



饲料 EPA 和 ALA 激活 PPAR α 在吉富罗非鱼脂代谢中的降脂作用

陈森¹, 高敏¹, 杨佳雯¹, 陈晓琪², 吴坤¹, 温小波¹,
荣华³, 孙育平^{2*}, 宁丽军^{1*}

(1. 华南农业大学海洋学院, 广东 广州 510642;

2. 广东省农业科学院动物科学研究所, 广东 广州 510640;

3. 襄阳职业技术学院, 湖北 襄阳 441050)

摘要: 为探讨脂肪酸激活过氧化物酶体增殖物激活受体 (*PPAR α*) 在吉富罗非鱼脂代谢中的降脂效应, 实验采用离体和在体试验相结合的方法进行研究。实验初期选用 7 种单体脂肪酸 [油酸 (OA)、棕榈酸 (PA)、亚油酸 (LA)、 α -亚麻酸 (ALA)、花生四烯酸 (AA)、二十碳五烯酸 (EPA)、二十二碳六烯酸 (DHA)] 孵育罗非鱼原代肝细胞, 并采用荧光定量 PCR 检测脂代谢相关指标。结果显示, 与对照组相比, ALA、AA 和 EPA 显著上调 *PPAR α* 、肉碱棕榈酰基转移酶 (*CPT1*)、脂酰辅酶 A 氧化酶 (*ACO*) 等脂肪酸分解代谢关键基因表达, ALA 还分别上调脂肪水解脂肪甘油三酯脂肪酶 (*ATGL*)、激素敏感脂肪酶 (*HSL*) 和脂肪酸转运相关基因脂蛋白酯酶 (*LPL*) 的表达, EPA 则同时抑制脂合成基因乙酰辅酶 A 羧化酶 (*ACC*) 的表达, ALA、EPA 和 AA 均能降低细胞内甘油三酯 (TG) 含量。PA 和 OA 则使细胞内 TG 含量显著上升。综合数据, 筛选出 2 种不同基因激活模式效应脂肪酸 EPA 和 ALA 设计在体实验, 分别设置正常脂 (7%) 组、高脂 (12%) 组以及高脂分别含 ALA (0.6%、1.2%)、EPA (0.6%、1.2%) 的 6 组半纯化饲料, 饲喂初始体重为 (3.53 \pm 0.03) g 的吉富罗非鱼 8 周。结果显示, 各组间生长无显著差异, 与高脂组相比, 4 个处理组均能显著降低罗非鱼体脂, 且随着 ALA 和 EPA 含量增加, 肥满度、肝体脂数、肠系膜脂肪指数逐渐降低, 血清和肝脏 TG 和胆固醇含量降低。血清谷草转氨酶、谷丙转氨酶、超氧化物歧化酶各组间无显著差异。EPA (1.2%) 组肝脏丙二醛含量显著升高, 还可显著提高肝脏脂代谢相关基因 (*PPAR α* 、*CPT1*、*ACO*、*ATGL*、*HSL*) 的表达, 促进脂分解代谢及降脂。研究表明, 饲料含 0.6% 的 EPA 或 ALA 即可上调 *PPAR α* 及其脂分解代谢相关靶基因表达, 发挥降脂效应。本研究结果为饲料配制与脂肪源筛选提供参考。

关键词: 吉富罗非鱼; *PPAR α* ; 脂肪酸; 降脂效应; 离体与在体

中图分类号: S 963.73

文献标志码: A

油脂是水产饲料主要能量原料之一, 为鱼类的正常生长提供必需脂肪酸 (EFA) 和能量, 同时

在维持细胞生物膜结构中也起着非常重要的作用^[1-2]。近年来鱼粉和蛋白原料紧缺且价格不断攀

收稿日期: 2023-11-20 修回日期: 2024-01-13

资助项目: 国家自然科学基金 (32002400); 广州市农业科技特派员项目 (2022E04J00253); 养殖罗非鱼肌肉品质参数优化与评估 (HXKJHT20221340)

第一作者: 陈森 (照片), 从事水生动物营养与饲料研究, E-mail: 815675194@qq.com

通信作者: 孙育平, 从事水产动物健康养殖研究, E-mail: sunyuping@gdaas.cn;

宁丽军, 从事鱼类营养与糖脂代谢的研究, E-mail: ning_lijun@163.com



升。相比之下, 油脂类原料价格相对较低而能值高, 在实际生产中一定程度提高脂肪添加比例能起到蛋白质节约效应, 还能减少氮排放对环境的污染^[3-4], 短期内饲喂高脂饲料在节约成本的同时, 可以促进鱼体的快速生长, 促进了高脂饲料在生产实践中的应用。不过, 过多地摄入高脂饲料可使机体脂代谢失衡, 损坏机体的免疫系统和抗氧化系统而引起炎症和细胞凋亡等^[5]。从代谢原理而言, 代谢的正常发生依赖于降解与合成两端的代谢平衡。目前相关研究表明, 鱼体能量摄入过高而脂解过程受阻, 是造成代谢失衡的重要原因^[6]。为此对鱼类脂分解代谢调控机制的了解显得尤为重要。

在哺乳动物中, 过氧化物酶体增殖物激活受体 (*PPARα*) 被认为是脂分解代谢调控原件中最关键的调控元件之一, 脂代谢多个步骤都会受到它的调控。*PPARα* 激活后调控参与脂类分解代谢相关酶类基因表达上调, 进而促进机体进行脂肪酸β-氧化。近年来的研究表明, 鱼类 *PPARα* 在被贝特类配体药物激活后, 有类似哺乳动物的调控脂分解代谢机制, 即激活的 *PPARα* 调控脂分解代谢进而降脂。如用 Fenofibrate 处理莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 和黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 后, 二者 *PPARα* 及其脂分解代谢靶基因显著上调, 机体降脂^[7-8]。同时, 鱼类 *PPARα* 激活调控与哺乳动物一样有赖于与配体结合并被激活。在哺乳动物上, 除贝特类这些合成配体外, 天然配体包括脂肪酸类 (EPA、ALA、ARA 等) 也是 *PPARα* 重要配体。目前鱼类基础研究中的配体 (如贝特类药物) 多为临床药物, 尚无法直接在鱼类中使用。不过, 在鱼类中已有关于不同脂肪源对鱼, 或不同脂肪酸对细胞, 在生长、脂代谢或在脂代谢相关基因表达影响上的研究^[9-11]。脂肪酸是否通过激活 *PPARα* 产生降脂及生理代谢作用仍未阐明。如在罗非鱼原代肝细胞研究中, 随着脂肪酸饱和度增加, 细胞 *PPARα* mRNA 表达均呈现明显的上升趋势, 而二者之间以何种方式关联并不清楚^[11], 在对黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*) 的研究中, 饲喂高 LC-PUFA 的鱼油、ARA 油、EPA+DHA 油组 *PPARα* 的表达比棕榈油、豆油、椰子油组高, 血脂比棕榈油、豆油组更低, 与椰子油组却没有差异, 意味着高 LC-PUFA 可更好地激活 *PPARα*, 但却不能解释椰子油组低脂效应^[10]。脂肪酸是鱼类的营养成分之一, 如能阐明鱼体脂

肪酸作为有效配基激活 *PPARα* 以完成该降脂效应, 那便意味着将能应用营养素激活 *PPARα* 的策略来调控当前鱼类脂沉积问题, 在对其研究基础上的利用也可避免其他药物配基在应用前景上所存在的安全与残留禁忌。

吉富罗非鱼 (GIFT *O. niloticus*) 生长迅速、抗病力强、肉质好且成本低, 是全球重要的养殖鱼类^[12]。吉富罗非鱼拥有完整的基因组信息, 是代谢基础研究良好的鱼类模型。为此, 本实验以吉富罗非鱼为研究对象, 通过离体实验筛选出能激活 *PPARα* 表达、促进脂质代谢并降低脂质在体内蓄积的脂肪酸, 后根据离体实验结果, 在饲料中添加不同的脂肪源饲喂吉富罗非鱼 8 周, 探究饲料脂肪酸对罗非鱼脂代谢、生长、生理生化指标等方面的影响。

1 材料与方法

1.1 吉富罗非鱼原代肝细胞的培养及脂肪酸的筛选

实验选取 30 g 左右的吉富罗非鱼, 剪鳃放血处死后用 75% 酒精擦拭鱼体消毒, 取出肝脏剪碎, 胰酶消化, 离心收集沉淀分离肝细胞, 完全培养基 (DMEM+10% FBS+1% 双抗) 重悬后计数, 使细胞数大于 10^6 , 接种于细胞培养板中, 在 28 °C、5% 的 CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h 后更换处理培养基 (DMEM+10% BSA+1% 双抗) 并加入不同浓度的脂肪酸 [油酸 (OA)、棕榈酸 (PA)、亚油酸 (LA)、α-亚麻酸 (ALA)、花生四烯酸 (AA)、二十碳五烯酸 (EPA)、二十二碳六烯酸 (DHA)] 继续孵育细胞 24 h, 使用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力, 筛选出适宜的处理浓度, 根据其结果孵育细胞。收集细胞检测脂代谢相关基因 [过氧化物酶体增殖物激活受体 (*PPARα*)、脂蛋白酯酶 (*LPL*)、激素敏感脂肪酶 (*HSL*)、乙酰辅酶 A 羧化酶 (*ACC*)、肉碱棕榈酰基转移酶 (*CPT1*)、脂酰辅酶 A 氧化酶 (*ACO*)、脂肪甘油三酯脂肪酶 (*ATGL*)] mRNA 表达情况, 实验重复 3 次。检测细胞内甘油三酯 (TG) 含量变化并对细胞进行油红 O 染色, 据此筛选出对肝细胞具有降脂效应的脂肪酸。

1.2 实验饲料

根据离体实验数据结果筛选出两种不同基因激活模式效应脂肪酸, ALA (强激活脂分解代谢基

因)、EPA (既强激活脂分解代谢又激活脂合成代谢基因)用于在体实验, 共配制 6 种等氮半纯化饲料, 配方和营养成分见表 1, 饲料主要脂肪酸组成见表 2, 以酪蛋白明胶为蛋白源, 以玉米淀粉为糖源, 分为正常脂对照组 (7%)、高脂组 (12%)、在高脂组基础上补充 ALA (0.6%、1.2%) 和 EPA

(0.6%、1.2%), ALA 和 EPA 来自紫苏油和精炼鱼油。将所有原料粉碎后过 40 目筛, 按配方表精准称重并加水混合均匀后, 制成直径约为 2.0 mm 的硬颗粒料。颗粒料在空调房阴干至饲料水分小于 10% 后装袋密封, 置于-20 °C 冰箱保存备用。

表 1 饲料配方与成分表

Tab. 1 Formulation and proximate analysis of the experimental diets

g/kg

成分 component	正常组 (C) control	高脂组 (HF) high fat	高脂组 (EPA 0.6%) high fat	高脂组 (EPA 1.2%) high fat	高脂组 (ALA 0.6%) high fat	高脂组 (ALA 1.2%) high fat
原料 ingredients						
酪蛋白 casein	320	320	320	320	320	320
明胶 gelatin	80	80	80	80	80	80
玉米淀粉 corn starch	320	320	320	320	320	320
猪油 lard oil	0	50	42.5	35	41.2	32.4
玉米油 corn oil	70	70	70	70	70	70
精炼鱼油 ¹⁾ refined fish oil	0	0	7.5	15	0	0
紫苏籽油 ¹⁾ perilla seed oil	0	0	0	0	8.8	17.6
维生素预混料 ²⁾ vitamin premix	10	10	10	10	10	10
VC脂 ester VC	1	1	1	1	1	1
矿物质预混料 ³⁾ mineral premix	10	10	10	10	10	10
纤维素 cellulose	173.75	123.75	123.75	123.75	123.75	123.75
磷酸二氢钙 monocalcium phosphate	10	10	10	10	10	10
氯化胆碱 choline chloride	5	5	5	5	5	5
抗氧化剂 BHT	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
总量 total quantity	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000
营养成分 nutritional composition						
粗蛋白 crude protein	342.35	342.63	346.67	341.71	346.77	341.95
粗脂肪 crude lipid	73.45	123.45	118.69	126.84	128.34	115.70
水分 moisture	98.24	100.21	106.17	98.24	98.85	99.01

注: 1) 精炼鱼油 EPA 含量为 80%, 紫苏籽油 ALA 含量为 68%; 2) 维生素预混料可为每千克饲料提供维生素 A (IU/kg), 900 000; 维生素 D (IU/kg), 200 000; 维生素 E (mg/kg), 4 500 mg; 维生素 K₃, 220 mg; 维生素 B₁, 320 mg; 维生素 B₂, 1 090 mg; 烟酸, 2 800 mg; 维生素 B₅, 2 000 mg; 维生素 B₆, 500 mg; 维生素 B₁₂, 1.6 mg; 维生素 C, 5 000 mg; 泛酸, 1 000 mg; 叶酸, 165 mg; 胆碱, 60 000 mg。3) 矿物质预混料可为每千克饲料提供: FeSO₄·7H₂O (g/kg), 25 g; CuSO₄·5H₂O (g/kg), 2.0 g; ZnSO₄·7H₂O (g/kg), 22 g; Na₂SeO₃ (g/kg), 0.04 g; KI (g/kg), 0.026 g; MnSO₄·4H₂O (g/kg), 7 g; CoCl₂·6H₂O (g/kg), 0.1 g。

Notes: 1) refined fish oil contained 80% EPA and perilla seed oil contained 68% ALA; 2) the vitamin premix provides the following per kg of diets contain vitamin A (IU/kg), 900 000; vitamin D (IU/kg), 200 000; vitamin E (mg/kg), 4 500 mg; vitamin K₃, 220 mg; vitamin B₁, 320 mg; vitamin B₂, 1 090 mg; niacin, 2 800 mg; vitamin B₅, 2 000 mg; vitamin B₆, 500 mg; vitamin B₁₂, 1.6 mg; vitamin C, 5 000 mg; pantothenic acid, 1 000 mg; folic acid, 165 mg; choline, 60 000 mg。3) the minerals premix provides the following per kg of diet contain: FeSO₄·7H₂O (g/kg), 25 g; CuSO₄·5H₂O (g/kg), 2.0 g; ZnSO₄·7H₂O (g/kg), 22 g; Na₂SeO₃ (g/kg), 0.04 g; KI (g/kg), 0.026 g; MnSO₄·4H₂O (g/kg), 7 g; CoCl₂·6H₂O (g/kg), 0.1 g。

1.3 实验鱼及养殖管理

吉富罗非鱼购于广东省罗非鱼良种场 (广州, 南沙), 放置循环系统中暂养 2 周, 暂养结束后选取健康、平均体重为 (3.53±0.03) g 的幼鱼 540 尾, 随机分为 6 组, 每组 3 个重复, 每个重复 30 尾, 放置于循环系统 (300 L/缸) 饲养。每天按鱼体重 4% 投喂, 每日投喂 2 次, 时间为 9:00 和 17:00,

每日记录病鱼死鱼情况, 每 3 天更换 1 次循环系统内 30% 的水, 日夜连续曝气, 养殖 8 周。实验期间主要水质参数: 溶解氧含量高于 7.0 mg/L, 平均水温 (29.0±1.0) °C, 氨氮小于 0.1 mg/L, 亚硝酸盐小于 0.1 mg/L, pH 维持在 7.0 左右。

1.4 实验鱼采样和体成分测定

养殖实验结束后鱼禁食 24 h, 统计每桶试验

表 2 饲料主要脂肪酸组成

原料 ingredients	正常组 (C) control	高脂组 (HF) high fat	高脂组 (EPA 0.6%) high fat	高脂组 (EPA 1.2%) high fat	高脂组 (ALA 0.6%) high fat	高脂组 (ALA 1.2%) high fat	%
C16:0	15.23	18.86	17.80	16.57	17.62	16.15	
C18:0	3.28	6.96	6.60	5.92	6.38	5.55	
C16:1	0.23	1.06	0.98	0.87	0.97	0.69	
C18:1	26.63	32.40	29.67	28.71	30.54	28.35	
C18:2n-6	51.85	37.60	36.00	35.65	36.59	36.42	
C20:4n-6	/	/	/	/	/	/	
C18:3n-3	0.80	0.61	0.57	0.97	5.42	10.45	
C20:5n-3	/	/	4.98	9.84	/	/	
C22:6n-3	/	/	/	/	/	/	
SFA	20.00	27.39	25.94	23.90	25.49	23.09	
MUFA	26.96	33.77	31.98	29.90	31.85	29.38	

注: / 脂肪酸未检测。

Notes: / the fatty acid is not detected.

鱼数量和重量, 每个处理组随机捞取 9 尾鱼, 其中 3 尾鱼置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 用于全鱼营养成分测定。剩余 6 尾麻醉后擦干体表水分, 测定体重和体长, 用于计算肥满度。6 尾鱼全部尾静脉采血, 置于 1.5 mL 离心管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 2 h 后离心 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min) 提取血清, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 用于血清生理生化指标的测定, 抽血后取出其内脏团、分离出肝脏和肠系膜脂肪, 称重, 用于计算脏体比、肝体比和肠系膜脂肪指数。采集肝脏于离心管中置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 用于分子指标的测定。其中全鱼水分含量采用直接干燥法测定; 灰分含量采用高温灼烧法测定; 粗蛋白含量采用凯氏定氮法测定; 粗脂肪含量采用索氏抽提法测定。

本研究实验过程中操作人员严格遵守《中国实验动物管理条例》伦理规范, 并按照华南农业大学实验室动物伦理委员会制定的规章制度执行。

1.5 相关指标计算公式

$$\text{存活率 (survival rate, SR, \%)} = N_t/N_0 \times 100\%$$

$$\text{增重率 (weight gain rate, WGR, \%)} = (W_t - W_0)/W_i \times 100\%$$

$$\text{肥满度 (condition factor, CF, g/cm}^3\text{)} = W/L^3 \times 100$$

$$\text{脏体比 (visceral somatic index, VSI, \%)} = W_v/W \times 100\%$$

$$\text{肝体比 (hepatosomatic index, HIS, \%)} = W_h/W \times 100\%$$

$$\text{肠系膜脂肪指数 (mesenteric fat index, MFI, \%)} = W_m/W \times 100\%$$

$$\text{饵料系数 (feed conversion rate, FCR)} = F_t/(W_t - W_0)$$

式中, N_t 和 N_0 分别为终末和初始鱼尾数, W_t 和 W_0 分别为终末和初始鱼的平均体重 (g), L 为鱼体长 (cm), W 为鱼体重 (g), W_v 、 W_h 和 W_m 分别为内脏、肝脏和肠系膜脂肪重量 (g), F_t 为饲料摄入量 (g)。

1.6 血清和肝脏生化指标检测

每个重复选取 3 个样品, 用试剂盒检测血清中谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST)、甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量。肝脏指标测定: 将肝脏样品称取后按质量体积比 (1 : 9) 加入生理盐水后匀浆, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min, 离心 10 min, 取上清液获得 10% 肝脏匀浆液, 测定肝脏组织蛋白、TG、TC、MDA 含量和 SOD 活性。试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.7 肝脏组织脂代谢基因 mRNA 表达量检测

根据血清和肝脏生理生化指标结果, 选取正常脂组、高脂组和高脂含 0.6% 的 EPA 和 ALA 共 4 组进行脂代谢基因表达量检测。Trizol 法提取组织总 RNA, 检测其完整性和浓度, 使用反转录试剂盒 (TaKaRa, 日本) 反转录为 cDNA, 并保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 用于检测肝脏组织脂代谢相关基因 (*PPAR α* 、*HSL*、*ATGL*、*LPL*、*CPT1*、*ACO* 等) mRNA 表达情况。

1.8 数据分析

使用 SPASS 18.0 软件对所有数据进行单因素方差 (ANOVA) 分析, 结合 Duncan 氏法用于多重比较分析组间差异显著性, 结果以平均值±标准误差 (mean±SE) 表示, $P<0.05$ 表示具有显著差异。

2 结果

2.1 不同脂肪酸孵育对吉富罗非鱼原代肝细胞脂代谢的影响

为了研究不同脂肪酸对吉富罗非鱼原代肝细胞脂代谢的影响, 用浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 的不同脂肪酸孵育 24 h 后, 检测细胞 TG 含量、脂滴和脂代谢相关基因的含量。EPA、AA 和 ALA 孵育可显著降低细胞内 TG 含量, OA 则使细胞内 TG 含量显著增加 ($P<0.05$) (图 1)。油红 O 染色结果显示, EPA 和 ALA 孵育可显著降低细胞内脂滴数量, OA 则使细胞内脂滴含量显著增加 (图版)。ALA、EPA、DHA 和 AA 显著促进脂代谢相关基因 *PPAR α* 和 *CPT1* 的表达 ($P<0.05$), 但 EPA 和 ALA 作用更显著 (图 2)。DHA 抑制脂代谢基因 *ATGL*、*HSL* 和 *LPL* 的表达, AA 和 ALA 则完全相反, EPA 可显著抑制脂合成相关基因 *ACC β* 的表达 ($P<0.05$), PA 则显著促进其表达 ($P<0.05$)。综上, 在饲料中添加 EPA 和 ALA 饲喂罗非鱼以进行体内验证。

2.2 饲料 EPA 和 ALA 对吉富罗非鱼生长性能和体成分的影响

饲养 8 周结束后, 高脂组增重率、肠系膜脂肪指数、肝体比、肥满度高于其他组, 其中 1.2% 的 EPA 和 ALA 最低, 但各组间无显著差异 ($P>$

0.05)。1.2% 的 EPA 和 ALA 组肥满度显著低于其他组 ($P<0.05$) (表 3)。全鱼粗脂肪, 高脂组最高 ($P<0.05$)。粗灰分, 高脂组低于其他组 ($P<0.05$), 水分和粗蛋白在各组间无显著差异 ($P>0.05$) (表 4)。

2.3 饲料 EPA 和 ALA 对吉富罗非鱼血清和肝脏生理生化指标的影响

在本实验中, 饲料 EPA 和 ALA 可显著降低血清和肝脏中 TG 和 TC 含量 ($P<0.05$)。EPA (0.6%) 和 ALA (0.6%) 或 EPA (1.2%) 和 ALA (1.2%) 两组间血清 TG 和 TC 含量无显著差异, 且 ALA (0.6%) 和 ALA (1.2%) 两组间血清 TG 和 TC 含量差异不显著 ($P>0.05$)。血清中 AST、ALT、SOD 和 MDA 各组间无显著差异 ($P>0.05$)。肝脏生化指标中添加

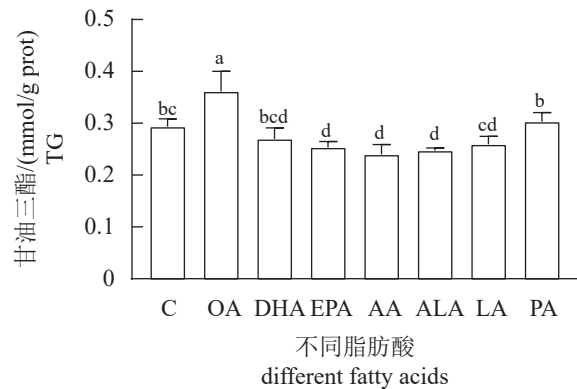
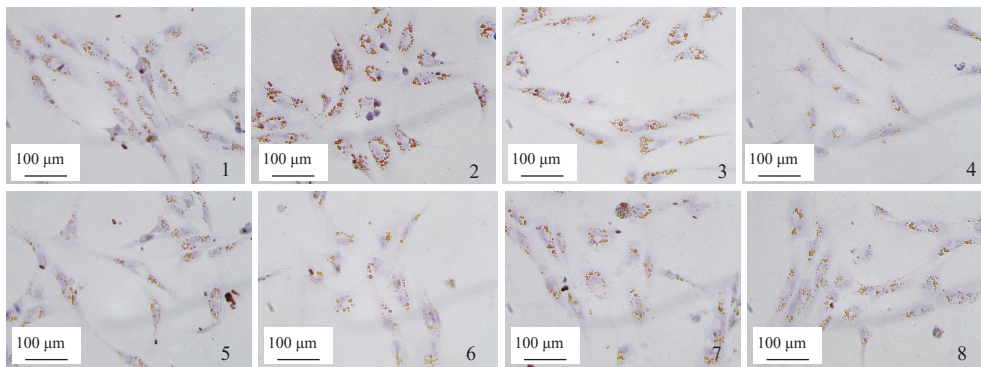


图 1 脂肪酸孵育对细胞 TG 含量的影响

C. 对照组, 各列柱子上的字母不同表示各组间差异显著, $P<0.05$, 下同。

Fig. 1 Effect of fatty acid incubation on TG content of cells

C. control group, values with different letters on columns are statistically different ($P<0.05$), the same below.



图版 细胞油红 O 染色

1. 对照组, 2. OA 处理组, 3. DHA 处理组, 4. EPA 处理组, 5. AA 处理组, 6. ALA 处理组, 7. LA 处理组, 8. PA 处理组。

Plate Cell oil red O staining

1. control group, 2. OA treatment group, 3. DHA treatment group, 4. EPA treatment group, 5. AA treatment group, 6. ALA treatment group, 7. LA treatment group, 8. PA treatment group.

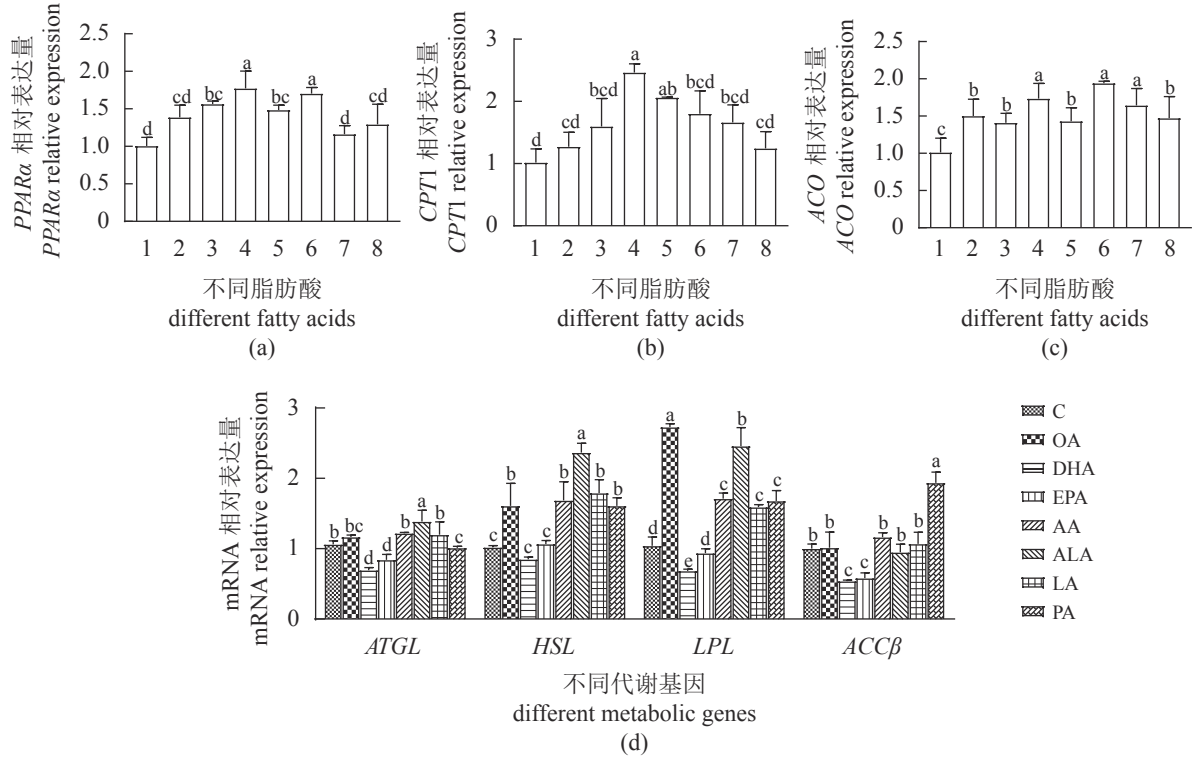


图 2 脂肪酸孵育对细胞脂代谢基因表达的影响

(a) *PPARα*, (b) *CPT1*, (c) *ACO*, (d) 不同代谢基因表达; 1. C, 2. OA, 3. DHA, 4. EPA, 5. AA, 6. ALA, 7. LA, 8. PA.

Fig. 2 Effect of fatty acid incubation on gene expression of lipid metabolism in cells

(a) *PPARα* gene expression, (b) *CPT1* gene expression, (c) *ACO* gene expression, (d) expression of different metabolic genes; 1. C, 2. OA, 3. DHA, 4. EPA, 5. AA, 6. ALA, 7. LA, 8. PA.

表 3 饲料添加 EPA 和 ALA 对吉富罗非鱼生长指标的影响

Tab. 3 Effects of EPA and ALA supplementation on growth indexes of GIFT *O. niloticus*

组别 groups	存活率(SR)% survival rate	增重率(WGR)% weight gain rate	脏体比(VIS)% viscerosomatic index	肝体比(HSI)% hepatosomatic index	肠系膜指数(MFI)% mesenteric fat index	肥满度(CF)/(g/cm ³) condition factor	饲料系数(FCR) feed conversion ratio
C	97.78±1.92	512.67±50.01	13.01±1.30	3.21±0.07	2.09±0.24	3.65±0.12 ^{ab}	1.15±0.04
HF	96.67±3.33	589.76±80.67	13.24±0.94	3.86±0.28	2.30±0.27	4.01±0.03 ^a	1.12±0.03
EPA (0.6%)	92.22±1.92	525.88±21.20	13.55±1.31	3.38±0.11	2.11±0.08	3.77±0.12 ^b	1.09±0.03
ALA (0.6%)	95.56±5.09	550.15±62.65	12.97±0.57	3.37±0.60	2.21±0.14	3.67±0.14 ^{ab}	1.06±0.01
EPA (1.2%)	98.89±1.92	507.64±24.39	12.74±1.40	3.06±0.76	2.02±0.10	3.51±0.14 ^c	1.11±0.08
ALA (1.2%)	97.78±1.92	516.20±27.94	12.22±0.42	2.92±0.46	2.17±0.17	3.47±0.06 ^c	1.16±0.17

注: HF: 高脂组。同列不同字母表示具有显著差异($P < 0.05$), 下同。

Notes: HF: high fat group. Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$), the same below.

表 4 全鱼营养成分

Tab. 4 Nutritional components of whole fish

组别 groups	粗脂肪 crude lipid	粗蛋白 crude protein	粗灰分 crude ash	水分 moisture
C	9.99±0.42 ^b	13.48±0.36	3.46±0.06 ^a	72.14±1.42
HF	11.59±0.46 ^a	13.92±0.08	3.05±0.02 ^b	70.56±1.05
EPA (0.6%)	10.34±0.34 ^b	13.74±0.36	3.35±0.20 ^a	72.12±1.02
ALA (0.6%)	10.54±0.63 ^b	13.46±0.41	3.45±0.35 ^a	71.65±1.57
EPA (1.2%)	10.59±0.31 ^b	13.85±0.39	3.39±0.05 ^a	71.38±1.09
ALA (1.2%)	10.37±0.39 ^b	13.58±0.27	3.44±0.03 ^a	71.75±1.12

EPA 1.2% 组 SOD 和 MDA 显著高于其他组 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.4 饲料 EPA 和 ALA 对吉富罗非鱼肝脏脂代谢相关基因表达的影响

EPA 1.2% 组存在脂质过氧化, 为此挑选正常脂组、高脂组、EPA 0.6% 和 ALA 0.6% 共 4 组进

行基因表达分析。EPA 和 ALA 可以显著促进 *PPAR α* 、*CPT1*、*ACO*、*ATGL*、*HSL* 和 *LPL* 基因的表达 ($P < 0.05$) (图 4), 且除 *PPAR α* 和 *CPT1* 两组无显著差异外, 其余添加 EPA 组的表达量均最高, 其脂合成相关基因 *FAS*、*ACC* 与脂代谢相关基因趋势相同, 且均为添加 EPA 组表达量最高。

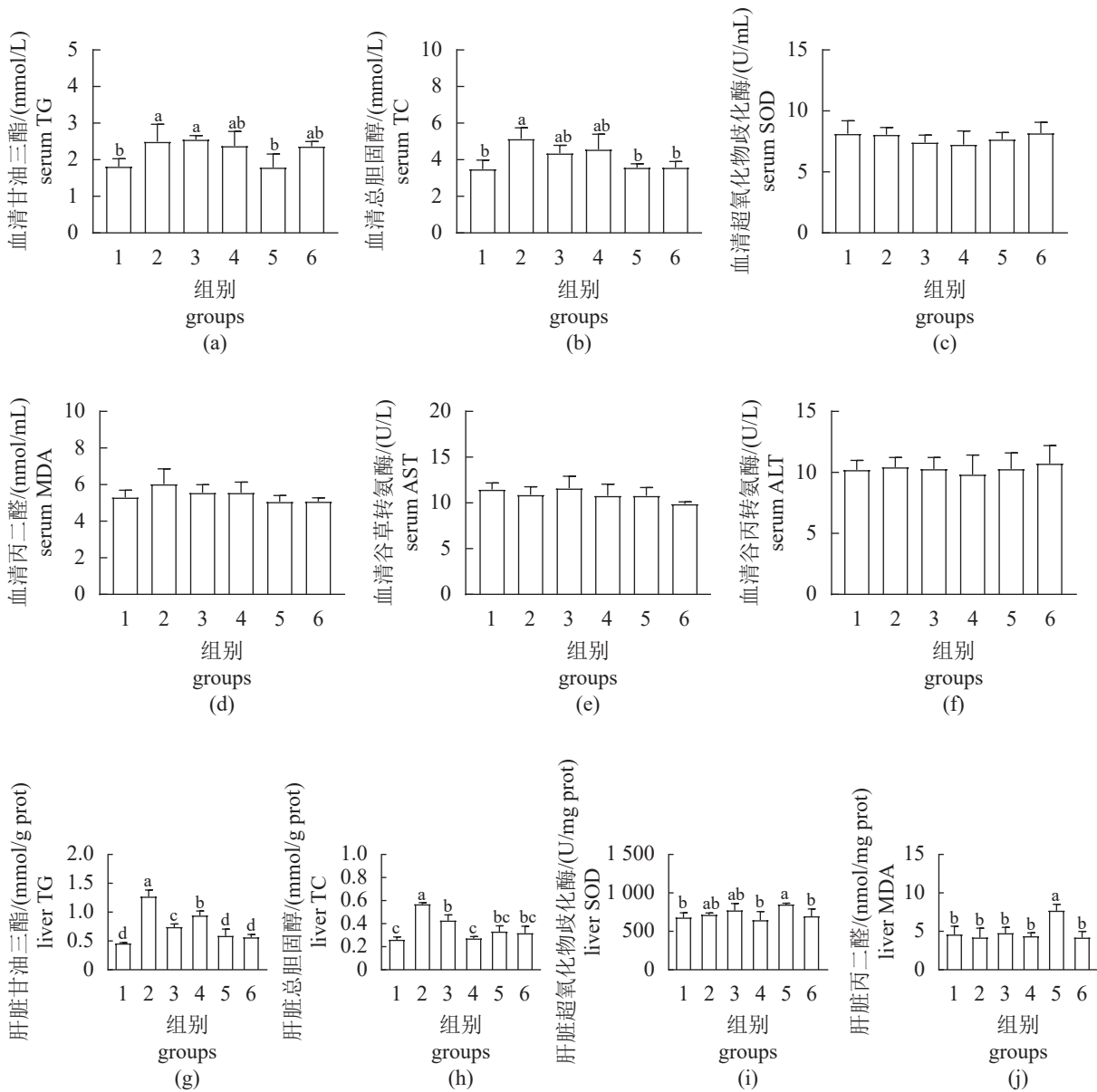


图 3 饲料添加 EPA 和 ALA 对吉富罗非鱼血清和肝脏生理生化指标的影响

(a) 血清 TG, (b) 血清 TC, (c) 血清 SOD, (d) 血清 MDA, (e) 血清 AST, (f) 血清 ALT, (g) 肝脏 TG, (h) 肝脏 TC, (i) 肝脏 SOD, (j) 肝脏 MDA。1. 对照组 (C), 2. 高脂组 (HF), 3. 高脂组 (EPA 0.6%), 4. 高脂组 (ALA 0.6%), 5. 高脂组 (EPA 1.2%), 6. 高脂组 (ALA 1.2%)。

Fig. 3 Effects of dietary EPA and ALA supplementation on serum and liver physiological and biochemical indexes of GIFT *O. niloticus*

(a) serum TG, (b) serum TC, (c) serum SOD, (d) serum MDA, (e) serum AST, (f) serum ALT, (g) liver TG, (h) liver TC, (i) liver SOD, (j) hepatic MDA. 1. control group (C), 2. high fat group (HF), 3. high fat group (EPA 0.6%), 4. high fat group (ALA 0.6%), 5. high fat group (EPA 1.2%), 6. high fat group (ALA 1.2%).

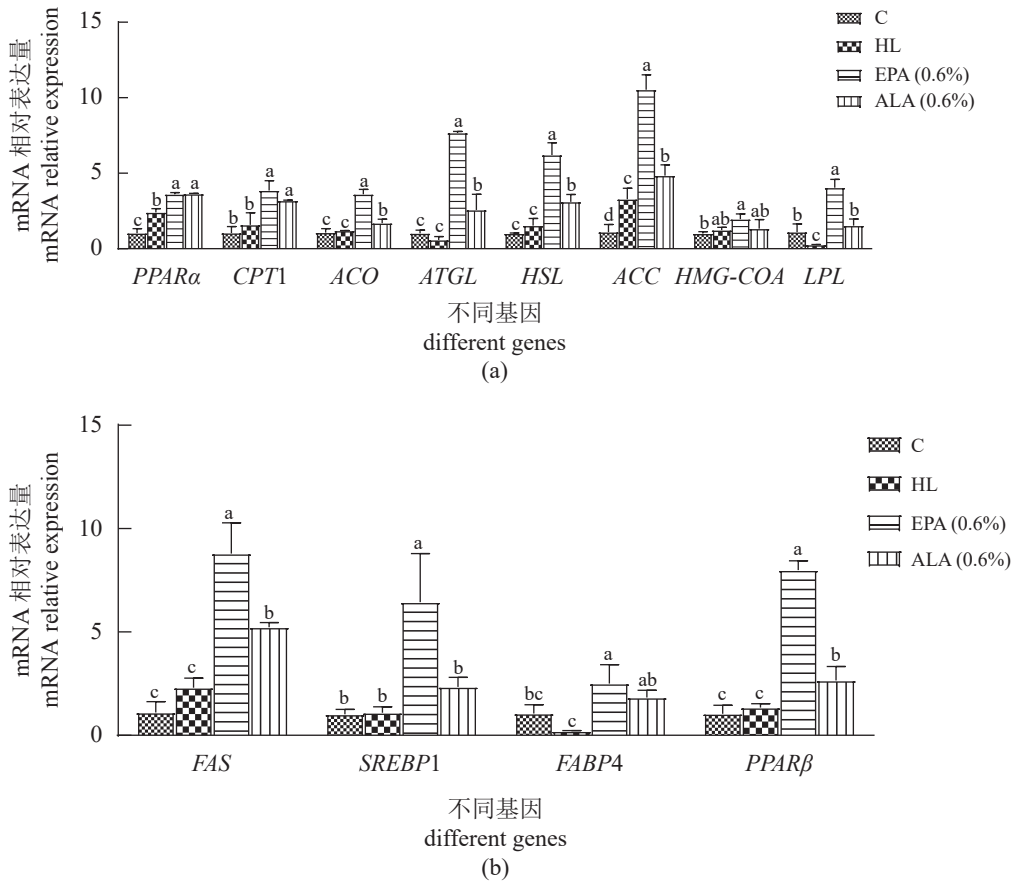


图4 饲料添加 EPA 和 ALA 对肝脏脂代谢基因的影响

(a) 脂分解相关基因, (b) 脂合成相关基因。

Fig. 4 Effects of EPA and ALA supplementation on liver lipid metabolism genes

(a) genes associated with lipolysis, (b) genes associated with lipid synthesis.

3 讨论

3.1 脂肪酸对吉富罗非鱼在体与离体脂代谢的影响

脂肪的水解和脂肪酸的氧化分解是由 *PPAR α* 、*ATGL*、*HSL*、*CPT1* 和 *ACO* 等一系列调控或酶功能基因完成, *ATGL* 是脂质水解的限速酶, 甘油三酯在 *ATGL* 的催化下转变为甘油二酯, 然后在 *HSL* 催化下分解为单酰基甘油, *CPT1* 被公认是 β -氧化限速酶。*PPAR α* 被认为是脂分解代谢最关键的调控因子之一, *PPAR α* 激活后调控参与脂类分解代谢相关的上述酶类基因表达上调, 进而促进机体进行脂分解代谢。不同脂肪酸孵育可对哺乳动物和鱼类上述脂水解和脂肪酸氧化分解基因以及脂蓄积效果产生不同影响。用不同长度和饱和度的脂肪酸处理 HepG2 细胞后发现, 月桂酸 (LA)、肉豆蔻酸 (MA)、ALA、EPA、DHA 激活 *PPAR α* 表达, PA、硬脂酸 (SA) 则抑制 *PPAR α* 表达^[13]。

类似地, PA 和 OA 处理 HepG2 细胞和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 肠上皮细胞会下调 *PPAR α* 表达量^[14-15]。在对斑马鱼 (*Danio rerio*) 和大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 研究中, 适宜 DHA 水平通过抑制肝脏脂质合成基因 *SREBP1c* 的表达和/或促进 *PPAR α* 和 β -氧化相关基因的表达而起到降脂作用, 不过过高 DHA 则促使鱼体脂质过氧化^[16-17]。相比之下, 饲料 EPA 促进草鱼或虹鳟肝组织中 *ATGL* 和 *CPT1* 表达量上调, 从而降脂^[18-19]。对卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 和大鼠 (*Rattus norvegicus*) 的研究中, ALA 可激活脂分解代谢相关 *ACO*、*CPT-2* 等基因, 促进腹腔脂肪或肝脏脂质分解^[20-21]。本实验结果显示, 脂肪酸孵育细胞 24 h 后, EPA、AA 和 ALA 可以显著降低细胞内 TG 和脂滴含量, 不过 ALA 是激活分解基因表达最强的脂肪酸, 而 EPA 是既激活分解又降低脂合成基因表达的脂肪酸。相关研究也发现, 在草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 中, EPA 除激活分解代谢外, 还通过

抑制脂肪生成相关基因的表达降脂^[22]。在本实验在体实验中, EPA 组与 ALA 组相比, 既激活脂分解基因表达又激活脂合成基因表达, 降脂效应却强于 ALA 组。推测 EPA 可能存在其他降脂途径, 如草鱼研究中的 EPA 促进脂肪细胞凋亡^[22]。在离体与在体实验中, 除个别基因外, EPA 和 ALA 均能显著促进脂分解代谢基因表达。这说明与前述研究类似, 罗非鱼肝脏通过促进脂肪水解和脂肪酸的 β -氧化来减少脂肪在肝脏中蓄积。在离体实验中, DHA 也可以促进脂分解代谢相关基因表达, 但同时抑制脂肪水解与脂肪酸摄入相关基因表达, 这或许是其细胞 TG 含量和脂滴含量高于 EPA 和 ALA 的原因。此外, PA 和 OA 都无法显著促进原代细胞脂分解代谢相关基因表达, 且造成了脂滴的沉积和细胞内 TG 含量增加, 这与以往研究相似^[15, 23]。Ricchi 等^[23] 在应用 PA 和 OA 孵育 HepG2、HuH7、WRL68 三株肝细胞系试验中表明, PA 和 OA 可以造成脂肪蓄积。

3.2 饲料 EPA 和 ALA 对吉富罗非鱼生长和体组成的影响

目前关于脂肪酸对鱼体生长的研究以必需脂肪酸为主。如满足卵形鲳鲹最适生长的必需脂肪酸水平为 0.64%~2.10% n-3HUFA, 且 DHA/EPA 比例约为 1.4^[24]。罗非鱼必需脂肪酸 n-6PUFA 在 0.50%~1.14% 时能获得最大生长^[25]。本研究中, n-6PUFA 均在此范围内, 所有组不存在必需脂肪酸缺乏所造成的生长差异。此外, 在蛋白水平和脂肪水平相同的情况下, 高脂饲料添加 EPA 和 ALA 未对鱼的增重率和成活率造成显著影响, 可能是因为罗非鱼必需脂肪酸为亚油酸, n-3PUFA 含量也都为 0.5% 以上, 当 n-6PUFA 满足机体需要后, 更多 n-3PUFA 的改变对鱼体生长的影响不大。之前的研究表明, 满足罗非鱼 n-6 脂肪酸需要后, ALA (n-3PUFA) 含量在 0.45% 即可满足鱼类最大生长需要^[26]。

在以往的研究中, 饲料补充 EPA 使黄鳢 (*Monopterus albus*) 肝脂下降, 并导致肝体脂数下降, 亚麻酸可以降低卵形鲳鲹幼鱼腹脂率, 说明亚麻酸具有促进腹内脂肪代谢, 降低腹脂的作用^[20, 27]。在罗非鱼的研究中发现, 随着亚麻酸含量升高 (2%), 体脂和腹脂下降, 全鱼粗蛋白含量增加^[26]。关于 EPA 在鱼体内降脂的机理也被认为是高 n-3 PUFA 既能促进脂肪酸氧化分解, 还可促

进脂肪细胞凋亡^[22]。尽管目前尚不能推断粗蛋白沉积因脂是由分解节约蛋白效应所致, 但是有研究表明, n-3 多不饱和脂肪酸可激活高等哺乳动物蛋白质合成代谢信号 mTOR 通路来促进蛋白质的合成^[28]。在其他鱼的体组成研究上, 亚麻酸在满足黄颡鱼和大菱鲈 (*Scophthalmus maximus*) 最大生长需求后, 再增加则不会引起粗蛋白的变化, 该效应是否因未能激活 mTOR 信号不得而知, 不过亚麻酸在影响鱼体组成上至少说明鱼种间效应在物种差异性^[29-30]。与之类似, 在本研究中不同水平 EPA 和 ALA 能明显降低鱼体脂, 肠系膜指数有下降趋势, 但都不能影响鱼体蛋白组成和通过节约蛋白效应改变增重。此外, 之前有研究表明, EPA 可以促进草鱼脂肪组织细胞凋亡降低腹腔脂肪含量^[22]。相比之下, 本研究中罗非鱼腹腔脂肪降脂效应不明显, 或许这是导致蛋白节约效应不能有效发挥的原因。本研究团队在最近的研究中发现, 罗非鱼能耐受较高的脂肪蓄积, 且当脂肪摄入过度时, 其可通过将过多脂肪分布于鱼体不同组织, 使其腹腔脂肪组织这一较易降脂部位的脂肪存储量不至过高, 其用于分解蛋白的量也较为有限^[28]。

3.3 饲料 EPA 和 ALA 对吉富罗非鱼生理生化指标的影响

血清和肝脏生化指标与摄食的营养成分密切相关, 能直接反映出不同饲料对动物健康状况和代谢变化的影响^[31]。TG 和 TC 含量是反映脂代谢功能的重要指标, 在体内过多或者过少可在一定程度上反映机体代谢异常^[32]。肝脏是合成甘油三脂和胆固醇的重要器官, 当机体摄入能量过剩时, 过多脂肪储存在肝脏中, 可导致脂肪变性甚至肝损伤^[33]。同样, 过多的肝脂也会从肝脏以脂蛋白的形式分泌进入血液中, 影响血甘油三酯和胆固醇水平。本研究发现, 饲料 EPA 和 ALA 可诱导肝脏 PPAR α 及脂分解代谢相关基因显著上调, 同时显著降低血清和肝脏中高脂诱导的高 TG 和/或 TC 含量来改善罗非鱼脂代谢。相似的结果在以往研究中也发现, 例如, 在草鱼的研究中, 饲料添加 EPA 可使肝脏和血清中 TG 和/或 TC 含量显著降低, 脂分解代谢相关基因上调^[22]。在大西洋鲑 (*Salmo salar*) 的研究中也发现, EPA+DHA 促进其脂肪酸 β -氧化, 从而降低肝脏和血清中可能的高脂导致的炎症^[34]。不过也有研究表明, 高水平

的 n-3PUFA, 如 EPA 和 DHA 可通过增加膜流动性以促进线粒体 β -氧化分解降脂^[35]。本研究中 EPA 或 ALA 体内合成 EPA 后也可能影响膜流动性, 从而改善机体生理代谢。

谷丙转氨酶和谷草转氨酶是反映鱼体肝脏是否受损的重要指标^[36]。在鱼体健康的情况下, 血清中谷丙转氨酶和谷草转氨酶含量较少, 但当饲料脂质过氧化或其他原因造成肝损伤时, 在肝细胞膜破裂后进入血液, 使血液中谷草转氨酶和谷丙转氨酶活性急剧上升^[37]。本实验结果显示, 与正常脂组相比, 高脂补充 EPA 和 ALA 组血清中谷草转氨酶和谷丙转氨酶没有显著差异, 即未对肝脏造成损伤。这与以往罗非鱼的研究, 饲料脂肪含量低于 15% 时不会对肝脏造成损伤及升高血清谷丙转氨酶相似^[38]。此外, 本研究中高脂 EPA 或 ALA 添加组的谷丙转氨酶、谷草转氨酶与高脂组相比也不存在显著差异, 表明饲料 EPA 和 ALA 在该水平 (0.6% 和 1.2%) 下不会对肝脏造成损伤, 这也与在红罗非鱼 (*O. mossambicus* × *O. niloticus*) 中 ALA 添加量大于 1.31% 时会对肝脏造成损伤相吻合^[39-40]。MDA 是机体脂质过氧化的产物, 是反映机体氧化损伤程度的重要指标, 含量过高会造成细胞膜损伤, 进而影响机体其他生理功能。在本研究中, EPA (1.2%) 组使肝脏 MDA 含量显著升高, 相似的结果在卵形鲳鲹中也有发现, 当饲料中 EPA 含量为 0.98% 时, 肝脏 MDA 含量显著升高, 引起机体氧化应激^[20]。此外, EPA (1.2%) 组肝脏 MDA 含量显著高于其他组, 而该组鱼增重率在各组中最低, 可能是由于 EPA 出现了脂质过氧化, 导致鱼体出现氧化损伤。这与之前在草鱼、大菱鲆生长的研究中饲料中 DHA 和 EPA 含量较高, 超过鱼体的利用范围时, 肝脏 MDA 含量显著高于其他组相一致^[41-42]。另外, 同样高水平 ALA (1.2%) 组机体未出现 MDA 上升, 这与此前罗非鱼研究中 MDA 含量与脂肪酸不饱和度呈正相关相一致^[43]。因此, 在饲料中, 适宜的 EPA (<1.2%) 或 ALA 可以起到降脂作用, 改善高脂饲喂罗非鱼脂代谢。

4 结论

本研究首先筛选出能促进吉富罗非鱼原代肝细胞脂肪代谢的两种脂肪酸 EPA 和 ALA, 并在养殖实验中验证。结果显示, 在本实验条件下, 高脂饲料中补充 0.6% 的 EPA 或 ALA 可以激活鱼 *PPAR α* 及脂分解代谢相关基因表达, 降低鱼体脂、

肝脏和血清 TG 和 TC 含量, 有效避免因脂肪摄入过量而带来的肝脏损伤。此外, 饲料含 0.6% 的 EPA 组还能激活脂合成相关基因的表达, 而其降脂效应强于 ALA (0.6%) 组, 推测其还存在如细胞凋亡之类的其他降脂路径, 有待进一步研究。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 陆游, 金敏, 袁野, 等. 不同脂肪源对黄颡鱼幼鱼生长性能、体成分、血清生化指标、体组织脂肪酸组成及抗氧化能力的影响 [J]. 水产学报, 2018, 42(7): 1094-1110.
Lu Y, Jin M, Yuan Y, et al. Effects of different lipid sources on growth performance, body composition, the serum biochemical indices, fatty acids composition and antioxidant capacity in juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(7): 1094-1110 (in Chinese).
- [2] 马晶晶, 邵庆均, 许梓荣, 等. n-3 高不饱和脂肪酸对黑鲷幼鱼生长及脂肪代谢的影响 [J]. 水产学报, 2009, 33(4): 639-649.
Ma J J, Shao Q J, Xu Z R, et al. Effects of n-3 high-unsaturated fatty acids on growth and lipid metabolism of juvenile black seabass (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(4): 639-649 (in Chinese).
- [3] 王菲, 李向飞, 李贵锋, 等. 不同糖脂比对建鲤幼鱼生长、体组成、消化及糖酵解能力的影响 [J]. 水产学报, 2015, 39(9): 1386-1394.
Wang F, Li X F, Li G F, et al. Effects of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, body composition, digestion and glycolysis of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *jian*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(9): 1386-1394 (in Chinese).
- [4] 王煜恒, 王爱民, 刘文斌, 等. 不同脂肪源对异育银鲫鱼种生长、消化率及体成分的影响 [J]. 水产学报, 2010, 34(9): 1439-1446.
Wang Y H, Wang A M, Liu W B, et al. Effects of dietary oil sources on growth performance, apparent digestibility and body composition of *Carassius auratus gibelio* [J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(9): 1439-1446 (in Chinese).
- [5] Jia R, Cao L P, Du J L, et al. Effects of high-fat diet on

- steatosis, endoplasmic reticulum stress and autophagy in liver of tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2020, 7: 363.
- [6] Lu K L, Xu W N, Wang L N, *et al.* Hepatic β -Oxidation and regulation of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed a high fat diet[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e93135.
- [7] Ning L J, He A Y, Lu D L, *et al.* Nutritional background changes the hypolipidemic effects of fenofibrate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 41706.
- [8] Zheng J L, Luo Z, Hu W, *et al.* Dietary fenofibrate reduces hepatic lipid deposition by regulating lipid metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* exposed to waterborne Zn[J]. *Lipids*, 2015, 50(4): 417-426.
- [9] Liu K, Liu H Y, Chi S Y, *et al.* Effects of different dietary lipid sources on growth performance, body composition and lipid metabolism - related enzymes and genes of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(2): 717-725.
- [10] Jin M, Yuan Y, Lu Y, *et al.* Regulation of growth, tissue fatty acid composition, biochemical parameters and lipid related genes expression by different dietary lipid sources in juvenile black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*[J]. *Aquaculture*, 2017, 479: 25-37.
- [11] 韩春艳, 郑清梅, 陈桂丹, 等. 添加不同类型脂肪酸对罗非鱼肝脏原代细胞内脂类代谢相关基因表达的影响 [J]. 嘉应学院学报 (自然科学版), 2014, 32(5): 53-57.
- Han C Y, Zheng Q M, Chen G D, *et al.* Effect of different fatty acids on the lipid metabolism related gene expression in primary cultured hepatocytes of tilapia[J]. *Journal of Jiaying University (Natural Science Edition)*, 2014, 32(5): 53-57 (in Chinese).
- [12] Zhang Y X, Jiang Z Y, Han S L, *et al.* Inhibition of intestinal lipases alleviates the adverse effects caused by high-fat diet in Nile tilapia[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2020, 46(1): 111-123.
- [13] Popeijus H E, Van Otterdijk S D, Van der Krieken S E, *et al.* Fatty acid chain length and saturation influences PPAR α transcriptional activation and repression in HepG2 cells[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014, 58(12): 2342-2349.
- [14] Selvam C, Saito T, Sissener N H, *et al.* Intracellular trafficking of fatty acids in the fish intestinal epithelial cell line RTgutGC[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 954773.
- [15] Zhong W X, Fan B, Cong H Y, *et al.* Oleic acid-induced perilipin 5 expression and lipid droplets formation are regulated by the PI3K/PPAR α pathway in HepG2 cells[J]. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 2019, 44(8): 840-848.
- [16] 李松林, 廖凯, 袁禹惠, 等. DHA 通过调控脂肪合成代谢影响大黄鱼肝脂沉积 [J]. 中国科技文献在线, 2016.
- Li S L, Liao K, Yuan Y H, *et al.* Regulation of DHA on hepatic lipid deposition through affecting lipogenesis in large yellow croaker[J]. *China Science and Technology Literature Online*, 2016 (in Chinese).
- [17] Ding Q W, Hao Q, Zhang Q S, *et al.* Excess DHA induces liver injury via lipid peroxidation and gut microbiota-derived lipopolysaccharide in zebrafish[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 870343.
- [18] Riera-Heredia N, Lutfi E, Sánchez-Moya A, *et al.* Short-term responses to fatty acids on lipid metabolism and adipogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(5): 1623.
- [19] 吉红, 曹艳姿, 刘品, 等. 饲料中 HUFA 影响草鱼脂质代谢的研究 [J]. 水生生物学报, 2009, 33(5): 881-889.
- Ji H, Cao Y Z, Liu P, *et al.* Effect of dietary HUFA on the lipid metabolism in grass carp ctenophar ymgodon idellus[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(5): 881-889 (in Chinese).
- [20] 戚常乐. LNA、ARA、DHA 和 EPA 对卵形鲳鲹幼鱼生长及免疫影响的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
- Qi C L. The study on effects of dietary LNA, ARA, DHA and EPA levels on growth performance and immunity of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[D]. Shanghai: Ocean University of Shanghai, 2017 (in Chinese).
- [21] 李微. Alpha-亚麻酸对大鼠肝脏、HepG2 细胞脂肪酸氧化及合成的影响 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2014.
- Li W. Effects of alpha-linolenic acid on fatty acid oxidation and synthesis in rat liver and HepG2 cells[D]. Beijing: Chinese People's Liberation Army Academy of

- Military Medical Sciences, 2014 (in Chinese).
- [22] 雷彩霞. EPA 及其前体 ALA 对草鱼脂肪蓄积的调控作用及机制分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- Lei C X. Effects and mechanism of epa and its precursor ala on lipid accumulation of grass carp (*Ctenopharygodon idellus*)[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2017 (in Chinese).
- [23] Ricchi M, Odoardi M R, Carulli L, *et al.* Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes[J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2009, 24(5): 830-840.
- [24] Zhang M, Chen C Y, You C H, *et al.* Effects of different dietary ratios of docosahexaenoic to eicosapentaenoic acid (DHA/EPA) on the growth, non-specific immune indices, tissue fatty acid compositions and expression of genes related to LC-PUFA biosynthesis in juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus*[J]. *Aquaculture*, 2019, 505: 488-495.
- [25] Li E C, Lim C, Klesius P H, *et al.* Growth, body fatty acid composition, immune response, and resistance to streptococcus iniae of hybrid Tilapia, *Oreochromis niloticus*×*Oreochromis aureus*, fed diets containing various levels of linoleic and linolenic acids[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2013, 44(1): 42-55.
- [26] Chen C Y, Sun B L, Li X X, *et al.* N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: quantification of optimum requirement of dietary linolenic acid in juvenile fish[J]. *Aquaculture*, 2013, 416-417: 99-104.
- [27] 朱长生, 江波, 周秋白. 饲料中不同 EPA 和 DHA 含量对黄鳝脂类代谢、生长及繁殖性能的影响 [J]. *水生生物学报*, 2013, 37(4): 648-655.
- Zhu C S, Jiang B, Zhou Q B. The effects of different levels of epa and dha on lipids metabolism, growth and reproductive performance of rice field eel (*Monopterus albus*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(4): 648-655 (in Chinese).
- [28] Smith G I, Atherton P, Reeds D N, *et al.* Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2011, 93(2): 402-412.
- [29] Li M, Chen L Q, Li E C, *et al.* Growth, immune response and resistance to *Aeromonas hydrophila* of darkbarbel catfish, *Pelteobagrus vachelli* (Richardson), fed diets with different linolenic acid levels[J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(4): 789-800.
- [30] 彭墨, 徐玮, 麦康森, 等. 亚麻籽油替代鱼油对大菱鲂幼鱼生长、脂肪酸组成及脂肪沉积的影响 [J]. *水产学报*, 2014, 38(8): 1131-1139.
- Peng M, Xu W, Mai K S, *et al.* Growth performance, fatty acids composition and lipid deposition in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) fed diets with various fish oil substitution levels by linseed oil[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(8): 1131-1139 (in Chinese).
- [31] 李富伟, 蔡辉益. 肽对肉鸡生长性能的影响及其生理机理研究 [J]. *动物营养学报*, 2005, 17(1): 40-44.
- Li F W, Cai H Y. The effect of peptide on growth performance of broilers and its mechanism[J]. *Acta Zoonutrimenta Sinica*, 2005, 17(1): 40-44 (in Chinese).
- [32] 王成强, 徐后国, 梁萌青, 等. 饲料亚麻酸含量对大规格鲈鱼生长性能、抗氧化指标和血清生化指标的影响 [J]. *动物营养学报*, 2016, 28(10): 3123-3133.
- Wang C Q, Xu H G, Liang M Q, *et al.* Effects of dietary α -linolenic acid content on growth performance, antioxidant indices and serum biochemical indices of large size Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(10): 3123-3133 (in Chinese).
- [33] 吴俊光, 王连生, 王常安, 等. 饲料中精氨酸水平对杂交鲟幼鱼抗氧化能力及血清生化指标的影响 [J]. *大连海洋大学学报*, 2016, 31(3): 272-279.
- Wu J G, Wang L S, Wang C A, *et al.* Effects of dietary arginine levels on antioxidative state and serum biochemical indices in juvenile hybrid sturgeon[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2016, 31(3): 272-279 (in Chinese).
- [34] Hundal B K, Lutfi E, Sigholt T, *et al.* A piece of the puzzle—possible mechanisms for why low dietary EPA and DHA cause hepatic lipid accumulation in Atlantic Salmon (*Salmo salar*)[J]. *Metabolites*, 2022, 12(2): 159.
- [35] Závorka L, Crespel A, Dawson N J, *et al.* Climate change-induced deprivation of dietary essential fatty acids can reduce growth and mitochondrial efficiency of wild juvenile salmon[J]. *Functional Ecology*, 2021, 35(9): 1960-1971.
- [36] 冯健, 刘永坚, 田丽霞, 等. 草鱼实验性镉中毒对肝脏、肾脏和骨骼的影响 [J]. *水产学报*, 2004, 28(2): 195-200.

- Feng J, Liu Y J, Tian L X, *et al.* The effect of experimental cadmium poisoning on hepatopancreas, kidney, skeleton in *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(2): 195-200 (in Chinese).
- [37] 张璐, 李静, 谭芳芳, 等. 饲料中不同维生素 A 含量对花鲈生长和血清生化指标的影响 [J]. *水产学报*, 2015, 39(1): 88-96.
- Zhang L, Li J, Tan F F, *et al.* Effects of different dietary vitamin A levels on growth and serum biochemical parameters for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(1): 88-96 (in Chinese).
- [38] 涂玮, 田娟, 文华, 等. 尼罗罗非鱼幼鱼饲料的适宜脂肪需要量 [J]. *中国水产科学*, 2012, 19(3): 436-444.
- Tu W, Tian J, Wen H, *et al.* Optimal dietary lipid requirement of advanced juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(3): 436-444 (in Chinese).
- [39] 陶易凡. 高脂应激下吉富罗非鱼肝脏脂代谢调控关键 microRNA 筛选及其功能研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2021.
- Tao Y F. Screening and functional characterization of lipid metabolism-related micromas in the genetically improved farmed tilapia with fatty liver induced by a high-fat diet[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [40] 何金钊, 陈涛, 杨艳, 等. 饲料中亚麻酸含量对红罗非鱼稚鱼生长、消化酶活性及血液生化指标的影响 [J]. *饲料研究*, 2019, 42(11): 46-49.
- He J Z, Chen T, Yang Y, *et al.* Effects of different linolenic acid levels on growth digestive enzyme activities and blood biochemical indicators of juvenile red tilapia[J]. *Feed Research*, 2019, 42(11): 46-49 (in Chinese).
- [41] Du Z Y, Clouet P, Huang L M, *et al.* Utilization of different dietary lipid sources at high level in herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): mechanism related to hepatic fatty acid oxidation[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2008, 14(1): 77-92.
- [42] Stéphan G, Guillaume J, Lamour F. Lipid peroxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) tissue: effect of dietary vitamin E and dietary $n - 6$ or $n - 3$ polyunsaturated fatty acids[J]. *Aquaculture*, 1995, 130(2-3): 251-268.
- [43] 刘艳. 线粒体和过氧化物酶体 β -氧化在罗非鱼脂质营养代谢中的功能研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2020.
- Liu Y. Study on roles of mitochondrial and peroxisomal β -oxidation in lipid nutrient metabolism of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[D]. Shanghai: East China Normal University, 2020 (in Chinese).

Lipid-lowering effect of PPAR α activated by feed EPA and ALA in GIFT *Oreochromis niloticus*

CHEN Sen¹, GAO Min¹, YANG Jiawen¹, CHEN Xiaoying², WU Kun¹, WEN Xiaobo¹,
RONG Hua³, SUN Yuping^{2*}, NING Lijun^{1*}

(1. College of Marine Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

3. Xiangyang Vocational and Technical Collage, Xiangyang 441050, China)

Abstract: Dietary fat is an essential nutrient for fish growth, yet the impact of PPAR α activation by fatty acids on lipid metabolism in fish is not well understood. This study aimed to investigate the role of PPAR α activation and its regulatory effects on lipid metabolism in response to fatty acids in GIFT *Oreochromis niloticus* using both *in vitro* and *in vivo* approaches. Primary hepatocytes from tilapia were incubated with seven individual fatty acids: oleic acid (OA), palmitic acid (PA), alpha-linolenic acid (ALA), linoleic acid (LA), arachidonic acid (AA), eicosapentaenoic acid (EPA), and docosahexaenoic acid (DHA), and lipid metabolism were measured. ALA, AA and EPA significantly up-regulated the expressions of key fatty acid catabolic genes such as PPAR α , carnitine palmitoyltransferase 1 (*CPT1*) and acyl-CoA oxidase (*ACO*). ALA specifically up-regulated the expressions of lipolysis related genes adipose triglyceride lipase (*ATGL*), adipose triglyceride lipase (*HSL*) and fatty acid transport-related genes adipose triglyceride lipase (*LPL*), respectively. EPA inhibited the expression of *ACC*, and ALA, EPA and AA could reduce the content of triglycerides in cells. In contrast, PA and OA increased triglyceride content and the number of lipid droplets. *In vivo* experiments were conducted with two fatty acids, EPA and ALA, which showed distinct gene activation patterns. Six semi-purified diets varying in ALA (0.6%, 1.2%) and EPA (0.6%, 1.2%) were formulated for normal fat (7%) group, high fat (12%) group (HF) and high fat group with EPA or ALA (0.6%, 1.2%), respectively. Tilapia with an initial body weight of (3.53±0.03) g were fed these diets for eight weeks. No significant differences in growth were observed among the groups. However, body fat was significantly reduced in all four treatment groups compared to the high-fat group. As ALA and EPA content increased, the condition factor (CF), hepatosomatic index (HSI), and muscle fat index (MFI) decreased, along with serum and liver triglycerides (TG) and cholesterol. No significant differences were found in levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) among the groups. Notably, MDA in the liver was significantly increased in the EPA (1.2%) group, and the expression of PPAR α , *CPT1*, *ACO*, *ATGL* and *HSL* was significantly enhanced with EPA and ALA supplementation. Collectively, these findings indicate that diets containing 0.6% EPA or ALA can up-regulate the expression of PPAR α and its lipid metabolism-related target genes, leading to a lipid lowering effect. The study's outcomes offer valuable insights for feed formulation and fat source screening.

Key words: GIFT *Oreochromis niloticus*; PPAR α ; fatty acids; lipid-lowering effect; *in vivo* and *in vitro*

Corresponding authors: SUN Yuping. E-mail: sunyuping@gdaas.cn;

NING Lijun. E-mail: ning_lijun@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32002400); Guangzhou Agricultural Science and Technology Special Commissioner Project (2022E04J00253); Optimization and Evaluation of Quality Parameters in Cultured Tilapia Muscle (HXKJHT20221340)