

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14254

黄斑蓝子鱼 LC-PUFA 合成代谢与渗透压调节的关系研究

谢帝芝^{1,2}, 徐树德^{1,3}, 陈芳^{1,2}, 王树启¹, 游翠红¹, 李远友¹

1. 汕头大学 海洋生物研究所 广东省海洋生物技术重点实验室, 广东 汕头 515063;

2. 河南师范大学 水产学院, 河南 新乡 453007;

3. 广东溢多利生物科技股份有限公司, 广东 珠海 519060

摘要: 为探讨黄斑蓝子鱼(*Siganus canaliculatus*)长链多不饱和脂肪酸(long-chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFA)合成代谢与渗透压调节的关系, 本研究以鱼油(FO)和混合植物油(苏子油与双低菜籽油, VO)为脂肪源配制两种等氮等脂饲料, 投喂饲养在 3 种盐度(10、20 和 32)下的黄斑蓝子鱼幼鱼 8 周后, 分析了各处理组幼鱼的生长性能和鳃的磷脂脂肪酸组成、 Na^+/K^+ -ATPase (NKA)活力及其基因表达。结果显示, 相同盐度下, VO 组和 FO 组鱼的生长性能差异不显著($P>0.05$); FO 组鱼鳃磷脂中的 n-3 LC-PUFA 含量显著高于 VO 组($P<0.05$), 但 VO 组鱼的 n-6 LC-PUFA 水平显著高于 FO 组($P<0.05$); VO 组鱼鳃的 NKA 酶活力及其 mRNA 表达量都显著高于 FO 组($P<0.05$)。不同盐度下, 无论 VO 组还是 FO 组的鱼, 盐度 10 组鱼的生长性能显著低于盐度 20 和 32 组($P<0.05$), 而其鳃的 LC-PUFA 含量、NKA 酶活力及其 mRNA 表达量都显著高于盐度 20 和 32 组($P<0.05$), 各指标在后两个盐度组之间差异不显著($P>0.05$)。由此可见, 盐度 10 对黄斑蓝子鱼具有一定的胁迫性, 导致其生长性能较差。摄食鱼油脂肪源饲料, 可以提高鱼鳃磷脂的 n-3 LC-PUFA 水平; 而摄食植物脂肪源饲料时, 鱼体可能通过自身合成的 n-6 LC-PUFA 调控鳃的 NKA 基因表达及其酶活力以调节渗透压。

关键词: 黄斑蓝子鱼; 盐度; 脂肪源; Na^+/K^+ -ATPase; 渗透压调节; LC-PUFA 合成代谢

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)05-0950-10

Na^+/K^+ -ATPase (NKA)是一个多次跨膜的整合膜蛋白, 主要功能是通过离子梯度和电位差来启动膜蛋白运输及离子通道, 维持细胞内外的渗透压平衡^[1]。近年来, 国内外学者做了大量有关 NKA 在鱼类渗透压调节的研究, 发现低渗或高渗环境中, 鱼类鳃 NKA 的酶活力及其 mRNA 表达量都保持高水平以维持渗透压平衡^[2-7]。近期研究表明, 饲料中脂肪酸组成也影响鱼体渗透压调节, 摄食富含花生四烯酸(arachidonic acid, ARA)的饲料有助于提高机体的抗应激能力^[8]。另外, ARA 还参与金头鲷(*Sparus aurata*)和条纹锯鲷(*Centropomus*

striata)NKA 基因表达和酶活力的调控^[9-10]。

鱼类不仅可以通过 NKA 的主动运输调节体内外的离子浓度, 还可以通过改变细胞膜磷脂中 LC-PUFA 水平, 调整膜的通透性, 以维持体内正常的渗透压^[11]。Nano 等^[12]用棕榈酸和 LC-PUFA 培养 Caco-2 细胞, 研究发现, 棕榈酸对细胞膜的流动性没有显著影响, 但细胞膜的流动性却与 LC-PUFA 的添加成正比。近年来有研究报道, 环境盐度影响鱼类组织脂肪酸的组成。低盐条件下, 大西洋鲑(*Salmo salar*)^[13]、黄斑蓝子鱼(*Siganus canaliculatus*)^[14]、真鲷(*Pagrus major*)^[15]组织中

收稿日期: 2014-07-04; 修订日期: 2014-07-29.

基金项目: 国家自然科学基金重大国际合作研究项目(31110103913); 国家自然科学基金面上项目(41276179); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31202012, 31202011).

作者简介: 谢帝芝(1986-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为水产动物营养与饲料. E-mail: xiedizhi@qq.com

通信作者: 李远友, 教授, 博士生导师. E-mail: yyli@stu.edu.cn

LC-PUFA 含量更高。这表明鱼类可以通过调整体内脂代谢, 增加体内 LC-PUFA 的合成, 以提高生物膜中 LC-PUFA 的含量, 从而改变膜的离子通透性来适应环境的盐度变化。

前期研究表明, 黄斑蓝子鱼 LC-PUFA 合成代谢受环境盐度和饲料脂肪源影响^[14]。为了探讨黄斑蓝子鱼渗透压调节与 LC-PUFA 合成代谢之间的关系, 以及不同脂肪源对 NKA 的营养调控机制, 本研究以鱼油和混合植物油为脂肪源配制两组饲料, 分别于 10、20 和 32 盐度条件下养殖 8 周。养殖结束后, 分别比较分析不同处理组的生长性能、鳃磷脂脂肪酸组成, 以及鳃 NKA 酶活力及其基因表达量, 为解释鱼类渗透压调节与 LC-PUFA 合成代谢之间的联系提供实验证据, 并初步揭示摄食不同脂肪源饲料的黄斑蓝子鱼对盐度变化的抗应激机制, 为黄斑蓝子鱼的健康养殖提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲料

实验所用黄斑蓝子鱼幼鱼捕自汕头大学海洋生物技术重点实验室南澳临海实验站附近海域。挑选健壮、体重约 7.5 g 的幼鱼于室内水泥池中用天然海水(盐度 32)暂养 1 周后, 将鱼分为 3 组: 一组鱼继续养在天然海水中, 另外两组分别于盐度 20 和 10 的水泥池中暂养 2 周。然后, 将 3 种盐度条件下的鱼转移至相应盐度水体的正式实验用水族箱中进行适应性养殖 2 周, 每个水族箱中放鱼 20 尾。暂养期间, 统一采用两种实验饲料等量混合投喂。

以大豆浓缩蛋白为蛋白源, 以鱼油(FO)与混合植物油(苏子油和双低菜籽油, VO)为脂肪源, 设计两组粗蛋白和粗脂肪含量分别为 350 g/kg 和 80 g/kg 的等氮等脂基础饲料。将所有的原料混合均匀后, 加入适量的蒸馏水再次混匀, 用硬颗粒挤压机(上海渔船渔机研究所)压制硬颗粒料, 自然晾干, 密封后置于 -20 °C 冰箱中保存备用。实验饲料配方及营养成分见表 1。

1.2 实验设计与样本采集

养殖实验开展前, 实验鱼禁食 24 h, 转入含

0.01% 苯氧基乙醇(2-phenoxyethanol)的自然海水中麻醉, 然后用纱布抹干体表水分, 逐一称重统计初始体重。360 尾鱼随机分配到 18 个水族缸(直径 0.9 m, 高 1 m), 每缸 20 尾鱼, 实验分 6 组, 每个处理组 3 个平行。养殖期间, 每天早晚各换 1 次水, 每次换水量是总体积的 1/2, 保持水质状况良好; 每天饱食投喂 2 次(8:30, 16:30), 并记录好日摄食量; 每天除了吸底、换水和投饵时停气外, 其他时间保持连续适量充气; 饲养水温为(22±3)°C, 自然光照。

实验开始时, 在每个盐度处理组中各取 3 尾全鱼以及 3 份鳃组织作为初始样本。实验结束时, 所有实验鱼逐一称重统计终末体重; 每缸随机取 4 尾全鱼(每组 12 尾)及 6 份鳃组织作为终末样本。所有全鱼与鳃组织样本经液氮速冻后, 存于 -80 °C 冰箱备用。实验饲料和全鱼生化成分的分析方法与本实验室前期研究方法一致, 实验步骤详细描述见本课题前期研究工作^[14, 16]。

1.3 鳃磷脂脂肪酸成分测定

采用经典的氯仿-甲醇法提取饲料和全鱼样本的总脂, 且添加 0.01% 二丁基羟基甲苯(butylated hydroxytoluene, BHT)作为抗氧化剂。磷脂分离具体方法: 将 30 mg 总脂溶解于 500 μ L 正己烷; 将其转入 Waterman 硅胶滤筒(Waterman, 美国)中; 待吸附后, 以 25 mL/min 向滤筒中注入 20 mL 氯仿洗脱非极性脂; 同样流速, 30 mL 甲醇洗脱滤筒余下的磷脂, 干燥称重。脂肪酸甲酯化的制备采用三氟化硼乙醚(ca. 48%, Acros Organics, USA)催化法。脂肪酸的检测使用日本岛津公司 GC-17A 型气相色谱仪进行分析测定(色谱柱: 美国瓦里安公司 VF-23 ms, 30 m×0.25 mm×0.25 μ m)。脂肪酸成分的鉴定根据 Sigma 公司的脂肪酸标准品, 采用面积归一法计算各组脂肪酸所占的面积百分比。总脂与脂肪酸甲酯实验具体操作步骤见 Li 等^[14, 16]。

1.4 鳃 NKA 酶活力测定

鳃组织 NKA 酶活力的测定使用南京建成生物工程研究所的测试盒。具体操作按试剂盒说明书进行。

表 1 实验饲料配方及营养成分
Tab. 1 Ingredients and composition of experimental diets

成分 ingredient	%干物质 dry matter basis	
	饲料组别 dietary group	
	鱼油脂肪源饲料 FO	混合植物油脂肪源饲料 VO
大豆浓缩蛋白 soy protein concentrate	500.0	500.0
淀粉 dextrin	240.0	240.0
α -淀粉 α -starch	50.0	50.0
纤维素 cellulose	50.0	50.0
混合矿物质 ¹ mineral mix ¹	40.0	40.0
混合维生素 ² vitamin mix ²	20.0	20.0
氯化胆碱 choline chloride	0.8	0.8
磷酸氢二钙 dicalcium phosphate	5.0	5.0
维生素 C vitamin C	0.2	0.2
L-赖氨酸 L-lysine	5.0	5.0
DL-蛋氨酸 DL-methionine	5.0	5.0
甜菜碱 betaine	3.0	3.0
三氧化二铬 Cr ₂ O ₃	2.0	2.0
鱼油 fish oil	80.0	0.0
双低菜籽油 canola oil	0.0	28.5
苏子油 perilla oil	0.0	51.5
常规成分 proximate composition		
干物质 dry matter	910.0	907.8
粗蛋白 crude protein	351.0	352.6
粗脂肪 crude lipid	80.5	80.2
灰分 ash content	75.5	71.5

注: 1. 每千克混合矿物质中含有: 钾 100 g, 镁 30 g, 铁 8 g, 钼 1 g, 锌 30 g, 锰 2 g, 钴 1 g, 碘 500 mg, 硒 40 mg. 2. 每千克混合维生素中含有: 维生素 A 4×10⁶ IU, 维生素 D₃ 2×10⁶ IU, 维生素 E 60 g, 维生素 K₃ 6 g, 维生素 B₁ 7.5 g, B₂ 16 g, B₆ 12 g, B₁₂ 100 mg, 烟酸 88 g, 泛酸钙 36 g, 叶酸 2 g, 生物素 100 mg, 肌醇 100 g, 单磷脂 200 g. 两者均购于广州诚一公司.

Note: 1. One kilogram of mineral mix containing the following: K 100 g, Mg 30 g, Fe 8 g, Mo 1 g, Zn 30 g, Mn 2 g, Co 1 g, I 500 mg, Se 40 mg. 2. One kilogram of vitamin mix containing the following: A 4×10⁶ IU, D₃ 2×10⁶ IU, E 60 g, K₃ 6 g, B₁ 7.5 g, B₂ 16 g, B₆ 12 g, B₁₂ 100 mg, nicotinic acid 88 g, calcium pantothenate 36 g, folic acid 2 g, biotin 100 mg, inositol 100 g, C-monophopholipid 200 g. Supplied by Chengyi Co., Ltd., China.

1.5 RNA 提取与实时定量 PCR 分析

按 Trizol 试剂盒(Invitrogen, 美国)说明书提取黄斑蓝子鱼鳃组织总 RNA。使用天根公司的 RNA 反转录试剂盒合成无 gDNA 污染的 cDNA。以 β -actin 基因为内参, 采用实时定量 PCR (Real-time PCR)分析各组别鳃组织中 *NKA* 基因的表达量。采用循环阈值(C_T)法^[17]统计分析 3 个关键酶基因的相对表达量。依据黄斑蓝子鱼 *NKA* (GeneBank 登录号: EU107280) 和 β -actin (EU107278.1)基因序列设计两对特异性引物, 引物

序列见表 2。Real-time PCR 反应体系为: ddH₂O 6 μ L, SYBR Green Supermix 10 μ L, 引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, cDNA(10 ng/ μ L) 2 μ L。反应条件为: 94℃变性 5min; 95℃ 10 s, 60℃ 20 s, 72℃ 20 s, 45 个循环; 95℃ 5 s, 65℃ 1 min, 40℃降温 10 s。每个样本重复 3 个反应。

1.6 数据统计分析

数据以平均值±标准误 ($\bar{x} \pm SE$)表示, 利用 SPSS 17.0 程序通过单因素方差分析(ANOVA)比较各实验组间的差异性, 差异显著水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 盐度与脂肪源对生长性能、饲料利用率和常规生化成分的影响

分析终末样本,发现相同盐度条件下,不同脂肪源对蓝子鱼的末重、增重率、特定生长率、饲料利用率和脂肪沉积率等生长性能指标没有显著影响($P>0.05$)。然而,不同盐度条件下,无论

VO 组还是 FO 组鱼,盐度 32 组和 20 组的生长性能指标都显著高于盐度 10 组($P<0.05$),且前两盐度组之间的生长性能指标无显著差异($P>0.05$)。同样,全鱼的水分、粗蛋白、粗脂肪和粗灰分等常规成分指标都不受饲料脂肪源的影响,盐度 32 组和 20 组之间的鱼体常规成分无显著性差异($P>0.05$),但都与盐度 10 组之间存在显著性差异($P<0.05$,表 3)。

表 2 关键酶基因实时定量 PCR 引物
Tab. 2 Primers for real-time PCR determination of the key enzyme genes expression

基因 transcript	引物名 primer	序列 (5'-3') sequence (5'-3')	GenBank 登录号 accession no.
NKA	NKA S	TGGTCCCCGCCATCTCTCT	EU107280
	NKA A	TCAGCAGGTCCATCGGGTAG	
β -actin	BS	CTTCCTTCCTCGGTATGGAGTC	EU107278.1
	BA	AGGTGGAGCAATGATCTTGATC	

表 3 不同处理组黄斑蓝子鱼生长性能和常规生化指标
Tab. 3 Growth performance and proximate composition of *Siganus canaliculatus* at different treatments

生长指标 growth performance	处理组别 treatment					
	10		20		32	
	VO	FO	VO	FO	VO	FO
初始体重/g initial body weight, IBW	17.59±0.34	17.96±0.06	18.04±0.29	18.37±0.18	18.40±0.32	18.20±0.16
终末体重/g final body weight, FBW	34.37±0.58 ^b	37.98±2.24 ^b	43.94±0.85 ^a	46.99±0.90 ^a	42.79±2.38 ^a	46.28±0.92 ^a
增重率/% weight gain rate	95.38±8.51 ^c	111.48±13.21 ^{bc}	137.17±7.09 ^{ab}	151.95±2.73 ^a	138.88±4.40 ^{ab}	158.10±2.89 ^a
特定生长率/(%·d ⁻¹) special growth rate	1.16±0.04 ^c	1.33±0.11 ^{bc}	1.54±0.13 ^{ab}	1.65±0.02 ^a	1.52±0.05 ^{ab}	1.69±0.02 ^a
饲料系数 feed conversion ratio	1.74±0.03	1.73±0.06	1.76±0.04	1.78±0.05	1.80±0.08	1.87±0.07
生化组成 proximate composition						
水分 moisture	71.13±0.43 ^a	71.34±0.59 ^a	69.14±0.81 ^b	67.51±0.41 ^b	65.64±0.41 ^b	67.18±0.85 ^b
粗蛋白 crude protein	17.50±0.44 ^b	17.92±0.45 ^{ab}	17.95±0.42 ^{ab}	19.44±0.18 ^a	19.11±0.76 ^{ab}	20.16±0.59 ^a
粗脂肪 crude lipid	9.38±0.33 ^b	9.16±0.33 ^b	11.08±0.78 ^a	10.89±0.12 ^a	12.10±0.69 ^a	11.52±0.22 ^a
灰分 ash	3.18±0.16 ^a	3.01±0.16 ^{ab}	2.46±0.28 ^b	2.30±0.39 ^b	2.85±0.11 ^b	2.51±0.09 ^b

注:同行数据标有不同小写字母者表示组间差异显著($P<0.05$)。增重率(%)=100×(终末体重-初始体重)/初始体重;特定生长率(%·d⁻¹)=100×[ln(终末体重)-ln(初始体重)]/养殖天数;饲料系数=饲料消耗量(g,干重)/增重率(g,湿重)。
Note: Values within the same row with different letters are significantly different ($P<0.05$). Weight gain rate (%) =100×(FBW-IBW)/IBW. Special growth rate (%·d⁻¹)=100×[ln(FBW)-ln(IBW)]/days. Feed conversion ratio= dry feed consumed (g)/wet weight gain (g).

2.2 饲料与各处理组鳃磷脂脂肪酸组成

饲料和各处理组鳃磷脂脂肪酸组成见表 4。相同盐度条件下,FO 组和 VO 组鳃磷脂大多数脂肪酸之间存在显著性差异,如饱和脂肪酸(saturated fatty acids, SFA)、单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acids, MUFA)、C₁₈ PUFA 和 LC-PUFA。不同盐度条件下,摄食相同脂肪源的饲料时,盐度 10 组的 n-3 LC-PUFA 和 n-6 LC-PUFA 含量都高于其在盐度 20 组和 32 组中的含量。各 VO 组鳃磷

脂中,n-6 LC-PUFA 含量显著高于 FO 组($P<0.05$)。

2.3 盐度与脂肪源对鳃 NKA 酶活力的影响

如图 1 所示,相同盐度下,VO 组鳃 NKA 酶活力都显著性高于 FO 组($P<0.05$)。FO 脂肪源饲料中所含的 LC-PUFA (EPA、DHA)可能抑制 NKA 酶活力。不同盐度下,无论 VO 组还是 FO 组,盐度 10 组鳃 NKA 酶活力都显著性高于盐度 20 组和 32 组($P<0.05$),而后两个盐度组之间的 NKA 酶活力无显著性差异($P>0.05$)。

表 4 实验饲料与各处理组黄斑蓝子鱼鳃磷脂脂肪酸组成(面积百分比)

Tab. 4 Main fatty acids composition of phospholipid in experimental diets and gill of *Siganus canaliculatus* at different treatments (%area)
n=3; $\bar{x} \pm \text{SE}$

	饲料组别 dietary group		处理组别 treatment					
			10		20		32	
	VO	FO	VO	FO	VO	FO	VO	FO
C18: 2n6	22.43	3.87	0.16±0.02 ^a	0.09±0.01 ^b	0.1±0.01 ^{ab}	0.04±0.01 ^c	0.11±0.03 ^{ab}	0.02±0.01 ^c
C18: 3n6	0.27	0.18	0.21±0.02 ^a	0.16±0.00 ^{ab}	0.20±0.04 ^{ab}	0.10±0.00 ^{ab}	0.18±0.06 ^{ab}	0.09±0.02 ^b
C20: 2n6	/	0.05	0.28±0.02 ^a	0.10±0.00 ^b	0.23±0.02 ^a	0.09±0.01 ^b	0.27±0.05 ^a	0.09±0.01 ^b
C20: 3n6	/	0.07	0.27±0.02 ^a	0.18±0.01 ^b	0.21±0.01 ^{ab}	0.12±0.00 ^c	0.20±0.01 ^{ab}	0.12±0.01 ^c
C20: 4n6	/	0.64	0.59±0.02	0.52±0.03	0.55±0.03	0.50±0.02	0.54±0.04	0.51±0.02
C18: 3n3	38.08	3.75	12.35±1.18 ^a	0.76±0.08 ^c	8.73±0.41 ^b	0.59±0.01 ^c	7.09±0.29 ^b	0.60±0.09 ^c
C18: 4n3	/	1.95	2.13±0.32 ^a	0.28±0.05 ^d	1.66±0.04 ^b	0.20±0.00 ^d	1.16±0.03 ^c	0.15±0.02 ^d
C20: 3n3	/	0.14	0.10±0.01 ^b	0.16±0.03 ^a	0.08±0.01 ^b	0.08±0.01 ^b	0.06±0.00 ^b	0.08±0.01 ^b
C20: 5n3	/	7.83	0.42±0.01 ^b	0.67±0.02 ^a	0.38±0.03 ^b	0.48±0.01 ^{ab}	0.41±0.01 ^b	0.50±0.03 ^{ab}
C22: 5n3	/	0.69	0.23±0.05	0.33±0.03	0.28±0.02	0.24±0.02	0.24±0.04	0.34±0.02
C22: 6n3	/	11.86	6.98±0.19 ^c	10.55±0.22 ^a	6.00±0.28 ^d	8.25±0.09 ^b	5.20±0.15 ^d	7.65±0.02 ^b
SFA	13.38	26.11	61.92±2.73 ^c	75.51±0.65 ^a	64.71±1.48 ^{bc}	73.36±5.22 ^{ab}	64.20±1.10 ^{bc}	77.12±1.54 ^a
MUFA	15.94	19.33	13.08±0.30 ^{ab}	11.17±0.85 ^b	13.79±0.94 ^a	10.61±0.62 ^b	15.66±1.66 ^a	12.76±0.47 ^b
n-6 C18PUFA	22.70	4.05	0.37±0.04 ^a	0.25±0.01 ^{ab}	0.30±0.03 ^a	0.14±0.01 ^b	0.30±0.09 ^a	0.11±0.01 ^b
n-3 C18PUFA	38.08	5.69	14.48±1.50 ^a	1.04±0.13 ^d	10.39±0.37 ^b	0.80±0.02 ^c	8.25±0.16 ^c	0.75±0.07 ^e
n-6 LC-PUFA	/	0.76	1.32±0.01 ^a	0.89±0.04 ^c	1.17±0.02 ^b	0.72±0.05 ^d	1.16±0.03 ^b	0.74±0.01 ^d
n-3 LC-PUFA	/	20.72	7.73±0.23 ^c	11.71±0.26 ^a	6.64±0.28 ^d	8.96±0.21 ^b	5.92±0.13 ^d	8.47±0.01 ^b

注: 同行数据标有不同小写字母者表示组间差异显著($P<0.05$).
Note: Values within the same row with different letters are significantly different ($P<0.05$).

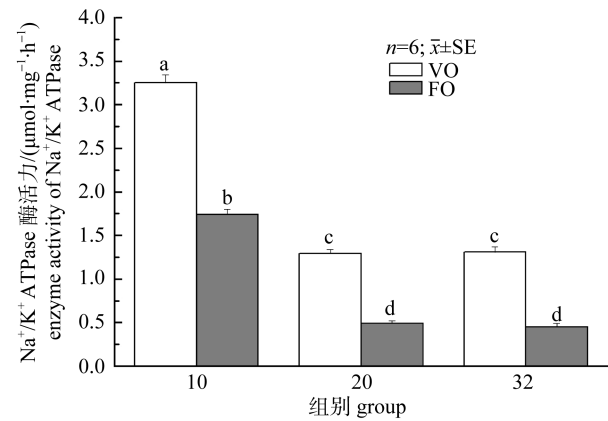


图 1 不同处理组鳃组织 Na^+/K^+ -ATPase 酶活力
柱上不同字母代表不同组间差异性显著($P<0.05$).

Fig. 1 Enzyme activity of Na^+/K^+ -ATPase in gills of *Siganus canaliculatus* at different treatment
Different letters show significant differences between different groups ($P<0.05$).

2.4 盐度与脂肪源对鳃 *NKA* mRNA 表达影响

如图 2 所示, 各组鳃 *NKA* mRNA 表达量趋势与其酶活力一致。相同盐度下, VO 组鳃 *NKA*

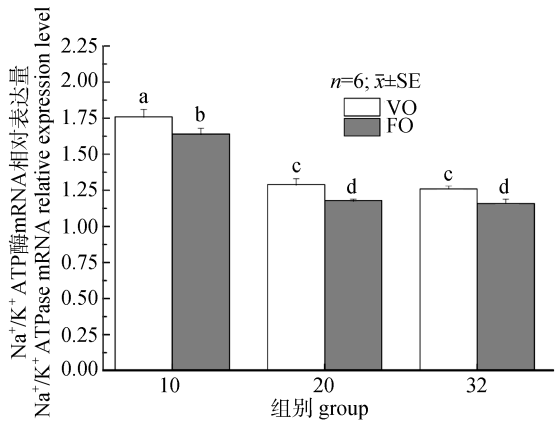


图 2 不同处理组鳃组织 Na^+/K^+ -ATPase mRNA 相对表达量
柱上不同字母代表不同组间显著性差异($P<0.05$).

Fig. 2 mRNA expression of Na^+/K^+ -ATPase relative to β -actin in gills of *Siganus canaliculatus* at different treatments.
Different letters show significant differences between different groups ($P<0.05$).

mRNA 表达量都显著高于相同盐度条件下的 FO 组($P<0.05$)。不同盐度下, 无论 VO 组还是 FO 组, 盐度 10 组鳃 *NKA* mRNA 表达量都显著高于盐度

20 组和 32 组($P<0.05$), 盐度 20 组和 32 组之间的 NKA mRNA 表达量无显著性差异。

3 讨论

渗透压平衡调节主要通过 NKA 酶主动运输实现, 而主动运输过程中需要消耗大量的能量^[18], 当鱼类生活在偏离等渗点的盐度环境下, 需消耗 10%~20% 甚至更多的能量来维持其渗透压平衡, 从而影响机体正常生长^[19]。从本研究生长指标来看, 相同脂肪源条件下, 盐度 10 组增重率和特定生长率都显著低于盐度 20 组和 32 组。有关盐度对渗透压调节的研究表明, 广盐性鱼类的 NKA 活力一般在其等渗点附近最低^[20-21]。本研究也发现, 在自然海水或接近自然海水条件下, 黄斑蓝子鱼鳃 NKA 酶活力显著性低于低盐组鱼体。说明 10 盐度对黄斑蓝子鱼属于低渗环境, 且黄斑蓝子鱼养殖水体盐度不宜低至 10。

环境盐度不仅影响鱼类 NKA 酶活力, 而且还调控机体 NKA 基因表达。南乳鱼 (*Galaxias maculatus*) 和鲑属鱼在适应海水环境时, 鳃 NKA α -1b 显著上调, 而 NKA α -1a 显著下调^[4, 22]。Tang 等^[3]分析了盐度对淡水青鳉 (*Oryzias latipes*) 和海水青鳉 (*Oryzias dancena*) 鳃 NKA 基因表达影响, 发现在适应盐度变化过程中, 鳃 NKA α 基因表达量显著提高。相似的是, 与自然环境盐度相近的 20 与 32 盐度下, 黄斑蓝子鱼鳃 NKA mRNA 显著低于盐度 10 组。另外, 有关鱼类 NKA 的免疫组织化学实验发现, 广盐性鱼类在与自然栖息环境相近的盐度条件下, 其 NKA 蛋白表达量最低^[7, 23]。以上结果表明, 与 NKA 酶活力一致, 其基因表达也在鱼类等渗点附近最低。

为了维持体内正常的渗透压, 广盐性鱼类不仅可以调整 NKA mRNA 表达以及酶活力促进离子转运, 还可以改变组织脂肪酸的组成以提高膜的流动性。膜脂 n-3 LC-PUFA 水平直接影响细胞膜的流动性, 以及离体通道的通透性^[9]。本研究发现, 摄食相同饲料脂肪源, 盐度 10 组鱼体鳃 n-3 LC-PUFA 含量显著高于盐度 20 组和 32 组。本课题组的前期研究中也发现, 低盐环境可以促

进黄斑蓝子鱼 n-3 LC-PUFA 在肝组织中积累, 同时也提高 LC-PUFA 合成代谢过程中的去饱和酶及延长酶基因表达水平^[14]。类似的现象也存在于其他海水鱼类适应低盐环境的过程中^[13, 15]。在淡水鱼欢卡频银汉鱼 (*Chirostoma estor*) 离体实验中发现, 淡水组离体细胞中无 LC-PUFA 合成活性, 而海水组离体细胞中具有较高的 LC-PUFA 合成活性, 且体内 DHA 含量也增加^[24]。同样, 生活在淡水环境中的虹鳟和樱鳟 (*Oncorhynchus masou*) 组织的 PUFA 含量较低, 而转入海水后, 体内的 PUFA 含量升高, 特别是 EPA 和 DHA 水平大幅度提高^[25-26]。一些洄游性鱼类的相关研究中, 也发现在水体盐度发生变化的阶段, 组织 LC-PUFA 含量差异明显, LC-PUFA 合成代谢活性变化显著^[27-28]。鱼类为适应环境盐度的变化, 可以通过调整体内脂代谢, 增加体内 LC-PUFA 生物合成, 以提高膜脂中 LC-PUFA 的含量, 从而改变膜的离子通透性来实现^[11]。另外, 一些与渗透压调节相关的激素, 如皮质醇、血管紧张素 II、生长素、胰岛素生长因子也可能间接地调控 LC-PUFA 合成途径^[14]。以上表明, 鱼类渗透压的调节与机体 LC-PUFA 合成代谢之间存在必然的关联。

盐度改变渗透压导致鱼体内的生物膜发生改变, 为适应生物膜参与的生理过程, 鱼类会对脂肪酸, 尤其是必需脂肪酸产生不同需求^[29]。Nano 等^[12]用棕榈酸和 LC-PUFA 培养 Caco-2 细胞的结果表明, 棕榈酸对细胞膜的流动性没有显著影响, 而细胞膜的流动性却与 LC-PUFA 的添加量成正比。Bell 等^[30]发现, 采食不同脂肪源饲料的大西洋鲑, 其鳃组织脂肪酸组成差异显著。其中, 鱼油组鱼体鳃 DHA 和 EPA 显著高于植物油组鱼体。同样, 本研究也发现, 相同盐度条件下, 摄食富含 LC-PUFA 的 FO 饲料的鱼体鳃磷脂 n-3 LC-PUFA 含量显著高于摄食 VO 饲料的鱼体。其他水产动物中也存在类似的现象, 摄食高 LC-PUFA 含量的饲料显著提高了凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 鳃中 n-3 LC-PUFA 水平^[31]。大量研究发现, 提高饲料中 EPA 和 DHA 含量有助于鱼类的渗透压调节^[32-34]。以上表明, 摄食富含 LC-PUFA 的饲

料有利于提高鱼类鳃中 n-3 LC-PUFA 水平, 促进膜脂的流动性。

同 EPA 和 DHA 一样, ARA 也在鱼类渗透压调节过程中起重要作用。比较大西洋鲑^[35]、凡纳滨对虾^[36]、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)^[37]等水生动物的肝和鳃组织的脂肪酸组成发现, 鳃中 ARA 含量都显著高于其肝组织。同样, 黄斑蓝子鱼鳃中 ARA 水平也显著高于其肝组织(数据未发表)。这说明鳃中保持高水平的 ARA 对鱼类离子转运和渗透压调节极为重要。另外, 不同盐度水体中水产动物体内 ARA 含量差异显著, 其中, 非自然水体环境中机体内的 ARA 显著性高于自然水体^[35-36]。由此可见, 在适应盐度变化的过程中, 鱼类对 LC-PUFA 有严格需求, 特别是对 ARA 的需求。

摄食富含 ARA 的饲料不仅增加了条纹石鲈(*Morone saxatilis*)组织 ARA 水平, 同时也提高了机体的抗应激能力^[38]。在金头鲷^[39]和大西洋牙鲆(*Paralichthys dentatus*)^[40]的相关研究中发现, 饲料中添加 ARA 可提高机体的抗应激反应。Atalah 等^[8]在含 EPA 和 DHA 的饲料中, 添加不同比例的 ARA 投喂欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)幼鱼, 发现机体的抗应激能力与 ARA 添加水平成正比。相反, DHA 与 EPA 却降低了小鼠 NKA 和 Ca^{2+} -ATPase 酶活力, 抑制离子交换^[41-42]。有趣的是, 采食缺乏 LC-PUFA 饲料的莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[43]和大西洋鲑^[31], 其鳃组织中的 ARA 含量反而显著高于摄食富含 LC-PUFA 饲料组。本研究也发现, 同一盐度条件下, VO 组鱼体鳃磷脂的 n-6 LC-PUFA 含量显著高于 FO 组。从一定程度上也证实了, 具有 LC-PUFA 合成能力的鱼类可经 LC-PUFA 合成途径将底物转化为 ARA, 以满足机体的生理需求^[44]。

作为类二十烷酸的 ARA 不仅可以转化为前列腺素和皮质醇参与鱼类渗透压调控^[45], 还可以通过影响 NKA mRNA 表达及其酶活力调控机体渗透压平衡。Van Anholt 等^[9]发现摄食高含量 ARA 的卤虫可提高乌鳊鱼全鱼的 NKA 酶活力, 降低机体的急性应激反应。Carrier 等^[10]采用不同 ARA 水平的饲料, 饲喂美洲黑石斑幼鱼。结果发

现, 摄食含 ARA 饲料组鱼体内的 NKA 基因表达量都显著高于对照组。本研究发现, VO 组鳃磷脂 n-6 LC-PUFA 含量显著高于 FO 组, 且其 NKA 基因表达量及酶活力都显著高于 FO 组, 说明黄斑蓝子鱼可通过自身合成 n-6 LC-PUFA 调控体内 NKA 基因的表达及其酶活力, 以维持渗透压平衡。LC-PUFA 影响 NKA 基因表达及其酶活力的具体原因, 可能是在于周围脂微环境的脂质过氧化影响 NKA 与膜脂的结合, 而 n-3 LC-PUFA 比 n-6 LC-PUFA 更易被氧化。所以相比于 n-3 LC-PUFA, n-6 LC-PUFA 有利于机体 NKA 基因的表达, 以及提高其酶活力^[46]。

本研究从生长性能、鳃磷脂脂肪酸组成, 以及鳃 NKA 基因表达与酶活力等方面, 比较分析了黄斑蓝子鱼在摄食不同脂肪源饲料条件下的渗透压调节机制, 以及 LC-PUFA 合成代谢与渗透压调节之间的联系。总之, 黄斑蓝子鱼摄食鱼油脂肪源可以提高鳃磷脂 n-3 LC-PUFA 水平, 促进膜脂流动性, 维持渗透压平衡; 摄食植物油脂肪源可通过合成的 n-6 LC-PUFA 调控体内 NKA 基因表达及其酶活力, 以调节渗透压。

参考文献:

- [1] Evans D H, Piermarini P M, Choe K P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste[J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(1): 97-177.
- [2] Kang C K, Tsai S C, Lee T H, et al. Differential expression of branchial Na^+/K^+ -ATPase of two medaka species, *Oryzias latipes* and *Oryzias dancena*, with different salinity tolerances acclimated to fresh water, brackish water and seawater[J]. *Comp Biochem Physiol A*, 2008, 151(4): 566-575.
- [3] Tang C H, Lai D Y, Lee T H. Effects of salinity acclimation on Na^+/K^+ -ATPase responses and FXD11 expression in the gills and kidneys of the Japanese eel (*Anguilla japonica*)[J]. *Comp Biochem Physiol A*, 2012, 163(3-4): 302-310.
- [4] Urbina M A, Schulte P M, Bystrinsky J S, et al. Differential expression of Na^+/K^+ -ATPase α -1 isoforms during seawater acclimation in the amphidromous galaxiid fish *Galaxias maculatus*[J]. *J Comp Physiol B*, 2013, 183(3): 345-357.
- [5] Flores A M, Shrimpton J M. Differential physiological and endocrine responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, transferred from fresh water to ion-poor or salt water[J]. *Gen*

- Comp Endocrinol, 2012, 175(2): 244–250.
- [6] Lin Y M, Chen C N, Lee T H. The expression of gill Na, K-ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to sea-water, brackish water and fresh water[J]. Comp Biochem Physiol A, 2003, 135(3): 489–497.
- [7] Kang C K, Liu F C, Chang W B, et al. Effects of low environmental salinity on the cellular profiles and expression of Na⁺, K⁺-ATPase and Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter 1 of branchial mitochondrion-rich cells in the juvenile marine fish *Monodactylus argenteus*[J]. Fish Physiol Biochem, 2012, 38(3): 665–678.
- [8] Atalah E, Hernández-Cruz C M, Ganuza E, et al. Importance of dietary arachidonic acid for the growth, survival and stress resistance of larval European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed high dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids[J]. Aquacult Res, 2011, 42(9): 1261–1268.
- [9] Van Anholt R D, Koven W M, Lutzky S, et al. Dietary supplementation with arachidonic acid alters the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae[J]. Aquaculture, 2004, 238(1–4): 369–383.
- [10] Carrier J K, Watanabe W O, Harel M, et al. Effects of dietary arachidonic acid on larval performance, fatty acid profiles, stress resistance, and expression of Na⁺/K⁺ ATPase mRNA in black sea bass *Centropristis striata*[J]. Aquaculture, 2011, 319(1–2): 111–121.
- [11] Yehuda S, Rabinovitz S, Carasso R L, et al. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane[J]. Neurobiol Aging, 2002, 23(5): 843–853.
- [12] Nano J L, Nobili C, Girard-Pipau F, et al. Effects of fatty acids on the growth of Caco-2 cells[J]. Prostagl Leuk Ess Fatty Acids, 2003, 69(4): 207–215.
- [13] Zheng X Z, Torstensen B E, Tocher D R, et al. Environmental and dietary influences on highly unsaturated fatty acid biosynthesis and expression of fatty acyl desaturase and elongase genes in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Biochim Biophys Acta-Mol Cell Biol Lipids, 2005, 1734(1): 13–24.
- [14] Li Y Y, Hu C B, Zheng Y J, et al. The effects of dietary fatty acids on liver fatty acid composition and Δ^6 -desaturase expression differ with ambient salinities in *Siganus canaliculatus*[J]. Comp Biochem Physiol B, 2008, 151(2): 183–190.
- [15] Sarker M A A, Yamamoto Y, Haga Y, et al. Influences of low salinity and dietary fatty acids on fatty acid composition and fatty acid desaturase and elongase expression in red sea bream *Pagrus major*[J]. Fish Sci, 2011, 77(3): 385–396.
- [16] Li Y Y, Chen W Z, Sun Z W, et al. Effects of n-3 HUFA content in broodstock diet on spawning performance and fatty acid composition of eggs and larvae in *Plectorhynchus cinctus*[J]. Aquaculture, 2005, 245(1–4): 263–272.
- [17] Whelan J A, Russell N B, Whelan M A. A method for absolute quantification of cDNA using real-time PCR[J]. J Immunol Meth, 2003, 278: 261–269.
- [18] Hiroi J, McCormick S D. New insight into gill ionocyte and ion transporter function in euryhaline and diadromous fish[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2012, 184(3): 257–268.
- [19] Hwang P P, Lee T H, Lin L Y. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms[J]. Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol, 2011, 301(1): R28–R47.
- [20] Tzeng W N, Lizuka Y, Shiao J C, et al. Identification and growth rate comparison of divergent migratory contingents of Japanese eel (*Anguilla japonica*)[J]. Aquaculture, 2003, 216(1–4): 77–86.
- [21] Luo M Z, Guan R Z, Jin H. Effects of salinity on Na⁺/K⁺-ATPase activity in gill and kidney of *Anguilla marmorata* and *A. bicolor pacifica* elver[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(3): 807–813. [罗鸣钟, 关瑞章, 靳恒. 盐度对花鳗鲡 (*Anguilla marmorata*) 和太平洋双色鳗鲡 (*A. bicolor pacifica*) 幼鳗鳃丝及肾脏 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力的影响[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44: 807–813.]
- [22] Bystrinsky J S, Richards J G, Schulte P M, et al. Reciprocal expression of gill Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit isoforms $\alpha 1a$ and $\alpha 1b$ during seawater acclimation of three salmonid fishes that vary in their salinity tolerance[J]. J Exp Biol, 2006, 209(10): 1848–1858.
- [23] Hwang P P, Lee T H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells[J]. Comp Biochem Phys A, 2007, 148(3): 479–497.
- [24] Fonseca-Madrigal J, Pineda-Delgado D, Martínez-Palacios C, et al. Effect of salinity on the biosynthesis of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in silverside *Chirostoma estor*[J]. Fish Physiol Biochem, 2012, 38(4): 1047–1057.
- [25] Sheridan M A, Allen W V, Kerstetter T H. Changes in the fatty acid composition of steelhead trout (*Salmo gairdnerii* Richardson), associated with parr-smolt transformation[J]. Comp Biochem Phys B, 1985, 80(4): 671–676.
- [26] Li H O, Yamada J. Changes of the fatty acid composition in smolts of masu salmon (*Oncorhynchus masou*), associated with desmoltification and sea-water transfer[J]. Comp Biochem Phys A, 1992, 103(1): 221–226.
- [27] Bell J G, Tocher D R, Farndale B M, et al. The effect of dietary lipid on polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation[J]. Lipids, 1997, 32(5): 515–525.

- [28] Tocher D R, Bell J G, Dick J R, et al. Polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation and the effects of dietary linseed and rapeseed oils[J]. *Fish Physiol Biochem*, 2000, 23(1): 59–73.
- [29] Alava V R. Effect of salinity, dietary lipid source and level on growth of milkfish (*Chanos chanos*) fry[J]. *Aquaculture*, 1998, 167(3–4): 229–236.
- [30] Bell J G, Farndale B M, Dick J R, et al. Modification of membrane fatty acid composition, eicosanoid production, and phospholipase a activity in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) gill and kidney by dietary lipid[J]. *Lipids*, 1996, 31(11): 1163–1171.
- [31] Hurtado M A, Racotta I S, Civera R, et al. Effect of hypo- and hypersaline conditions on osmolality and Na^+/K^+ -ATPase activity in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed low- and high-HUFA diets[J]. *Comp Biochem Phys A*, 2007, 147(3): 703–710.
- [32] Watanabe T, Arakawa T, Takeuchi T, et al. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficiency in juvenile striped jack *Pseudocaranx dentex*[J]. *Nippon Suisan Gakk*, 1989, 55(11): 1989–1995.
- [33] Watanabe T. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish[J]. *J World Aquacult Soc*, 1993, 24(2): 152–161.
- [34] Rainuzzo J R, Reitan K I, Olsen Y. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review[J]. *Aquaculture*, 1997, 155(1–4): 103–115.
- [35] Moya-Falcón C, Hvattum E, Dyrøy E, et al. Effects of 3-thia fatty acids on feed intake, growth, tissue fatty acid composition, β -oxidation and Na^+ , K^+ -ATPase activity in Atlantic salmon[J]. *Comp Biochem Physiol B*, 2004, 139(4): 657–668.
- [36] Hurtado M A, Racotta I S, Arjona O, et al. Effect of hypo- and hyper-saline conditions on osmolality and fatty acid composition of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) fed low- and high-HUFA diets[J]. *Aquacult Res*, 2006, 37(13): 1316–1326.
- [37] Romano N, Wu X G, Zeng C S, et al. Growth, osmoregulatory responses and changes to the lipid and fatty acid composition of organs from the mud crab, *Scylla serrata*, over a broad salinity range[J]. *Mar Biol Res*, 2014, 10(5): 460–471.
- [38] Harel M, Gavasso S, Leshin J, et al. The effect of tissue docosahexaenoic and arachidonic acids levels on hypersaline tolerance and leucocyte composition in striped bass (*Morone saxatilis*) larvae[J]. *Fish Physiol Biochem*, 2001, 24(2): 113–123.
- [39] Koven W, Barr Y, Lutzky S, et al. The effect of dietary arachidonic acid (20: 4n–6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae[J]. *Aquaculture*, 2001, 193(1–2): 107–122.
- [40] Willey S, Bengtson D A, Harel M. Arachidonic acid requirements in larval summer flounder, *Paralichthys dentatus*[J]. *Aquacult Int*, 2003, 11(1–2): 131–149.
- [41] Blaustein M P, Goldman W F, Fontana G, et al. Physiological roles of the sodium-calcium exchanger in nerve and muscle[J]. *Ann NY Acad Sci*, 1991, 639: 254–274.
- [42] Taffet G E, Pham T T, Bick D L M, et al. The calcium uptake of the rat heart sarcoplasmic reticulum is altered by dietary lipid[J]. *J Membrane Biol*, 1993, 131(1): 35–42.
- [43] Van Anholt R D, Spanings F A T, Koven W M, et al. Dietary supplementation with arachidonic acid in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) reveals physiological effects not mediated by prostaglandins[J]. *Gen Comp Endocr*, 2004, 139(3): 215–226.
- [44] Sargent J R, Tocher D R, Bell J G. The Lipids. *Fish Nutrition*[M]. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2002.
- [45] Lands W E M. Biosynthesis of prostaglandins[J]. *Annu Rev Nutr*, 1991, 11: 41–60.
- [46] Kaplan J H. Biochemistry of Na, K-ATPase[J]. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 511–535.

Research on relationship between LC-PUFA biosynthesis and osmoregulation in *Siganus canaliculatus*

XIE Dizhi^{1,2}, XU Shude^{1,3}, CHEN Fang^{1,2}, WANG Shuqi¹, YOU Cuihong¹, LI Yuanyou¹

1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, Marine Biology Institute, Shantou University, Shantou 515063, China;

2. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

3. Guangdong VTR Bio-tech Co., Ltd., Zhuhai 519060, China

Abstract: To explore the relationship between osmoregulation and long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) biosynthesis in rabbitfish (*Siganus canaliculatus*), an 8-week feeding trial was performed in juvenile rabbitfish with diets that contained fish oil (FO) or a blend of vegetable oils (VO; perilla and canola oils) at three salinities: 10, 20, and 32. The growth performance, fatty acid composition of gill phospholipids, and activity and expression levels of gill Na^+/K^+ ATPase (NKA) under different treatments were analyzed. The results showed that, at the same salinity, there was no effect of dietary lipid source on growth performance ($P>0.05$), whereas n-3 LC-PUFA content in gill phospholipids in the FO dietary groups was significantly higher than those in VO treatments ($P<0.05$). In particular, although the contents of n-6 LC-PUFA in VO-fed fish were lower than in FO-fed fish, the opposite was observed for n-6 LC-PUFA contents. Furthermore, the activity and mRNA expression levels of gill NKA in VO groups were significantly higher than those in FO groups ($P<0.05$). Under different salinities, the growth indexes at a salinity of 10 were significantly lower than those at salinities of 20 and 32 in both dietary groups ($P<0.05$), whereas the LC-PUFA contents, and activity and mRNA expression levels of NKA in fish fed VO were significantly higher than that in fish fed FO ($P<0.05$). In addition, there were no significant differences in either of the higher two salinities treatments ($P>0.05$). The results indicate that a salinity of 10 may not suitable for rabbitfish culture. Furthermore, FO-derived diets can improve n-3 LC-PUFA content in gill phospholipids, which helps maintain membrane lipid fluidity and osmotic balance. Alternatively, VO-derived diets can regulate osmotic pressure by synthesizing n-6 LC-PUFA to up-regulate NKA expression and activity.

Key words: *Siganus canaliculatus*; salinity; lipid sources; Na^+/K^+ ATPase; osmoregulation; LC-PUFA biosynthesis

Corresponding author: Li Yuanyou. E-mail: yyli@stu.edu.cn