

注射硫代乙酰胺并饲喂酵母培养物、姜黄素和水飞蓟素对 草鱼脂代谢相关基因表达丰度的影响

许 凡¹, 叶元土^{1*}, 蔡春芳¹, 张宝彤², 萧培珍², 王丽宏²,
向朝林¹, 姚林杰¹, 刘 猛¹, 李 薇³

(1. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏省水产动物营养重点实验室, 江苏 苏州 215123;
2. 北京市营养源研究所系统营养工程技术研究中心, 水产动物系统营养研究开放实验室, 北京 100069;
3. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 为探讨硫代乙酰胺(TAA)诱导草鱼肝胰脏损伤与损伤修复的作用机制, 试验以腹腔注射硫代乙酰胺诱导肝胰脏损伤实验模型草鱼为对象, 分别饲喂含有酵母培养物 *dv*、姜黄素和水飞蓟素的饲料 70 d 后, 采集草鱼肝胰脏样品, 采用实时定量反转录聚合酶链式反应(qPCR)方法, 检测了草鱼肝胰脏脂肪酸合成酶(FAS)、过氧化物酶增殖体激活受体 γ 辅助激活因子(PGC1- α)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(SCD1)、解偶联蛋白 2(UCP2)、过氧化物酶增殖体激活受体 α (PPAR- α)、过氧化物酶增殖体激活受体 γ (PPAR- γ)、类胰岛素样生长因子(IGF- I)的 mRNA 丰度, 探讨在饲料中添加酵母培养物 *dv*、姜黄素和水飞蓟素后, 草鱼肝胰脏脂代谢相关基因表达丰度的变化。结果显示, TAA 诱导草鱼肝损伤后, FAS 基因表达丰度上调, 调控脂质分解代谢的上游基因(如 PPAR- α 、PPAR- γ 、PGC1- α)表达丰度没有显著性的变化, 而 SCD1 基因表达丰度显著性下调, 其结果可能导致脂质在肝细胞积累量增加, 诱发脂肪性肝病的发生和发展。在饲料中添加酵母培养物 *dv*、姜黄素和水飞蓟素后, 在一定程度上修复了 TAA 对肝胰脏脂代谢的损伤。

关键词: 草鱼; 损伤; 脂代谢; 表达丰度

中图分类号: Q 785; S 963.73

文献标志码: A

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是我国主要淡水养殖鱼类, 由饲料引起的脂肪性肝病是影响草鱼生长、饲料利用效率、鱼体健康的主要营养性疾病^[1-2]。采用药物并辅助使用饲料物质诱导肝胰脏损伤的实验方法, 可以快速、批量、定向、稳定地建立动物肝胰脏损伤实验模型, 并已经成为研究动物脂肪性肝病发生、发展机制以及进行防治药物、饲料添加剂筛选的主要研究方法。

本研究依据向朝林等^[3]注射硫代乙酰胺及饲喂不同水平油脂饲料建立草鱼肝损伤实验模型的方法, 腹腔一次性注射 300 mg/kg 体质量剂量的

硫代乙酰胺(Thioacetamide, TAA)、饲喂含 3.61% 油脂饲料, 建立草鱼肝胰脏损伤、脂肪肝和肝纤维化实验模型, 并采用实时定量反转录聚合酶链式反应(qPCR)方法, 检测草鱼肝胰脏的脂肪酸合成酶(FAS)、过氧化物酶增殖体激活受体 γ 辅助激活因子 1(PGC1- α)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(SCD1)、解偶联蛋白 2(UCP2)、过氧化物酶增殖体激活受体 α (PPAR- α)、过氧化物酶增殖体激活受体 γ (PPAR- γ)、类胰岛素样生长因子(IGF- I)mRNA 的表达丰度, 了解实验模型草鱼以及在饲料中添加姜黄素、水飞蓟素和酵母培养物 *dv* 养殖 70 d 后, 草鱼肝胰脏脂代谢相关基因表达丰度

的变化,探讨硫代乙酰胺诱导草鱼肝胰脏损伤及在饲料中添加3种物质后对肝胰脏脂质代谢的影响状态,为研究草鱼肝胰脏损伤、脂肪性肝病发生和发展机制,以及相应的药物防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验草鱼初始体质量为 (30.0 ± 4.0) g,购于江苏溧阳水产养殖场,为池塘养殖一冬龄鱼种。经3周暂养、驯化后,选择体格健壮、规格整齐的鱼种随机分为5个组,参照向朝林等^[3]建立草鱼硫代乙酰胺肝损伤模型方法,设立对照组(不注射TAA、饲喂含3.61%油脂的饲料)、TAA模型组(腹腔一次性注射TAA 300 mg/kg体质量,饲喂含3.61%油脂的饲料,以下简称模型组)、TAA模型+0.75%酵母dv饲料组、TAA模型+1.40%姜黄素饲料组、TAA模型+0.83%水飞蓟素饲料组,设置4个重复、每个重复20尾鱼,在水泥池网箱中养殖70 d后,对照组和模型组随机各取3尾鱼,常规解剖观察和用于组织切片观察。每组随机取草鱼5尾用于qPCR分析。养殖试验在苏州市相城区新时代特种水产养殖厂室内水泥池小体积网箱(1.5 m × 1.5 m × 1.5 m)中进行,时间为2010年5月20日至8月1日,水温20~30 °C、溶解氧6.0 mg/L以上、pH值7.0~7.4、氨氮含量0.20~0.40 mg/L、亚硝酸盐氮0.05~0.1 mg/L。

试验饲料由常规饲料原料组成,饲料配方及营养组成见表1。酵母培养物dv由达农威生物发酵工程技术(深圳)有限公司提供,主要成份包括酵母细胞代谢产物、经发酵后变异的培养基和少量已无活性的酵母细胞;姜黄素由北京桑普生化有限公司提供,为姜黄提取产物,姜黄素的有效含量为95%;水飞蓟素由北京桑普生化有限公司提供,为水飞蓟种子提取产物,水飞蓟素的有效含量为80%。原料经粉碎过60目筛、混匀,加工成直径为3.0 mm的颗粒饲料,风干后于-20 °C保存。制粒温度65~70 °C,持续时间约40 s。

1.2 主要试剂

硫代乙酰胺购自国药集团化学试剂有限公司(批号:T20100310);氯仿、异丙醇、苯酚、无水乙醇均为分析纯;RNAiso Plus、DNase I、反转录试剂盒、SYBR Premix Ex TaqTM荧光染料均购于

TAKARA公司。

1.3 肝胰脏切片

肝胰脏组织经Bouin氏试液固定后,采取本研究室冰冻切片快速切片方法进行组织学切片。采用H.E染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察肝胰脏组织结构并采用Nikon COOLPIX4500型相机进行拍照。

1.4 mRNA的实时定量检测

根据GenBank中IGF(登录号AF247658.1)的保守序列,用Primer5.0软件设计其引物,其它的引物均参考已有的研究资料^[4-5](表2)。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。采用qRT-PCR检测肝胰脏脂代谢相关基因mRNA丰度。

草鱼肝胰脏RNA的提取:DNA I消化处理后,取1 μL琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量,1 μL参照逆转录试剂盒(TAKARA, DRR037S)说明进行反转录,生成cDNA第一链。实时定量检测利用CFX96 (Bio-Rad, USA)实时定量PCR检测系统进行,反应体系为20 μL,包括2 μL引物(浓度为上下游各4 μmol/L)、2 μL cDNA模板(反转录cDNA稀释50倍而得)、10 μL 2 × SYBR Premix Ex TaqTM、6 μL 无菌蒸馏水。反应条件为95 °C、30 s预变性;95 °C、5 s,55 °C、30 s,40个循环;融解曲线65~95 °C。根据扩增曲线得到的C_t值(荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数),计算出目标基因和内参基因β-actin C_t值的差异ΔC_t;进而计算出目的基因与内参基因β-actin mRNA的相对表达倍数2^{-ΔC_t},结果以柱状图表示。

1.5 数据分析

数据以平均值±标准差(mean ± SD)表示,试验结果用SPSS17.0软件进行处理,在单因素方差分析的基础上,采用Duncan氏多重比较法检验组间差异(P=0.05),字母不同代表差异显著。

2 结果

2.1 模型组与对照组草鱼肝胰脏组织学观察

试验草鱼养殖70 d后,对照组和模型组随机取3尾鱼解剖取内脏肉眼观察,对照组(图版-1)肝胰脏颜色红润,质地柔软,包膜下未见淤血表现。模型组(图版-2)肝胰脏已纤维化,质地偏韧,包膜下见淤血表现。肉眼观察,病变率为100%,对其进行

快速冰冻切片 H.E 染色(图版-3, 4), 对照组(图版-3)

表 1 试验饲料配方和营养成分(风干基础)

Tab. 1 Ingredients and nutrients of the diets(based on air dry)

g/kg

原料 ingredient	组别 groups				
	对照组 control	TAA 模型组 TAA model	TAA+酵母 DV TAA+culture	TAA+水飞蓟素 TAA+curcumin	TAA+姜黄素 TAA+silymarin
小麦 wheat	170	170	170	170	170
米糠 rice bran	70	70	70	70	70
豆粕 soybean meal	78	78	78	78	78
菜粕 rape seed meal	200	200	200	200	200
棉粕 cotton seed meal	200	200	200	200	200
进口鱼粉 fish meal	70	70	70	70	70
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	20	20	20	20	20
膨润土 bentonite	20	20	20	20	20
沸石粉 zeolite flou	20	20	20	20	20
大豆油 soybean oil	21	21	21	21	21
面粉 flour	121	121	120.25	120.17	119.6
预混料 premix 1)	10	10	10	10	10
酵母 DV yeast culture	—	—	0.75	—	—
水飞蓟 silymarin2)	—	—	—	0.83	—
姜黄素 curcumin2)	—	—	—	—	1.4
营养成分(实测值) proximate composition					
水分/% moisture	12.28	12.04	12.88	12.58	12.72
粗蛋白/% crude protein	29.31	29.40	28.88	29.00	28.74
粗脂肪/% crude lipid	3.61	3.72	3.48	3.55	3.49
总能/(kJ/g) general energy	15.35	15.38	15.36	15.26	15.56

注: 1) 预混料为每千克日粮提供 The premix provided following for per kg of feed: Cu 5 mg; Fe 180 mg; Mn 35 mg; Zn 120 mg; I 0.65 mg; Se 0.5 mg; Co 0.07 mg; Mg 300 mg; K 80 mg; VA 10 mg; VB₁ 8 mg; VB₂ 8 mg; VB₆ 20 mg; VB₁₂ 0.1 mg; VC 250 mg; 泛酸钙 calcium pantothenate 20 mg; 烟酸 niacin 25 mg; VD₃ 4 mg; VK₃ 6 mg; 叶酸 folic acid 5 mg; 肌醇 inositol 100 mg。2) 试验用姜黄素和水飞蓟素的纯度分别是 95%、80%。

Notes: 1) The premix provided following for per kg of feed: Cu 5 mg; Fe 180 mg; Mn 35 mg; Zn 120 mg; I 0.65 mg; Se 0.5 mg; Co 0.07 mg; Mg 300 mg; K 80 mg; VA 10 mg; VB₁ 8 mg; VB₂ 8 mg; VB₆ 20 mg; VB₁₂ 0.1 mg; VC 250 mg; calcium pantothenate 20 mg; niacin 25 mg; VD₃ 4 mg; VK₃ 6 mg; folic acid 5 mg; inositol 100 mg. 2) the purity of silymarin and curcumin is 95% and 80% respectively.

表 2 实时定量检测引物

Tab. 2 Primers used for quantitative real-time PCR

	登录号 accession no.	正向引物 forward primer (5'-3')	反向引物 reverse primer (5'-3')
PPAR- α	FJ623265	TCAGGATACCACTATGGAGTTCAC	TACAGCGGCGTTCACACTTG
PPAR- γ	EU847421	CGCTCATCTCCTACGGTCAG	ATGTCGCTGTCGTCCAACCTC
UCP2	AY948546	CGTGGTTTGTGGAAAAGG	GCTCCAAATGCAGATGTG
PGC-1 α	HM015283	GATGTCAGTGACCTCGATGCA	CAGCAAGTTGGCCTCATTTC
SCD1	AJ243835	ACTGGAGCTCTGTATGGAC	CGTAGATGTCACTCTGGAAG
β -actin	DQ211096	CGTGACATCAAGGAGAAG	GAGTTGAAGGTGGTCTCAT

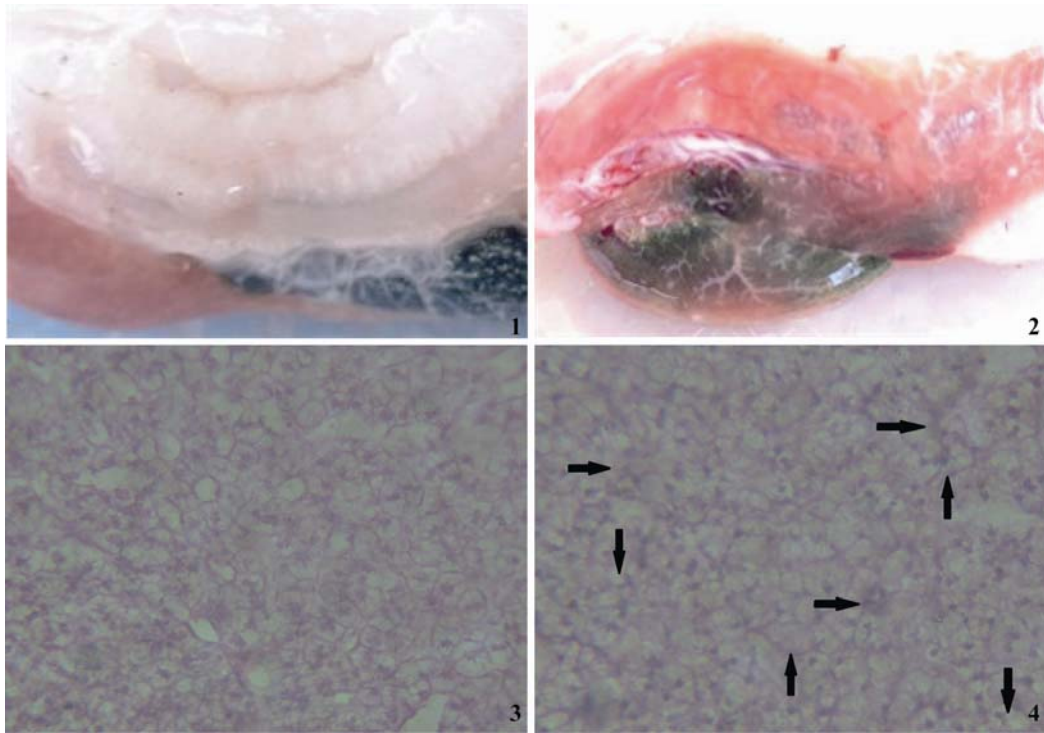
可见肝细胞排列整齐, 细胞轮廓清晰, 无细胞或组织坏死、炎症浸润; 而模型组(图版-4)与对照组相比, 肝细胞肿胀且边界模糊, 肝细胞部分脂肪病变, 有部分炎症浸润, 并出现肝纤维化。

2.2 试验组肝胰脏组织脂代谢相关基因 mRNA 的表达

试验通过荧光定量方法检测到各试验组肝胰脏组织脂代谢相关基因 mRNA 的表达丰度, 与对照组相比, 模型组中肝胰脏 FAS mRNA 表达显著升高($P < 0.05$); 在饲料中分别添加酵母培养物、姜黄素

和水飞蓟素养殖 70 d 后,其表达均显著低于对照组和模型组($P<0.05$),其中,姜黄素组与酵母组之间没

有显著性差异($P>0.05$),但显著低于水飞蓟组($P<0.05$)(图 1-a)。



图版

1. 对照组; 2. TAA 模型组; 3. 对照组(H.E × 400); 4. TAA 模型组(H.E × 400, 箭头处显示出纤维化、炎症浸润)。

Plate

1. control; 2. TAA injection group; 3. control group(H.E × 400); 4. TAA injection group(H.E × 400, arrows showed fibrosis and inflammatory infiltration)/

与对照组相比,模型组中肝胰脏 SCD1 mRNA 表达显著降低($P<0.05$);而在饲料中分别添加酵母培养物、姜黄素和水飞蓟素养殖 70 d 后,其表达均显著低于对照组($P<0.05$),其中,姜黄素组显著高于模型组 ($P<0.05$),酵母培养物组、水飞蓟素组显著低于模型组($P<0.05$)(图 1-b)。

与对照组相比,模型组肝胰脏 UCP2 mRNA 表达显著升高($P<0.05$);在饲料中添加姜黄素养殖 70 d 后,其表达显著降低($P<0.05$),显著低于对照组和模型组,而添加酵母培养物和水飞蓟素养殖 70 d 后,其表达均升高,其中酵母培养物组无显著性差异($P>0.05$),水飞蓟素组有显著性差异($P<0.05$) (图 1-c)。

与对照组相比,模型组中肝胰脏 PPAR- α mRNA 表达升高,但差异不显著($P>0.05$);在饲料中添加酵母培养物、姜黄素和水飞蓟素养殖 70 d 后,其表达较模型组的结果均降低,其中,姜黄素组无显著

性差异($P>0.05$);而酵母培养物和水飞蓟素组均有显著差异($P<0.05$) (图 1-d)。

模型组与对照组中肝胰脏 PPAR- γ mRNA 表达无显著性差异($P>0.05$);饲料中添加姜黄素养殖 70 d 后,其表达有升高趋势,而添加酵母培养物和水飞蓟素后,其表达均有降低趋势,但与对照组和模型组相比,均无显著性差异($P>0.05$) (图 1-e)。

与对照组相比,模型组中肝胰脏 PGC1- α mRNA 表达无显著差异($P>0.05$);在饲料中添加姜黄素养殖 70 d 后,其表达有升高趋势,但差异不显著($P>0.05$);而添加酵母培养物和水飞蓟素养殖 70 d 后,其表达均显著下降($P<0.05$) (图 1-f)。

与对照组比较,模型组中肝胰脏 IGF- I mRNA 表达差异不显著($P>0.05$);在饲料中添加酵母培养物、姜黄素和水飞蓟素后,其表达均显著下降,但与对照组没有显著性差异($P>0.05$) (图 1-g)。

3 讨论

3.1 关于 TAA 诱导草鱼肝损伤实验模型

TAA 是常用的肝脏损伤造模药物,腹腔注射

TAA 进入动物体内后,可被肝细胞内细胞色素 P450 混合功能氧化酶代谢为 TAA-硫氧化物,后者进一步代谢,引起脂质过氧化和肝细胞坏死^[6]。本试验

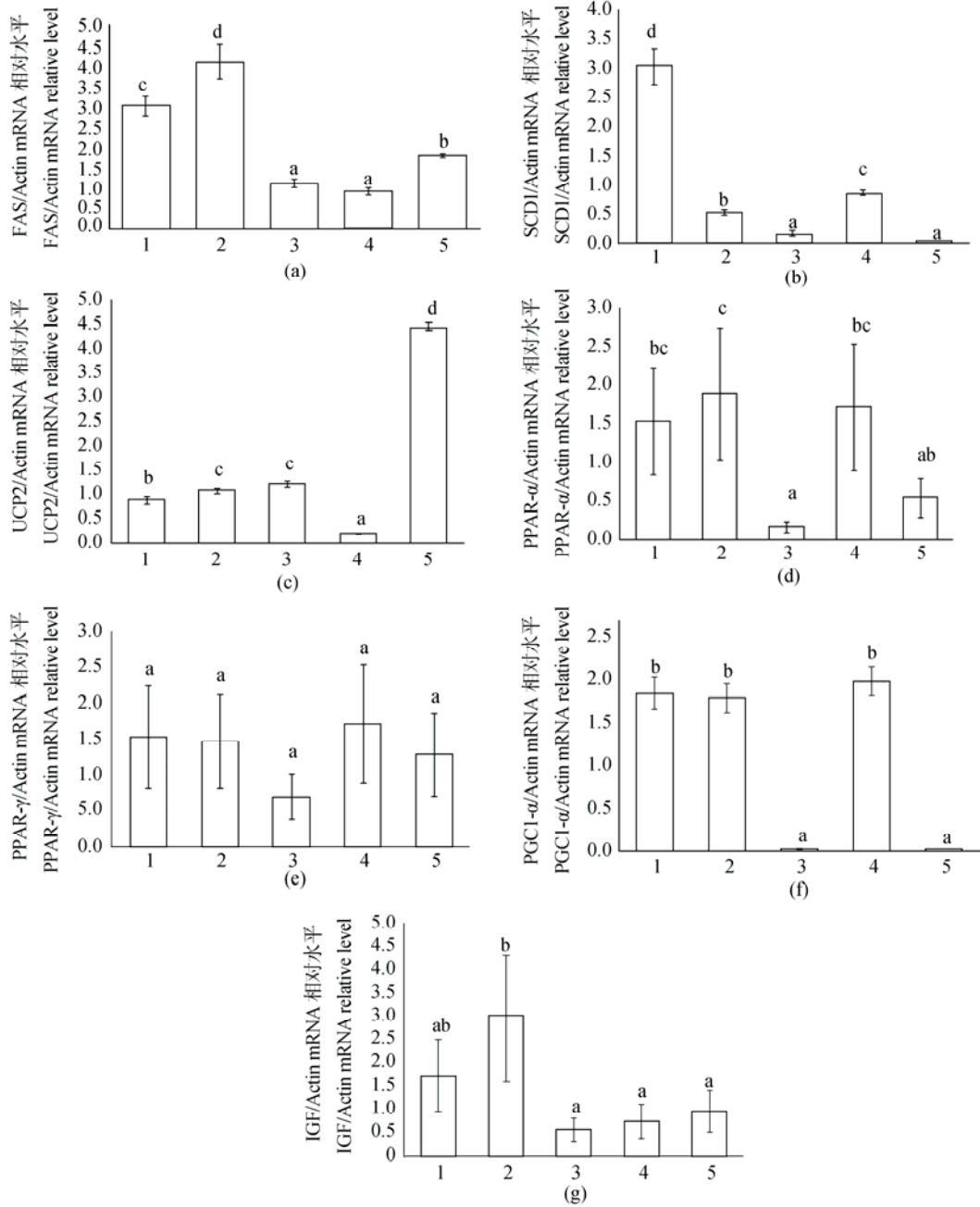


图 1 mRNA 丰度

1.对照组; 2.TAA 模型组; 3.TAA+酵母培养物组; 4.TAA+姜黄素组; 5.TAA+水飞蓟素组。

Fig. 1 mRNA abundance

1.control; 2. TAA model; 3.TAA + culture dv; 4. TAA +curcumin; 5.TAA+silymarin.

中的肝胰脏照片和切片也表明,腹腔注射 TAA 300 mg/kg(1 次/d)、并饲喂 3.61%油脂的饲料养殖 70 d 的方法可以建立草鱼肝损伤实验模型。

3.2 TAA 诱导草鱼肝损伤对脂质代谢的影响

FAS 控制的生物化学反应是以乙酰 CoA 为原料合成脂肪酸的过程,为脂肪酸合成的主要限制酶^[7]。硬脂酰辅酶 1 脱氢酶(SCD1)催化饱和脂肪酸

(SFA)向单不饱和脂肪酸(MUFA)的转化反应,是单不饱和脂肪酸[主要是油酸(18:1)和十六碳烯酸(16:1)]合成过程中的限速酶,而单不饱和脂肪酸主要出现在膜磷脂、甘油三酯和胆固醇酯类中^[8]。本试验中,TAA诱导草鱼肝胰脏损伤后,FAS基因表达活性显著上调、而SCD1基因表达活性显著下调,表明模型组草鱼肝胰脏脂肪酸合成能力显著增加,而由饱和脂肪酸(SFA)合成单不饱和脂肪酸(MUFA)能力显著下降,这种变化结果可能进一步影响到膜磷脂、甘油三酯和胆固醇酯类的组成^[9]。

解偶联蛋白2(UCP2)存在于线粒体内膜,是一种诱导性表达的基因,其主要生物学作用是抑制脂肪酸氧化时产生过氧化物,保护细胞免受损伤。肝细胞脂肪病变时,UCP2在肝脏Kupffer细胞内表达明显降低。肥胖、游离脂肪酸、活性氧、脂质过氧化物、胰岛素、瘦素等因子可以使UCP2表达上调,阻止脂质在肝细胞内沉积,防止脂肪性肝炎发生,产生一种适应性反应^[10]。本试验中,TAA诱导草鱼肝胰脏损伤时,UCP2基因表达活性被诱导表达,其表达活性显著上调,表明TAA可能诱导肝细胞脂质氧化,试验草鱼产生一定程度的适应性,增强UCP2基因表达活性以防止肝细胞的氧化损伤。

PPAR- α 是调节脂代谢相关基因的上游转录因子,可调控多种靶基因的表达,包括参与脂代谢几乎所有过程如脂肪酸摄取、结合与氧化,脂蛋白组合、运输与代谢的基因,是脂代谢关键的调节因子,其表达活性上调可以增强脂肪酸的 β 氧化^[11]。PPAR- γ 可由多种脂肪酸及其衍生物激活,是脂肪细胞基因表达和胰岛素细胞间信号传递的主要调节者,参与脂肪细胞分化、脂代谢的调节^[12]。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)辅激活因子1(PGC1)也是一种核转录因子,是PPAR- γ 的辅助激活因子,通过结合下游转录因子广泛参与线粒体生物合成、肝糖异生等重要代谢通路调节^[13]。本试验中,在TAA诱导草鱼肝胰脏损伤后,PPAR- α 、PPAR- γ 、PGC1- α 基因的表达没有出现显著性变化,其结果显示模型组草鱼线粒体生物合成能力和生物氧化能力(主要是脂肪酸的 β 氧化)没有显著性的变化。

IGF-I是生长激素(GH)促进生长的最重要的介导体,IGF-I的分泌主要受营养、生长激素、局部细胞因子及发育阶段调控IGF-I基因的表达上调能促

进蛋白质的合成,抑制蛋白质的降解^[14]。本试验中,IGF-I基因表达活性有上调的趋势,但没有达到显著性差异水平。

综上所述,由于FAS基因表达活性上调,使脂肪酸的合成量增加,而调控脂质分解代谢、尤其是脂肪酸的 β 氧化的上游基因(如PPAR- α 、PPAR- γ 、PGC1- α)表达活性没有显著性的变化,其结果可能导致脂质在肝细胞积累量增加,诱发脂肪性肝病的发生和发展。由于TAA的诱导作用,肝细胞内能量代谢的氧化磷酸化解偶联蛋白(UCP2)基因活性上调,显示出在脂肪酸的 β 氧化强度没有显著性改变的情况下,氧化磷酸化解偶联作用增强,虽然可以一定程度抑制脂质的过氧化作用、诱导性保护肝细胞的氧化损伤作用,但是鱼体所需要的能量供给可能出现不足而影响到鱼体的生长代谢。由于SCD1基因表达活性的显著性下调,显示出肝胰脏由SFA合成MUFA能力减弱,并进一步可能影响到肝细胞的膜磷脂、甘油三酯和胆固醇酯类组成。TAA诱导草鱼肝胰脏的损伤作用主要还是氧化损伤作用,并干扰肝细胞正常的脂质代谢和能量代谢,并可能影响到肝细胞脂质组成。

3.3 三种添加物对肝损伤模型草鱼脂质代谢的影响

酵母培养物 dv 对肝胰脏脂代谢相关基因表达丰度的影响 酵母培养物 dv 的主要成份为酵母细胞外代谢产物、经过发酵后变异的培养基和少量已无活性的酵母细胞^[15],其主要作用是通过对消化道结构与功能的维护发挥作用,并以肠道功能的维护为基础,通过生理性“肠-肝轴”对肝脏功能产生作用。本试验中,在TAA诱导肝损伤实验模型草鱼饲料中添加酵母培养物养殖70d后,草鱼肝胰脏FAS、PGC1- α 、SCD1、PPAR- α 、IGF-I基因的表达活性与模型组相比均显著下调,PPAR- γ 基因表达有下调趋势但差异不显著,UCP2基因表达有上调趋势但差异不显著。结合TAA诱导草鱼肝损伤对脂质代谢的影响的分析结果,显示出本实验中酵母培养物 dv 对TAA诱导的脂质代谢损伤具有一定程度的修复作用。

姜黄素对肝胰脏脂代谢相关基因表达丰度的影响

姜黄素来源于姜黄,有效成分为姜黄素、去甲氧基姜黄素和二去甲氧基姜黄素^[16]。姜黄素有抗氧化作用,通过抗自由基和脂质过氧化效应,增

强机体抗氧化酶的活力^[17];大鼠中的研究表明,姜黄素可以显著减轻肝细胞脂肪贮积和脂肪变性,减轻肝脏炎性细胞浸润等,保护肝细胞,防止肝细胞脂肪性病变^[18-19]。本试验中,在 TAA 诱导肝损伤实验模型草鱼饲料中添加姜黄素养殖 70 d 后,草鱼肝胰脏 FAS、UCP2、IGF- I 基因的表达活性与模型组相比均显著下调,PGC1- α 、PPAR- α 、PPAR- γ 基因表达无显著性差异,SCD1 基因表达显著上调。结合已经获得的草鱼特定生长率(姜黄素组高出模型组 28.95%,但还低于对照组)、饲料效率(姜黄素组显著低于模型组 42.49%)试验结果^[20],可以发现姜黄素的添加使得肝胰脏脂肪酸合成量减少,降低了脂质在肝细胞的积累量,并且在脂肪酸的 β 氧化强度没有显著性改变的情况下,氧化磷酸化解偶联作用减弱,增加了 ATP 的形成,补充了鱼体所需要能量的供给,从而使得鱼体的特定生长率与模型组相比显著升高(但还低于对照组),与此同时,肝胰脏由 SFA 合成 MUFA 能力增强,可能肝细胞的细胞膜有所修复。

水飞蓟素对肝胰脏脂代谢相关基因表达丰度的影响 水飞蓟素是水飞蓟种子的提取物,为天然黄酮木脂素类化合物,其主要成分为水飞蓟宾。水飞蓟素通过抗脂质过氧化和清除自由基,维持细胞膜的完整性和流动性,保护肝细胞膜。吴东方^[21]研究表明,水飞蓟素对小鼠肝细胞微粒体及线粒体膜的流动性和完整性有保护作用。本试验中,在 TAA 诱导肝损伤实验模型草鱼饲料中添加水飞蓟素养殖 70 d 后,草鱼肝胰脏 FAS、PGC1- α 、PPAR- α 、SCD1、IGF- I 基因的表达活性与模型组相比均显著下调,PPAR- γ 基因表达无显著性差异,UCP2 基因表达显著上调。本实验中水飞蓟素的添加使得肝胰脏脂肪酸合成量减少,降低了脂质在肝细胞的积累量,同时脂肪酸的 β 氧化强度显著减弱,氧化磷酸化解偶联作用显著增强,结合已经获得的草鱼特定生长率(水飞蓟素组的高出模型组 17.11%)、饲料效率(水飞蓟素组显著低于模型组 35.75%)的结果^[20],分析得出本实验中水飞蓟素对 TAA 诱导的脂质代谢损伤具有一定程度的修复作用,但修复效果不如酵母培养物和姜黄素好,修复机理也待进一步研究。

参考文献:

- [1] Jensen G S, Patterson K M, Yoon I. 酵母培养物具有抗大肠杆菌和抗真菌而不影响健康微生物区系的特性[J]. 饲料工业, 2008, 29(24): 30-31.
- [2] 张海涛, 李国立, 孙翠慈, 等. 营养素对鱼类脂肪肝病变的影响[J]. 海洋通报, 2004(1): 82-89.
- [3] 向朝林, 叶元土, 蔡春芳, 等. 注射硫代乙酰胺及饲喂不同水平油脂饲料建立草鱼肝损伤实验模型[J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(6): 61-62
- [4] Li G G, Liang X F, Xie Q L, et. al Gene structure recombinant expression and functional characterization of grass carp leptin [J]. General and Comparative Endocrinology, 2010: 166, 117-127.
- [5] 吉红, 刘品, 李杰, 等. 草鱼 PGC-1 α 基因的表达及饲喂 n-3HUFAs 对其影响[J]. 水产学报, 2010, 34(9): 1327-1334.
- [6] Wang X D, Anderson R, Soltész V, et. al. Phospholipids prevent enteric bacterial translocation in the early stage of experimental acute liver failure in the rat [J]. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 1994, 29(12):1117-1121.
- [7] 刘世杰, 宋代军, 刘作华. 日粮因素对脂肪酸合成酶(FAS)基因表达的影响[J]. 饲料工业, 2004(11): 27-29.
- [8] 闫爽. 瘦素对大鼠肝星状细胞硬脂酰辅酶 A 去饱和酶-1 基因表达的影响[J]. 陕西医学杂志, 2010(3): 295-297.
- [9] 高松, 刘国庆. 硬脂酰辅酶 1 脱氢酶(SCD1)基因研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(1): 109-112.
- [10] 代东伶, 沈薇. 解偶联蛋白 2 与非酒精性脂肪肝[J]. 中华肝脏病杂志, 2004(9): 67-69.
- [11] Ip E, Farrell G C, Robertson G, et. al. Central role of PPAR alpha dependent hepatic lipid turn over in dietary stea to hepatitis in mice[J]. Hepatology, 2003, 38: 123-132.
- [12] 彭丽红, 阳学风. PPAR 与脂代谢及脂肪肝的关系[J]. 南华大学学报: 医学版, 2006(5): 673-676.
- [13] 宋娟, 贾伟平. PGC-1 α 与能量平衡及糖脂代谢的关系[J]. 上海医学, 2004(11): 869-871.
- [14] 刘鹏. IGF- I 与蛋白质代谢[J]. 现代诊断与治疗, 2002(1): 19-20.
- [15] 甄玉国. 酵母培养物在水产动物中的应用研究进展[J]. 饲料与畜牧, 2008(5): 38-41.
- [16] 刘庆. 中国医学现代中药药理与临床[M]. 武汉: 人民出版社, 2005: 564.
- [17] 胡忠泽. 姜黄素对肉鸡免疫功能和抗氧化能力的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2006(4):34-40.
- [18] 刘永刚, 谢少玲, 李芳君. 分散制剂抗小鼠脂肪肝的实验研究[J]. 中国药业, 2008, 17(21): 7-9.
- [19] 任永丽. 姜黄素对家鸭脂肪肝模型肝脂与血脂的干预效果及机制研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 2327-2329.

[20] 向朝林. 草鱼硫代乙酰胺肝损伤实验模型建立及其应用研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.

[21] 吴东方. 水飞蓟素对小鼠肝细胞微粒体及线粒体膜流动性的影响[J]. 中国中药杂志, 2003(9): 80-82.

Effects of yeast culture, curcumin and silymarin on lipid metabolism related genes expression activity of liver injured by thioacetamide in grass carp

XU Fan¹, YE Yuan-tu^{1*}, CAI Chun-fang¹, ZHANG Bao-tong², XIAO Pei-zhen², WANG Li-hong²,
XIANG Chao-lin¹, YAO Lin-jie¹, LIU Meng¹, LI Wei³

(1. College of Basic Medical and Biological Sciences of Soochow University, Key Laboratory of Aquatic Animal Nutrition in Jiangsu, Suzhou 215123, China

2. Beijing Institute of Nutrition Source, System Engineering Research Center for Nutrition, Beijing 100069, China

3. School of Life Science of Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: To discuss and study the damage and repair mechanism of the thioacetamide-induced fish liver lesions in our research, firstly we established a liver injury experimental model of grass carp by intraperitoneal injection of thioacetamide (TAA). Then fish were fed with additive yeast culture dv, curcumin and silymarin for 70 days, and the hepatopancreas samples were collected. We used real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qPCR) method to detect the mRNA abundance of FAS, PGC1- α , SCD1, UCP2, PPAR- α , PPAR- γ and IGF- I so as to discuss the changes of the expression activity of the lipid metabolism-related genes of hepatopancreas of fishes in the experimental models as well as that which were fed with the three damage-repair additives such as yeast culture dv, curcumin and silymarin. The results showed that, after the thioacetamide induced liver injury, the expression level of FAS was significantly increased, the upstream genes regulating the lipid catabolism such as PPAR- α , PPAR- γ and PGC1- α had no significant change, while the SCD1 was significantly reduced, which may result in the increased lipid accumulation in the liver cells, so as to induce the occurrence and development of fatty liver disease. In brief, after feeding additives such as yeast culture dv, curcumin and silymarin, thioacetamide induced damage of the lipid metabolism of the grass carp hepatopancreas was to some extent repaired.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; injury; lipid metabolism; expression activity

Corresponding author: YE Yuan-tu. E-mail: yeyt@suda.edu.cn