol/L)	2.19±0.39 ^{ab}	1.94±0.16 ^a	2.06±0.14 ^{ab}	2.30±0.20 ^b
LDL-C (mmol/L)	2.54±0.25 ^b	2.10±0.20 ^a	2.33±0.24 ^{ab}	2.46±0.21 ^b
AST (U/L)	52.52±6.32 ^a	81.48±18.54 ^b	50.73±9.13 ^a	58.72±6.08 ^a
ALT (U/L)	6.78±0.39 ^a	7.41±0.45 ^b	6.71±0.29 ^a	6.58±0.61 ^a

营养的利用等有关^[11, 16, 17]。

3.2 枯草芽孢杆菌对草鱼肝脏脂肪含量的影响

肝脏的脂肪含量及油红染色结果表明, 嗜水气单胞菌能够造成草鱼肝脏的脂质积累, 而通过饲料中添加枯草芽孢杆菌可以改善这种状况, 减少脂质在草鱼肝脏中的积累。具体体现为第28天时, Ah+Bs和Bs+Ah组草鱼肝脏脂肪含量显著低于Ah组, 且与对照组肝脏脂肪含量处于同一水平。在哺乳动物中, 已经有许多文献表明一些益生菌能减少肝脏中脂质的积累, 治疗脂肪肝病^[18—20]。在鱼类中, *Shewanella*属的两个益生菌菌株(Pdp11及Pdp13)及鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)在降低肝脏脂质方面也有很大潜力^[21—24]。

3.3 枯草芽孢杆菌对草鱼血清生化指标的影响

肝脏在脂质代谢过程中具有许多作用(如摄取、转运、合成及分解等), 进入肝脏的脂肪酸, 能酯化成为TGs, 并能以脂滴的形式储存在肝细胞中, 或者以富含TGs的脂蛋白的形式分泌到血液中^[25]; 当肝细胞受到一定的损害时, 脂类代谢的平衡会被

打破, 并影响血清中的血脂水平^[26]。因此, 血脂水平等血清生化指标可以在一定程度上反映出肝脏的健康状态和机体脂质代谢等状况。本研究血清生化指标结果显示, 在注射嗜水气单胞菌后第28天, TG显著降低, 至第56天时CHO和LDL-C显著降低, HDL-C也有降低的趋势; 而投喂枯草芽孢杆菌饲料, 均能使血脂恢复到与对照组相同的水平。另外, 在添加枯草芽孢杆菌后, 血清中AST和ALT活性较Ah组显著下降, 表明枯草芽孢杆菌Ch9可能减少了

嗜水气单胞菌对肝脏的损害。已有研究表明, 鼠李糖乳杆菌、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)能降低罗非鱼血清中AST和ALT的活性^[27]。对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)饲喂含有枯草芽孢杆菌的饲料, 血清中AST和ALT活性显著下降^[28]。因此, 枯草芽孢杆菌在减少因嗜水气单胞菌的感染对肝脏的损伤及其对脂质代谢的影响, 改善因嗜水气单胞菌感染造成的血脂下降方面具有一定潜力。

3.4 枯草芽孢杆菌对草鱼肝脏脂代谢相关基因表达的影响

为分析感染嗜水气单胞菌及投喂枯草芽孢杆菌饲料对草鱼肝脏脂肪合成、分解与调控相关基因mRNA表达水平的影响, 采用qPCR技术检测草鱼肝脏脂代谢相关基因mRNA表达水平。重要的脂肪生成相关酶, 如FAS、ACC, 以及重要的转录因子SREBP-1c和PPAR γ 可以促进肝脏脂质的合成; PPAR α 可诱导CPT1表达, 促进脂肪酸分解; HSL、ATGL、LPL均参与脂肪的水解^[29-36], FAT/CD36除了与脂肪酸转运相关, 还在脂肪酸氧化代谢过程中发挥了重要作用^[37-39]。本研究表明, 投喂枯草芽孢杆菌在维持肝脏正常脂质代谢方面具有一定作用。第28天时Ah组ACC α 较对照组显著地上调, LPL、ATGL、FAT/CD36显著地下调, 血清TG在第28天显著降低, 表明感染嗜水气单胞菌诱导草鱼脂质合成增加、脂质分解及输出减少, 导致肝脏脂质积累; 在投喂枯草芽孢杆菌后, ACC α 的mRNA表达水平较Ah组下调, 甘油三酯水解相关酶LPL及ATGL mRNA表达水平均上调, 并与对照无显著差异。因此脂肪酸合成的减少及脂质分解的增加造成了Bs+Ah组及Ah+Bs组脂肪含量低于Ah组且与对照无显著差异。相关研究表明, 高脂饲料诱导的

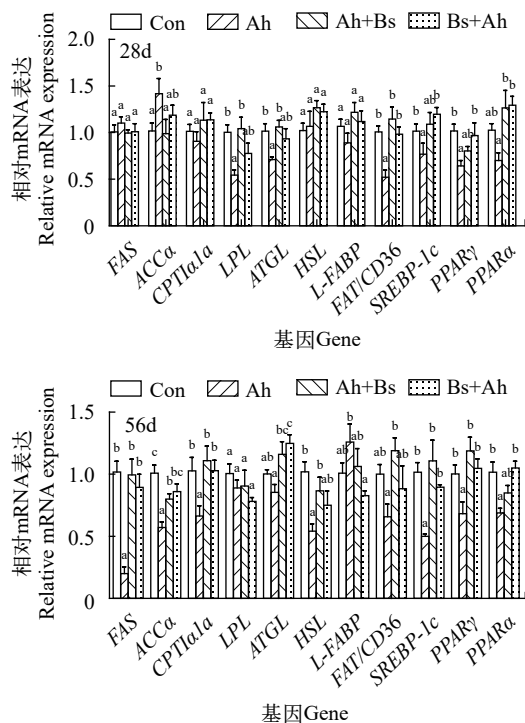


图2 益生枯草芽孢杆菌对草鱼肝脏脂代谢基因表达的影响

Fig. 2 Effects of *B. subtilis* on mRNA levels of lipid metabolism genes of grass carp

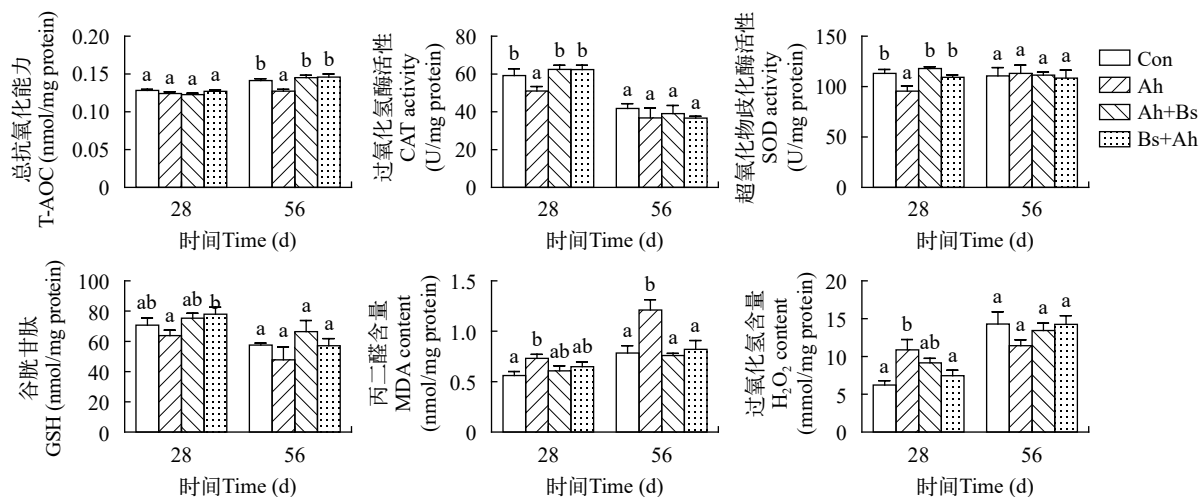


图3 益生枯草芽孢杆菌对草鱼肝脏抗氧化酶活性及MDA和H₂O₂含量的影响

Fig. 3 Effects of *B. subtilis* on activities of antioxidant enzymes and content of MDA and H₂O₂ in grass carp

脂肪肝罗非鱼LPL表达水平显著下调, 在高脂饲料中添加垂盆草提取物后则显著上调LPL表达水平^[3], 用咖啡因治疗斑马鱼(*Danio rerio*)的脂肪肝, 其肝脏ACC1表达水平显著地下调^[40], 这些均与本研究相似。56d时Ah组FAS、ACC α 、CPT1 α 、HSL、SPEBP-1c、PPAR γ 和PPAR α 表达水平较对照均显著地下调, 表明Ah组肝脏脂质合成和分解均减少, 脂质代谢异常。在投喂Cu过量饲料后, 黄颡鱼ACC α 和ATGL表达水平均显著下调, 而肝脏脂肪含量减少^[41], 与本研究结果相似。在投喂枯草芽孢杆菌饲料后, 这些基因表达与对照无显著差异, 表明在感染嗜水气单胞菌前后投喂枯草芽孢杆菌饲料均能够减少因感染嗜水气单胞菌对草鱼脂质代谢的影响。

3.5 枯草芽孢杆菌对草鱼肝脏抗氧化能力的影响

许多外源因素能诱导体内形成过氧化环境, 导致自由基浓度升高, 进而干扰肝脏脂类代谢、破坏细胞功能, 最终形成肝脏脂质积累, 破坏肝脏功能^[4]。因此, 氧化应激和氧化还原平衡的改变在肝脏脂肪变性的发病机制中起着至关重要的作用^[42]。T-AOC是评价机体抗氧化能力的重要指标^[43]。SOD、CAT、GSH是一类重要的抗氧化酶, 在保护细胞免受氧化应激、预防或修复氧化损伤方面发挥着重要作用, 如SOD能催化O₂⁻转化为H₂O₂, 而CAT则能清除H₂O₂^[44]。MDA是脂质氧化损伤的重要产物, 可用于评估脂质过氧化程度^[5, 45]。实验结果表明, 饲喂含有枯草芽孢杆菌的饲料后, 草鱼抗氧化能力显著提高, 主要反映在肝脏SOD、GSH、CAT、T-AOC较Ah组显著提高; MDA及H₂O₂含量较Ah组低。已有的研究表明益生菌能够提高鱼类的抗氧化能力: 投喂含有枯草芽孢杆菌的饲料8周后, 团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)幼鱼肝脏SOD、CAT、GSH-PX的活性显著升高, MDA含量显著降低^[46]; 在饲料中补充德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)投喂8周后, 黄河鲤(*Cyprinus carpio* Huanghe var)肝脏SOD、CAT、GPX活性及T-AOC显著升高, MDA含量显著降低^[47]。因此, 枯草芽孢杆菌能提高草鱼肝脏的抗氧化能力, 减少组织氧化应激的发生, 降低感染嗜水气单胞菌对肝脏的损害。

4 结论

以上结果表明, 在饲料中添加枯草芽孢杆菌可减少嗜水气单胞菌感染对草鱼肝脏功能的损害, 有利于调节肝脏正常的脂质合成、分解、转运等功能, 减少脂质在肝脏中的积累, 并促进草鱼的生长及降低饲料系数。

参考文献:

- [1] Du Z Y, Clouet P, Zheng W H, *et al.* Biochemical hepatic alterations and body lipid composition in the herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed high-fat diets [J]. *British Journal of Nutrition*, 2006, **95**(5): 905-915.
- [2] Kong W, Huang C, Tang Y, *et al.* Effect of *Bacillus subtilis* on *Aeromonas hydrophila*-induced intestinal mucosal barrier function damage and inflammation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 1588.
- [3] Huang L, Cheng Y, Huang K, *et al.* Ameliorative effect of *Sedum sarmentosum* Bunge extract on tilapia fatty liver via the PPAR and P53 signaling pathway [J]. *Scientific Reports*, 2018, **8**(1): 8456.
- [4] Du Z Y. Causes of fatty liver in farmed fish: a review and new perspectives [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, **38**(9): 1628-1638. [杜震宇. 养殖鱼类脂肪肝成因及相关思考 [J]. 水产学报, 2014, **38**(9): 1628-1638.]
- [5] Tang Y, Han L, Chen X, *et al.* Dietary supplementation of probiotic *Bacillus subtilis* affects antioxidant defenses and immune response in grass carp under *Aeromonas hydrophila* challenge [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2019, **11**(2): 545-558.
- [6] Zhao H, Luo Y, Wu Z, *et al.* Hepatic lipid metabolism and oxidative stress responses of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed diets of two different lipid levels against *Aeromonas hydrophila* infection [J]. *Aquaculture*, 2019, (509): 149-158.
- [7] Al-Muzafar H M, Amin K A. Probiotic mixture improves fatty liver disease by virtue of its action on lipid profiles, leptin, and inflammatory biomarkers [J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2017, **17**(1): 43.
- [8] An H M, Park S Y, Lee D K, *et al.* Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2011, (10): 116.
- [9] Li W F, Zhang X P, Song W H, *et al.* Effects of *Bacillus* on the water quality in grass carp culture [J]. *Journal of Aquaculture*, 2012, **33**(10): 1-5. [李卫芬, 张小平, 宋文辉, 等. 芽孢杆菌对草鱼养殖水质的影响 [J]. 水产养殖, 2012, **33**(10): 1-5.]
- [10] Liu H, Wang S, Cai Y, *et al.* Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, (60): 326-333.
- [11] Wu Z X, Feng X, Xie L L, *et al.* Effect of probiotic *Bacillus subtilis* Ch9 for grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844), on growth performance, digestive enzyme activities and intestinal microflora [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2012, **28**(5): 721-727.
- [12] Zhang X, Peng L, Wang Y, *et al.* Effect of dietary supplementation of probiotic on performance and intestinal microflora of Chinese soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2014, **20**(6): 667-674.
- [13] Sheikhlar A, Alimon A R, Daud H, *et al.* White mulberry (*Morus alba*) foliage methanolic extract can alleviate *Aeromonas hydrophila* infection in African catfish (*Clarias fahuensis*) [J]. *Aquaculture*, 2018, **415**: 1-7.

- rias gariepinus) [J]. *The Scientific World Journal*, 2014, (2014): 592709.
- [14] Liu C H, Chiu C H, Wang S W, *et al.* Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, **33**(4): 699-706.
- [15] Karimzadeh S, Amirkolaie A K, Miandehy S P. The effects of different levels of Beta Plus on growth performance, microbial flora and blood parameters of caspian trout, *Salmo caspius* (Kessler, 1877) [J]. *International Journal of Aquatic Biology*, 2014, **2**(6): 292-298.
- [16] Cheng W, Chiu C S, Guu Y K, *et al.* Expression of recombinant phytase of *Bacillus subtilis* E20 in *Escherichia coli* HMS 174 and improving the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, juveniles by using phytase-pretreated soybean meal-containing diet [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2013, **19**(2): 117-127.
- [17] Liu C H, Wu K, Chu T W, *et al.* Dietary supplementation of probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth performance and disease resistance against *Vibrio alginolyticus* in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*) [J]. *Aquaculture International*, 2017, **26**(1): 63-74.
- [18] Lee H Y, Park J H, Seok S H, *et al.* Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, **1761**(7): 736-744.
- [19] Ma X, Hua J, Li Z. Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells [J]. *Journal of Hepatology*, 2008, **49**(5): 821-830.
- [20] Xu R Y, Wan Y P, Fang Q Y, *et al.* Supplementation with probiotics modifies gut flora and attenuates liver fat accumulation in rat nonalcoholic fatty liver disease model [J]. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2012, **50**(1): 72-77.
- [21] Banda IGD, Lobo C, León-Rubio J M, *et al.* Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* [J]. *Aquaculture*, 2010, **306**(1): 281-288.
- [22] Tapia-Paniagua S T, Diaz-Rosales P, García de la Banda I, *et al.* Modulation of certain liver fatty acids in *Solea senegalensis* is influenced by the dietary administration of probiotic microorganisms [J]. *Aquaculture*, 2014, (424-425): 234-238.
- [23] Falcinelli S, Picchietti S, Rodiles A, *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* lowers zebrafish lipid content by changing gut microbiota and host transcription of genes involved in lipid metabolism [J]. *Scientific Reports*, 2015, (5): 9336.
- [24] Falcinelli S, Rodiles A, Hatef A, *et al.* Dietary lipid content reorganizes gut microbiota and probiotic *L. rhamnosus* attenuates obesity and enhances catabolic hormonal milieu in zebrafish [J]. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 5512.
- [25] Yuan X, Liang X F, Liu L, *et al.* Fat deposition pattern and mechanism in response to dietary lipid levels in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, **42**(6): 1557-1569.
- [26] Zhang Y L, Zhang T, Zhou Z F, *et al.* The clinical value of serum lipid in patients with acute chronic hepatitis, cirrhosis and liver carcinoma [J]. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2008, **20**(6): 369-370. [张莹兰, 张弢, 周祖发, 等. 急性慢性肝炎、肝硬化及肝癌患者血脂检测的临床意义 [J]. 临床消化病杂志, 2008, **20**(6): 369-370.]
- [27] Zhou X B, Huang Y H, Cao J M, *et al.* Effects of 5 kinds of lactobacillus on growth performance, body composition, serum biochemical indices and intestinal microflora of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, **26**(7): 2009-2017. [周晓波, 黄燕华, 曹俊明, 等. 5种乳酸菌对罗非鱼生长性能、体成分、血清生化指标及肠道菌群的影响 [J]. 动物营养学报, 2014, **26**(7): 2009-2017.]
- [28] Hassaan M S, Soltan M A, Jarmolowicz S, *et al.* Combined effects of dietary malic acid and *Bacillus subtilis* on growth, gut microbiota and blood parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2018, (24): 83-93.
- [29] Chen Q L, Luo Z, Pan Y X, *et al.* Differential induction of enzymes and genes involved in lipid metabolism in liver and visceral adipose tissue of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* exposed to copper [J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, (136-137): 72-78.
- [30] Song Y F, Luo Z, Zhang L H, *et al.* Endoplasmic reticulum stress and disturbed calcium homeostasis are involved in copper-induced alteration in hepatic lipid metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Chemosphere*, 2016, (144): 2443-2453.
- [31] Eberle D, Hegarty B, Bossard P, *et al.* SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis [J]. *Biochimie*, 2004, **86**(11): 839-848.
- [32] Rosen E D, Sarraf P, Troy A E, *et al.* PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro [J]. *Molecular Cell*, 1999, **4**(4): 611-617.
- [33] Tontonoz P, Hu E, Spiegelman B M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor [J]. *Cell*, 1994, **79**(7): 1147-1156.
- [34] Morash A J, Kajimura M, McClelland G B. Intertissue regulation of carnitine palmitoyltransferase I (CPTI): Mitochondrial membrane properties and gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2008, **1778**(6): 1382-1389.
- [35] Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria [J]. *BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2000, **1486**(1): 1-17.
- [36] Ji H, Li J, Liu P. Regulation of growth performance and lipid metabolism by dietary n-3 highly unsaturated fatty acids in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2011, **159**(1): 49-56.
- [37] Bonen A, Han X X, Habets D D, *et al.* A null mutation in skeletal muscle FAT/CD36 reveals its essential role in insulin- and AICAR-stimulated fatty acid metabolism [J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2007, **292**(6): E1740-E1749.
- [38] Coburn C T, Knapp F F, Febbraio M, *et al.* Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice [J]. *The*

- Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(42): 32523-32529.
- [39] Holloway G P, Lally J, Nickerson J G, *et al.* Fatty acid binding protein facilitates sarcolemmal fatty acid transport but not mitochondrial oxidation in rat and human skeletal muscle [J]. *Journal of Physiology*, 2010, **582**(1): 393-405.
- [40] Zheng X, Dai W, Chen X, *et al.* Caffeine reduces hepatic lipid accumulation through regulation of lipogenesis and ER stress in zebrafish larvae [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2015, **22**(1): 105.
- [41] Chen Q L. Effects and mechanisms of copper on lipid metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and javelin goby *Synechogobius hasta* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015: 73-86. [陈启亮. 铜对黄颡鱼和矛尾复虾虎鱼脂类代谢的影响及机理研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015: 73-86.]
- [42] Roberto G, Giovanni M, Maurizio C. Redox balance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2011, **15**(5): 1325-1365.
- [43] Du Z J, Xia J, Luo M L, *et al.* Protective effect of Gln on *Pelodiscus sinensis* against *Aeromonas hydrophila* infection [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2014, **33**(2): 254-260. [杜宗君, 夏晶, 骆美琳, 等. 谷氨酰胺对嗜水气单胞菌致病中华鳖的保护作用 [J]. 四川动物, 2014, **33**(2): 254-260.]
- [44] Wang W N, Zhou J, Peng W, *et al.* Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part C*, 2009, **150**(4): 428-435.
- [45] Yang S P, Wu Z H, Jian J C, *et al.* Effect of marine red yeast *Rhodospiridium paludigenum* on growth and antioxidant competence of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2010, **309**(1): 62-65.
- [46] Sun S M, Su Y L, Zhang W X, *et al.* Effects of dietary *Bacillus subtilis* on growth performance, liver antioxidant ability, intestinal microflora structure and disease resistance of juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, **28**(2): 507-514. [孙盛明, 苏艳莉, 张武肖, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对团头鲂幼鱼生长性能、肝脏抗氧化指标、肠道菌群结构和抗病力的影响 [J]. 动物营养学报, 2016, **28**(2): 507-514.]
- [47] Zhang C N, Zhang J L, Guan W C, *et al.* Effects of *Lactobacillus delbrueckii* on immune response, disease resistance against *Aeromonas hydrophila*, antioxidant capability and growth performance of *Cyprinus carpio* Huanghe var [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, (68): 84-91.

EFFECTS OF *BACILLUS SUBTILIS* ON THE HEPATIC LIPID METABOLISM OF *CTENOPHARYNGODON IDELLUS*

LUO Yan-Er^{1,2}, ZHAO Hui^{1,3}, GUO Dao-Yuan^{2,3}, WANG Huan^{1,4}, CHEN Xiao-Xuan^{3,4} and WU Zhi-Xin^{1,4}

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Hubei Engineering Technology Research Center for Aquatic Animal Diseases Control and Prevention, Wuhan 430070, China; 3. Hubei Provincial Engineering Laboratory for Pond Aquaculture, Wuhan 430070, China; 4. National Demonstration Center for Experimental Aquaculture Education, Wuhan 430070, China)

Abstract: To investigate the effects of *Bacillus subtilis* on the hepatic lipid metabolism and antioxidant function, the grass carp were randomly divided into 4 groups: control group (Con), *Aeromonas hydrophila* group (Ah), *Aeromonas hydrophila*+*Bacillus subtilis* (Ah+B_s) group and *Bacillus subtilis*+*Aeromonas hydrophila* group (B_s+Ah), and the three experimental groups were intraperitoneally injected with 1×10^5 CFU/fish *A. hydrophila*, and *B. subtilis* diet contained 1×10^7 CFU/g for a trial of 56 days. The results showed that two groups fed with *B. subtilis* had higher weight gain rate and special growth rate compared with the Ah group ($P < 0.05$). *B. subtilis* significantly decreased liver lipid droplet size and the hepatic lipid content at day 28 ($P < 0.05$), increased the content of serum cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol and reduced activities of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *B. subtilis* downregulated the expression of acetyl-CoA carboxylase α and upregulated the expression of lipoprotein lipase and adipose triglyceride lipase on day 28. *B. subtilis* enhanced superoxide dismutase, catalase, glutathione and total antioxidant capacity, and diminished malondialdehyde and hydrogen peroxide. In conclusion, probiotic *B. subtilis* supplementation can promote growth, enhance the antioxidant function, reduce the liver damage caused by infection of *A. hydrophila*, regulate the hepatic lipid metabolism, and reduce the hepatic lipid accumulation in grass carp.

Key words: Grass carp; *Aeromonas hydrophila*; *Bacillus subtilis*; Lipid metabolism; Antioxidant function