

饲料中糖/脂肪比对暗纹东方鲀幼鱼生长、血液指标、 肝代谢酶活性及 *PEPCK* 基因表达的影响

刘襄河, 叶超霞, 沈碧端, 王春艳, 彭 键, 王安利*

(华南师范大学生命科学学院, 广东省水产健康安全养殖重点实验室,
生态与环境科学广东普通高校重点实验室, 广东 广州 510631)

摘要: 配制 6 种不同糖/脂肪比例(CHO:L 分别为 4.29、2.79、1.86、1.19、0.73 和 0.42)的等氮等能饲料, 饲养暗纹东方鲀幼鱼[初始体质量为(11.2 ± 0.5)g]60 d, 探讨饲料中糖与脂肪比例对其生长、饲料利用、生理生化指标和 *PEPCK* 基因表达的影响。实验结果表明: 随饲料中 CHO:L 降低, 暗纹东方鲀特定生长率(SGR)、蛋白质效率(PER)和饲料效率(FE)先升高后降低, 且均在 CHO:L 为 1.86 时达最大, 显著高于 CHO:L 为 0.42、0.73 和 4.29 时的值($P < 0.05$)。血浆甘油三酯和肝脏脂肪含量随 CHO:L 降低而显著增加($P < 0.05$), 而血糖和肝糖原含量随 CHO:L 降低而显著降低($P < 0.05$)。随饲料中 CHO:L 降低, 肝脏脂肪酶和脂肪合成酶活性先增加后降低, 分别在 CHO:L 为 1.19 和 1.86 时活性最高。CHO:L 为 1.86 ~ 4.29 时丙酮酸激酶活性显著高于其他饲料组($P < 0.05$)。CHO:L 为 0.42 和 0.73 时, 淀粉酶活性显著低于其他饲料组($P < 0.05$), 而 *PEPCK* 活性和 mRNA 相对表达量显著高于其他饲料组($P < 0.05$)。饲料中 CHO:L 对暗纹东方鲀存活率和血浆总胆固醇含量无显著影响($P > 0.05$)。分别用二次多项回归模型拟合 SGR、PER、FE 和 CHO:L 的关系, 得到暗纹东方鲀幼鱼饲料中 CHO:L 的适宜范围为 2.01 ~ 2.16, 且其对碳水化合物的利用能力要高于脂肪。

关键词: 暗纹东方鲀; 糖脂比; 生化指标; *PEPCK* 基因

中图分类号: S 963

文献标志码: A

暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*), 俗称河鲀、河豚鱼、气泡鱼, 隶属于鲀科、东方鲀属, 属江海洄游性鱼类, 杂食偏动物食性, 主要分布于我国渤海、黄海、东海及通海的江河下游, 为“长江三鲜”之一。由于该种鱼对淡水有很好的适应性及较高的经济价值, 已经被我国开发为淡水养殖的新品种, 在广东、福建、江苏、上海等地养殖规模发展很快, 全国年产量在 1 万 t 左右。目前, 在养殖过程中, 通常以鳊鱼料或甲鱼料混合冰冻小杂鱼替代, 在表面上保证了大多数养殖生产的正常运转, 但对于暗纹东方鲀产业可持续发展、健康高效养殖、病害防治等方面留下很

大的安全隐患, 因而探究暗纹东方鲀的营养需求, 研制安全高效、环境友好型的配合饲料尤为重要。暗纹东方鲀的研究主要集中在生物学特性、环境适应性、种苗繁育技术等方面^[1-4], 而对其营养需求研究较少, 仅见蛋白质需求^[5]、蛋白原料消化率^[6]、鱼粉替代^[7]和糖类需求^[8]方面的报道。

肝脏是营养物质代谢最活跃的场所, 它既可使血糖氧化利用或者合成肝糖原贮存来降低血糖, 又能通过糖异生和糖原分解补充血糖的不足。磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, *PEPCK*; E. C. 4. 1. 1. 32) 是糖异生

收稿日期: 2014-03-12 修回日期: 2014-05-12

资助项目: 国家自然科学基金(31100296); 国家农业科技成果转化资金项目(2013GB2E000365); 广东省重点实验室建设项目(2009A060800019); 省部产学研结合项目(2011B090500009); 广东省高等学校科技创新重点项目(CXZD1114); 广州市科技计划项目(2014J4100052); 广东省科技计划项目(2011B020307010, 2012B020307004)

通信作者: 王安利, E-mail: wanganli@scnu.edu.cn

途径的关键限速酶,能催化草酰乙酸生成磷酸烯醇式丙酮酸,在维持动物血糖水平的稳定中起关键作用^[9]。研究表明,细胞质型 PEPCK (PEPCK-C) 是参与糖代谢和脂代谢的重要酶类,动物摄食高糖饲料时,其肝中 PEPCK-C 水平大幅度下降,而禁食或摄食高蛋白高脂肪低糖饲料时其肝中 PEPCK-C 水平明显增加,并且 PEPCK 活性的调节主要表现在基因转录水平上^[10]。本研究饲料中不同糖和脂肪比例对暗纹东方鲀生长、血液指标、肝代谢酶活性及 PEPCK 基因表达的影响,初步探讨其饲料中适宜的糖/脂肪比例,旨在为其营养需求和人工配合饲料的研制与生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 饲料的配制

实验饲料以鱼粉、酪蛋白和鱿鱼肝脏粉作为蛋白源,鱼油和豆油作为脂肪源,玉米淀粉作为糖源,设计了6组等氮等能的饲料,其中糖/脂肪比例分别为4.29、2.79、1.86、1.19、0.73和0.42(表1)。所有饲料原料用粉碎机粉碎后过80目筛,按饲料配方比例准确称重后混匀,微量组分采用逐级扩大法混匀,先将粉状原料混合均匀,再添加鱼油、豆油和卵磷脂并充分混合,加适量水,用双螺杆制粒机做成粒径3mm的颗粒饲料,自然风干后分装,贮存于-20℃冰柜中备用。

表1 实验饲料配方及常规营养水平(风干基础,%)

Tab.1 Formulation and proximate composition of the experimental diets (air dry basis, %)

饲料原料 ingredients	饲料组(糖/脂肪比例) diets (CHO:L)					
	组1(4.29)	组2(2.79)	组3(1.86)	组4(1.19)	组5(0.73)	组6(0.42)
鱼粉 fish meal	48.6	48.6	48.6	48.6	48.6	48.6
酪蛋白 casein	10	10	10	10	10	10
乌贼内脏粉 squid organ meal	4	4	4	4	4	4
玉米淀粉 corn starch	30	25	20	15	10	5
鱼油 fish oil	1.1	2.2	3.3	4.4	5.5	6.6
豆油 soybean oil	1.1	2.2	3.3	4.4	5.5	6.6
大豆磷脂 soya lecithin	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
复合预混料 compound premix ¹	2	2	2	2	2	2
氯化胆碱 choline chloride(50%)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
VC-磷酸酯 vitamin C phosphate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
粘合剂 binder	2	2	2	2	2	2
沸石粉 zeolite meal	0	2.8	5.6	8.4	11.2	14
营养成分 proximate analysis						
干物质/% dry matter	90.2	90.4	90.9	91.4	90.7	91.6
粗蛋白/% crude protein	42.2	42.9	42.7	42.3	42.6	42.5
粗脂肪/% crude lipid	7.5	9.8	11.9	14	16.3	18.3
粗纤维/% crude fiber	6.9	6.3	6.5	7.2	6.8	6.3
灰分/% ash	11.2	13.9	16.8	19.7	22.4	25.2
无氮浸出物/% nitrogen-free extract ²	32.2	27.1	22.1	16.8	11.9	7.7
总能/(MJ/kg) gross energy ³	18.4	18.7	18.7	18.6	18.7	18.5
糖/脂肪 carbohydrate: lipid (CHO:L) ⁴	4.29	2.79	1.86	1.19	0.73	0.42

注:1. 复合预混料(g/kg 饲料):VA,30 000 IU;VC,4 g;VD,30 000 IU;VE,3 000 IU;VK,20 mg;VB₁,20 mg;VB₂,480 mg;VB₆,360 mg;VB₁₂,1.2 mg;叶酸,170 mg;生物素,10 mg;肌醇,8 g;泛酸钙,80 mg;烟酸,200 mg;MgSO₄·7H₂O,80.0 g;FeSO₄·7H₂O,40.0 g;ZnSO₄·7H₂O,20.0 g;KI,6.7 g;CuSO₄·5H₂O,7.5 g;AlCl₃·6H₂O,0.2 g;Na₂Se₂O₃,0.01 g;MnSO₄·H₂O,2.0 g;CoCl₂·6H₂O,1.0 g。2. 无氮浸出物(%)=100(%) - 粗蛋白(%) - 粗脂肪(%) - 粗纤维(%) - 灰分(%)。3. 饲料总能根据蛋白质、脂肪和碳水化合物的能量(23.6,39.5和17.2 kJ/g)来计算。4. 糖/脂肪=无氮浸出物/粗脂肪^[17]

Notes:1. the compound premix provides vitamin and mineral(per kg of diet):VA,30 000 IU;VC,4 g;VD,30 000 IU;VE,3 000 IU;VK,20 mg;VB₁,20 mg;VB₂,480 mg;VB₆,360 mg;VB₁₂,1.2 mg; folic acid,170 mg; biotin,10 mg; inositol,8 g; calcium pantothenate,80 mg; nicotinic acid,200 mg;MgSO₄·7H₂O,80.0 g;FeSO₄·7H₂O,40.0 g;ZnSO₄·7H₂O,20.0 g;KI,6.7 g;CuSO₄·5H₂O,7.5 g;AlCl₃·6H₂O,0.2 g;Na₂Se₂O₃,0.01 g;MnSO₄·H₂O,2.0 g;CoCl₂·6H₂O,1.0 g。2. nitrogen-free extract;calculated as(%)=100(%) - crude protein(%) - crude lipid(%) - crude fiber(%) - ash(%). 3. calculated values based on 23.6,39.5 and 17.2 kJ/g for protein, lipid and carbohydrate, respectively. 4. CHO:L = nitrogen free extract/crude lipid

1.2 实验鱼与饲养管理

暗纹东方鲀购于广州市金洋水产养殖有限公

司,鱼苗运到华南师范大学生物系养殖实验场,放入暂养池驯养2周后,选取体格健壮、规格均匀的

个体 450 尾,平均体质量为 (11.2 ± 0.5) g,用渔用消毒剂和食盐混合溶液消毒后,随机放入 18 个圆形钢化玻璃缸中(300 L),每缸 25 尾鱼,每组饲料对应 3 个缸,称初始体质量后开始实验。

养殖实验持续 60 d,每天 8:00 和 16:00 各投喂 1 次,达到表观饱食,无剩余残饵,投喂 0.5 h 后观察采食情况,估计采食量,并吸出多余饲料,记录每天每缸鱼的采食量,调整次日的投喂量。早晚各吸污 1 次,定期清洗养殖桶,实验用水为曝气自来水,用增氧机昼夜持续增氧,每半个月换水 1 次,换水量约 $1/4 \sim 1/3$ 。实验期间水温 (26 ± 2) °C, pH 7.8 ± 0.3 ,溶氧高于 6.0 mg/L,氨氮低于 0.05 mg/L,光照为自然光源。

1.3 样品采集与计算

生长指标 实验结束后,禁食 24 h,每缸鱼称重并计数。生长指标计算公式如下:

$$\text{特定生长率 (specific growth rate, SGR, \% / d)} = 100 \times (\ln W_f - \ln W_i) / t$$

式中, W_f 表示平均终末体质量(g), W_i 表示平均初始体质量(g), t 表示饲养天数。

蛋白质效率 (protein efficiency ratio, PER) = 鱼体质量增加量(g)/摄入饲料蛋白总量(g)

饵料效率 (feed efficiency, FE, %) = $100 \times$ 饲料消耗量(g)/鱼体质量增加量(g)

存活率 (survival rate, SR, %) = $100 \times$ 终末尾数/初始尾数

样品采集 实验鱼在投喂最后 1 次饲料后 5 h,每缸随机取 5 尾鱼,用 MS-222 (50 mg/L) 麻醉后,用 2.5 mL 一次性无菌注射器从尾静脉采血,血用肝素钠抗凝,并以 $3\ 000 \times g$, 4 °C 离心 20 min 分离血浆,保存于 -80 °C 冰箱待测。每缸随机选取 5 尾鱼,解剖取其肝脏样品,装入冻存管放入液氮中速冻,并于 -80 °C 下保存待测。

1.4 样品分析

饲料样品常规营养成分的测定:水分测定采用 105 °C 烘箱干燥恒重法;粗蛋白测定采用凯氏定氮法 ($N \times 6.25$, Kjeltac™ 8400, Sweden);粗脂肪测定采用索氏抽提法 (Soxtec Avanti 2050, Sweden);粗纤维测定采用酸碱洗涤后灼烧法 (Fibertec 2010, Sweden);灰分测定采用马弗炉灼烧法 (550 °C)。血浆中葡萄糖 (GLU) 采用葡萄糖氧化法检测;甘油三酯 (TG) 和总胆固醇 (TCHO) 分别采用比色法检测;肝糖原测定采用蒽酮试剂比色法,具体操作

方法参见说明书(南京建成生物研究所试剂盒)。肝脂肪测定采用氯仿-甲醇提取法^[11]。

称取肝脏样品(1 g)按质量体积比(W/V, 1/10)加入预冷 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液(4 °C, pH 7.4),用高速组织匀浆机在冰浴中匀浆,并以 $3\ 000 \times g$, 4 °C 离心 20 min,取上清液用于测定肝脏脂肪酶(LPS)、脂肪合成酶(FAS)和淀粉酶(AMS)活性(采用苏州科铭生物技术有限公司试剂盒)。另外称取肝脏样品(0.5 g)后加 10 倍体积冰浴的缓冲液(30 mmol/L HEPES, 0.25 mmol/L sucrose, 0.5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L K_2HPO_4 , 1 mmol/L DTT, pH 7.4),冰浴中匀浆,以 $10\ 000 \times g$, 4 °C 离心 20 min,取上清液用于测定丙酮酸激酶(PK)和 PEPCK 活性,参照 Treberg 等^[12]方法测定。匀浆上清液蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 法测定,以牛血清蛋白为标准蛋白。酶活性表示为:在 37 °C 条件下,每毫克蛋白每分钟水解 1 μmol 底物为 1 个活力单位 U。

称取肝脏样品 100 mg 用于提取总 RNA 样品,采用 Trizol RNA isolation reagent (Invitrogen, Gaithersburg, USA) 试剂,总 RNA 样品用 RNase-Free DNase (TaKaRa, Dalian, China) 去除 DNA 污染。用核酸测定仪测定 RNA 浓度, RNA (A260: A280) 比值在 1.8 ~ 2.0 的样品进一步用 1.2% 琼脂凝胶电泳检测 RNA 的完整性和 DNase 处理效率。每个样品 cDNA 合成均采用 1 μg 的总 RNA, 采用 PrimeScript™ RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa, Dalian, China) 试剂盒,转录的 cDNA 用灭菌超纯水定量至 200 μL。取 2 μL cDNA 作为模板,加至 20 μL 反应体系,采用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, Dalian, China) 试剂盒在 ABI Real-time PCR analyzer 7500 instrument (Applied Biosystems, USA) 进行定量分析。标准曲线采用 5 个不同稀释梯度的 cDNA 样品进行定量,每个稀释 3 个重复,扩增效率采用 $E = 10^{(-1/\text{Slope})} - 1$ 进行计算。荧光定量的引物设计基于 GenBank 中暗纹东方鲀 *PKECK* 和内参基因(*β-actin*) cDNA 序列,用 Primer 5.0 软件设计引物(表 2)。目的基因相对表达效率采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算^[13]。每个样品重复 3 次。

1.5 数据处理

所有数据以平均值 ± 标准误 (mean ± SE) 表示。采用 SPSS 13.0 软件对实验数据做单因素方

差分析(One-Way ANOVA),所有用百分数表示的数据都先转化成反正弦方根后再进行方差分析,当差异显著时,则进行 Tukey 多重比较,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

表 2 糖代谢酶基因表达所用荧光定量 PCR 引物及内参引物序列
Tab.2 Primers and internal probe sequences used for phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression analysis by the real-time PCR

基因 genes	登录号 GenBank accession number	引物序列 sequence primer(5'-3')	扩增片段长度/bp product size
磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 PEPCK	FJ429325.1	F:TCC CGC TTG TCT ACG AAT R:AGG ACC TTG CCT TTA TGC	134
内参基因 β -actin	EU871643.1	F:ATC CTG ACA GAG CGT GGG T R:TCT CGT TGC CGA TGG TGA	186

2 结果

2.1 不同糖/脂肪比例饲料对暗纹东方鲀生长和饲料利用的影响

饲料中 CHO:L 对暗纹东方鲀 SGR、PER 和 FE

具有显著影响($P < 0.05$) (表 3)。CHO:L 为 1.19 和 1.86 时,暗纹东方鲀的 SGR、PER 和 FE 显著高于 4.29、0.73 和 0.42 组($P < 0.05$)。统计分析表明(图 1),SGR(y) 和 CHO:L(x) 的二次曲线回归方程为:
 $y = -0.089 2x^2 + 0.385 7x + 1.625 5 (R^2 = 0.960 4)$,

表 3 饲料中不同糖与脂肪比例对暗纹东方鲀幼鱼 SGR、PER、PE 和存活率的影响
Tab.3 Specific growth rate, protein efficiency ratio, feed efficiency and survival rate of juvenile obscure puffer fed different dietary carbohydrate-to-lipid ratio diets

糖/脂肪比例 CHO:L	初始体质量/g IW	终末体质量/g FW	特定增长率/(%/d) SGR	蛋白质效率 PER	饲料效率/% FE	存活率/% survival rate
4.29	11.3 ± 0.2	30.3 ± 1.3 ^a	1.65 ± 0.07 ^a	1.04 ± 0.05 ^a	0.42 ± 0.03 ^a	88.0 ± 4.0
2.79	11.3 ± 0.1	36.8 ± 1.1 ^c	1.97 ± 0.05 ^{cd}	1.40 ± 0.08 ^{bc}	0.58 ± 0.05 ^{bc}	90.7 ± 2.3
1.86	11.2 ± 0.2	38.2 ± 1.5 ^c	2.04 ± 0.05 ^d	1.57 ± 0.05 ^d	0.66 ± 0.04 ^c	93.3 ± 2.3
1.19	11.2 ± 0.1	37.7 ± 1.3 ^c	2.01 ± 0.06 ^d	1.50 ± 0.08 ^{cd}	0.63 ± 0.03 ^c	93.3 ± 2.3
0.73	11.2 ± 0.1	33.9 ± 0.8 ^b	1.85 ± 0.07 ^{bc}	1.32 ± 0.06 ^b	0.55 ± 0.04 ^b	93.3 ± 2.3
0.42	11.2 ± 0.2	31.8 ± 0.6 ^a	1.75 ± 0.06 ^{ab}	1.17 ± 0.07 ^a	0.49 ± 0.03 ^a	88.0 ± 4.0

注:同一列数据右上角不同上标字母表示有显著差异($P < 0.05$),下同

Notes: means in the same column with different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$), the same as following

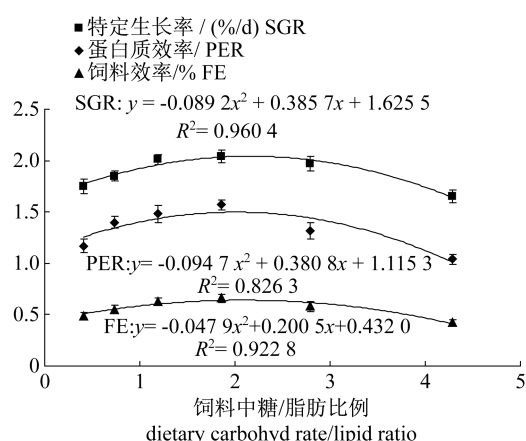


图 1 暗纹东方鲀 SGR、PER 和 FE 与饲料中糖脂比的回归关系

Fig.1 Relationship between specific growth rate, protein efficiency ratio, feed efficiency and dietary carbohydrate/lipid ratio of obscure puffer

当 CHO:L 为 2.16 时,SGR 最大;PER(y) 和 CHO:L(x) 的二次曲线回归方程为: $y = -0.094 7x^2 + 0.380 8x + 1.115 3 (R^2 = 0.826 3)$,当 CHO:L 为 2.01 时,PER 最大;FE(y) 和 CHO:L(x) 的二次曲线回归方程为: $y = -0.047 9x^2 + 0.200 5x + 0.432 0 (R^2 = 0.922 8)$,当 CHO:L 为 2.09 时,FE 最大。CHO:L 对暗纹东方鲀存活率无显著影响($P > 0.05$)。

2.2 不同糖/脂肪比例饲料对暗纹东方鲀血浆生化指标、肝糖原和肝脂肪含量的影响

不同比例 CHO:L 饲料对暗纹东方鲀血糖、血浆甘油三酯、肝糖原和肝脂肪含量有显著影响($P < 0.05$),但对血浆总胆固醇含量影响不显著(表 4)。血糖和肝糖原含量随 CHO:L 降低而降低,CHO:L 为 1.86 ~ 4.29 时血糖含量显著高于 CHO:L 为 0.42 ~ 1.19 时的值($P < 0.05$);肝糖

原含量在 CHO:L 为 4.29 时最高,并显著高于 CHO:L 为 0.42 ~ 1.86 时的值 ($P < 0.05$)。血浆甘油三酯和肝脂肪含量随 CHO:L 降低而增加,CHO:L 为 2.79 和 4.29 时甘油三酯含量显著低

于其他饲料组 ($P < 0.05$); CHO:L 为 0.42 和 0.73 时肝脂肪含量显著高于 CHO:L 为 1.86 ~ 4.29 时的值 ($P < 0.05$)。

表 4 饲料中不同糖与脂肪比例对暗纹东方鲀幼鱼血糖、甘油三酯、总胆固醇、肝糖原和肝脂肪含量的影响
Tab.4 Plasma glucose, triglyceride, total cholesterol, liver glycogen and lipid of juvenile obscure puffer fed different carbohydrate-to-lipid ratio diets

糖/脂肪比例 CHO:L	血糖/(mmol/L) plasma glucose	血浆甘油三酯/(mmol/L) plasma triglyceride	血浆总胆固醇/(mmol/L) plasma total cholesterol	肝糖原/% liver glycogen	肝脂肪/% liver lipid
4.29	6.68 ± 0.50 ^c	6.97 ± 1.45 ^a	7.21 ± 1.28	3.65 ± 0.31 ^d	30.31 ± 1.62 ^a
2.79	6.75 ± 0.34 ^c	8.58 ± 0.78 ^a	7.63 ± 1.48	3.24 ± 0.18 ^{cd}	32.18 ± 1.67 ^{ab}
1.86	6.78 ± 0.42 ^c	10.27 ± 1.31 ^b	7.43 ± 1.53	2.96 ± 0.21 ^c	34.44 ± 2.23 ^b
1.19	5.45 ± 0.45 ^b	11.65 ± 1.52 ^{bc}	8.03 ± 1.35	2.55 ± 0.17 ^b	36.22 ± 2.45 ^{bc}
0.73	4.43 ± 0.52 ^b	12.67 ± 1.36 ^c	8.59 ± 1.21	2.29 ± 0.24 ^{ab}	37.78 ± 2.53 ^c
0.42	3.22 ± 0.37 ^a	13.53 ± 1.24 ^c	8.37 ± 1.29	2.03 ± 0.26 ^a	39.46 ± 2.78 ^c

2.3 不同糖/脂肪比例饲料对暗纹东方鲀肝脏脂肪和糖代谢酶活性及 *PEPCK* 基因表达的影响

不同比例 CHO:L 饲料对暗纹东方鲀肝脏 LPS、FAS、AMS、PK 和 *PEPCK* 活性有显著影响 ($P < 0.05$) (表 5)。LPS 和 FAS 活性随 CHO:L 降低,均呈现先升高后降低的趋势,CHO:L 为 1.19 时 LPS 活性最高,且显著高于 0.42、2.79 和 4.29 时的值 ($P < 0.05$); CHO:L 为 1.86 和 2.79

时 FAS 活性显著高于 CHO:L 为 0.42 ~ 1.19 时的值 ($P < 0.05$)。CHO:L 为 1.86 ~ 4.29 时 PK 活性显著高于其他饲料组 ($P < 0.05$)。CHO:L 为 0.42 和 0.73 时,AMS 活性显著低于其他饲料组 ($P < 0.05$),而 *PEPCK* 活性及其 mRNA 相对表达量 (图 2) 均显著高于其他饲料组 ($P < 0.05$)。

表 5 饲料中不同糖与脂肪比例对暗纹东方鲀幼鱼肝脏中脂肪酶、脂肪合成酶、淀粉酶、丙酮酸激酶和磷酸烯醇丙酮酸羧激酶活性的影响
Tab.5 Lipase, fatty acid synthetase, amylase, pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase of juvenile obscure puffer fed different carbohydrate-to-lipid ratio diets

糖/脂肪比例 CHO:L	脂肪酶/ (U/g prot) LPS	脂肪合成酶/ (U/g prot) FAS	淀粉酶/ (U/g prot) AMS	丙酮酸激酶/ (U/g prot) PK	磷酸烯醇丙酮酸羧激酶/ (U/g prot) PEPCK
4.29	20.08 ± 2.47 ^a	53.69 ± 2.98 ^{bc}	0.42 ± 0.09 ^b	36.58 ± 1.83 ^c	11.88 ± 1.45 ^a
2.79	21.33 ± 1.56 ^{ab}	57.42 ± 3.26 ^c	0.44 ± 0.04 ^b	37.72 ± 1.89 ^c	12.55 ± 1.39 ^a
1.86	25.78 ± 1.82 ^{cd}	59.37 ± 3.54 ^c	0.45 ± 0.04 ^b	36.88 ± 1.48 ^c	11.65 ± 1.47 ^a
1.19	28.67 ± 2.34 ^d	50.47 ± 3.17 ^b	0.39 ± 0.05 ^b	32.47 ± 2.31 ^b	13.34 ± 1.31 ^a
0.73	25.33 ± 1.91 ^{cd}	47.74 ± 2.95 ^{ab}	0.32 ± 0.03 ^a	29.74 ± 1.73 ^{ab}	17.75 ± 1.57 ^b
0.42	23.54 ± 2.05 ^{bc}	43.63 ± 3.88 ^a	0.29 ± 0.02 ^a	27.69 ± 1.65 ^a	19.37 ± 1.25 ^b

3 讨论

已有大量研究表明,在饲料中添加适量的非蛋白源能量物质(糖和脂肪)可以减少饲料蛋白质分解用于能量消耗,起到节约蛋白质的作用,并能减轻氮排泄对养殖水体环境的污染^[14-15]。本实验通过对 SGR、PER 和 FE 进行二元回归综合分析得

出,CHO:L 为 2.01 ~ 2.16 时,暗纹东方鲀能获得最佳的生长性能和饲料利用率。本研究中采用等氮等能原则配制饲料,CHO:L 过高(4.29)或过低(0.42和 0.73)均显著降低暗纹东方鲀生长性能和饲料利用率,这表明饲料中糖和脂肪维持适宜的比例才能充分发挥鱼类利用脂肪和糖类的协同效应,这与对长吻鲷 (*Leiocassis longirostris*)^[16]、非洲

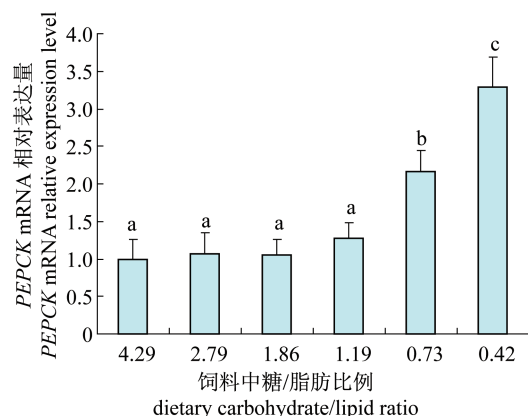


图2 饲料中不同糖脂比对暗纹东方鲀肝脏磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 mRNA 相对表达量的影响

图中不同上标字母表示有显著差异 ($P < 0.05$)

Fig. 2 Expression analysis of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) in liver relative to β -actin in response to juvenile obscure puffer fed different carbohydrate/lipid ratio diets

Significant differences within the diets are indicated by different letters ($P < 0.05$)

鲶 (*Clarias gariepinus*)^[17]、黄鳍鲷 (*Sparus latus*)^[18]、许氏平鲈 (*Sebastes schlegeli*)^[19]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[20] 和团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[21] 等鱼类研究结果一致。CHO:L 为 4.29 时 SGR 比 1.86 时显著降低,这说明暗纹东方鲀可能对饲料淀粉的耐受不能超过 27.1%,这与其饲料中最适糊精添加量为 23.5% 的研究结果基本一致^[8]。摄食高 CHO:L 饲料会降低鱼类生长和饲料利用,其原因可能是由于糖类影响鱼类对必需氨基酸和不饱和脂肪酸的吸收^[22],同时高 CHO:L 饲料中必需脂肪酸缺乏也是鱼生长性能和饲料效率降低的主要原因^[23];而低 CHO:L 饲料导致增重率下降主要是由于大量脂类在鱼体内沉积引起组织病变,影响了正常代谢功能所致^[16,20],本实验取样解剖过程中也观察到肠系膜上脂肪沉积和肝脏中脂肪含量明显增加。

肝脏是鱼类中间代谢的主要器官,也是鱼类重要的营养储存场所。肝脏淀粉酶活性和肝糖原含量随 CHO:L 降低而降低,主要是由于饲料中淀粉含量不足时,淀粉含量的增加能促进淀粉酶活性升高,有助于糖类消化吸收,导致血糖含量升高和肝糖原积累增加,这与在非洲鲶^[17] 研究中结果一致。但当淀粉含量进一步增加时,淀粉酶活

性无显著变化,鱼类对糖类的消化能力达到饱和,血糖含量变化趋于平缓,过量吸收的糖沉积在肝脏中,会导致糖代谢负担,在许氏平鲈幼鱼^[19] 研究中存在类似现象。有研究表明,饲料脂肪含量不足时,鱼体通过提高肝脏或肠道中脂肪酶 (LPS) 和脂肪合成酶 (FAS) 活性从而增加对饲料的脂肪消化吸收或体内合成转化;而饲料中外源性脂肪充足时,鱼类自身需要合成的脂肪减少,使得作为脂肪合成原料的脂肪酸需要量减少,同时饲用鱼油富含 n-3 多不饱和脂肪酸抑制 FAS 基因表达,导致 LPS 和 FAS 活性下降^[24]。本研究中,肝脏 LPS 和 FAS 活性随 CHO:L 降低呈现出先升高后降低的趋势,分析原因可能是饲料中脂肪水平为 11.9%~14.1% 时,鱼体对内、外源性脂肪酸的需求达到一个平衡点,过低或过高的脂肪水平平均会对 LPS 和 FAS 活性有一定的抑制作用,其相关代谢机制需进一步研究。暗纹东方鲀血浆中胆固醇 (CHO) 和甘油三酯 (TG) 含量均随 CHO:L 降低呈增加趋势,可能是由于饲料中脂肪含量增加导致鱼体吸收并转化的游离脂肪酸不断增多,使肝脏合成并转运出去的 CHO 和 TG 也不断增多,导致血浆 CHO 和 TG 含量升高,这与在黄鳍鲷^[18] 中的研究结果相一致。本研究中,暗纹东方鲀肝脂肪含量与饲料脂肪水平呈现正相关,在军曹鱼 (*Rachycentron canadum*)^[25] 和异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)^[26] 的研究中也得出与本实验相似的结论。

PK 和 PEPCK 是糖酵解和糖异生途径中的关键限速酶,二者调控机体内磷酸烯醇式丙酮酸平衡,其活性的变化对维持机体血糖水平具有重要作用。对欧洲舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[27] 和金头鲷 (*Sparus aurata*)^[28] 的研究表明肝脏中 PK 活性受到饲料糖水平的调节。本研究发现,暗纹东方鲀肝脏 PK 活性随 CHO:L 增加而升高,这与血糖和肝糖原的变化趋势一致,表明饲料中 CHO:L 比例能影响肝脏中 PK 活性调节,而 PK 活性增加有利于增加糖酵解来维系鱼体内葡萄糖的动态平衡。PEPCK 在细胞内的定位不同,分为细胞质型 (PEPCK-C) 和线粒体型 (PEPCK-M),两者的动力学性能和分子量大小相似,但编码的基因不同^[10]。PEPCK-C 主要在肝、肾和脂肪组织中表达,它的转录受各种营养素和激素调节;而 PEPCK-M 为组成型表达,不受营养素的调节。对

虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的研究结果表明,饥饿、再投喂、饲料含糖与否、饲料蛋白含量等营养条件都对其肝脏中的 *PEPCK* 活性无影响^[29],因此分析认为虹鳟肝脏中 *PEPCK* 主要是 *PEPCK-M*,掩盖了 *PEPCK-C* 的表达^[30]。本研究中未能分离暗纹东方鲀肝脏细胞的细胞质和线粒体,测定所得酶活性是 *PEPCK* 2 个亚型活性的总和。暗纹东方鲀 *PEPCK* 活性和 mRNA 相对表达量受到饲料中 CHO:L 变化的影响,推测暗纹东方鲀肝脏中 *PEPCK* 可能主要是 *PEPCK-C*,同时 *PEPCK-C* 和 *PEPCK-M* 二者在肝脏中所占比例还有待进一步的验证。对鲤 (*Cyprinus carpio*) 研究中发现,摄食 20% 糖饲料组 *PEPCK* mRNA 的表达量比无糖饲料组低;同时禁食或摄食低糖饲料时,*PEPCK* 活性及 mRNA 水平将会增加^[31]。俞菊华等^[9] 研究表明高脂组 (40.88% 蛋白, 19.93% 脂肪, 14.98% 糖) 和低脂组 (50.14% 蛋白, 9.92% 脂肪, 14.45% 糖) 翘嘴红鲌 (*Erythroculter ilishaeformis*) *PEPCK* mRNA 表达差异不显著;但无糖组 (63.38% 蛋白, 9.13% 脂肪) 鱼摄食后 24 h 后, *PEPCK* 表达量为其他组同期的 2.5~4.7 倍,表明无糖饲料诱导 *PEPCK* 表达增加,与无糖饲料引起较强的糖异生作用一致。*PEPCK* 不存在别构调控和翻译后修饰调控,该酶活性的调节主要表现在转录水平上^[32]。本研究中暗纹东方鲀摄食 CHO:L 为 0.73 和 0.42 饲料组的肝脏 *PEPCK* 活性及其 mRNA 相对表达量显著升高,在翘嘴红鲌研究中发现相似现象^[33],可能是由于饲料中糖含量较低导致鱼体血糖含量明显降低,从而引起糖异生作用增强来维持血糖内稳态,并且 *PEPCK* 基因表达的精确调控有利于动物血糖水平的稳定^[34]。

4 结论

本实验条件下,饲料中不同糖/脂肪比例对暗纹东方鲀幼鱼的生长性能、生理生化指标和 *PEPCK* 基因表达均产生显著的影响。饲料中添加过量的脂肪导致暗纹东方鲀肝脏脂肪沉积、血浆甘油三酯含量、肝脏 *PEPCK* 活性及其 mRNA 相对表达量显著增加,同时抑制肝脏脂肪酶和脂肪合成酶活性;饲料中添加可消化糖不易在鱼体内形成脂肪,暗纹东方鲀更趋向于利用饲料中的糖源作为能量来源。分别用二次多项回归模型拟

合 SGR、PER、FE 和 CHO:L 的关系,得到暗纹东方鲀幼鱼饲料中 CHO:L 的适宜范围为 2.01~2.16。

参考文献:

- [1] Hua Y Y, Li T Y, Zou H H. Growth and development characteristics of captive *Takifugu obscurus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28 (1): 8-14. [华元渝, 李廷友, 邹宏海. 养殖型暗纹东方鲀生长与发育特性. 水产学报, 2004, 28 (1): 8-14.]
- [2] Yang Z, Chen Y F. Salinity tolerance of embryos of obscure puffer *Takifugu obscurus* [J]. Aquaculture, 2006, 253 (1-4): 393-397.
- [3] Yang Z, Chen Y F. Induced ovulation using LHRHa in anadromous obscure puffer *Takifugu obscurus* cultured entirely in freshwater [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2003, 29 (4): 323-326.
- [4] Cai Z Q, Liu T, Lin Y T, et al. The artificial breeding and seedling cultivation technology of obscure puffer *Takifugu obscurus* [J]. Reservoir Fisheries, 2003, 23 (4): 20-21. [蔡志全, 刘韬, 林永泰, 等. 暗纹东方鲀全人工繁殖及苗种培育技术. 水利渔业, 2003, 23 (4): 20-21.]
- [5] Yang Z, Yang J X. Optimum protein requirement of juvenile *Takifugu obscurus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2003, 27 (5): 450-455. [杨州, 杨家新. 暗纹东方鲀幼鱼对蛋白质的最适需要量. 水产学报, 2003, 27 (5): 450-455.]
- [6] Zhong G F, Han B, Hua X M, et al. Apparent digestibility coefficients (ADC) of selected protein feed ingredients and the effect of dietary multi enzyme on ADC of *Takifugu obscurus* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2012, 21 (2): 241-246. [钟国防, 韩斌, 华雪铭, 等. 暗纹东方鲀对几种蛋白质原料表观消化率及酶制剂对其消化能力的影响. 上海海洋大学学报, 2012, 21 (2): 241-246.]
- [7] Zhong G F, Qian X, Hua X M, et al. Effects of feeding with corn gluten meal on lysozyme activity and c-lysozyme gene expression in *Fugu obscurus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34 (7): 1121-1128. [钟国防, 钱曦, 华雪铭, 等. 玉米蛋白粉替代鱼粉对暗纹东方鲀溶菌酶活性及 c 型溶菌酶 mRNA 表达的影响. 水产学报, 2010, 34 (7): 1121-1128.]
- [8] Liu X H, Ye C X, Zheng L M, et al. Effect of dietary dextrin levels on growth, activities of digestive

- enzyme and blood biochemical indices of juvenile obscure puffer *Takifugu obscurus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 2013, 37(9):1359-1368. [刘襄河, 叶超霞, 郑丽勉, 等. 饲料糊精水平对暗纹东方鲀幼鱼生长、消化酶活性和血液生化指标的影响. 水产学报, 2013, 37(9):1359-1368.]
- [9] Yu J H, Ge X P, Tang Y K, *et al.* Effects of carbohydrate, lipid in diets on the *PEPCK* gene expression of *Erythroculter ilishaeformis* [J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(3):369-373. [俞菊华, 戈贤平, 唐永凯, 等. 碳水化合物、脂肪对翘嘴红鲌 *PEPCK* 基因表达的影响. 水产学报, 2007, 31(3):369-373.]
- [10] Hanson R W, Reshef L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression [J]. Annual Review of Biochemistry, 1997, 66:581-611.
- [11] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues [J]. Journal of Biological Chemistry, 1957, 226(1):497-509.
- [12] Treberg J R, Lewis J M, Driedzic W R. Comparison of liver enzymes in osmerid fishes: key differences between a glycerol accumulating species, rainbow smelt (*Osmerus mordax*), and a species that does not accumulate glycerol, capelin (*Mallotus villosus*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2002, 132(2):433-438.
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. 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.
- [14] Mohanta K N, Mohanty S N, Jena J K. Protein-sparing effect of carbohydrate in silver barb, *Puntius gonionotus* fry [J]. Aquaculture Nutrition, 2007, 13(4):311-317.
- [15] Mohseni M, Hassani M H S, Pourali F H, *et al.* The optimum dietary carbohydrate/lipid ratio can spare protein in growing beluga, *Huso huso* [J]. Journal of Applied Ichthyology, 2011, 27(2):775-780.
- [16] Tan Q, Xie S, Zhu X, *et al.* Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth and feed utilization in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Günther) [J]. Journal of Applied Ichthyology, 2007, 23(5):605-610.
- [17] Ali M Z, Jauncey K. Optimal dietary carbohydrate to lipid ratio in African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) [J]. Aquaculture International, 2004, 12(2):169-180.
- [18] Hu Y H, Liu Y J, Tian L X, *et al.* Optimal dietary carbohydrate to lipid ratio for juvenile yellowfin seabream (*Sparus latus*) [J]. Aquaculture Nutrition, 2007, 13(4):291-297.
- [19] Lee S M, Kim K D. Effects of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth and body composition of juvenile and grower rockfish, *Sebastes schlegelii* [J]. Aquaculture Research, 2009, 40(16):1830-1837.
- [20] Gao W, Liu Y J, Tian L X, *et al.* Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth performance, body composition, nutrient utilization and hepatic enzymes activities of herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Aquaculture Nutrition, 2010, 16(3):327-333.
- [21] Li X F, Wang Y, Liu W B, *et al.* Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on growth performance, body composition and glucose metabolism of fingerling blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* [J]. Aquaculture Nutrition, 2013, 19(5):701-708.
- [22] Zhu H X, Jiang Q C, Yang J H, *et al.* Dietary non-protein energy sources: growth, physiology and biochemistry by the juvenile Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Von Martens) [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(3):473-480. [朱欢喜, 蒋琦辰, 杨江华, 等. 饲料中非蛋白能源物质对红螯光壳螯虾幼虾生长、生理、生化指标的影响. 水产学报, 2012, 36(3):473-480.]
- [23] Zhang S L, Ai Q H, Xu W, *et al.* Effects of dietary carbohydrate to lipid ratio on growth, feed utilization, plasma glucose and glycolytic enzyme activities of juvenile darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(3):466-473. [张世亮, 艾庆辉, 徐玮, 等. 饲料中糖/脂肪比例对瓦氏黄颡鱼生长、饲料利用、血糖水平和肝脏糖酵解酶活力的影响. 水生生物学报, 2012, 36(3):466-473.]
- [24] Wnag A M, Han G M, Wei X J, *et al.* Molecular cloning of fatty acid synthase from gift tilapia (*Oreochromis niloticus*): response of its expression to refeeding and different lipid levels in diet [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(7):1113-1120. [王爱民, 韩光明, 韦信键, 等. 吉富罗非鱼 *FAS* 基因的克隆及再投喂和饲料脂肪水平对其表达的影响. 水产学报, 2010, 34(7):1113-1120.]

- [25] Wang J T, Liu Y J, Tian L X, *et al.* Effect of dietary lipid level on growth performance, lipid deposition, hepatic lipogenesis in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) [J]. *Aquaculture*, 2005, 249 (1 - 4): 439 - 447.
- [26] Wang A M, Li F, Yang W P, *et al.* Effect of dietary lipid level on growth performance, body fat deposition, muscle composition and activities of digestive enzymes of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(3): 625 - 633. [王爱民, 吕富, 杨文平, 等. 饲料脂肪水平对异育银鲫生长性能、体脂沉积、肌肉成分及消化酶活性的影响. *动物营养学报*, 2010, 22(3): 625 - 633.]
- [27] Enes P, Panserat S, Kaushik S, *et al.* Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2006, 143(1): 89 - 96.
- [28] Fernández F, Miquel A G, Córdoba M, *et al.* Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 343(1): 1 - 10.
- [29] Panserat S, Plagnes-Juan E, Brèque J, *et al.* Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2001, 204(2): 359 - 365.
- [30] Enes P, Panserat S, Kaushik S, *et al.* Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2009, 35(3): 519 - 539.
- [31] Panserat S, Médale F, Blin C, *et al.* Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp [J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2000, 278(5): 1164 - 1170.
- [32] Qian Y X, Yang S X, Tong L J, *et al.* Low salinity induces cytosolic *PEPCK* expression in sea perch (*Lateolabrax japonicus*) [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 26(7): 651 - 658. [钱云霞, 杨孙孝, 童丽娟, 等. 低盐度可诱导鲈鱼胞浆型 *PEPCK* 基因表达. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, 26(7): 651 - 658.]
- [33] Ge X P, Liu B, Xie J, *et al.* Effect of different carbohydrate levels of dietary on growth, plasma biochemical indices and hepaticpancreas carbohydrate metabolic enzymes in topmouth culter (*Erythroculter ilishaeformis* Bleeker) [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2007, 30(3): 88 - 93. [戈贤平, 刘波, 谢骏, 等. 饲料中不同碳水化合物水平对翘嘴红鲌生长及血液指标和糖代谢酶的影响. *南京农业大学学报*, 2007, 30(3): 88 - 93.]
- [34] Cournarie F, Azzout-Marniche D, Foretz M, *et al.* The inhibitory effect of glucose on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in cultured hepatocytes is transcriptional and requires glucose metabolism [J]. *FEBS Letters*, 1999, 460(3): 527 - 532.

**Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratio on growth,
blood biochemical indices, hepatic metabolic enzymes and *PEPCK* gene
expression of juvenile obscure puffer (*Takifugu obscurus*)**

LIU Xianghe, YE Chaoxia, SHEN Biduan, WANG Chunyan, PENG Jian, WANG Anli*

(Key Laboratory of Ecology and Environment Science of Guangdong Higher Education Institutes, Guangdong Provincial

Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: This experiment was conducted to evaluate the effects of dietary carbohydrate-to-lipid ratio on growth performance, feed utilization, biochemical indices and phosphoenolpyruvate carboxykinase (*PEPCK*) gene expression in juvenile obscure puffer, *Takifugu obscurus*. Six isonitrogenous and isoenergetic diets were formulated with dietary CHO:L ratios of 4.29, 2.79, 1.86, 1.19, 0.73 and 0.42, respectively. Fish (initial weight 11.2 ± 0.5 g) were stocked in triplicate tanks (25 fish per tank) and fed to satiation during a period of 60 days. The results indicated that best specific growth rate, protein efficiency ratio and feed efficiency were found in fish fed diet with CHO:L of 1.86, which were significantly higher than those of fish fed diets with 0.42, 0.73 and 4.29 ($P < 0.05$). Plasma triglyceride and liver lipid content increased significantly as dietary CHO:L ratio decreasing ($P < 0.05$), while plasma glucose and hepatic glycogen content showed a contrary tendency. Activities of lipase, fatty acid synthase, amylase and pyruvate kinase in liver were significantly affected by dietary CHO:L ratio ($P < 0.05$). Fish fed diets with CHO:L of 0.42 and 0.73 had significantly higher *PEPCK* activity and mRNA relative expression than those fed with the other diets ($P < 0.05$). However, survival and plasma total cholesterol content were unaffected by dietary CHO:L ratio. The optimal range of CHO:L within 2.01 – 2.16 is suitable for juvenile obscure puffer based on second-order polynomial regression analysis of SGR, PER and FE against dietary CHO:L ratio, respectively.

Key words: *Takifugu obscurus*; carbohydrate-to-lipid ratio; biochemical index; *PEPCK* gene

Corresponding author: WANG Anli. E-mail: wanganl@scnu.edu.cn