

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19314

盐度胁迫对尼罗罗非鱼肝脂肪酸组成与脂代谢相关基因表达的影响

宋凌元^{1, 2, 3}, 程亚美^{1, 2, 3}, 赵金良^{1, 2, 3}

1. 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海海洋大学, 上海 201306;
2. 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海海洋大学, 上海 201306;
3. 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海海洋大学, 上海 201306

摘要: 为探讨盐度胁迫对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肝脂肪酸代谢的影响, 本研究分别在盐度 8 和盐度 16 的水体中对尼罗罗非鱼进行两周的胁迫实验, 比较盐度胁迫过程中肝脂肪酸组成变化, 以及脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)、苹果酸酶(malic enzyme, ME)和过氧化物酶体增殖物激活受体 α 亚基(Peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR- α) mRNA 表达量变化。结果表明, 胁迫 12 h, 盐度组血浆渗透压升至最高, 16 盐度组血浆渗透压显著高于 8 盐度组($P < 0.05$), 胁迫后期血浆渗透压逐渐下降并趋于稳定。胁迫 96 h 前, 盐度组饱和脂肪酸含量显著低于淡水组($P < 0.05$), 96 h 后饱和脂肪酸含量逐渐恢复至初始水平; 胁迫期间, 盐度组单不饱和脂肪酸含量显著低于淡水组($P < 0.05$), 而长链多不饱和脂肪酸(DHA、EPA 和 ARA 为主)含量显著高于淡水组($P < 0.05$)。盐度组脂蛋白脂肪酶(LPL)、苹果酸酶(ME)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α 亚基(PPAR- α) mRNA 表达量均显著高于淡水组($P < 0.05$)。结果表明, 盐度胁迫影响了肝脂肪酸组成和脂代谢过程。本研究旨在为鱼类渗透调节中脂类能量利用提供基础资料。

关键词: 尼罗罗非鱼; 脂肪酸; 脂代谢; 盐度胁迫

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)08-0859-09

盐度是影响硬骨鱼类生理生化重要环境因子之一^[1]。广盐性鱼类能通过复杂的渗透压调节机制维持其体内正常的生理功能, 以适应环境盐度的变化^[2]。渗透调节过程主要是通过相关的酶和转运蛋白进行体内、外的离子转运来实现的^[3], 在逆浓度转运过程中, 这些酶和转运蛋白的合成和功能发挥需要耗用大量的能量^[4]。脂质是机体的主要能源物质, 脂肪酸作为其代谢产物在机体生理生化过程中发挥重要作用^[5]。近年来有研究报道, 低盐条件下, 大西洋鲑(*Salmo salar*)^[6]、黄斑蓝子鱼(*Siganus canaliculatus*)^[7]、真鲷(*Pagrus major*)^[8]体内长链多不饱和脂肪(long-chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFA)含量更高, 表明海水鱼类可以通过体内脂代谢调节, 适应环境的

盐度变化。

肝是鱼类脂质主要储存器官, 也是机体主要供能器官^[9], 为脂肪酸代谢的重要场所^[10]。在脂质分解和脂肪酸代谢过程中, 脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)、苹果酸酶(malic enzyme, ME)、过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPARs)等关键酶和转录因子共同参与^[11]。LPL 是生物体重要的脂解酶^[12-13]。ME 参与脂肪酸代谢调节, 是脂肪酸 β -氧化过程中重要的酶^[14]。PPAR- α 是参与脂肪酸 β -氧化过程的重要调节因子^[15-16]。

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)是世界性养殖鱼类, 且能在一定盐度范围内生长繁殖。么宗利等^[17]研究认为, 尼罗罗非鱼在盐度 5~10 的

收稿日期: 2019-11-01; 修订日期: 2020-03-11.

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-46).

作者简介: 宋凌元(1993-), 男, 硕士研究生, 专业方向为鱼类遗传育种. E-mail: 786785555@qq.com

通信作者: 赵金良, 教授. E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

水体中能正常生长;在盐度 32 水体中可以产卵,但孵化率较低。此前,已开展过盐度胁迫对尼罗罗非鱼生长、繁育和生理等方面影响^[18-20]。对盐度 8 和盐度 16 胁迫下尼罗罗非鱼肝转录组的研究发现,许多脂代谢相关基因和代谢通路表达水平发生显著变化,暗示盐度胁迫可能对尼罗罗非鱼脂代谢过程产生影响^[21]。因此,本研究在盐度 8 和盐度 16 下对尼罗罗非鱼进行胁迫,比较盐度组与淡水组肝中脂肪酸组成及 *LPL*、*ME* 和 *PPAR-α* mRNA 表达差异,探讨尼罗罗非鱼渗透压调节与肝脂肪酸组成之间的关系,为尼罗罗非鱼渗透调节脂类能量利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验鱼及盐度胁迫实验 尼罗罗非鱼取自上海海洋大学罗非鱼种质资源试验站。挑选活力较好,规格为(50.4±3.6) g 幼鱼作为实验用鱼。在实验室淡水循环可控水族箱系统(150 cm×60 cm×40 cm)中暂养 1 周,实验开始前 2 天开始禁食。

胁迫试验设置盐度梯度为 0 (S0)、8 (S8)和 16 (S16),每个梯度设置 3 个平行组。调制好相应盐度的实验用水后,曝气 2 d,将实验鱼直接转入,进行胁迫实验,每个水族箱随机放入 25 尾。实验期间每天保持 12 h 光照,水温(24.2±2.3) °C, pH 7.25,溶解氧≥6.41 mg/L,氨氮≤0.45 mg/L。24 h 连续充气,试验期间不投喂,实验周期为 2 周。

1.1.2 样品采集 分别采集胁迫 0 h、12 h、24 h、48 h、96 h、1 周和 2 周的实验鱼血液和肝组织,每个水族箱随机取 3 尾(每个处理 9 尾)。取样前,将各实验组鱼转入含 0.01%苯氧基乙醇水溶液中麻

醉。血液样本采集使用 2 mL 医用注射器从尾端静脉处抽血(每尾鱼采血 1~2 mL),放入含有肝素抗凝剂(上海生工生物有限公司)的离心管中(1 mL 血液中加 0.2 g 肝素),置于 4 °C 下备用。肝经液氮速冻,置于-80 °C 冰箱中备用。每个处理组、每个时间点取 6 份样本进行相关数据测定。

1.2 实验方法

1.2.1 渗透压测定 血浆渗透压使用 Micro-Osmometer (Löser, Germany)渗透压仪测量。

1.2.2 脂肪酸组成测定 肝样本先冷冻干燥后,称取 0.5 g,采用氯仿-甲醇法提取肝样本的总脂。加 2 mL 0.5 mol/L 氢氧化钠甲醇溶液,60 °C 水浴 30 min。冷却,加 2 mL 25%三氟化硼甲醇溶液,60 °C 水浴 20 min。冷却,加 2 mL 正己烷和 2 mL 饱和氯化钠溶液,振荡萃取,静止分层。取上清液,利用日本岛津(Shimadzu) GC-2010 气相色谱仪进行测定。采用面积归一法计算各组脂肪酸所占的面积百分比。

1.2.3 RNA 提取与 mRNA 相对表达量测定 将肝组织研成粉末,用 Trizol 提取总 RNA,琼脂糖凝胶电泳和 OD 仪检验 RNA 纯度和浓度($D_{260}/D_{280} \geq 2$)。取 1 μL 总 RNA 为模板,使用南京诺唯赞生物科技有限公司 RNA 反转录试剂盒录合成无 gDNA 的 cDNA (按 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 说明书操作)。根据 NCBI 网站中尼罗罗非鱼的 *LPL* (NCBI Gene ID: 100534504)、*ME* (NCBI Gene ID: 100698053)和 *PPAR-α* (NCBI Gene ID: 100697805)基因 cDNA 序列,设计特异扩增引物,所设计的引物经过 Blast 均与该物种目标基因匹配(表 1)。用 β -actin 作为内参。采用实时定量 PCR (Real-time PCR)分析肝中各基因的表达量,

表 1 实时定量 PCR 引物
Tab. 1 Primers for Real-time PCR determinations of the studied genes

基因 gene	引物名称 primer	序列(5'-3') sequence	NCBI ID
<i>LPL</i>	LPL S	GATACACGGCTGGACGGTAA	100534504
	LPL A	GTTGGTAAGGTCTCCGGCAA	
<i>ME</i>	ME S	ACGATGACATCCAAGGCACT	100698053
	ME A	AGTCCGTTTCCTGCTGTCTG	
<i>PPAR-α</i>	PPAR-α S	GTGTGAGCGGAAGTGC AAAA	100697805
	PPAR-α A	GATGAAAGGCGGCTTGCTAGT	
β -actin	B S	ATCGTGGGGCGCCCCAGGCATCAGG	100476247
	B A	CCTGATGCCTGGGGCCCCACGAT	

反应体系为 ddH₂O 7.2 μL, SYBR Green Supermix 10 μL, 引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, cDNA (10 ng/μL) 2 μL。PCR 扩增程序: 95 ℃ 3 min, 95 ℃ 10 s, 63 ℃ 15s, 72 ℃ 25 s, 进行熔融曲线分析, 证实扩增为单个 PCR 产物。所有基因的扩增效率在 95.1%~99.3%。每个样本 3 次重复, 采用 2^{-ΔΔCt} 法对不同基因的表达量进行比较分析。

1.2.4 数据分析 统计结果以平均值±标准差($\bar{x}\pm SD$)表示, 采用 SPSS 19 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 当差异显著($P<0.05$)时, 再进行 student-Newman-Keuls 多重比较分析。以 GraphPad Prism V.5.03 工具制作图表。

2 结果与分析

2.1 盐度胁迫下血浆渗透压

直接转入盐度水体后, 盐度组血浆渗透压均有明显上升, 12 h, 血浆渗透压达到峰值(图 1), 随后血浆渗透压逐渐下降(S8 组恢复速度较 S16 组快), 逐渐恢复至初始水平。胁迫过程中, S16 组血

浆渗透压显著高于 S8 组($P<0.05$)。

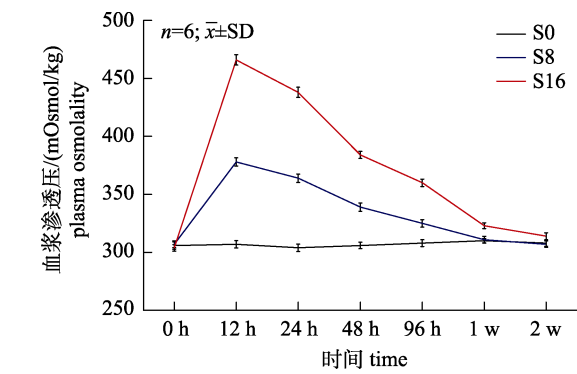


图 1 盐度胁迫下尼罗罗非鱼血浆渗透压
Fig. 1 Plasma osmolality of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at different salinity stress

2.2 盐度胁迫下肝脂肪酸组成

盐度组和淡水组肝中脂肪酸组成见表 2。前 96 h, 盐度组饱和脂肪酸(SFA, 以 C16 为主)含量显著低于淡水组($P<0.05$), S16 组含量显著低于 S8 组($P<0.05$); 96 h 后, 盐度组饱和脂肪酸含量恢复至初始水平。

表 2 不同盐度处理 2 周尼罗罗非鱼肝脂肪酸组成
Tab. 2 Fatty acid composition in liver of Nile tilapia at different salinity treatments for 2 weeks

脂肪酸 fatty acid	对照组 control group S0						
	0 h	12 h	24 h	48 h	96 h	1 w	2 w
C14:0	1.03±0.07	1.12±0.05	1.18±0.04	1.05±0.08	1.09±0.06	0.85±0.01	/
C16:0	14.65±0.46 ^c	14.35±0.86 ^c	14.94±0.76 ^c	14.52±0.64 ^c	15.13±0.45 ^c	18.49±0.74 ^b	20.82±1.06 ^a
C18:0	7.29±0.45 ^b	7.21±0.28 ^b	7.16±0.31 ^b	6.89±0.27 ^b	7.34±0.13 ^b	12.07±1.05 ^a	12.27±0.65 ^a
SFA	22.97±1.01 ^a	22.68±0.87 ^a	23.28±0.95 ^a	22.46±1.15 ^b	23.56±1.36 ^b	31.41±1.38 ^b	33.09±1.59 ^a
C16:1	3.04±0.14	2.97±0.04	3.04±0.09	2.85±0.08	3.15±0.12	2.84±0.08	2.79±0.09
C18:1(n-9)	29.5±1.28 ^a	28.78±1.14 ^a	28.96±1.26 ^a	29.43±1.42 ^a	29.38±1.57 ^a	27.31±1.25 ^b	26.89±1.27 ^b
C20:1(n-9)	1.32±0.06	1.31±0.06	1.34±0.03	1.26±0.04	1.39±0.02	1.33±0.05	1.27±0.08
MUFA	33.86±1.18 ^a	33.06±1.26 ^a	33.34±1.49 ^a	33.54±1.51 ^a	33.92±1.06 ^a	31.48±2.14 ^b	30.95±1.96 ^b
C18:2(n-6)	22.44±0.86 ^a	23.67±1.08 ^a	23.89±1.17 ^a	23.34±1.16 ^a	21.69±0.84 ^{ab}	19.1±0.71 ^b	18.87±0.92 ^b
C18:3(n-6)	0.94±0.02	1.07±0.02	0.93±0.08	0.89±0.02	0.88±0.01	1.14±0.04	0.99±0.08
C20:2(n-6)	1.41±0.16	1.43±0.09	1.47±0.07	1.51±0.08	1.45±0.08	1.38±0.06	1.54±0.02
C20:4(n-6) ARA	2.77±0.19 ^c	2.97±0.12 ^c	2.89±0.14 ^c	2.97±0.14 ^c	2.62±0.12 ^c	2.77±0.16 ^c	2.74±0.09 ^c
n-6 PUFA	27.56±1.25 ^b	29.14±1.31 ^a	29.18±2.08 ^a	28.71±1.43 ^a	26.64±2.04 ^b	26.39±1.32 ^{bc}	24.14±1.65 ^c
C18:3(n-3)	1.02±0.04	1.11±0.08	1.14±0.06	0.98±0.02	1.15±0.08	0.97±0.02	1.06±0.05
C20:5(n-3) EPA	1.07±0.02 ^d	1.02±0.05 ^d	0.94±0.03 ^d	1.05±0.04 ^d	1.04±0.02 ^d	1.12±0.08 ^d	0.99±0.02 ^d
C22:6(n-3) DHA	13.5±0.74 ^d	12.71±0.42 ^d	13.05±0.34 ^d	13.42±0.57 ^d	13.29±0.46 ^d	10.06±0.43 ^c	9.63±0.37 ^c
n-3 PUFA	15.59±1.13 ^d	14.84±0.76 ^d	15.13±1.27 ^d	15.45±0.86 ^d	15.48±1.04 ^d	12.15±0.74 ^c	11.68±0.75 ^c
PUFA	43.15±1.84 ^c	43.98±2.16 ^c	44.31±2.35 ^c	44.16±2.24 ^c	42.12±2.48 ^c	36.54±2.81 ^d	35.82±2.37 ^d
LC-PUFA	18.36±1.06 ^d	17.81±0.59 ^d	18.02±0.82 ^d	18.42±0.81 ^d	18.1±0.72 ^d	14.92±0.67 ^c	14.42±0.76 ^c

(待续 to be continued)

(续表 2 Tab. 2 continued)

脂肪酸 fatty acid	处理组 treatment S8					
	12 h	24 h	48 h	96 h	1 w	2 w
C14:0	/	/	/	/	/	/
C16:0	13.33±0.15 ^d	13.56±0.23 ^d	13.42±0.37 ^d	13.77±0.29 ^d	14.82±1.03 ^c	14.73±0.84 ^c
C18:0	6.93±0.12 ^b	7.04±0.14 ^b	6.84±0.12 ^b	6.75±0.07 ^b	7.76±0.58 ^b	7.34±0.32 ^b
SFA	20.26±1.26 ^c	20.6±0.76 ^c	20.26±1.07 ^c	20.52±0.68 ^c	22.58±1.07 ^b	22.07±1.25 ^b
C16:1	2.57±0.08	2.59±0.13	2.72±0.04	3.09±0.09	2.85±0.12	2.69±0.12
C18:1(n-9)	24.91±1.09 ^c	24.82±1.05 ^c	25.04±1.26 ^c	24.93±0.99 ^c	23.84±1.07 ^d	22.84±1.13 ^d
C20:1(n-9)	1.41±0.07	1.38±0.04	1.34±0.06	1.45±0.02	1.31±0.09	1.36±0.04
MUFA	28.91±1.31 ^c	28.79±1.36 ^c	29.1±1.57 ^c	29.47±1.28 ^c	28.04±1.76 ^c	26.89±1.34 ^d
C18:2(n-6)	20.49±1.06 ^b	19.49±0.82 ^b	19.69±1.04 ^b	18.37±1.02 ^c	17.54±0.82 ^c	18.51±1.34 ^c
C18:3(n-6)	1.12±0.04	1.07±0.06	1.14±0.08	0.96±0.02	1.06±0.04	1.03±0.02
C20:2(n-6)	1.45±0.09	1.49±0.13	1.36±0.02	1.28±0.06	1.44±0.08	1.41±0.02
C20:4(n-6) ARA	4.12±0.19 ^d	4.36±0.17 ^c	4.71±0.14 ^c	4.43±0.09 ^c	4.8±0.13 ^c	4.81±0.21 ^c
n-6 PUFA	27.18±1.08 ^b	26.41±1.37 ^{bc}	26.9±1.25 ^b	25.04±1.56 ^c	24.84±0.85 ^c	25.76±1.24 ^c
C18:3(n-3)	0.98±0.01	0.95±0.09	1.07±0.06	1.12±0.04	1.04±0.01	1.12±0.08
C20:5(n-3) EPA	3.46±0.09 ^b	3.37±0.14 ^b	3.12±0.13 ^b	3.32±0.13 ^b	2.66±0.14 ^c	2.72±0.02 ^c
C22:6(n-3) DHA	18.84±0.87 ^c	19.16±1.16 ^c	19.87±1.07 ^b	20.14±0.98 ^b	20.47±1.08 ^b	21.41±0.96 ^b
n-3 PUFA	23.18±1.28 ^c	23.48±1.23 ^c	24.06±1.18 ^b	24.58±0.76 ^b	24.17±1.16 ^b	25.25±0.78 ^b
PUFA	50.36±2.26 ^b	49.89±2.58 ^b	50.96±2.08 ^b	49.62±2.03 ^b	49.01±2.46 ^b	50.01±1.54 ^b
LC-PUFA	27.3±0.76 ^c	27.84±1.76 ^c	28.77±1.46 ^b	29.01±1.34 ^b	28.97±1.42 ^b	30.06±1.37 ^b

脂肪酸 fatty acid	处理组 treatment S16					
	12 h	24 h	48 h	96 h	1 w	2 w
C14:0	/	/	/	/	/	/
C16:0	12.35±0.92 ^c	12.54±0.64 ^c	13.19±0.54 ^d	13.32±0.74 ^d	13.62±0.56 ^d	14.51±0.91 ^c
C18:0	7.01±0.17 ^b	7.09±0.23 ^b	7.21±0.28 ^b	7.23±0.16 ^b	7.59±0.83 ^b	7.63±0.27 ^b
SFA	19.36±1.01 ^d	19.63±1.27 ^d	20.4±1.06 ^c	20.55±1.07 ^c	21.21±0.96 ^{bc}	22.14±1.09 ^b
C16:1	2.96±0.02	3.09±0.16	3.15±0.15	3.24±0.24	2.61±0.05	2.52±0.06
C18:1(n-9)	25.29±1.04 ^c	24.78±1.36 ^c	23.06±1.08 ^d	22.12±1.23 ^{dc}	21.26±1.39 ^c	20.95±1.34 ^c
C20:1(n-9)	1.44±0.04	1.47±0.04	1.41±0.06	1.48±0.01	1.34±0.02	1.37±0.04
MUFA	29.72±1.09 ^c	29.34±1.45 ^c	27.62±1.42 ^d	26.84±0.56 ^{dc}	25.21±1.05 ^c	25.84±1.04 ^c
C18:2(n-6)	19.61±0.94 ^b	19.26±0.62 ^c	18.55±0.73 ^c	15.62±0.43 ^d	16.72±1.06 ^d	16.25±0.87 ^d
C18:3(n-6)	0.98±0.01	1.03±0.09	0.94±0.02	0.92±0.01	1.11±0.05	0.94±0.01
C20:2(n-6)	1.39±0.04	1.42±0.05	1.45±0.04	1.36±0.06	1.32±0.10	1.53±0.08
C20:4(n-6) ARA	5.04±0.12 ^b	5.48±0.24 ^b	5.11±0.21 ^b	6.52±0.25 ^a	5.43±0.21 ^b	5.69±0.16 ^b
n-6 PUFA	27.02±1.27 ^b	27.19±1.32 ^b	26.05±1.29 ^c	24.42±1.23 ^d	24.58±1.49 ^c	24.41±0.59 ^c
C18:3(n-3)	1.09±0.06	1.06±0.05	1.14±0.06	1.04±0.01	1.13±0.05	0.95±0.02
C20:5(n-3) EPA	3.85±0.04 ^a	3.92±0.12 ^a	3.87±0.14 ^a	4.02±0.09 ^a	3.81±0.06 ^a	3.16±0.09 ^b
C22:6(n-3) DHA	17.01±0.63 ^c	18.52±0.91 ^c	20.38±1.02 ^b	22.74±1.28 ^b	23.29±0.81 ^a	24.13±1.34 ^a
n-3 PUFA	21.95±1.03 ^c	23.5±1.16 ^c	25.39±1.15 ^b	27.8±1.37 ^{ab}	28.23±1.37 ^a	28.24±1.29 ^a
PUFA	49.57±1.96 ^b	50.69±1.97 ^b	51.44±2.07 ^a	52.22±1.74 ^a	52.81±3.47 ^a	52.65±2.34 ^a
LC-PUFA	26.99±1.29 ^c	28.98±1.47 ^b	30.5±1.32 ^b	34.32±1.15 ^a	33.66±1.86 ^a	33.93±1.69 ^a

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 ($P<0.05$).

胁迫期间, 盐度组单不饱和脂肪酸(MUFA, 以 C18:1 为主)含量显著低于淡水组($P<0.05$); S16 组 MUFA 含量显著低于 S8 组($P<0.05$), 96 h 前盐度组 MUFA 含量呈下降趋势, 96 h 后趋于稳定。

淡水组多不饱和脂肪酸(PUFA)显著高于盐度组($P<0.05$), S8 组 PUFA 含量显著高于 S16 组($P<0.05$)。96 h 前盐度组 PUFA 含量呈下降趋势, 96 h 后趋于稳定, 其中, 盐度组亚油酸(LA)含量显著低于 S0 组($P<0.05$), S16 组 LA 含量显著低于 S8 组($P<0.05$), LA 含量变化趋势与 PUFA 相符; 盐度组长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA, 花生四烯酸、DHA 和 EPA)含量显著高于淡水组($P<0.05$), S16 组 LC-PUFA 含量显著高于 S8 组($P<0.05$); 96 h 前 LC-PUFA 含量呈上升趋势, 96 h 后趋于平稳。

2.3 盐度胁迫下肝脂代谢基因表达

如图 2 所示, 盐度组 *LPL* mRNA 表达量显著高于淡水组($P<0.05$), 表达量在 96 h 达到峰值, 胁迫期间, S16 组 *LPL* 表达量显著高于 S8 组($P<0.05$), 96 h 前表达量呈上升趋势, 96 h 后开始下降。如图 3 所示, 盐度组 *ME* mRNA 表达量显著高于淡水组($P<0.05$), 表达量在 12 h 达到峰值, 胁迫期间, S16 组表达量显著高于 S8 组($P<0.05$), 12 h 后表达量开始下降。如图 4 所示, 盐度组 *PPAR-α* mRNA 表达量显著高于淡水组($P<0.05$), 表达量在 96 h 达到峰值, 胁迫期间, S16 组表达量

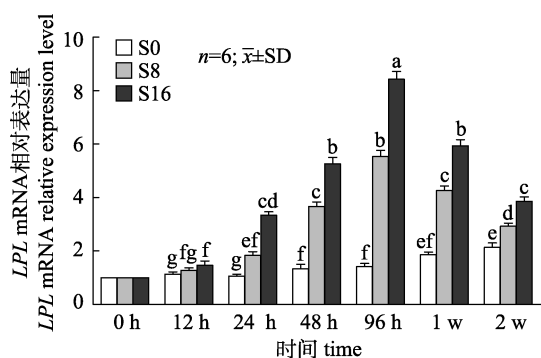


图 2 盐胁迫下尼罗罗非鱼肝 *LPL* mRNA 相对表达量

柱上不同字母代表不同组间显著差异($P<0.05$).

Fig. 2 The mRNA expression of *LPL* in the liver of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at salinity stress
Different letters show significant differences between groups ($P<0.05$).

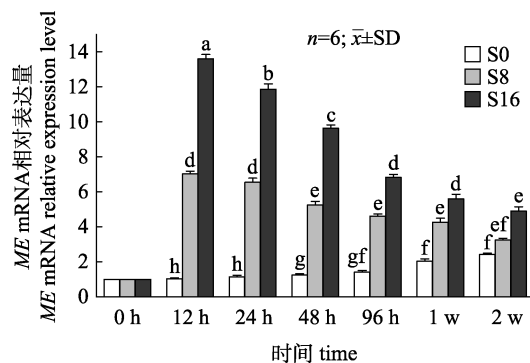


图 3 盐度胁迫下尼罗罗非鱼肝 *ME* mRNA 相对表达量

柱上不同字母代表不同组间显著差异($P<0.05$).

Fig. 3 The mRNA expression of *ME* in the liver of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at salinity stress
Different letters show significant differences between groups ($P<0.05$).

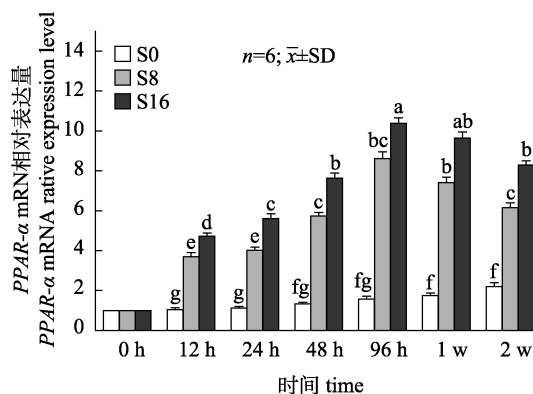


图 4 盐度胁迫下尼罗罗非鱼肝 *PPAR-α* 转录因子 mRNA 相对表达量

柱上不同字母代表不同组间显著差异($P<0.05$).

Fig. 4 The mRNA expression of *PPAR-α* in the liver of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at salinity stress
Different letters show significant differences between groups ($P<0.05$).

显著高于 S8 组($P<0.05$), 96 h 前表达量呈上升趋势, 96 h 后开始下降。

3 讨论

鱼类应对盐度胁迫是一个离子浓度升高的过程, 直观表现为血浆渗透压变化。广盐性硬骨鱼类在适应不同盐度环境时分为两个阶段, 即适应期和长期调节期^[22-24]。本研究中, 尼罗罗非鱼盐度组血浆渗透压呈现两种不同阶段的变化, 第一个阶段(0~96 h)为血浆渗透压急剧变化时期, 两

个盐度组(8、16)血浆渗透压分别由(378.00±3.59) mOsmol/kg 和(466.00±4.54) mOsmol/kg 降低至(325.00±3.15) mOsmol/kg 和(360.00±3.27) mOsmol/kg, 第二个阶段(96 h~2 w)血浆渗透压开始缓慢下降并恢复至淡水组水平。研究结果与莫桑比克罗非鱼(*O. mossambicus*)^[25]、花白鲮(*Fundulus heteroclitus*)^[26-27]和金头鲷(*Sparus aurata*)^[28]等血浆渗透压变化趋势相符。尼罗罗非鱼前 96 h 为适应期, 96 h 后进入长期调节期。

不同类型脂肪酸在生物生理生化过程中发挥的作用不同。研究表明, 饱和脂肪酸为鱼类主要的贮能物质, 可以为渗透压调节提供大量的能量^[29]。LC-PUFA 是细胞膜不可缺少的成分, 通过其含量的变化改变细胞膜的通透性进而参与渗透调节^[30-31]。本研究中, 盐度胁迫下肝中 SFA 和 LC-PUFA 含量呈现不同的变化, 如盐度组 SFA 含量在 96 h 前显著低于 S0 组($P<0.05$), 96 h 后逐渐恢复初始水平; LC-PUFA 含量 96 h 前呈现上升趋势, 96 h 后趋于平稳。表明在盐度胁迫下, 尼罗罗非鱼(1) 96 h 内是重要调节期; (2) SFA 和 LC-PUFA 含量变化, 暗示它们是脂代谢调整过程。

Nano 等^[32]分别用棕榈酸和 LC-PUFA 培养 Caco-2 细胞, 发现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 添加量成正比。虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[33]在盐度胁迫下肝 EPA 和 DHA 含量提高, 同样的结果在日本鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[34]淡化过程中也被发现。已有研究表明提高 EPA 和 DHA 比例有助于机体的渗透压调节^[33-34]。本研究中, 96 h 前, 盐度组 EPA 和 DHA 含量呈现上升趋势, S16 组 EPA 和 DHA 含量高于 S8 组, 表明在盐度胁迫时促进了肝中 EPA 和 DHA 合成, 且随胁迫强度增加。EPA 和 DHA 含量 96 h 后逐渐趋于平稳。表明在适应期内, 通过提升 EPA [C20:5(n-3)]和 DHA [C22:6(n-3)]含量, 增加细胞膜流动性, 以应对盐度离子胁迫压力; 进入长期调节期后, 渗透压平衡重新建立, 所以 EPA 和 DHA 含量保持在较稳定的水平。有研究表明, ARA [C20:4(n-6)]可以转化为皮质醇参与渗透压调节过程^[35]。表明 ARA 在渗透压调节

过程中起关键作用。研究表明, 饲料中缺乏 ARA 会降低条纹鲈鱼(*Morone saxatilis*)^[36]仔稚鱼机体抗应激能力, 从而抑制免疫系统发育。饲料中添加 ARA 可提高金头鲷^[37]和大西洋牙鲆(*Paralichthys dentatus*)^[38]机体的抗应激反应。本研究中, 盐度组 ARA 含量高于 S0 组, 表明在盐度胁迫下, 机体对抗应激反应促进 ARA 的合成增加。96 h 前盐度处理组 ARA 含量呈上升趋势, 96 h 后下降并趋于平稳, 表明尼罗罗非鱼在适应期、长期调节期机体的不同应激反应。

研究表明, SFA 通过 β -氧化作用可以为渗透压调节提供所需的能量^[39]。本研究中, 96 h 前盐度组 SFA 含量显著低于淡水组($P<0.05$), 表明在尼罗罗非鱼在适应期消耗的能量较高。LPL 酶是脂质动员的关键酶, 盐度组 LPL mRNA 表达量高于淡水组, 96 h 到达高峰, 表明在盐度胁迫下肝脂解作用活跃, 这也与盐度胁迫其间 SFA 含量变化趋势有一定关联。ME 是 β -氧化关键酶, 本研究中, 盐度组肝 ME mRNA 表达量高于淡水组, 12 h 表达量最高, 表明当渗透压最高, 胁迫强度最大, 对离子转运能量需求最大。进入长期调节后, 脂肪酸代谢趋于平稳, 表明渗透压调节与能量代谢达到了一个新的平衡。本研究中, S16 组 LPL 表达量高于 S8 组, 表明高盐胁迫进一步增强了脂解作用。PPAR- α 转录因子是参与脂肪酸 β -氧化过程的调节因子。本研究中, 盐度组肝 PPAR- α mRNA 表达量 96 h 前上升, 表明在适应期肝脂肪酸 β -氧化过程活跃, 耗能较高; 96 h 后下降, 脂肪酸 β -氧化作用减弱, 渗透压平衡恢复, 能量代谢建立了新的平衡。

通过对胁迫后罗非鱼血浆渗透压、肝脂肪酸组成及 LPL、ME 和 PPAR- α 表达量分析比较, 初步揭示适应期, 渗透压快速上升, 机体应激反应较大, 渗透压调节对能量需求高, 进入胁迫后期时机体转为长期调节阶段, 渗透压已趋于恢复, 渗透调节的能量需求趋于平稳。胁迫前期, LPL、ME 和 PPAR- α 表达量增加, 促进了脂解作用和脂肪酸的氧化, 改变了脂肪酸组成。SFA 含量降低, 表明 SFA 氧化可为渗透压调节提供能量; LC-PUFA

升高趋势, 表明 ARA 缓解了机体应激反应, n-3 LC-PUFA 提供细胞膜组分参与渗透压调节。

参考文献:

- [1] Gutiérrez-Cánovas C, Millán A, Velasco J, et al. Contrasting effects of natural and anthropogenic stressors on beta diversity in river organisms[J]. *Global Ecology and Biogeography*, 2013, 22(7): 796-805.
- [2] Hwang P P, Lee T H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2007, 148(3): 479-497.
- [3] Hiroi J, McCormick S D. New insights into gill ionocyte and ion transporter function in euryhaline and diadromous fish[J]. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2012, 184(3): 257-268.
- [4] Tseng Y C, Hwang P P. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2008, 148(4): 419-429.
- [5] Luvizotto-Santos R, Lee J T, Branco Z P, et al. Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* dana, 1851 (crustacea-grapsidae)[J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 2003, 295A(2): 200-205.
- [6] 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]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2005, 1734(1): 13-24.
- [7] 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]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 151(2): 183-190.
- [8] 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]. *Fisheries Science*, 2011, 77(3): 385-396.
- [9] Schirf V R, Turner P, Selby L, et al. Nutritional status and energy metabolism of crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) muscle and hepatopancreas[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1987, 88(3): 383-386.
- [10] Pierron F, Baudrimont M, Bossy A, et al. Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 81(3): 304-311.
- [11] Diez A, Menoyo D, Pérez-Benavente S, et al. Conjugated linoleic acid affects lipid composition, metabolism, and gene expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L)[J]. *The Journal of Nutrition*, 2007, 137(6): 1363-1369.
- [12] Zimmermann R, Strauss J G, Heammler G, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase[J]. *Science*, 2004, 306(5700): 1383-1386.
- [13] Tian J, Wen H, Zeng L B, et al. Changes in the activities and mRNA expression levels of lipoprotein lipase (LPL), hormone-sensitive lipase (HSL) and fatty acid synthetase (FAS) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during fasting and re-feeding[J]. *Aquaculture*, 2013, 400-401: 29-35.
- [14] Guay C, Madiraju S R M, Aumais A, et al. A role for ATP-citrate lyase, malic enzyme, and pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(49): 35657-35665.
- [15] Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2011, 1812(8): 1007-1022.
- [16] Li Y, Zhao Y T, Zhang Y K, et al. Growth performance, fatty acid composition, peroxisome proliferator-activated receptors gene expressions, and antioxidant abilities of blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*, fingerlings fed different dietary oil sources[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2015, 46(4): 395-408.
- [17] Yao Z L, Wang H. Advances on the studies of tilapia cultured in saline water[J]. *Marine Fisheries*, 2006, 28(3): 251-256. [么宗利, 王慧. 罗非鱼咸水养殖研究进展[J]. 海洋渔业, 2006, 28(3): 251-256.]
- [18] Fan W J, Li S F, Meng Q H, et al. Saltwater tolerance of *Oreochromis niloticus* (NEW GIFTS), *Sarotherodon melanotheron*, and their F₁ and F₂ hybrids[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(3): 430-435. [范武江, 李思发, 孟庆辉, 等. 4 种遗传型罗非鱼的耐盐慢性驯化表现[J]. 中国水产科学, 2012, 19(3): 430-435.]
- [19] Tang S J, Yang J, Wang C H, et al. Analysis of selective pressure on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) populations during domestication/selective breeding[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(4): 900-913. [唐首杰, 杨洁, 王成辉, 等. 驯养、选育条件下尼罗罗非鱼群体的选择压力分析[J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 900-913.]
- [20] Liu W, Wen H, Lu X, et al. Effects of high levels of niacin on lipid metabolism and body fat deposition in genetically improved farmed tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Journal*

- of Fishery Sciences of China, 2019, 26(3): 473-483. [刘伟, 文华, 陆星, 等. 高水平烟酸对吉富罗非鱼脂代谢和体脂沉积的影响[J]. 中国水产科学, 2019, 26(3): 473-483.]
- [21] Xu Z X, Gan L, Li T Y, et al. Transcriptome profiling and molecular pathway analysis of genes in association with salinity adaptation in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. PLoS ONE, 2015, 10(8): e0136506.
- [22] Laiz- Carrión R, Sangiao-Alvarellos S, Guzmán J M, et al. Growth performance of gilthead sea bream *Sparus aurata* in different osmotic conditions: Implications for osmoregulation and energy metabolism[J]. Aquaculture, 2005, 250(3-4): 849-861.
- [23] Polakof S, Arjona F J, Sangiao-Alvarellos S, et al. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*[J]. Journal of Comparative Physiology B, 2006, 176(5): 441-452.
- [24] Arjona F J, Vargas-Chacoff L, Ruiz-Jarabo I, et al. Osmoregulatory response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to changes in environmental salinity[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2007, 148(2): 413-421.
- [25] Lin C H, Huang C L, Yang C H, et al. Time-course changes in the expression of Na, K-ATPase and the morphometry of mitochondrion-rich cells in gills of euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during freshwater acclimation[J]. Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology, 2004, 301A(1): 85-96.
- [26] Wood C M, Marshall W S. Ion balance, acid-base regulation, and chloride cell function in the common killifish, *Fundulus heteroclitus*: A euryhaline estuarine teleost[J]. Estuaries, 1994, 17(1): 34-52.
- [27] Marshall W S, Emberley T R, Singer T D, et al. Time course of salinity adaptation in a strongly euryhaline estuarine teleost, *Fundulus heteroclitus*: A multivariable approach[J]. Journal of Experimental Biology, 1999, 202(11): 1535-1544.
- [28] Mancera J M, Perez-Figares J M, Fernandez-Llebrez P. Osmoregulatory responses to abrupt salinity changes in the euryhaline gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1993, 106(2): 245-250.
- [29] Sangiao-Alvarellos S, Laiz-Carrión R, Guzmán J M, et al. Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs[J]. American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2003, 285(4): R897-R907.
- [30] Borlongan I G, Benitez L V. Lipid and fatty acid composition of milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) grown in freshwater and seawater[J]. Aquaculture, 1992, 104(1-2): 79-89.
- [31] Mourente G, Bell J G, Tocher D R. Does dietary tocopherol level affect fatty acid metabolism in fish?[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2007, 33(3): 269-280.
- [32] Nano J L, Nobili C, Girard-Pipau F, et al. Effects of fatty acids on the growth of Caco-2 cells[J]. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2003, 69(4): 207-215.
- [33] İbrahim Haliloğlu H, Bayır A, Necdet Sirkecioğlu A, et al. Comparison of fatty acid composition in some tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) living in seawater and freshwater[J]. Food Chemistry, 2004, 86(1): 55-59.
- [34] Xu J, Yan B L, Teng Y J, et al. Analysis of nutrient composition and fatty acid profiles of Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus* (Cuvier) reared in seawater and freshwater[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2010, 23(5): 401-405.
- [35] Hemler M E, Lands W E M. Biosynthesis of prostaglandins[J]. Lipids, 1977, 12(7): 591-595.
- [36] 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 Physiology and Biochemistry, 2001, 24(2): 113-123.
- [37] 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.
- [38] Willey S, Bengtson D A, Harel M T. Arachidonic acid requirements in larval summer flounder, *Paralichthys dentatus*[J]. Aquaculture International, 2003, 11(1-2): 131-149.
- [39] Chirala S S, Wakil S J. Structure and function of animal fatty acid synthase[J]. Lipids, 2004, 39(11): 1045-1053.

Effects of salinity on the fatty acid composition and the expression of lipid-metabolism-related genes in the liver of Nile tilapia

SONG Lingyuan^{1,2,3}, CHENG Yamei^{1,2,3}, ZHAO Jinliang^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Salinity is one of the most important factors that influence the physiological status of fish. To adapt to different salinity environments, fish need to consume a lot of energy to maintain osmotic pressure balance. As an intermediate product of lipid metabolism, fatty acids not only play an important role in physiological and biochemical processes, but are also an important energy source for the body. The liver is the main lipid storage organ and the main organ for fatty acid metabolism in fish. *Oreochromis niloticus* is a unique model species to study salinity adaptation because it can live in a wide range of salinities. To investigate the effects of salinity on the metabolism of fatty acids in the liver of *Oreochromis niloticus*, this study compared the changes in fatty acid composition and the mRNA expressions of lipoprotein lipase (LPL), malic enzyme (ME) and peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) in the liver of Nile tilapia in saline water (levels 8 and 16) during a two week salinity stress period. The results showed that the plasma osmolality in the salinity group rose to the highest level in 12 h, and the plasma osmolality in the 16-salinity group was significantly higher than in the 8-salinity group. Meanwhile, the plasma osmolality gradually decreased and tended to be stable in the latter stage of treatments. Before 96 h, the content of saturated fatty acids in the liver of the salinity groups was significantly lower than the freshwater group ($P<0.05$). After 96 h, they gradually recovered to the initial level. The content of monounsaturated fatty acids in the liver of the salinity group was significantly lower than the freshwater group ($P<0.05$). The content of long-chain polyunsaturated fatty acids (mainly docosahexaenoic acid DHA, Eicosapentaenoic Acid EPA, and Arachidonic Acid ARA) in the liver of the salinity groups was significantly higher than the freshwater group ($P<0.05$). The mRNA expressions of LPL, ME, and PPAR- α in the liver of the salinity groups was significantly higher than the freshwater group ($P<0.05$). These results indicate that the composition of fatty acids in the liver and lipid metabolism can be impacted by salinity stress, which provides basic information on lipid energy utilization in fish osmoregulation.

Key words: *Oreochromis niloticus*; fatty acids; lipid metabolism; salinity stress

Corresponding author: ZHAO Jinliang. E-mail: jlzha@shou.edu.cn