



日粮海带酶解提取物对斑点叉尾鲷生长和肝脏转录组表达的影响

吕昊¹, 叶元土^{1*}, 易皓明¹, 孙飞¹, 石瑶瑶¹,
吕斌¹, 周伟², 蒋蓉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. 山东荣成鸿德海洋生物科技有限公司, 山东 荣成 264300;

3. 无锡三智生物科技有限公司, 江苏 无锡 214000)

摘要: 为研究饲料中海带酶解提取物对斑点叉尾鲷生长和肝脏转录组表达的影响, 在日粮中分别添加 0 g/kg (S, 对照组)、0.3 g/kg (KP3)、0.5 g/kg (KP5)、1.0 g/kg (KP10)、1.5 g/kg (KP15)、2.0 g/kg (KP20) 的海带酶解提取物, 以初始体质量为 (51.18±1.14) g 的斑点叉尾鲷为实验对象, 随机分为 6 组, 每组 3 个重复, 每个重复 40 尾鱼, 在池塘网箱中养殖 60 d。结果显示: ① 与对照组 (S) 相比, 饲料添加海带酶解提取物对斑点叉尾鲷的存活率 (SR) 没有显著影响, 特定生长率 (SGR) 提高了 1.20%~5.39%, 饲料系数 (FCR) 降低了 -0.83%~9.09%; 分别以 SGR 和 FCR 为目标进行二次多项式回归分析, 得到海带酶解提取物在饲料中的最适添加量分别为 0.98 和 0.96 g/kg; KP10~KP20 组肥满度 (CF) 和脏体比 (VSI) 显著降低, KP10 组肝体比 (HSI) 显著降低; 各组全鱼的水分、粗脂肪、粗蛋白质和粗灰分含量差异不显著。② KP3 组肠道皱襞高度, KP5 组肠道皱襞高度、宽度、肌层厚度, KP10 组的皱襞宽度均显著高于 S 组。③ 选取 S 组与 KP10 组鱼肝脏提取总 RNA 后进行转录组测序和基因差异表达分析, 表达显著下调的基因数有 81 个, 显著上调的有 199 个; GO 功能分类分析结果显示, 差异表达基因 (DEGs) 被注释到 DNA 转录、金属离子结合、膜及膜组成成分等条目上; KEGG pathway 分析结果显示, DEGs 主要富集到细胞增殖与分化、激素调控、脂类代谢、糖类代谢以及生长因子代谢等相关的 12 个显著差异代谢通路。研究表明, 日粮添加海带酶解提取物可以促进斑点叉尾鲷生长, 降低饲料系数, 改善肠道形态结构, 加强肝脏的糖脂代谢能力, 适宜添加量为 0.96~0.98 g/kg。

关键词: 斑点叉尾鲷; 海带酶解提取物; 生长; 肝脏转录组

中图分类号: S 963.7

文献标志码: A

斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 自 1984 被引进后经过三十多年的推广, 被广大养殖户接受并广泛养殖, 是我国重要的淡水养殖名优品种^[1]。随着养殖规模扩大, 饲料用量不断增加, 饲料

资源的匮乏将成为巨大的挑战。通过鉴定新饲料或开发提高资源利用效率的新添加剂来扩大饲料资源基础, 将对斑点叉尾鲷养殖的可持续发展发挥重要作用^[2]。

收稿日期: 2020-10-09 修回日期: 2021-01-19

资助项目: 海带酶解提取物对斑点叉尾鲷生长的影响与氧化豆油损伤修复研究 (P113401819); 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项 (2019YFD0900200)

第一作者: 吕昊 (照片), 从事水产动物营养与饲料研究, E-mail: 505928169@qq.com

通信作者: 叶元土, E-mail: yeyt@suda.edu.cn



海带 (*Saccharina japonica*) 是一种冷温带性大型底栖藻类, 主要分布于北太平洋和大西洋沿海。我国海带的养殖面积和产量均居世界首位, 到 2018 年我国海带的年产量已超过 150 万 t^[3]。除了资源丰富、价格低廉等特点, 海带还具有较高的营养价值, 包括丰富的碳水化合物(褐藻胶、海带淀粉、褐藻糖胶、甘露醇)、不饱和脂肪酸、矿物质和维生素等营养成分^[4]。其中, 褐藻胶具有多种生物活性, 并且可以作为一种有效的饲料赋形剂^[5]。褐藻糖胶和海带淀粉这 2 种海带多糖均具有清除自由基的能力和抗氧化作用^[6], 可以增强机体免疫^[7]。海带兼具营养和免疫的双重功效, 具有作为动物饲料添加剂的巨大潜力^[8]。已有不少报道表明, 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[9]、黑鲍 [*Haliotis discus hannai* (♀)×*H. discus discus* (♂)]^[10]、异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)^[11] 等水产动物摄食添加海带的饲料后, 生长性能均有不同程度的提高。然而, 海带细胞壁中存在大量的褐藻胶, 其水溶性很差, 阻碍了组织间的营养因子和活性物质溶出, 海带饲料的应用也因此受限^[12]。不同的加工工艺可以改善这一局限性, 例如热提取法、酸碱提取法、酶解提取法、超声波提取法和发酵等^[13], 这些方法可以提高海带营养物质的利用效率。其中酶解法具有水解位点专一、高效、反应条件温和等优势, 符合实际生产需求。本实验使用的海带酶解提取物是应用酶解技术将纤维质和果胶质水解, 提取出细胞质和细胞间质液中的物质, 再经分离纯化定向浓缩获得的产品。海带酶解提取物对比海带粉, 在饲料中的添加量更低、溶解性更好, 有利于消化吸收, 能更充分发挥海带的营养价值。

本实验以斑点叉尾鲷为对象, 在日粮中添加不同比例的海带酶解提取物, 研究其对斑点叉尾鲷生长、肠道组织结构的影响, 通过肝脏转录组基因差异表达结果分析肝脏的代谢状态, 为海带酶解提取物作为斑点叉尾鲷饲料添加剂的使用效果和适宜添加量提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 实验对象

斑点叉尾鲷购自大丰市华辰水产科技有限公司养殖基地, 鱼种初始体质量为 (51.18±1.14) g, 驯养 1 周后, 选用规格一致、体质健康的鱼种随机分成 6 组, 每组 3 个重复, 共 18 个养殖单元 (网箱), 每个单元 40 尾, 共 720 尾。

1.2 实验饲料

饲料中添加的海带酶解提取物购自山东荣成海洋生物科技有限公司, 海带酶解提取物的组成成分见表 1。以不添加海带酶解提取物的饲料组为对照组 (S)。海带酶解提取物在饲料中的添加量分别为 0.3 g/kg (KP3)、0.5 g/kg (KP5)、1.0 g/kg (KP10)、1.5 g/kg (KP15)、2.0 g/kg (KP20)。饲料组成及营养水平见表 2。饲料原料粉碎后过 60 目筛, 混匀加适量水搅拌, 使用华祥牌 HKj200 制粒机加工成直径为 1.5 mm, 长度为 4 mm 左右的颗粒, 风干后置于 4 °C 保存待用。

1.3 饲养管理

养殖实验在盐城市大丰区华辰水产实业有限公司养殖基地池塘的实验网箱中进行, 网箱规格为 1.5 m × 1.8 m × 1.8 m。池塘中设置 1.5 kW 的叶轮式增氧机 1 台, 运行 7 h/d。日投喂 2 次 (07:00、16:00), 日投喂量为鱼体质量的 3%~4%, 每 10 d 估算 1 次鱼体质量并调整投喂量。正式实验从 2018 年 7 月 8 日—9 月 8 日, 共计 60 d, 养殖期间水温 24.0~32.5 °C。实验期间溶解氧含量 >7.0 mg/L, pH 7.8~8.2, 氨氮浓度 <0.10 mg/L, 亚硝酸盐浓度 <0.005 mg/L, 硫化物浓度 <0.05 mg/L。

1.4 样品采集及分析

生长和形体指标计算 养殖实验结束禁食 24 h 后进行采样。记录实验鱼尾数并称重, 用于生长速率、饲料系数的计算。取 10 尾鱼测量体长、体质量, 编号后解剖, 称取内脏团总质量以及肝脏质量, 用于形体指标计算。

表 1 海带酶解提取物成分

| 海藻酸 alginate | 海带多糖 kelp polysaccharide | 海带寡糖 kelp oligosaccharides | 蛋白质 protein | 甘露醇 mannitol | 钾 potassium | 钙 calcium | 碘 iodine |
|-----------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------|-----------------|----------------|--------------|-------------|
| 28.27 | 9.10 | 17.70 | 3.50 | 14.26 | 18.60 | 0.77 | 0.05 |

表 2 实验饲料组成及营养水平 (风干基础)
Tab. 2 Composition and nutrient levels of experimental diets (AD basis) %

| 成分 component | S | KP3 | KP5 | KP10 | KP15 | KP20 |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 原料 ingredients | | | | | | |
| 面粉 flour | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 |
| 米糠 rice bran | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 |
| 米糠粕 rice bran meal | 7.00 | 6.97 | 6.95 | 6.90 | 6.85 | 6.80 |
| 膨化大豆 expanded soybean | 8.00 | 8.00 | 8.00 | 8.00 | 8.00 | 8.00 |
| 豆粕 soybean meal | 26.80 | 26.80 | 26.80 | 26.80 | 26.80 | 26.80 |
| 菜粕 rapeseed meal | 14.00 | 14.00 | 14.00 | 14.00 | 14.00 | 14.00 |
| 进口鱼粉65 imported fish meal 65 | 12.00 | 12.00 | 12.00 | 12.00 | 12.00 | 12.00 |
| 美国鸡肉粉 American chicken meal | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 |
| 磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂ | 2.20 | 2.20 | 2.20 | 2.20 | 2.20 | 2.20 |
| 沸石粉 zeolite meal | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 |
| 膨润土 bentonite | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 |
| 豆油 soybean oil | 4.00 | 4.00 | 4.00 | 4.00 | 4.00 | 4.00 |
| 海带酶解提取物 kelp enzymatic hydrolysis extract | 0.00 | 0.03 | 0.05 | 0.10 | 0.15 | 0.20 |
| 预混料 premix feed ¹ | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| 合计 total | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| 营养水平 nutrient levels | | | | | | |
| 水分 moisture | 6.63 | 6.74 | 6.02 | 5.88 | 5.72 | 6.06 |
| 粗蛋白质 crude protein | 36.01 | 35.92 | 36.22 | 36.82 | 37.21 | 37.26 |
| 粗脂肪 crude lipid | 9.42 | 9.38 | 9.49 | 9.52 | 9.58 | 9.53 |
| 粗灰分 crude ash | 12.10 | 12.14 | 12.17 | 12.20 | 12.30 | 12.26 |
| 磷 phosphorus | 1.44 | 1.51 | 1.48 | 1.43 | 1.50 | 1.51 |

注: 1. 每kg预混料含铜 2.5 mg, 铁 64 mg, 锰 13 mg, 锌 19 mg, 碘 0.021 mg, 硒 0.07 mg, 钴 0.016 mg, 镁 96 mg, 钾 0.05 mg, 维生素A 0.8 mg, 维生素B₁ 0.8 mg, 维生素B₂ 0.8 mg, 维生素B₆ 1.2 mg, 维生素B₁₂ 0.002 mg, 维生素C 30 mg, 泛酸钙 2.5 mg, 烟酸 2.5 mg, 维生素D₃ 0.3 mg, 维生素K₃ 0.5 mg, 叶酸 0.5 mg, 肌醇 10 mg

Notes: 1. one kilogram of premix contain Cu 2.5 mg, Fe 64 mg, Mn 13 mg, Zn 19 mg, I 0.021 mg, Se 0.07 mg, Co 0.016 mg, Mg 96 mg, K 0.05 mg, VA 0.8 mg, VB₁ 0.8 mg, VB₂ 0.8 mg, VB₆ 1.2 mg, VB₁₂ 0.002 mg, VC 30 mg, calcium pantothenate 2.5 mg, niacin 2.5 mg, VD₃ 0.3 mg, VK₃ 0.5 mg, folic acid 0.5 mg, inositol 10 mg

饲料、全鱼常规成分分析 每个网箱随机取 2 尾鱼, 每组保留 6 尾鱼全鱼样品, 进行常规体成分测定。饲料原料及所有实验鱼用粉碎机粉碎均匀, 在 LGJ-18B 型冷冻干燥机中干燥至恒重测定水分; 采用凯氏定氮法 (GB 5009.5—2010) 测定粗蛋白质含量; 采用索氏抽提法 (GB/T 14772—2008) 测定粗脂肪含量; 采用灼烧法 (GB 5009.4—2010) 测定灰分含量; 采用比色法 (GB 5009.87—2016) 测定总磷含量。

组织切片制作和数据测量 每个网箱取

2 尾鱼, 每组 6 尾鱼, 常规解剖分离出中肠 (肠道全长的 1/2 处), 取中肠 10 mm 肠段, 甲醛固定, 按常规组织切片法进行脱水、透明、透蜡、石蜡包埋后切片, 切片厚度 5~6 μm, H.E 染色, 切片在光学显微镜下观察记录微观形态结构特征, 显微测量, 并拍照留存。

皱襞高度用黏膜皱襞顶端至基部凹陷处的垂直距离表示, 每张切片随机选取 10 个皱襞测量, 取平均值作为结果; 皱襞宽度以皱襞基部、高度 1/3 和 2/3 处的平均宽度表示, 每张切片随

机选取 10 个皱襞测量, 取平均值作为结果; 每张切片随机选取 10 处肌层厚度进行测量, 取平均值作为结果。

肝脏转录组样品采集 每个网箱取 3 尾鱼, 每组 9 尾鱼, 用 MS-222 麻醉后解剖出肝脏组织, 将每个网箱 3 尾鱼体的肝脏等量混合后 (每个组 3 个平行样) 放入 1.5 mL EP 管中, 液氮速冻运回实验室 -80°C 保存备用。将生长结果梳理后, 选取特定生长率最高的实验组 (KP10) 和对照组的肝脏组织进行转录组测序。

1.5 转录组测序

RNA 的分离、纯化和质控 将肝脏组织置于研钵中加入液氮磨至粉末, 用 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 方法对总样品的 RNA 进行分离和纯化。然后用 NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA) 对总 RNA 的量与纯度进行质控。再通过 Agilent 2100 对 RNA 的完整性进行检测, 以 RIN number >7.0 为合格的标准。

cDNA 文库制备与测序 cDNA 文库的制备及测序委托杭州联川生物技术股份有限公司完成, 具体方法: 取出 $5\ \mu\text{g}$ 的质检合格的总 RNA, 使用 oligo(dT) 磁珠, 通过两轮的纯化对其中的带有 PolyA(多聚腺苷酸) 的 mRNA 进行特异性捕获。将捕获到的 mRNA 进行片段化, 再通过逆转录酶的作用合成 cDNA。然后使用 E. coli DNA polymerase I 与 RNase H 进行二链合成, 将这些 DNA 与 RNA 的复合双链转化成 DNA 双链, 同时掺入 DUTP, 补齐平末端。再在其两端各加上一个 A 碱基, 使其与末端带有 T 碱基的接头进行连接, 利用磁珠进行筛选和纯化。以 UDG 酶消化二链, 再通过 PCR, 使其形成片段大小为 300 bp (± 50 bp) 的文库。最后, 使用 Illumina HiSeq 4000 (LC Bio, China) 对其进行双端测序, 读长 150 bp。

转录组数据分析 依据基因在样本中的表达量, 先计算表达量的倍数, 再计算以 2 为底、差异表达倍数 (fold change) 的对数值, 即 $\log_2(\text{FC})$ 值。 $\log_2(\text{FC})$ 值为正表示差异表达上调, 为负表示差异表达下调。以 $|\log_2(\text{FC})| \geq 1$ 同时 $P < 0.05$ 作为显著差异的阈值, 筛选出达到该条件的基因为显著差异表达基因。然后对差异表达基因进行 GO 富集性分析和 KEGG 信号通路富集性分析。

1.6 数据分析

原始数据经 Excel 2010 软件初步整理后, 用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 同时进行 Duncan 氏多重比较分析实验数据的差异显著性, 结果以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异显著水平。

2 结果

2.1 适宜剂量组生长速率显著提高

添加海带酶解提取物对各组斑点叉尾鲷存活率均无显著影响 ($P > 0.05$)。各组的特定生长率均高于 S 组, 其中 KP5 和 KP10 组与 S 组相比, 特定生长率分别提高了 4.19% 和 5.39% ($P < 0.05$); 除 KP20 组外各组的饲料系数均低于 S 组, KP10 组降低了 9.09% ($P < 0.05$)。结果显示日粮添加海带酶解提取物可以提高斑点叉尾鲷生长速率、降低饲料系数 (表 3)。日粮添加低剂量海带酶解提取物后斑点叉尾鲷的脏体比、肝体比与对照组相比均有不同程度降低, KP10、KP15、KP20 组肥满度和脏体比显著降低 ($P < 0.05$), KP10 组肝体比显著降低 ($P < 0.05$)。各组斑点叉尾鲷鱼体的水分、粗脂肪、粗蛋白质和粗灰分含量无显著变化 ($P > 0.05$) (表 4)。

随着饲料中海带酶解提取物添加量的增加, 斑点叉尾鲷的特定生长率呈现二次回归方程的变化趋势, 表明海带酶解提取物在日粮中的添加量有剂量效应特征。特定生长率与海带酶解提取物添加量之间符合一元二次回归方程 $y = -0.060 2x^2 + 0.118 5x + 1.686 4$ ($R^2 = 0.552 5$), 经计算得出当以生长速率为标准时, 海带酶解提取物在饲料中的最适添加量为 0.98 g/kg (图 1)。饲料中海带酶解提取物添加量与饲料系数的关系符合一元二次回归方程 $y = 0.091 2x^2 - 0.175 5x + 1.216 3$ ($R^2 = 0.747 8$), 经计算得出当以饲料系数为标准时, 海带酶解提取物在饲料中的最适添加量为 0.96 g/kg (图 2)。

2.2 适宜剂量组肠道皱襞高度、宽度增加, 肌层厚度增加

斑点叉尾鲷养殖 60 d 后, 取中肠做组织切片, 进行光学显微镜观察。

肠道组织切片观察结果显示, 各组肠道皱襞高度、皱襞宽度和肌层厚度的量化结果显示,

表 3 日粮海带酶解提取物对斑点叉尾鲷生长和饲料系数的影响
Tab. 3 Effects of *S. japonica* enzymatic hydrolysis extract added in feed on growth performance and FCR of *I. punctatus*

| 项目 items | S | KP3 | KP5 | KP10 | KP15 | KP20 |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 初始体质量/g IBW | 52.34±0.83 | 50.26±1.13 | 50.75±0.69 | 51.52±1.11 | 51.43±1.06 | 50.84±1.70 |
| 终末体质量/g FBW | 144.48±1.66 ^{bc} | 141.57±3.91 ^{abc} | 144.39±4.84 ^{bc} | 148.26±3.16 ^c | 140.62±0.71 ^{abc} | 141.33±6.51 ^{abc} |
| 存活率/% SR | 96.67±3.82 | 95.83±3.82 | 99.17±1.44 | 100 | 100 | 100 |
| 特定生长率/(%/d) SGR | 1.67±0.01 ^a | 1.73±0.03 ^b | 1.74±0.08 ^b | 1.76±0.02 ^b | 1.69±0.01 ^{ab} | 1.70±0.03 ^{ab} |
| 与S组比较/% compared with group S | | 3.59 | 4.19 | 5.39 | 1.20 | 1.80 |
| 饲料系数 FCR | 1.21±0.05 ^b | 1.19±0.02 ^b | 1.15±0.06 ^{ab} | 1.10±0.03 ^a | 1.19±0.01 ^b | 1.22±0.03 ^b |
| 与S组比较/% compared with group S | | -1.65 | -4.96 | -9.09 | -1.65 | 0.83 |

n=3

注: 同行肩标不同小写字母表示差异显著(P<0.05), 下同

Notes: values with different lowercase superscripts mean significant difference(P<0.05), the same below

表 4 日粮海带酶解提取物对斑点叉尾鲷形体指标和体成分的影响

Tab. 4 Effects of *S. japonica* enzymatic hydrolysis extract on the body parameters and body composition of *I. punctatus*

| 项目 items | S | KP3 | KP5 | KP10 | KP15 | KP20 |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 形体指标 body parameters (n=10) | | | | | | |
| 肥满度/(g/cm ³) CF | 1.53±0.06 ^{bc} | 1.57±0.02 ^c | 1.48±0.05 ^b | 1.39±0.02 ^a | 1.41±0.03 ^a | 1.38±0.03 ^a |
| 脏体比/% HSI | 8.18±0.95 ^c | 8.09±1.06 ^{bc} | 7.76±0.69 ^{bc} | 5.89±0.67 ^a | 6.71±1.17 ^{ab} | 6.69±0.49 ^{ab} |
| 肝体比/% VSI | 1.16±0.13 ^b | 1.09±0.14 ^{ab} | 1.07±0.12 ^{ab} | 0.96±0.09 ^a | 1.08±0.04 ^{ab} | 1.07±0.04 ^{ab} |
| 体成分 body composition (n=3) | | | | | | |
| 水分/% moisture | 65.06±1.46 | 67.54±1.58 | 65.73±1.86 | 68.89±1.75 | 67.01±1.58 | 69.30±0.83 |
| 粗蛋白质/% crude protein | 16.32±0.25 | 14.47±0.97 | 16.21±0.57 | 15.29±0.33 | 15.74±0.61 | 14.23±0.90 |
| 粗脂肪/% crude lipid | 14.44±1.39 | 12.89±1.51 | 13.56±1.22 | 11.37±2.20 | 12.22±2.26 | 11.96±0.75 |
| 粗灰分/% crude ash | 3.86±0.84 | 3.46±0.07 | 3.53±0.48 | 3.47±0.41 | 4.00±0.53 | 3.56±0.23 |

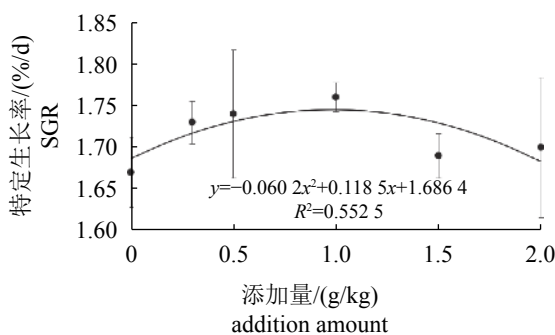


图 1 斑点叉尾鲷特定生长率与日粮中海带酶解提取物添加量的关系

Fig. 1 Relationship between specific growth rate of *I. punctatus* and the addition amount of *S. japonica* enzymatic hydrolysis extract

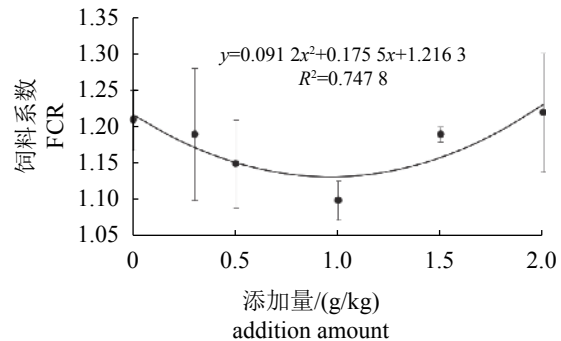
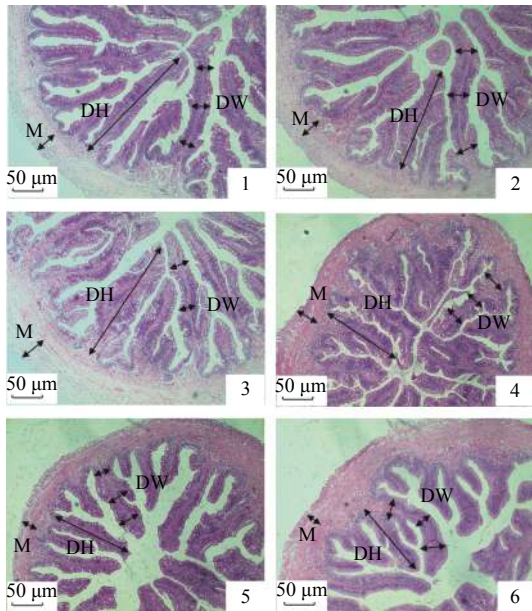


图 2 斑点叉尾鲷饲料系数与日粮中海带酶解提取物添加量的关系

Fig. 2 Relationship between feed conversion ratio of *I. punctatus* and the addition amount of *S. japonica* enzymatic hydrolysis extract

随着海带酶解提取物添加量增加, 各组鱼肠道皱襞高度和宽度都呈现先增加后减少的趋势(图版, 图 3)。与对照组相比, KP3、KP5 组皱襞高度分别增加了 11.98% 和 19.29% ($P < 0.05$); KP5、KP10 组肠道皱襞宽度增加了 46.10% 和 39.76% ($P < 0.05$); KP5 组肠道肌层厚度增加了 26.10% ($P < 0.05$)。结果显示, 日粮添加 0.3~1.0 g/kg 海带酶解提取物在一定程度上改善了斑点叉尾鲷的肠道结构, 而更高的添加量没有明显改善效果。



图版 日粮添加海带酶解提取物对斑点叉尾鲷肠道组织结构的影响(H.E 染色, 200×)

1-6 分别表示斑点叉尾鲷饲喂 0、0.3、0.5、1.0、1.5、2.0 g/kg 海带酶解提取物添加量的日粮后中肠组织形态的变化。DH. 肠道皱襞高度, DW. 皱襞宽度, M. 肌层厚度

Plate Effect of *S. japonica* enzymatic hydrolysis extract on the intestinal structure of *L. punctatus* (H.E staining, 200×)

Histological examination of 1-6 shows the changes of midgut tissue morphology of *L. punctatus* fed diets supplemented with 0, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 g/kg *S. japonica* enzymatic hydrolysis extract. DH. the height of duplicature, DW. the width of duplicature, M. the thickness of muscularis

2.3 肝脏中激素、固醇类合成和糖代谢、脂代谢途径的部分基因差异表达上调

显著差异表达的基因数 将对对照组与添加海带酶解提取物组肝脏转录组数据进行统计分析, 差异表达显著下调的基因数为 81 个, 上调的基因数为 199 个, 差异表达显著上调的基因数远大于下调基因数(表 5)。

筛选出海带酶解提取物相比对照组上调或

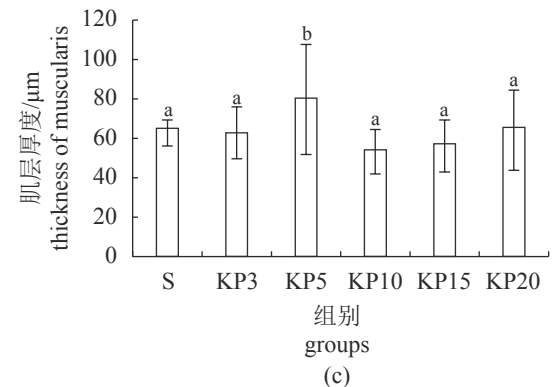
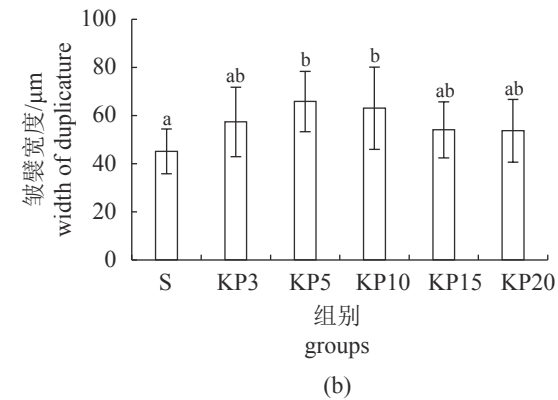
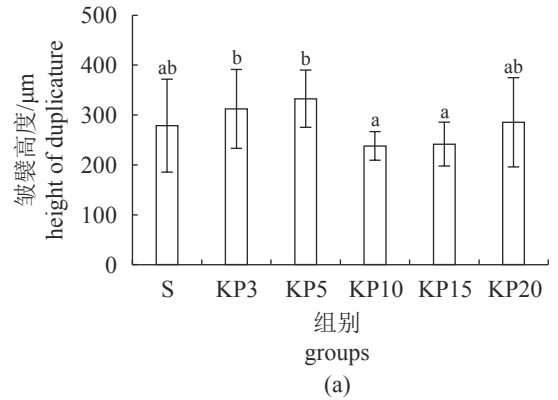


图 3 海带酶解提取物对斑点叉尾鲷中肠组织结构的影响

(a) 皱襞高度, (b) 皱襞宽度, (c) 肌层厚度。图中不同上标表示不同组间差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 3 Effects of *S. japonica* enzymatic hydrolysis extract on intestinal structure of *L. punctatus*

(a) height of duplicature, (b) width of duplicature, (c) thickness of muscularis. Different letters mean significant difference within different groups ($P < 0.05$)

下调幅度最大的前 10 位基因, 其 GO 注释和 KEGG 通路的注释结果显示: 显著上调的基因中有 3 个已知基因, 分别为核受体共激活因子 2 (*ncoa2*)、Krüppel 样因子 12 亚型 (*klf12*) 和包含 BTB 结构域的锌指蛋白 16 (*zbtb16*); 显著下调的

表 5 日粮与添加海带酶解提取物日粮的转录组差异表达基因数量统计

Tab. 5 Statistics on the differentially expressed genes of transcriptome between common diet and diet supplemented with *S. japonica* enzymatic hydrolysis extract

| log ₂ (FC) | 下调基因数 down-regulated gene number | log ₂ (FC) | 上调基因数 up-regulated gene number |
|--|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| ≤(-1)~(-2) | 72 | ≥1~2 | 142 |
| ≤(-2)~(-4) | 8 | ≥2~4 | 55 |
| ≤(-4) | 1 | ≥4 | 2 |
| 小计 subtotal | 81 | | 199 |
| 差异表达基因总数 total number of differentially expressed genes | 7 464 | | 12 264 |

表 6 海带酶解提取物组与对照组相比上调/下调幅度最大的前 10 位基因

Tab. 6 Top 10 genes with the greatest up/down-regulation in the *S. japonica* enzymatic hydrolysis extract group compared with the control group

| 基因 gene | log ₂ (FC) | 基因描述 gene description | GO注释 GO annotations | KEGG通路 KEGG pathway | P值 P value |
|-------------------|-----------------------|---|---|--|------------------------|
| LOC108268537 | 5.43 | 未鉴定的蛋白质 uncharacterized protein | GO: 0070989氧化脱甲基 oxidative demethylation | NA | 3.39×10 ⁻¹² |
| <i>ncoa2</i> | 2.86 | 核受体共激活因子2 nuclear receptor coactivator 2 | GO: 0003713转录共激活因子活性 transcription coactivator | NA | 2.89×10 ⁻⁵ |
| LOC108271496 | 2.52 | 1,25-二羟维生素D ₃ 24-羟化酶, 线粒体 1,25-dihydroxyvitamin D ₃ 24- hydroxylase, mitochondrial | GO: 0016491氧化还原酶活性 oxidoreductase activity | 00100 类固醇生物合成 steroid biosynthesis | 1.40×10 ⁻⁴ |
| <i>c5h1orf194</i> | 2.48 | 未表征蛋白C1orf194同源物 uncharacterized protein C1orf194 homolog | NA | NA | 2.29×10 ⁻⁴ |
| LOC108271131 | 2.30 | 脂蛋白脂肪酶样前体 lipoprotein lipase-like precursor | GO: 0004465脂蛋白脂肪酶活性 lipoprotein lipase activity | 03320 PPAR信号通路 PPAR signaling pathway | 4.09×10 ⁻⁴ |
| <i>kfl12</i> | 2.22 | Krüppel样因子12亚型 X1 Krueppel-like factor 12 isoform X1 | GO: 0046872金属离子结合 metal ion binding | NA | 7.78×10 ⁻⁴ |
| LOC108267282 | 2.14 | 嘌呤核苷磷酸化酶样 purine nucleoside phosphorylase- like | GO: 0004731嘌呤核苷磷酸化酶 活性 purine-nucleoside phosphorylase activity | 00760 烟酸酯和烟酰胺代谢 nicotinate and nicotinamide metabolism | 9.17×10 ⁻⁴ |
| <i>zbtb16</i> | 2.12 | 包含BTB结构域的锌指蛋白16 zinc finger and BTB domain- containing protein 16 | GO: 0006355转录调控, DNA 模板 regulation of transcription, DNA- templated | NA | 1.07×10 ⁻³ |
| LOC108271807 | 2.06 | 维生素D ₃ 羟化酶相关蛋白样亚型 X1 vitamin D ₃ hydroxylase-associated protein-like isoform X1 | GO: 0016021膜的整体成分 integral component of membrane | 04723逆行内源性大麻素信号 retrograde endocannabinoid signaling | 1.56×10 ⁻³ |
| LOC108270518 | 1.97 | C-C基序趋化因子样21aC-C motif chemokine 21a-like | GO: 0002548单核细胞趋化性 monocyte chemotaxis | 04672产生IgA的肠道免疫网络 intestinal immune network for IgA production | 2.24×10 ⁻³ |
| LOC108258483 | -3.12 | ras相关和血小板同源结构域包 含蛋白1样亚型 ras-associated and pleckstrin homology domains-containing protein 1-like isoform X1 | GO: 0007165信号转导 signal transduction | 04611 血小板活化 platelet activation | 2.18×10 ⁻⁵ |
| LOC100304637 | -3.19 | 胰岛素样生长因子2 IGF2 | GO: 0005159胰岛素样生长因子 受体结合 insulin-like growth factor receptor binding | 04010 MAPK信号通路 MAPK signaling pathway | 1.67×10 ⁻⁵ |
| LOC108259607 | -3.26 | 未鉴定的蛋白质 uncharacterized protein | GO: 0006412翻译 translation | 04146 过氧化物酶体 peroxisome | 1.84×10 ⁻⁵ |

· 续表 6 ·

| 基因 gene | log ₂ (FC) | 基因描述 gene description | GO注释 GO annotations | KEGG通路 KEGG pathway | P值 P value |
|----------------|-----------------------|--|---|---|------------------------|
| LOC108255161 | -3.29 | 核受体亚家族1 D组成员2样 nuclear receptor subfamily 1 group D member 2-like | NA | NA | 9.46×10 ⁻⁶ |
| <i>adra1b</i> | -3.33 | α-1肾上腺素能受体 alpha-1B adrenergic receptor | GO: 0001994去甲肾上腺素-肾 上腺素血管收缩参与全身动脉血 压调节 norepinephrine-epinephrine vasoconstriction involved in regulation of systemic arterial blood pressure | 04080 神经活性配体-受体 neuroactive ligand-receptor interaction | 1.16×10 ⁻⁵ |
| LOC108267421 | -3.38 | 视网膜鸟苷基环化酶2样1x2亚型 retinal guanylyl cyclase 2-like isoform X1 | GO: 0000166核苷酸结合 nucleotide binding | 00230 嘌呤代谢 purine metabolism | 6.67×10 ⁻⁶ |
| LOC108259372 | -3.50 | 转导蛋白样增强蛋白3-B同工型 X4 transducin-like enhancer protein 3- B isoform X4 | GO: 0030099骨髓细胞分化 myeloid cell differentiation | 04330 Notch信号通路 Notch signaling pathway | 3.88×10 ⁻⁶ |
| <i>col24a1</i> | -3.96 | 胶原蛋白α-1 (24) 链 collagen alpha-1(X X IV) chain | GO: 0005201细胞外基质结构 成分 extracellular matrix structural constituent | NA | 2.00×10 ⁻⁷ |
| LOC108255274 | -4.59 | 核受体亚家族4 A组成员1样 nuclear receptor subfamily 4 group A member 1-like | GO: 0003700DNA结合转录因子 活性 DNA binding transcription factor activity | 04010 MAPK信号通路 MAPK signaling pathway | 4.55×10 ⁻⁹ |
| LOC108254794 | -5.64 | 25-羟维生素D-1α羟化酶, 线 粒体 25-hydroxyvitamin D-1 alpha hydroxylase, mitochondrial | GO: 0004498钙糖二醇1-单加氧 酶活性 caldiol 1-monooxygenase activity | 00100 甾体生物合成 steroid biosynthesis | 3.54×10 ⁻¹² |

注: NA. 未获得

Notes: NA. not available

基因有 2 个已知基因, 分别为 α-1 肾上腺素能受体 (*adra1b*) 和胶原蛋白 α-1 (24) 链 (*col24a1*) (表 6)。

转录组基因 GO 分类结果 将经过 GO 注释的显著差异表达基因进行分类, 在生物过程条目中, DNA 转录、信号转导相关基因受影响较大, 且均表现为差异表达上调。在分子功能条目中, 受影响较大的为结合类, 包括金属离子结合、ATP 结合、DNA 结合、核苷酸结合、核酸结合、锌离子结合等基因, 相关基因以差异表达上调为主; 其次为催化活性, 包括转移酶、水解酶、蛋白激酶活性, 其差异表达显著上调基因数分别占显著差异基因数的 65%、60% 和 58.3%。在细胞组成条目中, 膜及膜组成成分的相关差异表达显著基因数最多, 分别为 57 和 51 个, 核、细胞质、细胞外区域也分别有 49、41 和 12 个显著差异表达的相关基因 (表 7)。这些结果表明摄食添加海带酶解提取物的日粮对鱼体细胞组成、细胞信号转导和分子功能方面产生了重大影响, 从而可能导致细胞组织结构和功能发生改变。富集的 GO Term 大部分与细胞信号转导相关,

而细胞信号转导系统具有调节细胞增殖、分化、代谢、应激、防御和凋亡等作用, 从显著差异上调与下调的基因比例, 多数差异基因表达上调, 因此添加海带酶解提取物可能对促进细胞增殖、分化以及加强代谢、免疫防御等方面有积极作用。

转录组 KEGG 通路分类结果 在生物体内, 不同基因相互协调行使其生物学功能, 基于 KEGG Pathway 的分析有助于更进一步解读基因的生物学功能。KEGG 通路分类结果显示, 差异基因显著富集在脂肪细胞因子信号通路、FoxO 信号通路、类固醇生物合成通路等共 12 个代谢通路上 ($P < 0.05$) (表 8)。这些信号通路主要包括细胞增殖与分化 (FoxO 信号通路、铁死亡、P53 信号通路、TGF-beta 信号通路)、激素调控 (胰岛素信号通路)、脂类代谢 (脂肪细胞因子信号通路、类固醇生物合成)、糖类代谢 (半乳糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、糖酵解/糖异生) 以及生长因子代谢 (磷酸肌醇代谢、烟酰胺和烟酰胺代谢) 等方面, 同时由于差异表达上调基因数大于差异表

表 7 斑点叉尾鲷摄食添加海带酶解提取物的日粮后肝脏转录组差异表达基因的 GO Term 分类结果

| GO 功能 GO function | GO ID gene ontology ID | GO 信息 GO Term | 显著差异表达基因数 number of genes with significant differences | 上调基因数 up-regulated gene number | 下调基因数 down-regulated gene number | |
|----------------------------|----------------------------|--|--|--------------------------------------|--|----|
| 生物过程 biological process | GO:0006355 | 以DNA为模板的转录调控 regulation of transcription, DNA-templated | 25 | 15 | 10 | |
| | GO:0006351 | 转录, DNA模板 transcription, DNA templated | 19 | 8 | 11 | |
| | GO:0008150 | 生物过程 biological process | 17 | 12 | 5 | |
| | GO:0006468 | 蛋白质磷酸化 protein phosphorylation | 15 | 10 | 5 | |
| | GO:0035556 | 细胞内信号转导 intracellular signal transduction | 14 | 12 | 2 | |
| | GO:0007165 | 信号转导 signal transduction | 13 | 12 | 1 | |
| | GO:0055114 | 氧化还原过程 oxidation-reduction process | 12 | 11 | 1 | |
| 分子功能 molecular function | GO:0046872 | 金属离子结合 metal ion binding | 46 | 38 | 8 | |
| | GO:0005524 | ATP结合 ATP binding | 25 | 15 | 10 | |
| | GO:0003677 | DNA结合 DNA binding | 23 | 16 | 7 | |
| | GO:0003674 | 分子功能 molecular function | 20 | 14 | 6 | |
| | GO:0016740 | 转移酶活性 transferase activity | 20 | 13 | 7 | |
| | GO:0000166 | 核苷酸结合 nucleotide binding | 16 | 7 | 9 | |
| | GO:0016787 | 水解酶活性 hydrolase activity | 15 | 9 | 6 | |
| | GO:0003676 | 核酸结合 nucleic acid binding | 14 | 8 | 6 | |
| | GO:0003700 | DNA结合转录因子活性 DNA binding transcription factor activity | 14 | 10 | 4 | |
| | GO:0004672 | 蛋白激酶活性 protein kinase activity | 12 | 7 | 5 | |
| | GO:0008270 | 锌离子结合 zinc ion binding | 10 | 8 | 2 | |
| | 细胞组分 cellular component | GO:0016020 | 膜 membrane | 57 | 42 | 15 |
| | | GO:0016021 | 膜的组成部分 integral component of membrane | 51 | 37 | 14 |
| GO:0005634 | | 核 nucleus | 49 | 31 | 18 | |
| GO:0005737 | | 细胞质 cytoplasm | 41 | 27 | 14 | |
| GO:0005575 | | 细胞成分 cellular component | 27 | 20 | 7 | |
| GO:0005886 | | 质膜 plasma membrane | 14 | 10 | 4 | |
| GO:0005576 | | 细胞外区域 extracellular region | 12 | 9 | 3 | |

表 8 斑点叉尾鲷摄食添加海带酶解提取物的日粮后肝脏转录组差异表达基因的 KEGG 通路分类结果

Tab. 8 KEGG pathway classification results of differentially expressed genes in the liver transcriptome after ingestion of diets supplemented with *S. japonica* enzymatic hydrolysis extract

| 通路ID pathway ID | 通路 pathway | 显著差异表达基因数 number of genes with significant differences | 上调基因数 up-regulated gene number | 下调基因数 down-regulated gene number |
|--------------------|--|--|--------------------------------------|--|
| ko04920 | 脂肪细胞因子信号通路 adipocytokine signaling pathway | 8 | 6 | 2 |
| ko04068 | FoxO信号通路 FoxO signaling pathway | 9 | 6 | 3 |
| ko00100 | 类固醇生物合成 steroid biosynthesis | 3 | 2 | 1 |
| ko04216 | 铁死亡 ferroptosis | 4 | 3 | 1 |
| ko04115 | P53信号通路 P53 signaling pathway | 5 | 4 | 1 |
| ko00562 | 磷酸肌醇代谢 inositol phosphate metabolism | 6 | 5 | 1 |
| ko00052 | 半乳糖代谢 galactose metabolism | 3 | 1 | 2 |
| ko00760 | 烟酸酯和烟酰胺代谢 nicotinate and nicotinamide metabolism | 3 | 2 | 1 |
| ko00500 | 淀粉和蔗糖代谢 starch and sucrose metabolism | 3 | 1 | 2 |
| ko04910 | 胰岛素信号通路 insulin signaling pathway | 7 | 5 | 2 |
| ko04350 | TGF-beta信号通路 TGF-beta signaling pathway | 5 | 4 | 1 |
| ko00010 | 糖酵解/糖异生 glycolysis/gluconeogenesis | 4 | 2 | 2 |

达下调的基因数，因此多为对信号通路产生正面影响，尤其是对细胞增殖和营养因子代谢有促进作用。最终结果表现为鱼体增强对营养物质的吸收和利用，鱼体生长速率提高。

3 讨论

3.1 海带酶解提取物可改善斑点叉尾鲷生长性能

目前已有较多文献报道海藻在饲料添加剂方面的应用，然而不同海藻在不同种类鱼体内的最适添加量差异显著，不同海藻在同一种鱼类体内的最适添加量也有不同。为了更准确反映适宜添加量，本实验设置了海带酶解提取物 5 个不同添加梯度，结果显示，日粮添加 0.3~2.0 g/kg 的海带酶解提取物均在一定程度上提高了斑点叉尾鲷的特定生长率，添加 0.3~1.5 g/kg 的海带酶解提取物可以降低饲料系数。当添加量为 0.98 g/kg 时对斑点叉尾鲷的生长促进效果最好。

实验用的海带酶解提取物主要成分是褐藻酸钾以及海带多糖和寡糖。褐藻酸钾可以与饲料中的阳离子反应形成交联键，生成凝胶体将饲料原料包裹固定。这种凝胶体轻微吸水膨胀，能保持长时间不溃散，提高了饲料的黏结性、

耐水性和适口性，从而提高饲料的利用效率^[12]。有研究表明，将 2%~5% 的海藻作为黏结剂添加到肉鸡饲料中，其饲料的颗粒稳定性指数 (pellet durability index, PDI) 和硬度有所提高，且肉鸡的饲料效率也显著提高^[13]。

对于海带酶解提取物的促生长作用机制已有较多报道，其作用机制是多方面的。首先由于藻类中还普遍存在一些如二甲基-β-丙酸噁啉 (DMPT) 和二甲基巯基丙酸 (DMSP) 等具有诱食作用的物质^[14-15]，通过这些成分刺激鱼类的化学感觉器官，进而刺激中枢神经释放促摄食因子，提高鱼类采食量。目前的大部分研究主要集中在营养水平，与海带酶解提取物的诱食作用相关的研究较少，其发挥作用的成分和应用效果有待进一步研究。海带的营养价值众所周知，除了褐藻胶、甘露醇等碳水化合物外，海带中尤其富含碘、矿物质、维生素、色素以及其他活性成分，饲料中添加海带或其酶解提取物可以有效改善饲料营养素组成和饲料性质，这也是将海带产品作为饲料添加剂的主要原因。有研究发现海带酶解提取物的多糖成分可以通过提高消化酶活性来促进鱼体对营养物质的吸收。李文武^[16]的实验结果表明，海带多糖能显著提

高斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 胃肠蛋白酶活性和肠黏膜麦芽糖酶活性, 但对乳糖和蔗糖酶影响较弱。杨晴等^[17]的研究也发现, 褐藻糖胶对黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 幼鱼胃和肠道脂肪酶活性具有增强作用。此外还有研究证明, 褐藻糖胶对人体和动物消化道菌群结构有一定的影响。肠道内的乳酸杆菌 (*Lactobacillus*)、双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 等优势菌群是重要的生理性细菌, 在调节肠道微生态平衡, 抑制病原菌生长和腐败菌发育, 调控宿主的营养代谢、生理机能、免疫机能等方面有着重要的影响^[18]。0.04% 的褐藻寡糖可以提高盲肠乳酸杆菌的数量, 0.2% 的褐藻酸钠和褐藻寡糖明显降低大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的数量^[19]。海带通过促进优势菌群的增殖以及抑制病原菌生长来维持肠道菌群的平衡从而促进生长^[20]。与众多研究结果相似的是, 本实验在日粮中添加较高剂量的海带酶解提取物对斑点叉尾鲷的促生长作用反而有所降低, 表现出剂量效应, 即存在最适添加量的问题。一方面是因为海带酶解提取物中大量的海带多糖往往会对营养物质的吸收产生阻碍。本实验转录组结果表现出的是海带酶解提取物中含有某些成分可能对促进脂质代谢有积极作用, 然而当剂量达到一定程度, 最终会表现为减少脂肪的利用。其主要成分褐藻胶本身对胆固醇、胆汁酸具有很强的吸附性, 同时作为酸性多糖将带有大量负电荷, 进一步阻止胆固醇进入细胞, 通过吸附结合胆汁酸、胆固醇降低了鱼体对胆汁酸、胆固醇的重吸收^[21]。此外, 海带多糖作为一种潜在的膳食纤维, 具有促进肠道蠕动的的作用, 但是加快肠道转运的同时也会减少食物在肠道的停留时间, 斑点叉尾鲷作为一种偏肉食性的鱼类, 肠道长度与草食性鱼类相比偏短, 这可能会导致营养物质来不及充分吸收便排出体外, 从而降低了其生长性能。

3.2 海带酶解提取物可改善斑点叉尾鲷肠道组织结构

肠道是鱼体与饲料直接接触的重要器官, 其皱襞密度、高度、厚度以及肌层的厚度会直接影响营养物质的吸收^[22]。本实验中, 日粮添加 0.3~1.0 g/kg 海带酶解提取物可以增加皱襞高度、宽度和肠壁肌层厚度, 从而增大肠道与营

养物质的接触面积并且增强肠道蠕动的动力, 表明较低剂量海带酶解提取物可以改善肠道组织形态结构, 这可能归因于海带多糖中的褐藻糖胶对大肠杆菌、双歧杆菌的抑制作用^[20]。同时褐藻糖胶也可以抑制肠球菌以及链球菌等菌种在肠道的附着^[23], 避免了肠道组织形态被病原菌破坏, 健康的肠道内环境对斑点叉尾鲷的肠道组织发育有促进作用。也有研究发现, 仔猪饲料中添加 120 $\mu\text{g/mL}$ 的海藻多糖可以显著上调小肠紧密连接蛋白 Occludin、Claudin-1 和 ZO-1 的 mRNA 相对表达量^[24], 紧密连接蛋白是肠道机械屏障的基础结构, 海带酶解提取物可能通过促进紧密连接蛋白的表达来维持肠道机械屏障功能的完整性。

3.3 海带酶解提取物增强斑点叉尾鲷肝脏代谢水平

肝脏代谢营养物质的能力对鱼体的生长性能和健康状态有极大地影响, 因此分析不同表型的肝脏转录组有助于阐明海带酶解提取物促生长的分子作用机制。不同表型的组织基因表达量的差异也是巨大的, 而其中差异最为显著的基因可能就是作用靶点之一。依据实验结束时斑点叉尾鲷肝脏转录组分析的结果, 筛选出了其中上下调差异最明显的前 10 位基因, 分析结果如下。

NCOA2 是 *p160* 类固醇受体共激活因子家族主要成员之一。在脂肪细胞中, *NCOA2* 作为共激活因子与脂肪细胞分化转录因子-过氧化物酶体增生物 *PPARG* 相互作用, 通过减弱 *Phospho-PPARG-S114* 复合物来促进脂肪细胞的分化, 增加脂肪细胞的数量。因此 *NCOA2* 对脂肪沉积有重要的调控作用^[25]。本实验中 *NCOA2* 基因高表达对鱼体脂肪沉积有一定的积极作用。

KLF12 是一种与真核细胞转录调控相关的锌指蛋白, 研究证实其与脂代谢的调节也有相关作用, 可以显著促进脂肪酸合成酶 (*FAS*)、乙酰 CoA 羧化酶 (*ACC*) 等脂代谢相关基因的表达水平提高。此外, 脂蛋白脂肪酶相关基因表达也显著提高。同时还推测 *KLF12* 基因在改善脂肪肝、增强葡萄糖耐受性以及增加胰岛素敏感性方面有重要作用^[26]。

在上调的差异基因中, 描述为维生素 D_3 羟化酶相关蛋白样亚型 *X1* 和 *C-C* 基序趋化因子样

21a 两种基因, 其 GO 功能注释均与细胞膜相关。维生素 D3 羟化酶的生物学作用之一是促进小肠黏膜对钙和磷的吸收^[27]。C-C 基序趋化因子则与免疫球蛋白 A(IgA) 的合成相关, 肠道黏膜产生的 IgA 能阻止毒素以及抗原入侵, 其免疫效应对肠道健康起到重要的保护作用^[28]。从上述结果来看, 海带酶解提取物对于肠黏膜的吸收作用以及维持肠道健康有积极影响。

日粮添加海带酶解提取物后, 肝脏转录组结果显示, 差异表达基因显著富集在 12 条 KEGG 通路中, 这些信号通路主要涉及在细胞增殖与分化、脂类代谢、糖类代谢以及生长因子代谢、免疫等方面。其中, *G6PC* 基因涉及其中 6 条信号通路, 占总数的二分之一, 可见该基因很可能是影响多种代谢的潜在靶位点之一。*G6PC* 即 6-磷酸葡萄糖酶催化亚基, 是 6-磷酸葡萄糖酶 (*G6Pase*) 的组成部分, 在机体内作用位催化 6-磷酸葡萄糖水解生成葡萄糖和磷酸, 是糖原分解和糖异生的最后一步反应^[29-30]。研究表明, 营养素可以调节鱼类肝脏中的 *G6PC* 水平, 高糖饲料投喂草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 后 *G6PC* 表达量上调^[31]。本实验结果显示, 日粮添加海带酶解提取物后饲料成分改变, 肝脏 *G6PC* 水平显著升高。此外, 激素也对鱼类的 *G6PC* 表达水平有调控作用, 研究发现胰岛素可以抑制虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的 *G6PC* 表达水平^[32]。在本实验条件下, 添加剂用量极低, 含糖量变化幅度较小, 并且 KEGG 通路有显著富集在胰岛素信号通路上的现象。而已有研究表明, 海带酶解提取物的主要成分海带多糖可以提高胰岛素水平^[33]。因此海带酶解提取物可能是通过激素如胰岛素调控 *G6PC* 的表达水平, 最终调控代谢酶的活性促进鱼体生长。

转录组实验结果主要用于揭示饲料添加海带酶解提取物后对斑点叉尾鲷生理代谢和生理机能的影响。本实验结果显示, 饲料中海带酶解提取物的确对斑点叉尾鲷的生理代谢产生了积极影响, 尤其是在作为信号分子的作用机制方面有增强的作用。饲料中的海带酶解提取物可能通过影响生理代谢信号分子与激素调控作用、影响脂代谢和能量代谢等途径促进斑点叉尾鲷的生理代谢和生长, 并对肠道黏膜、肝脏等组织结构产生了积极影响。在生理功能作用方面, 显示出有增强免疫作用的能力, 具体的

<https://www.china-fishery.cn>

作用位点、作用途径或作用方式等还需要进一步的研究。

4 结论

本实验条件下, 在初始体质量为 (51.18±1.14) g 的斑点叉尾鲷日粮中添加海带酶解提取物可以提高其生长速率, 降低饲料系数, 改善肠道形态结构。推荐斑点叉尾鲷饲料中海带酶解提取物添加量为 0.96~0.98 g/kg。

肝脏转录组的结果显示, 适宜添加量的海带酶解提取物对斑点叉尾鲷肝脏的糖脂代谢水平有积极影响。

参考文献 (References):

- [1] 王友慧, 叶元土. 斑点叉尾鲷营养需求和饵料开发研究进展[J]. *饲料广角*, 2002(12): 16-18.
Wang Y H, Ye Y T. The nutrition requirement and feed development of channel catfish[J]. *Feed China*, 2002(12): 16-18 (in Chinese).
- [2] Makkar H P S, Tran G, Heuzé V, et al. Seaweeds for livestock diets: a review[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2016, 212: 1-17.
- [3] 金振辉, 刘岩, 张静, 等. 中国海带养殖现状与发展趋势[J]. *海洋湖沼通报*, 2009(1): 141-150.
Jin Z H, Liu Y, Zhang J, et al. Breeding actuality and developing direction of Laminaria in China[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2009(1): 141-150 (in Chinese).
- [4] 黄晓林, 郑优, 单琰婷, 等. 海带化学成分和药理活性研究进展[J]. *浙江农业科学*, 2015, 56(2): 246-250.
Huang X L, Zheng Y, Shan Y T, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of kelp[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2015, 56(2): 246-250 (in Chinese).
- [5] 李妍佳. 利用海藻制备动物营养源的研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2011.
Li Y J. Study on feeds with seaweed[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2011 (in Chinese).
- [6] Peng Z F, Liu M, Fang Z X, et al. In vitro antioxidant effects and cytotoxicity of polysaccharides extracted from *Laminaria japonica*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 50(5): 1254-1259.
- [7] Son E H, Moon E Y, Rhee D K, et al. Stimulation of

- various functions in murine peritoneal macrophages by high mannuronic acid-containing alginate (HMA) exposure *in vivo*[J]. *International Immunopharmacology*, 2001, 1(1): 147-154.
- [8] 常巧玲, 孙建义. 海藻饲料资源及其在水产养殖中的应用研究[J]. *饲料工业*, 2006, 27(2): 62-64.
Chang Q L, Sun J Y. Seaweed feed resource and its application research in aquiculture[J]. *Feed Industry*, 2006, 27(2): 62-64 (in Chinese).
- [9] 刘立鹤, 董爱华, 周永奎, 等. 饲料中不同水平海带粉对凡纳对虾生长及饲料表观消化率的影响[J]. *广东农业科学*, 2006(2): 72-74.
Liu L H, Dong A H, Zhou Y K, *et al.* Effect of dietary levels of kelp meal on the growth and digestibility of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2006(2): 72-74 (in Chinese).
- [10] 张汉华, 李敏, 朱长波, 等. 不同饵料对黑鮪幼鮪生长及存活的影响[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(6): 903-910.
Zhang H H, Li M, Zhu C B, *et al.* Effects of different diets on growth and survival rate of juvenile black abalone, *Haliotis discus hannai* Ino ♀× *Haliotis discus discus* Ino ♂[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(6): 903-910 (in Chinese).
- [11] 董学兴, 吕林兰, 王爱民, 等. 海带对异育银鲫生长性能、表观消化率、体成分及非特异性免疫的影响[J]. *水产科学*, 2011, 30(9): 543-546.
Dong X X, Lv L L, Wang A M, *et al.* Effect of dietary kelp *Laminaria japonica* on growth performance, apparent digestibility, body composition and non-specific immune indices in allogynogenetic crucian carp[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(9): 543-546 (in Chinese).
- [12] 卢荭虹. 海带多糖的分离纯化、结构特性及在卷烟中应用研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
Lu J H. Purification and structural characteristics of polysaccharide from *Laminaria japonica* and its application in cigarette[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013 (in Chinese).
- [13] Mohd Subakir F N, Ishak N I, Abu Samah N, *et al.* The effects of seaweed-based pellet binders on growth performance, feed efficiency and carcass characteristics in broilers[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2021, 272: 114786.
- [14] 潘训彬, 洗健安, 寇红岩, 等. 水产饲料诱食剂研究[J]. *饲料工业*, 2014, 35(14): 14-18.
Pan X B, Xian J A, Kou H Y, *et al.* Research progress on feed attractant for aquatic animals[J]. *Feed Industry*, 2014, 35(14): 14-18 (in Chinese).
- [15] 王亮. 部分大型海藻 DMSP 含量的检测 [D]. 苏州: 苏州大学, 2012.
Wang L. The detection of DMSP concentration in some common seaweeds[D]. Suzhou: Soochow University, 2012 (in Chinese).
- [16] 李文武. 海带粗多糖对斜带石斑鱼血清指标和肠道功能的影响 [D]. 福州: 福建农林大学, 2015.
Li W W. Effects of laminaria polysaccharide on the serum parameters and intestinal function of *Epinephelus coioides*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2015 (in Chinese).
- [17] 杨晴, 杨锐, 周歧存, 等. 褐藻糖胶对黄颡鱼幼鱼生长性能和消化酶活性的影响[J]. *动物营养学报*, 2014, 26(7): 1880-1887.
Yang Q, Yang R, Zhou Q C, *et al.* Effects of fucoidan on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(7): 1880-1887 (in Chinese).
- [18] Baumgart D C, Dignass A U. Intestinal barrier function[J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2002, 5(6): 685-694.
- [19] Yan G L, Guo Y M, Yuan J M, *et al.* Sodium alginate oligosaccharides from brown algae inhibit *Salmonella enteritidis* colonization in broiler chickens[J]. *Poultry Science*, 2011, 90(7): 1441-1448.
- [20] Lynch M B, Sweeney T, Callan J J, *et al.* The effect of dietary *Laminaria*-derived laminarin and fucoidan on nutrient digestibility, nitrogen utilisation, intestinal microflora and volatile fatty acid concentration in pigs[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(3): 430-437.
- [21] Ikegami S, Tsuchihashi F, Harada H, *et al.* Effect of viscous indigestible polysaccharides on pancreatic-biliary secretion and digestive organs in rats[J]. *The Journal of Nutrition*, 1990, 120(4): 353-360.
- [22] Caspary W F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1992, 55(1 Suppl): 299-308.

- [23] Shibata H, Iimuro M, Uchiya N, *et al.* Preventive effects of cladosiphon fucoidan against *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils[J]. *Helicobacter*, 2003, 8(1): 59-65.
- [24] 郭晓波, 邹田德, 杨晋, 等. 海藻多糖对仔猪小肠上皮细胞紧密连接蛋白及核转录因子- κ B信号通路相关基因表达的影响[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(6): 2816-2823.
- Guo X B, Zou T D, Yang J, *et al.* Effects of seaweed polysaccharides on expression of tight junction protein and related genes in nuclear transcription factor- κ B signaling pathway in porcine epithelial cells[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(6): 2816-2823 (in Chinese).
- [25] 李艳, 孙文星, 徐春瑛, 等. NCOA2核心启动子甲基化分析及其与肾周和皮下脂肪组织差异表达的关系[J]. *南京农业大学学报*, 2014, 37(4): 131-136.
- Li Y, Sun W X, Xu C Y, *et al.* NCOA2 core promotor methylation and its differential expression profile in perirenal and subcutaneous fat tissue[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2014, 37(4): 131-136 (in Chinese).
- [26] 常永生. KLF12在脂代谢中的相关作用 [C]//第11届全国脂质与脂蛋白学术会议论文汇编. 太原: 中国生物化学与分子生物学会, 2012.
- Chang Y S. The related role of KLF12 in lipid metabolism[C]//National Lipid and Lipoprotein Academic Conference. Taiyuan: The Chinese Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2012 (in Chinese).
- [27] 姜彬, 陈盛, 王元. 1, 25-二羟维生素D3的免疫学作用及其临床应用[J]. *现代免疫学*, 2010, 30(1): 85-88.
- Jiang B, Chen S, Wang Y. The immunological effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and its clinical application[J]. *Current Immunology*, 2010, 30(1): 85-88 (in Chinese).
- [28] Macpherson A J, Hunziker L, McCoy K, *et al.* IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms[J]. *Microbes and Infection*, 2001, 3(12): 1021-1035.
- [29] Foster J D, Pederson B A, Nordlie R C. Glucose-6-phosphatase structure, regulation, and function: an update[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 1997, 215(4): 314-332.
- [30] Van de Werve G, Lange A, Newgard C, *et al.* New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(6): 1533-1549.
- [31] 徐晶, 梁旭方, 蔡文静, 等. 草鱼3个6-磷酸葡萄糖酶催化亚基的基因表达分析及高糖饲料对其表达的影响[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(1): 24-34.
- Xu J, Liang X F, Cai W J, *et al.* Gene expression analysis of three 6-phosphoglucose catalytic subunits in grass carp and the effects of a high carbohydrate diet on gene expression[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(1): 24-34 (in Chinese).
- [32] Lucie M, Dai W W, Stéphane P, *et al.* The five *glucose-6-phosphatase* paralogous genes are differentially regulated by insulin alone or combined with high level of amino acids and/or glucose in trout hepatocytes[J]. *Molecular Biology Reports*, 2016, 43(4): 207-211.
- [33] 于竹芹, 帅莉, 李晓丹, 等. 海带多糖对糖尿病小鼠胰岛素受体表达的影响[J]. *青岛大学医学院学报*, 2015, 51(2): 141-145.
- Yu Z Q, Shuai L, Li X D, *et al.* Effect of saccharina japonica polysaccharide on the expression of insulin receptor in diabetic mice[J]. *Acta Academiae Medicinae Qingdao Universitatis*, 2015, 51(2): 141-145 (in Chinese).

Effects of *Saccharina japonica* enzymatic hydrolysis extract on the growth and hepatopancreas transcriptome of *Ictalurus punctatus*

LÜ Hao¹, YE Yuantu^{1*}, YI Haoming¹, SUN Fei¹, SHI Yaoyao¹,
LÜ Bin¹, ZHOU Wei², JIANG Rong³

(1. Key Laboratory of Aquatic Animal Nutrition of Jiangsu Province, School of Basic Medicine and Biological Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China;

2. Shandong Rongcheng Hongde Marine Biological Technology Co., Ltd, Rongcheng 264300, China;

3. Wuxi Sanzhi Biotechnology Co., Ltd., Wuxi 214000, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of kelp enzymatic extract on the growth and hepatopancreas transcriptome of *Ictalurus punctatus*. We prepared different diets with enzymatic extract of kelp addition amount of 0 g/kg (S), 0.3 g/kg (KP3), 0.5 g/kg (KP5), 1.0 g/kg (KP10), 1.5 g/kg (KP15), 2.0 g/kg (KP20) to feed channel catfish in cage-culture for 60 days. Channel catfish [initial body weight (51.18±1.14)g] as experimental object were randomly divided into 6 groups with 3 replicates per group and 40 individuals per replicate. The results showed that: ① Compared with the control group S, the addition of kelp enzymatic extract in diet had no significant effect on the survival rate (SR) of channel catfish, the specific growth rate (SGR) increased by 1.20% to 5.39%, and the feed coefficient rate (FCR) decreased by -0.83% to 9.09%. A quadratic polynomial regression analysis was carried out with SGR and FCR as the targets respectively, and the optimal addition amount of kelp enzymatic hydrolysis extract in the feed was 0.98 and 0.96 g/kg. The condition factor (CF) and viscero-somatic index (VSI) decreased significantly in groups KP10 to KP20, and the hepatosomatic index (HSI) decreased significantly in group KP10. The moisture, crude fat, crude protein and ash of fish had no significant difference in all groups. ② Height of duplicature in group KP3, height and width of duplicature and thickness of muscularis in group KP5, thickness of muscularis in group KP10 were all significantly higher than those in group S. ③ Total RNA was extracted from S and KP10 groups' hepatopancreas. Transcriptome sequencing results showed that there were 81 significantly down-regulated genes and 199 up-regulated genes. GO functional classification analysis results indicated that differentially expressed genes (DEGs) were annotated to items such as DNA transcription, metal ion binding, membrane and membrane composition. According to the results of KEGG pathway analysis, we found that DEGs were mainly enriched in 12 related pathways including cell proliferation and differentiation, hormone regulation, lipid metabolism, carbohydrate metabolism, growth factor metabolism and so on. Our studies have indicated that adding kelp enzymatic extract to diet can promote the growth of *I. punctatus*, reduce feed coefficient, and have positive effects on the intestinal morphology and the glucose and lipid metabolic capability of liver and pancreas. The suitable addition amount was 0.96-0.98 g/kg.

Key words: *Ictalurus punctatus*; kelp enzymatic hydrolysis extract; growth; hepatopancreas transcriptome

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

Funding projects: Effect of Kelp Enzymatic Hydrolysis Extract on the Growth of *Ictalurus punctatus* and the Damage Repair of Oxidized Soybean Oil (P113401819); Key Special Project of National Key R & D Program "Blue Granary Scientific and Technological Innovation" (2019YDF09000200)