

DOI: 10.12264/JFSC2024-0125

高脂饲料对斑马鱼脂代谢及 KLF15-TWIST2 信号通路表达的影响

杜雨凌^{1,2}, 李虹辉², 王家辉², 彭丽雯², 朱豪杰¹, 全珂¹, 罗庆华², 褚武英²

1. 长沙理工大学食品与生物工程学院, 湖南 长沙 410114;

2. 长沙学院生物与化学工程学院, 湖南省两栖爬行动物资源保护与产品加工工程技术研究中心, 湖南 长沙 410022

摘要: 为探究 KLF15-TWIST2 信号通路在斑马鱼(*Danio rerio*)脂代谢中的作用, 分析了高脂饲料对斑马鱼生理指标、组织形态和抗氧化酶活性的影响, 并探讨了脂代谢相关基因及 KLF15-TWIST2 信号通路的表达特征。结果显示, 斑马鱼摄入高脂饲料引起总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量显著上升($P<0.01$), 且体内出现大量脂滴; 超氧化物歧化酶(SOD)活性显著上升($P<0.05$), 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性显著降低($P<0.001$)。此外, 摄入高脂饲料显著增加了 KLF15 基因的表达水平($P<0.001$), 而 TWIST2 表达显著降低($P<0.05$); 脂肪合成相关基因 SREBP、FASN、ACCI、DGAT2、CEBP α 表达显著升高($P<0.05$), 脂肪分解基因 ATGL 显著降低($P<0.05$), 而脂肪酸氧化基因 PPAR α 、CPT1、LPL、LXPA 则表现出显著升高趋势($P<0.05$)。相关性分析表明 KLF15-TWIST2 信号通路与 SREBP、FASN、ACCI、ATGL、DGAT2、CEBP α 、PPAR α 、LPL 等基因的表达都具有相关性。综上所述, 高脂饲料能够引起斑马鱼体内过量脂质蓄积并导致脂代谢紊乱, 推测 KLF15-TWIST2 信号通路可能对脂代谢具有重要调控作用。

关键词: 斑马鱼; KLF15-TWIST2 信号通路; 高脂饲料; 脂代谢

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)09-1079-11

近年来, 在水产养殖过程中养殖者为了节约饲料中的蛋白质而降低成本, 高脂饲料被广泛应用于高密度集约化养殖中^[1]。饲料中添加适量的脂肪能提高蛋白质的利用效率, 有助于维持鱼类的正常生理功能, 促进生长发育。但过量的摄入会导致其体内脂肪过度蓄积, 进而引起脂代谢紊乱, 最终可能诱发脂肪肝^[2]、免疫功能障碍^[3]以及增加死亡率等风险, 严重威胁其健康, 制约了水产养殖业健康可持续发展。通过深入研究鱼类脂质代谢的调控机制并采取相应的管理措施, 可以有效降低鱼类脂质摄入过量的风险, 对保障鱼类健康具有重要意义。

锌指转录因子 Krüppel 样因子 15 (Krüppel-like factor 15, KLF15)已被证实是调控脂代谢^[4]、

葡萄糖代谢^[5]和氨基酸代谢^[6]的重要转录因子, 在促进脂肪合成与储存、机体生长和代谢平衡方面发挥着重要作用。Matoba 等^[7]使用腺病毒敲低 KLF15 后显著降低了 3T3-L1 前体脂肪细胞中的脂质含量, 过表达 KLF15 脂肪含量显著增加, 表明 KLF15 通过调节脂肪生成、抑制脂肪分解等过程影响脂代谢。Anzai 等^[8]通过对肝母细胞和成熟肝细胞中具有差异表达的转录因子进行全面筛选, 发现 KLF15 在肝细胞成熟过程中具有促进作用。研究表明, KLF15 在代谢活跃组织(如肝脏、骨骼肌、心脏)中高度表达, 由于其在营养代谢中的作用使其成为调节代谢网络的关键角色^[9-11]。Mori 等^[12]在 3T3-L1 前体脂肪细胞中证实过表达 KLF15 能够显著促进脂滴的形成, 而转染 KLF15 的负显

收稿日期: 2024-07-16; 修订日期: 2024-08-04.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(32102816); 湖南省教育厅科学研究优秀青年项目(22B0327); 国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目(U21A20263); 国家重点研发计划项目(2022YFD2400802).

作者简介: 杜雨凌(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为营养代谢与健康. E-mail: 1064980422@qq.com

通信作者: 褚武英, 教授, 研究方向为鱼类营养与品质调控. E-mail: chuwyuying18@163.com

性失活突变体得到了相反的结果。李青莹^[13]在前体脂肪细胞中通过 siRNA 干扰 *KLF15* 后,发现脂滴的形成和 TG 的含量显著下降。进一步研究认为 *KLF15* 作为一个重要的脂质处理整合因子,使其在生理和病理中发挥重要作用。

TWIST 相关蛋白 2 (twist-related protein 2, TWIST2) 是一种保守的碱性螺旋-环-螺旋 (b-HLH) 转录因子,作为一种分子开关,通过直接或间接机制激活或抑制靶基因^[14]。相关研究表明, TWIST2 调控的通路涉及炎症^[15]、能量稳态和代谢紊乱^[16], 并且发现 TWIST2 作为 3T3-L1 前体脂肪细胞分化的负调节因子发挥作用。TWIST2 敲低引起肥胖、胰岛素抵抗和肝脂肪变性,伴有炎症、内质网应激和线粒体功能障碍,而 TWIST2 的过表达可以改善肝细胞脂肪变性并抑制炎症^[17]。ChIP 分析表明, *KLF15* 可以直接与 TWIST2 启动子相互作用并增强 TWIST2 转录^[18]。因此,探索 KLF15-TWIST2 信号通路在鱼类脂代谢中的作用和可能机制,为鱼类营养调控研究提供新的思路。

目前,关于维持水产动物脂质代谢稳态的研究,主要集中在高脂饲料中添加降脂物质的方式上。Zhao 等^[19]发现枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)可以通过抑制肝脏脂肪酸的合成和促进 β -氧化来降低草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肝脂含量,还可以缓解血脂异常和肝脏氧化损伤。除此之外,三丁苷(tributyrin)对幼年大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[20]、葛根素(puerarin)对斑马鱼(*Danio rerio*)^[21]、小檗碱(berberine)对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[22]、苦瓜提取物(Bitter melon extract)对鲤(*Cyprinus carpio*)^[23]、槲皮素(Quercetin)对鲈鱼(*Lateolabrax maculatus*)^[24]都可以起到减少组织中脂肪沉淀、提高抗氧化能力、抑制炎症的作用。然而,对于高脂饲料诱导的鱼类脂代谢紊乱及其产生机制尚未完全阐明。斑马鱼由于其产卵量高、发育迅速、在脂质代谢过程中高度保守等特点,被广泛应用于代谢性疾病的研究^[25-27]。因此,本研究以斑马鱼为对象,分析高脂饲料对斑马鱼脂代谢的影响及 KLF15-TWIST2 信号通路的表达特征,初步阐明 KLF15-TWIST2 信号通路在斑马鱼

脂代谢中的调控作用,有助于更好地理解鱼类脂代谢的分子机制,以期为鱼类养殖和营养调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究所用野生型(AB系)斑马鱼来自长沙学院水生动物肌肉品质与健康实验室。选择性成熟的雌性与雄性个体作为种鱼,实验所用到的斑马鱼仔鱼通过上述雌雄种鱼交配得到。实验开始前将鱼放入室内循环水系统[水温(28.0±0.5)℃, pH(7.5±0.2)]中暂养,光周期为 14 h,暗周期为 10 h。每天定时定量喂食丰年虾和脱壳卵饲料,及时清除食物残渣和粪便。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计 将成年雌、雄斑马鱼以 2:2 比例放入 12 个繁殖隔离缸内,次日早上给予光照、抽取隔板使其交配产卵,1 h 后收集鱼卵,清除未受精的卵及粪便等杂质。将受精卵置于含海盐培养液(海盐加入量为 60 mg/L)的 125 mm 玻璃培养皿中,28℃恒温箱内进行恒温培养。在受精 5 d 后(5 day post fertilization, 5 dpf)挑选 180 尾健康状态的斑马鱼仔鱼随机分为正常组(NFD)和高脂组(HFD),将其分别放入 90 mm 玻璃培养皿中,每组设置 3 个重复,每个重复 30 尾,其中 NFD 组喂食基础饲料, HFD 组喂食高脂饲料,两种饲料营养成分详见表 1。按照 2 mg/尾鱼进行投喂,每日喂食两次(8:30 和 17:30),每次喂食后 2 h 更换培养液。实验周期为 1 周。

表 1 实验用饲料营养成分(干物质)
Tab. 1 Nutritional composition of experimental diet (dry matter)

成分 nutritional composition	含量/% content	
	正常组 NFD	高脂组 HFD
粗蛋白 crude protein	52	52
粗脂肪 crude lipid	3	11
水分 water	5	5
粗纤维 crude cellulose	2.9	2.9

1.2.2 生理指标检测 5 dpf 斑马鱼仔鱼在连续喂养 7 d 后收样,按照 1 尾仔鱼重量 1 mg 进行计

算^[28], 重量: 体积=1: 9 加入生理盐水, 将其机械匀浆, 2500 r/min 条件下离心 10 min, 取其上清液进行总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定。在测定之前, 先用总蛋白定量测试盒(BCA 法)检测各样品总蛋白量, 用于生理指标的标准化。实验所用试剂盒均购于南京建成生物工程研究所有限公司。

1.2.3 组织学观察 5 dpf 斑马鱼仔鱼在连续喂养 7 d 后收样, 样本在 4%多聚甲醛中固定 24 h, 常规石蜡包埋、切片, 经 HE 和油红 O 染色。利用显微镜观察脂滴(染色红色)并拍照, 分析其组织学特征。

1.2.4 抗氧化酶活性测定 5 dpf 斑马鱼仔鱼在连续喂养 7 d 后收样, 组织样本的处理方法参考试剂盒内的说明书进行制备。使用到的超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)试剂盒均购自于南京建成生物工程研究所有限公司。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 按照 Total-RNA 试剂盒(Omega)说明书提取总 RNA, RNA 的完整性通

过琼脂糖凝胶电泳进行检测, 浓度通过超微量分光光度计(NanoPhotometer-NP80, implen, 德国)进行测定。取 1 μg 所提取的 RNA 按照 TaKaRa 公司的 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒进行逆转录合成 cDNA, 将收集得到的 cDNA 稀释 10 倍并于 -40 ℃保存。采用实时荧光定量 PCR 技术检测相关基因(*KLF15*、*TWIST2*、*SREBP*、*FASN*、*ACC1*、*DGAT2*、*CEBPα*、*CPT1*、*ATGL*、*LPL*、*SCD*、*HSL*等)的表达量。反应总体积为 12.5 μL, 包括 SYBR Premix Ex TaqTM II 6 μL, 逆转录合成的 cDNA 模板 0.5 μL, 无酶水 5 μL, 上游引物和下游引物各 0.5 μL。反应条件为 95 ℃预变性 3 min, 95 ℃变性 5 s, 60 ℃退火 30 s, 40 个循环。每个样品 3 次技术重复, 反应结束后统计 C_t 值, 采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算各待测基因的相对表达量^[29]。所有基因引物通过 Primer Premier 5.0 软件设计, 待测基因引物序列详见表 2, 以 *GAPDH* 作为内参基因, 引物由北京擎科生物科技公司合成。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列
Tab. 2 Quantitative real-time PCR primers

引物名称 primer	正向引物(5'-3') forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') reverse primer (5'-3')
<i>KLF15</i>	GGAGACTTGAGGACCATGC	TACTAGACCCTCGCCAGCTT
<i>TWIST2</i>	CGCTCCCCTCGGATAAACTC	TGTTGTCCATCTCGTCGCTC
<i>SREBP</i>	TCGGCTTCACCAATCCTGAC	AGTGTTGTAATGCAGGGCGA
<i>FASN</i>	ACAACATAACCGCTGGAGGG	GGTTCTCAGGCAGTCAGCAT
<i>ACC1</i>	GTGGTGAGGTGGTTGGAGAG	AGGGTTAGCTTGAACCAGGC
<i>DGAT2</i>	AGCCACAGGATTCACCAAGG	ATCACGATGACCACAGCGTT
<i>CEBPα</i>	CCATCTACGACAGCCAAGCA	GTGGTGTTGAGAGTGGTGGT
<i>CPT1</i>	ACTCTCGATGGACCCTGTGA	GGCCACAGACAGAGAGTTGG
<i>ATGL</i>	AACGTGCTGGTGTCTCACTT	CGTCCACATACCTCACTCCT
<i>PPARα</i>	GCTGGACGATAGTGACCTCG	CTCGATATGCGGGACGTTCA
<i>PPARγ</i>	CGCTCGACTACAGCAGCATA	CCTGTAGATGGGCTCGTGTG
<i>LPL</i>	CAAAATTCGCACACGCAGGA	CTTCATGGGCTGGTCAGTGT
<i>LXPα</i>	TGGCATCCAGGCTATTGGAG	GAACCAACACTGCACCCCTA
<i>SCD</i>	ATCCCGACGCTCCTCAGATA	GTCGTAGGGAAACGTGTGGT
<i>HSL</i>	AGGCCCGTTACATTGCATCA	AGAGCTGACCGTTGGGATTG
<i>PLIN1</i>	GGAGCTTCTGACCCTATGCC	AGAGGATTCAGGCCAGGGAT
<i>PLIN2</i>	ACCTGAAGTCTGTGTGCGAG	ACGCCAGGTCATTTGCCATA
<i>PGC1</i>	AGGAGAGGCGAGTGGTGTAT	CATTCTCAAGGGCAGCGAGA
<i>SCAD</i>	AGCTTCATCCACTGCCAACA	GATACCGAGAGCCTGTGCTG

(待续 to be continued)

(续表 2 Tab. 2 continued)

引物名称 primer	正向引物(5′-3′) forward primer (5′-3′)	反向引物(5′-3′) reverse primer (5′-3′)
UCP1	GGTGTGGGCAGACGATACAA	CTCGTGATGTTTCGGCAGAGT
UCP2	TTCAGAGCTGGTGACGTTCC	TGGTGGAGGCTTTGTCTCC
UCP3	CTGACCAAAGAGGGACCAGC	AGAAAGGCGATTCCCACGAG
GAPDH	TGAGGTTAAGGCAGAAGGCG	AAGTAGCACCTGCATCACCC

注: *KLF15*: 锌指转录因子 Krüppel 样因子 15; *Twist* 2: Twist 相关蛋白 2; *SREBP*: 胆固醇调节元件基因; *FASN*: 脂肪酸合成酶基因; *ACCI*: 乙酰辅酶 A 羧化酶 1; *DGAT2*: 二酯酰甘油酰基转移酶基因; *CEBPa*: CCAAT 增强子结合蛋白 α; *CPT1*: 肉碱棕榈酰转移酶 1; *ATGL*: 甘油三酯水解酶基因; *PPARα*: 过氧化物酶体增殖物激活受体 α 基因; *PPARγ*: 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 基因; *LPL*: 脂蛋白脂肪酶; *LXPα*: 肝 X 受体; *SCD*: 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1; *HSL*: 激素敏感脂酶基因; *PLIN1*: 脂蛋白 1; *PLIN2*: 脂蛋白 2; *PGC1*: 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子; *SCAD*: 短链酰辅酶 A 脱氢酶; *UCP1*: 脱偶联蛋白 1; *UCP2*: 脱偶联蛋白 2; *UCP3*: 脱偶联蛋白 3; *GAPDH*: 甘油醛 3-磷酸脱氢酶。

Note: *KLF15*: Krüppel-like factor 15; *Twist* 2: twist-related protein 2; *SREBP*: sterol-regulatory element-binding proteins; *FASN*: fatty acid synthase isoform; *ACCI*: acetyl coenzyme A carboxylase 1; *DGAT2*: diacylglycerol O-acyltransferase 2; *CEBPa*: CCAAT/enhancer-binding protein alpha; *CPT1*: carnitine palmitoyltransferase 1; *ATGL*: adipose triglyceride lipase; *PPARα*: peroxisome proliferator-activated receptor α; *PPARγ*: peroxisome proliferator-activated receptor γ; *LPL*: lipoprotein lipase; *LXPα*: liver X receptor α; *SCD*: stearoyl-CoA desaturase; *HSL*: hormone-sensitive lipase; *PLIN1*: perilipin 1; *PLIN2*: perilipin 2; *PGC1*: peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1α; *SCAD*: short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase; *UCP1*: uncoupling protein 1; *UCP2*: uncoupling protein 2; *UCP3*: uncoupling protein 3; *GAPDH*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

1.3 数据处理

将实验所得数据利用 Excel 软件进行整理分析,使用 SPSS 27.0 软件对数据进行独立样本 *T* 检验(*T*-test)与显著性检验。所得结果以平均值±标准差(mean±SD)表示,当 *P*<0.05 时认为两组数据之间具有显著性差异。使用 GraphPad Prism 8 软件进行图片绘制,不同的*表示两组之间的差异(*: *P*<0.05, **: *P*<0.01, ***: *P*<0.001)

2 结果与分析

2.1 高脂饲料对斑马鱼生理指标的影响

通过高脂饲养斑马鱼仔鱼 7 d 后,分析其体内生理指标变化。结果发现,与正常饲料组相比,高脂饲料组斑马鱼仔鱼体内总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量均呈现显著升高趋势(*P*<0.01)(图 1)。

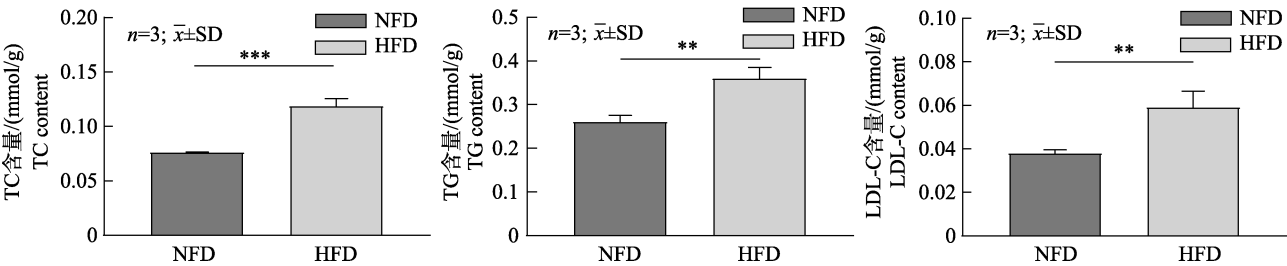


图 1 高脂饲料对斑马鱼生化指标的影响

NFD 为正常组, HFD 为高脂组, 柱形图上方星号表示差异显著(**: *P*<0.01, ***: *P*<0.001)。

Fig. 1 The effect of a high-fat diet on the biochemical indices of *Danio rerio*

NFD is the normal-fat diet group, HFD is the high-fat diet group. An asterisk above the bar graph indicates a significant difference (**: *P*<0.01, ***: *P*<0.001).

2.2 高脂饲料对斑马鱼组织形态及脂质蓄积的影响

通过 HE 和油红 O 染色观察斑马鱼仔鱼组织形态变化和脂质蓄积情况。结果发现,与正常饲

料组相比,高脂饲料组斑马鱼仔鱼出现脊索弯曲,细胞排列疏松,间隙增大,造成机体损伤(图 2a、2b),同时还观察到斑马鱼仔鱼体内蓄积大量脂滴(图 2c、2d)。

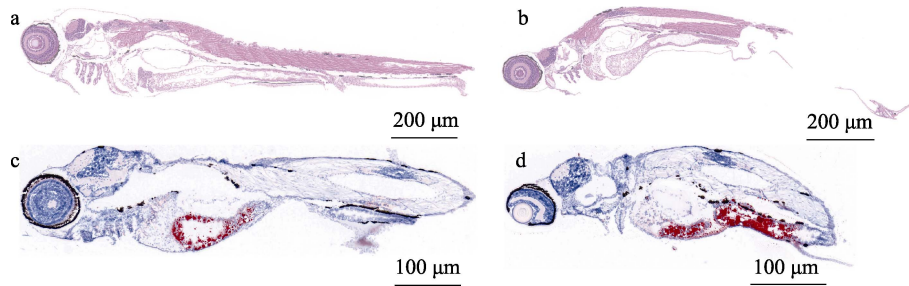


图 2 高脂饲料对斑马鱼组织形态及脂质蓄积的影响

a. NFD 组 HE 染色; b. HFD 组 HE 染色; c. NFD 组油红 O 染色; d. HFD 组油红 O 染色.

Fig. 2 The effect of a high-fat diet on tissue morphology and lipid accumulation in *Danio rerio*

a. HE staining of NFD group; b. HE staining of HFD group; c. NFD group oil red O staining; d. HFD group oil red O staining.

2.3 高脂饲料对斑马鱼抗氧化酶活性的影响

通过分析高脂饲料条件下斑马鱼抗氧化酶活性的变化, 结果发现, 与正常饲料组相比, 高脂

饲料组斑马鱼仔鱼超氧化物歧化酶(SOD)活性显著升高($P<0.05$), 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性呈现显著降低($P<0.001$)(图 3)。

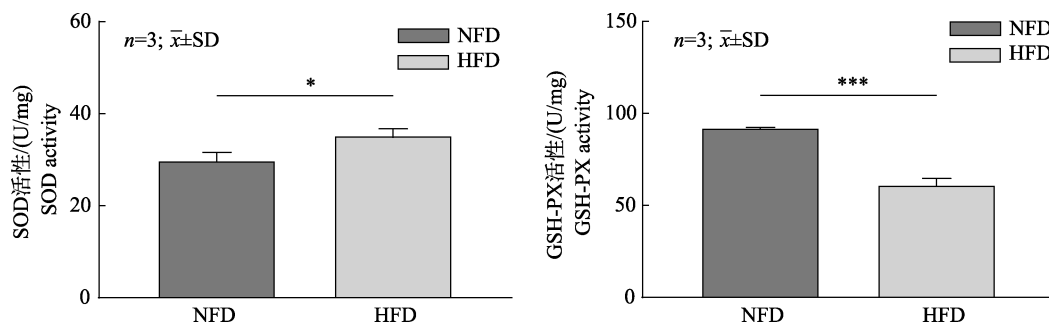


图 3 高脂饲料对斑马鱼抗氧化酶活性的影响

NFD 为正常组, HFD 为高脂组, 柱形图上方星号表示差异显著(*: $P<0.05$, ***: $P<0.001$).

Fig. 3 Effect of high-fat diet on antioxidant enzyme activities in *Danio rerio*

NFD is the normal-fat diet group, HFD is the high-fat diet group. An asterisk above the bar graph indicates significant difference (*: $P<0.05$, ***: $P<0.001$).

2.4 高脂饲料对斑马鱼 KLF15-TWIST2 信号通路及脂代谢相关基因表达的影响

通过测定高脂饲料条件下斑马鱼 KLF15-TWIST2 信号通路及脂代谢相关基因表达的变化, 初步分析 KLF15-TWIST2 信号通路在斑马鱼脂代谢中的作用。结果发现, 与正常饲料相比, 高脂饲料显著上调斑马鱼仔鱼 KLF15 的 mRNA 表达($P<0.001$), 而 TWIST2 则表现出显著下调趋势($P<0.05$)(图 4); 脂肪合成相关基因 SREBP、FASN、ACCI、DGAT2、CEBPα 和 PPARγ 的 mRNA 表达显著升高(图 5a), 而脂肪分解相关基因 ATGL 表现出显著降低趋势($P<0.05$), 脂肪酸氧化相关基因 PPARα、CPT1、LPL、LXPα 的表达显著升高

(图 5b), 脂滴包被蛋白 PLIN1 表达增加(图 5c)。相关性分析发现, KLF15 与脂代谢相关基因 SREBP、FASN、ACCI、DGAT2、CEBPα、PPARα、LPL、LXPα、PPARγ、PLIN1 和 UCPI 表达呈正相关, 与 PLIN2 呈负相关; TWIST2 与 ATGL、PLIN2 表达呈正相关, 而与 FASN、CEBPα、CPT1、LPL、LXPα、UCPI 呈负相关(图 6)。

3 讨论

3.1 高脂饲料对斑马鱼生理指标的影响

脂肪在新陈代谢中起着关键作用, 能够为鱼类提供必需的能量和营养。饲料中增加适量脂肪含量可以提高其利用效率和蛋白质沉积^[24]。然而,

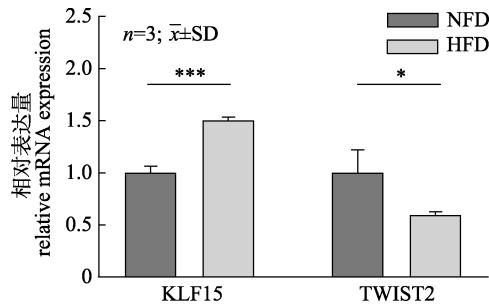


图 4 高脂饲料对斑马鱼 KLF15-TWIST2 信号通路基因表达的影响

NFD 为正常组, HFD 为高脂组, 柱形图上方星号表示差异显著 (*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$).

Fig. 4 Effect of high-fat diet on gene expression of KLF15-TWIST2 signaling pathway in *Danio rerio*. NFD is the normal-fat diet group, HFD is the high-fat diet group. An asterisk above the bar graph indicates a significant difference (*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$).

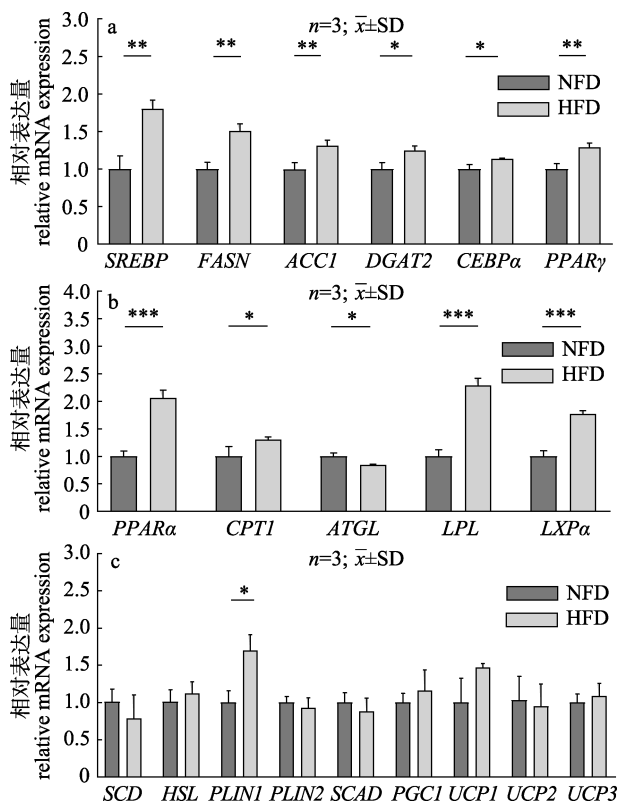


图 5 高脂饲料对斑马鱼脂代谢相关基因表达的影响

a: 脂肪合成相关基因表达; b: 脂肪酸氧化相关基因表达; c: 其他脂代谢相关基因表达; NFD 为正常组, HFD 为高脂组, 柱形图上方星号表示差异显著 (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$).

Fig. 5 Effects of high-fat diet on the expression of lipid metabolism-related genes in *Danio rerio*

a: Lipid synthesis-related gene expression; b: Fatty acid oxidation-related gene expression; c: Other lipid metabolism-related gene expression; NFD is the normal-fat diet group, HFD is the high-fat diet group. An asterisk above the bar graph indicates a significant difference (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$).

过量地摄入脂质可能导致鱼类肝脏、腹部脂肪组织和肌肉中脂质异常积累^[30]。TG 和 TC 的含量是反映机体脂代谢的重要生理指标, LDL-C 作为 TG 的主要载体之一, 其在鱼体中的作用主要是将肝脏中过多的脂肪转运到外周组织^[31]。本研究结果显示, 脂肪水平增加促使斑马鱼 TG、TC 和 LDL-C 水平升高, 并引起脂质蓄积, 与星斑篮子鱼 (*Siganus guttatus*)^[32]、黄鳝 (*Monopterus albus*)^[33]、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[34] 等水生动物的研究报道结果一致。表明机体摄入的能量超过维持正常代谢所需要的能量时, 将影响脂质转运、代谢等过程, 可能出现脂代谢紊乱、肝脏病变等问题。

3.2 高脂饲料对斑马鱼抗氧化酶活性的影响

机体的酶系统主要含有过氧化氢酶 (CAT)、SOD 以及 GSH-PX 等。SOD 可清除机体内的超氧自由基, CAT 和 GSH-PX 可清除机体内的过氧化氢, 其活性高低可以反映机体清除活性氧自由基能力的大小^[35]。在本研究中, 高脂饲料喂养后斑马鱼幼鱼 SOD 活性显著升高, 这一结果与 Liang 等^[36] 对大口黑鲈抗氧化能力的研究结果具有不同的变化趋势, 可能是因为饲料脂肪含量增加, 加快机体内防御系统运行用以修复氧化损伤。这种差异的产生可能与鱼的种类、饲养环境、脂肪来源等因素有关。本研究发现 GSH-PX 活性极显著降低, 表明体内过氧化氢自由基大量积累, 造成肝脏氧化损伤。结合油红 O 染色观察的结果分析, 在高脂胁迫条件下, 斑马鱼体内氧化体系与抗氧化体系的平衡状态受到破坏, 从而降低斑马鱼抗氧化应激能力, 引起氧化还原失衡进而造成肝脏损伤。

3.3 高脂饲料对斑马鱼 KLF15-TWIST2 信号通路及脂代谢相关基因表达的影响

通常, 脂质积累取决于脂肪酸从头合成和脂肪 β -氧化分解的平衡, 这一过程涉及多种酶和转录因子^[37]。为了进一步揭示 KLF15-TWIST2 信号轴是否影响斑马鱼脂代谢, 本研究分析了 KLF15、TWIST2 与脂代谢相关基因的表达。结果发现, 高脂饲喂后 KLF15 表达显著增加, TWIST2 表达显著减少, 这与邓玉春^[38]和 Zhang 等^[39]的研

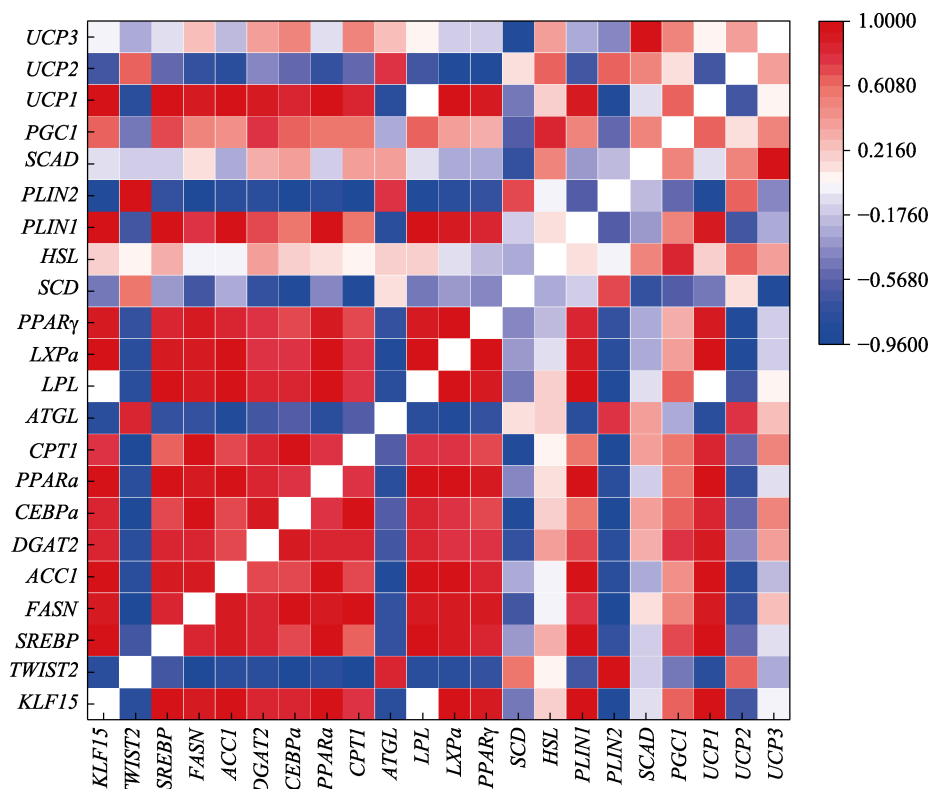


图 6 KLF15-TWIST2 信号通路与脂代谢相关基因表达相关性分析

Fig. 6 Correlation analysis between the KLF15-TWIST2 signaling pathway and the expression of lipid metabolism related genes

究相同。*SREBP*、*FASN*、*ACC1* 是参与脂肪酸合成的主要蛋白质^[25]。Wu 等^[40]发现高脂可以显著提高鲤 *SREBP*、*FASN*、*ACC1* 基因的表达水平, 这与本研究结果是一致的。*ATGL* 是参与脂肪分解的关键酶, 能够调节脂肪体大小, 在能量代谢中起着重要作用^[41]。相关研究显示, 饲料中脂肪含量的增加能够引起幼年黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*) *ATGL* 表达量降低^[42]。在本研究中, 高脂饲喂后 *ATGL* 表达量呈现显著下降趋势, 这可能是由于脂肪摄入过量, 导致体内无法及时将脂肪分解产物完全氧化利用, 进而影响脂代谢过程。

PPARα 作为最重要的调节脂肪酸氧化分解代谢的一种核转录因子, 通过促进脂肪酸氧化和酮体合成, 调节脂质的水平^[43]。*CPT1* 被认为是控制脂肪酸氧化与运输的重要调控点^[44]。当 *PPARα* 被激活后, 可上调 *CPT1* 与 *LPL* 的活性, 促进 β -氧化的发生^[45]。在珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂)^[46]的研究中认为高脂饲料摄入对 *PPARα*、*CPT1* 和 *LPL*

基因起上调影响, 而在钝吻鲷(*Megalobrama amblycephala*)^[47]中却得到了不一样的结果。在本研究中, 所得到的结果为高脂胁迫下 *PPARα*、*CPT1* 与 *LPL* 的表达显著升高, 与另一项在斑马鱼中的研究相似^[48]。这表明机体内脂肪酸摄入过多时, 其分解代谢过程加快。高脂饲料摄入后, 对 *PPARα*、*CPT1* 和 *LPL* 基因水平所产生的不同结果, 这可能与脂肪的种类和添加量、鱼的类型和实验条件等有关。

在本研究中, 基因表达和皮尔逊相关性分析结果均表明 KLF15-TWIST2 信号通路对脂代谢的调控作用。饲料中脂肪含量增加后, KLF15-TWIST2 信号通路与 *SREBP*、*FASN*、*ACC1*、*DGAT2*、*CEBPα*、*CPT1*、*ATGL*、*PPARα*、*PPARγ*、*LPL*、*LXPα*、*PLIN1*、*PLIN2*、*UCP1* 等脂代谢基因表现出相关性, 但还有一些基因例如 *SCD*、*HSL*、*PGC1*、*SCAD*、*UCP2*、*UCP3* 没有显示出相关性, 可能是因为本研究周期仅为一周, KLF15-TWIST2 信号通路与其相关性没有充分体现。

4 结论

本研究发现高脂饲料导致斑马鱼体内出现过量的脂质蓄积, 并造成组织损伤及脂代谢紊乱, *KLF15* 基因表达显著升高, 而 *TWIST2* 明显降低, 并且与 *SREBP*、*FASN*、*ACC1*、*ATGL*、*DGAT2*、*CEBP α* 、*PPAR α* 、*LPL* 等基因都具有显著相关性; 综上所述, *KLF15-TWIST2* 信号通路可能通过参与脂肪酸合成、运输、 β -氧化、分解、脂蛋白合成等过程调控脂代谢, 其分子机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Naiel M A E, Negm S S, Ghazanfar S, et al. The risk assessment of high-fat diet in farmed fish and its mitigation approaches: A review[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2023, 107(3): 948-969.
- [2] Ma J R, Kong L M, Zhou S S, et al. Effect of supplementation of chlorogenic acid to high-fat diet on growth, lipid metabolism, intestinal and hepatic histology, and gut microbiota of spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*)[J]. Metabolites, 2023, 13(10): 1067.
- [3] Yin P, Xie S W, Zhuang Z X, et al. Dietary supplementation of bile acid attenuate adverse effects of high-fat diet on growth performance, antioxidant ability, lipid accumulation and intestinal health in juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Aquaculture, 2021, 531: 735864.
- [4] Prosdocimo D A, John J E, Zhang L L, et al. KLF15 and PPAR α cooperate to regulate cardiomyocyte lipid gene expression and oxidation[J]. PPAR Research, 2015, 2015: 201625.
- [5] Takashima M, Ogawa W, Hayashi K, et al. Role of KLF15 in regulation of hepatic gluconeogenesis and metformin action[J]. Diabetes, 2010, 59(7): 1608-1615.
- [6] Zhu X, Liu J J, Cai M L, et al. The circadian rhythm regulates branched-chain amino acids metabolism in fast muscle of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) during short-term fasting by Clock-KLF15-Bcat2 pathway[J]. The British Journal of Nutrition, 2022, 130(4): 604-615.
- [7] Matoba K, Lu Y, Zhang R L, et al. Adipose KLF15 controls lipid handling to adapt to nutrient availability[J]. Cell Reports, 2017, 21(11): 3129-3140.
- [8] Anzai K, Tsuruya K, Ida K, et al. Kruppel-like factor 15 induces the development of mature hepatocyte-like cells from hepatoblasts[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): Article No.18551.
- [9] Prosdocimo D A, Anand P, Liao X D, et al. Kruppel-like factor 15 is a critical regulator of cardiac lipid metabolism[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(9): 5914-5924.
- [10] Asada M, Rauch A, Shimizu H, et al. DNA binding-dependent glucocorticoid receptor activity promotes adipogenesis via Krüppel-like factor 15 gene expression[J]. Laboratory Investigation, 2011, 91(2): 203-215.
- [11] Wu Z N, Wang S Q. Role of kruppel-like transcription factors in adipogenesis[J]. Developmental Biology, 2013, 373(2): 235-243.
- [12] Mori T, Maeda N, Inoue K, et al. A novel role for adipose ephrin-B1 in inflammatory response[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76199.
- [13] Li Q Y. Research on effects of KLF15 in porcine preadipocytes differentiation and prediction of fat deposition capacity[D]. Changchun: Jilin University, 2015. [李青莹. KLF15 对猪前体脂肪细胞分化及通过其含量预测脂肪沉积能力的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.]
- [14] Franco H L, Casasnovas J, Rodríguez-Medina J R, et al. Redundant or separate entities?—Roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene transcription[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(4): 1177-1186.
- [15] Pettersson A T, Laurencikienė J, Mejhert N, et al. A possible inflammatory role of twist1 in human white adipocytes[J]. Diabetes, 2010, 59(3): 564-571.
- [16] Ren R, Chen Z F, Zhao X, et al. A possible regulatory link between *Twist 1* and *PPAR γ* gene regulation in 3T3-L1 adipocytes[J]. Lipids in Health and Disease, 2016, 15(1): Article No.189.
- [17] Dutta A B, Lank D S, Przanowska R K, et al. Kinetic networks identify TWIST2 as a key regulatory node in adipogenesis[J]. Genome Research, 2023, 33(3): 314-331.
- [18] Zhou L L, Li Q J, Chen A, et al. KLF15-activating Twist2 ameliorated hepatic steatosis by inhibiting inflammation and improving mitochondrial dysfunction via NF- κ B-FGF21 or SREBP1c-FGF21 pathway[J]. The FASEB Journal, 2019, 33(12): 14254-14269.
- [19] Zhao H, Luo Y E, Zhang Y A, et al. Effects of *Bacillus subtilis* on hepatic lipid metabolism and oxidative stress response in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fed a high-fat diet[J]. Marine Life Science & Technology, 2020, 2(1): 50-59.
- [20] Xu N, Ding T, Liu Y T, et al. Effects of dietary tributyrin on

- growth performance, body composition, serum biochemical indexes and lipid metabolism-related genes expression of juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) fed with high level soybean oil diets[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2020, 27(2): 395-406.
- [21] Liu Y S, Yuan M H, Zhang C Y, et al. *Puerariae lobatae* radix flavonoids and puerarin alleviate alcoholic liver injury in zebrafish by regulating alcohol and lipid metabolism[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 134: 111121.
- [22] Gong Y L, Lu Q S, Liu Y L, et al. Dietary berberine alleviates high carbohydrate diet-induced intestinal damages and improves lipid metabolism in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 1010859.
- [23] Qin C B, Wang J L, Zhao W L, et al. Effects of dietary bitter melon extract on growth performance, antioxidant capacity, inflammatory cytokines expression, and intestinal microbiota in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2022, 2022: 3705943.
- [24] Dong Y Z, Xia T, Lin J B, et al. Quercetin attenuates high-fat diet-induced excessive fat deposition of spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*) through the regulatory for mitochondria and endoplasmic reticulum[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2021, 8: 746811.
- [25] Oka T, Nishimura Y, Zang L Q, et al. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity[J]. *BMC Physiology*, 2010, 10(1): Article No.21.
- [26] Wang C, Zhang C, Yu H B, et al. Glycerol monolaurate and triglycerol monolaurate alleviated high-fat diet induced lipid accumulation and damage of liver in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Aquaculture*, 2022, 561: 738616.
- [27] Han J C, Zhang R, Zhang X F, et al. Zebrafish model for screening antiatherosclerosis drugs[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2021: 9995401.
- [28] Wu L, Chen Z, Yu C, et al. Effects of high cholesterol diet on the lipid metabolism in zebrafish larvae[J]. *Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences)*, 2019, 39(7): 978-982. [武琳, 陈忠, 余翠, 等. 高胆固醇饮食对斑马鱼脂代谢的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(7): 978-982.]
- [29] Livak K J, Schmittgen D T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [30] Xie S W, Yin P, Tian L X, et al. Dietary supplementation of astaxanthin improved the growth performance, antioxidant ability and immune response of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed high-fat diet[J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(12): 642.
- [31] Cheng H L, Xia D Q, Wu T T. Fatty liver and regulation of lipids metabolism in fish[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2006, 18(4): 294-298. [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.]
- [32] Zhu W. Effects of dietary lipid levels on growth performance, nutritional components and activities of digestive enzymes of *Siganus guttatus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [朱卫. 饲料脂肪水平对点篮子鱼生长性能、营养成分及消化酶活性的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [33] Zhang Y Z, Guo F, Yang X, et al. Insights into the mechanism of growth and fat deposition by feeding different levels of lipid provided by transcriptome analysis of swamp eel (*Monopterus albus*, Zuiew 1793) liver[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1118198.
- [34] Niu H X, Lei J L, Chang J, et al. Effect of a vitamin E-supplemented high-fat diet on the growth, lipid metabolism and antioxidant function of turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(2): 291-299. [牛化欣, 雷霖霖, 常杰, 等. 维生素 E 对高脂饲料养殖大菱鲆生长、脂类代谢和抗氧化性能的影响[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(2): 291-299.]
- [35] Sailaja Rao P, Kalva S, Yerramilli A, et al. Free radicals and tissue damage: Role of antioxidants[J]. *Free Radicals and Antioxidants*, 2011, 1(4): 2-7.
- [36] Liang C, Jiao L F, Zhou Q C. Effects of choline on the growth performance, antioxidant function and lipid metabolism in juvenile largemouth bass fed with high-fat diet[J]. *Aquaculture Reports*, 2023, 30: 101605.
- [37] Xia X J. Effects of polysaccharides on muscle quality, lipid metabolism and expression of heat shock protein 70 gene of *Schizothorax prenanti* Tchang[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2015. [夏晓杰. 多糖对齐口裂腹鱼肌肉品质、脂质代谢及 HSP70 基因表达的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.]
- [38] Deng Y C. Role and mechanism of free fatty acid inhibit the expression of *KLF15* by GPR40/GPR120[D]. Shihezi: Shihezi University, 2020. [邓玉春. 游离脂肪酸通过 GPR40/GPR120 抑制 *KLF15* 表达的作用及机制研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2020.]
- [39] Zhang Y M, Ge X X, Li Y Q, et al. TWIST2 and the PPAR signaling pathway are important in the progression of

- nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2021, 20(1): Article No.39.
- [40] Wu D, Li J N, Fan Z, et al. Dietary *Lycium barbarum* polysaccharide modulates growth performance, antioxidant capacity, and lipid metabolism in common carp (*Cyprinus carpio*) fed with high-fat diet[J]. *Antioxidants*, 2024, 13(5): 540.
- [41] Smirnova E, Goldberg E B, Makarova K S, et al. ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells[J]. *EMBO Reports*, 2006, 7(1): 106-113.
- [42] Yang B Q, Shen Y D, Monroig Ó, et al. The ameliorative role of methionine in hepatic steatosis and stress response in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) fed with a high-fat diet[J]. *Aquaculture*, 2024, 580: 740306.
- [43] Xiang S Q. The effects of RS4-type resistant starch on growth performance, meat quality and lipid metabolism of *Schizothorax prenanti*[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2014. [向世琼. RS4 型抗性淀粉对齐口裂腹鱼生长性能、肉质及脂肪代谢的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2014.]
- [44] Bruce C R, Brolin C, Turner N, et al. Overexpression of carnitine palmitoyltransferase I in skeletal muscle *in vivo* increases fatty acid oxidation and reduces triacylglycerol esterification[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2007, 292(4): E1231-E1237.
- [45] Wang J L, Yuan T T, Liu X X, et al. Regulatory effects of high-fat diet supplemented with rehmannia or yam on the growth, blood index, and lipid metabolism of *Cyprinus carpio haematopterus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2023, 30(1): 48-59. [王俊丽, 苑婷婷, 刘欣欣, 等. 高脂饲料添加地黄或山药对黄河鲤鱼生长、血清生化指标和脂代谢的调节作用[J]. *中国水产科学*, 2023, 30(1): 48-59.]
- [46] Liao C Y, Gao W H, Li J H, et al. Effects of short-term high-fat stress on growth performance, liver health, and lipid metabolism genes in *Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2023, 30(9): 1080-1092. [廖春燕, 高文浩, 李嘉辉, 等. 短期高脂应激对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能、肝脏健康和脂代谢基因的影响[J]. *中国水产科学*, 2023, 30(9): 1080-1092.]
- [47] Lu K L, Xu W N, Wang L N, et al. Hepatic β -oxidation and regulation of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed a high fat diet[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e93135.
- [48] Wu S, Huang C, Chen Y R, et al. *Momordica charantia* leaf extract reduces hepatic lipid accumulation and diet-induced dyslipidemia in zebrafish through lipogenesis and β -oxidation[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 87: 104857.

Effect of a high-fat diet on lipid metabolism and KLF15-TWIST2 signaling pathway gene expression levels in zebrafish (*Danio rerio*)

DU Yuling^{1,2}, LI Honghui², WANG Jiahui², PENG Liwen², ZHU Haojie¹, QUAN Ke¹, LUO Qinghua², CHU Wuying²

1. School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha 410114, China;

2. College of Biological and Chemical Engineering, Changsha University; Hunan Engineering Technology Research Center for Amphibian and Reptile Resource Protection and Product Processing, Changsha 410022, China

Abstract: Lipids are important constituents and energy storage substances in fish, and their main role is oxidative energy supply. Excessive lipid levels in the feed affect the normal physiological metabolism of fish. KLF15 is an important regulator and effector of intra- and inter-organ metabolic processes, playing a key role in promoting fat synthesis and storage. TWIST2 is a conserved basic helix-loop-helix (b-HLH) transcription factor that serves as a molecular switch to activate or repress target genes through direct or indirect mechanisms, regulating pathways involved in inflammation, energy homeostasis, and metabolic disorders. The expression patterns of *KLF15* with *TWIST2* play important roles in many aquatic animals. This study aimed to investigate the role of the KLF15-TWIST2 signaling pathway in lipid metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). Zebrafish larvae were randomly divided into a normal-fat diet (NFD) group and a high-fat diet (HFD) group 5 days after fertilization. The NFD group was fed a basal diet and the HFD group was fed an HFD. After 7 consecutive days of feeding, zebrafish litters from the NFD and HFD groups were homogenized in an ice bath to collect samples, centrifuged to extract the supernatant and measured to analyse changes in lipid metabolism-related indexes and the expression characteristics of the KLF15-TWIST2 signaling pathway. Physiological indices and antioxidant enzyme activities as well as histological observations were used to determine whether an HFD caused lipid metabolism disorders. The expression levels of *KLF15*, *TWIST2*, and genes related to lipid metabolism (*SREBP*, *FASN*, *ACCI*, *DGAT2*, *CEBPA*, *CPT1*, *ATGL*, *LPL*, *SCD*, and *HSL*) were detected by fluorescence quantitative PCR and their correlations were analyzed. An HFD caused a significant ($P<0.01$) increase in total cholesterol, triglyceride, and low-density lipoprotein-cholesterol content in zebrafish. A significant ($P<0.05$) increase in superoxide dismutase activity and a significant ($P<0.001$) decrease in glutathione peroxidase activity were observed in zebrafish in the HFD group compared to those in the NFD group, and a large accumulation of lipids was observed. Intake of an HFD significantly increased the expression level of *KLF15* ($P<0.001$), but significantly decreased the expression level of *TWIST2* ($P<0.05$). The expression levels of lipid-synthesis-related genes, *SREBP*, *FASN*, *ACCI*, *DGAT2*, and *CEBPA* were significantly increased ($P<0.05$), while the expression level of the lipolysis gene *ATGL* was significantly decreased ($P<0.05$). Meanwhile, fatty acid oxidation genes *PPARα*, *CPT1*, *LPL*, *LXPα* showed a significantly higher expression level trend ($P<0.05$). The expression levels of members of the *KLF15-TWIST2* signaling pathway were significantly correlated with the expression levels of *SREBP*, *FASN*, *ACCI*, *ATGL*, *DGAT2*, *CEBPA*, *PPARα*, and *LPL*. These results suggested that an HFD led to excessive lipid accumulation and tissue damage and lipid metabolism disorders in zebrafish, and that the KLF15-TWIST2 signaling pathway may regulate lipid metabolism through its involvement in fatty acid synthesis, transport, β -oxidation, catabolism and lipoprotein synthesis. The present study explored the role of the KLF15-TWIST2 signaling pathway in lipid metabolism in fish, which is of great significance for understanding the health of fish.

Key words: zebrafish; KLF15-TWIST2 signaling pathway; high-fat diet; lipid metabolism

Corresponding author: CHU Wuying. E-mail: chuwuying18@163.com