

doi: 10.7541/2015.12

## 灌喂氧化鱼油使草鱼肠道黏膜胆固醇胆汁酸合成基因通路表达上调

叶元土<sup>1</sup> 蔡春芳<sup>1</sup> 许凡<sup>1</sup> 董娇娇<sup>1</sup> 张宝彤<sup>2</sup> 萧培珍<sup>2</sup>

(1. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏省水产动物营养重点实验室, 苏州 215123;  
2. 北京营养源研究所水产动物系统营养研究开放实验室, 北京 100000)

**摘要:** 以草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)为试验对象, 灌喂氧化鱼油 7d 后, 采集肠道黏膜组织并提取总 RNA, 采用 RNA-seq 方法, 进行氧化鱼油组和正常鱼油组草鱼肠道黏膜基因差异表达水平、基因注释和 IPA 基因通路分析, 并测定了血清中胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白含量。研究结果显示, 草鱼肠道黏膜在受到氧化鱼油损伤后, 胆固醇和胆汁酸生物合成通路代谢酶、调节胆固醇和胆汁酸合成或转运的代谢酶或蛋白基因差异表达, 部分基因差异表达达到显著性上调水平。实验结果表明, 草鱼肠道黏膜具备完整的“乙酰辅酶 A→胆固醇→胆汁酸”的合成代谢基因通路。肠道黏膜在受到氧化鱼油损伤后, 以乙酰辅酶 A 为原料的胆固醇生物合成代谢通路基因表达增强, 胆固醇由细胞外转运到细胞内的逆转运途径基因通路表达下调, 胆固醇由细胞内向细胞外转运基因通路表达上调; 以胆固醇为原料的胆汁酸经典合成代谢途径基因通路表达上调, 而胆汁酸的补充合成途径基因表达下调。在灌喂氧化鱼油后, 血清胆固醇、低密度脂蛋白、甘油三酯含量分别增加了 28.84%、29.56%和 12.13%, 而高密度脂蛋白含量下降了 8.15%。

**关键词:** 草鱼; 肠道黏膜; RNA-seq; 胆固醇; 胆汁酸; 基因差异表达

中图分类号: S963.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2015)01-0090-11

油脂是饲料重要的组成部分, 但油脂中的不饱和脂肪酸容易氧化、酸败, 氧化、酸败产物如过氧化物、丙二醛等对鱼类具有毒副作用<sup>[1-3]</sup>。肠道是鱼类消化吸收的主要器官, 饲料中氧化油脂首先对肠道造成损伤作用, 并对其他器官造成一定的影响。高通量 RNA 测序(RNA-seq)技术的发展为在转录组水平上、更宏观的层面研究特定代谢途径基因通路、以及不同代谢通路之间的关系奠定了基础<sup>[4, 5]</sup>。

胆固醇的生物合成主要在肝脏细胞、其次在肠道细胞进行, 是以乙酰辅酶 A 为原料<sup>[6, 7]</sup>, 以 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMG-CR)催化乙酰辅酶 A 合成 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 为胆固醇合成反应的限速反应, 而 HMG-CR 为胆固醇生物合成

的限速酶。胆固醇也是动物体内胆汁酸、甾体激素合成的原料<sup>[8, 9]</sup>。胆汁酸包括胆酸、脱氧胆酸、鹅胆酸、牛黄胆酸、甘氨酸胆酸等<sup>[1]</sup>。生物体内的代谢反应由酶催化完成, 酶蛋白基因表达活性在一定程度上也反应了酶蛋白合成量和酶催化反应的能力。本文较为系统地分析了肠道黏膜组织胆固醇、胆汁酸合成通路的基因差异表达信息, 同时也测定了血清中胆固醇、血脂成分含量的变化, 从整体上得到了草鱼“乙酰辅酶 A→胆固醇→胆汁酸”的合成代谢基因通路的酶蛋白基因差异表达结果, 这对于掌握和了解肠道黏膜氧化损伤与肠道胆固醇、胆汁酸代谢的关系, 以及胆固醇、胆汁酸在肠道健康维护、损伤修复中的特殊营养作用具有重要的基础研究价值和生产指导意义。

收稿日期: 2014-02-13; 修订日期: 2014-07-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172417); 苏州市应用基础研究项目 SYN201316 资助

作者简介: 叶元土(1964—), 男, 四川广安人; 教授, 硕士生导师; 主要从事水产动物营养与饲料研究。E-mail: yeyt@suda.edu.cn; Tel./Fax: +86-0512-65880179

通信作者: 蔡春芳, E-mail: caicf@suda.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 氧化鱼油

试验用鱼油为以鳀、带鱼为原料提取, 经过精炼的精制鱼油, 购自中国福建高龙实业有限公司。在精炼鱼油中添加  $\text{Fe}^{2+}$  30 mg/L ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、 $\text{Cu}^{2+}$  15 mg/L ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )、 $\text{H}_2\text{O}_2$  600 mg/L (30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 和 0.3% 的水充分混合。在温度(80±2)、充空气、搅拌条件下持续氧化 14d 得到氧化鱼油, 于-80 冰箱中保存备用。采用常规方法测定鱼油和氧化鱼油的氧化评价指标: 碘价(IV)分别为(67.19±3.32) g/kg 和(61.99±4.03) g/kg、酸价(AV)为(0.51±0.04) g/kg 和(3.64±0.23) g/kg、过氧化值(POV)为(10.86±1.26) meq/kg 和(111.27±2.85) meq/kg、丙二醛(MDA)为(7.50±1.60)  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  和(72.20±10.00)  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。鱼油经过 14d 的氧化后, IV 下降了 7.74%, 而 AV、POV、MDA 分别增加了 613.73%、924.59%、862.67%。

### 1.2 草鱼及其灌喂方法

试验草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)来自于江苏常州池塘养殖, 用粗蛋白 28%、粗脂肪 5% 的常规草鱼饲料在室内循环养殖系统中养殖 20d 后, 选择平均体重(108.4±6.2) g 试验鱼 42 尾, 分别饲养于单体容积 0.3 m<sup>3</sup> 的 6 个养殖桶中, 设置鱼油组和氧化鱼油组, 每组各 3 个平行, 每个养殖桶饲养 7 尾试验草鱼。灌喂试验期间的水温(23±1)、溶解氧 6.4 mg/L、pH 7.2。

将鱼油、氧化鱼油分别与大豆磷脂(食品级)以质量比 4:1 的比例混匀、乳化, 作为灌喂用的鱼油、氧化鱼油, 于 4 冰箱中保存。选取内径 2.0 mm 的医用软管(长度 5 cm)安装在 5 mL 一次性注射器上, 作为灌喂工具。将草鱼用湿毛巾包住身体, 按照试验鱼体体重的 1% 分别吸取鱼油、氧化鱼油, 待鱼嘴张开时将灌喂软管送入口中, 感觉到管口通过咽喉进入食道时, 通过注射器注入鱼油或氧化鱼油, 注射完毕后, 保持注射姿势 15—20s, 之后退出注射软管, 将草鱼放入水族缸中。于每天上午 9:00 对试验鱼定量灌喂。灌喂试验开始前鱼体停食 24h, 下午投喂草鱼饲料 1 次, 连续灌喂 7d。

### 1.3 血清成分分析

于灌喂试验的第 8 天上午 9:00, 每个养殖桶分别取试验鱼 3 尾、尾静脉采血, 静置 40min, 血液自然凝固后, 2500 r/min 离心 15min, 取上清液

10000 r/min 再离心 15min 得血清, 每个养殖桶 3 尾试验鱼血清等量合并, 正常鱼油组和氧化鱼油组草鱼各 3 个血清样品, 液氮速冻后, -80 低温保存。血清样品送至苏州市九龙医院, 使用雅培 C800 全自动生化分析仪测定血清中胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白含量。

### 1.4 肠道黏膜

在灌喂试验结束后, 试验鱼体停食 24h, 氧化鱼油组与鱼油组分别在 3 个平行养殖桶中各取 3 尾、每组 9 尾试验鱼。冰浴常规解剖、分离内脏团, 将肠道剖开, 浸于预冷 PBS 中漂洗后转入另一个预冷培养皿中, 用手压住前肠端、用解剖刀从前向后一次刮取得到黏膜, 转入 1.5 mL 离心管中(Rnasefree), 液氮速冻, 所有样品最终存于-80 备用。

### 1.5 RNA 提取

每桶试验草鱼分别取正常和氧化鱼油组肠道黏膜样本各一份, 分别独立用于提取总 RNA。RNA 提取时, 各组 9 个样品按照总 RNA 提取试剂盒(New-BioIndustry)操作进行。RNA 提取后经过电泳检测 RNA 质量, 在三个平行桶各取 1 尾、共 3 尾鱼 RNA 质量好的样本(电泳条带亮度高、清晰、无拖尾)进行等量混合为 1 个样本, 同样方法再混合一个样本, 其余的舍弃。鱼油组、氧化鱼油组分别得到 2 个( $n=2$ )平行样本, 共 4 个混合 RNA 样本, 分别用于 RNA-seq。混合后的 RNA 提取液轻轻吹打充分混匀后, 加入到专用的 RNA 保存管底部, 真空干燥, 一般 60  $\mu\text{L}$  干燥 6—7h, 80  $\mu\text{L}$  干燥 9—10h。干燥样品用于总 RNA 测序。

### 1.6 RNA 鉴定、文库构建、Illumina 测序和基因注释

采用 RNA 纳米生物分析芯片和量子比特套件(RNA Nano Bioanalysis chip and Qubit Kit)测定(仪器为 Agilent 2100)氧化鱼油组和正常鱼油组 RNA 完整性和浓度, RNA 完整性 RIN (RNA Integrity Number)值分别为 9.10 和 8.70; RNA 浓度分别为 190、121 ng/ $\mu\text{L}$ 。分别取等量(约 2.5  $\mu\text{g}$ )的氧化鱼油组和正常鱼油组草鱼肠道黏膜 RNA, 采用 Illumina 公司 TruSeq 的 RNA 样品制备试剂盒制备 cDNA 文库, PCR 循环 15 次。利用 Illumina 的 HiSeq2000 进行文库的聚类 and 序列分析, 配对末端(PE)的读段为 50 bp。原始测序读段中除去接头序列、序列质量分数小于 20、读长序列小于 30 的短读段后用于基因的从头组装。基因的从头组装使用 Bruijn 图形方式进行装配(CLC Bioversion5.5)。转录组

的注释和基因定位是利用 UniProtKB/SwissPro 和 NCBI 进行基因 top hits (E-value 为  $1e^{-6}$ ) 的 BLAST 检

索。基因的注释采用 UniProtKB/SwissProt 数据库 (Blast2GO version 2.5.1) 进行。

表 1 试验草鱼血清胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白含量  
Tab. 1 Cholesterol, triglyceride, HDL and LDL levels in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) serum (mmol / L)

组别 Groups	胆固醇 Cholesterol	甘油三酯 Triglyceride	高密度脂蛋白 HDL	低密度脂蛋白 LDL
	4.59	3.81	2.07	1.13
鱼油组 Fish oil group	3.81	4.38	2.41	1.02
	4.67	4.18	1.78	1.03
平均 Average	4.36	4.12	2.09	1.06
	5.51	4.46	1.98	1.53
氧化鱼油组 Oxidized fish oil group	5.66	4.57	1.86	1.16
	5.67	4.84	1.91	1.43
平均 Average	5.61	4.62	1.92	1.37
比率 Ratio *(%)	28.84	12.13	-8.15	29.56

注: \*为(氧化鱼油组结果-正常鱼油组结果)×100/正常鱼油组结果

Note: \*(Oxidized fish oil group value - fish oil group value) × 100 / fish oil group value

鱼油和氧化鱼油组分别合并 2 个平行 RNA 样本的试验数据, 依据 RNA-seq 分析结果和基因表达分析结果做差异表达分析和 IPA (Ingenuity Pathways Analysis) 基因通路分析, 在 CLC Genomics Workbench (version 5.5) 进行基因的差异表达分析, 映射参数分别设置为 95%,  $P < 0.05$ 。以正常组草鱼结果为对照, 灌喂氧化鱼油组基因具有显著差异表达的界定条件为 fold 绝对值大于 2、读段数大于 10。依据  $P$  值和具有显著差异表达基因数占通路基因总数的比例确认基因通路。

## 2 结果

### 2.1 血清胆汁酸、胆固醇和血脂含量的变化

于灌喂试验第 8 天采集试验鱼血清, 测定其中胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白含量(表 1)。在灌喂氧化鱼油 7d 后, 草鱼血清胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白含量分别增加了 28.84%、12.13%、29.56%, 而高密度脂蛋白含量下降了 8.15%。

### 2.2 胆固醇合成代谢基因通路

以灌喂正常鱼油组结果为对照, 灌喂氧化鱼油后的草鱼肠道黏膜基因差异表达的结果见表 2。有 *HADHB*、*HMGCS1*、*HMGCRa*、*MVK*、*MVD*、*ID11*、*FDPS*、*FDFT1*、*DHCR4*、*SQLE*、*LSS*、*CYP51*、*PPP2CA*、*SC4MO1*、*NSDH1*、*HSD17B7*、*EBP*、*SC5D* 共 18 个胆固醇合成酶基因显示出差异表达。差异倍数(Fold)范围为 1.27—6.02, 且全部为正值, 即胆固

醇生物合成酶的基因全部为差异表达上调。这些酶的碱基序列与对应的斑马鱼基因的相似度为 75.4%—99.1%, 具有很好的相似度。

经过 IPA 基因通路分析, 显示胆固醇生物合成共有 *MVD*、*FDPS*、*SQLE*、*FDFT1*、*EBP*、*ID11*、*MVK*、*LSS*、*HMGCR*、*SC5D* 等基因进入典型的规范路径,  $P$  值为  $3.59E^{-20}$ , Ratio 为 11/16 (0.688)。

将所得到的灌喂氧化鱼油组基因差异表达分析结果进行 KEGG 中的通路分析, 其中胆固醇生物合成和初级胆汁酸生物合成路径得到较为完整的显示, 综合胆固醇、胆汁酸生物合成代谢途径和本试验中得到的具有差异表达的酶基因分析结果, 显示了草鱼肠道组织中较为完整的“乙酰辅酶 A→胆固醇→胆汁酸”的合成代谢途径和催化反应的酶(图 1)。

### 2.3 胆固醇生物合成调节、转运相关的酶(蛋白)基因

依据胆固醇生物合成的代谢途径、胆固醇合成代谢调节机制和胆固醇转运途径, 以及 IPA 基因通路和 KEGG 中的通路分析结果, 在灌喂氧化鱼油草鱼肠道黏膜转录组分析结果中, 查找到甾醇 O-酰基转移酶 1(SOAT1)、固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白样(SCAP)、胆固醇酯转运蛋白 CETP)、固醇调节元件结合蛋白 2、3(SREBP2、SREBP 3)等 14 个酶或蛋白质的基因, 差异倍数范围为 -3.05—7.89 (表 3)。其中, *SOAT1*、*CETP*、*LDLr12*、*LDLr1*、*LDLr8*、*ATP-BCTA1*、*MRP5* 均为差异表达下调, 而 *SCAP*、*MRP1*、*MRP4*、*MRP2*、*MRP3* 均为差异表达上调。

表 3 中所注释的基因序列与斑马鱼等物种对应基因序列的相似度为 61.9%—95.5%。

上述结果显示, 在草鱼肠道黏膜组织中, 肠道黏膜受到氧化鱼油损伤后, 不仅存在胆固醇合成途径代谢酶的基因差异表达, 而且还有涉及胆固醇合成代谢调节、转运等途径的酶或蛋白质基因得到差异表达。与胆固醇生物合成途径共同组成了一个草鱼肠道组织中较为完整的胆固醇合成以及调节控制和转运的基因通路。

## 2.4 胆汁酸合成通路

胆汁酸的生物合成是以胆固醇为原料, 一般是在肝细胞中进行的, 本实验在草鱼肠道黏膜中也得到差异表达的胆汁酸合成酶基因, 以及涉及胆汁酸

合成调节、转运酶或蛋白的基因。依据转录组基因注释和基因差异表达分析结果, 有胆汁酸合成途径的胆固醇 7- $\alpha$ -单加氧酶(CYP7A1)、固醇 26-羟化酶(CYP27A1)、羟酰辅酶 A 脱氢酶(HADHa)、固醇载体蛋白 2(SCP2)基因差异表达上调, 而细胞色素 P450 7B1(CYP7B1)、 $\alpha$ -甲基酰基辅酶 A 消旋酶(AMACR)基因差异表达下调(表 4)。经过 *IPA* 基因通路分析和 KEGG 中的路径分析, 初级胆汁酸代谢途径得到注释, 显示在灌喂氧化鱼油后, 草鱼肠道黏膜胆汁酸合成途径得到差异表达, 但没有达到显著性差异水平。涉及胆汁酸合成调节和转运蛋白的基因有法呢醇 X 受体(*FXR*)、钠/胆汁酸转运蛋白 7(*SLCA7*)显示出差异表达下调, 胆盐输出泵(*BSEP*)

表 2 草鱼肠道黏膜胆固醇生物合成代谢酶基因及其差异表达

Tab. 2 The genes and the fold value of cholesterol biosynthesis pathway in the intestinal mucosal of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

基因描述 Blast Hit Description (HSP)	序列长度 Sequence Length (bp)	相似度 Blast Similarity (%)	差异倍数 Fold Change	酶编号 Enzyme codes
羟酰辅酶 A 脱氢酶 Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, <b>HADHB</b>	2247	92.8	1.27	EC:2.3.1.16
羟甲基-CoA 合成酶 Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, <b>HMG CS1</b>	3525	75.4	3.25	EC:2.3.3.10
3-羟基-3-甲基戊二酰基辅酶 A 还原酶 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase a, <b>HMG CRa</b>	499	93.5	3.67	EC:1.1.1.34
甲羟戊酸激酶 Mevalonate kinase, <b>MVK</b>	1879	80.1	3.27	EC:2.7.1.36
二磷酸甲羟戊酸脱羧酶 Diphospho mevalonate decarboxylase, <b>MVD</b>	243	88	4.28	EC:4.1.1.33
戊烯二磷酸 $\Delta$ -异构酶 Lisopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1, <b>ID11</b>	844	95.8	6.02	EC:5.3.3.2
法呢基焦磷酸合酶 Farnesyl diphosphate synthase, <b>FDPS</b>	1592	84.2	3.89	EC:2.5.1.10
法呢二磷酸法呢基转移酶 1 Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1, <b>FDFT1</b>	1464	87.2	3.34	EC:2.5.1.21
24-脱氢胆固醇还原酶 24-Dehydrocholesterol reductase, <b>DHCR4</b>	1889	91.6	4.45	EC:1.3.1.72
角鲨烯单加氧酶 Squalene monooxygenase, <b>SQLE</b>	2898	82.1	4.59	EC:1.1.1.35
羊毛甾醇合成酶 Lanosterol synthase, <b>LSS</b>	2663	89.5	4.05	EC:5.4.99.7
羊毛甾醇 14- $\alpha$ -脱甲基酶 Lanosterol 14-alpha demethylase, <b>CYP51</b>	2890	89.7	4.44	EC:1.14.13.70
蛋白磷酸酶 2 Protein phosphatase 2, <b>PPP2CA</b>	1774	99.1	1.49	EC:1.14.13.72
甲基甾醇单加氧酶 1 Methyl sterol monooxygenase 1, <b>SC4MO1</b>	2302	91.3	3.95	EC:1.14.13.72
甾醇-4- $\alpha$ -羧酸甲酯 3-脱氢酶 Sterol-4- $\alpha$ -carboxylate 3-dehydrogenase, <b>NSDHI</b>	1490	85.9	4.47	EC:1.1.1.145 EC:1.1.1.170
3-酮-类固醇还原酶 3-keto-steroid reductase, <b>HSD17B7</b>	1611	84.4	2.80	EC:1.1.1.62
固醇异构酶 Emopamil binding protein (sterol isomerase), <b>EBP</b>	1393	81	4.47	EC:5.3.3.5
胆固醇氧化酶, <b>SC5D</b>	1516	89	3.42	EC:1.14.21.6

注: \*比对物种均为斑马鱼 *Danio rerio*

Note: The Top-Hit Species are zebrafish (*Danio rerio*)

表 3 草鱼肠道黏膜胆固醇合成调节、转运相关酶(蛋白)基因及其差异表达

Tab. 3 Genes and the fold value of regulate- or transport-related enzyme (protein) with cholesterol synthesis pathway in the intestinal mucosal of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

基因描述 Blast Hit Description (HSP)	序列长度 Sequence Length (bp)	相似度 Blast Similarity (%)	差异倍数 Fold Change	酶编号 Enzyme codes
甾醇 O-酰基转移酶 1 Sterol O-acyltransferase 1-like SOAT1	3251	77.4	-1.71	EC:2.3.1.26
固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白 Sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein-like SCAP	3634	95.5 ( <i>Mus musculus</i> )	1.92	EC:2.7.7.6
胆固醇酯转运蛋白 Cholesteryl ester transfer protein CETP	1172	64	-1.28	
固醇调节元件结合蛋白 3 Sterol regulatory element binding protein 3 SREBP3	264	79.9	-	
固醇调节元件结合蛋白 2 Sterol regulatory element-binding protein 2 SREBP2	588	61.9	-	
低密度脂蛋白受体相关蛋白 12 Low-density lipoprotein receptor-related protein 12 LDLr12	1881	68.3	-1.13	EC:2.3.1.48
低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 LDLr1	2496	73.8	-2.00	EC:2.3.1.50
低密度脂蛋白受体相关蛋白 8 Low-density lipoprotein receptor-related protein 8 LDLr8	478	70.8 ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	-2.34	
ATP 结合盒转运体 A1 ATP-binding cassette transporter A1 ATP-BCT A1	1881	87.1	-1.22	EC:3.6.1.3
多药耐药相关蛋白 Multidrug resistance-associated protein1 MRP1	4847	80 ( <i>Poeciliopsis lucida</i> )	1.75	
多药耐药相关蛋白 4 Multidrug resistance-associated protein 4 MRP4	5325	88	7.89	EC:1.1.1.141
多药耐药相关蛋白成员 2 Multidrug resistance-associated protein member 2 MRP2	4986	79.5	3.93	
多药耐药相关蛋白 3 Multidrug resistance associated protein 3 MRP3	2721	87.4 ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	3.18	EC:1.6.1.2; EC:1.6.1.1
多药耐药相关蛋白 5 类 Multidrug resistance-associated protein 5-like MRP5	4730	86.9	-3.05	

注: \*比物种除特别注明(括号内)外, 其余均为斑马鱼(*Danio rerio*)Note: In addition to the brackets indicate specie, the rest are zebrafish (*Danio rerio*)

表 4 草鱼肠道黏膜胆汁酸合成与调节酶(蛋白)基因及其差异表达

Tab. 4 Genes and the fold value of the bile acid synthase (or protein) in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

基因描述 Blast Hit Description (HSP)	序列长度 Sequence Length (bp)	相似度 Blast Similarity (%)	差异倍数 Fold Change	酶编号 Enzyme codes
胆固醇 7- $\alpha$ -单加氧酶 Cholesterol 7-alpha-monooxygenase, CYP7A1	676	75.2	1.31	EC:1.14.13.17
固醇 26-羟化酶 Sterol 26-hydroxylase, CYP27A1	2436	75.2	1.01	
细胞色素 P450, 家族 7, 亚家族 B, 多肽 Lcytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1, CYP7B1	939	71.2	-1.98	EC:2.7.11.0
$\alpha$ -甲基酰基辅酶 A 消旋酶 $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase, AMACR	2285	86.4	-1.61	EC:5.1.99.4
羟酰辅酶 A 脱氢酶 Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, HADHa	3052	90	1.45	EC:1.1.1.35 EC:4.2.1.17
固醇载体蛋白 2 Sterol carrier protein 2, SCP2	2422	89.4	3.01	EC:2.3.1.176 EC:6.3.2.6
法呢醇 X 受体 Farnesoid X receptor FXR	2272	85.7	-1.29	EC:4.1.1.21 EC:5.4.99.18
胆盐输出泵 Bile salt export pump, BSEP	4579	84.9	1.36	
钠/胆汁酸转运蛋白 7 Sodium/bile acid cotransporter7, SLCA7	1692	91.1	-1.21	

注: \*比物种均为斑马鱼(*Danio rerio*)Note: In addition to the brackets indicate specie, the rest are zebrafish (*Danio rerio*)

基因差异表达上调。

### 3 讨论

本研究在对草鱼灌喂氧化鱼油 7d 后, 观察到肠道黏膜脱落, 肠道受到严重的急性损伤。以灌喂正常鱼油的样本为对照, 采用 RNA-seq 方法, 得到了灌喂氧化鱼油后草鱼肠道黏膜组织基因差异表达的结果(待发表)。主要试验结果为, 草鱼肠道黏膜组织得到 4.5G 的读段数量, 注释了 1 万左右的基因数量(conting 数)。显示有 455 个基因差异表达极显著( $\text{fold} \geq 3.0$  或  $\text{fold} \leq -3.0$ ), 其中 253 个基因差异表达显著上调( $\text{fold} \geq 3.0$ )、202 个基因差异表达显著下调( $\text{fold} \leq -3.0$ )。采用 IPA (Ingenuity Pathways Analysis) 基因通路分析方法, 有 183 个差异表达显著的基因进入通路。观察到 NRF2 介导的氧化应激通路、GSH/GST(s)通路、泛素-蛋白酶体通路等差异表达上调。在该项研究中得到一个值得关注的结果是, 在氧化油脂造成草鱼肠道急性损伤的情况下, 肠道胆固醇合成代谢的系列酶基因差异表达显著上调, 本文仅就此内容进行分析。

#### 3.1 草鱼肠道黏膜组织存在胆固醇、胆汁酸的生物合成代谢通路

Victor 等<sup>[7]</sup>较为系统地阐述了胆固醇的生理作用和病理意义, 且节肢动物(如虾、蟹等)和线虫缺乏关键胆固醇生物合成酶的角鲨烯合成酶和羊毛甾醇合酶而不能合成胆固醇, 鱼类等脊椎动物的肝(胰)脏是以乙酰辅酶 A 为原料合成胆固醇的主要器官, 其次是肠道<sup>[6, 7]</sup>。胆固醇的主要去路之一是合成胆汁酸。本试验以灌喂氧化鱼油 7d 后的草鱼肠道黏膜组织为试验材料, 对总 RNA 经过序列分析, 注释得到了在肠道黏膜组织中的胆固醇和胆汁酸生物合成途径代谢酶。依据动物胆固醇、胆汁酸合成的途径, 结合本试验结果, 图 1 显示有 *HADHB*、*HMG CS1*、*HMG CR $\alpha$* 、*MVK*、*MVD*、*ID11*、*FDPS*、*FDFT1*、*DHCR4*、*SQLE*、*LSS*、*CYP51*、*PPP2CA*、*SC4MO1*、*NSDH1*、*HSD17B7*、*EBP*、*SC5D* 共 18 个胆固醇合成酶基因参与了以乙酰辅酶 A 为原料的胆固醇合成通路, 整个代谢途径经历了甲羟戊酸、甲羟戊酸-5-磷酸、异戊烯基-5-焦磷酸、二甲基烯丙基二磷酸、法呢基二磷酸、羊毛甾醇、酵母甾醇(Zymosterol)等中间物质, 最后合成胆固醇。重要的是这 18 个酶蛋白基因差异表达倍数为 1.27—6.02, 均显示为差异

表达上调。这一结果表明, 在草鱼肠道黏膜组织中, 以乙酰辅酶 A 为原料的胆固醇生物合成途径的客观存在, 且在灌喂氧化鱼油导致肠道黏膜损伤后, 均是差异表达上调。

在以胆固醇为原料的胆汁酸合成途径中, 由 CYP7A1 催化胆固醇合成 7 $\alpha$ -羟基胆固醇酯为限速反应, 注释得到了 *CYP7A1*(1.31)、*AMACR*(-1.61)、*HADL*(1.45)、*SCP2*(3.01)差异表达基因, 催化经过 3 $\alpha$ 、7 $\alpha$ -二羟基-5 $\beta$ -胆甾烷醇-CoA 和 3 $\alpha$ 、7 $\alpha$ 、12 $\alpha$ -三羟基-5 $\beta$ -胆甾烷醇-CoA 反应途径, 分别合成牛磺酸鹅脱氧胆酸、甘氨脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸和胆酸、牛黄胆酸、甘氨胆酸。结果显示, 草鱼肠道组织中存在胆汁酸代谢的反应途径, 有胆汁酸合成代谢酶基因得到差异表达。

#### 3.2 肠道氧化损伤使肠道黏膜胆固醇合成能力增强

在正常生理条件下, 较多的文献资料显示<sup>[6-11]</sup>, 细胞内胆固醇主要依赖 SCAP-SREBPs-LDLr/HMG coA reductase/ ATP-BCT A1、G1 三个方面的作用保持基本的稳定状态。(1)通过 HMG coA 还原酶调节细胞内胆固醇的生物合成, 增加细胞内胆固醇量<sup>[8-11]</sup>。(2)通过 CETP-SCAP-SREBPs-LDLr 途径将细胞外胆固醇逆转运至细胞内<sup>[11, 12]</sup>。(3)通过三磷酸腺苷结合盒转运体(ATP-binding cassette transporter, ATP-BCT A1)A1、G1(多药耐药相关蛋白 MRP1、MRP-G1)将细胞内胆固醇转运到细胞外<sup>[10, 11, 13]</sup>。上述三个方面协调维持细胞内胆固醇平衡稳定。在本试验中, 草鱼肠道在受到氧化鱼油损伤后胆固醇合成及其调节控制的变化主要表现为以下几个方面:

(1) 肠道黏膜胆固醇的逆转运代谢减弱。胆固醇的逆转运途径是指通过 CETP-SCAP-SREBPs-LDLr 途径将细胞外胆固醇转运至细胞内的途径<sup>[11, 12, 14]</sup>, 也是细胞内胆固醇的来源之一。胆固醇的转运首先需要进行酯化为胆固醇酯<sup>[11]</sup>, 甾醇 O-酰基转移酶(SOAT1)是催化胆固醇酯与胆固醇相互转化的酶, 在本试验中, SOAT1 (fold 为-1.71)差异表达下调, 表明胆固醇酯化或去酯化的反应减弱; 胆固醇酯转运蛋白(CETP)、低密度脂蛋白受体相关蛋白(LDLr)是胆固醇逆转运需要的转运载体蛋白<sup>[12-14]</sup>, CETP (fold 为-1.28)和 LDLr1、LDLr8、LDLr12 差异表达均下调(fold 分别为-2.00、-2.34、-1.13), 仅有固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白(SCAP)表达上调(fold 为 1.92), 但 SCAP 还参与激活 HMG-CoA 还原

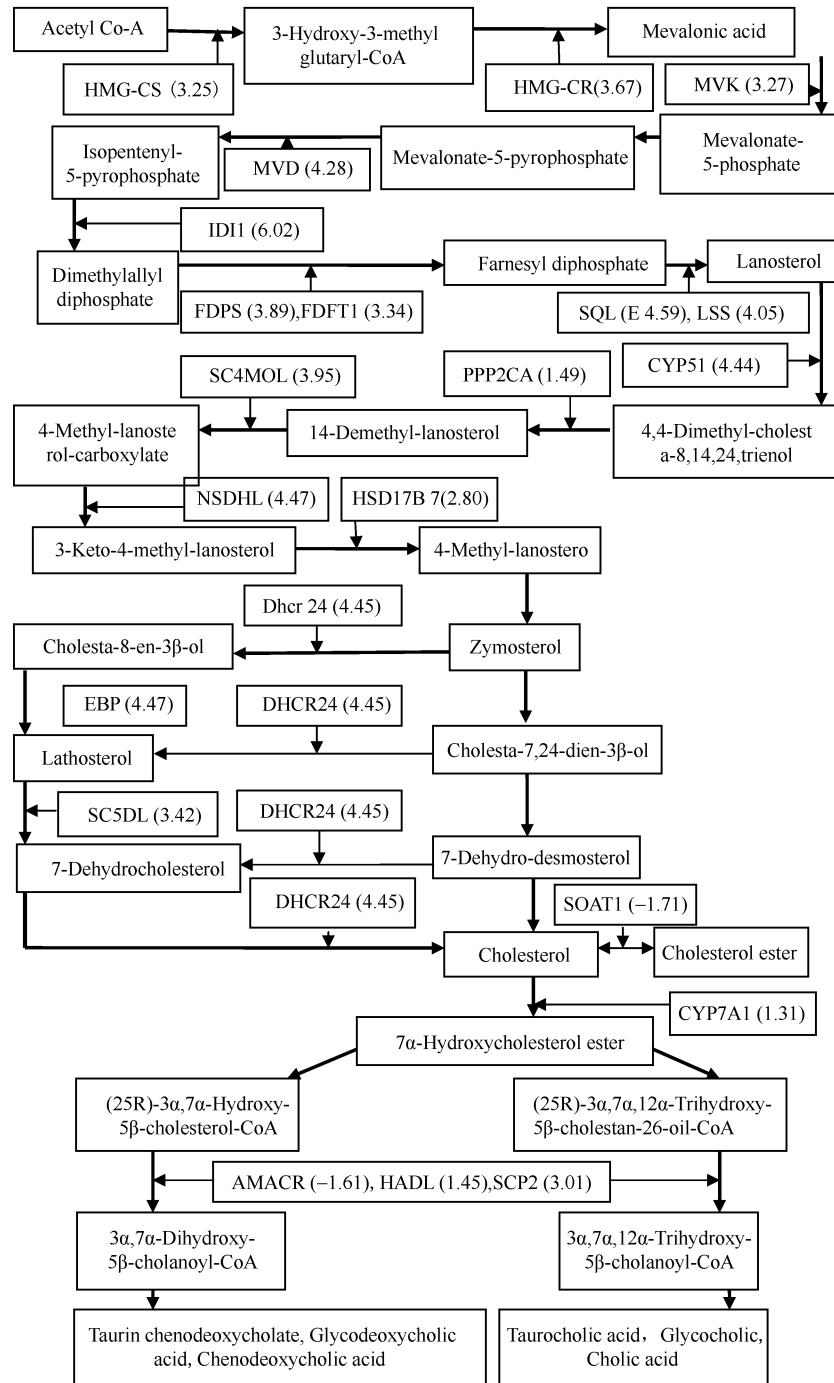


图 1 草鱼肠道黏膜胆固醇胆汁酸合成路径图(大写字母为酶或蛋白缩写, 括号内数字为 fold 值)

Fig. 1 Synthesis pathway of cholesterol and bile acid in intestinal mucosa of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) (Uppercase letter is abbreviation of the enzyme or protein, in brackets for the fold value)

酶的作用<sup>[12]</sup>。因此, 草鱼肠道黏膜在受到氧化鱼油损伤后, 通过 CETP-SCAP-SREBPs-LDLr 途径将细胞外胆固醇转移到细胞内的胆固醇逆转运途径的能力是减弱的。

(2) 肠道黏膜细胞内胆固醇的外流转运能力得到增强。细胞内胆固醇外流转运是通过 ATP-BCT

A1、MRP1、MRP-G1 等将细胞内胆固醇转运到细胞外的过程<sup>[10, 11, 13]</sup>。ATP-BCT A1(又缩写为 ABCA1)为介导细胞内胆固醇流出的关键转运体<sup>[16]</sup>, 是胆固醇转运的关键蛋白。在本试验中, ATP-BCT A1 的差异表达是下调的(fold 为-1.22)。多药耐药相关蛋白 (Multidrug resistance-associated protein, MRP)属于 p

型糖蛋白超基因家族, 为具有三磷酸腺苷(ATP)结合域的盒式跨膜转运子蛋白超家族成员<sup>[17]</sup>, MRPs 主要为有机阴离子转运载体, 承载固醇类、胆汁酸(盐)、多种药物等物质向细胞外转运, 从而保护细胞免受胆盐损伤<sup>[17, 18]</sup>。MRP1 最重要的生理作用是外排机体内潜在的有害物质, 包括外源性物质、内源性化合物及其代谢物, 从而保护组织器官<sup>[18]</sup>。MRP2、MRP3 主要负责胆红素和其他胆汁成分的排泄, 与肝脏胆汁淤积有关。本试验在肠道黏膜组织基因注释结果也得到上述几个蛋白基因, 并显示出差异表达, 其中的多药耐药相关蛋白 MRP1 (fold 为 1.75)、MRP2 (fold 为 3.93)、MRP3 (fold 为 3.18)、MRP4 (fold 为 7.89)均为显著性表达上调, 只有 MRP5 (fold 为-3.05)为显著性下调。这些结果表明, 草鱼肠道组织中也有多药耐药相关蛋白基因的表达, 且在氧化鱼油造成肠道黏膜损伤后, 显示出依赖于多药耐药相关蛋白调节的细胞内胆固醇向细胞外转运能力得到加强。

(3) 肠道黏膜胆固醇生物合成能力及其调节作用增强。已经有较多的研究证实, HMG CoA 还原酶(HMG CR)是合成胆固醇途径的限速酶<sup>[8-11, 19]</sup>, 控制着以乙酰辅酶 A 为原料, 经过甲羟戊酸、角鲨烯等途径合成胆固醇的代谢。在本试验中, *HADHB*、*HMG CS1*、*HMG CRa*、*MVK*、*MVD*、*ID11*、*FDPS*、*FDFT1*、*DHCR4*、*SQLE*、*LSS*、*CYP51*、*PPP2CA*、*SC4MO1*、*NSDH1*、*HSD17B7*、*EBP*、*SC5D* 共 18 个胆固醇生物合成的基因差异表达, 且均是差异表达上调(fold 为 1.27—6.02)。尤其值得关注的是, 草鱼肠道黏膜组织在受到氧化鱼油严重损伤的情况下, 胆固醇合成途径的代谢酶和参与调节作用的酶、蛋白质的基因达到显著性表达上调, 而胆汁酸的经典合成途径也显示得到上调。在灌喂氧化鱼油 7d 后, 草鱼血清胆固醇含量增加了 28.84%, 含有胆固醇的低密度脂蛋白(LDL)含量增加了 29.56%。胆固醇合成酶基因表达活性上调、血清胆固醇含量增加, 这是一个非常值得关注的结果, 是否预示着在草鱼肠道损伤下, 增强胆固醇、胆汁酸合成酶、调节酶或蛋白基因的表达活性, 合成更多的胆固醇、胆汁酸以满足氧化应激、氧化损伤修复的生理需要? 这还需要深入、系统的研究。

关于食物(日粮)因素对胆固醇、胆汁酸代谢的影响也有一些研究报道。食物中的大豆蛋白<sup>[20, 21]</sup>、

大米蛋白<sup>[22]</sup>含有抗性蛋白(不易被消化、类似于食物纤维的食物蛋白成分)、以及其中的微量成分物质如大豆皂甙等, 对人体、大鼠等具有降低血清和体内胆固醇水平的作用。日粮豆粕对鱼类胆固醇代谢同样产生较大的影响<sup>[23, 24]</sup>, 豆粕替代鱼粉导致鱼类血液胆固醇水平下降, 但肝(胰)脏 HMG CoA 还原酶基因的表达活性显著上调, 而控制以胆固醇为原料合成胆汁酸的 *CYP7A1* 基因表达活性也上调。但是, 对肠道胆固醇、胆汁酸合成代谢则没有研究报告。

需要特别注意的是, 日粮中高含量植物蛋白原料、尤其是高含量的豆粕也会导致鱼类肠道黏膜的损伤<sup>[23-25]</sup>。在肠道黏膜组织结构和功能性损伤条件下, 鱼体肠道黏膜胆固醇、胆汁酸生物合成能力、代谢强度的变化就是值得关注的重要问题。日粮中高含量的豆粕对大西洋鲑(*Salmo salar*)<sup>[24]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[25]</sup>、草鱼<sup>[26]</sup>等鱼类肠道具有损伤作用, 可以引起肠道黏膜的微绒毛脱落, 肠道炎症等。因此, 日粮中高含量的植物蛋白、尤其是高含量的豆粕, 一方面是其中的抗性蛋白、纤维、微量抗营养因子等直接与胆固醇、胆汁酸结合成复合物而排出体外, 增加了粪便中胆固醇、胆汁酸的排泄量; 另一方面, 也因为对肠道黏膜的损伤作用, 导致黏膜细胞结构与功能损伤, 减少了肠道组织对胆固醇、胆汁酸的再吸收。其结果导致体内胆固醇、胆汁酸水平下降。现有的研究报告显示, 激活了鱼类肝(胰)脏 HMG CoA 还原酶、*CYP7A1* 基因的表达上调, 使胆固醇和胆汁酸的生物合成量显著增加以满足生理需要。此时, 引出一个重要的问题是, 在日粮豆粕、氧化油脂等因素造成肠道黏膜损伤条件下, 肠道黏膜组织胆固醇合成、胆汁酸的代谢会发生怎样的变化? 肝(胰)脏、肠道均有胆固醇生物合成的能力, 那么在肠道黏膜损伤条件下, 肝(胰)脏和肠道黏膜胆固醇、胆汁酸生物合成能力、合成量是否会发生变化? 氧化油脂也可以引起鱼体肠道黏膜的严重氧化性损伤<sup>[1-3]</sup>, 氧化豆油水溶物、丙二醛均可以导致离体草鱼肠道黏膜细胞严重的损伤。那么, 在氧化油脂对鱼体肠道黏膜造成氧化损伤后, 肠道黏膜胆固醇合成、胆汁酸代谢会发生怎样的变化? 本试验结果显示, 在灌喂氧化鱼油后, 肠道黏膜出现严重的损伤, 但是肠道胆固醇合成、胆汁酸合成酶基因的表达活性上调, 显示出肠道黏膜胆固醇生物合成能力的增强, 这是一个很值得关注的研究结



果。我们以实际养殖生产中患有肠道炎症的草鱼肠道黏膜为材料,检测其中的胆固醇合成酶基因的表达活性,其结果也是显示表达上调(待发表)。

本试验结果也显示出,调节肠道胆固醇生物合成的部分蛋白基因表达活性发生了变化。参与胆固醇生物合成调节蛋白主要有胆固醇调节元件结合蛋白(SREBPs)、固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白(SREBP cleavage-activating protein, SCAP)。SREBPs<sup>[12, 14]</sup>是膜结合的转录因子,SCAP 是内质网的一种膜蛋白<sup>[14]</sup>,是细胞内胆固醇敏感器,同时 SCAP 也被证明能与 SREBPs 在内质网结合成复合物,是 SREBP 的一个运载蛋白<sup>[12, 14]</sup>。在本试验中,HMG CoA 还原酶(fold 为 3.67)、SCAP(fold 为 1.92)均表现为差异表达上调,表明在草鱼肠道黏膜在受到氧化鱼油损伤的情况下,通过 SCAP-SREBPs-HMG 还原酶控制路径,对以 HMGCoA 还原酶作为限速酶的胆固醇生物合成调控是上调的,即是向增强胆固醇合成方向调控的。在灌喂氧化鱼油后,草鱼血清胆固醇含量增加了 28.84%、含有胆固醇的低密度脂蛋白(LDL)含量增加了 29.56%也为此提供了证据。

### 3.3 草鱼肠道黏膜有胆汁酸生物合成酶、调节蛋白的基因差异表达

动物胆汁酸合成有经典途径及替代途径两种途径。经典途径是胆汁酸合成的主要途径,胆固醇 7 $\alpha$  羟化酶(CYP7A1)是此反应途径的限速酶<sup>[6, 7, 27]</sup>。在本试验中,在胆汁酸合成途径中的胆固醇 7 $\alpha$  羟化酶(CYP7A1)、固醇 26-羟化酶(CYP27A1)、细胞色素 P450 7B1(CYP7B1)、 $\alpha$ -甲基酰基辅酶 A 消旋酶(AMACR)、羟酰辅酶 A 脱氢酶(HADHa)、固醇载体蛋白(SCP2)等均在肠道黏膜中得到基因注释结果,并表现出差异表达,这一结果初步显示出草鱼肠道黏膜胆汁酸代谢途径的客观存在性。

关于肠道黏膜胆汁酸合成代谢的调控作用,胆汁酸的合成速度与 CYP7A1 的活性呈正相关,胆汁酸通过核受体法呢醇 X 受体(FXR)对 CYP7A1 进行负反馈调节,以此维持体内胆汁酸池的平衡<sup>[7, 27, 28]</sup>。受 FXR 调控的靶基因主要有 CYP7A1、胆盐输出泵(BSEP),当胆汁酸浓度增大后,激活 FXR,使 CYP7A1 转录被抑制,胆汁酸合成速度下降。在本试验中,CYP7A1 (fold 为 1.31)、CYP27A1(fold 为 1.01)、HADHa (fold 为 1.45)、SCP2(fold 为 3.01)均为差异表达上调,显示肠道黏膜在受到氧化鱼油损伤后,

胆汁酸合成能力增强。FXR (fold 为-1.29)表达下调有利于胆汁酸合成速度增加,钠/胆汁酸转运蛋白 7 (SLCA7, fold 为-1.21)差异表达下调不利于细胞对胆汁酸的吸收转运,而胆盐输出泵(BSEP, fold 为 1.36)差异表达上调则有利于胆汁酸向细胞外的转运。因此,草鱼肠道黏膜在受到氧化鱼油损伤后,肠道黏膜组织通过 CYP7A1 为限速酶的胆汁酸经典合成途径得到加强,胆汁酸由细胞内向细胞外转运能力增强。

胆汁酸合成的另一个途径称为替代途径<sup>[6, 7, 27]</sup>,由甾醇 27 $\alpha$  羟化酶(CYP27A1)和甾醇 12 $\alpha$  羟化酶(CYP7B1)(fold 为-1.98)催化。在本试验中,CYP27A1 虽然显示差异表达上调,但是 CYP7B1、AMACR (fold 为-1.61)为下调,表明在肠道黏膜中胆汁酸合成的替代途径整体下调。

## 4 结论

草鱼肠道黏膜具备完整的“乙酰辅酶 A $\rightarrow$ 胆固醇 $\rightarrow$ 胆汁酸”的合成代谢基因通路和代谢途径。肠道黏膜在受到氧化鱼油损伤后,胆固醇生物合成代谢途径增强,血清胆固醇含量增加;胆固醇逆转途径减弱,胆固醇向细胞外转运增强;肠道黏膜组织中胆汁酸的经典合成代谢途径增强,而替代合成途径减弱。

### 参考文献:

- [1] Ye Y T, Cai C F. Fish Nutrition and Feed Formulation [M]. Beijing: Chemistry and Chemical Press. 2013, 33—104 [叶元土, 蔡春芳. 鱼类营养与饲料配制. 北京: 化学工业出版社. 2013, 33—104]
- [2] Kristin H, Kjersti K, Kjartan S, et al. Feed intake and absorption of lipid oxidation products in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets coated with oxidised fish oil [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2001, 25: 209—219
- [3] Du Z Y, Clouet P, Huang L M. Utilization of different dietary lipid sources at high level in herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): mechanism related to hepatic fatty acid oxidation [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2008, 14: 77—92
- [4] Li C, Zhang Y, Wang R J, et al. RNA-seq analysis of mucosal immune responses reveals signatures of intestinal barrier disruption and pathogen entry following *Edwardsiella ictaluri* infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32: 816—827
- [5] Alessandro C, Jose M P, Gregory E M. Sequencing, de novo

- annotation and analysis of the first *Anguilla anguilla* transcriptome: EeelBase opens new perspectives for the study of the critically endangered european eel [J]. *BMC Genomics*, 2010, **11**: 635
- [6] Ni C M, Liu H Y, Liu X Y, *et al.* The research progress of cholesterol [J]. *Journal of the Chinese Modern Clinical Medical Journal*, 2005, **3**(4): 316—318 [倪楚民, 刘浩宇, 刘锡仪, 等. 胆固醇的研究进展. 中华现代临床医学杂志, 2005, **3**(4): 316—318]
- [7] Victor A C, Dolores B, Pablo M, *et al.* Advances in the physiological and pathological implications of cholesterol [J]. *Biological Reviews*, 2013, **88**: 825—843
- [8] Wang W, Tong T J. The key enzyme of cholesterol synthesis way: HMG CoA reductase and disease [J]. *Progress in Physiological Science*, 1999, **30**(1): 5—9 [汪维, 童坦君. 胆固醇合成途径的关键酶: HMG 辅酶 A 还原酶和疾病. 生理科学进展, 1999, **30**(1): 5—9]
- [9] John S B, Peter J E. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast [J]. *Progress in Lipid Research*, 2011, **50**: 403—410
- [10] Shahram E B, Marc E, Thomas W M, *et al.* Developmental processes regulated by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMG CR) pathway: Highlights from animal studies [J]. *Reproductive Toxicology*, 2014, **46**: 115—120
- [11] Liu T F, Song B L. Negative feedback regulation mechanism of cholesterol synthesis approach [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2013, **35**(4): 401—409 [柳童斐, 宋保亮. 胆固醇合成途径的负反馈调控机制. 中国细胞生物学学报, 2013, **35**(4): 401—409]
- [12] Liu F, Zhou X. The SCAP and the mechanisms regulating cholesterol level [J]. *Journal of Life Science*, 2002, **14**(3): 146—149 [刘芳, 周新. SCAP 与胆固醇水平的调节机制. 生命科学, 2002, **14**(3): 146—149]
- [13] Si Y H, Shang Z P, Qin S C. Novel pathway for reverse cholesterol transport: directly transintestinal cholesterol efflux [J]? *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, **27**(11): 1007—1012 [司艳红, 商战平, 秦树存. 胆固醇逆转运的新途径: 胆固醇经肠道直接排出体外? 中国生物化学与分子生物学报, 2011, **27**(11): 1007—1012]
- [14] Wei N B, Liu G Y, Wang H F, *et al.* Sterol regulatory element binding protein in cholesterol metabolism in the research on mechanism of action [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry*, 2013, **49**(5): 80—84 [魏宁波, 刘红云, 汪海峰, 等. 固醇调控元件结合蛋白在胆固醇代谢中作用机制的研究进展. 中国畜牧杂志, 2013, **49**(5): 80—84]
- [15] Mardones P, Quiñones V, Amigo L, *et al.* Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice [J]. *Journal of Lipid Research*, 2001, **42**(2): 170—180
- [16] Tang Y Y, Chen W J, Lu Q, *et al.* Research Advances of Intracellular Transport and Function of ABCA1 [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2013, **40**(6): 510—519 [唐艳艳, 陈五军, 路倩, 等. ABCA1 的胞内运输及功能研究新进展. 生物化学与生物物理进展, 2013, **40**(6): 510—519]
- [17] Kullak Ublick G A, Beuers U, Paumgartner G. Hepatobiliary Transport [J]. *Journal of Hepatology*, 2011, **32**: 3—18
- [18] Ile S M, Li R, Kanwar J R, *et al.* Structural and functional properties of human multidrug resistance protein1 (MRP1/ABCC1) [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2011, **18**(3): 439—481
- [19] Wang Y, Rogers P M, Su C, *et al.* Regulation of cholesterol genesis by the oxysterol receptor, LXRA [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, **283**(39): 26332—26339
- [20] Potter S M. Overview of proposed mechanism for the hypocholesterolemic effect of soy [J]. *Journal Nutrition*, 1995, **125**: 606—611
- [21] Zhou Z H, Yang X Q, Tang C H. Mechanisms for hypocholesterolemic effect of digestion resistant protein of soy [J]. *Food Research and Development*, 2005, **26**(4): 168—172 [周志红, 杨晓泉, 唐传核. 大豆抗消化蛋白降胆固醇作用机理研究进展. 食品研究与开发, 2005, **26**(4): 168—172]
- [22] Luan H, Yang L. Research progress in rice protein affect cholesterol metabolism [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, **33**(5): 421—424 [栾慧, 杨林. 大米蛋白调控胆固醇代谢的研究进展. 食品工业科技, 2012, **33**(5): 421—424]
- [23] Han X M, Zhang X, Tao L L, *et al.* The effects of replacing fish meal with soybean meal on cholesterol metabolism in fish: a review [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2013, **28**(5): 734—740 [汉雪梅, 张曦, 陶琳丽, 等. 豆粕替代鱼粉对鱼类胆固醇代谢影响的研究进展. 云南农业大学学报, 2013, **28**(5): 734—740]
- [24] Kortner T M, Gu J, Krogdahl A, *et al.* Transcriptional regulation of cholesterol and bile acid metabolism after dietary soyabean meal treatment in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *British Journal of Nutrition*, 2012, **30**: 1—12
- [25] Ostaszewska T, Dabrowski K. Growth and Morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean protein [J]. *Aquaculture*, 2005, **245**: 273—286
- [26] Wu L F, Wang H H, Qin G X, *et al.* Effects of soybean protein on intestinal morphology and main blood biochemical parameters of *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Journal of Northwest Agriculture and Forestry University* (Natural Science Edition), 2010, **38**(2): 25—30 [吴莉芳, 王洪鹤, 秦贵信, 等. 大豆蛋白对草鱼肠道组织及血液主要生化指标的影响. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, **38**(2): 25—30]
- [27] Gregor L, Monika L, Damjana R. Cytochrome P450s in the synthesis of cholesterol and bile acids—from mouse models to human diseases [J]. *FEBS Journal*, 2012, **279**: 1516—1533

- [28] Bo K, Li W, John Y L, *et al.* Mechanism of tissue-specific farnesoid X receptor in suppressing the expression of genes in bile-acid synthesis in mice [J]. *Hepatology*, 2012, **56**(3):1034—1043

## FEEDING GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS*) WITH OXIDIZED FISH OIL UP-REGULATES THE GENE EXPRESSION IN THE CHOLESTEROL AND BILE ACID SYNTHESIS PATHWAY IN INTESTINAL MUCOSA

YE Yuan-Tu<sup>1</sup>, CAI Chun-Fang<sup>1</sup>, XU Fan<sup>1</sup>, DONG Jiao-Jiao<sup>1</sup>, ZHANG Bao-Tong<sup>2</sup> and XIAO Pei-Zhen<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Animal Nutrition, School of Basic Medicine and Biological Science, Soochow University, Suzhou 215123, China; 2. Open Lab for Aquatic Animal Nutrition, Beijing Research Institute for Nutritional, Beijing 100000, China)

**Abstract:** In this study, grass carps *Ctenopharyngodon idellus* were injected with oxidized fish oil (experimental group) and normal fish oil (control group) continuously for 7 days. We collected the intestinal mucosa and extracted the total RNA the tissue, and then obtained the RNA sequences from both groups by using the RNA-seq method. We analyzed the differential gene expression, gene annotation, and *IPA* gene pathway, and measured the levels of cholesterol, triglycerides, HDL, and LDL in serum in the meanwhile. The gene expression in the cholesterol and bile acid biosynthesis pathways increased significantly ( $\geq 2$  folds) when the intestinal mucosa was injured by oxidized fish oil. Our analysis revealed a complete “acetyl coenzyme A  $\rightarrow$  cholesterol  $\rightarrow$  bile acid” biosynthesis gene pathway in the intestinal mucosa of grass carps. Damages in the intestinal mucosa were demonstrated and they were clearly associated with oxidized fish oil. The overall gene expression in the cholesterol biosynthesis pathway was enhanced after the injury. The gene expression was reduced in the reverse cholesterol transporting pathway; in contrast, the gene expression in the cholesterol transport pathway was up-regulated which implied that more cholesterol could be transported out the cell. There was an increase in the gene expression in the classical pathway of bile acid biosynthesis that utilized cholesterol as a raw material; however, the expression in its supplementary pathway was decreased. The levels of cholesterol, LDL, and triglyceride in serum were increased by 28.84%, 29.56% and 12.13% respectively, whereas the level of high-density lipoprotein was reduced by 8.15%.

**Key words:** Grass carp *Ctenopharyngodon idellus*; Intestinal mucosa; RNA-seq; Cholesterol; Bile acid; Differentially expressed