

文章编号: 1674-5566(2020)01-0045-10

DOI:10.12024/jsou.20190302546

投喂蚕豆对草鱼肝脏脂肪蓄积及脂肪代谢的影响

付兵^{1,2}, 郁二蒙¹, 王广军¹, 谢骏¹, 李志斐¹, 张凯¹, 龚望宝¹,
田晶晶¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为了研究摄食蚕豆后草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 肝脏脂肪蓄积情况以及形成原因, 采集了摄食蚕豆的草鱼 (试验组) 和摄食配合饲料的草鱼 (对照组) 的肝脏样本后, 通过 H&E 染色、油红 O 染色和透射电镜分别对两组草鱼肝脏进行病理学特征、脂质蓄积情况和肝细胞的超显微结构观察, 同时检测与脂肪代谢相关的生理生化指标, 并分析与脂肪酸合成相关的基因表达情况。结果发现: 与对照组草鱼相比, 试验组草鱼肝脏发生明显的脂肪变性, 线粒体形态异常且数量减少; 试验组草鱼血清中甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 含量显著升高 ($P < 0.05$); 试验组草鱼肝脏中 TG、TC 和过氧化氢 (H_2O_2) 含量显著增加, 但过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽 (GSH) 显著降低 ($P < 0.01$); 试验组草鱼肝脏脂肪酸合成相关基因 (*acc* 和 *fas*) 的 mRNA 表达量极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。研究表明, 长期摄食蚕豆的草鱼肝脏会发生脂肪变性, 其可能与脂肪酸从头合成 (DNL) 增加、氧化应激增强及线粒体结构破坏等有关。研究结果将为脆肉鲩营养调控和预防鱼类肝脏脂肪变性提供一定的理论依据。

关键词: 草鱼; 蚕豆; 超微结构; 线粒体; 脂肪酸合成基因

中图分类号: S 963 **文献标志码:** A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 是我国重要的淡水养殖鱼类之一, 2018 年全国产量为 535 万 t, 约占全国水产品总量的 9%。在 20 世纪 70 年代初, 广东省五七干校技术人员偶然发现在草鱼成鱼养殖阶段投喂单一饲料蚕豆 (*Vicia faba*) 90 ~ 120 d 后, 其肌肉硬度增加、肉质紧实和口感脆爽。这种肌肉性质改变的草鱼被称脆化草鱼或脆肉鲩^[1]。脆肉鲩因口感改善深受消费者喜爱, 目前已推广至全国, 部分产品远销东南亚和北美。脆肉鲩不仅拓宽了普通草鱼的销售市场, 而且脆肉鲩的市场价格通常是普通草鱼的二倍以上, 显著提高了养殖户的经济效益。

然而脆肉鲩, 在养殖过程中, 不仅出现生长缓慢, 而且其肝脏受到摄食蚕豆的影响, 表现为肝脏抗氧化能力降低和功能受损^[2-3], 在快速游

动后肝脏会严重充血^[4]。另外, 有研究发现, 蚕豆投喂陆生动物后, 其肝脏也有类似的现象。MARTÍNEZ 等^[5]将蚕豆作为唯一蛋白来源投喂给小鼠后发现小鼠生长减缓和肝脏重量显著减少。ORTIZ 等^[6]用含有蚕豆提取物单宁的饲料投喂给鸡和小鼠后, 发现肝脏均水肿变性。本团队前期研究还发现投喂蚕豆后, 草鱼肝脏中的粗脂肪含量增多^[7]。这说明蚕豆可能导致了草鱼肝脏中的脂肪代谢失衡, 造成脂肪在肝脏中蓄积。到目前为止, 对投喂蚕豆造成草鱼肝脏脂肪蓄积的机制未见有报道。此外, 研究^[8-10]表明鱼类脂肪肝的发生不仅会降低鱼类的生长性能、免疫能力和抗病能力, 更严重的是还会降低肌肉的品质, 影响口感。因此降低脂肪肝的发生、维持肝脏的健康状态对保证脆肉鲩肌肉品质有积极

收稿日期: 2019-03-03 修回日期: 2019-05-08

基金项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费 (2017HY-ZC0501); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-45-21); 中国-东盟海上基金 (CAMC-2018F); 广东省省级科技计划项目 (2017B090906002)

作者简介: 付兵 (1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物健康养殖。E-mail: alifb1028@163.com

通信作者: 王广军, E-mail: gjwang@prfi.ac.cn

的意义。

为了探究蚕豆引起草鱼肝脏脂肪蓄积的原因,以蚕豆为单一饲料源投喂草鱼 120 d 后,采集摄食蚕豆的草鱼(脆肉鲩)和摄食配合饲料的普通草鱼的血液和肝脏样品,进行肝脏的 H&E 染色、油红 O 染色和肝细胞透射电镜观察,同时测定血液和肝脏中与脂肪代谢相关的生理生化指标,并利用 Real-time PCR 技术定量分析基因 *acc* 和 *fas* 的表达变化,以期期望为脆肉鲩的营养调控提供科学数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验草鱼的养殖在珠江水产研究所养殖基地进行,养殖鱼池规格为 4.5 m × 4.5 m × 1.1 m 的水泥池,取规格基本一致且体质健康的草鱼 180 尾[(816.44 ± 57.96) g],分成对照组(投喂普通配合饲料)和试验组(投喂单一蚕豆),每组设置 3 个重复,每个重复为 30 尾,养殖时间为 2018 年 6 月中旬至 2018 年 10 月中旬(120 d)。蚕豆的粗蛋白质与粗脂肪含量分别为 287 g/kg 和 23.1 g/kg,而普通饲料的粗蛋白与粗脂肪分别为 360 g/kg 和 6.2 g/kg。投饵量按体质量的 3% ~ 5% 计算,每天投喂 2 次(9:00 和 18:00)。试验期间水温为 25 ~ 30 °C, pH 为 6.5 ~ 7.5,溶解氧大于 5.0 mg/L。养殖试验结束后,试验组草鱼和对照组草鱼体质量分别为(1 798 ± 129) g 和 (2 225 ± 100) g。

1.2 取样

每个重复取 3 尾鱼,经丁香酚麻醉后,用 5 mL 无菌注射器从尾静脉取血,采集的血液置于 10 mL 无菌离心管中,4 °C 冰箱中静置 3 h 后,在 3 500 r/min 离心 10 min,取上层血清用于生理生化指标的测定。解剖试验鱼,取约 1 g 肝脏组织,液氮速冻,于 -80 °C 冰箱保存用于基因表达检测;切割厚度小于 0.5 cm 的肝脏组织固定于 4% 多聚甲醛和 10% 甲醛中,分别用于 H&E 染色和油红 O 染色;取厚度小于 0.2 cm 的肝脏组织固定于 2.5% 戊二醛溶液中用于透射电镜观察;取约 5 g 的肝脏组织,液氮速冻,于 -80 °C 保存,用于肝脏生理生化指标的检测。

1.3 H&E 染色和油红 O 染色

肝脏组织在 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后,进

行脱水、透明和浸蜡包埋,制备石蜡组织切片再进行常规染色。待切片水化后浸入苏木精染色 10 min,蒸馏水速洗,用 0.1% 盐酸乙醇分色,浸入 1% 伊红中染色 2 min,再用盐酸乙醇分色,经 95% 乙醇与无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片后,光镜下观察肝脏组织的病理学特征。

肝脏组织冰冻切片后,60% 异丙醇洗 30 s,油红 O 原液 6 mL 加蒸馏水 4 mL 混匀后浸染切片 10 min,60% 异丙醇洗去多余染液,苏木素染核 2 min,水洗至细胞核蓝化,最后用甘油明胶封片。光镜下观察肝细胞中的红色脂滴。

1.4 透射电镜

肝脏组织在 2.5% 戊二醛中固定 24 h 后。用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH = 7.4)冲洗 4 h,在 1% 锇酸培养基中固定,然后用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗,分别使用体积分数为 50%、70%、80%、90% 和 100% 乙醇和 100% 叔丁醇进行脱水。将切片用乙酸双氧铀染色,然后用柠檬酸铅染色。观察超微结构变化,并使用 S-3400N 透射电子显微镜拍摄显微照片,观察肝细胞的超显微结构。

1.5 生理生化指标的测定

将 1.2 节中所取的同一重复的 3 条试验鱼样品混合。按照南京建成生物工程研究所的试剂盒说明书,测定血清甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malonaldehyde, MDA)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)的活性和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)的活性。肝脏的甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、过氧化氢(H₂O₂)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)的测定采用南京建成生物工程研究所的试剂盒;肝脏和血清中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)活性检测使用北京索莱宝科技有限公司的试剂盒。

1.6 Real-time PCR 检测基因 mRNA 表达情况

按照 RNA 提取试剂盒(TaKaRa, 日本)说明

书提取肝脏总 RNA, 经 OD_{260/280} 分析测定 RNA 浓度后, 使用反转录试剂盒 (TaKaRa, 日本) 将 1 μg RNA 反转录为 cDNA。采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测对照组草鱼和试验组草鱼肝脏中的乙酰辅酶 a 羧化酶 (acetyl CoA carboxylase,

acc) 和脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, *fas*) 基因的表达情况, 以草鱼 β -actin 编码的基因作为内参基因。实时荧光定量所用到的引物均由上海英潍捷基贸易有限公司合成, 引物信息详见表 1^[11]。

表 1 内参基因与目的基因的引物

Tab. 1 Primers of reference and target genes

基因 Genes	正向引物(5' - 3') F-Primer (5' - 3')	反向引物(5' - 3') R-Primer (5' - 3')
β -actin	CGTGACATCAAGGAGAAG	GAGTTGAAGGTGGTCTCAT
<i>acc</i>	TGGCTGCACTGCACTCTCACT	GGTCCAGCTTCCTGCGGTC
<i>fas</i>	GATGGGTCTACAGCCTGATGG	GACACCCTGTGGACATTGAGC

实时荧光定量 PCR 采用荧光染料 SYBR[®] GREEN I NUCLEIC A。PCR 反应体系如下: 14.0 μL 超纯水, 2.0 μL 10 \times PCR 缓冲液 (200.0 mmol/L Tris-HCL, 500.0 mmol/L KCl), 1.0 μL 镁离子 (50.0 mmol/L), 1.0 μL 模板, 0.5 μL dNTPs (10 mmol/L), 0.5 μL 上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.5 μL 下游引物 (10.0 $\mu\text{mol/L}$), 0.3 μL SYBR (20 \times), 0.2 μL Taq 酶 (5.0 U/ μL)。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环, 溶解温度 60 ~ 95 $^{\circ}\text{C}$ 。采用 StepOn[™] Real-Time PCR System 检测阈值周期数 (Ct)。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法^[12] 对数据进行处理。

1.7 统计分析

所有数据采用平均值 \pm 标准差 (Means \pm SD) 表示。使用 SPSS 22.0 软件对数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示显著差异, $P < 0.01$ 表示极显著差异。

2 结果与分析

2.1 肝脏外形观察

与对照组草鱼肝脏相比, 试验组草鱼肝脏外观颜色发黄, 贫血肿大, 具有油腻感, 表面出现大小不一的白色坏死病灶。

2.2 H&E 染色的肝脏切片观察

将对照组草鱼与试验组草鱼的肝脏切片进行 H&E 染色观察。由图版 I-1 和图版 I-3 可知: 对照组草鱼肝小叶中央静脉周围肝索结构排列规则, 并呈正常的放射状; 肝索间可见肝窦; 肝细胞形态与大小正常, 核圆、大和居中, 细胞胞质充盈; 肝细胞未见肿胀, 仅有零星的空泡分散在肝脏中。由图版 I-2 和图版 I-4 可知: 试验组草

鱼肝小叶结构紊乱, 界限不清; 肝索排列不规则; 肝细胞明显肿胀, 部分细胞核贴壁, 细胞胞浆内有大量大小不一的空泡。

2.3 油红 O 染色的肝脏切片观察

将对照组草鱼与试验组草鱼的肝脏进行油红 O 染色切片观察, 在光镜下肝细胞内的脂肪滴呈红色, 细胞核呈蓝色。由图版 II-1 和图版 II-3 可知: 对照组草鱼肝细胞仅有少许红色小脂滴。由图版 II-2 和图版 II-4 可知: 试验组草鱼肝细胞明显肿大、变圆, 明显可见细胞内有大小不等的红色脂滴, 呈弥漫状; 中央静脉周围的肝细胞油红染色较深, 肝脏脂肪蓄积严重, 表现为脂肪变性状态。

2.4 肝脏透射电镜观察

将对照组草鱼与试验组草鱼的肝脏切片进行透射电镜观察。由图版 III-1 和图版 III-3 可知: 对照组肝细胞细胞质内可见丰富的线粒体和内质网, 线粒体结构完整, 嵴清晰明显; 内质网以粗面内质网为主, 呈捆状整齐的排列在细胞核和线粒体的周围; 细胞核形状较规则, 常染色质均匀分布。由图 III-2 和图版 III-4 可知: 试验组肝细胞线粒体、内质网数量形态异常, 数量明显减少, 杂乱地分布在细胞质中; 肝细胞体积变大, 排列不规则; 肝细胞核边缘形状不规则。

2.5 投喂蚕豆对草鱼血清脂肪代谢相关指标的影响

由表 2 可知: 试验组草鱼血清中的甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 和丙二醛 (MDA) 的含量显著高于对照组 ($P < 0.05$); 试验组草鱼血清中的过氧化氢 (H_2O_2)、谷丙转氨酶 (ALT) 活性和谷草转氨酶

(AST)活性极显著高于对照组($P < 0.01$),但过氧化氢酶(CAT)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)的活性和还原型谷胱甘肽与氧化型谷胱甘肽的

比值(GSH/GSSH)极显著低于对照组($P < 0.01$)。两组血清中的高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)差异不显著($P > 0.05$)。

表2 投喂蚕豆对草鱼血清脂肪代谢相关指标的影响

Tab.2 Effects of feeding broad bean on serum indexes of grass carp related to fat metabolism

项目 Item	对照组 Control group	试验组 Treatment group
甘油三酯 TG/(mmol/L)	2.07 ± 0.13	2.43 ± 0.16 *
总胆固醇 TC/(mmol/L)	4.49 ± 0.42	5.35 ± 0.30 *
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C/(mmol/L)	1.28 ± 0.27	1.47 ± 0.25
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C/(mmol/L)	1.51 ± 0.25	1.88 ± 0.10 *
过氧化氢酶 CAT/(U/mL)	4.07 ± 1.40	2.26 ± 0.33 **
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 G6PD/(U/mL)	124.58 ± 12.90	52.01 ± 11.30 **
还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽 GSH/GSSH	9.17 ± 3.94	5.18 ± 1.63 **
丙二醛 MDA/(nmol/mL)	29.24 ± 7.80	46.28 ± 1.43 *
过氧化氢 H ₂ O ₂ /(mmol/L)	12.09 ± 2.33	20.92 ± 3.37 **
谷丙转氨酶 ALT/(U/L)	77.38 ± 2.26	144.38 ± 7.54 **
谷草转氨酶 AST/(U/L)	92.71 ± 9.34	188.29 ± 12.78 **

注: *表示同一行数据有显著差异 $P < 0.05$, **表示同一行数据有极显著差异 $P < 0.01$

Notes: * represents significant difference in the same row data ($P < 0.05$), ** represents extremely significant difference in the same row data ($P < 0.01$)

2.6 投喂蚕豆对草鱼肝脏脂肪代谢相关指标的影响

由表3可知:试验组草鱼肝脏中的甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)和过氧化氢(H₂O₂)的含量均极显著高于对照组($P < 0.01$),且丙二醛

(MDA)的含量也显著高于对照组($P < 0.05$);试验组草鱼肝脏中的过氧化氢酶(CAT)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)的活性和还原型谷胱甘肽与氧化型谷胱甘肽的比值(GSH/GSSH)均极显著低于对照组($P < 0.01$)。

表3 投喂蚕豆对草鱼肝脏脂肪代谢相关指标的影响

Tab.3 Effects of feeding broad bean on liver indexes of grass carp related to fat metabolism

项目 Item	对照组 Control group	试验组 Treatment group
甘油三酯 TG/(mmol/g prot)	0.35 ± 0.07	0.73 ± 0.10 **
总胆固醇 TC/(mmol/g prot)	0.51 ± 0.24	1.10 ± 0.12 **
过氧化氢酶 CAT/(U/mg prot)	9.95 ± 0.85	4.41 ± 0.39 **
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 G6PD/(U/mg prot)	114.43 ± 8.91	79.89 ± 9.13 **
还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽 GSH/GSSH	11.68 ± 4.00	2.39 ± 0.82 **
丙二醛 MDA/(nmol/mg prot)	0.65 ± 0.27	1.37 ± 0.25 *
过氧化氢 H ₂ O ₂ /(mmol/g prot)	10.91 ± 2.18	38.06 ± 6.24 **

注: *表示同一行数据有显著差异 $P < 0.05$, **表示同一行数据有极显著差异 $P < 0.01$

Notes: * represents significant difference in the same row data ($P < 0.05$), ** represents extremely significant difference in the same row data ($P < 0.01$)

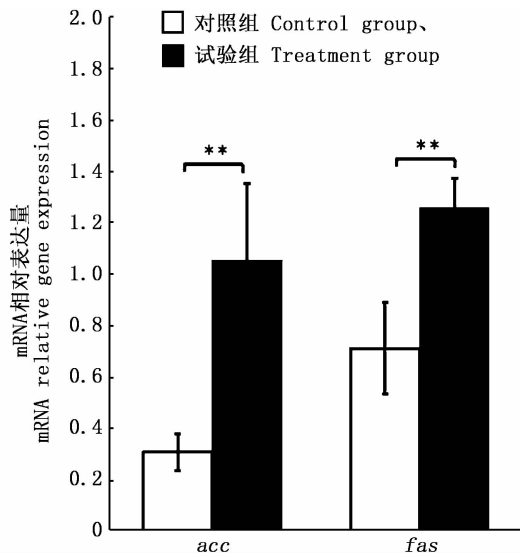
2.8 投喂蚕豆对草鱼肝脏脂肪酸合成相关基因表达的影响

由图1所知,试验组草鱼肝脏中的 *acc* 和 *fas* 的基因表达均极显著高于对照组($P < 0.01$),分别比对照组高出了 243.17% 和 76.99%。

3 讨论

肝脏作为碳水化合物、蛋白质和脂质合成、

代谢、存储、重新分配的主要场所,在维持机体代谢稳态中起着重要作用。当肝脏所吸收的能量大于支出时,TG会在肝脏中积聚,从而引起肝脏的脂肪蓄积,表现为肝脏脂肪变性(或称为脂肪肝)^[13]。目前,已有大量的研究^[8-10]表明:脂肪肝会引起鱼类食欲不振、生长性能降低、饵料系数提高;肌肉品质降低;应激耐受性和免疫力降低,对病害的敏感性和死亡率提高等现象。通常患



** 表示极显著差异 ($P < 0.01$)

** represents extremely significant difference ($P < 0.01$)

图1 投喂蚕豆对草鱼肝脏脂肪酸合成相关基因 (*acc* 和 *fas*) 的表达的影响

Fig.1 Effect of feeding broad bean on the gene expression of fatty acid synthesis (*acc* and *fas*) in grass carp liver

脂肪肝的鱼其肝脏外观发黄、肿大,具有油腻感;肝细胞内出现明显的脂滴;线粒体和内质网形态异常甚至溶解消失^[14-15]。以蚕豆作为单一饵料投喂草鱼 120 d 后,经外观、H&E 染色、油红 O 染色和透射电镜观察发现试验组草鱼肝脏表现出类似病理特征,呈现出典型的肝脏脂肪变性状态。

研究^[16]表明脂肪酸的过量供应是肝脏脂肪变性的一个重要决定因素。试验组草鱼血液中的 TC、TG 和转运内源性胆固醇的 LDL-C 显著高于对照组,这表明蚕豆可以诱导草鱼血脂异常,从而可能促进试验组草鱼肝细胞从血液中摄取和储存 TC 和 TG。此外,脂肪酸从头合成 (de novo lipogenesis, DNL) 也是导致肝脏脂肪变性的关键途径^[17-18],该途径主要是乙酰辅酶 A 羧化酶将乙酰辅酶 A 转化为丙二酰辅酶 A,再由脂肪酸合成酶将其转化为棕榈酸 (C16:0),并在其他酶的作用下进行延伸^[19],最终以 TG 形式存储^[13,20],而 DNL 受 *acc* 和 *fas* 这两个关键基因的调控,经检测发现试验组草鱼肝脏中的 *acc* 和 *fas* 基因表达均显著高于对照组,表明试验组草鱼肝细胞中 DNL 途径上调,这会促进脂肪酸在肝脏中的合成增加。

脂肪酸氧化代谢主要通过线粒体 β -氧化进行的^[21],因此线粒体的功能是否正常,在细胞中数量的多少直接影响着脂肪酸代谢。在正常生理状态下,线粒体一般会产生产占总耗氧量 2% 的活性氧 (reactive oxygen species, ROS),主要为 O_2^- ^[22],因此线粒体通常也为高水平 ROS 的氧化靶点。研究^[23-24]表明,高水平的 ROS 会氧化线粒体膜、电子传递链复合物蛋白和线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 等,从而造成细胞内线粒体数量减少和形态结果异常。另外, O_2^- 会被歧化成过 H_2O_2 (H_2O_2 属于 ROS,具有氧化性),通常会被细胞内的抗氧化剂 CAT 和依赖于 G6PD 还原的 GSH 转化为无毒性的水^[22,25]。试验组草鱼肝脏中的 H_2O_2 含量极显著高于对照组,而 CAT 和 G6PD 活性以及 GSH 的含量均显著较低,表明试验组草鱼肝脏中的 H_2O_2 可能会超出正常阈值水平而引起氧化应激,从而对线粒体造成氧化损伤。从透射电镜观察到试验组草鱼肝细胞中线粒体数量减少,形态结构异常的结果正好印证了这一点。以上结果表明,试验组草鱼肝细胞中氧化应激的发生导致线粒体数量的减少,进而降低了脂肪在肝脏中的氧化代谢。

同时,试验组草鱼肝细胞膜也受到了氧化应激的作用。在哺乳动物中,血液中的 ALT 和 AST 的活性的高低意味着肝脏健康与否,当 ALT 和 AST 在血液中的活性增加时,表明肝功能受损^[26]。目前已有许多学者^[27-28]利用这两个指标来判断鱼类的肝功能是否正常。试验组草鱼血液中的 ALT 和 AST 极显著高于对照组,这表明了试验组草鱼肝脏功能受损,可能的原因是氧化应激引起了脂质过氧化而破坏了肝细胞膜,使主要存在肝细胞内的 ALT 和 AST 大量地从细胞内逸出进入血液,致使 ALT 和 AST 在血液中的活性增加。MDA 是多不饱和脂肪酸过氧化物的降解产物,其含量的大小能直接反映脂质过氧化水平^[2]。试验组草鱼肝脏中的 MDA 显著增加在一定程度上验证了肝细胞膜受到了“氧化应激”的破坏。

目前研究^[29]已证实,在哺乳动物中,氧化应激在非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 发生和进展中起着重要作用。也有研究表明在鱼类肝脏发生脂肪变性时,氧化应激可能也起着类似促进作用,如 SITJ α -

BOBADILLA 等^[8]用 100% 植物蛋白源替代鱼粉时,发现金头鲷 (*Sparus aurata*) 肝脏发生脂肪变性时伴随有严重的氧化应激。LIU 等^[30]发现全氟十二烷酸诱导斑马鱼 (*Barchydanio rerio*) 肝脏脂肪变性涉及脂肪酸 β -氧化和氧化应激的紊乱。由此,推测氧化应激可能是试验组草鱼肝脏发生脂肪变性的关键因素。

参考文献:

- [1] YU E M, ZHANG H F, LI Z F, et al. Proteomic signature of muscle fibre hyperplasia in response to faba bean intake in grass carp[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 45950.
- [2] 魏静, 郑小森, 冷向军, 等. 草鱼脆化过程中血液学指标及组织氧化还原的动态变化[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(4): 559-568.
WEI J, ZHENG X M, LENG X J, et al. Effects of feeding broad bean on haematological indexes and redox balance of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(4): 559-568.
- [3] 毛盼, 胡毅, 邹志利, 等. 投喂蚕豆饲料和去皮蚕豆饲料对草鱼生长性能、肌肉品质及血液生理生化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2014, 26(3): 803-811.
MAO P, HU Y, HUAN Z L, et al. Effects of feeding broad bean and dehulling broad bean diets on growth performance, muscle quality and blood physiological-biochemical indices of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(3): 803-811.
- [4] 谭乾开, 黎华寿. 食物与水环境因子对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus* C. et V)脆化过程的影响[J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2409-2415.
TAN Q K, LI H S. Effects of diets dose and water quality on the transformation of common grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* C. et V) to crisped grass carp [J]. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(7): 2409-2415.
- [5] MARTÍNEZ J A, MACARULLA M T, MARCOS R, et al. Nutritional outcome and immunocompetence in mice fed on a diet containing raw field beans (*Vicia faba*, var. minor) as the source of protein[J]. British Journal of Nutrition, 1992, 68(2): 493-503.
- [6] ORTIZ L T, ALZUETA C, TREVINO J, et al. Effects of faba bean tannins on the growth and histological structure of the intestinal tract and liver of chicks and rats [J]. British Poultry Science, 1994, 35(5): 743-754.
- [7] 王一飞, 吉红, 陈昊杰, 等. 投喂蚕豆对草鱼肌肉质构特性、脂质蓄积状况及组织脂肪酸组成的影响[J]. 南方农业学报, 2015, 46(11): 2040-2045.
WANG Y F, JI H, CHEN H J, et al. Effects of feeding broad bean on muscle texture characteristics, lipid accumulation and tissue fatty acid composition of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Journal of Southern Agriculture, 2015, 46(11): 2040-2045.
- [8] SITJÀ-BOBADILLA A, PEÑA-LLOPIS S, GÓMEZ-REQUENI P, et al. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) [J]. Aquaculture, 2005, 249(1/4): 387-400.
- [9] GONZÁLEZ-FÉLIX M L, MINJAREZ-OSORIO C, PEREZ-VELAZQUEZ M, et al. Influence of dietary lipid on growth performance and body composition of the Gulf corvina, *Cynoscion othonopterus* [J]. Aquaculture, 2015, 448: 401-409.
- [10] 杜震宇. 养殖鱼类脂肪肝成因及相关思考[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1628-1638.
DU Z Y. Causes of fatty liver in farmed fish: a review and new perspectives [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1628-1638.
- [11] LI A X, YUAN X C, LIANG X F, et al. Adaptations of lipid metabolism and food intake in response to low and high fat diets in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Aquaculture, 2016, 457: 43-49.
- [12] 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(4): 402-408.
- [13] MATHERLY S C, PURI P. Mechanisms of simple hepatic steatosis: not so simple after all [J]. Clinics in Liver Disease, 2012, 16(3): 505-524.
- [14] MOSCONI-BAC N. Hepatic disturbances induced by an artificial feed in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during the first year of life [J]. Aquaculture, 1987, 67(1/2): 93-99.
- [15] 黄春红, 肖调义, 胡毅, 等. 养殖鱼类脂肪肝研究现状分析[J]. 动物营养学报, 2014, 26(7): 1715-1722.
HUANG C H, XIAO T Y, HU Y, et al. Analysis on research status of fatty liver disease in aquaculture fish [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(7): 1715-1722.
- [16] BRADBURY M W. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis [J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2006, 290(2): G194-G198.
- [17] BROWNING J D, HORTON J D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury [J]. Journal of Clinical Investigation, 2004, 114(2): 147-152.
- [18] TAKAISHI K, DUPLOMB L, WANG M Y, et al. Hepatic insig-1 or -2 overexpression reduces lipogenesis in obese Zucker diabetic fatty rats and in fasted/refed normal rats [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(18): 7106-7111.
- [19] MOON Y A, HORTON J D. Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(9): 7335-7343.
- [20] DIRAISON F, MOULIN P, BEYLOT M. Contribution of hepatic *de novo* lipogenesis and reesterification of plasma non

- esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Diabetes & Metabolism*, 2003, 29(5): 478-485.
- [21] TESSARI P, CORACINA A, COSMA A, et al. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2009, 19(4): 291-302.
- [22] ZOROV D B, JUHASZOVA M, SOLLOTT S J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release [J]. *Physiological Reviews*, 2014, 94(3): 909-950.
- [23] RICCI C, PASTUKH V, LEONARD J, et al. Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial-superoxide generation and apoptosis [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2008, 294(2): C413-C422.
- [24] RACHEK L I, YUZEFOVYCH L V, LEDOUX S P, et al. Troglitazone, but not rosiglitazone, damages mitochondrial DNA and induces mitochondrial dysfunction and cell death in human hepatocytes [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, 240(3): 348-354.
- [25] SAVASKAN N E, UFER C, KÜHN H, et al. Molecular biology of glutathione peroxidase 4: from genomic structure to developmental expression and neural function[J]. *Biological Chemistry*, 2007, 388(10): 1007-1017.
- [26] SLAM R, ALAM M J. Evaluation of liver protective activity of *Moringa oleifera* bark extract in paracetamol induced hepatotoxicity in rats[J]. *BioRxiv*, 2019: 513002, doi: 10.1101/513002.
- [27] WANG C, LIU Y, SUN G X, et al. Growth, immune response, antioxidant capability, and disease resistance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed *Bacillus velezensis* V4 and *Rhodotorula mucilaginosa* compound[J]. *Aquaculture*, 2019, 500: 65-74.
- [28] LI H T, TANG S Y, DU W H, et al. The effects of ethoxyquin and *Angelica sinensis* extracts on lipid oxidation in fish feeds and growth, digestive and absorptive capacities and antioxidant status in juvenile red carp (*Cyprinus carpio* var. *xingguonensis*): a comparative study[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(1): 43-61.
- [29] BORRELLI A, BONELLI P, TUCCILLO F M, et al. Role of gut microbiota and oxidative stress in the progression of non-alcoholic fatty liver disease to hepatocarcinoma: Current and innovative therapeutic approaches [J]. *Redox Biology*, 2018, 15: 467-479.
- [30] LIU Y, WANG J S, WEI Y H, et al. Induction of time-dependent oxidative stress and related transcriptional effects of perfluorododecanoic acid in zebrafish liver[J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 89(4): 242-250.

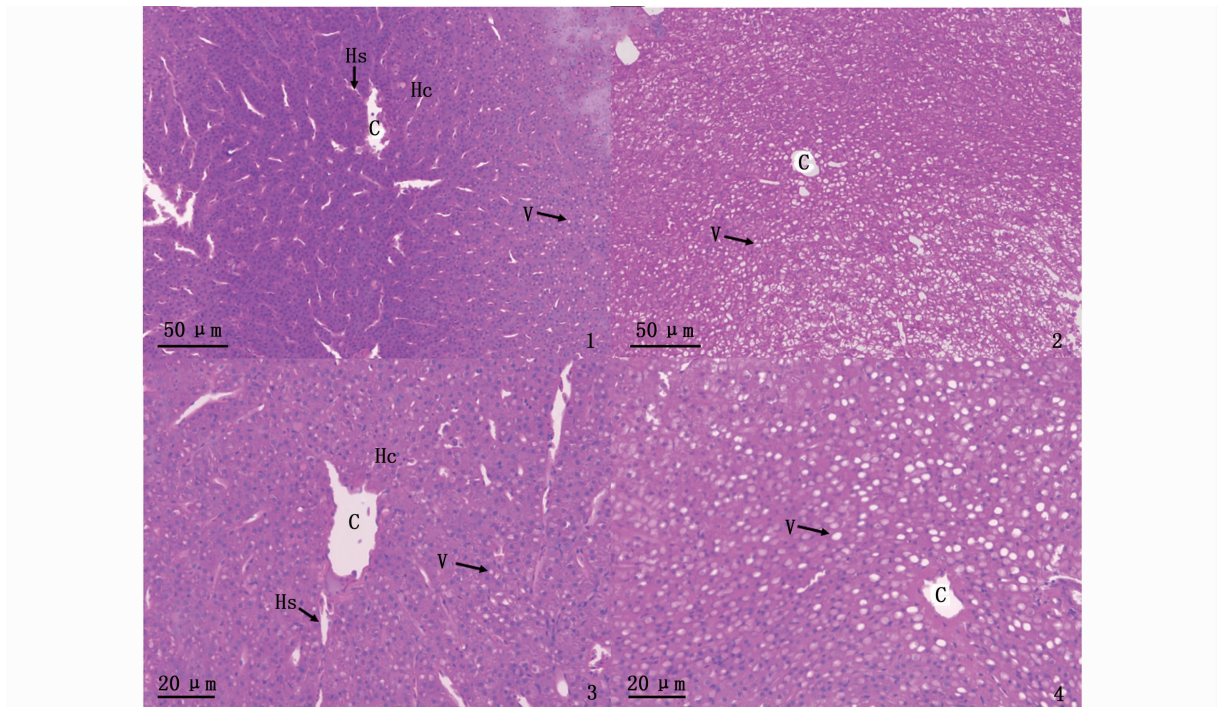
Effects of feeding broad bean on fat accumulation and metabolism in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) liver

FU Bing^{1,2}, YU Ermeng¹, WANG Guangjun¹, XIE Jun¹, LI Zhifei¹, ZHANG Kai¹, GONG Wangbao¹, TIAN Jingjing¹

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application and Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, Guangdong, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

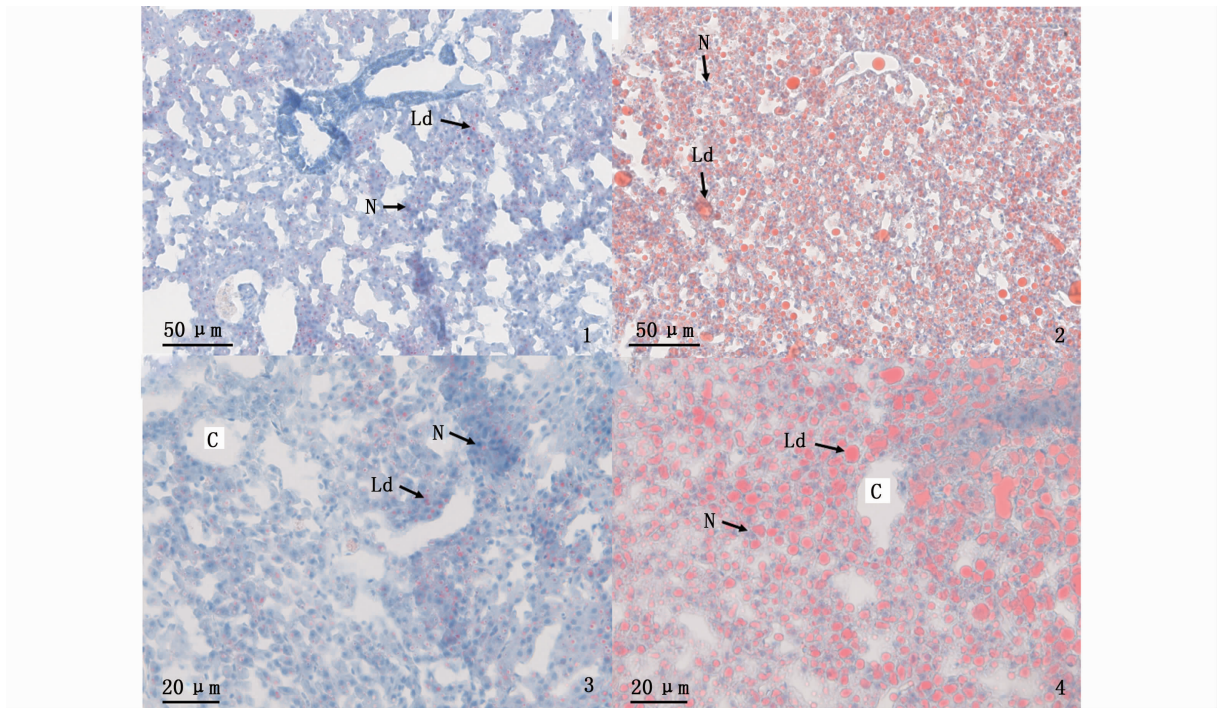
Abstract: To explore the liver fat accumulation and its possible reasons of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fed with broad bean, liver samples of grass carp fed with broad bean (treatment group) and artificial feed (control group) were collected. The pathological feature, fat accumulation and hepatic structure were observed by H&E, oil red O staining and transmission electron microscopy method, respectively. The expression levels of genes associated with fatty acid synthesis were further analyzed. Additionally, some biochemical indexes were also detected both in liver and serum. The results showed that: hepatic steatosis was observed accompanying the abnormal morphology and decreased number of mitochondria in the treatment group; Triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in the serum of treatment group were significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$); TG, TC and hydrogen peroxide (H_2O_2) in the liver of treatment group were extremely higher than those of the control group ($P < 0.01$), but catalase (CAT) activity and glutathione (GSH) were extremely lower ($P < 0.01$); The mRNA expression levels of fatty acid synthesis (*acc* and *fas*) in treatment group were extremely higher than those in the control group ($P < 0.01$). The results demonstrated that long-term feeding broad bean could cause fat accumulation in the liver of grass carp, which may be related to the increase of fatty acid synthesis, oxidative stress and collapse of mitochondrial structure. This study would provide scientific data for nutritional regulation of grass carp and prevention from fish hepatic steatosis.

Key words: grass carp; broad bean; ultrastructure; mitochondria; fatty acid synthesis gene



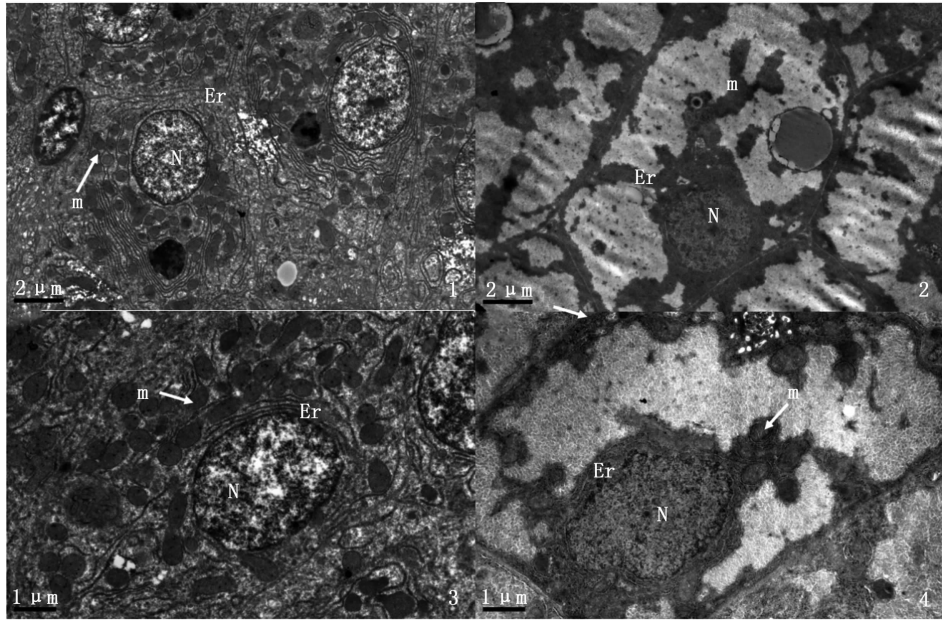
1 和 3 分别为对照组草鱼肝脏的 H&E 染色切片的 200 倍和 400 倍显微结构图; 2 和 4 分别为试验组草鱼肝脏的 H&E 染色切片的 200 倍和 400 倍显微结构图; C. 中央静脉; V. 空泡; Hs. 肝窦; Hc. 肝索
 1 and 3 for the 200 and 400 times of H&E staining of control group liver, respectively. 2 and 4 for the 200 and 400 times of H&E staining of treatment group liver, respectively. C. Central vein; V. Vacuole; Hs. Hepatic sinusoid; Hc. Hepatic cords

图版 I 试验组和对照组草鱼肝脏切片 H&E 染色观察结果
Plate I H&E staining of liver in treatment group and control group



1 和 3 分别为对照组草鱼肝脏的油红 O 染色切片的 200 倍和 400 倍显微结构图; 2 和 4 分别为试验组草鱼肝脏的油红 O 染色切片的 200 倍和 400 倍显微结构图; C. 中央静脉; N. 细胞核; Ld. 脂肪滴
 1 and 3 for the 200 and 400 times of the oil red O staining of the control group liver, respectively. 2 and 4 for the 200 and 400 times of oil red O staining of the treatment group liver, respectively. C. Central vein; N. Nucleus; Ld. Lipid droplet

图版 II 试验组和对照组草鱼肝脏切片油红 O 染色观察结果
Plate II Oil red O staining of liver in treatment group and control group



1 和 3 为对照组草鱼肝细胞超微结构图；2 和 4 为试验组草鱼肝细胞超微结构图；N. 细胞核；m. 线粒体；Er. 内质网
 1 and 3 for the TEM micrographs of the control group liver, respectively; 2 and 4 for the TEM micrographs of the treatment group liver, respectively. N. Nucleus; m. Mitochondria; Er. Endoplasmic reticulum

图版 III 试验组和对照组草鱼肝脏透射电镜观察结果

Plate III The transmission electron microscopy (TEM) of liver in treatment group and control group