



人工诱导星康吉鳗卵巢发育主要组织脂质代谢分析

王桂香¹, 李 慷^{1,2,3*}, 刘如聪¹, 姜之信¹,
巴旭冰¹, 宋宗诚⁴, 刘利平^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

4. 威海圣航水产科技有限公司, 山东 威海 264319)

摘要: 为分析人工诱导星康吉鳗卵巢发育组织脂质代谢, 实验使用超高效液相色谱四极杆轨道阱质谱 (UHPLC/Q-Orbitrap MS) 对人工诱导星康吉鳗卵巢发育不同时期肝脏、卵巢、肌肉和血浆进行了脂质组学分析, 并测定了肝脏代谢酶活。对不同发育阶段星康吉鳗组织脂质成分分析结果显示, 在肝脏、肌肉、卵巢和血浆中各鉴定出 68、27、63 和 212 种脂质标志物, 主要包括磷脂酰丝氨酸 (PS)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰胆碱 (PC)、甘油三酯 (TG) 和鞘磷脂 (SM) 等。4 种组织中 TG、甘油二酯 (DG) 和神经酰胺 (Cer) 等脂类物质在发育过程中呈现出不同的变化趋势。肝脏代谢中, 脂肪酸合成酶、肝脂酶和脂蛋白脂酶浓度呈现先升高后降低的过程, 主要参与了 TG、磷脂和脂肪酸的代谢。研究表明, 星康吉鳗卵巢发育过程中主要组织的 TG、磷脂发生了不同程度的变化, 脂质代谢相关酶活性变化也与脂质代谢特征相对应。

关键词: 星康吉鳗; 脂质转化; 脂质组学; 脂质代谢

中图分类号: Q 493.5; S 965

文献标志码: A

星康吉鳗 (*Conger myriaster*) 属于鳗鲡目 (Anguilliformes) 康吉鳗科 (Congridae) 康吉鳗属 (*Conger*), 是我国东海、渤海等近海常见鱼类^[1]。随着海洋鱼类的过度捕捞以及海洋环境的污染, 星康吉鳗的数量在逐渐减少, 野生资源面临枯竭的风险, 由于星康吉鳗的生活史复杂, 对其研究主要集中在资源调查、捕捞和生态研究等方面^[2-5]。至今, 星康吉鳗尚未实现全人工繁殖, 也未建立稳定的人工养殖模式, 市场供给仍依靠野生星康吉鳗的捕捞, 制约了产业的健康发展^[6]。

脂质为鱼类胚胎发育卵黄物质的主要营养成

分, 是胚胎、仔鱼发育过程主要的代谢能源^[7]。甘油磷脂是生物膜的主要成分, 有多种分类, 其中磷脂酰胆碱 (PC) 是鱼类性腺中的主要能量物质, 在生殖细胞分化、胚胎发育和仔鱼存活方面有重要作用^[7-9]。作为脂蛋白的重要组成成分, 胆固醇可以促进脂质的吸收和运输, 是参与生殖的类固醇激素的前体, 能够促进性腺发育^[10]。为研究性腺发育期间的关键脂质变化及其作用, 脂质组学分析的技术和方法逐渐应用于相关鱼类研究中^[11-12]。Li 等^[8]对许氏平鲉 (*Sebastes schlegelii*) 性腺生殖周期进行了脂质组学研究, 发现脂质主要

收稿日期: 2021-10-26 修回日期: 2022-02-26

资助项目: 上海市科技兴农技术创新项目 (2020-02-08-00-10-F01471); 国家自然科学基金 (32072994); 上海海洋大学科技发展专项

第一作者: 王桂香 (照片), 从事鱼类繁殖生物学研究, E-mail: 1565981764@qq.com

通信作者: 李慷, 从事鱼类繁殖生物学研究, E-mail: kli@shou.edu.cn;

刘利平, 从事鱼类繁殖生物学研究, E-mail: lp-liu@shou.edu.cn



富集在 4 条显著差异的甘油磷脂代谢途径, 为进一步了解硬骨鱼性腺发育过程中的物质代谢和调控提供了基础。在研究雌性和雄性日本皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 营养价值差异时, 通过脂质组学分析了不同组织中脂质的变化, 为评价两者的营养价值提供了参考^[13]。Wang 等^[14]对中间球海胆 (*Strongylocentrotus intermedius*) 的脂质组学研究首次证明了海胆的脂质组学图谱, 突出了脂质分子的显著差异, 确定了主要脂质类别为雌性 PC(19 种) 和雄性 TG(11 种), 为进一步研究水产动物脂肪酸合成和代谢提供了更加可靠和完善的生物标志物。

脂质代谢在动物性腺发育进程中具有至关重要的作用, 如参与细胞分化、分裂和迁移等^[15]。鱼类的脂质代谢过程涉及不同组织和器官, 如肌肉、肝脏和性腺, 同时, 肝脏是鱼类脂肪代谢的重要功能器官, 参与脂类的合成、分解和运输, 并为性腺发育提供所需能量和物质^[16]。脂肪酸合成酶 (FAS) 是肝脏中脂质代谢的关键酶, 参与脂肪酸的合成; 肝脂酶 (HL) 和脂蛋白脂酶 (LPL) 统称为总脂酶, 是鱼肝脏脂肪降解的关键酶, HL 在肝细胞中合成, 可作为配体促进低密度脂蛋白和乳糜微粒残余物进入肝细胞, 同时参与中密度脂蛋白和高密度脂蛋白的代谢^[17-19]。在观察长期温度胁迫对鲤 (*Cyprinus carpio*) 脂质代谢的影响中, 发现肝脏、脑、心脏和肌肉中甘油三酯 (TG) 水平和 HL 活性呈负相关^[20]。

脂质作为星康吉鳗的重要内源物质之一, 其转化与性腺发育和卵子的质量密切相关。目前对星康吉鳗卵巢发育过程中的营养需求和脂质调节过程研究有限, 开展相关研究对于优化人工繁殖策略具有重要意义。实验利用脂质组学分析方法, 分析了星康吉鳗雌鳗卵巢发育过程中主要组织脂质代谢的变化, 筛选与卵巢发育密切相关的脂质标志物, 探讨关键脂质的流动与转化, 为提高星康吉鳗卵巢发育和卵子质量提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

星康吉鳗购于威海圣航水产科技有限公司。挑选 60 尾健康活力好、体重 (658 ± 160) g 的星康吉鳗作为雌性亲本。养殖于 3 个直径为 1.5 m 的圆形循环水桶中 (水深 1 m), 每个桶中养殖

20 尾, 循环海水养殖, 桶上用遮阳网布遮光, 养殖水温为 (17 ± 2) °C, 海水盐度为 30 ± 1 。实验过程中操作人员严格遵守实验动物伦理规范, 并按照上海海洋大学实验动物伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 星康吉鳗人工催熟与样品采集

雌性星康吉鳗采用注射外源激素人工促熟。外源激素为人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG, 100 IU/kg), 鲤脑垂体 (carp pituitary extract, CPE, 2 颗/kg)。注射液为脑垂体经研钵磨碎后加入生理盐水与 HCG 的混合液, 采用肌肉注射, 每周促熟 1 次。在首次注射前随机采样 6 尾作为对照, 然后每 2 周采样 1 次。采样时, 星康吉鳗使用麻醉剂 (MS-222) 麻醉后, 称重和测量生物学指标, 采集肝脏、卵巢和肌肉, 采集血液样本加入肝素钠 2 000~3 000 r/min 离心 10 min 后收集血浆, 将样品存放于无菌无酶的 2 mL 冻存管放入液氮罐速冻, 于 -80 °C 保存, 备用。

1.3 卵巢组织学观察

星康吉鳗使用 MS-222 麻醉后, 在解剖盘上用手术剪从泄殖孔开始, 沿雌鳗腹中线剪开至胸腔下方, 采集到卵巢在 Bouin 氏液固定, 经 30%~100% 的乙醇梯度脱水, 二甲苯透明 8~12 min, 将组织浸蜡后包埋于石蜡中, 冷却 2~3 h 后切成 6~8 μ m 厚的石蜡切片 (1508A, 石家庄科迪药业有限公司), 苏木精-伊红 (H.E) 染色染色, 在乙醇溶液进行切片脱水, 经透明和中性树脂封片后在光学显微镜 (Nikon Eclipse 55i) 下观察, 通过 Nikon DS-Ri1 进行拍照, 并根据 Utoh 等^[21]所确定的方法划分星康吉鳗卵巢发育阶段。

1.4 样品处理及脂质组学分析

星康吉鳗 6 个发育阶段每个阶段每种组织各取 6 个样本进行前处理, 每个样本称取 30 mg 组织后加入 1 mL 甲醇水溶液 (4:1), 冷却后使用研磨仪研磨 (70 Hz, 2 min), 超声提取 10 min 后于 -20 °C 静置 30 min, 低温离心 (12 000 r/min, 20 min, 4 °C) 后取经 0.22 μ m 有机系滤膜过滤的上清液进行超高效液相色谱四极杆轨道阱质谱 (UHPLC/Q-Orbitrap MS) 检测。同样, 取 100 μ L 血浆样本, 加入 400 μ L 甲醇水溶液, 超声提取 10 min 后于 -20 °C 静置 30 min, 低温离心后 (12 000 r/min, 20 min, 4 °C) 取经滤膜过滤的上清液进行

UHPLC/Q-Orbitrap MS 检测。实验过程中, 每个样本分别取 2 μL 组织样本和血浆样本的上清液, 混合制得质量控制 (quality control, QC) 样本。

色谱条件 色谱柱为 Thermo Synchronis C18 色谱柱 (100 mm $\times$ 3 mm, 1.7 μm), 流动相 A 为乙腈: 水 (60: 40, 体积比), 溶液含 10 mmol/L 甲酸铵, 流动相 B 为乙腈: 异丙醇 (10: 90, 体积比), 溶液含 10 mmol/L 甲酸铵; 柱温 60 $^{\circ}\text{C}$, 进样器温度 10 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 5 μL , 流速 0.4 mL/min。

质谱条件 可加热的电喷雾离子源 (HESI), 正负切换扫描模式; 全扫描/数据依赖的二级扫描模式 (Full MS-ddMS²) 扫描模式, 扫描范围 135~2 000 m/z; 全扫描 (Full MS) 分辨率 70 000, 二级扫描 (ddMS²) 分辨率 17 500; 喷雾电压 3 kV, 鞘气流速为 15 L/min, 辅助气 (N₂) 流速为 2 L/min; 离子传输管温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管温度 320 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.5 酶活检测

肝脏中脂肪酸合成酶 (FAS)、肝脂酶 (HL) 和脂蛋白脂酶 (LPL) 活性采用上海酶联生物科技有限公司生产的酶联免疫 (ELISA) 试剂盒进行检测, 每个时期各取 6 个样本, 每个样本准确称取 0.1 g 肝脏组织, 按照 1: 9 的比例加入磷酸盐缓冲溶液 (PBS) (pH 7.2~7.4) 在研磨仪中进行匀浆, 2 000~3 000 r/min 离心 20 min 后收集上清液, 按照说明书操作步骤进行检测, 每个样本重复测 3 次。

1.6 数据处理

实验数据使用 EXCEL 处理, 结果以平均值 $\pm$ 标准差方式表示, 使用 SPSS 22.0 软件对各组数据之间进行统计分析, 显著水平为 $P<0.05$ 。脂质组学原始数据通过液质分析软件 Progenesis Q1 (Waters Corporation, Milford, 美国) 处理, 获得包含保留时间、质荷比和峰强度的数据矩阵, 剔除丢失 80 % 数据峰, 保留至少一组样品中非零值 80 % 以上的变量, 进行填补空缺值 (原始矩阵中最小值填补空缺值)。将样本质谱峰的响应强度进行总和归一化后的数据导入脂质组学数据处理软件 SIMCA-14.1 (Umetrics) 进行多元统计变量分析, 经主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (Orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 使用 200 次置换检验来评估模型的可靠程度。将数据进行 t 检验和差异倍数 (fold change, FC) 分析,

结合 OPLS-DA 模型得到的变量投影重要性指标 (variable importance in the projection, VIP), 确定显著差异脂质, 其中 $\text{VIP}>1$ 、 $P<0.05$ 的脂类物质为显著差异脂质。使用 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)、LIPIDMAPS (<http://www.lipidmaps.org/>) 和 MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 等在线数据库确认差异脂类物质的结构以及脂质标志物。

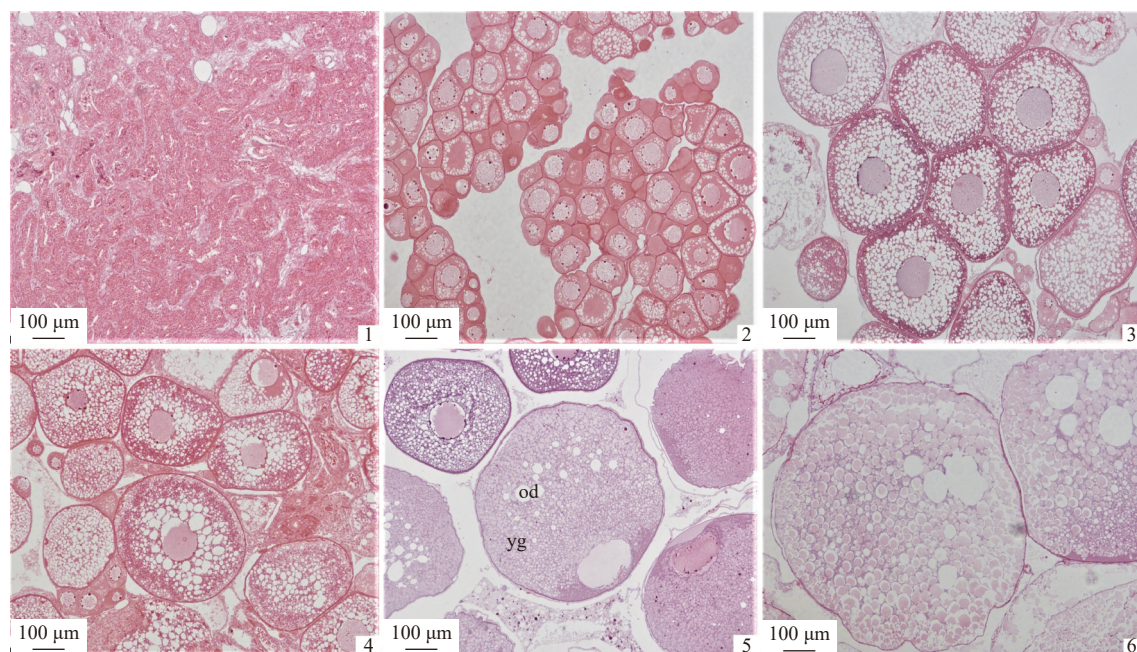
2 结果

2.1 星康吉鳗卵巢发育

处于 6 个不同发育时相的星康吉鳗卵巢细胞, 通过显微观察发现卵巢中卵巢细胞基本上都处于同一时期 (图版)。图版-1 为染色质核仁阶段, 细胞体积小 [(5.23 $\pm$ 0.33) mm] 排列紧密, 细胞核占据了大部分细胞; 图版-2 为脂滴阶段, 细胞直径增大 [(183.06 $\pm$ 79.42) mm], 空泡状的脂滴分布在细胞质中; 图版-3 为初级卵黄球阶段, 细胞体积较大 [(288.79 $\pm$ 49.13) mm], 脂滴布满整个细胞质, 卵黄球出现在卵巢细胞外围; 图版-4 为次级卵黄球阶段, 卵巢细胞直径继续增加 [(385.50 $\pm$ 73.76) mm], 卵黄球数量增多, 占据了大部分细胞质; 图版-5 为核迁移阶段, 卵巢细胞直径继续增大 [(621.07 $\pm$ 58.91) mm], 细胞核移至细胞一侧, 脂滴和卵黄球形态变大; 图版-6 为成熟期, 卵细胞直径达到最大值 [(684.95 $\pm$ 18.36) mm], 生发泡破裂, 脂滴融合, 卵黄球大小增加。

2.2 不同发育阶段主要组织脂质组学分析

脂质组学数据经 PCA 分析后, 根据样本分离情况以及卵巢发育程度, 将实验样本划分为卵巢发育早期、中期、后期进行后续的数据处理 ($n=36$)。星康吉鳗卵巢不同发育阶段 4 种组织 OPLS-DA 分析如图 1 所示, 得分图中不同发育阶段样品明显分离, 肝脏正离子模式 (ESI⁺) (图 1-a): $R^2Y=0.95$, $Q^2=0.76$, 负离子模式 (ESI⁻) (图 1-b): $R^2Y=0.70$, $Q^2=0.60$; 肌肉 ESI⁺ (图 1-c): $R^2Y=0.91$, $Q^2=0.71$, ESI⁻ (图 1-d): $R^2Y=0.98$, $Q^2=0.71$; 卵巢 ESI⁺ (图 1-e): $R^2Y=0.98$, $Q^2=0.96$, ESI⁻ (图 1-f): $R^2Y=0.78$, $Q^2=0.72$; 血浆 ESI⁺ (图 1-g): $R^2Y=0.86$, $Q^2=0.72$, ESI⁻ (图 1-h): $R^2Y=0.91$, $Q^2=0.69$; R^2Y 表示模型解释能力, Q^2 表示模型的预测能力, R^2Y 和 Q^2 越接近 1 说明模型的稳定性和预测性越好, 数据表明, 本实验建立的模型具有较高的可



图版 星康吉鳗不同发育时期卵巢组织学特征

1. 染色质核仁阶段, 2. 脂滴阶段, 3. 初级卵黄球阶段, 4. 次级卵黄球阶段, 5. 核迁移阶段, 6. 成熟期; od. 脂滴, yg. 卵黄球。

Plate Histological characteristics of ovaries in different developmental stages of *C. myriaster*

1. chromatin nucleolus stage, 2. oil droplet stage, 3. primary yolk globule stage, 4. secondary yolk globule stage, 5. migratory nucleus stage, 6. maturation stage; od. oil drop, yg. yolk globule.

靠性。

2.3 卵巢发育相关脂质标志物的鉴定

在肝脏、肌肉、性腺和血浆中分别鉴定出 68、27、63 和 212 个脂质标志物, 主要包括磷脂酰丝氨酸 (PS)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰肌醇 (PI)、磷脂酰胆碱 (PC)、甘油磷脂酸 (PA)、磷脂酰甘油 (PG)、甘油三酯 (TG)、鞘磷脂 (SM)、甘油二酯 (DG)、神经酰胺 (Cer)、心磷脂 (CL)、胆固醇酯 (CE) 和脂肪酸 (FFA)(表 1)。星康吉鳗性腺发育过程中肝脏 CL、DG、Cer、PA 的含量先上调至中期含量最高后下调, PE、SM、PC 含量逐渐上调至后期含量最高, PI、TG、PS 在早期含量最高(图 2-a); 肌肉中 TG 含量在后期下调, 而 PI、PC、PE 含量在后期上调(图 2-b); 卵巢中 PI、PC、PE 含量在发育过程中逐渐上调, PG、Cer 含量先上调后下调, TG、SM 在早期含量最高(图 2-c); 血浆中 Cer、SM、PC、PE 含量逐渐下调, TG、CE 含量先上调后下调, PS 含量逐渐上调, PI 含量先上调后下调(图 2-d)。

2.4 肝脏中脂质代谢相关酶活性变化

肝脏组织中脂肪酸合成酶 (FAS) 活性呈现先

升高后降低的趋势, 在初级卵黄球阶段 $[(407.65 \pm 11.20) \text{ U/L}]$ 达到最大值后一直保持在较高水平, 在成熟期 $[(381.99 \pm 6.53) \text{ U/L}]$ 较初级卵黄球阶段出现显著下降趋势 ($P < 0.05$)(图 3-a)。肝脏组织中肝脂酶 (HL) 活性呈现先升高后降低的趋势, 在初级卵黄球阶段 $[(277.75 \pm 10.57) \text{ U/L}]$ 达到最大值后一直保持在较高水平, 在成熟期 $[(257.68 \pm 9.71) \text{ U/L}]$ 较脂滴阶段出现下降趋势, 但没有显著差异(图 3-b)。肝脏组织中脂蛋白脂酶 (LPL) 活性呈现先升高后降低的趋势, 在核迁移阶段 $[(378.76 \pm 15.18) \text{ U/L}]$ 达到最大值后下降 ($P < 0.05$)(图 3-c)。

3 讨论

甘油三酯和磷脂是生物生殖腺的主要脂类组分, 并为其后代胚胎发育和开口前的幼体发育提供能量, 也是鱼类主要的能量储存形式^[22-23]。本研究中随着性腺发育 TG 的含量在肝脏、肌肉、性腺和血浆中逐渐下调, 推测其主要功能是为星康吉鳗性腺发育供给能源, 这与 Wang 等^[24]对于不同发育阶段捻转血矛线虫 (*Haemonchus contortus*) 脂质研究结果一致。李磊等^[23]通过研究中球海胆 (*Strongylocentrotus intermedius*) 繁殖前后

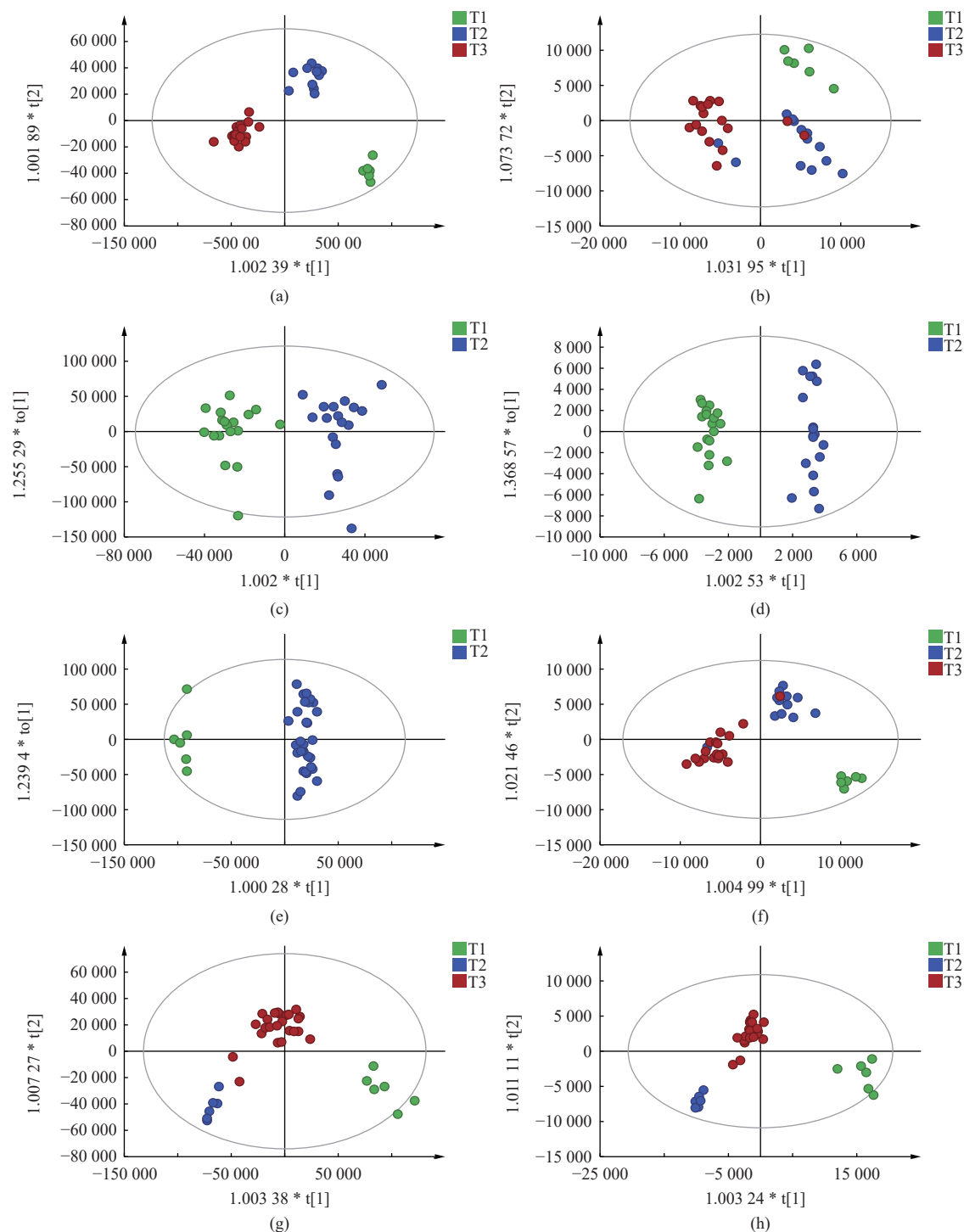


图 1 不同发育阶段主要组织 OPLS-DA 分析

(a) 肝脏 (ESI+), (b) 肝脏 (ESI-), (c) 肌肉 (ESI+), (d) 肌肉 (ESI-), (e) 卵巢 (ESI+), (f) 卵巢 (ESI-), (g) 血浆 (ESI+), (h) 血浆 (ESI-); T1. 早期, T2. 中期, T3. 后期, 图中每一个点表示一个独立的样本, 不同颜色表示不同的分组, 横坐标表示预测主成分的回归系数权重大小, 纵坐标表示正交主成分的回归系数权重大小; 下同。

Fig. 1 OPLS-DA analysis of main tissues at different developmental stages

(a) liver (ESI+), (b) liver (ESI-), (c) muscle (ESI+), (d) muscle (ESI-), (e) ovary (ESI+), (f) ovary (ESI-), (g) plasma (ESI+), (h) plasma (ESI-); T1. early, T2. middle, T3. late, each point in the figure represents an independent sample, different colors represent different groups, the abscissa represents the weight of the regression coefficient of the predicted principal component, and the ordinate represents the weight of the regression coefficient of the orthogonal principal component; the same below.

表 1 不同组织中脂类标志物数量

Tab. 1 The number of lipid markers in different kinds of samples ($n = 36$)

样品种类 sample	PS	PE	PI	PC	PA	PG	TG	SM	DG	Cer	CL	CE	FFA	总计 total
肝脏 liver	3	15	2	15	1	1	20	1	1	3	5		1	68
肌肉 muscle		10	3	4			9						1	27
卵巢 ovary	2	26	4	15		1	5	4		3			3	63
血浆 plasma	3	72	8	87			23	13		2		1	1	212

注: PS. 磷脂酰丝氨酸, PE. 磷脂酰乙醇胺, PI. 磷脂酰肌醇, PC. 磷脂酰胆碱, PA. 甘油磷脂酸, PG. 磷脂酰甘油, TG. 甘油三酯, SM. 鞘磷脂, DG. 甘油二酯, Cer. 神经酰胺, CL. 心磷脂, CE. 胆固醇酯, FFA. 脂肪酸; 下同。

Notes: PS. phosphatidylserine, PE. phosphatidylethanolamine, PI. phosphatidylinositol, PC. phosphatidylcholine, PA. phosphatidic acid, PG. phosphatidylglycerol, TG. triglycerides, SM. sphingomyelin, DG. diglyceride, Cer. ceramide, CL. cardiolipin, CE. cholesteryl ester, FFA. free fat acid; the same below.

性腺中脂类和脂肪酸含量的变化, 发现可以在海胆繁殖前 1~2 个月在饲料中添加磷脂、游离脂肪酸、甘油三酯等物质, 以促进海胆性腺发育, 这一结果能够为星康吉鲷营养强化过程中添加甘油三酯等物质提供一定的参考作用。

磷脂是一类含有磷酸基团的脂类, 主要参与细胞膜系统的组成, 包括磷脂酰甘油 (PG)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰胆碱 (PC) 等^[25]。PC 对大脑、心脏、肝脏等新陈代谢活动具有重要作用, 同时也是卵母细胞和受精卵的内源营养来源^[26]。硬骨鱼的营养物质通常以 PC 和 PE 的形式储存在油球中, 本研究卵巢中 PC 含量在发育过程中逐渐上调, 这与 Meng 等^[9]在鸡胚胎发育过程中卵黄囊脂质组学研究结果相似。在卵巢成熟过程中, 卵黄颗粒开始融合, 部分 PE 转化为花生四烯酸, 进一步刺激卵巢内类固醇的合成, 促进卵母细胞的最终成熟, PE 对于细胞膜的完整性和细胞分裂的重要作用也已被证实^[27]。本实验中肝脏、肌肉和卵巢的 PE 含量在性腺成熟期均处于较高水平, 虽与已报道的许氏平鲉性腺发育期间的性腺脂质组学特征相反^[8], 但与人工促熟过程中日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 的肌肉、肝脏、卵巢和卵的脂肪含量和脂肪酸组成变化相似^[28], 推测是由于人工注射促熟激素影响了脂质的运输。作为脂质代谢的中间产物, 磷脂酰丝氨酸 (PS) 参与了生长发育的信号调节, 可为其他脂质的合成提供资源^[29]。本实验中, 肝脏的 PS 含量逐渐下调, 维持了肝脏中 PC 等脂类物质的水平, 为卵巢的发育提供营养; 而血浆中 PS 的含量变化则与之相反, 这与许氏平鲉性腺发育期间的变化一致^[8]。卵母细胞最终成熟时, 磷脂被用于能量代谢, 本研究中卵巢鞘磷脂 (SM) 含量逐渐下调, 而 SM 是细胞膜的主

要组成成分, 可作为第一和 (或) 第二信使调控细胞的生长、分化、衰老和凋亡等许多重要的信号转导过程^[30-31]。通过向水产饲料中添加磷脂, 已能够提高养殖对象的繁殖性能, 例如 Martins 等^[32]研究了磷脂微饲料对斑马鱼 (*Danio rerio*) 骨骼发育和繁殖性能的影响, 发现磷脂源可以提高斑马鱼的繁殖性能, 并对骨骼发育产生积极影响。此外, 通过投饲添加了鱼油和大豆卵磷脂的饲料, 显著提高了紫海胆 (*Anthocidaris crassispina*) 的性腺指数^[33]。因此, 本实验发现星康吉鲷发育后期其关键组织内磷脂含量处在较高水平, 为今后人工繁殖过程中的营养强化提供了参考。

脂肪酸合成酶 (FAS) 是内源性脂肪酸合成过程的关键酶, 能够催化乙酰辅酶 A 和丙二酸单酰辅酶 A 合成 TG^[34]。当 FAS 酶活力高时, 丙二醛 CoA 被催化成脂肪酸, 增加脂肪在体内的沉积^[35]。本实验 FAS 活性在初级卵黄球阶段达到最大值并保持在较高水平, 从而促进性腺中脂类物质的积累, 在性腺发育成熟期完成脂类物质积累后, 活性显著性下降, 这一研究结果与罗建学等^[36]在脂肪酸合成酶基因的研究进展中提出的观点一致。作为脂肪代谢的关键酶, 肝脂酶 (HL) 能够作用于大多数脂类物质^[37], 直接参与生物体内脂肪的代谢过程。HL 几乎能水解各类脂蛋白中的甘油三酯及磷脂等脂质, 对于肝脏中脂肪的分解和整个机体的脂质代谢有重要的作用^[38-39]。本研究中 HL 活性在脂滴阶段达到最大值后一直保持在较高水平, 推测主要是因为肝脏中磷脂和大部分甘油酯类物质在发育中后期上调需要大量的 HL, 而在成熟期物质调动减慢, 因此 HL 活性也随之下降, 这一结果与 Sun 等^[20]对鲤脂质代谢研究中的结果基本一致。脂蛋白脂酶 (LPL) 主要参与脂肪组织和肌肉的脂肪细胞中合成脂肪贮存或氧化供能的过程,

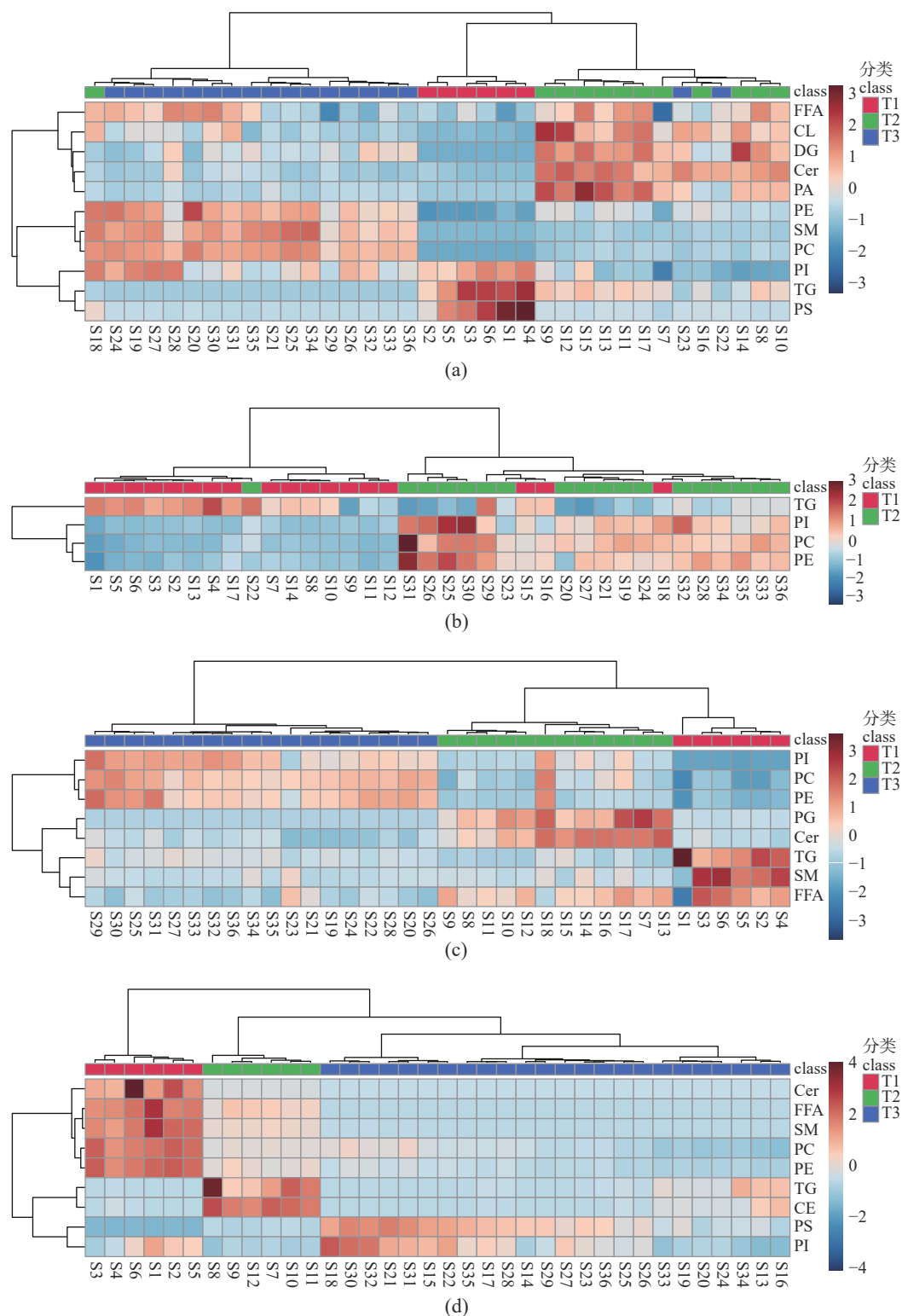


图 2 不同发育阶段主要组织脂质标志物相对含量热图

(a) 肝脏, (b) 肌肉, (c) 性腺, (d) 血浆; S1~S36 为实验样本编号; 横坐标为样本名称, 纵坐标为脂质名称, 图中颜色表示不同脂质相对含量的变化, 具体变化趋势请见右侧颜色条数字标注。

Fig. 2 Heat map of relative content of main tissues at different developmental stages

(a) liver, (b) muscle, (c) gonad, (d) plasma; S1-S36 are the experimental sample numbers; the abscissa coordinate is the sample name, the ordinate coordinate is the lipid name, the color in the figure indicates the change of the relative content of different lipids, and the specific change trend can be found in the color bar on the right side.

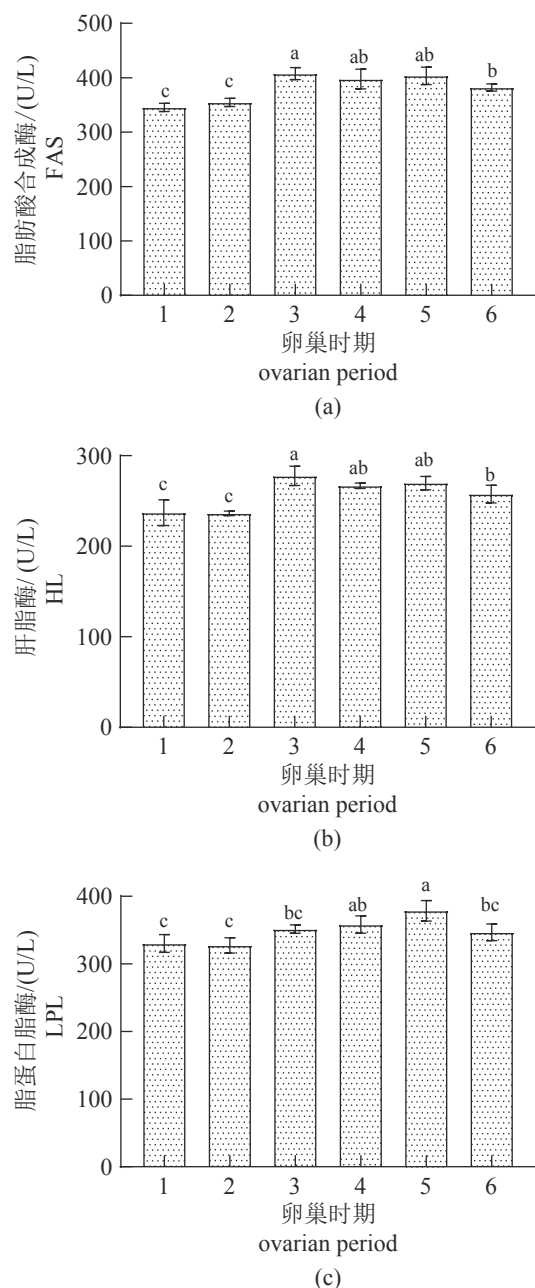


图3 星康吉鳗不同发育阶段肝脏脂质代谢相关酶活性

(a) 脂肪酸合成酶, (b) 肝脂酶, (c) 脂蛋白脂酶; 1. 染色质核仁阶段, 2. 脂滴阶段, 3. 初级卵黄球阶段, 4. 次级卵黄球阶段, 5. 核迁移阶段, 6. 成熟期; 横坐标表示卵巢发育时期, 纵坐标表示酶活性, 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 Activity of lipid metabolism related enzyme of liver from *C. myriaster* at different developmental stages

(a) fatty acid synthase enzyme, (b) liver lipase enzyme, (c) liver lipase enzyme; 1. chromatin nucleolus stage, 2. oil droplet stage, 3. primary yolk globule stage, 4. secondary yolk globule stage, 5. migratory nucleus stage 6. maturation stage; the abscissa represents the ovarian development period, and the ordinate represents the enzyme activity, different small letters superscripts mean significant differences ($P < 0.05$).

能够促进脂质等多种脂蛋白的转运, 同时催化甘油三酯分解成脂肪酸^[40-41]。实验中 LPL 活性在发育过程中先升高后降低, 在核迁移阶段达到最大值后下降, 作用机理与 HL 相似, 是脂肪分解与转运的关键酶, 从而促进肝脏中磷脂和大部分甘油酯类物质在发育中后期的上调, 这与周旋等^[42]在鱼类脂蛋白脂肪酶的研究进展中虹鳟卵巢发育过程中脂肪组织 LPL 活性降低, LPL 分解原质脂蛋白和卵黄蛋白来促进卵巢发育的研究结果一致。

本实验研究了人工催熟星康吉鳗卵巢发育过程中主要组织脂质代谢特征, 筛选出卵巢发育相关的脂类标志物, 并对整个发育过程中脂质代谢相关酶活性进行了评估。不同组织中脂类物质的变化以及相关酶活性趋势, 表明了营养强化过程中添加甘油三酯、磷脂类物质对星康吉鳗卵巢发育的必要性, 研究结果可以为星康吉鳗发育过程中营养需求和提高卵子的发育质量提供理论基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 李晓龙, 李慷, 汝高盟, 等. 不同激素组合对人工诱导星康吉鳗性成熟效果的比较 [J]. 上海海洋大学学报, 2021, 30(1): 29-38.
Li X L, Li K, Ru G M, *et al.* Comparative analysis of the effects of HCG and CPE combinations on the sexual maturation of common Japanese conger *Conger myriaster* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2021, 30(1): 29-38 (in Chinese).
- [2] 牟秀霞, 李明坤, 尹洁, 等. 山东半岛东南部海域星康吉鳗资源密度时空分布及其与环境因子之间关系 [J]. 水产学报, 2019, 43(8): 1759-1767.
Mu X X, Li M K, Yin J, *et al.* Relationship between spatio-temporal distribution of *Conger myriaster* and the environment factors in the southeast waters of Shandong Peninsula [J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(8): 1759-1767 (in Chinese).
- [3] 刘西方, 刘贺, 薛莹, 等. 海州湾星康吉鳗的摄食生态特征 [J]. 中国水产科学, 2015, 22(3): 517-527.
Liu X F, Liu H, Xue Y, *et al.* Feeding ecology of *Conger myriaster* in Haizhou Bay [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(3): 517-527 (in Chinese).
- [4] 田方. 山东近海星康吉鳗 (*Conger myriaster*) 延绳钓渔具性能研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
Tian F. Fishing efficiency of white-spotted conger

- longline fishing gear in Shandong Coastal Sea[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013 (in Chinese).
- [5] Utoh T, Horie N, Mikawa N, *et al.* Annual changes in ovarian development and plasma estradiol-17 β level in reared female common Japanese conger, *Conger myriaster*[J]. *Fisheries Science*, 2005, 71(1): 38-47,
- [6] 李晓龙. 星康吉鳗驯养及不同激素组合对人工诱导星康吉鳗性成熟效果的比较分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- Li X L. Comparative analysis of the effects of acclimation and different hormone combinations on the sexual maturation of common Japanese conger *Conger Myriaster*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [7] Cejas J R, Almansa E, Jérez S, *et al.* Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white seabream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 139(2): 209-216,
- [8] Li J S, Song M, Wen H S, *et al.* Gonadal lipidomics profile of an ovoviviparity teleost, black rockfish, during gonadal development[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2021, 47(4): 811-828,
- [9] Meng Y Q, Qiu N, Mine Y, *et al.* Comparative lipidomics of chick yolk sac during the embryogenesis provides insight into understanding the development-related lipid supply[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(26): 7467-7477,
- [10] Kumar V, Sinha A K, Romano N, *et al.* Metabolism and nutritive role of cholesterol in the growth, gonadal development, and reproduction of crustaceans[J]. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 2018, 26(2): 254-273,
- [11] Zehethofer N, Pinto D M. Recent developments in tandem mass spectrometry for lipidomic analysis[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 627(1): 62-70,
- [12] 刘虎威, 白玉. 脂质组学及其分析方法 [J]. *色谱*, 2017, 35(1): 86-90.
- Liu H W, Bai Y. Lipidomics and its analytical methods[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2017, 35(1): 86-90 (in Chinese).
- [13] Zhang Y Y, Qin L, Liu Y X, *et al.* Evaluation of lipid profile in different tissues of Japanese abalone *Haliotis discus hannai* Ino with UPLC-ESI-Q-TOF-MS-based lipidomic study[J]. *Food Chemistry*, 2018, 265: 49-56,
- [14] Wang H, Zhao W F, Ding B C, *et al.* Comparative lipidomics profiling of the sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2021, 40: 100900,
- [15] Yao Y, Ding L, Huang X. Diverse functions of lipids and lipid metabolism in development[J]. *Small Methods*, 2020, 4(7): 1900564,
- [16] 程汉良, 夏德全, 吴婷婷. 鱼类脂类代谢调控与脂肪肝 [J]. *动物营养学报*, 2006, 18(4): 294-298.
- Cheng H L, Xia D Q, Wu T T. Fatty liver and regulation of lipids metabolism in fish[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2006, 18(4): 294-298 (in Chinese).
- [17] Yang Q H, Ding M Y, Tan B P, *et al.* Effects of dietary vitamin A on growth, feed utilization, lipid metabolism enzyme activities, and fatty acid synthase and hepatic lipase mRNA expression levels in the liver of juvenile orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Aquaculture*, 2017, 479: 501-517,
- [18] Han C Y, Wen X B, Zheng Q M, *et al.* Effects of dietary lipid levels on lipid deposition and activities of lipid metabolic enzymes in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* $\times$ *O. aureus*)[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2011, 95(5): 609-615,
- [19] Guo J L, Zhou Y L, Zhao H, *et al.* Effect of dietary lipid level on growth, lipid metabolism and oxidative status of largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. *Aquaculture*, 2019, 506: 394-400,
- [20] Sun J L, Zhao L L, Cui C, *et al.* Influence of long-term temperature stress on respiration frequency, Na⁺/K⁺-ATPase activity, and lipid metabolism in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2019, 83: 165-171,
- [21] Utoh T, Horie N, Okamura A, *et al.* Oogenesis in the common Japanese conger *Conger myriaster*[J]. *Fisheries Science*, 2003, 69(1): 181-188,
- [22] Bennett P M, Weber L P, Janz D M. Comparison of chloroform-methanol-extracted and solvent-free triglyceride determinations in four fish species[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2007, 19(3): 179-185,
- [23] 李磊, 杨丹, 亓守冰, 等. 中间球海胆繁殖前后性腺中脂类和脂肪酸含量变化 [J]. *大连海洋大学学报*, 2018, 33(4): 423-429.
- Li L, Yang D, Qi S B, *et al.* Changes in lipids and fatty acids in gonads of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* before and after reproduction[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2018, 33(4): 423-429 (in Chinese).
- [24] Wang T, Nie S, Ma G X, *et al.* The developmental lipidome of *Haemonchus contortus*[J]. *International Journal for Parasitology*, 2018, 48(12): 887-895,
- [25] 刘艳青. 皱纹盘鲍地域及季节性差异分析及内脏磷脂减肥活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.

- Liu Y Q. Studies on the original and seasonal analysis of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) and anti-obesity activity of phospholipids from abalone viscera[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013 (in Chinese).
- [26] Smith R E, Fritz H, Rouchotas P. Lecithin (phosphatidylcholine): healthy dietary supplement or dangerous toxin?[J]. *The Natural Products Journal*, 2016, 6(4): 242-249.
- [27] Calzada E, Onguka O, Claypool S M. Phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease[J]. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2016, 321: 29-88.
- [28] Ozaki Y, Koga H, Takahashi T, *et al.* Lipid content and fatty acid composition of muscle, liver, ovary and eggs of captive-reared and wild silver Japanese eel *Anguilla japonica* during artificial maturation[J]. *Fisheries Science*, 2008, 74(2): 362-371.
- [29] Kim H Y, Huang B X, Spector A A. Phosphatidylserine in the brain: metabolism and function[J]. *Progress in Lipid Research*, 2014, 56: 1-18.
- [30] 蒋宪成. 鞘磷脂代谢与动脉粥样硬化 [J]. 中华高血压杂志, 2014, 22(7): 603-606.
- Jiang X C. Sphingomyelin metabolism and atherosclerosis[J]. *Chinese Journal of Hypertension*, 2014, 22(7): 603-606 (in Chinese).
- [31] 吕冰洁, 阳杨, 张建新. 鞘磷脂代谢物与肺癌关系的研究进展 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2014, 43(5): 603-605.
- Lv B J, Yang Y, Zhang J C. Research progress on the relationship between sphingomyelin metabolites and lung cancer[J]. *Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong*, 2014, 43(5): 603-605 (in Chinese).
- [32] Martins G, Diogo P, Santos T, *et al.* Microdiet formulation with phospholipid modulate zebrafish skeletal development and reproduction[J]. *Zebrafish*, 2019, 17(1): 27-37.
- [33] Cuesta-Gomez D M, Lazo J P, del Pilar Sánchez-Saavedra M. Effects of dietary fish oil and soya bean lecithin on gonad index, colour and biochemical composition of the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson 1857)[J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(8): 3384-3402.
- [34] Chirala S S, Wakil S J. Structure and function of animal fatty acid synthase[J]. *Lipids*, 2004, 39(11): 1045-1053.
- [35] Smith S, Witkowski A, Joshi A K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase[J]. *Progress in Lipid Research*, 2003, 42(4): 289-317.
- [36] 罗建学, 李春风, 初晓辉, 等. 脂肪酸合成酶基因的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(6): 118-123.
- Luo J X, Li C F, Chu X H, *et al.* Research on the fatty acid synthase (FAS) gene[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2011, 38(6): 118-123 (in Chinese).
- [37] Holmes R S, Vandeberg J L, Cox L A. Comparative studies of vertebrate lipoprotein lipase: a key enzyme of very low density lipoprotein metabolism[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2011, 6(2): 224-234.
- [38] Cheng W, Guo L, Zhang Z H, *et al.* HNF factors form a network to regulate liver-enriched genes in zebrafish[J]. *Developmental Biology*, 2006, 294(2): 482-496.
- [39] 蒋左玉, 姚俊杰, 熊铎龙, 等. 普安银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 卵黄囊期脂蛋白脂酶和肝脂酶基因的表达及葡萄糖、维生素 C 对其的影响 [J]. 渔业科学进展, 2015, 36(6): 43-48.
- Jiang Z Y, Yao J J, Xiong H L, *et al.* The effects of glucose and vitamin C on the gene expression of lipoprotein lipase and hepatic lipase during the development of the yolk-sac larva of *Carassius auratus gibelio*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(6): 43-48 (in Chinese).
- [40] 王刚, 曾勇庆, 武英, 等. 猪肌肉组织 LPL 基因表达的发育性变化及其与肌肉脂肪沉积关系的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(3): 253-257.
- Wang G, Zeng Y Q, Wu Y, *et al.* The developmental changes of LPL mRNA expression in muscle and their association with intramuscular fat for pigs[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2007, 38(3): 253-257 (in Chinese).
- [41] 吉红, 苏尚顺, 刘茜, 等. 草鱼 LPL 基因的表达及饥饿和再投喂对其影响 [J]. 水产学报, 2009, 33(6): 980-986.
- Ji H, Su S S, Liu Q, *et al.* Study on the LPL gene expression and the influence of fasting and refeeding on it in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(6): 980-986 (in Chinese).
- [42] 周旋, 姚翠鸾, 王志勇. 鱼类脂蛋白脂肪酶的研究进展 [J]. 海洋科学, 2009, 33(12): 133-137.
- Zhou X, Yao C L, Wang Z Y. Advance on the study of lipoprotein lipase in fish[J]. *Marine Sciences*, 2009, 33(12): 133-137 (in Chinese).

Analysis of lipid metabolism in main tissues of artificially induced ovarian development tissues of *Conger myriaster*

WANG Guixiang¹, LI Kang^{1,2,3*}, LIU Rucong¹, JIANG Zhixin¹,
BA Xubing¹, SONG Zongcheng⁴, LIU Liping^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. Weihai Shenghang Aquatic Technology Limited Company, Weihai 264319, China)

Abstract: Conger eel (*Conger myriaster*) is one of the common fish in the East China Sea and other coastal waters, with over fishing and pollution in the marine environment, the wild resources of *C. myriaster* face the risk of depletion. However, there are limit studies on the reproduction and a lack of research on lipid requirements during the development of the ovary of the *C. myriaster*. Therefore, lipid metabolism of artificially induced ovary development tissue of lipid metabolism was analyzed in different developmental stages of ovary in this study to provide a theoretical basis for artificial reproduction of the *C. myriaster*. This study provides insights into the lipid metabolism of the *C. myriaster* during artificially induced ovarian development. The lipid compositions of the liver, ovary, muscle and plasma in distinct stages were determined using ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-orbitrap mass spectrometry (UHPLC/Q-Orbitrap MS). The activity of metabolic enzymes in the liver was investigated as well. By analyzing the lipid components of liver, ovary, muscle, and plasma of *C. myriaster* at different developmental stages, 68, 27, 63 and 212 lipid markers were identified in the liver, muscle, ovary and plasma, mainly including phosphatidylserine (PS), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), triglycerides (TG) and sphingomyelin (SM). Lipids such as TG, diglyceride (DG) and ceramide (Cer) in the four tissues showed different trends during developments. In liver metabolism, the concentration of fatty acid syntheses, liver lipase and lipoprotein lipase showed a process of first increasing and then decreasing. The process was mainly involved in the metabolism of triglycerides, phospholipids and fatty acids. Studies showed that the triglycerides and phospholipids in the main tissues of the *C. myriaster* had changed to varying degrees during the development of the ovary, and the changes in the activities of lipid metabolism-related enzymes also corresponded to the characteristics of lipid metabolism. This experiment initially explored the lipid mobilization of main tissues during the ovary development of the *C. myriaster* to provide a basic reference for the artificial reproduction and sustainable development of the *C. myriaster*.

Key words: *Conger myriaster*; lipid conversion; lipidomics; liver metabolism

Corresponding authors: LI Kang. E-mail: kli@shou.edu.cn;

LIU Liping. E-mail: lp-liu@shou.edu.cn

Funding projects: Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program, China (2020-02-08-00-10-F01471); National Natural Science Foundation of China (32072994); Special Fund for Science and Technology Development of Shanghai Ocean University