

饲料脂肪对翘嘴红鲌生长、葡萄糖激酶和葡萄糖-6-磷酸酶活性与基因表达的影响

刘波, 唐永凯, 俞菊华, 谢骏, 戈贤平

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081)

摘要: 选用 360 尾翘嘴红鲌 (*Erythrocutler ilishaeformis* Blecker), 体质量约 40 g。随机分成为 2 组, 分别为高脂组 (脂肪质量分数 19.93%, 碳水化合物质量分数 14.45%)、低脂组 (脂肪质量分数 9.92%, 碳水化合物质量分数 12.38%), 每组设 3 个重复, 饲养 8 周。分别于摄食后 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 测定血液指标、糖代谢酶葡萄糖激酶 (Glucokinase, GK, E.C. 2.7.1.1) 以及葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6Pase, E.C.3.1.3.9) 活性及基因表达, 并分析高脂肪与低脂肪水平日粮对翘嘴红鲌生长的影响。与低脂水平日粮相比, 高脂水平日粮组血液甘油三酯水平和游离脂肪酸水平分别在摄食后 3 h、12 h 有增加现象, 肝胰脏粗蛋白与脂肪含量有显著增加 ($P<0.05$)。与低脂水平日粮相比, 在摄食后 3~12 h 高脂肪水平日粮组糖代谢酶 GK 的 mRNA 水平显著增加 ($P<0.05$), 但是日粮脂肪水平并不能显著影响 GK 活性 ($P>0.05$)。在摄食后 3~24 h 高脂肪水平日粮组糖代谢酶 G6Pase 的 mRNA 水平得到显著促进, 并在摄食后 24 h G6Pase 活性显著增加 ($P<0.05$)。因此, 摄食高脂肪水平日粮能增加肝胰脏粗蛋白与脂肪含量, 造成翘嘴红鲌高血糖效应, 诱导 G6Pase 酶活性及基因的表达, 这可能是影响翘嘴红鲌碳水化合物利用的原因之一。[中国水产科学, 2008, 15 (6): 1 024-1 033]

关键词: 翘嘴红鲌; 脂肪; 葡萄糖激酶; 葡萄糖-6-磷酸酶; 酶活性; 生长; 基因表达

中图分类号: S96

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)06-1024-10

碳水化合物 (Carbohydrate, CHO) 利用率低是在鱼类营养生理中主要存在的问题^[1]。葡萄糖激酶 (Glucokinase, GK, E.C. 2.7.1.1) 是糖酵解过程中葡萄糖分解产生能量、调节血糖的关键酶。早期研究表明, 鱼类缺乏 GK 或 GK 活性很低^[2-3], 这是限制鱼体对 CHO 利用的原因之一。后来的研究证实, 在大西洋鲑 (*Salmo salar*)、大西洋比目鱼 (*Hippoglossus hippoglossus*)、金头鲷 (*Sparus aurata*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和鲤 (*Cyprinus carpio*) 存在 GK 的 cDNA, 且日粮中高 CHO 与鱼体的摄食能影响 GK 活性与其 mRNA 水平^[4-8]。有关日粮脂肪含量对鱼类 GK 活性影响的报道很少, 仅见 Panserat 等^[9]的报道, 即日粮脂肪含量并不能影响虹鳟 GK 活性, 但是摄食后 3 h 可增加虹鳟的 GK 基因的表达。

葡萄糖-6-磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6Pase,

E.C.3.1.3.9) 是糖异生过程水解葡萄糖-6-磷酸盐生成葡萄糖的限制酶, 在保证血糖的动态平衡方面起着重要的作用^[10-11]。有关日粮营养成分对鱼体 G6Pase 影响比较复杂, 存在不同的调控机制。Kirchner 等^[12]发现虹鳟日粮蛋白水平与碳水化合物水平能增加 G6Pase 活性与基因表达, 但是对金头鲷的 G6Pase 基因表达没有显著影响^[13]; 但也有报道表明鲤、虹鳟摄食高糖后 G6Pase 活性与基因表达受到抑制^[14-15]。有关日粮脂肪对鱼体 G6Pase 的影响, 在虹鳟中发现日粮高脂肪诱导了 G6Pase 活性及表达量^[9]; 但是在金头鲷的研究中未观察到此种现象^[16]。

对哺乳动物的研究表明, 以鱼油为脂肪源的高脂肪日粮能抑制一些糖酵解酶的活性, 如: 丙酮酸激酶和 GK^[17-18], 并能诱导肝脏糖异生^[19], 但是有关日粮脂肪对翘嘴红鲌 (*Erythrocutler ilishaeformis*

收稿日期: 2007-12-18; 修订日期: 2008-04-22.

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划 (2006BAD03B07); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目; 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 (2007JBFB12); 江苏省自然科学基金 (BK2007027).

作者简介: 刘波 (1978-), 男, 助理研究员, 硕士, 主要从事水产动物营养与免疫研究. E-mail: liub@ffrc.cn

通讯作者: 戈贤平, 研究员. E-mail: gexp@ffrc.cn

Bleeker) 糖代谢相关酶活性及其基因表达水平的研究还未见报道。本实验在日粮中添加不同水平的蛋白质和 CHO, 以鱼油作为脂肪源投喂翘嘴红鲌, 探讨其对鱼类血液中葡萄糖、游离脂肪酸、甘油三酯、胆固醇等代谢的影响, 并通过荧光实时定量 PCR 法检测肝脏 GK 和 G6Pase 基因表达所受影响, 了解鱼类 CHO 的代谢机理, 最终为研制合理高效的鱼类饲料提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 翘嘴红鲌 (*Erythrocutler ilishaeformis* Bleeker) 鱼种购于浙江淡水水产研究所, 暂养于水泥池 (规格为 800 cm×200 cm×100 cm), 先投喂

膨化浮性饲料 (上海大江饲料公司), 半个月后改为沉性鲫鱼饲料 (无锡通威饲料公司), 驯化 30 d 正式对鱼体称重, 分组, 试验选择健康、规格、体质量基本一致鱼样 360 尾, 初始体质量约 40 g, 随机分为 2 组, 分别为低脂肪对照组 (LL), II 高脂肪试验组 (HL), 每组设 3 个重复, 共 6 个水泥池, 每个水泥池 60 尾实验鱼。

1.1.2 实验饲料 仿照 Panserat 等^[9]设计实验配方, 实验日粮配方与营养水平见表 1。各种原料分别粉碎过 60 目筛, 先把棒土、沸石粉、添加剂等混匀, 再加大料逐级充分混匀, 后加鱼油适量水混匀后喷洒在饲料上, 用小型绞肉机制成粒径为 2.0 mm 的湿颗粒饲料, 并在 40 ℃ 烘 12 h 至半干, 饲料水份为 10% 左右, 后保存备用。

表 1 翘嘴红鲌日粮配方与营养水平
Tab.1 Formulation and composition of experimental diets for top mouth culter %

原料成分 Ingredients	低脂肪组 Low lipid (LL)	高脂肪组 High lipid (HL)
酪蛋白 Casein	20	16
明胶 Gelatin	5	4
鱼粉 Fish meal	30	28
豆粕 Soybean meal	35	25
α- 淀粉 α-Starch	1.5	2.5
鱼油 Fish oil	6	17
多维 Vitamin premix	1	1
多矿 Mineral premix	1	1
沸石粉 Zeolite powder	0	3
棒土 Attapalgite	0	2
食盐 Salt	0.5	0.5
营养水平 * Chemical composition *		
干物质 Dry matter	89.80	91.05
粗蛋白 Crude protein	50.14	40.88
粗脂肪 Crude lipid	9.92	19.93
碳水化合物 Carbohydrate	14.45	12.38
总能 / (kJ·g ⁻¹) Gross energy	18.25	19.66

注: 营养水平含量中总能 (GE) 按蛋白质 23.64 kJ/g, 脂肪 39.54 kJ/g, 碳水化合物 17.15 kJ/g 计算; 其他为实测值; 添加剂含微量元素和维生素等 (由南京华牧动物研究所提供)。

Note: Gross energy (GE): protein 23.64 kJ/g, ether extract 39.54 kJ/g, carbohydrate 17.15 kJ/g; the others are measured values. Additives contain trace-mineral, vitamins, et al. (provided by Nanjing Huamu Animal Research Institute).

1.2 饲养管理

翘嘴红鲌在淡水渔业研究中心宜兴养殖基地水泥池驯化 30 d 后开始投喂实验日粮,高脂肪组投喂量为鱼体质量的 3%,低脂肪组为鱼体质量的 2.5%,每天投喂 2 次,分别在 8:00-9:00、16:00-17:00 各投 1 次,30 min 后观察吃食情况,把多余饲料吸出。水源为地下水,早晚各吸污 1 次,15 d 换水 1 次,每次换水 1/3,日夜连续充气增氧,饲养过程中每天 8:00 及 16:00 各测温 1 次,每周测 1 次水质,整个实验期间水质如下:饲养过程中水温 (24.5 ± 4.32) °C,溶氧高于 5 mg/L,氨氮低于 0.01 mg/L,硫化氢低于 0.05 mg/L, pH 6.8 ~ 7.0 等。正式实验养殖 56 d 后称重。

1.3 样本的采集

实验养殖结束后,采样前饥饿 48 h,然后分别于投喂后 0、3 h、6 h、12 h、24 h 鱼体采血,每个平行组取 3 尾,每组 9 尾鱼,用 MS-222 麻醉鱼体后,尾静脉采血,血样用肝素抗凝,在 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 制备血浆,上清液移入冻存管并冻存于液氮中。采完血取 50~100 mg 肝胰脏冻存于液氮中用于分子生物学测定,另取一部分用于肝脏酶活性测定。另外每个平行组取 3 尾,每组 9 尾鱼取背部肌肉分别称鱼体质量、内脏重、肝胰脏重、测量体长,并取鱼体肝胰脏、背部肌肉入 -20 °C 冰箱保存,以便作鱼体粗蛋白、粗脂肪等常规分析。

1.4 血液指标与常规指标测定

血糖用葡萄糖氧化酶法(试剂盒来源上海复旦张江生物医药股份有限公司);甘油三酯采用酶法(试剂盒来源上海名典生物工程公司),在美国贝克曼 Cx-4 型自动生化分析仪上测定。游离脂肪酸采用比色法(试剂盒来源南京建成生物有限公司)。用恒温干燥法(105 °C)、凯氏定氮法、索氏抽提法分别测定水分、蛋白质、脂肪含量。饲料可消化糖含量的测定采用 3,5-二硝基水杨酸法,肝胰脏中的脂肪采用用氯仿-甲醇抽提法。

1.5 酶活性测定

所有肝胰脏样品解冻后加 10 倍的 4 °C 缓冲液冰浴匀浆,制成 10% 匀浆液。照 Panserat 等^[6]、Kirchne 等^[20]、蔡春芳^[21]方法配置缓冲液含 80 mmol/L Tris、5 mmol/L EDTA、1 mmol/L KH_2PO_4 、2 mmol/L NaHCO_3 、1.4 mmol/L DTT, pH 7.5。之后在 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min,上清液一部分立即用于 GK、己糖激酶(HK, EC 2.7.1.1)、葡萄糖脱氢酶

(GDH, EC 1.1.1.47) 活性的测定;另一部分上清液继续于 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min,上清液备用测定 G6Pase 活性,保存于 -20 °C 冰箱,室温 (25 ± 1) °C 下,24 h 测定完毕。蛋白水平用福林酚法,标准蛋白为牛血清白蛋白,购于南京建成生物研究所。

GK 活性测定按照 Tranulis 等^[4]、Panserat 等^[6]的方法,反应体系为: 65 mU/mL G6PDH、2 mmol/L NADP^+ 、7 mmol/L ATP、80 mmol/L Tris、5 mmol/L EDTA、8 mmol/L MgSO_4 、1 mmol/L KH_2PO_4 、2 mmol/L NaHCO_3 、0.2 mmol/L DTT、葡萄糖 100 mmol/L, pH 8.2。上述测定结果以 HK 和 GDH 校正后的值为 GK 活性值。上法中葡萄糖水平改为 0.5 mmol/L 时所测值为 HK 活性值;上法中 ATP 去除所测值为 GDH 活性值。反应时间为 5 min。酶活性单位定义:在 30 °C、pH 8.2 下,每 g 组织蛋白在本反应体系中每 min 生成 1 mmol/L 的 NADPH 为 1 个活性单位。

G6Pase 按 Alegre 等^[22]、Panserat 等^[9-23]测定,反应体系为: 26.5 mmol/L G6P、1.8 mmol/L EDTA、2 mmol/L NAD^+ 、0.5~0.7 U·mL⁻¹ 变旋酶(MUT)、5~7 U/mL Glucose dehydrogenase、100 mmol/L imidazole-HCl。酶活性定义:在 30 °C、pH 7.0 下,在本反应体系中每 min 氧化水解 1 μmol 6-磷酸葡萄糖为 1 个活性单位。

1.6 肝脏 GK 和 G6Pase 的 RT-PCR 测定

根据已分离出的翘嘴红鲌 GK 和 G6Pase cDNA 全序列^[24],设计 GK、G6Pase 引物 P1、P2、P3、P4,根据鱼类 β -actin 保守序列,设计翘嘴红鲌 β -actin 引物 P5、P6,见表 2。所有引物均由上海申能博彩生物有限公司合成,扩增的片段为 100~150 bp。

表 2 实验用实时定量 RT-PCR 引物
Tab. 2 Primers used in real time RT-PCR

引物 Primer	序列 Sequence
GK	P1 5'-GAA TAC GAC CGC GTT GTT GA-3'
	P2 5'-CTG AGG CTT CGC CGT TAAAC-3'
G6Pase	P3 5'-GCA GGC GTT ATT TCA GGC AT-3'
	P4 5'-CCA CAC CCA GAG CTT TCA GG-3'
β -actin	P5 5'-ACT TCG AGC AGG AGA T-3'
	P6 5'-ACA GTG TTG GCA TAC AG-3'

取翘嘴红鲌肝脏组织 50~100 mg, 参照 Trizol Reagent (Invitrogen 公司) 说明书操作, 抽提总 RNA。使用紫外分光光度计测定 RNA 的水平, 并根据 $OD_{260/280}$ 值判断 RNA 的质量, 一般为 1.8~2.0。根据 SYBR ExScript™ RT-PCR Kit (大连 Takara 公司) 进行 RT 反应, 然后采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 扩增反应, 反转录反应液: 500 ng RNA; 2 μ L 5 $\times$ Buffer; 0.5 μ L dNTP Mixture (ea. 10 mmol/L); 0.25 μ L RNase Inhibitor (40 U/ μ L); 0.5 μ L dT-AP Primer (50 mmol/L); 0.25 μ L ExScript™ RTase (200 U/ μ L); 加 DEPC H₂O 到 10 μ L。反应条件: 42 $^{\circ}$ C 40 min; 90 $^{\circ}$ C 2 min, 4 $^{\circ}$ C 保温至关机。荧光定量 PCR 反应液组成: 12.5 μ L SYBR® premix Ex Taq™ (2 $\times$); 0.5 μ L PCR Forward Primer (10 μ mol/L); 0.5 μ L PCR Reverse Primer (10 μ mol/L); 2.0 μ L 模板 (cDNA 溶液); 9.5 μ L dH₂O。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3min, 后 45 个循环: 95 $^{\circ}$ C 10 s; 60 $^{\circ}$ C 20 s; 读板记录荧光量, 72 $^{\circ}$ C 3 min; 溶解的反应条件为 65 $^{\circ}$ C 至 90 $^{\circ}$ C, 每升高 0.2 $^{\circ}$ C 保持 1 s 读板记录荧光量。

1.7 相关指标计算公式

特定生长率 ($\% \cdot d^{-1}$) = $100 \times (\ln [\text{实验末平均体质量}] - \ln [\text{实验初平均体质量}]) / \text{实验天数}$

饵料系数 = 饲料消耗量 / 鱼体增重量

肝体比 ($\%$) = $100 \times \text{实验末鱼体肝重} / \text{实验末鱼体质量}$

肥满度 ($\%$) = $100 \times \text{实验末鱼体质量} / \text{实验末鱼体长度立方}$

内脏比 ($\%$) = $100 \times \text{实验末鱼体内脏重} / \text{实验末鱼体质量}$

死亡率 ($\%$) = $100 \times (\text{实验初鱼体尾数} - \text{实验末鱼体尾数}) / \text{实验初鱼体尾数}$

1.8 数据统计与分析

糖代谢酶 mRNA 水平计算以翘嘴红鲌 β -actin 为内参, 对得到的各样品 C_t 值进行均一化处理, 以

低脂肪组的 mRNA 水平为基准, 应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 确定不同样品的 mRNA 的相对含量^[25]。所有数据用 SPSS (Ver.11.5) 软件统计单因子方差分析 (One-way ANOVA), 多重比较用 Duncan's 进行差异显著性检验, 结果用平均值 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm SE$) 表示。高脂肪与低脂肪组之间比较采用非配对 t -检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 脂肪水平对翘嘴红鲌生产性能的影响

由表 3 可知, 与低脂肪组相比, 高脂肪组鱼体内脏比显著 ($P < 0.05$) 增加了 53.97%, 肝脏粗蛋白、粗脂肪含量分别显著 ($P < 0.05$) 增加了 7.93%、58.23%。特定生长率、饵料系数、死亡率、肝体比、肥满度等没有显著性影响, 其中高脂肪组特定生长率有增加趋势, 饵料系数有降低趋势。

2.2 脂肪水平对翘嘴红鲌血液指标的影响

由表 4 可知, 高脂肪组与低脂肪组都呈现了高血糖效应, 在摄食后的 12~24 h 达到最大。但是高脂肪组的血糖水平一直比低脂肪组高, 但是二者之间没有显著性差异。与禁食时血糖相比, 低脂肪组摄食后 6 h、24 h, 高脂肪组在摄食后 6 h、12 h、24 h 血糖水平显著提高 ($P < 0.05$)。

由表 5 可知, 高脂肪组的血浆甘油三酯水平一直比低脂肪组高, 其中在摄食 3 h 时, 高脂肪组血浆甘油三酯水平比低脂肪组显著增加 ($P < 0.05$); 在高脂肪组, 摄食 3~24 h 时血浆甘油三酯水平比禁食组显著提高 ($P < 0.05$)。

由表 6 可知, 血浆游离脂肪酸水平呈现先下降后上升的趋势, 高脂肪组的血浆游离脂肪酸水平一直比低脂肪组高, 其中在摄食后 12 h, 高脂肪组血浆游离脂肪酸水平比低脂肪组显著增加 ($P < 0.05$)。与禁食相比, 高脂肪组投料后 3~24 h, 低脂肪组在 3 h、6 h 血浆游离脂肪酸水平显著降低 ($P < 0.05$)。

表 3 高低水平脂肪日粮对翘嘴红鲌生产性能的影响
Tab. 3 Effect of different dietary lipids on growth performance of top mouth culter $n=3; \bar{x} \pm SE$

组别 Group	低脂肪组 Low lipid (LL)	高脂肪组 High lipid (HL)
初均重 / g Initial average body weight	40.95±0.90	40.11±1.09
末均重 / g Final average body weight	89.81±3.12	92.41±8.34
特定生长率 / (%·d ⁻¹) Specific growth rate	1.40±0.06	1.48±0.11
饵料系数 Feed conversion ratio	1.46±0.11	1.41±0.15
死亡率 / % Mortality rate	2.00±1.00	5.33±3.06
肝体比指数 / % Hepato-somatic index	0.42±0.01	0.44±0.01
内脏比指数 / % Viscero-somatic index	10.84±1.28	16.69±1.28*
饱满度 / % Fullness coefficient	1.03±0.04	1.00±0.01
肌肉粗蛋白 / % Crude protein of muscle	18.11±0.54	17.11±0.65
肌肉粗脂肪 / % Crude lipid of muscle	1.12±0.26	0.92±0.16
肝脏粗蛋白 / % Crude protein of liver	13.87±0.68	14.97±0.65*
肝脏粗脂肪 / % Crude lipid of liver	2.37±0.57	3.75±0.84*

注: * 表示高脂肪组与低脂肪组 t -test 比较差异显著 ($P<0.05$).

Note: *Significant difference between LL and HL (t -test, $P<0.05$).

表 4 禁食与投喂不同脂肪含量日粮后翘嘴红鲌的血糖变化

Tab. 4 Changes of starved and postprandial plasma glucose levels of top-mouth culter fed with different lipid levels of diets $n=9; \bar{x} \pm SE; \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别 Group	禁食 Starved	投料后 Postprandial time			
		3 h	6 h	12 h	24 h
低脂组 LL	5.31±1.57 ^c	6.75±0.91 ^{bc}	11.36±1.61 ^{ab}	9.04±0.75 ^{abc}	12.56±0.69 ^a
高脂组 HL	5.85±2.24 ^b	7.80±0.65 ^{ab}	10.00±1.32 ^a	12.33±1.35 ^a	12.14±0.64 ^a

注: 同一行数据中有不同字母表示差异显著 ($P<0.05$).

Note: Values with different superscripts show significant differences ($P<0.05$) between the time groups.

表 5 禁食与投喂不同脂肪含量日粮后翘嘴红鲌血浆甘油三酯的变化

Tab. 5 Changes of starved and postprandial plasma triglycerides of topmouth culter fed with different lipid levels of diets $n=9; \bar{x} \pm SE; \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别 Group	禁食 Starved	投料后 Postprandial time			
		3 h	6 h	12 h	24 h
低脂组 LL	1.21±0.34	2.21±0.28	1.94±0.48	3.50±0.41	1.98±0.17
高脂组 HL	0.98±0.19 ^c	3.44±0.21 ^{a*}	2.55±0.06 ^b	4.67±0.72 ^a	2.01±0.28 ^b

注: 同一行数据中有不同字母表示差异显著 ($P<0.05$); * 表示高脂肪组与低脂肪组比较差异显著 ($P<0.05$).

Note: Values with different superscripts show significant differences ($P<0.05$) between the time groups; *Different from LL fish (t -test, $P<0.05$).

表 6 禁食与投喂不同脂肪含量日粮后翘嘴红鲌血浆游离脂肪酸的变化

Tab. 6 Changes of starved and postprandial plasma fatty acid of topmouth culter fed with different lipid levels of diets
 $n=9$; $\bar{x} \pm \text{SE}$; $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别 Group	禁食 Starved	投料后 Postprandial time			
		3 h	6 h	12 h	24 h
低脂组 LL	0.42 ± 0.03^a	0.26 ± 0.02^c	0.31 ± 0.33^{bc}	0.33 ± 0.01^{abc}	0.37 ± 0.02^{ab}
高脂组 HL	0.49 ± 0.02^a	0.32 ± 0.02^b	0.37 ± 0.03^b	$0.38 \pm 0.01^{b*}$	0.38 ± 0.03^b

注: 同一行数据中有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); * 表示高脂肪组与低脂肪组比较差异显著 ($P < 0.05$).

Note: Values with different superscripts show significant differences ($P < 0.05$) between the time groups; *Different from LL fish (t -test, $P < 0.05$).

2.3 脂肪水平对翘嘴红鲌肝脏糖代谢酶及基因表达的影响

由表 7、8 可知, 高脂肪组与低脂组 GK 活性总体趋势呈上升, 低脂组 GK 活性比高脂肪组高, 但是二者之间差异不显著, 各组在禁食后, 没有检测到 GK 活性, 这说明摄食能提高 GK 活性。进一步分析发现高脂肪组在摄食 12 h 的 GK mRNA 水平比禁食时有显著 ($P < 0.05$) 提高; 高脂肪组在摄食 3 h、6 h、12 h 时比低脂肪组同一时间 GK mRNA 水平

显著 ($P < 0.05$) 增加。

由表 9、10 可知, 与低脂肪组相比, 在摄食后的 3~24 h, 高脂肪水平日粮显著 ($P < 0.05$) 促进了糖代谢酶 G6Pase 的 mRNA 水平, 在摄食后 24 h 显著 ($P < 0.05$) 增加了 G6Pase 的活性; 与禁食时相比, 低脂肪组在摄食 6 h、12 h、24 h, 高脂肪组在 24 h G6Pase 的活性显著 ($P < 0.05$) 增加; 高脂肪组摄食后 G6Pase 的 mRNA 水平也显著 ($P < 0.05$) 增加。

表 7 禁食与投喂不同脂肪含量日粮后翘嘴红鲌肝脏 GK 活性的变化

Tab. 7 Starved and postprandial GK activity changes of topmouth culter fed with different lipid levels of diets

$n=9$; $\bar{x} \pm \text{SE}$; $\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{prot}$

组别 Group	禁食 Starved	投料后 Postprandial time			
		3 h	6 h	12 h	24 h
低脂组 LL	0	1.16 ± 0.17	1.83 ± 1.27	2.74 ± 1.44	3.68 ± 1.06
高脂组 HL	0	0.94 ± 0.72	1.81 ± 0.65	1.60 ± 0.75	2.33 ± 0.79

表 8 禁食与投喂不同脂肪含量日粮后翘嘴红鲌肝脏 GK mRNA 水平的变化

Tab. 8 Starved and postprandial GK mRNA changes of topmouth culter fed with different lipid levels of diets

$n=9$; $\bar{x} \pm \text{SE}$

组别 Group	禁食 Starved	投料后 Postprandial time			
		3 h	6 h	12 h	24 h
低脂组 LL	0.027 ± 0.008	0.013 ± 0.000	0.013 ± 0.000	0.023 ± 0.001	0.026 ± 0.006
高脂组 HL	0.160 ± 0.044^b	$0.270 \pm 0.061^{b*}$	$1.010 \pm 0.180^{b*}$	$9.010 \pm 0.820^{a*}$	0.063 ± 0.015^b

注: 同一行数据中有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); * 表示高脂肪组与低脂肪组比较差异显著 ($P < 0.05$).

Note: Values with different superscripts show significant differences ($P < 0.05$) between the time groups; *Different from LL fish (t -test, $P < 0.05$).

表 9 禁食与投喂不同脂肪含量日粮后翘嘴红鲌肝脏 G6Pase 活性的变化

Tab. 9 Starved and postprandial G6Pase activity changes of topmouth culter fed with different lipid levels of diets
 $n=9; \bar{x} \pm SE; \text{mU} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot}$

组别 Group	禁食 Starved	投料后 Postprandial time			
		3 h	6 h	12 h	24 h
低脂组 LL	12.14±1.82 ^b	8.63±1.25 ^b	17.95±0.74 ^a	17.90±1.22 ^a	19.82±1.39 ^a
高脂组 HL	11.12±1.46 ^{bc}	5.45±1.70 ^c	17.81±2.79 ^b	17.14±2.31 ^b	26.78±1.84 ^{a*}

注: 同一行数据中有不同字母表示差异显著 ($P<0.05$); * 表示高脂肪组与低脂肪组比较差异显著 ($P<0.05$).

Note: Values with different superscripts show significant differences ($P<0.05$) between the time groups; *Different from LL fish (t -test, $P<0.05$).

表 10 禁食与投喂不同脂肪含量日粮后翘嘴红鲌肝脏 G6Pase mRNA 水平的变化

Tab. 10 Starved and postprandial G6Pase mRNA changes of topmouth culter fed with different lipid levels of diets
 $n=3; \bar{x} \pm SE$

组别 Group	禁食 Starved	投料后 Postprandial time			
		3 h	6 h	12 h	24 h
低脂组 LL	0.002±0.000	0.002±0.000	0.001±0.000	0.002±0.001	0.001±0.000
高脂组 HL	1.090±0.410 ^b	3.530±0.400 ^{a*}	3.260±0.860 ^{a*}	4.410±0.640 ^{a*}	4.480±0.320 ^{a*}

注: 同一行数据中有不同字母表示差异显著 ($P<0.05$); * 表示高脂肪组与低脂肪组比较差异显著 ($P<0.05$).

Note: Values with different superscripts show significant differences ($P<0.05$) between the time groups; *Different from LL fish (t -test, $P<0.05$).

3 讨论

3.1 高低水平脂肪日粮对翘嘴红鲌生产性能的影响

在实际养殖过程中,在翘嘴红鲌日粮中添加 6%~9% 脂肪就能满足鱼体必须脂肪酸的需要量^[26]。在一定范围内,多余脂肪含量能给鱼体提供能量,这种高脂肪水平日粮摄入过多之后,鱼体新陈代谢加强,促进了体内营养物质的积累,鱼体吸收的脂肪很大一部分可能转化为脂肪积累于肝脏与内脏器官中^[27-29],从而促进鱼体的生长。本实验发现,鱼体肝脏在脂肪、肝体比、内脏比等方面也有相似的趋势,其中高脂肪组内脏比显著增加,摄食的日粮高脂肪转化到了鱼体内脏,导致肝脏营养成分蛋白质、脂肪的增加。同时也发现高脂肪组(HL19.93%)与低脂肪组(LL9.92%)相比,特定生长比率、饲料效率等指标差异不显著,但高脂肪组特定生长比率有增加趋势,饲料效率有降低趋势,这与 Panserat 等^[9]和 Cho 等^[30]在虹鳟日粮中利用一定的蛋白质来替代一定的脂肪含量有相似的趋势。

3.2 高低水平脂肪日粮对翘嘴红鲌血液指标的影响

鱼体大量脂肪的摄入,会造成血液脂肪含量的增加^[9]。本实验也发现高脂肪日粮组血浆游离脂肪酸、甘油三酯的含量高于低脂肪日粮组;同时也

发现高脂肪日粮组的血糖一直高于低脂肪日粮组,二者之间血糖没有显著性差异,这说明日粮脂肪含量可能并不能影响葡萄糖的利用,这与 Panserat 等^[9]在虹鳟, Fanelli 等^[19]、Randle 等^[31]、Bizeau 和 Hazel 等^[32]在研究哺乳动物中的结果一致。但是本研究发现,无论低脂肪组,还是高脂肪组,在摄食后血糖均呈上升趋势,并在 24 h 血糖达到最高,呈现了高血糖效应,这与一般鱼体在摄食后 3~6 h 血糖达到最大是不一致的^[9,21,33],这说明翘嘴红鲌摄食后一直到 24 h 还忍受高血糖带来的危害,也说明该物种对糖的耐受能力可能比一般的鱼类低。在实际养殖过程中也发现翘嘴红鲌性子比较急躁,外界有一些轻微响声,鱼体就跳动,造成鳞片脱落而死亡,推测高血糖效应的存在可能是翘嘴红鲌在养殖过程中容易受环境影响而死亡的原因之一。

3.3 脂肪水平对翘嘴红鲌糖代谢酶的影响

肝脏 GK 和 G6Pase 是糖代谢过程中的两个关键酶,对于保持鱼类血糖起着非常重要的作用。实验表明,在禁食 2 d 后,没有检测到 GK 活性及 mRNA,这可能与动物的摄食特性有关。禁食时的 GK 活性水平都是比较低的,这与 Caseras 等^[8]、Metón 等^[16]在硬头鳟、金头鲷上投喂不同含糖饲

料的报道结果是一致的。摄食后,日粮中一定量的糖能诱导硬头鳊、虹鳊、鲤、青鱼、鲫、欧洲舌齿鲈等肝胰脏 GK 活性增加及 mRNA 水平^[4-8]。本实验中发现日粮脂肪水平不影响 GK 活性,但是高脂肪组比低脂肪组能提高 GK mRNA 水平,这与 Panserat 等^[9]的报道是一致的。可能原因是高脂肪组日粮含量很高,已达到翘嘴红鲌需要量的 2 倍多,造成糖的异生增强,生成的葡萄糖含量多,诱导了 GK mRNA 水平增加,但是由于 GK 活性并没有增加,这可能与本实验检测的 GK 活性只是 GK 类似物的活性有关,即根据 Tranulis 等^[4]的方法,用 HK 和 GDH 校正后的值才是 GK 活性。结果的差异是否与测定方法有关仍需要进一步研究。另外,也可能与摄食的时间有关系。Caseras 等^[8]、Panserat 等^[23]对虹鳊的研究认为投喂高糖日粮后可造成 GK 表达靠前, GK 酶活性有延后现象,认为这可能是由于鱼类对糖利用能力低的原因之一。本实验在摄食后的 0~24 h 内,高脂肪与低脂肪组之间 GK 酶活性没有显著差异,这种酶基因表达与酶活性升高的滞后是否影响了实验结果,还待进一步的实验验证。但是在哺乳动物中发现多元不饱和脂肪酸 (PUFA) 会减少 GK 活性及 GK mRNA 水平^[18],这与本实验结果是不一致的,这可能与动物的种类、脂肪的种类与含量等有关。

哺乳动物日粮脂肪对 G6Pase 活性及基因表达的影响尚不清楚^[34],但是研究发现,老鼠长期摄入大量的游离脂肪酸,其葡萄糖产物可以通过 G6Pase 基因表达的增加得到提高^[35]。在水产动物, Panserat 等^[9]发现虹鳊日粮中的脂肪能增加 G6Pase 活性及 G6Pase 的 mRNA 水平,这与本结果一致,在摄食后的 3 h、6 h、12 h、24 h 高脂肪日粮组糖代谢酶 G6Pase 的 mRNA 水平得到显著促进,在摄食后 24 h G6Pase 活性显著增加。同时也发现,与禁食时相比,高脂肪组在 24 h G6Pase 活性显著增加,并在摄食后 3~24 h G6Pase 的 mRNA 水平显著增加了,这也存在一种基因表达靠前,酶活性有延后现象。由于 G6Pase 酶基因表达与酶活性升高滞后,有可能造成日粮脂肪水平对 G6Pase 的 mRNA 水平和 G6Pase 活性影响的不同步,不过这得需要进一步的研究。但 Metón 等^[16]对金头鲷的研究中并未观察到此种现象,日粮中的脂肪含量对 G6Pase 的表达没有影响,这可能是由于不同鱼类糖代谢机制不一样所致。

参考文献:

- [1] Wilson R P. Utilization of dietary carbohydrate by fish[J]. Aquaculture, 1994, 124: 67-80.
- [2] Tranulis M A, Christophersen B, Blom A K, et al. Effects of starvation and temperature variations on glucose dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Comp Biochem Physiol B, 1991, 99(3): 687-691.
- [3] Moon T W and Foster G D. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences [M]. In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, edited by Hochachka P W and Mommsen T P. Amsterdam: Elsevier Science, 1995: 65-100.
- [4] Tranulis M A, Dregni O, Christophersen B, et al. A glucokinase-like enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 114B (1): 35-39.
- [5] Panserat S, Blin C, Médale F, et al. Molecular cloning, tissue distribution and sequence analysis of complete glucokinase cDNA from gilthead seabream (*Sparus aurata*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000a, 474: 61-69.
- [6] Panserat S, Médale F, Blin C, et al. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream and common carp [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000c, 278(5): R1164-1170.
- [7] Capilla E, Médale F, Navarro I, et al. Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in rainbow trout [J]. Regulatory Peptides, 2003, 110(2): 123-132.
- [8] Caseras A, Metón L, Fernández F, et al. Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 2000, 1493(1/2): 135-141.
- [9] Panserat S, Perrin A, Kaushik S. High dietary lipids induce liver glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. J Nutr, 2002, 132: 137-141.
- [10] Printz R L, Magnuson M A, Granner D K. Mammalian glucokinase. Annu Rev Nutr, 1993, 13: 463-496.
- [11] Mithieux G. New knowledge regarding glucose-6-phosphatase gene and protein and their roles in the regulation of glucose metabolism [J]. Eur J Endocrinol, 1997, 136: 137-145.
- [12] Kirchner S, Kaushik S, Panserat S, et al. Low protein intake is associated with reduced hepatic gluconeogenic enzyme expression in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J].

- Biochem Physiol, 2003b, 129: 243–249.
- [13] Salgado M C, Metón I, Egea M, et al. Transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit promoter by insulin and glucose in the carnivorous fish, *Sparus aurata* [J]. J Mol Endocrinol, 2004, 33 (3): 783–95.
- [14] Shimeno S, Kheyyali D, Shikata T. Metabolic response to dietary carbohydrate to protein ratios in carp [J]. Fisheries Sci, 1995, 61: 277–281.
- [15] Panserat S, Plagnes-Juan E, Kaushik S. Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) [J]. Biochim Biophys Acta, 2002b, 1579 (1): 35–42.
- [16] Metón I, Caseras A, Fernandez F, et al. Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition [J]. Comp Biochem Physiol B, 2004, 138 (2): 145–153.
- [17] Jump D B, Clarke S D. Regulation of gene expression by dietary fat [J]. Annu Rev Nutr, 1999, 19: 63–90.
- [18] Jump D B, Clarke S D, Thelen A, et al. Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids [J]. J Lipid Res, 1994, 35: 1 076–1 084.
- [19] Fanelli C, Calderone S, Epifano L, et al. Demonstration of a critical role for free fatty acids in mediating counterregulatory stimulation of gluconeogenesis and suppression of glucose utilization in humans [J]. J Clin Invest, 1993, 92: 1 617–1 622.
- [20] Kirchner S, Kaushik S, Panserat S. Effect of partial substitution of dietary protein by a single gluconeogenic dispensable amino acid on hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Comp Biochem and Physiol, 2003, 134: 337–347.
- [21] 蔡春芳. 青鱼和鲫对饲料糖的利用及其代谢机制的研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2004: 43–96.
- [22] Alegre M, Ciudad C J, Fillat C, et al. Determination of glucose-6-phosphatase activity using the glucose dehydrogenase-coupled reaction [J]. Anal Biochem, 1988, 173: 185–189.
- [23] Panserat S, Médale F, Brèque J, et al. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2000b, 11 (1): 22–29.
- [24] 戈贤平. 不同糖、脂含量日粮对翘嘴红鲌相关糖代谢酶调节研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006: 21–85.
- [25] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method [J]. Methods, 2001, 25: 402–408.
- [26] 陈建明, 叶金云, 潘茜, 等. 翘嘴鲌鱼种饲料中脂肪适宜水平的初步研究 [J]. 水产养殖, 2005, 26 (2): 18–19.
- [27] Hilton J W, Atkinson J L. Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to increase levels of available carbohydrate in practical trout diets [J]. Br J Nutr, 1982, 47: 597–607.
- [28] Brauge C, Médale F, Corraze G. Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater [J]. Aquaculture, 1994, 123: 109–120.
- [29] Lanari D, Poll B M, Ballestrazzi R, et al. The effects of dietary fat and NFE levels on growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) growth rate, body and fillet composition, carcass traits and nutrient retention efficiency [J]. Aquaculture, 1999, 179: 351–364.
- [30] Cho C Y, Kaushik S J. Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. World Rev Nutr Diet, 1999, 61: 132–172.
- [31] Randle P J. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years [J]. Diabetes Metab Rev, 1998, 14: 263–283.
- [32] Bizeau M E, Hazel J R. Dietary fat type alters glucose metabolism in isolated rat hepatocytes [J]. J Nutr Biochem, 1999, 10: 709–715.
- [33] 黄鹤忠, 丁磊, 宋学宏, 等. 青鱼和草鱼葡萄糖耐量的比较研究 [J]. 中国水产科学, 2005, 12 (4): 496–500.
- [34] Foster J D, Nordlie R C. The biochemistry and molecular biology of the glucose-6-phosphatase system [J]. Exp Biol Med, 2002, 227: 601–608.
- [35] van de Werve G, Lange A J, Newgard C, et al. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose-6-phosphatase system [J]. Eur J Biochem, 2000, 267: 1 533–1 549.

Effects of dietary lipids on growth, GK and G6Pase activities and mRNA levels in top-mouth cutler (*Erythrocutler ilishaeformis* Bleeker)

LIU Bo, TANG Yong-kai, YU Ju-hua, XIE Jun, GE Xian-ping

(Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Top-mouth culter (*Erythroculter ilishaeformis* Bleeker) is also called white fish from Taihu Lake in China. It is a carnivorous fish belonging to cypriniformes, Cyprinidae, Culterinae. It is one of four famous freshwater fish species and now becomes one of the main cultured species in China. There were some investigations on the biology of top-mouth culter. However, few studies have been reported on its nutritional requirements. The objectives of this study were to evaluate the effects of dietary high lipids on postprandial plasma metabolites including glucose, triglycerides, fatty acids and cholesterol, as well as expression and activities of hepatic GK, G6pase and PEPCK enzymes, and to explore the carbohydrate utilization in fish. In the present study, 360 top-mouth cutler with average weight 40.53 ± 0.66 g were randomly divided into two groups. Each group with triplication was fed with diets containing high lipid (HL) level (19.93% lipid, 14.45% carbohydrate) or with low lipid (LL) level (9.92% lipid, 12.38% carbohydrate). After 8 weeks, plasma biochemical indices and glucokinase (GK), glucose-6-phosphatase (G6Pase) activities and mRNA levels were determined at 0, 3, 6, 12 and 24 h after feeding. The results showed that compared with the low level of dietary lipids, the high dietary lipids level promoted fish hepatic crude protein and fat content; increased triglyceride content at 3 h after the meal and free fatty acids concentrations of plasma at 12 h after taking food. The level of dietary lipids did not significantly affect GK activity even though GK mRNA level were increased at 3–24 h after taking high level of lipids. The high level of dietary lipids significantly increased mRNA level of G6Pase at 3, 6, 12 and 24 h and G6Pase activity at 24 h as well after food ingestion. Therefore, these data suggest ingestion of high dietary lipids would increase the hepatic crude protein and fat content causing high glycaemia, inducing G6Pase activity and gene expression, which may affect carbohydrate utilization rate of top-mouth cutler at least as part of reasons. [Jousnal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (6): 1 024–1 033]

Key words: *Erythrocutler ilishaeformis*; dietary lipids; GK; G6Pase; enzym activity; growth; gene expression

Corresponding author: GE Xian-ping. E-mail: gexp@ffrc.cn