

投喂高脂饲料后草鱼主要生化指标和乙酰辅酶 A 羧化酶 1 mRNA 表达的变化

汪开毓 苗常鸿 黄锦炉 王均 连海 吴春艳 牟巧凤 付希
(四川农业大学鱼病研究中心 四川农业大学动物疫病与人类健康四川省重点实验室 雅安 625014)

摘要: 为了研究草鱼肝脏对高脂饲料的代谢调控机理, 试验研究了连续 12 周投喂含 8.1% 脂肪的饲料对草鱼血清生化指标、肝胰脏生化指标及乙酰辅酶 A 羧化酶 1 (ACC1) mRNA 表达的影响。将 120 尾平均体重为 (15.0 ± 2.4) g 的健康草鱼随机为高脂组和基础组, 分别投喂含 8.1% 脂肪的高脂饲料和 4.6% 脂肪的基础饲料, 并在试验的第 4、8、12 周检测草鱼血清中甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (CHO) 含量及谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 活性以及肝胰脏中丙二醛 (MDA) 含量和超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性。在试验第 12 周, 制作病理切片观察肝胰脏组织形态, 并应用半定量反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测肝胰脏 ACC1 mRNA 的相对表达量。结果表明: 试验期间, 高脂组草鱼肝细胞出现损伤, 并随投喂时间的延长而加重; 高脂组草鱼血清中 AST、ALT 活性及 TG、CHO 含量以及肝胰脏中 MDA 含量均随投喂时间的延长而显著或极显著上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而肝胰脏中 SOD 和 CAT 活性则随投喂时间的延长而显著或极显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在试验第 12 周, 高脂组草鱼血清中 AST、ALT 活性及 TG、CHO 含量以及肝胰脏中 MDA 含量均显著或极显著高于基础组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而肝胰脏中 SOD 和 CAT 活性则显著或极显著低于基础组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与基础组相比, 高脂组草鱼肝胰脏 ACC1 mRNA 相对表达量极显著升高 ($P < 0.01$)。由此得出, 高脂饲料的连续投喂升高了草鱼的血脂水平, 并使草鱼肝胰脏出现损伤, 其作用机制可能与高脂饲料降低草鱼抗氧化能力以及促进肝脏脂肪合成有关。

关键词: 草鱼; 高脂饲料; 生化指标; ACC1 mRNA; 半定量 RT-PCR

中图分类号: S963

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2012)12-2375-09

根据水产行业标准 SC/T 1024—2002《草鱼配合饲料》, 草鱼饲料中粗脂肪含量不应小于 4%。但是, 草鱼是一种对脂肪需求量较低的植食性鱼类^[1-2]。有研究表明, 当给草鱼投喂脂肪含量为 8% 的饲料 8 周后, 草鱼则出现采食量下降、生长发育受阻以及血脂升高的现象^[3-4]。草鱼长期摄入高脂饲料后可导致肝脏脂肪代谢机能紊乱, 其病理上可表现为肝脏脂肪异常沉积或肝组织不同程度的损伤^[5-6]。然而, 草鱼长期摄入高脂饲料后引发其肝脏脂肪代谢异常的作用机制仍不清楚。

作为体内脂肪合成的关键酶之一, 乙酰辅酶 A 羧化酶 1 (ACC1) 参与了长链脂肪酸从头合成的第 1 步反应, 其活性高低可直接影响肝脏对脂肪的合成速度, 对调控肝组织的脂肪代谢活动具有重要作用^[7-8]。因此, 研究和分析摄入高脂饲料后草鱼的血清生化指标、肝胰脏生化指标以及 ACC1 mRNA 相对表达量的变化, 有助于阐明草鱼脂肪代谢的变化机制。本试验通过连续 12 周投喂草鱼高脂饲料, 以研究高脂饲料对草鱼主要生化指标和 ACC1 mRNA 表达的影响, 旨在探索草鱼对

收稿日期: 2012-07-24

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划创新团队项目 (IRT0848)

作者简介: 汪开毓 (1955—), 男, 四川荣经人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事水生动物疾病研究。E-mail: kywang@sicau.edu.cn

过量脂肪的代谢调控机理,为系统阐明草鱼营养代谢性肝病的发病机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

草鱼:购自成都市邛崃水产养殖场。鱼油:购自青岛永丰生物科技有限公司。大豆油:购自益海嘉里食品营销有限公司。

1.2 试验设计与饲料配制

试验设基础组和高脂组 2 组,每组设 3 个重复,每个重复 20 尾鱼。基础组投喂含 4.6% 脂肪的基础饲料,高脂组投喂含 8.1% 脂肪的高脂饲料。试验饲料组成及营养水平见表 1,饲料中的脂肪比例设计参考 Du 等^[4]的报道以及 SC/T 1024—2002《草鱼配合饲料》,其他营养物质的配比参考 NRC(1993)鲤鱼的营养需求。

1.3 饲养管理

健康草鱼共 120 尾,平均体重为(15.0 ± 2.4) g,雌雄随机,购回后用氯化钠溶液浸泡消毒,分组后以重复为单位驯养在 80 cm × 75 cm × 60 cm 的水族箱中,养殖水质符合 GB 11607—89《渔业水质标准》。驯养期间各组均按草鱼体重的 1% ~ 2% 投喂基础饲料,每天在 09:00、12:00、18:00 各投喂 1 次,每 2 天换水 1 次,水源为经曝气后的自来水,换水量为原来水量的 1/4 ~ 1/3,换水的同时抽去残饵和粪便。经 2 周驯养后,随机抽取 6 条草鱼,剖解,观察无异常后开始正式试验,正式试验时试验鱼饲喂对应饲料,均按饱食量投喂,试验期为 12 周。

1.4 样本采集与生长相关指标的测定

试验开始前草鱼禁食 1 d,从 2 组中各抽取 6 尾草鱼,称重后剥离肝胰脏,称量肝胰脏重量并记录。分别在正式试验开始后的第 4、8、12 周对 2 组草鱼随机采样,采样前草鱼禁食 1 d,每组各取 6 尾,称重、尾静脉采血后剖解并剥离肝胰脏,将肝胰脏称重,记录,计算肝体指数。

肝体指数 = 100 × 肝胰脏重 / 鱼体重。

1.5 血清相关指标的测定

将采集的血液样本在室温下静置 30 min,转入 4 °C 冰箱放置 3 h 后 4 000 r/min 离心 10 min,抽取上层血清,同组血清合并为 1 份,4 °C 存放,用于甘油三酯(TG)、总胆固醇(CHO)含量以及谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性的检测,上

述指标检测所用试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

表 1 试验饲料组成及营养水平(干物质基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of experimental diets (DM basis) %

项目 Items	基础饲料 Basal diet	高脂饲料 High-fat diet
原料 Ingredients		
酪蛋白 Casein	20.0	20.0
明胶 Gelatin	5.0	5.0
鱼粉 Fish meal	15.0	15.0
微晶纤维素 Microcrystalline cellulose	6.0	6.0
面粉 Flour	19.9	16.4
α-淀粉 α-starch	25.0	25.0
鱼油 Fish oil	2.8	5.0
大豆油 Soybean oil	1.8	3.1
维生素预混料 Vitamin premix ¹⁾	1.0	1.0
矿物质预混料 Mineral premix ²⁾	1.0	1.0
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	2.0	2.0
氯化胆碱 Choline chloride	0.5	0.5
合计 Total	100.0	100.0
营养水平 Nutrient levels ³⁾		
粗蛋白质 CP	30.5	30.5
粗脂肪 EE	4.6	8.1
有效磷 AP	0.6	0.6
赖氨酸 Lys	2.3	2.3
蛋氨酸 Met	0.8	0.8

¹⁾ 每千克维生素预混料含 Contained the following per kg of the vitamin premix: VA 醋酸酯 retinyl acetate (500 000 IU/g) 0.80 g, VD₃ (500 000 IU/g) 0.48 g, DL-α-生育酚醋酸酯 DL-α-tocopherol acetate (50%) 20.00 g, VK₃ (23%) 0.22 g, VB₁₂ (1%) 0.1 g, D-生物素 D-biotin (2%) 5.00 g, 叶酸 folic acid (96%) 0.52 g, 盐酸硫胺素 thiamine hydrochloride (90%) 0.13 g, VC 醋酸酯 acetic ester (93%) 7.16 g, 烟酸 nicotinic acid (99%) 2.58 g, 肌醇 inositol (99%) 52.33 g, D-泛酸钙 D-calcium pantothenate (98%) 3.07 g, 核黄素 riboflavin (80%) 0.99 g, 吡哆醇 pyridoxol (81%) 0.75 g, 玉米淀粉 corn starch 905.87 g。

²⁾ 每千克矿物质预混料含 Contained the following per kg of the mineral premix: FeSO₄ · 7H₂O (19.7% Fe) 76.14 g, CuSO₄ · 5H₂O (25.00% Cu) 1.20 g, ZnSO₄ · 7H₂O (22.5% Zn) 13.33 g, MnSO₄ · H₂O (31.8% Mn) 4.09 g, KI (3.8% I) 2.89 g, NaSeO₃ (1% Se) 5.00 g, 玉米淀粉 corn starch 897.35 g。

³⁾ 计算值 Calculated values。

1.6 肝胰脏相关指标的测定

分别从基础组和高脂组中各取 6 尾鱼,将同

组鱼的肝胰脏合并,取其中 0.2 g,按试剂盒说明制备 10% 的组织匀浆,用于肝胰脏丙二醛(MDA)含量以及超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性的检测,上述指标检测所用试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。试验第 12 周,各组取部分肝胰脏 -80 °C 冻存,用于半定量反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 ACC1 mRNA 的相对表达量。剩余的肝胰脏用福尔马林溶液固定,制作病理切片后进行苏木精-伊红(HE)染色

和苏丹 III + IV 染色,显微镜下观察肝组织形态。

1.7 肝胰脏 ACC1 mRNA 表达的半定量检测

1.7.1 引物设计

使用 Primer 5.0 和 Oligo 7.0 软件设计 RT-PCR 引物(表 2),引物序列参考 GenBank 公布的草鱼 ACC1 基因序列(登录号: HM142590)和 β -肌动蛋白(β -actin)基因序列(登录号: DQ211096)进行设计,引物由上海生工公司合成。

表 2 RT-PCR 引物序列

Table 2 Primer sequences for RT-PCR

基因 Genes	引物 Primer(5'-3')	退火温度 Annealing temperature/°C	产物长度 Length of product/bp
乙酰辅酶 A 羧化酶 1 ACC1	F: AACGAGGCAGAACGATTG R: GCGGAGTTTCCACAGACG	55.3	192
β -肌动蛋白 β -actin	F: TCTGCTATGTGGCTCTTGACT R: TACCGCAAGACTCCATACCCAA	59.4	174

1.7.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第 1 链的合成

采用 Trizol 试剂(TakaRa 公司),提取第 12 周基础组和高脂组的草鱼肝胰脏总 RNA,1% 琼脂糖凝胶电泳分析总 RNA 提取效果,紫外分光光度计测定吸光度(OD)值,计算 RNA 浓度以确定上样量。以提取的总 RNA 为模板,37 °C 15 min,85 °C 5 s 反转录合成 cDNA。上述 2 组的 cDNA 样品保存在 -20 °C 冰箱,供 RT-PCR 使用。

1.7.3 RT-PCR 和产物半定量分析

以 1.7.2 合成的 cDNA 为模板,RT-PCR 扩增 ACC1 基因片段序列。反应体系共 50 μ L。ACC1 和 β -actin 基因的反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,退火温度 55.3 °C (β -actin 基因为 59.4 °C) 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析,核酸染料(golden view)染色,用 Quantity One 462 软件分析条带丰度,计算 ACC1 mRNA 的相对表达量。

$$ACC1 \text{ mRNA 的相对表达量} = \frac{ACC1 \text{ 表达丰度}}{\beta\text{-actin 表达丰度}}$$

1.8 统计分析

所得数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理,高脂组和基础组数据进行组间差异 t 检验,同组 3 个取样时间的数据进行单因素方差分析和

Duncan 氏法多重比较,结果用平均值 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

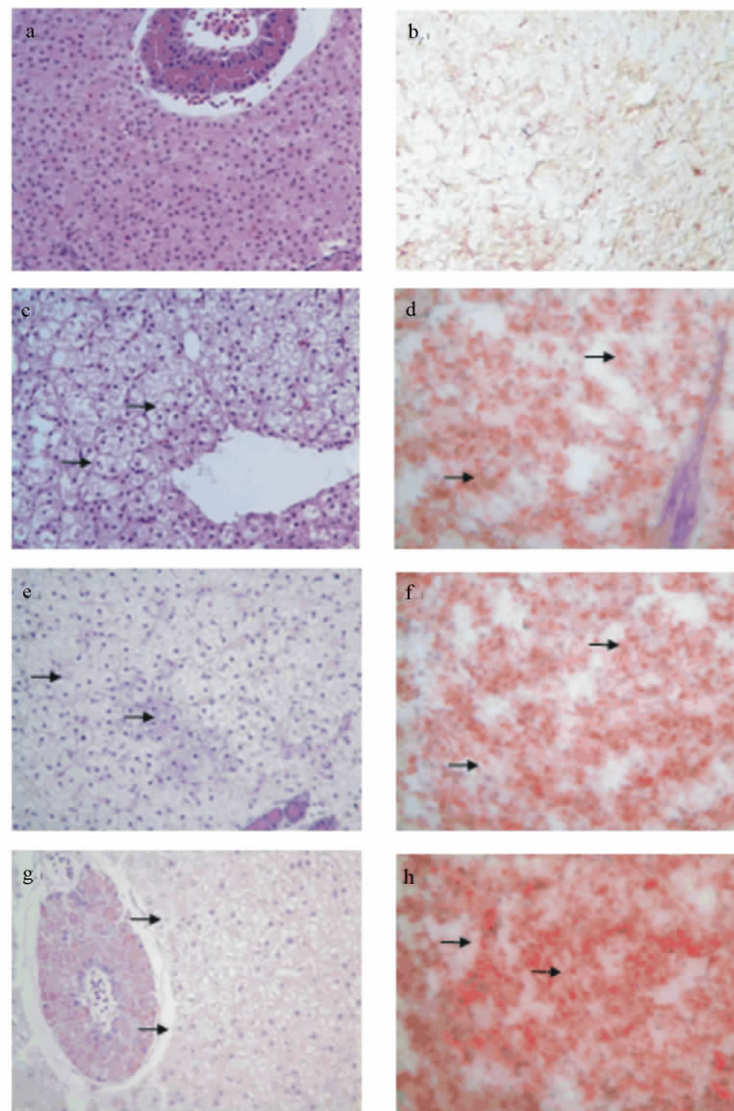
2 结果

2.1 草鱼肝胰脏组织形态学观察

试验期间,基础组草鱼肝细胞排列整齐,细胞界限清晰,细胞内有少量脂滴(图 1-a、图 1-b)。与基础组相比,高脂组草鱼第 4 周时肝细胞肿胀,部分肝细胞脂滴增多(图 1-c、图 1-d);第 8 周时肝细胞进一步肿胀,肝索排列紊乱,肝细胞内空泡体积增大,部分肝细胞核染色质浓缩、边移,肝细胞内脂滴进一步增多,并相互融合(图 1-e、图 1-f);第 12 周时脂肪变性进一步加重,肝细胞轮廓不清,部分肝细胞坏死(图 1-g、图 1-h)。

2.2 草鱼生长情况

由表 3 可知,试验初始阶段,高脂组和基础组草鱼体重差异不显著($P > 0.05$)。试验第 4 周时,高脂组草鱼体重达 35.12 g,较基础组显著升高了 9.2% ($P < 0.05$);试验第 8 周时,高脂组和基础组草鱼体重差异不显著($P > 0.05$);试验第 12 周时,高脂组草鱼体重为 98.62 g,较基础组显著降低了 11.4% ($P < 0.05$)。



a: 基础组,肝细胞和胰腺腺泡形态完整,排列整齐(HE染色); b: 基础组,肝细胞红染脂滴体积较小(苏丹Ⅲ+Ⅳ染色); c: 高脂组第4周时,肝细胞肿胀,胞浆内出现较多脂质空泡(→)(HE染色); d: 高脂组第4周时,肝细胞内红染脂滴增多(→)(苏丹Ⅲ+Ⅳ染色); e: 高脂组第8周时,肝细胞肿胀,脂质空泡增大(→)(HE染色); f: 高脂组第8周时,红染脂滴继续增多(→)(苏丹Ⅲ+Ⅳ染色); g: 高脂组第12周时,肝细胞脂肪变性更趋严重,脂质空泡增大(→)(HE染色); h: 高脂组第12周时,红染脂滴进一步增多,体积增大(→)(苏丹Ⅲ+Ⅳ染色)。

a: basal group, both hepatocytes and pancreatic alveolus were clear and arranged well (HE staining); b: basal group, a little small size red lipid droplets in hepatocytes (Sudan III + IV staining); c: high-fat group, hepatocytes swelling, and more lipid vacuoles in the cytoplasm (→) (week 4, HE staining); d: high-fat group, the number of red lipid droplets increased (→) (week 4, Sudan III + IV staining); e: high-fat group, hepatocytes swelling, and the volume of lipid vacuoles increased (→) (week 8, HE staining); f: high-fat group, lipid droplets further developed (→) (week 8, Sudan III + IV staining); g: high-fat group, hepatocyte steatosis was more serious, and the volume of lipid droplets increased (→) (week 12, HE staining); h: high-fat group, both the number and the volume of red lipid droplets further increased (→) (week 12, Sudan III + IV staining).

图1 12周内草鱼肝胰脏组织形态学观察

Fig. 1 Histomorphology observation on hepatopancreas of grass carp within 12 weeks (400 ×)

试验初始阶段,高脂组和基础组草鱼肝体指数差异不显著 ($P > 0.05$)。试验第 4 周时,高脂组草鱼肝体指数为 2.51,较基础组显著升高了 9.1% ($P < 0.05$); 试验第 8 周时,高脂组草鱼肝体指数

达 2.23,但与基础组差异不显著 ($P > 0.05$); 试验第 12 周时,高脂组草鱼肝体指数为 2.00,较基础组显著降低了 13.5% ($P < 0.05$)。

表 3 12 周内草鱼生长情况

Table 3 Growth condition of grass carp within 12 weeks

时间点 Time points	组别 Groups	体重 Body weight	肝体指数 Hepatosomatic index
初始 Initiate	基础组 Basal group	15.23 ± 1.05	2.10 ± 0.20
	高脂组 High-fat group	15.16 ± 0.57	2.16 ± 0.09
第 4 周 Week 4	基础组 Basal group	32.16 ± 2.62 [*]	2.30 ± 0.15 [*]
	高脂组 High-fat group	35.12 ± 1.47 [*]	2.51 ± 0.11 [*]
第 8 周 Week 8	基础组 Basal group	70.93 ± 5.50	2.11 ± 0.34
	高脂组 High-fat group	71.76 ± 2.49	2.23 ± 0.10
第 12 周 Week 12	基础组 Basal group	109.14 ± 7.82 [*]	2.27 ± 0.26 [*]
	高脂组 High-fat group	98.62 ± 5.57 [*]	2.00 ± 0.11 [*]

高脂组数据肩标 ** 表示与同一时间点基础组相比差异极显著 ($P < 0.01$), * 表示与同一时间点基础组相比差异显著 ($P < 0.05$)。下表同。

Values in the high-fat group with ** superscript mean significant difference compared with the basal group at the same time point ($P < 0.01$), and with * superscript mean significant difference compared with the basal group at the same time point ($P < 0.05$). The same as below.

2.3 草鱼血清生化指标的变化

投喂高脂饲料后,草鱼血清 TG、CHO 含量均在试验第 4 周有不同程度地上升,并在试验期间保持着上升的趋势。由表 4 可知,试验第 4 周时,高脂组血清 TG 含量达 2.12 mmol/L,较基础组显著升高了 89.0% ($P < 0.05$)。试验第 8、12 周的检测结果显示,高脂组血清 TG 含量分别达 2.57 和 2.71 mmol/L,较基础组分别显著升高了 70.2% 和 99.2% ($P < 0.05$)。试验期间高脂组草鱼血清 TG 含量随投喂时间的延长逐渐上升,且第 4 周与第 12 周之间差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。试验第 4 周时,高脂组血清 CHO 含量已达 5.56 mmol/L,较基础组极显著升高了 78.0% ($P < 0.01$); 试验第 8 周时,高脂组血清 CHO 含量达 5.96 mmol/L,较基础组极显著升高了 81.7% ($P < 0.01$); 试验第 12 周时,高脂组草鱼血清 CHO 含量高达 6.66 mmol/L,较基础组极显著升高了 100.6% ($P < 0.01$)。试验期间高脂组草鱼血清 CHO 含量随投喂时间的延长逐渐上升,且 3 个时间点间差异达到显著或极显著水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),试验第 8 周时较前 1 次测定结果显著升高了 7.2% ($P < 0.05$),第 12 周时较前 1 次测定结果极显著升高了 11.7% ($P < 0.01$)。

与基础组相比,高脂组草鱼血清 AST 和 ALT 活性同样在试验第 4 周有不同程度地上升,并在试验期间保持上升趋势。试验第 4 周时,高脂组草鱼血清 ALT 和 AST 活性分别为 8.57 和 12.23 U/L,较基础组分别极显著升高了 85.5% 和 188.4% ($P < 0.01$); 试验第 8 周时,高脂组草鱼血清 ALT 和 AST 活性分别为 14.69 和 24.07 U/L,均极显著高于基础组 3 倍以上 ($P < 0.01$); 试验第 12 周时,高脂组草鱼血清 ALT 和 AST 活性达 66.43 和 100.31 U/L,均极显著高于基础组 14 倍以上 ($P < 0.01$)。与血清 CHO 上升趋势类似,草鱼血清 ALT 和 AST 活性均随高脂饲料投喂时间的延长而上升,且 3 个时间点之间差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

2.4 草鱼肝胰脏生化指标的变化

由表 5 可知,试验第 4 周时,高脂组草鱼肝胰脏 MDA 含量达 3.14 nmol/mg,较基础组显著升高了 102.5% ($P < 0.05$); 试验第 8 周时,高脂组草鱼肝胰脏 MDA 含量达 7.61 nmol/mg,约为基础组的 5 倍 ($P < 0.01$); 试验第 12 周时,高脂组草鱼肝胰脏 MDA 含量为 8.22 nmol/mg,较基础组极显著升高了 230.1% ($P < 0.01$)。试验期间草鱼肝胰脏 MDA 含量随高脂饲料投喂时间的延长

而持续上升,3 个时间点之间差异达到极显著 ($P < 0.01$)。

表 4 12 周内草鱼血清生化指标的变化

Table 4 Changes in serum biochemical indices of grass carp within 12 weeks

时间点 Time points	组别 Groups	甘油三酯 TG/(mmol/L)	总胆固醇 CHO/(mmol/L)	谷丙转氨酶 ALT/(U/L)	谷草转氨酶 AST/(U/L)
第 4 周 Week 4	基础组 Basal group	1.12 ± 0.12	3.12 ± 0.09	4.62 ± 0.17	4.24 ± 0.07
	高脂组 High-fat group	2.12 ± 0.14 ^{b*}	5.56 ± 0.14 ^{b,c**}	8.57 ± 0.56 ^{c**}	12.23 ± 0.32 ^{c**}
第 8 周 Week 8	基础组 Basal group	1.51 ± 0.08	3.28 ± 0.06	4.46 ± 0.34	4.39 ± 0.59
	高脂组 High-fat group	2.57 ± 0.21 ^{ab*}	5.96 ± 0.02 ^{bb**}	14.69 ± 1.10 ^{b**}	24.07 ± 0.71 ^{b**}
第 12 周 Week 12	基础组 Basal group	1.36 ± 0.25	3.32 ± 0.01	4.52 ± 0.03	4.15 ± 0.33
	高脂组 High-fat group	2.71 ± 0.07 ^{a*}	6.66 ± 0.18 ^{aa**}	66.43 ± 2.54 ^{a**}	100.31 ± 2.46 ^{a**}

同列数据肩标不同大写字母表示不同时间点的高脂组之间差异极显著 ($P < 0.01$) ,不同小写字母表示不同时间点的高脂组之间差异显著 ($P < 0.05$) 。下表同。

In the same column, values with different capital letter superscripts mean extremely significant difference among high-fat groups of different time points ($P < 0.01$), and with different small letter superscripts mean significant difference among high-fat groups of different time points ($P < 0.05$). The same as below.

投喂高脂饲料后,草鱼肝胰脏 SOD 活性在试验第 4 周达到峰值,之后表现出下降的趋势。试验第 4 周时,高脂组草鱼肝胰脏 SOD 活性为 208.00 U/mg,较基础组显著升高了 16.3% ($P < 0.05$); 试验第 8 周时,高脂组草鱼肝胰脏 SOD 活性降至 152.56 U/mg,与高脂组第 4 周的测定结果比较下降了 36.3% ($P < 0.01$),并显著低于同期基础组 ($P < 0.05$); 试验第 12 周时,高脂组草鱼肝胰脏 SOD 活性为 156.22 U/mg,与高脂组第 8 周的测定结果比较略有上升(上升了 2.4%) ($P > 0.05$),仍显著低于同期基础组 ($P < 0.05$)。

与 SOD 活性相似,高脂组草鱼肝胰脏 CAT 活性在试验第 4 周达到峰值,之后表现出下降的趋势。试验第 4 周时,高脂组肝胰脏 CAT 活性达 625.47 U/g,约为基础组的 30 倍,差异极显著 ($P < 0.01$)。试验第 8 周和第 12 周的检测结果显示高脂组草鱼肝胰脏 CAT 活性分别为 619.39 和 290.43 U/g,均极显著高于同期基础组 14 倍以上 ($P < 0.01$)。试验期间草鱼肝胰脏 CAT 活性随着高脂饲料投喂时间的延长而下降,试验第 12 周时的检测结果与第 8 周时相比极显著降低了 113.2% ($P < 0.01$)。

表 5 12 周内草鱼肝胰脏生化指标的变化

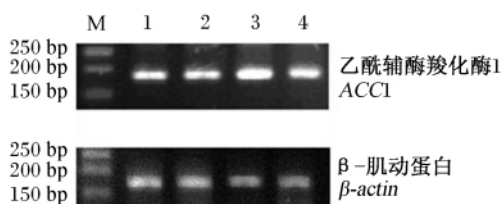
Table 5 Changes in hepatopancreas biochemical indices of grass carp within 12 weeks

时间点 Time points	组别 Groups	丙二醛 MDA/(nmol/mg)	超氧化物歧化酶 SOD/(U/mg)	过氧化氢酶 CAT/(U/g)
第 4 周 Week 4	基础组 Basal group	1.55 ± 0.51	172.88 ± 3.63	18.02 ± 1.88
	高脂组 High-fat group	3.14 ± 0.01 ^{C*}	208.00 ± 8.69 ^{Aa*}	625.47 ± 4.27 ^{Aa**}
第 8 周 Week 8	基础组 Basal group	1.57 ± 0.10	172.68 ± 0.79	20.96 ± 3.69
	高脂组 High-fat group	7.61 ± 0.07 ^{B**}	152.56 ± 9.94 ^{Bb*}	619.39 ± 7.14 ^{Aa**}
第 12 周 Week 12	基础组 Basal group	2.49 ± 0.01	187.72 ± 10.75	19.69 ± 0.32
	高脂组 High-fat group	8.22 ± 0.12 ^{A**}	156.22 ± 0.35 ^{Bb*}	290.43 ± 0.41 ^{Bb**}

2.5 草鱼肝胰脏 ACC1 mRNA 表达的变化

2% 琼脂糖凝胶电泳结果显示,RT-PCR 产物大小在 150 bp 以上,胶回收测序结果证实该产物

是目的基因的扩增片段(图 2)。经计算,高脂组草鱼肝胰脏 ACC1 mRNA 的相对表达量为 1.11,较基础组极显著升高了 33.7% ($P < 0.01$,图 3)。

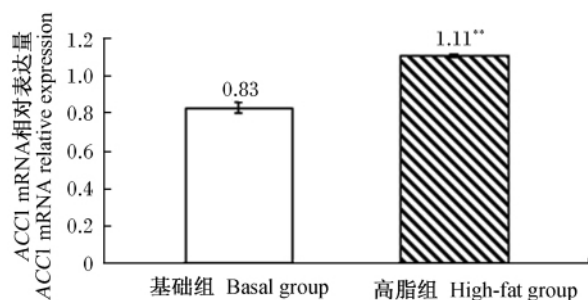


M: DNA 分子质量标准; 1: 基础组; 2: 基础组; 3: 高脂组; 4: 高脂组。

M: DNA molecular marker; 1: basal group; 2: basal group; 3: high-fat group; 4: high-fat group.

图 2 RT-PCR 产物电泳图谱

Fig. 2 Electrophoretogram of the RT-PCR products



高脂组数据肩标 ** 表示与基础组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。

Values in the high-fat group with ** superscript mean significant difference compared with the basal group ($P < 0.01$).

图 3 第 12 周草鱼肝胰脏 ACC1 mRNA 的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of ACC1 mRNA of grass carp on the week 12

3 讨论

3.1 草鱼高脂摄入与肝组织损伤

鱼类血清中 TG 和 CHO 主要源于肝脏的合成,血清中这 2 项指标的变化可在一定程度上反映肝脏对脂肪的代谢情况^[9]。本试验中,基础组草鱼血清 TG 和 CHO 含量分别为 1.33 和 3.24 mmol/L,而高脂组草鱼血清 TG 和 CHO 含量均随着投喂时间的延长而升高,试验第 4 周、第 8 周和第 12 周时这 2 项指标均显著或极显著高于基础组。有研究表明,饲料中的脂肪能被鱼类代谢为游离脂肪酸并被肝脏摄取^[10]。Du 等^[5-6]研究发现,幼龄草鱼摄入高脂饲料 6 周后血浆 TG 和 CHO 含量升高,并出现了类似哺乳动物高脂血症

的症状。本试验中草鱼摄入高脂饲料后,同样出现了血清 TG 和 CHO 含量持续升高的趋势,这说明投喂 12 周含 8.1% 脂肪的高脂饲料使草鱼摄入的游离脂肪酸过多,并进一步使肝脏合成的 TG 和 CHO 过量。这些过量的 TG 和 CHO 被转运出肝脏,使草鱼表现为血脂水平上升。

AST 和 ALT 是存在于肝细胞胞浆内的 2 种重要转氨酶,当肝细胞发生损伤或坏死时这 2 种转氨酶释放入血液,因此血清中 ALT 和 AST 活性的异常升高常提示着肝脏已发生损伤或炎症^[11-12]。在本试验中,从第 4 周开始,高脂组草鱼血清 ALT 和 AST 活性均极显著高于同期基础组。试验期间高脂组草鱼血清 AST、ALT 活性与饲料投喂时间呈正相关关系。肝胰脏组织学观察结果进一步证实,过量的脂肪摄入使草鱼肝细胞在试验第 4 周发生损伤,且在 12 周内使肝细胞损伤加重。

3.2 草鱼高脂摄入与肝胰脏脂质过氧化反应

MDA 是脂质过氧化反应产生的最终产物,可在一定程度上反映机体的过氧化程度^[11]。脂肪酸在氧化过程中可产生多种氧化应激诱导物,如活性氧(ROS)和自由基,它们既可以引起肝细胞损害,又可以通过攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,使肝脏发生氧化应激并最终产生 MDA^[13]。在本试验中,高脂组草鱼肝胰脏 MDA 含量在试验第 4 周已显著高于基础组,且 MDA 含量与饲料投喂时间呈正相关关系。这说明,连续投喂高脂饲料加速了草鱼肝脏对脂肪酸的氧化,此期间不断产生的氧化应激诱导物使 MDA 持续生成。

SOD 和 CAT 都是动物机体重要的抗氧化酶,它们可以清除 ROS 和自由基,保护机体不受损伤,但过量的 ROS 和自由基可以抑制抗氧化酶的活性,使肝脏出现低抗氧化水平^[14-15]。这在本试验高脂组草鱼上也有体现:试验第 4 周,草鱼肝胰脏中 SOD 和 CAT 活性分别达到了同期基础组的 2 和 35 倍;第 8 周时,高脂组这 2 种抗氧化酶的活性开始下降;到第 12 周时,这 2 种抗氧化酶活性均极显著低于第 4 周的检测结果。结合高脂组草鱼试验期间肝胰脏中 MDA 含量持续升高的结果,可以推断在高脂饲料投喂前 4 周,草鱼尚能通过不断提高肝胰脏中 SOD、CAT 的活性来清除机体产生的氧化应激诱导物,但过量的诱导物可能在第 4 周后超过了草鱼机体自身的清除能力,并开始抑

制机体抗氧化酶的活性。

3.3 草鱼高脂摄入后 ACC1 mRNA 表达的变化

ACC1 是肝脏内脂肪酸合成反应的限速酶,其活性的大小可以在一定程度上反映动物对脂肪的合成速率^[8]。ACC1 mRNA 的表达量受到食物、激素和其他一些生理因子的影响^[16]。已有研究证实,哺乳动物进食高脂饲料后 ACC1 mRNA 的表达量增加,而处于饥饿状态时 ACC1 mRNA 的表达受到抑制^[17]。而在鱼类上,对 ACC1 mRNA 表达量的研究较少。Matsumoto 等^[18]利用高脂饲料建立 8 周龄青鳉鱼的非酒精性脂肪肝模型,8 周后发现试验鱼肝胰脏 ACC1 mRNA 表达量增加。而 Kuwashiro 等^[19]在相同试验管理条件下从另一批 8 周龄青鳉鱼上却发现试验鱼进食同种高脂饲料 8 周后肝胰脏 ACC1 mRNA 表达量下降。本试验半定量 RT-PCR 分析结果显示,投喂高脂饲料 12 周后草鱼肝胰脏 ACC1 mRNA 相对表达量增加,极显著高于基础组,与 Matsumoto 等^[18]的研究结果相符,由此推断投喂 12 周的含 8.1% 脂肪的高脂饲料使草鱼肝胰脏 ACC1 活性上升,加快了草鱼体内脂肪酸在肝脏中从头合成的速度。通过对比 Matsumoto 等^[18]和 Kuwashiro 等^[19]的试验可以发现,鱼类 ACC1 mRNA 表达量的变化除受高脂饲料影响外,还与试验动物的体质、体内脂肪酸合成和氧化的相互作用有关。本试验仅选取了草鱼体内脂肪酸长链合成中的 1 个限速基因作为研究对象,在后续的试验中还可以将更多参与脂肪酸代谢的相关基因纳入研究范围,结合病理形态学的观察和相关生化指标的检测,更全面地研究草鱼对过量脂肪酸的代谢模式。

4 结 论

高脂饲料的连续投喂升高了草鱼的血脂水平,并使草鱼肝胰脏出现损伤,其作用机制可能与高脂饲料降低草鱼抗氧化能力以及促进肝脏脂肪合成有关。

参考文献:

- [1] 廖翔华,林鼎. 养殖鱼类营养需求研究进展[J]. 水生生物学报,1989,13(2):170-186.
- [2] 刘珂珂,王华朗. 草鱼饲料与营养需求研究进展[J]. 广东饲料,2008,17(3):36-38.
- [3] 雍文岳,黄忠志,廖朝兴,等. 饲料中脂肪含量对草鱼生长的影响[J]. 淡水渔业,1985(6):11-14.
- [4] DU Z Y, CLOUET P, DEGRACE P, et al. Hypolipidaemic effects of fenofibrate and fasting in the herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed a high-fat diet [J]. British Journal of Nutrition, 2008, 100(6):1200-1212.
- [5] DU Z Y, LIU Y J, TIAN L X, et al. Effect of dietary lipid level on growth, feed utilization and body composition by juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Aquaculture Nutrition, 2005, 11(2):139-146.
- [6] 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.
- [7] CHENG H, JI N, PENG Y, et al. Molecular characterization and tissue-specific expression of the acetyl-CoA carboxylase α gene from grass carp, *Ctenopharyngodon idella* [J]. Gene, 2011, 487:46-51.
- [8] BARBER M C, TRAVERS M T. Cloning and characterisation of multiple acetyl-CoA carboxylase transcripts in ovine adipose tissue [J]. Gene, 1995, 154(2):271-275.
- [9] 程汉良,夏德全,吴婷婷. 鱼类脂类代谢调控与脂肪肝[J]. 动物营养学报,2006,18(4):294-298.
- [10] 王兴强,段青源,麦康森,等. 养殖鱼类脂肪肝研究概况[J]. 海洋科学,2002,26(7):36-39.
- [11] 金芬芬,徐团,秦圣娟,等. 镉对长江华溪蟹肝胰脏线粒体抗氧化酶活性和脂质过氧化水平的影响[J]. 水生生物学报,2001,35(6):1019-1023.
- [12] 蒋永芳,旷晖峰. 慢性乙型病毒性肝炎患者血清 HBV DNA 水平和谷丙转氨酶与肝组织病理的关系[J]. 重庆医科大学学报,2005,30(4):578-580.
- [13] OLIVIRA C P M S, DA COSTA GAYOTTO L C, TATAI C, et al. Oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in rats fed with a choline-deficient diet [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2002, 6(3):399-406.
- [14] WOLF J, WLOFE M. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish [J]. Toxicologic Pathology, 2005, 33(1):75-85.
- [15] GRATAGLIANO I, VENDEMIALE G, CARACENI P, et al. Starvation impairs antioxidant defense in fatty livers of rats fed a choline-deficient diet [J]. The Journal of Nutrition, 2000, 130(9):2131-2136.
- [16] 岳颖,刘国华,郑爱娟,等. 生长动物脂肪代谢关键酶基因表达调控[J]. 动物营养学报,2012,24(2):232-238.
- [17] O'CALLAGHAN B L, KOO S H, WU Y, et al. Glu-

- cose regulation of the acetyl-CoA carboxylase promoter PI in rat hepatocytes [J]. *Journal of Biological Chemistry* 2001 276(19) : 16033 - 16039.
- [18] MATSUMOTO T ,TERAI S ,OISHI T ,et al. Medaka as a model for human nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Disease Models & Mechanisms* 2010 3(7/8) : 431 - 440.
- [19] KUWASHIRO S ,TERAI S ,OISHI T ,et al. Telmisartan improves nonalcoholic steatohepatitis in medaka (*Oryzias latipes*) by reducing macrophage infiltration and fat accumulation [J]. *Cell and Tissue Research* , 2011 344(1) : 125 - 134.

Changes in Main Biochemical Indices and Acetyl-CoA Carboxylase 1 mRNA Expression of Grass Carp Fed a High-Fat Diet

WANG Kaiyu MIAO Changhong HUANG Jinlu WANG Jun LIAN Hai
WU Chunyan MOU Qiaofeng FU Xi

(*Fisheries Disease Research Center , Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province ,
Sichuan Agricultural University , Ya' an 625014 , China*)

Abstract: The effects of consecutive feeding 8.1% fat diet for 12 weeks on serum biochemical indices , hepatopancreas biochemical indices and acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1) mRNA expression of grass carp were investigated to study the metabolic regulation mechanism of grass carp liver on high-fat diet. A total of 120 grass carp with an average body weight of (15.0 ± 2.4) g were randomly divided into high-fat group and basal group , and the fish in those 2 groups were fed the diets containing 8.1% (high-fat diet) and 4.6% fat (basal diet) , respectively. The contents of triglyceride (TG) and total cholesterol (CHO) and the activities of alanine aminotransferase (AST) and aspartate aminotransferase (ALT) in serum , and the content of malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in hepatopancreas were determined on the 4th , 8th and 12th weeks , respectively. On the 12th week , the tissue morphology of hepatopancreas was observed by making pathological sections , and the relative expression of ACC1 mRNA in hepatopancreas was analyzed by semi-quantitative RT-PCR. The results showed as follows: in the experimental period , the hepatocytes of grass carp of high-fat group appeared injuries , and the injuries were more and more serious with increasing the feeding time; the contents of TG and CHO and the activities of AST and ALT in serum and the content of MDA in hepatopancreas of high-fat group were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) , while the activities of SOD and CAT in hepatopancreas of high-fat group were significantly decreased with increasing the feeding time ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) . On the 12th week , the contents of TG and CHO and the activities of AST and ALT in serum and the content of MDA in hepatopancreas of high-fat group were significantly higher than those of basal group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) , whereas the activities of SOD and CAT in hepatopancreas of high-fat group were significantly lower than those of basal group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) . Compared with the basal group , the relative expression of ACC1 mRNA of high-fat group was significantly increased on the 12th week ($P < 0.01$) . The results indicate that consecutive feeding high-fat diet can increase the blood fat level and damage the hepatopancreas of grass carp , and its mechanism may be related to the high-fat diet decreasing antioxidant ability and increasing liver fat synthesis of grass carp. [*Chinese Journal of Animal Nutrition* , 2012 , 24(12) : 2375-2383]

Key words: grass carp; high-fat diet; biochemical indices; ACC1 mRNA; semi-quantitative RT-PCR