

饲料中 HUFA 影响草鱼脂质代谢的研究

吉红^{1,2} 曹艳姿¹ 刘品¹ 苏尚顺¹ 林亚秋³
曹福余¹ 奥宏海⁴ 周继术^{1,2} 叶元土⁵

(1. 西北农林科技大学动物科技学院水产科学系, 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学水产科学研究所, 杨凌 712100;
3. 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041; 4. 日本水产养殖研究所, 南势 516-0193;
5. 苏州大学, 基础医学与生物科学学院, 苏州 215123)

摘要: 选用初始体重为 (50.14 ± 3.33) g 的草鱼 80 尾, 饲养于四个循环水养殖缸 4w, 饲养期水温 18—22℃。分别饲喂以三油酸甘油酯制品 (对照组)、三油酸甘油酯制品和精制鱼油混合油 (HUFA 组) 为脂肪源的两种试验饲料。饲养结束后对试验鱼不同组织脂肪酸组成、生物学性状、体组成、血清生化指标、脂质代谢酶活性、脂蛋白脂酶 (LPL) 基因表达及肝胰脏抗氧化指标进行测定。脂肪酸分析表明, 饲料中 HUFA 显著影响鱼体组成: HUFA 组草鱼腹腔脂肪组织中 C22:6n-3 ($P < 0.01$)、HUFA ($P < 0.05$) 含量显著升高; 肌肉组织中 n-3 ($P < 0.01$)、HUFA ($P < 0.05$) 含量显著升高, 而 C20:4n-6 含量显著降低 ($P < 0.05$); 肝胰脏和脑组织中 HUFA 含量没有显著差异 ($P > 0.05$), 除脑组织外, 肝胰脏、肌肉、腹腔脂肪组织中 n-3/n-6 均显著升高 ($P < 0.05$)。与对照组相比, HUFA 组腹腔脂肪指数、肝胰脏脂质含量显著降低, 肝胰脏 T-AOC 活性显著升高 ($P < 0.05$), 肝胰脏 LPL 活性及基因表达丰度均显著降低 ($P < 0.05$)。研究指出, 饲料中 HUFA 显著影响了草鱼组织脂肪酸组成, 且这种影响具有组织特异性。饲料 HUFA 具有抑制草鱼脂质合成及向肝组织的脂质转运、降低肝胰脏脂质及腹腔脂肪的沉积、提高草鱼抗氧化能力的作用。

关键词: 草鱼; HUFA; 脂质代谢; 基因表达; 抗氧化

中图分类号: S963.73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)05-0881-09

高不饱和脂肪酸 (Highly unsaturated fatty acid, HUFA) 能够维持鱼类细胞膜结构和机能的完整性、保持某些酶活性、构成前列腺素前体及增强免疫系统功能^[1-5]。n-3HUFA, 如二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA) 和二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA), 为海水鱼生长发育的必需脂肪酸。一般认为, 海水鱼类转化较短链及较低不饱和程度脂肪酸为 n-3HUFA 的能力有限, 不足以满足其生长发育的需要, 所以饲料中必须对其予以补充。迄今为止, 研究者以生长为主要指标, 已经确立了真鲷^[6]、鲈^[7]、鲆^[8]、金头鲷^[9]等对 n-3HUFA 或 EPA、DHA 的需要。近年来的研究则更注重探讨 n-3HUFA 对养殖鱼类生理活性的影响^[1, 2, 10-12]。如 Ji, *et al.* 和 Om, *et al.* 发现饲料 DHA 可抑制黑鲷脂质合成并促进其脂质分解^[1, 2]。

由于 HUFA 并非淡水鱼的必需脂肪酸, HUFA 影响淡水鱼生理功能的研究较少。草鱼是我国主要养殖对象之一, 有学者研究了不同脂肪酸及脂肪源饲料对草鱼生长、脂肪酸组成及体成分的影响, 发现 HUFA 或鱼油具有促进生长及降低体脂含量的作用^[13-16]。但其影响体脂沉积的作用是由于 HUFA 抑制了体脂合成还是转运, 或者是促进了脂质分解尚不清楚, 相关机理的研究需要深入开展。本研究室持续进行 HUFA 改善淡水鱼生理活性的研究, 已初步探讨了富含 HUFA 的鱼油对鲤生长及脂代谢的影响及其机理^[17]。

本试验以草鱼为对象, 进一步探讨 HUFA 对草鱼脂肪酸组成、体成分、血清生化指标、脂质代谢酶活性、脂蛋白脂酶 (Lipoprotein lipase, LPL) 基因表达及抗氧化能力的影响, 旨在为研究 HUFA 对淡水鱼的

收稿日期: 2009-01-05; 修订日期: 2009-05-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771667); 西北农林科技大学青年学术骨干支持计划项目资助

通讯作者: 吉红 (1967—), 男, 汉族, 河南灵宝人; 副教授, 博士; 主要从事水生经济动物营养与饲料学研究。E-mail: jihong@nwsuaf.edu.cn

生理功能及脂质代谢的生理调控提供基本资料。

1 材料与方法

1.1 试验饲料 根据暖水性鱼类半精制典型试验配方^[18],制作等氮等能的两组饲料。对照组饲料的脂肪源是三油酸甘油酯, HUFA 组饲料的脂肪源是三油酸甘油酯和精制鱼油的混合油。三油酸甘油酯

购自中国医药上海化学试剂公司 (纯度 ≥ 98.3%),精制鱼油购自无锡迅达化学品厂 (EPA ≥ 5%, DHA ≥ 75%),氨基酸混合物、混合无机盐及混合维生素均参照文献 [1, 19]。各原料均粉碎过 60 目筛,将原料按比例混匀后压制成直径为 2 mm 长 3 mm 颗粒,于冰箱冷藏保存,随用随取。试验饲料配方及营养成分组成 (表 1)。

表 1 半纯化试验饲料配方及营养成分组成
Tab. 1 Ingredient and proximate composition of the semi-purified experimental diet

配方 Formulation (%)	饲料 Diets	
	对照组 Control group	HUFA 组 HUFA group
酪蛋白 Casein	32	32
明胶 Gelatin	8	8
糊精 Dextrin	28	28
纤维素 Cellulose	15	15
三油酸甘油酯 Triolein	6	5.4
精制鱼油 refined fish oil	0	0.6
羟甲基纤维素 Carboxymethylcellulose	2	2
混合无机盐 Mineral mix	4	4
混合维生素 Vitamin mix	1	1
氨基酸混合物 Amino acid mixture	4	4
概略组分 Proximate composition (%)		
水分 Moisture	11.60	10.56
粗蛋白 Crude Protein	36.38	35.83
粗脂肪 Crude lipid	5.95	5.69
粗灰分 Crude ash	5.60	5.63

1.2 试验鱼及饲养试验 试验草鱼购自宝鸡市陈仓区鱼场。挑选健康且个体相近的草鱼,放入容积为 160 L 的循环水系统中驯养,每日投喂商品饲料 (由陕西省饲料厂提供) 3 次 (8: 30、12: 30、16: 30),投饵量以饱食为度,持续摄食约 1h,随后清除残饵和粪便。水源为经曝气的自来水,试验期间水温 (20 ± 2) ,水流速度为 20—30 L/h,DO > 5 mg/L。

驯养 4w 后,依体重相近原则挑选试验鱼 80 尾 (体重 (50.14 ± 3.33) g,体长 (13.76 ± 2.01) cm),随机分为两个处理组,两个平行,置于循环水养殖系统饲养。正式试验饲养管理与驯化期间基本相同,每天记录水温及试验鱼摄食等情况。饲养期为 4w。

1.3 采样及分析 试验结束后,对所有试验鱼称量体重,分离空壳、肝胰脏、脾脏、肠、腹腔脂肪、单侧肌肉分别称重并测量体长及肠长;每缸随机取

10 尾鱼解剖,分离制备肝胰脏、腹腔脂肪、脑、肌肉样品于 - 80 保存,用于抗氧化指标、酶活、基因表达、脂肪酸组成的测定;另随机取 5 尾鱼采血后分离肌肉和肝胰脏样品,于 - 20 保存,用于体成分的测定。

1.3.1 脂肪酸的测定 每个处理组随机取 6 尾鱼 (每缸 3 尾) 的肝胰脏样品,两两合并为 3 个测定样。饲料 (表 2) 及鱼体各组织的脂肪酸组成采用岛津 GC-9A 气相色谱仪测定。气相色谱条件:色谱柱为 J&W GC Column Performance Summary (30 m × 0.250 mm × 0.25 μm);氢火焰离子检测器 (FD);FD 270 ,柱温采用程序升温:80 (3 min) 至 240 (5 / min);载气为高纯氮气,分流比为 60 1,进样量为 10 μL。

表 2 饲料脂肪酸组成

Tab. 2 Fatty acids composition of experimental diet

脂肪酸 Fatty acid	饲料 Dietary	
	对照组 Control group	HUFA 组 HUFA group
C14 0	1.70	1.48
C16 0	10.54	10.17
C16 1	1.61	2.00
C18 0	2.47	2.51
C18 1n9c	52.77	50.02
C18 2n6c	21.69	20.49
a-C18 3n3c	0.44	0.38
C20 0	0.82	0.72
C20 1	1.23	1.08
C21 0	0.60	1.21
C20 5n3	—	1.15
C22 6n3	—	3.81
n-3	0.45	5.34
n-6	21.69	20.49
n-3/n-6	0.07	0.26

1.3.2 生物学性状测定 试验结束后,对所有试验鱼称量体重,分离空壳、肝胰脏、脾脏、肠、腹腔脂肪、单侧肌肉分别称重并测量体长及肠长。

主要生物学性状的测定指标如下:

肝体比 = 肝胰脏重 / 体重 × 100%

腹脂指数 = 腹腔脂肪重 / 体重 × 100%

脾体比 = 脾脏重 / 体重 × 100%

肠长比 = 肠长 / 体长 × 100%

肠体指数 = 肠重 / 体重 × 100%

空壳比率 = 空壳重 / 体重 × 100%

含肉率 = 肌肉重 / 体重 × 100%

1.3.3 肌肉及肝胰脏成份测定 饲养试验结束后,每个处理组随机取 10 尾鱼 (每缸 5 尾),采血后分离肌肉和肝胰脏样品,于 -20℃ 保存,用于体成分的测定。测定时两两合并成 5 个样品进行测定。先用烘干失重法测定肌肉和肝胰脏的水分含量,再用索氏抽提法测定肌肉粗脂肪含量;肌肉粗蛋白测定用半微量凯氏定氮法,肝胰脏脂质含量用甲醇-氯仿混合液 (2:1, v/v) 提取,香草醛比色法进行测定。

1.3.4 血清样品制备和指标测定 饲养试验结束后,每个处理组随机取 10 尾鱼 (每缸 5 尾),尾静脉取血,3000 r/min 离心 10 min,制备血清,两两合并成 5 个样品进行测定。血清生化指标测定采用岛津 LAB600 全自动血清生化分析仪测定,指标包括谷

丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、球蛋白 (GLO)、尿素氮 (BUN)、总胆固醇 (Chol)、甘油三脂 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL-c)、血糖 (GLU)。

1.3.5 肝胰脏脂质代谢酶活性及抗氧化指标测定

每个处理组随机取 8 尾鱼 (每缸 4 尾) 的肝胰脏样品,两两合并为 4 个测定样。采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定脂蛋白脂酶 (LPL)、苹果酸脱氢酶 (MDH) 活性,而葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G-6-PDH) 活性的测定据 G. E. Glock and P. Mclean^[20] 的方法。肝胰脏抗氧化指标采用南京建成试剂盒测定,测定指标包括总抗氧化活性 (T-AOC) 和丙二醛 (MDA) 含量。

1.3.6 总 RNA 提取与 cDNA 第一链的合成 总 RNA 提取与纯化参照 TR Pure Reagent 公司的 Biotek Corporation 试剂盒进行操作。cDNA 第一链的合成 (即逆转录 RT) 按照 Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit#K1621 试剂盒 (Fermentas 公司),以 oligo (dT) 18 为反转录引物,按照说明进行操作。

1.3.7 LPL mRNA 水平的测定 每个处理组随机取 6 尾鱼 (每缸 3 尾) 的肝胰脏样品,两两合并为 3 个测定样。用 RT-PCR 方法检测 LPL 在两种饲料脂肪源处理条件下肝胰脏组织中 mRNA 表达水平,以 β -肌动蛋白 (β -actin) 为内参。应用 Primer Premier 5.0 软件,按照引物设计的基本要求,根据草鱼 β -actin (DQ211096) 基因设计引物: Sense: 5' → 3' CA-GAGCTCTCTCCTTGATGTC, Antisense: 5' → 3' GATATGGAGAAGATCTGGCA,产物长度为 409 bp; 根据本研究室克隆获取的草鱼 LPL 部分序列设计一对特异引物: Sense: 5' CGCAACAACATTACCCAA-3', Antisense: 5' AATCCCAATAGCGATCTGG-3',产物长度为 360 bp。PCR 反应体系为: 灭菌的二蒸水 18.6 μ L、10 mmol/L dNTP Mix 0.5 μ L、PCR buffer (NH)₄ SO₄ 2.5 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L、cDNA 1.25 μ L、20 mmol/L Primer 0.25 μ L、20 mmol/L Primer 0.25 μ L、5 U/ μ L Taq DNA Polymerase 0.15 μ L。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 4 min, 95℃ 45 s, 56℃ 45 s/53.5℃ 45 s (β -actin), 72℃ 60 s, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min, 指数增长期内终止反应。

1.4 数据处理 所得数据用平均值 ± 标准差 (M ± SD) 表示,采用 t 检验进行显著性检验, P < 0.05 为差异显著, P < 0.01 为差异极显著。

2 结 果

2.1 HUFA对草鱼不同组织脂肪酸组成的影响

由表 3 可见,饲料中 HUFA 影响了试验鱼的脂肪酸组成。与摄食对照组饲料的草鱼相比, HUFA 组草鱼的肝胰脏组织中 C20: 1 含量显著降低 ($P = 0.037$),脂肪组织中 C22: 6n-3 ($P = 0.009$)、HUFA

($P = 0.017$)含量均显著升高,肌肉组织中 C20: 4n-6 含量显著降低 ($P = 0.049$),而 n-3 ($P = 0.006$)、HUFA ($P = 0.044$)含量均显著性升高,除脑组织 ($P = 0.149$)外,肌肉 ($P = 0.012$)、肝胰脏 ($P = 0.032$)、腹腔脂肪组织 ($P = 0.0004$)中 n-3/n-6 均显著升高。

表 3 HUFA 对草鱼脂肪酸组成的影响

Tab. 3 Effect of dietary HUFA on fatty acid composition of Grass carp (%)

脂肪酸 Fatty acid	肌肉 Muscle		肝胰脏 Hepatopancreas		腹腔脂肪组织 IPF		脑 Brain	
	对照组	HUFA 组	对照组	HUFA 组	对照组	HUFA 组	对照组	HUFA 组
	Control group	HUFA group	Control group	HUFA group	Control group	HUFA group	Control group	HUFA group
C14: 0	2.43 $\pm$ 0.51	3.06 $\pm$ 0.21	3.52 $\pm$ 1.64	2.62 $\pm$ 0.66	4.37 $\pm$ 0.42	3.49 $\pm$ 0.08	0.85 $\pm$ 0.20	4.22 $\pm$ 0.82
C15: 0	—	—	—	—	0.31 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.02	—	—
C15: 1	—	—	—	—	—	—	1.26 $\pm$ 0.00	1.19 $\pm$ 0.18
C16: 0	17.92 $\pm$ 3.78	20.00 $\pm$ 1.23	26.71 $\pm$ 2.67	21.31 $\pm$ 3.08	17.69 $\pm$ 1.23	17.77 $\pm$ 0.39	20.65 $\pm$ 1.17	19.60 $\pm$ 0.34
C16: 1	4.13 $\pm$ 0.93	4.48 $\pm$ 0.35	5.55 $\pm$ 1.75	5.85 $\pm$ 1.54	5.13 $\pm$ 0.78	4.46 $\pm$ 0.75	3.87 $\pm$ 0.21	3.85 $\pm$ 0.31
C17: 0	—	—	—	—	0.30 $\pm$ 0.04	0.54 $\pm$ 0.40	—	—
C17: 1	—	—	—	0.39 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.06	0.44 $\pm$ 0.01	1.24 $\pm$ 0.10	1.22 $\pm$ 0.40
C18: 0	5.31 $\pm$ 0.69	5.31 $\pm$ 0.25	6.03 $\pm$ 0.42	7.09 $\pm$ 0.13	4.66 $\pm$ 0.74	4.49 $\pm$ 0.45	13.87 $\pm$ 0.56	14.69 $\pm$ 0.22
C18: 1n9c	28.89 $\pm$ 6.21	34.46 $\pm$ 0.48	34.08 $\pm$ 3.92	37.86 $\pm$ 1.71	38.00 $\pm$ 0.77	40.53 $\pm$ 2.54	23.36 $\pm$ 0.61	22.72 $\pm$ 0.30
C18: 2n6c	14.64 $\pm$ 1.98	16.18 $\pm$ 1.46	4.06 $\pm$ 0.93	3.45 $\pm$ 0.86	19.57 $\pm$ 3.30	17.67 $\pm$ 1.38	2.70 $\pm$ 0.68	2.66 $\pm$ 0.54
rC18: 3n6c	—	—	—	—	0.22 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.00	—	—
aC18: 3n3c	1.37 $\pm$ 0.52	0.92 $\pm$ 0.32	—	—	0.96 $\pm$ 0.22	0.66 $\pm$ 0.28	—	—
C20: 0	3.51 $\pm$ 2.58	—	—	—	0.22 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.02	—	—
C20: 1	2.59 $\pm$ 0.69	0.88 $\pm$ 0.03	1.17 $\pm$ 0.08	0.93 $\pm$ 0.05 [*]	1.20 $\pm$ 0.07	1.06 $\pm$ 0.10	0.82 $\pm$ 0.06	0.89 $\pm$ 0.02
C21: 0	2.51 $\pm$ 1.26	1.52 $\pm$ 0.53	1.73 $\pm$ 0.17	1.62 $\pm$ 0.26	0.93 $\pm$ 0.03	0.85 $\pm$ 0.06	0.74 $\pm$ 0.27	0.93 $\pm$ 0.26
C20: 3n6	1.37 $\pm$ 0.71	0.68 $\pm$ 0.06	0.53 $\pm$ 0.22	0.45 $\pm$ 0.11	0.65 $\pm$ 0.07	0.59 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.01	—
C20: 4n6	3.26 $\pm$ 0.37	2.18 $\pm$ 0.40 [*]	3.81 $\pm$ 1.24	3.04 $\pm$ 0.94	0.71 $\pm$ 0.05	0.70 $\pm$ 0.11	5.30 $\pm$ 0.26	5.09 $\pm$ 0.25
C20: 5n3	—	0.45 $\pm$ 0.13	—	0.68 $\pm$ 0.10	—	—	—	1.70 $\pm$ 0.32
C22: 6n3	2.91 $\pm$ 0.06	3.00 $\pm$ 0.52	2.11 $\pm$ 1.05	4.01 $\pm$ 1.66	0.41 $\pm$ 0.03	1.25 $\pm$ 0.13 ^{**}	12.06 $\pm$ 0.63	12.56 $\pm$ 0.56
SFA	30.50 $\pm$ 1.05	29.88 $\pm$ 0.40	38.00 $\pm$ 4.22	32.64 $\pm$ 3.54	28.49 $\pm$ 1.08	27.64 $\pm$ 0.06	36.11 $\pm$ 1.90	37.44 $\pm$ 0.75
MUFA	35.61 $\pm$ 6.92	39.53 $\pm$ 1.00	40.79 $\pm$ 3.16	45.03 $\pm$ 2.40	44.83 $\pm$ 1.39	46.49 $\pm$ 1.77	30.55 $\pm$ 0.80	29.87 $\pm$ 0.42
PUFA	20.64 $\pm$ 0.77	22.87 $\pm$ 1.28	10.33 $\pm$ 3.42	11.41 $\pm$ 2.67	22.51 $\pm$ 3.66	20.95 $\pm$ 1.50	20.40 $\pm$ 0.11	21.45 $\pm$ 0.83
HUFA	3.26 $\pm$ 0.37	5.63 $\pm$ 0.86 [*]	5.92 $\pm$ 2.27	7.51 $\pm$ 2.27	1.11 $\pm$ 0.08	1.95 $\pm$ 0.20 [*]	17.37 $\pm$ 0.89	18.79 $\pm$ 0.75
n-3	1.37 $\pm$ 0.52	4.06 $\pm$ 0.32 ^{**}	2.11 $\pm$ 1.05	4.47 $\pm$ 1.34	1.37 $\pm$ 0.25	1.91 $\pm$ 0.18	12.06 $\pm$ 0.63	13.70 $\pm$ 0.76
n-6	19.26 $\pm$ 1.11	18.81 $\pm$ 1.55	8.22 $\pm$ 2.38	6.94 $\pm$ 1.52	21.14 $\pm$ 3.41	19.03 $\pm$ 1.33	8.33 $\pm$ 0.64	7.75 $\pm$ 0.29
n-3/n-6	0.07 $\pm$ 0.03	0.22 $\pm$ 0.04 [*]	0.24 $\pm$ 0.05	0.65 $\pm$ 0.12 [*]	0.07 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00 ^{**}	1.46 $\pm$ 0.20	1.77 $\pm$ 0.11

注:同行数据右上角 * 表示差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$); $n = 3$

Note: Means in same row with * sign to indicate significantly ($P < 0.05$); and with ** sign are very significantly different ($P < 0.01$); $n = 3$

2.2 HUFA对草鱼生物学性状及体成分的影响

由表 4可见:与对照组相比 HUFA 组草鱼肝体比极显著增加 ($P = 0.007$),腹腔脂肪指数显著降低 ($P = 0.033$);肌肉的粗脂肪含量较高,但无显著性差异 ($P = 0.114$),肝胰脏脂质 ($P = 0.002$)及水分 ($P = 0.016$)含量均显著降低;而脾体比、肠长

比、肠体指数、空壳重、含肉率等组间没有显著差异。

2.3 HUFA对草鱼血清生化指标的影响

由表 5可看出 HUFA 组 ALT、ALP较对照组呈上升趋势,而 HDL-c、AST呈下降趋势,但差异均不显著。其他指标组间也无显著差异。

表 4 HUFA对草鱼生物学性状及体成分的影响 (%)

Tab. 4 Effect of dietary HUFA on biological parameters and body composition in Grass carp (%)

项目 Item	n	对照组 Control group	HUFA 组 HUFA group
肝体比 Hepatosomatic index	40	1.63 ±0.44	1.96 ±0.56 *
腹脂指数 Intraperitoneal fat index	40	0.34 ±0.20	0.24 ±0.15 *
脾体比 Spleen index	40	0.19 ±0.05	0.19 ±0.04
肠长比 Relative intestine length	40	164.56 ±35.51	167.55 ±27.49
肠体指数 Relative intestine weight	40	2.83 ±1.12	3.02 ±0.98
空壳比率 Gutted body ratio (%)	40	90.56 ±2.29	90.96 ±2.13
含肉率 Muscle ratio (%)	40	45.01 ±5.53	45.68 ±4.88
肌肉水分 Muscle Moisture (%)	5	80.70 ±1.08	80.47 ±0.95
肌肉粗蛋白 Muscle crude protein (%)	5	18.46 ±0.68	18.56 ±0.35
肌肉粗脂肪 Muscle crude lipid (%)	5	3.99 ±1.42	5.57 ±2.02
肌肉灰分 Muscle crude ash (%)	5	1.22 ±0.32	1.10 ±0.21
肝胰脏水分 Hepatosomatic Moisture (%)	5	74.91 ±0.56	73.36 ±0.71 *
肝胰脏脂质 Hepatosomatic lipid (%)	5	10.85 ±1.63	7.23 ±1.09 *

注:同行数据右上角 * 表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Means in same row with * sign to indicate significantly ($P < 0.05$)

表 5 HUFA对草鱼血清生化指标的影响

Tab. 5 Effect of dietary HUFA on serum biochemical indicators in Grass carp (mg/dL)

Item	ALT	AST	ALP	TP	ALB	GLO	A/G	BUN	Cho1	TG	HDL-c	GLU
对照组 Control group	25.88	85.40	65.40	30.91	8.86	22.05	0.40	0.79	4.77	2.35	2.81	4.04
	±8.63	±52.04	±24.00	±4.33	±1.45	±1.95	±0.03	±0.29	±0.85	±0.58	±0.42	±1.26
HUFA 组 HUFA group	29.32	69.8	125.89	28.17	8.49	22.80	0.38	0.82	4.92	2.79	2.26	4.69
	±11.86	±20.95	±78.34	±10.37	±1.40	±2.20	±0.04	±0.33	±1.58	±1.08	±0.82	±1.74

注: $n = 5$

2.4 HUFA对草鱼肝胰脏脂质代谢酶活性及 LPL 基因表达的影响

由表 6可以看出,肝胰脏 LPL 活性 HUFA 组显著低于对照组 ($P = 0.032$); G-6-PDH 及 MDH 活性 HUFA 组均低于对照组,但无显著差异。采用 RT-PCR 方法,对草鱼肝胰脏组织中的 LPL 表达情况进行检

测,以 β -actin 基因为内参,所有样品的扩增条带经 Dophin DOC 数据转换系统转换后,每个样品扩增条带中 LPL 的转换 OD 值与 β -actin 的值相比,即得 LPL 基因的相对表达丰度,显著性检验结果(图 1)。由图 1 可知,HUFA 组草鱼肝胰脏 LPL 基因表达丰度显著低于对照组 ($P = 0.026$),其趋势与 LPL 酶活状况一致。

表 6 HUFA对草鱼肝胰脏脂质代谢酶活力的影响

Tab. 6 Effects of dietary HUFA on the activities of lipid metabolism related enzymes in hepatopancreas of grass carp (U/mg蛋白)

项目 Item	LPL	MDH	G-6-PDH
对照组 Control group	1.03 ±0.05	6.08 ±1.16	39.73 ±35.45
HUFA组 HUFA group	0.50 ±0.22*	5.26 ±1.15	29.33 ±27.72

注:同列数据右上角 * 表示差异显著 ($P < 0.05$); $n = 4$
Note: Means in same array with * sign to indicate significantly ($P < 0.05$); $n = 4$

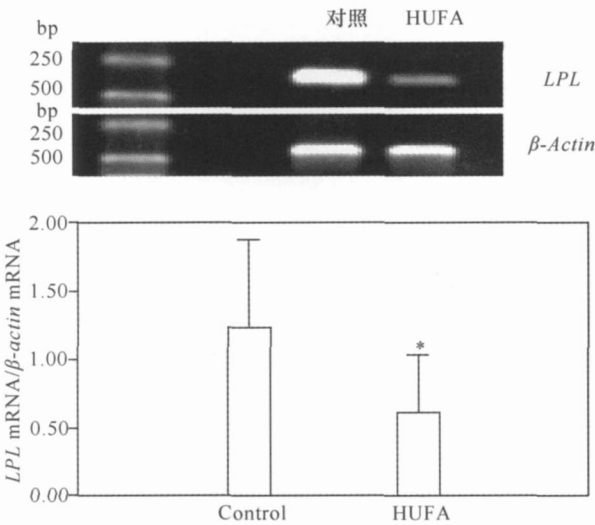


图 1 HUFA对草鱼肝胰脏 LPL 基因表达的影响

Fig.1 Effects of HUFA on LPL gene expression in hepatopancreas of grass carp

* 表示差异显著 ($P < 0.05$); $n = 3$ * sign to indicate significantly ($P < 0.05$); $n = 3$

2.5 HUFA对草鱼肝胰脏抗氧化指标的影响

由图 2 可见: HUFA 组 MDA 较对照组低,但无显著性差异 ($P = 0.564$);而 T-AOC 则显著高于对照组 ($P = 0.028$).表明饲料 HUFA 提高了草鱼肝胰脏的抗氧化能力。

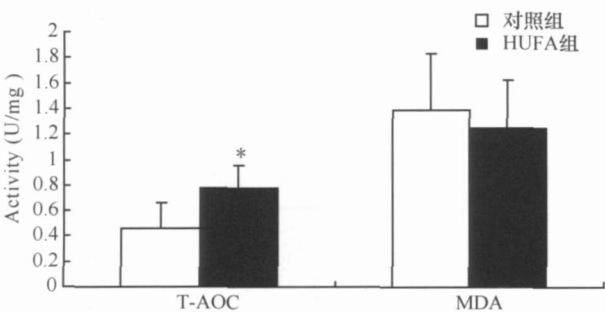


图 2 HUFA对草鱼肝胰脏抗氧化指标的影响

Fig.2 Effect of dietary HUFA on antioxidant indicators in hepatopancreas of grass carp (U/mg)

* 表示差异显著 ($P < 0.05$); $n = 4$ * sign to indicate significantly ($P < 0.05$); $n = 4$

3 讨论

3.1 饲料 HUFA对鱼体脂肪酸组成的影响

本试验中 HUFA 组各组织 n-3、DHA 含量均较对照组呈上升趋势;除脑组织外,其他三种组织 n-3/n-6均显著升高 ($P < 0.05$),说明鱼体组织器官脂肪酸组成与饲料脂肪酸组成有一定的相关性。刘兴旺等^[21]报道,军曹鱼鱼体各器官中 n-3HUFA 的水平随饲料中 n-3HUFA 水平的增加而逐渐提高,且随着 DHA 添加量的增加,肌肉和肝脏中 18:1n-9的含量逐渐降低,本实验中发现 HUFA 组肝脏中 C20:1 含量较对照组显著降低 ($P < 0.05$),其机制可能与之相同。

淡水鱼具有转化脂肪酸的能力。本实验发现,除脂肪组织,其他各组织的 DHA 水平组间均无显著差异,说明草鱼表现出了对饲料脂肪酸的转化能力。同时,从组织 HUFA 含量看, HUFA 组草鱼脂肪组织及肌肉组织中 HUFA ($P < 0.05$)含量均显著性升高,肝胰脏和脑组织中 HUFA 水平与对照组没有显著差异 ($P > 0.05$),除脑组织外,其他三种组织中 n-3/n-6均显著升高,表明草鱼的脂肪酸转化能力有组织特异性,重要的器官脂肪酸组成保持稳定,如脑、肝胰脏等受饲料脂肪酸影响较小,而肌肉、脂肪组织则受饲料影响比较大。这与 Pratoomyot, et al.^[22]报道菜油部分替代鱼油对大西洋鲑肝脏的 HUFA 含量影响较小,但对肌肉组织 HUFA 含量影响较大的结果相一致。

3.2 饲料 HUFA对鱼体脂质蓄积的影响及其可能机制

在蛋白质、脂肪和糖类等主要营养素配比基本不变的情况下,饲料中 n-3HUFA 的含量显著影响金头鲷肝脂含量和肝体比^[23],摄食低 n-3HUFA 的饲料,金头鲷肝脂含量增加;而摄食高 n-3HUFA 的饲料,其肝脂含量降低,表明 n-3 HUFA 具有抑制肝脏脂肪积累的作用。本试验中,尽管血清中脂质含量未受饲料 HUFA 的影响,但 HUFA 组肝脂含量与腹腔脂肪指数显著降低。曹俊明等^[13,14]的研究表

明摄食 n-3HUFA 饲料的草鱼肝胰脏脂质含量显著降低,而内脏脂质含量显著升高。周继术等^[18]发现鱼油可抑制鲤的脂质合成及脂质进入肝胰脏,从而使肝胰脏脂质含量降低。Om, *et al.*^[2,3]则指出饲料中 EPA 和 DHA 可降低黑鲟腹腔脂肪细胞脂质蓄积和细胞直径大小,以及肌肉、肝胰脏中脂质含量。有报道指出摄食富含 DHA 卤虫的塞内加尔舌鲷仔鱼也表现出较低的总脂肪积累^[24]。

鱼类组织脂质的积累与脂质合成及外源性脂质进入关系密切。本研究对脂质合成代谢及转运过程中若干关键酶的活性进行了检测。脂肪合成代谢酶主要包括能生成 NADPH 的酶,如苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)、异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-PDH)等。本试验中 HUFA 组草鱼肝胰脏 MDH、G-6-PDH 均较对照组有下降趋势,这与周继术等^[17]研究鱼油对鲤脂质代谢的影响结果相一致。显示 HUFA 组饲料抑制了草鱼肝胰脏脂质合成,这与 EPA、DHA 比亚油酸更能有效抑制大鼠肝脏中脂肪酸合成酶活性^[25]以及 DHA 抑制了黑鲟肝胰脏及腹脂组织中 G-6-PDH 活性的研究结果^[1-3]相近。另一方面, LPL 催化水解血浆脂蛋白中来源于食物的甘油三酯,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,因而在机体脂质代谢调控上起关键作用。梁旭方等^[26]发现,饲料脂肪酸对真鲷肝脏 LPL 基因表达的促进作用,随脂肪酸不饱和度的增加而增加。而本次试验结果显示, HUFA 组肝胰脏 LPL 活性及表达丰度均显著低于对照组,表明饲料 HUFA 抑制了淡水鱼草鱼肝胰脏 LPL 的活性及其基因表达,说明 HUFA 在抑制了肝胰脏脂质合成的同时也抑制外源性脂质进入肝胰脏,以保证肝胰脏脂质水平的恒定。这为 HUFA 在草鱼脂肪肝防治中的作用提供了一定的理论基础。而 HUFA 对真鲷与草鱼肝脏 LPL 基因表达诱导作用不一致可能是由于海水鱼与淡水鱼对 HUFA 需求量的差异造成的。

3.3 饲料 HUFA 对鱼体抗氧化能力的影响

由于 HUFA 的不饱和键易遭受自由基攻击,因此本研究也探讨了 HUFA 对草鱼抗氧化能力的影响。T-AOC 是机体内抗氧化能力的总体体现,是酶促和非酶促两方面因子抗氧化能力的总合。本研究中, HUFA 组肝胰脏 T-AOC 水平显著升高,这与吉红等^[27]发现 DHA 灌喂后 32h 鲤肝胰脏 T-AOC 水

平显著升高的结果类似。Frenoux J R, *et al.*^[28]也指出在日粮中添加 HUFA 能显著降低患自发性高血压症大鼠的血压、提高总抗氧化能力、抑制脂质过氧化反应。而 Song J H, *et al.*^[29]认为日粮中添加高含量的 DHA 可能会通过提高膜脂质过氧化的敏感性和破坏抗氧化系统,从而对血浆及肝脏组织等产生不良影响。以上研究结果表明 HUFA 对组织抗氧化能力影响的研究结果尚存在诸多矛盾,且 HUFA 对组织抗氧化能力的影响极有可能存在物种特异性及剂量依赖性。其机制有可能与 HUFA 作为一种氧化因子造成机体抗氧化系统应激性反应有关^[30,31],也可能是 HUFA 特有的生理作用直接提高了机体抗氧化系统组成因子的活力^[32,33]。相关研究尚需深入进行。

参考文献:

- [1] Ji H, Om A D, Yoshimatsu T, *et al.* Effect of dietary docosahexaenoic acid on lipogenesis and lipolysis in black sea bream *Acanthopagrus schlegelii* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, 26 (1): 112—121
- [2] Om A D, Umino T, Nakagawa H, *et al.* The effects of dietary EPA and DHA fortification on lipolysis activity and physiological function in juvenile black sea bream *Acanthopagrus schlegelii* (Bleeker) [J]. *Aquaculture Res*, 2001, 32 (sup.): 255—262
- [3] Om A D, Ji H, Unino T, *et al.* Dietary effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on lipid metabolism in black sea bream [J]. *Fisheries Sci*, 2003, 69: 1182—1193
- [4] Izquierdo M S. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae [J]. *Aquacult Nutr*, 1996, 2: 183—191
- [5] Izquierdo M S. Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species [J]. *Cah Options Mediterr*, 2005, 63: 91—102
- [6] Takeuchi T, Shiina Y, Watanabe T. Suitable levels of n-3 highly unsaturated fatty acids in diet for fingerlings of red sea bream [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1992, 58 (3): 509—514
- [7] Van B E, Amat F, Hontoria F, *et al.* Preliminary results on the nutritional evaluation of omega 3-HUFA enriched *Artemia* nauplii for larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* [J]. *Aquaculture*, 1989, 49: 223—229
- [8] Kim K D, Lee S M. Requirement of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids for juvenile flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Aquaculture*, 2004, 229: 315—323
- [9] Ibeas C, Izquierdo M S, Lorenzo A. Effect of different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids on growth and fatty acid composition of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. *Aquaculture*, 1994, 127: 177—188
- [10] Yang Y J, Bing X W, Xu Z H. Effects of unsaturated fatty acids on the growth and immunity indices of *Monopterus albus* [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2008, 35 (2): 224—228 [杨彦劫, 邴旭文, 徐增洪. 不饱和脂肪酸对黄鳝生长及

- 免疫指标的影响. 安徽农业大学学报, 2008, 35(2): 224—228]
- [11] Ishizaki Y, Uematsu K, Takeuchi T. Preliminary study of the effect of dietary docosahexaenoic acid on the volumetric grows of the brain in larval yellowtail [J]. *Fish Sci*, 2000, 66: 611—613
- [12] Montero D, Robaina L E, Socorro J, *et al* Alteration of liver and muscle fatty acid composition in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles held at high stocking density and fed an essential fatty acid deficient diet [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2001, 24: 63—72
- [13] Cao J M, Tian Li X, Chen Z, *et al* Effect of dietary fatty acids on growth and tissue chemical composition of grass carp [J]. *Journal of South China University of Technology* (Natural Science), 1996, 12(9): 149—154 [曹俊明, 田丽霞, 陈竹, 等. 饲料中不同脂肪酸对草鱼生长和组织营养成分组成的影响. 华南理工大学学报(自然科学版), 1996, 12(9): 149—154]
- [14] Cao J M, Liu Y J, Lao C L, *et al* Effect of different dietary fatty acids on tissue lipid content and fatty acids composition of grass carp [J]. *Acta Zoonutrientia Sinica*, 1997, 9(3): 36—44 [曹俊明, 刘永坚, 劳彩玲, 等. 饲料中不同脂肪酸对草鱼组织脂质含量和脂肪酸构成的影响. 动物营养学报, 1997, 9(3): 36—44]
- [15] Liu W, Xu P, Ren B G, *et al* Effect of dietary lipid content on growth of juvenile grass carp [J]. *Jiangxi Science*, 1995, 19(4): 362—365 [刘玮, 徐萍, 任本根, 等. 饲料中不同脂肪含量对草鱼稚鱼生长的影响. 水产学报, 1995, 19(4): 362—365]
- [16] Takeuchi T, Watanabe K, Yong W Y, *et al* Essential fatty acid of grass carp *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1991, 57(3): 467—473
- [17] Zhou J S, Ji H, Wang J H, *et al* Influence of fish oil on growth and lipid metabolism in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2008, 38(2): 275—280 [周继术, 吉红, 王建华, 等. 鱼油对鲤生长及脂质代谢的影响. 中国海洋大学学报, 2008, 38(2): 275—280]
- [18] Li A J. Nutrition and feeding of aquatic animal [M]. Agricultural Publishing House of China 2004, 97—98 [李爱杰主编. 水产动物营养与饲料. 中国农业出版社. 2004, 97—98]
- [19] Lovell T. Nutrition and Feeding of Fish [M]. New York: Van Nostrand Reinhold 1989
- [20] Gbck G E, Mclean P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver [J]. *Biochem. J.*, 1953, 55: 400—408
- [21] Liu X W, Tan B P, Mai K S, *et al* Effect of dietary n-3 HUFA on growth and fatty acids composition of juvenile cobia [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(2): 190—195 [刘兴旺, 谭北平, 麦康森, 等. 饲料中不同水平 n-3HUFA对军曹鱼生长及脂肪酸组成的影响. 水生生物学报, 2007, 31(2): 190—195]
- [22] Pratoomyot J, Bendiksen E Å, Bell J G, *et al* Comparison of effects of vegetable oils blended with southern hemisphere fish oil and decontaminated northern hemisphere fish oil on growth performance, composition and gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Aquaculture*, 2008, 280: 170—178
- [23] Wang J H, Xue M, Ding J Z, *et al* Researching progress of fish trophism fatty hepatitis [J]. *Feed Industry*, 2008, 29(4): 34—37 [王菊花, 薛敏, 丁健中, 等. 鱼类营养性脂肪肝的研究进展. 饲料工业, 2008, 29(4): 34—37]
- [24] Mireia V, Alicia E, Matthew P B, The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the Artemia feeding period [J]. *Aquaculture*, 2005, 249: 353—365
- [25] Clarke S D, Armstrong M K, Jump D B. Dietary polyunsaturated fat uniquely suppress rat liver fatty acid synthase and s14 mRNA content [J]. *J of Nutr*, 1990, 12: 225—231
- [26] Liang X F, Li Y Q, Li G S, *et al* Cis-acting element and in vivo regulation of lipoprotein lipase gene of red sea bream (*Pagrus major*) [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2004, 23(4): 49—55 [梁旭方, 李月琴, 李贵生, 等. 真鲷脂蛋白脂肪酶基因顺式元件 PPRE及在肝脏活体调控作用. 热带海洋学报, 2004, 23(4): 49—55]
- [27] Ji H, Zhou J S, Cao F Y, *et al* Effect of DHA on anti-oxidation capacity in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2009, 18(2): 142—149 [吉红, 周继术, 曹福余, 等. DHA对鲤抗氧化能力影响的初步研究. 上海海洋大学学报, 2009, 18(2): 142—149]
- [28] Frenoux J R, Prost E D, Belleville J L. A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improve antioxidant status in spontaneously hypertensive rats [J]. *The Journal of Nutrition*, 2001, 131: 39—45
- [29] Song J H, Fujimoto K, Miyazawa T. Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils [J]. *The Journal of Nutrition*, 2000, 130: 3028—3033
- [30] Li K, Zhou Z L, Wang M S, *et al* Effects of Benzo (a) pyrene on activities of hepatic antioxidant enzyme in *Carassius auratus* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2003, 10(1): 88—91 [李康, 周忠良, 王明山, 等. 苯并 (a) 芘对鲫鱼 (*Carassius auratus*) 肝脏抗氧化酶的影响. 应用与环境报, 2003, 10(1): 88—91]
- [31] L Ü J C, Zhao Y F, Wu Y C, *et al* Accumulation of copper in the tissues of *Chlamys farreri* and its effects on the activity of superoxide dismutase in the seawater [J]. *Transactions of the CSAE*, 2005, 21(5): 131—135 [吕景才, 赵元凤, 吴益春, 等. 海水中铜在扇贝组织的蓄积及其对酶活性的影响. 农业工程学报, 2005, 21(5): 131—135]
- [32] Frenoux J R, Prost E D, Belleville J L. A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improve antioxidant status in spontaneously hypertensive rats [J]. *The Journal of Nutrition*, 2001, 131: 39—45
- [33] Jump D B, Thelen A, Mater M. Dietary polyunsaturated fatty acid and hepatic gene expression [J]. *Lipid*, 1999, 34 (Suppl): S209—S212

EFFECT OF DIETARY HUFA ON THE LIPID METABOLISM IN GRASS CARP CTENOPHARYNGODON IDELLUS

JI Hong^{1,2}, CAO Yan-Zi¹, LIU Pin¹, SU Shang-Shun¹, LIN Ya-Qiu³, CAO Fu-Yu¹, Hiromi OKU⁴,
ZHOU Ji-Shu^{1,2} and YE Yuan-Tu⁵

(1. College of Animal and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China;

2. Fisheries Research Institute, Northwest A & F University, Yangling 712100, China;

3. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;

4. National Research Institute of Aquaculture, Minam i-se, Mie 516-0193, Japan;

5. Preclinical Medicine and Biological Science College, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: The study was conducted to examine the effect of dietary fatty acid composition on body composition and lipid metabolism of grass carp. Two semi-purified experimental diets were formulated containing either triolein (Control diet) or a fish oil concentrate rich in n-3 highly unsaturated fatty acid mixture (HUFA diet) as the main lipid source, and fed to duplicate groups (20 fish/tank) of grass carp (initial weight = 50 ± 3 g /fish) for 4 weeks at 18—22 °C. Fatty acid and proximate composition of different organs or body compartments, morphological characteristics, serum biochemical indicators, the activity of key enzymes of lipid metabolism, LPL mRNA expression, and hepatopancreas anti-oxidant systems were determined at the end of the 4-week feeding trial. Dietary HUFA were incorporated into the fish body effectively. Analysis of fatty acid indicated that a higher content of C22: 6n-3 ($P < 0.01$) and HUFA ($P < 0.05$) were found in intra-peritoneal fat (IPF), and a higher content of n-3 ($P < 0.01$) and HUFA ($P < 0.05$) but lower C20: 4n-6 content ($P < 0.05$) in muscle of HUFA group. There was no significant difference in fatty acid composition of both the hepatopancreas and brain of fish fed the two diets. The content of n-3/n-6 was significantly higher in the hepatopancreas, IPF, and muscle in fish fed the HUFA diet compared to the control diet. The content of IPF and hepatopancreas lipid ($P < 0.05$) was lower in the HUFA group. On the other hand, a significantly higher T-AOC activity, the lower LPL activity and LPL mRNA expression ($P < 0.05$) was observed in the hepatopancreas of fish fed the HUFA diet. It could be concluded that the fatty acid composition of the experimental fish was affected by fatty acid composition of the diet. However, the fatty acid composition of different body compartments of grass carp differed significantly. Dietary HUFA might inhibit the activity of lipogenesis enzymes or decrease lipid storage leading to lower hepatopancreas lipid content. Dietary HUFA also had the positive effect on the antioxidant defense systems in grass carp.

Key words: Grass carp; Highly unsaturated fatty acids; Lipid metabolism; Gene expression; Antioxidation