文章编号: 1000-0615(2017)05-0757-09 DOI: 10.11964/jfc.20160710467

饲料LNA/LA比对鲤幼鱼生长性能，肝脏脂肪酸组成及Δ6 *fad*, *elovl*5 mRNA表达的影响

谢帝芝， 于若梦， 陈 芳， 卢荣华， 杨丽萍， 孟晓林， 聂国兴*
(河南师范大学水产学院，河南省水产动物养殖工程技术研究中心，河南 新乡 453007)

摘要： 为了探讨饲料LNA/LA比对鲤幼鱼生长性能和LC-PUFA合成代谢的影响，本研究以鱼油和混合植物油(花生油和紫苏籽油)为脂肪源配制5组等氮等脂饲料。对照组(D1)以鱼油为唯一脂肪源，其他5组实验饲料以花生油和紫苏籽油为脂肪源，且LNA/LA比分别为0.02(D2)、0.46(D3)、1.09(D4)和1.53(D5)。8周养殖实验后，分析各处理组鱼体的生长性能指标、肝脏脂肪酸组成，肝脏Δ6 *fad-a/b*和*elovl5-a/b*基因表达水平。结果显示，与对照组相比，植物油饲料对鱼体增重率(WGR)、特定生长率(SGR)和饲料系数(FCR)无显著影响，但显著影响了鱼体肝脏LC-PUFA水平，提高了肝脏Δ6 *fad-a*和*elovl5-a* mRNA表达水平。在各植物油组之间，饲料LNA/LA比显著影响了鱼体WGR和SGR指标，其中D2和D4组鱼体生长表现较好；随着饲料中LNA/LA比的升高，鱼体肝脏LC-PUFA水平，以及Δ6 *fad-a*和*elovl5-a* mRNA表达水平也随之增加，其中D4组鱼体肝脏Δ6 *fad-a*和*elovl5-a* mRNA表达量最高，且其LC-PUFA含量显著高于D2和D3组。由此可见，植物油饲料尽管不影响鲤正常生长，但影响了鱼体肝组织LC-PUFA含量。然而，饲料中添加适宜的LNA/LA比(1.09∶1)可促进鲤肝脏Δ6 *fad-a*和*elovl5-a* mRNA的表达，最大限度地提高鱼体内源LC-PUFA合成量，从而有效地降低植物油饲料对鱼体组织LC-PUFA含量的负面影响。

关键词: 鲤；LNA/LA；LC-PUFA；Δ6 *fad*；*elovl5*
中图分类号: S 963.7 **文献标志码:** A

多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)一般指碳原子数≥18、双键数≥2的直链脂肪酸；其中，碳原子数≥20、双键数≥3的PUFA称为长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)。二十碳四烯酸(20:4n6, ARA)、二十碳五烯酸(20:5n3, EPA)和二十二碳六烯酸(22:6n3, DHA)等功能性LC-PUFA在鱼类个体发育、生长、存活、色素沉积、应激和疾病抵抗力，以及大脑、视力和神经系统中起着重要作用[1]。在机体内，内源性LC-PUFA通常由其18碳PUFA (18C PUFA)前体经去饱和作用以及碳链延长作用而合成。一般认为，淡水鱼具有将亚油酸(18:2n6, LA)和α-亚麻酸(18:3n3, LNA)等18C PUFA合成具有重要生理功能的LC-PUFA的能力[1]。因此，富含18C PUFA的植物油可以满足淡水鱼对必需脂肪酸(essential fatty acids, EFA)的需求[2-8]。

随着对EFA需求的深入研究，研究者认为可将鱼类EFA的需求量分为3个层次[9]：①低需求水平：能满足鱼体基本生理需求，预防典型的营养性疾病(该类型的研究成果主要基于短期内养殖幼鱼所获得)；②较高需求水平：能长期维持鱼体快速健康生长；③高需求水平：以保证鱼

收稿日期： 2016-07-03 **修回日期：** 2016-09-29
资助项目： 国家自然科学基金(31402311，31602176)；河南省高校科技创新团队支持计划(14IRTSTHN013)；河南省高等学校重点科研项目(16A240003)；河南师范大学青年科学基金(2015QK32)；河南师范大学博士启动基金(qd14180)
通信作者： 聂国兴，E-mail：niegx@htu.cn

体肌肉n-3 LC-PUFA含量。相比于鱼油，植物油对淡水鱼的生长性能影响不大，但显著降低了绝大多数鱼体肌肉LC-PUFA含量(特别是n-3 LC-PUFA含量)，致使鱼肉品质大打折扣[6-8]。

为了降低植物油对鱼类肌肉LC-PUFA含量的影响，研究者采用了多种营养策略以最大限度地提高鱼体内源LC-PUFA合成量[10-15]。例如，饲料中添加芝麻素、染料木素和硫辛酸等活性物质[10-11]；调整不同脂肪源饲料的养殖周期[8，12]；饲料中添加适宜的LNA/LA比，以维持LNA和LA的平衡[13-15]。上述营养策略主要是通过提高鱼体内脂肪酸去饱和酶(fatty acid desaturase, Fad)和长链脂肪酸碳链延长酶(elongases of very long-chain fatty acids, Elovl)基因的表达量及其酶活，而促进机体LC-PUFA的生物合成。

鲤(*Cyprinus carpio*)是我国养殖历史最长的鱼，也是主要的水产养殖对象之一。Ren等[2]从鲤体内成功克隆了LC-PUFA合成关键酶基因——Δ6 *fad*和*elovl5*，从分子水平上证实了LA和LNA为鲤EFA，为植物油能满足鲤EFA的需求提供理论支持。近年来，国内外学者对鲤配合饲料中LA和LNA的适宜添加量进行了深入研究[16-17]。但是，有关饲料中LNA/LA适宜比的研究甚少。因此，为了探讨饲料中LNA/LA比对鲤生长性能和肝脏LC-PUFA合成代谢的影响，本研究以鱼油和混合植物油为脂肪源配制5组饲料，养殖8周。养殖结束后，比较分析不同处理组的生长性能、肝脏脂肪酸组成，以及Δ6 *fad-a/b*、*elovl5-a/b* mRNA表达水平，为确定鲤幼鱼配合饲料中LNA/LA适宜比提供实验证据，为植物油在鲤配合饲料中高效利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验对象及饲料

本研究以豆粕、菜粕和棉粕为蛋白源，鱼油和混合植物油(花生油和紫苏籽油)为脂肪源，设计5组不同LNA/LA比的等氮等脂饲料。其中，D1组为鱼油对照组。D2~D5组以花生油(含37.5% LA)和紫苏籽油(含17.7% LA和57.4% LNA)为脂肪源，对应的LNA/LA比分别为0.02、0.46、1.09和1.53，将所有的原料混合均匀后，加入适量的蒸馏水再次混匀，用硬颗粒挤压机(上海渔船渔机研究所)压制成直径为1.5 mm的硬颗粒料，自然晾干，置于–20 °C冰箱中保存备用。实验饲料配方及营养成分见表1。

实验所用鲤幼鱼购于河南聚丰科技有限公司。挑选规格一致的健康幼鱼于水族缸中暂养2周。暂养期间，统一采用5种饲料等量混合投喂。养

表 1 饲料配方及营养成分(风干物质基础)

Tab. 1 Ingredients and composition of experimental diets (dry matter basis) %

饲料原料 ingredient	饲料组 dietary treatments				
	D1	D2	D3	D4	D5
豆粕 soybean meal	25	25	25	25	25
菜籽粕 rapeseed meal	25	25	25	25	25
棉籽粕 cottonseed meal	17	17	17	17	17
次粉 wheat middling	10	10	10	10	10
米糠 rice bran	13.2	13.2	13.2	13.2	13.2
混合维生素 vitamin mixture[1]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
混合矿物质 mineral mixture[2]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
氯化胆碱 choline chiorlde	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
磷酸二氢钙 dicalcium phosphate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
赖氨酸 L-Lysine	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
蛋氨酸 DL-methionine	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
鱼油 fish oil	8	0	0	0	0
花生油 peanut oil	0	8	6.13	3.67	2.81
紫苏籽油 perilla oil	0	0	1.87	4.33	5.19
常规成分 proximate composition					
干物质 dry matter	86.55	87.48	87.39	86.71	87.96
粗蛋白 crude protein	32.10	32.32	31.70	31.97	32.34
粗脂肪 crude lipids	8.13	8.02	7.97	8.11	8.03
灰分 ash	6.61	6.43	6.40	6.24	6.28

注：1. 每千克混合矿物质中含有钾100 g，镁30 g，铁8 g，钼1 g，锌30 g，锰2 g，钴1 g，碘500 mg，硒40 mg。2. 每千克混合维生素中含有维生素$A_3$10000 IU，维生素$D_3$30000 IU，维生素$E_3$1000 IU，维生素K_3 20 mg，维生素$B_1$20 mg，$B_2$480 mg，$B_6$360 mg，B_{12}100 mg，烟酸170 mg，泛酸钙80 mg，叶酸170 mg，生物素10 mg，肌醇8 g，单磷脂10 g

Notes: 1. one kilogram of mineral mix containing the following: K 100 g, Mg 30 g, Fe 8 g, Mo 1 g, Zn 30 g, Mn 2 g, Co 1 g, I 500 mg, Se 40 mg. 2. one kilogram of vitamin mix containing the following: $A_3$10000 IU, $D_3$30000 IU, $E_3$1000 IU, K_3 20 mg, B_1 20 mg, B_2 480 mg, B_6 360 mg, B_{12} 100 mg, nicotinic acid 170 mg, calcium pantothenate 80 mg, folic acid 170 mg, biotin 10 mg, inositol 8 g, C-monophopholipid 10 g

殖实验开展前，实验鱼禁食24 h，经0.01% MS-222麻醉后，用纱布抹干体表水分，逐一称重统计初始体质量。450尾鱼随机分配至15个水族缸(直径0.9 m, 高1 m)，每缸30尾鱼，实验分5组(每组3平行)，养殖8周。养殖期间，为保持良好的水质状况，每天换水1次(换水量为总体积的1/2)；每天饱食投喂2次(8:30，16:30)；每天除了吸底、换水和投饵时停气外，其他时间保持连续充气；饲养水温为(20±3) °C。

1.2　样本采集与分析

实验开始时，取3尾全鱼和9份肝脏组织作为初始样本。实验结束时，每缸实验鱼逐一称重并统计终末体质量；同时，每缸随机取1尾全鱼及6份肝脏组织作为终末样本。所有全鱼与肝组织样本经液氮速冻后，存于–80 °C冰箱保存备用。实验饲料和全鱼生化成分的分析方法与笔者前期的研究方法一致[18]。

1.3　饲料与肝脏脂肪酸成分测定

采用经典的氯仿—甲醇法提取鱼体肝脏的总脂。采用三氟化硼乙醚(ca. 48%, Acros Organics, USA)催化法进行脂肪酸甲酯化。脂肪酸的检测使用Agilent 7890B气相色谱仪进行分析(色谱柱：Agilent HP-88，100 m×0.25 mm，0.20 μm)。脂肪酸成分的鉴定根据Sigma公司的脂肪酸标准品，采用面积归一法计算各组脂肪酸所占的面积百分比。总脂与脂肪酸甲酯实验具体操作步骤见Xie等[18]，各组实验饲料脂肪酸组成见表2。

1.4　RNA提取与实时定量PCR分析

按Trizol试剂盒(TaKaRa，大连)说明书提取鱼体肝脏总RNA。使用RNA反转录试剂盒(Invitrogen，美国)合成cDNA。以*β-actin*基因为内参，采用实时定量PCR(Real- time PCR)分析各组肝脏组织中Δ6 *fad-a/b*、*elovl*5-*a/b*基因的表达量。参考Ren等[2]合成特异性引物，其序列见表3。Real-time PCR反应体系为ddH_2O 6 μL，SYBR Green Supermix 10 μL，引物(10 μmol/L)各1 μL，cDNA(10 ng/μL)2 μL。反应条件为94 °C变性5 min；95 °C 10 s，58 °C 20 s，72 °C 20 s，45个循环；95 °C 5 s，65 °C 1 min，40 °C降温 10 s。每个样本重复3次。采用循环阈值(CT)法[19]统计分析基因的相对表达量。

表 2　饲料主要脂肪酸组成(面积)

Tab. 2　Fatty acid composition of experimental diets (area)　　%

主要脂肪酸 main fatty acids	饲料组别 dietary treatments				
	D1	D2	D3	D4	D5
C14:0	7.40	2.50	2.11	1.44	1.25
C16:0	17.04	18.54	15.77	16.84	15.62
C16:1	3.18	1.28	1.55	1.09	1.78
C18:0	3.17	3.14	3.54	3.61	3.57
C18:1	14.42	19.02	18.41	18.14	17.53
C18:2*n*6 (LA)	4.07	34.71	30.85	23.34	19.42
C18:3*n*6	0.42	/	/	/	/
C20:3*n*6	0.37	/	/	/	/
C20:4*n*6 (ARA)	1.31	/	/	/	/
C18:3*n*3 (LNA)	3.95	0.54	14.07	25.44	29.8
C18:4n3	0.30	/	/	/	/
C20:4*n*3	0.43	/	/	/	/
20:5*n*3 (EPA)	2.71	/	/	/	/
C22:5*n*3 (DPA)	0.52	/	/	/	/
C22:6*n*3 (DHA)	7.31	/	/	/	/
SFA	28.31	24.18	22.54	22.44	21.54
MUFA	25.64	22.34	20.16	19.23	19.31
n-3 PUFA	11.34	0.54	14.07	35.44	35.53
n-6 PUFA	6.45	34.71	30.85	27.44	23.24
LNA/LA	0.97	0.02	0.46	1.09	1.53

注：/.脂肪酸未检测
Notes: /. the fatty acid is not detected

1.5　计算及统计分析

鱼体增重率、特定生长率、饲料效率和存活率等指标参照以下公式计算：

增重率(WGR，%)=(终末体质量–初始体质量)/初始体质量×100

特定生长率(SGR，%/d)=(ln终末体质量–ln初始体质量)/养殖天数×100

饲料系数(FCR)=鱼体湿增重/采食干饲料重

存活率(SR，%)=(实验结束时活鱼数)/(实验开始时活鱼数)×100

数据以平均值±标准误(mean±SE)表示，利用SPSS 17.0程序通过单因素方差分析(One-Way ANOVA)比较各实验组间的差异性，差异显著水平为0.05。

表 3 关键酶基因实时定量PCR引物

Tab. 3 Primers for Real-time PCR determinations of the key enzyme genes expression

基因 genes	引物名 primers	序列 5′–3′ sequence 5′–3′	参考文献 reference
fads6a	Fa S	ATCGGACACCTGAAGGGAGCG	[2]
	Fa A	CATGTTGAGCATGTTGACATCCG	
fads6b	Fb S	GTACCAATGGGAGGTTCGGCAC	[2]
	Fb A	GAGTTGAAGGTTTGGATGAAATGCATG	
elovl5a	Ea S	GTCCTGACCATGTTCCAGACATCTTG	[2]
	Ea A	CTGTAAGCGGACGAGGTGTCGTC	
elovl5b	Eb S	GTCCTGACCATGTTCCAGACATCTTG	[2]
	Eb A	CATGAAGCTCCTCTACTGCGCTG	
β-actin	BS	CGCCCCAGACATCAGGGTG	[2]
	BA	CACAGATCATGTTTGAGACCTTCAACAC	

2 结果

2.1 饲料LNA/LA比对鱼体生长性能、饲料利用率和体成分的影响

养殖8周之后，饲料LNA/LA比对鱼体存活率无显著影响(P>0.05)。但是，饲料LNA/LA比显著影响了鱼体生长性能指标。其中，D2、D4组鱼体增重率和特定生长率显著高于D3、D5处理组(P<0.05)。各组间饵料系数无显著差异(表4)。全鱼体成分分析结果显示，各组间鱼体水分、粗蛋白、粗脂肪、灰分等指标的差异不显著(P>0.05)(表4)。

2.2 饲料LNA/LA比对鱼体肝脏脂肪酸组成的影响

与对照组相比，植物油源饲料显著影响了鱼体肝脏组织脂肪酸组成。各实验组鱼体肝脏ARA、EPA、DHA以及LC-PUFA水平显著低于对照组(P<0.05)。然而，鱼油组鱼体肝脏中18:4n-3和20:4n-3水平却显著低于植物油组。而且，该两种脂肪酸的含量随着饲料中LNA/LA比升高而升高。在各实验组中，鱼体肝脏LNA、ARA、EPA、DHA以及LC-PUFA水平含量随饲料中LNA/LA比例升高而升高，且D4组(LNA/LA=1.09)肝脏LC-PUFA水平最高。

2.3 饲料LNA/LA比对鱼体肝脏Δ6 *fad*、*elovl*5 mRNA表达水平的影响

实验组D2~D5鱼体肝脏Δ6 *fad-a*、*elovl*5-*a* mRNA表达水平均显著高于对照组(P<0.05)(图1)，但是，Δ6 *fad-b*、*elovl*5-*b* mRNA水平在各处理组间的差异性不显著(P>0.05)。当饲料中LNA/LA=

表 4 不同处理组鲤生长性能和体成分分析

Tab. 4 Growth performance and proximate composition of *C. carpio* at different treatments

生长指标 growth indexes	饲料组别 dietary treatments				
	D1	D2	D3	D4	D5
初始体质量/g initial weight	8.12±0.03	8.04±0.07	7.97±0.08	8.20±0.09	8.07±0.03
终末体质量/g final weight	19.03±0.30[a]	18.93±0.57[a]	16.8±0.20[b]	20.06±0.63[a]	17.77±0.41[ab]
增重率/% WGR	134.44±2.93[ab]	135.48±6.05[a]	110.82±4.33[b]	144.60±5.11[a]	120.13±4.22[ab]
特定生长率/(%/d) SGR	1.52±0.05[ab]	1.53±0.07[a]	1.33±0.11[b]	1.59±0.08[a]	1.41±0.11[ab]
饲料系数 FCR	1.5±0.03	1.63±0.04	1.6±0.07	1.61±0.07	1.54±0.05
存活率/% SR	98.89	100	96.67	97.78	93.33
体成分 proximate composition					
水分/% moisture	72.37±0.75	69.65±2.96	68.49±0.10	67.71±4.29	70.29±0.91
粗蛋白/% crude protein	16.75±0.06	17.47±0.95	16.09±2.11	18.11±1.44	16.36±0.05
粗脂肪/% crude lipids	7.00±0.18	8.21±1.12	7.99±0.65	8.27±2.56	7.94±1.36
灰分/% ash	3.49±0.04	3.81±0.28	3.76±0.38	3.32±0.28	3.20±0.07

注：同行数据标有不同小写字母表示组间差异显著(P<0.05)，下同

Notes: values within the same row with different letters are significantly different (P<0.05), the same below

表 5　各处理组鲤肝脏脂肪酸组成(面积)

Tab. 5　Main fatty acids composition of the liver of *C. carpio* at different treatments (area)　%

主要脂肪酸　main fatty acids	饲料组别　dietary treatments				
	D1	D2	D3	D4	D5
C14:0	2.18±0.10	3.09±0.15	2.75±0.37	3.25±0.54	2.79±0.35
C16:0	37.87±0.8[a]	30.24±0.34[c]	31.45±0.68[c]	33.62±0.51[b]	32.73±1.78[b]
C16:1	13.27±0.93[a]	9.15±0.08[b]	8.99±0.18[b]	11.31±0.29[a]	11.10±1.37[ab]
C18:0	5.28±0.35[a]	4.46±0.75[ab]	4.16±0.05[b]	4.57±0.27[ab]	5.11±0.47[a]
C18:1	13.65±1.11[c]	17.77±0.37[a]	17.13±1.44[a]	18.49±0.06[b]	19.01±1.11[b]
C18:2*n*6 (LA)	4.96±0.32[d]	32.86±0.76[a]	24.25±0.54[b]	18.54±0.34[c]	17.82±0.51[c]
C18:3*n*6	0.14±0.03[c]	0.23±0.02[c]	0.83±0.05[b]	0.87±0.01[ab]	0.68±0.10[b]
C18:3*n*3 (LNA)	3.03±0.01[d]	0.26±0.02[a]	8.21±0.02[b]	15.16±0.02[c]	18.13±0.02[c]
C20:3*n*6	0.21±0.20[d]	1.87±0.10[a]	1.71±0.12[a]	0.99±0.06[bc]	1.09±0.17[b]
C20:4*n*6 (ARA)	2.51±0.26[a]	1.70±0.10[b]	1.74±0.03[b]	1.28±0.11[c]	1.05±0.22[c]
C18:4n3	0.22±0.04[b]	0.33±0.02[b]	0.43±0.10[a]	0.35±0.01[a]	0.37±0.04[a]
C20:4*n*3	0.02±0.01[d]	0.33±0.02[c]	0.32±0.09[c]	0.58±0.04[a]	0.51 ±0.03[ab]
20:5*n*3 (EPA)	0.68±0.04[a]	0.09±0.02[c]	0.14±0.03[c]	0.40±0.02[b]	0.39 ±0.01[b]
C22:5*n*3 (DPA)	1.70±0.20[a]	0.23±0.02[c]	0.30±0.03[d]	0.47±0.04[bc]	0.43 ±0.02[bc]
C22:6*n*3 (DHA)	8.5±0.13[a]	1.72±0.14[c]	2.38±0.07[dc]	4.28±0.23[b]	3.56±0.40[c]
SFA	45.33±1.25[a]	37.79±0.56[b]	38.36±1.10[b]	41.44±0.23[ab]	40.63±1.85[ab]
MUFA	39.92±0.18[b]	46.92±0.45[a]	46.12±1.62[a]	40.80±0.35[b]	41.91±1.16[ab]
n-3 PUFA	14.13±0.16[a]	3.63±0.18e[e]	11.25±0.32[c]	21.65±0.33[b]	23.63±0.39[c]
n-6 PUFA	7.82±0.38[d]	35.66±0.98[a]	28.53±0.43[a]	21.68±0.30[b]	20.64±0.80[bc]
LC-PUFA	13.62±0.43[a]	5.94±0.52[c]	6.38±0.41[bc]	8.00±0.65[b]	6.78±0.36[b]

1.09时，鱼体肝脏Δ6 *fad-a*、*elovl*5-*a* mRNA表达水平最高，说明LNA/LA为1.0左右时最适合鱼体肝脏合成LC-PUFA。

3　讨论

同其他脊椎动物一样，ARA、EPA和DHA等LC-PUFA对鱼类的正常生长发育至关重要[1]。一般认为，淡水鱼体内具有合成LC-PUFA所需要的一系列Fads及Elovl，可利用富含LNA和LA的植物油合成LC-PUFA。然而，绝大多数海水鱼缺乏*fads*及*elovl*基因或这些基因酶活性很低，难以将LNA和LA转化为LC-PUFA。所以，海水鱼的养殖依赖于富含LC-PUFA的鱼油[1]。近年来，研究者们在植物油替代鱼油方面做了大量研究，发现植物油(缺乏LC-PUFA)饲料显著影响了海水鱼的生长[20-22]，但对淡水鱼的生长无影响，而且摄食植物油饲料的草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)和鳡(*Elopichthys bambusa*)的生长性能更佳[6-7, 23]。同样，本研究也发现植物油组鱼体生长指标与鱼油组无显著性差异，且D2和D4组增长率和特定生长率的数值还高于鱼油组。以上研究表明，PUFA作为鱼类的EFA，淡水鱼与海水鱼对其种类的需求截然不同。

按照EFA的不同类型，可将鱼类分为3种：①仅为n-6 PUFA；②n-3和n-6 PUFA；③仅为n-3 PUFA。鲤属于第2种类型，对n-3和n-6 PUFA都为必需[17]。Takeuchi [17]研究发现，鲤对EFA的需求为1% LA和0.5%~1% LNA。同对照组相比，植物油组对鲤体生长性能无影响，这说明本研究的植物油饲料能满足鱼体对EFA的需求。另外，本研究进一步发现，饲料中LNA/LA水平显著影

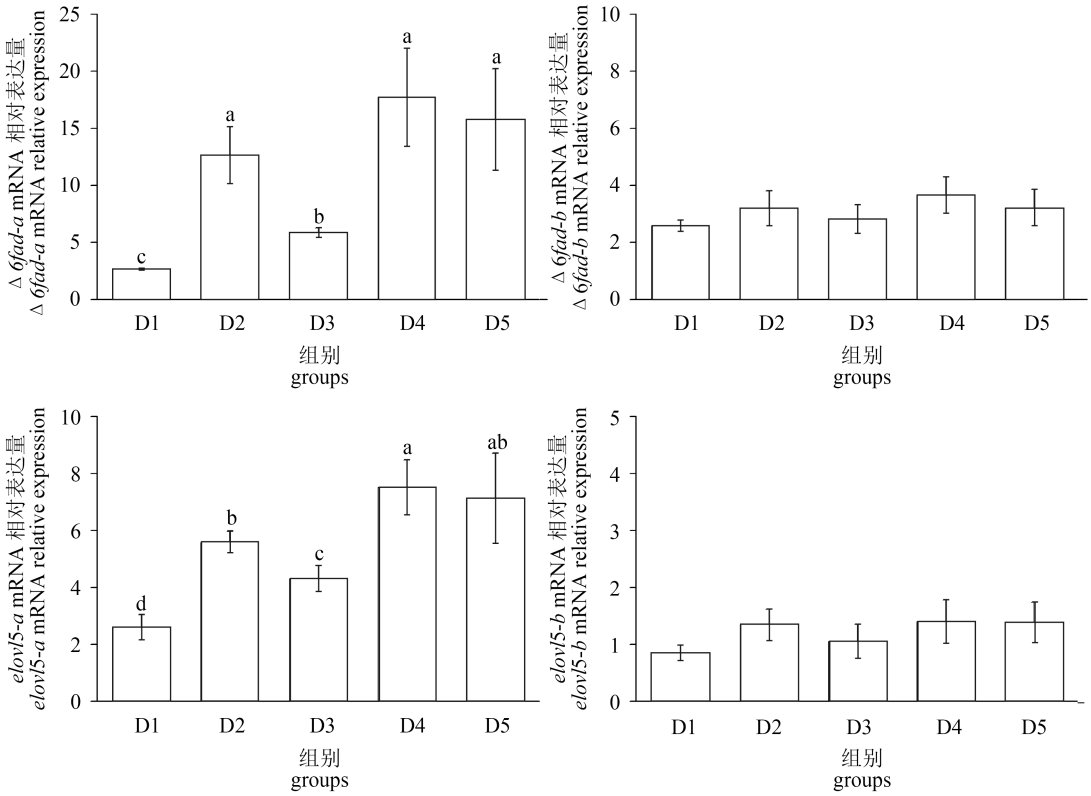

图 1 不同处理组肝脏Δ6 *fad*、*elovl*5 mRNA相对表达量

柱形图上方不同字母代表不同组间存在显著性差异(P<0.05)

Fig. 1 mRNA expression of Δ6 *fad*, *elovl*5 relative to *β-actin* in liver of *C. carpio* at different treatments

Different letters above the columns show significant differences between different groups (P<0.05)

响了鲤生长。其中，D4组(LNA/LA=1.09)鱼体的生长表现最好，且显著高于D3(LNA/LA=0.46)组。Tan等[24]发现，黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)摄食LNA/LA为1.17和2.12的饲料时，鱼体生长性能显著高于其他组。相似的是，LNA/LA为2.5和1饲料组的河鲈(*Perca fluviatilus*)生长性能高于LNA/LA为1.48和2.45饲料组[25]。Wu等[13]研究发现，随着饲料中LNA/LA比例的升高，点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)幼鱼的生长效果也越好，当LNA/LA=3.3时，鱼体获得最大增重率。饲料中LNA/LA比影响鱼体生长性能的现象，佐证了*n*-3和*n*-6 PUFA水平保持平衡对鱼体生长的重要性[6]。

同其他研究一样，本研究中鱼体肝脏脂肪酸组成也基本反映了其所摄食饲料的脂肪酸组成[16，20，24-25]。尽管植物油组鱼体肝脏ARA、EPA和DHA水平低于鱼油组，但各植物油组鱼体肝脏C18:3n6、C18:4n3、C20:3n6、C20:4n3、22:5n3等中间代谢产物高于鱼油组。同其他淡水鱼一样[6-7]，这表明植物油脂肪源能促进鲤体内LC-PUFA从头合成。值得注意的是，随着所摄食饲料中的LNA/LA比增加，鲤肝脏LNA含量升高而LA含量下降。同时，DHA和ARA的含量分别随饲料中LNA/LA比升高而降低。在镜鲤相关实验中也发现，随着饲料中LA水平增加，鱼体肝脏组织中ARA水平升高，而EPA和DHA水平下降[26]。与其他相关研究一致[13，25，27]，各植物油组饲料中LNA与LA总水平相差不大，但是鲤肝脏LNA与LA总水平随着饲料中LNA/LA比例升高而减少。鱼体组织脂肪酸的组成从一定程度上也表现了EFAs在体内的去饱和及延长反应等代谢途径的效率[28]。Senadheera等[27]研究发现LNA在鱼体中更易被用来转化成LC-PUFA或氧化供能，而LA更易储存于体内。

为了探讨植物油在一些重要商品鱼养殖中的应用，大量研究者分析了植物油替代鱼油对鱼体LC-PUFA合成代谢的影响[14-15，27-28]。本研究中也分析了饲料脂肪源对鲤LC-PUFA代谢关键基因——Δ6 *fad*和*elovl*5 mRNA表达的影响。结果显示，饲料脂肪酸组成显著影响了Δ6 *fad-a*和*elovl5-a*

mRNA的表达，而对Δ6 *fad-b*和*elovl*5-*b* mRNA表达影响不大。与此相似的是，Ren等[2]发现饲料中不同脂肪源只影响鲤Δ6 *fad-a*和*elovl*5-*a* mRNA的表达。这表明Δ6 Fad-a和Elovl5-a在调控鲤LC-PUFA合成代谢过程中起着关键作用，而Δ6 Fad-b和Elovl5-b的功能有待于进一步分析。与鱼油组相比，植物油组鱼体肝脏Δ6 *fad-b*和*elovl*5-*b* mRNA水平显著上调。相似的结果在海水鱼和其他淡水鱼中也有发现，植物脂肪源都促进了机体LC-PUFA关键酶基因的表达[14-15，27-28]，这可能是因为植物油(缺乏LC-PUFA)对体内LC-PUFA代谢无反馈抑制效应[29]。此外，研究者们认为18C PUFA可作为脂代谢关键转录因子的配体，参与激活LC-PUFA关键基因的表达[30]。

除了饲料脂肪源之外，饲料LNA/LA比也参与LC-PUFA合成代谢关键酶基因的表达调控。关键酶基因的功能研究表明，鱼类Δ6 Fad和Elovl5对C18 PUFA底物的选择性比较偏向n-3系列[14-15，31]。大量养殖实验发现，饲料中添加高比例的LNA/LA可提高鱼体Δ6 *fad*和*elovl*5基因的表达及相关酶活性[14-15，27-28]。然而，当饲料中LNA水平超过一定量时，同样也会抑制关键酶基因的表达[14-15]。相似的是，本研究发现D4组(LNA/LA=1.09)鱼体肝脏Δ6 *fad-a*、*elovl*5-*a* mRNA表达水平最高。因此，为了提高养殖鱼体生长及内源性LC-PUFA合成水平，其配合饲料中LNA/LA比例需适宜，以保证LNA和LA之间的平衡。

4　结论

本研究从鱼体生长性能、肝脏脂肪酸组成，肝脏Δ6 *fad*和*elovl*5基因表达等指标综合分析，发现植物油饲料中添加适宜的LNA/LA比(1.09∶1)可促进鲤肝脏Δ6 *fad-a*和*elovl*5-*a* mRNA的表达，最大限度地提高鱼体内源LC-PUFA合成量，从而有效地降低植物油饲料对鱼体组织LC-PUFA含量的负面影响。本研究为确定鲤幼鱼配合饲料中LNA/LA适宜比提供实验证据，为植物油在鲤配合饲料中高效利用奠定基础，具有一定的生产实践价值。

参考文献：

[1] Sargent J R, Tocher D R, Bell J G. The lipids[M]//Halver J E, Hardy R W. Fish Nutrition. San Diego, CA: Academic Press, 2002: 181-257.

[2] Ren H T, Yu J H, Xu P, *et al*. Influence of dietary fatty acids on muscle fatty acid composition and expression levels of Δ6 desaturase-like and Elovl5-like elongase in common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 163(2): 184-192.

[3] 单世涛. 油脂对鲤鲫鱼生长、血清生化指标及脂质代谢的影响研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.
Shan S T. The study on effect of oil on growth, serum biochemical indices, lipid metabolism of common carp and Crucian carp[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2009 (in Chinese).

[4] 潘瑜, 毛述宏, 关勇, 等. 饲料中不同脂肪源对鲤鱼生长性能、脂质代谢和抗氧化能力的影响[J]. 动物营养学报, 2012, 24(7): 1368-1375.
Pan Y, Mao S H, Guan Y, *et al*. Effects of different lipid sources in diets on growth performance, lipid metabolism and antioxidant ability of common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2012, 24(7): 1368-1375(in Chinese).

[5] 周继术, 吉红, 王建华, 等. 鱼油对鲤生长及脂质代谢的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(2): 275-280.
Zhou J S, Ji H, Wang J H, *et al*. Influence of fish oil on growth and lipid metabolism in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Periodical of Ocean University of China, 2008, 38(2): 275-280(in Chinese).

[6] 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.

[7] 张媛媛, 刘波, 戈贤平, 等. 不同脂肪源对异育银鲫生长性能、机体成分、血清生化指标、体组织脂肪酸组成及脂质代谢的影响[J]. 水产学报, 2012, 36(7): 1111-1118.
Zhang Y Y, Liu B, Ge X P, *et al*. Effect of dietary oil sources on growth performance, body composition, the serum biochemical indices, fatty acids composition and lipid metabolism of *Carassius auratus gibelio*[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(7): 1111-1118(in Chinese).

[8] Montero D, Robaina L, Caballero M J, *et al*. Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: a time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet[J]. Aquaculture, 2005,

248(1-4): 121-134.

[9] Tocher D R. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective[J]. Aquaculture, 2015, 449: 94-107.

[10] Schiller V A L, Trattner S, Mráz J, *et al*. Fatty acids and gene expression responses to bioactive compounds in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes[J]. Neuroendocrinology Letters, 2011, 32(Suppl 2): 41-50.

[11] Zajic T, Mraz J, Pickova J. Evaluation of the effect of dietary sesamin on white muscle lipid composition of common carp (*Cyprinus carpio* L.) juveniles[J]. Aquaculture Research, 2015. DOI: 10.1111/are.12833.

[12] Yılmaz H A, Corraze G, Panserat S, *et al*. Effects of alternate feeding with different lipid sources on fatty acid composition and bioconversion in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. Aquaculture, 2016, 464: 28-36.

[13] Wu F C, Chen H Y. Effects of dietary linolenic acid to linoleic acid ratio on growth, tissue fatty acid profile and immune response of the juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*[J]. Aquaculture, 2012, 324-325: 111-117.

[14] Xie D Z, Chen F, Lin S Y, *et al*. Cloning, functional characterization and nutritional regulation of Δ6 fatty acyl desaturase in the herbivorous euryhaline teleost *Scatophagus argus*[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e90200.

[15] Xie D Z, Chen F, Lin S Y, *et al*. Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in the euryhaline herbivorous teleost *Scatophagus argus*: functional characterization, tissue expression and nutritional regulation of two fatty acyl elongases[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2016, 198: 37-45.

[16] 周小秋, 李洪琴, 刘汉元, 等. ω3UFA和ω6UFA对幼建鲤生产性能和免疫功能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2005, 41(8): 27-29.
Zhou X Q, Li H Q, Liu H Y, *et al*. Effect of ω3UFA and ω6UFA on growth performance and immune function of young carp[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2005, 41(8): 27-29(in Chinese).

[17] Takeuchi T. Essential fatty acid requirements in carp[J]. Archiv für Tierernaehrung, 1996, 49(1): 23-32.

[18] Xie D, Wang S, You C, *et al*. Characteristics of LC-PUFA biosynthesis in marine herbivorous teleost *Siganus canaliculatus* under different ambient salinities[J]. Aquaculture Nutrition, 2015, 21(5): 541-551.

[19] Whelan J A, Russell N B, Whelan M A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR[J]. Journal of Immunological Methods, 2003, 278(1-2): 261-269.

[20] Yılmaz H A, Eroldoğan O T. Effects of fish oil substitution with two different vegetable oil classes on fatty acid digestibility in Juvenile European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*[J]. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2015, 15(1): 1-12.

[21] Benedito-Palos L, Ballester-Lozano G F, Simó P, *et al*. Lasting effects of butyrate and low FM/FO diets on growth performance, blood haematology/biochemistry and molecular growth-related markers in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)[J]. Aquaculture, 2016, 454: 8-18.

[22] Mozanzadeh M T, Agh N, Yavari V, *et al*. Partial or total replacement of dietary fish oil with alternative lipid sources in silvery-black porgy (*Sparidentex hasta*)[J]. Aquaculture, 2016, 451: 232-240.

[23] 陈海燕, 朱邦科, 樊启学, 等. 不同脂肪源对鳡幼鱼生长、血清生化组成和肝脏的影响[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(2): 116-122.
Chen H Y, Zhu B K, Fan Q X, *et al*. Effect of dietary lipid sources on growth, blood biochemical indices and liver of juvenile yellowcheek carp (*Elopichthys bambusa*)[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2013, 32(2): 116-122(in Chinese).

[24] Tan X Y, Luo Z, Xie P, *et al*. Effect of dietary linolenic acid/linoleic acid ratio on growth performance, hepatic fatty acid profiles and intermediary metabolism of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Aquaculture, 2009, 296(1-2): 96-101.

[25] Blanchard G, Makombu J G, Kestemont P. Influence of different dietary 18: 3n-3/18: 2n-6 ratio on growth performance, fatty acid composition and hepatic ultrastructure in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*[J]. Aquaculture, 2008, 284(1-4): 144-150.

[26] Tian J J, Lei C X, Ji H. Influence of dietary linoleic acid (18: 2n-6) and α-linolenic acid (18: 3n-3) ratio on fatty acid composition of different tissues in freshwater fish Songpu mirror carp, *Cyprinus carpio*[J]. Aquaculture Research, 2015. DOI: 10.1111/are.12832.

[27] Senadheera S D, Turchini G M, Thanuthong T, *et al*. Effects of dietary α-linolenic acid (18: 3n-3)/linoleic acid (18: 2n-6) ratio on fatty acid metabolism in Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(3): 1020-1030.

[28] Brown J E. A critical review of methods used to estimate linoleic acid Δ6-desaturation *ex vivo* and *in vivo*[J].

European Journal of Lipid Science and Technology, 2005, 107(2): 119-134.

[29] Tocher D R, Bell J G, Dick J R, *et al*. Effects of dietary vegetable oil on atlantic salmon hepatocyte fatty acid desaturation and liver fatty acid compositions[J]. Lipids, 2003, 38(7): 723-732.

[30] Vagner M, Robin J H, Zambonino-Infante J L, *et al*. Ontogenic effects of early feeding of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a range of dietary *n*-3 highly unsaturated fatty acid levels on the functioning of polyunsaturated fatty acid desaturation pathways[J]. British Journal of Nutrition, 2009, 101(10): 1452-1462.

[31] Kabeya N, Yamamoto Y, Cummins S F, *et al*. Polyunsaturated fatty acid metabolism in a marine teleost, Nibe croaker *Nibea mitsukurii*: functional characterization of Fads2 desaturase and Elovl5 and Elovl4 elongases[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 188: 37-45.

Effects of dietary LNA/LA ratio on growth, hepatic fatty acid profiles and △6*fad*, *elovl*5 mRNA expression in common carp (*Cyprinus carpio*)

XIE Dizhi , YU Ruomeng , CHEN Fang , LU Ronghua , YANG Liping , MENG Xiaolin , NIE Guoxing *

(*Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation*, *College of Fisheries*, *Henan Normal University*, *Xinxiang* 453007, *China*)

Abstract: To evaluate the effects of dietary α-linolenic acid (LNA, 18:3n-3)/ linoleic acid (LA, 18:2n-6) ratios on growth performance and LC-PUFA biosynthesis in common carp, we designed five iso-nitrogenous and iso-energetic diets for eight weeks of feeding trial. The control diet (D1) was only supplemented with fish oil as lipid source, while the mix of peanut oil and perilla oil with varying LNA/LA ratios of 0.02, 0.46, 1.09 and 1.53 was used as lipid source for the experimental groups [D2, D3, D4 and D5, VO (vegetable oil) diets], respectively. The results showed that, there were no differences among control group and VO groups in WGR, SGR and FCR. Compared with the control group, the hepatic LC-PUFA levels were significantly low in VO groups, whereas, the hepatic Δ6 *fad-a* and *elovl*5-*a* mRNA expression levels were significantly improved by VO diets. Among the four VO groups, the WGR and SGR were significantly affected by dietary LNA/LA ratios, with higher growth in D4 and D2 groups. Additionally, the hepatic LC-PUFA levels, Δ6 *fad-a* and *elovl*5-*a* mRNA expression levels were higher in the fish fed higher ALA/LA ratios diets. In particular, the highest hepatic LC-PUFA levels were observed in D4 groups, and consistent with this, hepatic Δ6 *fad-a* and *elovl*5-*a* mRNA with the highest level were also showed in D4 groups. The results indicate that VO diets have a negative effect on the hepatic LC-PUFA levels in common carp. However, the optimal balance LNA/LA supplement (1.09∶1) have been successful in raising the efficiency of LC-PUFA production by improving the hepatic Δ6 *fad-a* and *elovl*5-*a* mRNA expression, and decreasing the negative impact of VO diets on tissue LC-PUFA concentration in this fish species.

Key words: *Cyprinus carpio*; LNA/LA; LC-PUFA; Δ6 *fad*; *elovl*5

Corresponding author: NIE Guoxing. E-mail: niegx@htu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31402311, 31602176); Program for Innovative Research Team (in Science and Technology) in University of Henan Province (14IRTSTHN013); Key Research Project in University of Henan Province (16A240003); Youth Scientific Foundation of Henan Normal University (2015QK32); Doctoral Foundation of Henan Normal University (qd14180)