

文章编号: 1000-0615(2017)04-0588-14

DOI: 10.11964/jfc.20160710477

饲料中花生四烯酸对发育前期大菱鲆亲鱼 性类固醇激素合成的影响

张圆琴^{1,2}, 徐后国², 曹林², 卫育良², 郑珂珂², 梁萌青^{1,2,3*}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 为研究饲料中不同水平的花生四烯酸(arachidonic acid, ARA)对发育前期的大菱鲆亲鱼性类固醇激素合成量及合成过程的影响, 配制3种等氮等脂(脂肪含量13%)的实验饲料, 分别含有不同梯度水平的花生四烯酸: 0.72%(不添加花生四烯酸精制油的对照组, C), 5.63%(添加低水平ARA的处理组, ARA-L)及15.03%(添加高水平ARA的处理组, ARA-H)(各数值均为占总脂肪酸的比例)。每组饲料投喂3个实验桶, 每桶放25尾3龄大菱鲆亲鱼(雌雄比例约为1:1)。养殖实验在室内流水系统内进行, 每天饱食投喂2次, 养殖周期为5个月。养殖结束后, 分别取性腺发育前期的雌雄鱼测血清雌二醇和睾酮的含量并检测性腺中性类固醇激素合成相关蛋白质的基因表达量。结果显示: 与对照组相比, 饲料中高水平的花生四烯酸显著降低了雌鱼血清中雌二醇的含量, 而雄鱼血清中睾酮的含量在低水平花生四烯酸处理组显著降低。在卵巢中, 饲料中高水平的花生四烯酸显著降低了促卵泡激素受体mRNA的表达量, 但是饲料中低水平的花生四烯酸显著提高了17 α 羟化酶的mRNA表达量。在精巢中, 饲料中低水平的花生四烯酸显著降低了固醇合成急性调节蛋白以及17 α 羟化酶的mRNA表达量, 但显著升高了芳香化酶的mRNA表达量。饲料中花生四烯酸提高了性腺、肝脏和肌肉组织中花生四烯酸的含量, 但降低了二十碳五烯酸(EPA)的含量, 卵巢中的花生四烯酸累积量高于精巢。综上所述, 饲料中添加一定量的花生四烯酸抑制了发育前期大菱鲆亲鱼雌二醇和睾酮的合成, 在卵巢中, 这种抑制作用可能是通过抑制促卵泡激素受体的表达来实现, 而在精巢中, 可能是通过抑制固醇合成急性调节蛋白以及17 α 羟化酶来实现。

关键词: 大菱鲆; 亲鱼; 饲料; 花生四烯酸; 性类固醇激素合成; 基因表达

中图分类号: S 963.7

文献标志码: A

脂肪和脂肪酸已经被证明是亲鱼饲料中决定亲鱼繁育成功及保证后代健康的重要营养素^[1]。n-3系列长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)在亲鱼繁育中的重要作用已经得到了大量的实验证实^[2-11]。但是, n-6系列的多不饱和脂肪酸, 主要是花生四烯酸(C20:4n-6)的作用却相对被忽视。在过去的十年中, ARA在亲鱼繁育中的功能得到了越

来越多的关注。现有的研究表明, ARA同样对亲鱼产卵、配子质量及仔鱼质量等都具有显著的正向作用。这在舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[12]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[13]、庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)^[14]及黄鳊(*Monopterus alba*)^[15]中都得到了证实。对性腺及配子的脂肪酸分析及对鱼类成熟和幼体发生过程中ARA的动

收稿日期: 2016-07-08 修回日期: 2016-09-20

资助项目: 国家自然科学基金(31402309); 中国博士后科学基金(2014M551991, 2015T80763); 国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50-G08)

通信作者: 梁萌青. E-mail: liangmq@ysfri.ac.cn

力学研究也都表明,ARA对鱼类繁育具有重要的作用^[8, 16-19]。

至今,关于ARA如何影响鱼类繁育的机理研究还非常少。仅有的研究表明,ARA可以对卵母细胞的成熟、排卵及性激素在血清中的结合产生调节作用^[20-22]。对ARA影响鱼类性类固醇激素合成的研究尤其少^[23],虽然在哺乳类和鸟类中ARA已被证明能够调节性类固醇激素合成^[24-25]。性类固醇激素合成对鱼类繁育来说是一个至关重要的过程,一些体外研究表明,ARA能够调控睾酮的合成,但对ARA调控雌二醇合成的研究几乎没有。而且,这些体外实验对揭示鱼体内真正的繁育调控过程作用有限。因此,本实验以投喂养殖实验的方式研究饲料中ARA对鱼类性类固醇激素合成的影响,并同时通过分子生物学方法研究ARA对性类固醇激素合成关键过程(即,对促性腺激素的响应、胆固醇的转运及酶促反应过程)的影响,以揭示ARA调控性类固醇激素合成的相关机理过程。这些关键过程是类固醇激素合成的核心过程,但是关于其受饲料营养素的调节的研究还非常少。

本实验以大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)为研究对象。大菱鲆是我国北方水产养殖的支柱种类之一,但是,大菱鲆亲鱼的养殖目前仍然以投喂鲜杂鱼为主,这不但造成了营养不全面,降低了繁育性能,还容易造成病原菌传播并加速水质恶化。因此,研究开发大菱鲆亲鱼的专用配合饲料势在必行。本实验室之前已经就大菱鲆亲鱼饲料中的维生素(A、C及E)的功能作用进行了研究^[26-28]。本实验将继续开展大菱鲆亲鱼的脂肪酸营养研究,探讨饲料中ARA对大菱鲆性类固醇激素合成的影响。结合对脂肪酸累积的相关分析,本实验期望能为揭示大菱鲆亲鱼的ARA营养生理代谢提供基础数据。因亲鱼性腺发育前期的营养调控是整个繁育期营养调控的重要组成部分,而前期的性激素合成直接关系到性腺成熟过程的启动,因此,本实验重点关注性腺发育前期ARA对性类固醇激素合成的影响。

1 材料与方

1.1 饲料原料和饲料配方

以鱼粉、酪蛋白和小麦粉为主要蛋白源,以橄榄油(主要用于提供供能所需的油酸)、n-3 LC-PUFA富集油及三硬脂酸甘油酯(嘉兴市沪东

日用助剂有限公司,中国嘉兴)为脂肪源(脂肪含量约13%)配制基础饲料(表1),并通过在基础饲料中分别添加0%、1.43%及4.43%的ARA富集油(ARA含量占总脂肪酸41%;江苏天凯生物科技有限公司,中国南京)替代相应比例的三硬脂酸甘油酯(C18:0含量,占总脂肪酸62%)来获得不同梯度的饲料ARA水平,3组饲料依次命名为C(对照组),ARA-L(含低水平ARA)和ARA-H(含高水平ARA)。饲料的加工、包装和储藏均采用本实验的统一方法^[29],所有原料粉碎过80目筛,按照饲料配方将原料混合,制成粒径6 mm的饲料,用烘箱55 °C 12 h烘干,然后-20 °C保存备用。饲料的脂肪酸组成见表2。饲料C、ARA-L及ARA-H中的ARA含量分别为0.72%、5.63%和15.03%(占总脂肪酸)。

1.2 实验动物及饲养管理

实验采用3龄的大菱鲆亲鱼,购于海阳市黄海水产有限公司(中国烟台)。实验在室内流水养殖系统(36°46'N, 121°09'E)中进行。实验前,用对照组饲料暂养2周以适应养殖环境。正式养殖实验开始前将实验鱼禁食24 h,然后将实验鱼随机分配于9个养殖桶(直径230 cm,高100 cm),每桶25尾,雌雄比例约为1:1。每天表观饱食投喂2次。养殖实验持续5个月(从海阳市当地11月持续到次年3月份),在发育产卵季节之前结束投喂实验并取样。采用自然光照周期,养殖用水采用深井水及外海水混合使用(必要时采取控温措施),水温11~15 °C,盐度30~32,溶解氧>7 mg/L。每天投喂结束后30 min,吸出残饵和粪便。

1.3 取样

养殖实验结束后,从每个桶中分别取未发育的雌鱼和雄鱼各3尾。以丁香酚(1:10 000)麻醉后,用无菌注射器自尾静脉取血,室温凝结沉降2 h,然后4 °C凝结沉降4~6 h,分离血清并保存于-70 °C冰箱。取血后,将亲鱼解剖,取肝脏、肌肉和性腺样品。所有的样品立即放入液氮中,之后转移到-80 °C保存待用。

1.4 饲料常规成分、饲料及鱼体组织脂肪酸测定

饲料常规成分分析均采用AOAC法。其中,水分的测定为105 °C烘干恒重法;粗蛋白的测定为凯氏定氮法;粗脂肪的测定为索氏抽提法;灰分的测定为箱式电阻炉550 °C灼烧法。

表 1 实验饲料配方及营养成分组成(干物质)
Tab. 1 Formulation and proximate composition of the experimental diets (dry matter) %

	组别 groups		
	C	ARA-L	ARA-H
原料 ingredients			
鱼粉 fish meal	60.00	60.00	60.00
酪蛋白 casein	12.00	12.00	12.00
小麦粉 wheat meal	15.62	15.62	15.62
维生素混合物 vitamin premix ^a	1.00	1.00	1.00
矿物质混合物 mineral premix ^b	1.00	1.00	1.00
磷酸二氢钙 Ca (H ₂ PO ₄) ₂	1.00	1.00	1.00
氯化胆碱 choline chloride	0.50	0.50	0.50
Vc磷酸盐 L-ascorbyl-2-polyphosphate	0.50	0.50	0.50
防霉剂 mold inhibitor ^c	0.10	0.10	0.10
乙氧基喹啉 ethoxyquin	0.05	0.05	0.05
大豆卵磷脂 soy lecithin	1.50	1.50	1.50
橄榄油 olive oil	1.00	1.00	1.00
n-3 LC-PUFA富集油 n-3 LC-PUFA enriched oil ^d	1.30	1.30	1.30
ARA富集油 ARA enriched oil ^e	0.00	1.43	4.43
三硬脂酸甘油酯 tristearin ^f	4.43	3.00	0.00
成分分析 proximate composition			
粗蛋白 crude protein	55.81	55.64	55.90
粗脂肪 crude lipid	12.87	12.98	13.01
灰分 ash	12.79	12.85	12.93

注: a. 维生素混合物(mg/kg diet): 维生素B₁, 25 mg; 核黄素(80%), 45 mg; 维生素B₆(盐酸吡哆醇), 20 mg; 维生素B₁₂, 0.1 mg; 维生素K₃, 10 mg; 肌醇, 800 mg; 维生素B₃(泛酸), 60 mg; 烟酸, 200 mg; 叶酸, 20 mg; 生物素 1.2 mg; 维生素A, 32 mg; 维生素D₃, 5 mg; 维生素E, 120 mg; 微晶纤维素, 13.67 g. b. 无机盐混合物(mg/kg diet): 硫酸镁, 1200 mg; 硫酸铜, 10 mg; 硫酸锌, 50 mg; 硫酸铁, 80 mg; 硫酸锰, 45 mg; 氯化钴(1%), 50 mg; 亚硒酸钠(1%), 20 mg; 碘酸钙(1%), 60 mg; 沸石粉, 13.485 g. c. 防霉剂: 50%丙酸钙+50%富马酸. d. n-3 LC-PUFA富集油: 甘油三酯型; 含37% DHA和21% EPA(占总脂肪酸); 河北海源康健生物科技有限公司, 中国沧州. e. ARA富集油: 甘油三酯型; 含41%ARA(占总脂肪酸); 江苏天凯生物科技有限公司, 中国南京. f. 三硬脂酸甘油酯: 沪东日用助剂有限公司, 中国嘉兴

Notes: a. vitamin premix (mg or g/kg diet): thiamin 25 mg; riboflavin, 45 mg; pyridoxine HCl, 20 mg; vitamin B₁₂, 0.1 mg; vitamin K₃, 10 mg; inositol, 800 mg; pantothenic acid, 60 mg; niacin, 200 mg; folic acid, 20 mg; biotin, 1.2 mg; retinol acetate, 32 mg; cholecalciferol, 5 mg; lpha-tocopherol, 120 mg; wheat middling, 13.67 g. b. mineral premix (mg or g/kg diet): MgSO₄·7H₂O, 1200 mg; CuSO₄·5H₂O, 10 mg; ZnSO₄·H₂O, 50 mg; FeSO₄·H₂O, 80 mg; MnSO₄·H₂O, 45 mg; CoCl₂·6H₂O (1%), 50 mg; NaSeSO₃·5H₂O (1%), 20 mg; Ca(IO₃)₂·6H₂O (1%), 60 mg; zeolite, 13.485 g. c. mold inhibitor: contained 50% calcium propionic acid and 50% fumaric acid. d. n-3 LC-PUFA enriched oil: in the form of triglyceride; containing 37% DHA and 21% EPA (of total fatty acids); Hebei Haiyuan Health Biological Science and Technology Co., Ltd., Cangzhou, China. e. ARA enriched oil: in the form of triglyceride; containing 41% ARA (of total fatty acids); Jiangsu Tiankai Biotechnology Co., Ltd., Nanjing, China. f. tristearin: HUDONG article of everyday use Co., Ltd., Jiaxing, China

饲料及鱼体组织脂肪酸的测定采用气相色谱法。将冻干后的样品分别用KOH-甲醇和HCl-甲醇酯化(72 °C水浴), 然后用正己烷萃取甲酯化的脂肪酸, 然后上机测定。气相色谱采用安捷伦HP6890, 石英毛细管色谱柱(惠普007-CW), 并配备火焰电离检测器。柱温从150 °C到200 °C

以每分钟15 °C程序升温, 然后从200 °C到250 °C以每分钟2 °C升温。进样口和检测器温度均为250 °C。

1.5 实时荧光定量PCR及雌二醇和睾酮的检测

使用RNAiso Plus(TaKaRa大连公司, 中国大

表 2 饲料脂肪酸组成(占总脂肪酸)

Tab. 2 Fatty acid compositions of the experimental diets (of total fatty acids) %

脂肪酸 fatty acid	组别 groups		
	C	ARA-L	ARA-H
C 14:0	3.99	4.17	3.21
C 16:0	22.94	21.85	17.17
C 18:0	27.09	20.80	6.20
饱和脂肪酸 Σ SFA	54.02	46.82	26.58
C 16:1n-7	2.98	3.28	2.96
C 18:1n-7	1.69	1.80	1.81
C 18:1n-9	12.52	13.62	14.65
单不饱和脂肪酸 Σ MUFA	17.20	18.70	19.43
C 18:2n-6	6.02	6.79	7.71
C 20:4n-6	0.72	5.63	15.03
n-6多不饱和脂肪酸 Σ n-6 PUFA	6.74	12.41	22.74
C 18:3n-3	0.69	0.72	0.75
C 20:5n-3	6.95	7.10	6.71
C 22:5n-3	1.51	1.37	1.43
C 22:6n-3	10.01	10.12	10.49
n-3多不饱和脂肪酸 Σ n-3 PUFA	19.16	19.31	19.38
总n-3/总n-6 Σ n-3/ Σ n-6	2.84	1.56	0.85

连)提取性腺组织中的RNA, 并使用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)反转录试剂盒(TaKaRa, 中国大连)反转录成cDNA。

根据NCBI GenBank数据库中相关鱼的蛋白质序列, 利用Primer 5.0设计引物(表3)克隆得到以下基因的核心序列: 促卵泡激素受体(Genbank序列号KX496327)、固醇合成急性调节蛋白(Genbank序列号KX496333)、胆固醇侧链裂解酶(Genbank序列号KX496328)、17 α 羟化酶(Genbank序列号KX496329)、3 β -羟基类固醇脱氢酶(Genbank序列号KX496330)、17 β -羟基类固醇脱氢酶(Genbank序列号KX496331)及芳香化酶(Genbank序列号KX496332)。

依据克隆得到的核心片段序列信息, 以及GenBank数据库中的促黄体激素受体序列信息设计类固醇合成相关蛋白质及内参蛋白POL的特异性引物(表3), 并交由生工生物工程(上海)股份有

限公司合成引物。实时PCR使用SYBR Green PCR Master Mix (TaKaRa公司)进行, PCR过程使用Eppendorf定量PCR仪Mastercycler eprealplex。结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[30]。

血清中的雌二醇和睾酮采用电化学发光法测得, 使用青岛大学医学院附属医院(中国青岛)罗氏COBAS-6000自动电化学发光免疫分析仪测定。

1.6 统计分析

采用SPSS 16.0软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 所有百分数数值在统计之前经过反正弦处理。当处理之间差异显著($P < 0.05$)时, 用Tukey's检验进行多重比较分析。所有数据以平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)的形式表示。

2 结果

2.1 性类固醇激素合成

雌鱼血清中雌二醇含量在ARA-H处理组显著低于ARA-L处理组和对照组C($P < 0.05$), 但在ARA-L处理组和对照组C间无显著性差异($P > 0.05$, 图1)。雄鱼血清中睾酮的含量在ARA-L组显著低于对照组C ($P < 0.05$), 而在对照组和ARA-H处理组之间以及ARA-L和ARA-H处理组之间没有显著性差异($P > 0.05$, 图2)。

2.2 性类固醇激素合成相关蛋白质的基因表达量

在雌鱼的卵巢中, 促卵泡激素受体的mRNA表达量在ARA-H组显著低于对照组C ($P < 0.05$), 而在对照组C和ARA-L处理组间以及ARA-L和ARA-H处理组间没有显著性差异($P > 0.05$, 表4)。17 α 羟化酶的mRNA表达量则在ARA-L处理组中显著高于对照组C($P < 0.05$), 而在对照组C与ARA-H处理组之间以及ARA-L和ARA-H处理组之间没有显著性差异($P > 0.05$)。促黄体激素受体、胆固醇侧链裂解酶、3 β -羟基类固醇脱氢酶、17 β -羟基类固醇脱氢酶以及芳香化酶的mRNA表达量在各处理组间没有显著性差异($P > 0.05$)。固醇合成急性调节蛋白在卵巢中的表达量极低。

在雄鱼的精巢中, 固醇合成急性调节蛋白和17 α 羟化酶的mRNA表达量在ARA-L处理组中显著低于对照组C ($P < 0.05$), 而在对照组C和ARA-H处理组间以及ARA-L和ARA-H处理组间没有显著性差异($P > 0.05$, 表4)。芳香化酶的mRNA表达量

表 3 引物列表

Tab. 3 Sequences of the primers used in this work

蛋白质 protein	引物 primer	序列 sequence (5'-3')	描述 description
促卵泡激素受体 FSHR	F	CGGTGTTYGCCAGTGAGTTGT	克隆序列引物
	R	TGCGGACGGTCAGRTARATGC	
	qF	CAGCAGCTACAGCAAGGTGAG	定量PCR引物
	qR	ACGCAGAAGAAGGCTAGGATG	
促黄体激素受体 LHR	qF	TCGTCAACTCGTCACGGAGA	定量序列引物
	qR	ATGGCGAAGAAGGAGATTGG	
固醇合成急性调节蛋白 StAR	F	GACAGGTTTGAGGAAGAATGCC	克隆序列引物
	R	CATCACTTCCAGCTTGAACACCT	
	qF	GCAGGTCCAGGCTCCAGTA	定量PCR引物
	qR	CGCTGTATCCGTCCTCCTTTT	
胆固醇侧链裂解酶 P450ssc	F	GAGCTGATGGCTGGAGGRGT	克隆序列引物
	R	GCTGGRATGTGGTAGTTTTGAA	
	qF	ACGACTTCTATAACGCTACTGTGG	定量PCR引物
	qR	GGAATCCGCTTCAGCATCTC	
17 α 羟化酶 P450c17	F	CGCBGAGAACAAACAACAC	克隆序列引物
	R	CGACCAGGGTCAAAGAG	
	qF	GAACAACAACACGGCGGAGG	定量PCR引物
	qR	CGGGTGATGGATGAGGTAGGC	
3 β -羟基类固醇脱氢酶 3 β -HSD	F	TTCGAGGGCGACATCAGAGA	克隆序列引物
	R	GCCTCRTTCTTGGTCTTGCTGTA	
	qF	GCGTCGGTCGTCTTCCACATC	定量PCR引物
	qR	AGGAGCACCTGCGTCCCTTTG	
17 β -羟基类固醇脱氢酶 17 β -HSD	F	ATGAGAAACCTGGCCAAGAAG	克隆序列引物
	R	GGGCTGGGTGACTGGATG	
	qF	CGGAAATGAAGGCTCAAGGTC	定量PCR引物
	qR	AGGAGGACGGCCAAACTCT	
芳香化酶 aromatase	F	AGACGTGGAGCAGGCAGATAAAC	克隆序列引物
	R	CTGCTGGGACAGGTTGTTGGT	
	qF	AGGGCACAAACATCATTCTCAAC	定量PCR引物
	qR	TGAACCAAAGGGCTGGAAGTAAC	
内参 POL	qF	AGACGCACAGACCTCACG	定量PCR引物
	qR	GGTGCCATGTCTGACTAGAGAC	

在ARA-L处理组中显著高于对照组C和ARA-H处理组($P < 0.05$),但是在对照组C和ARA-H处理组间没有显著性差异($P > 0.05$)。促卵泡激素受体、

促黄体激素受体、胆固醇侧链裂解酶、3 β -羟基类固醇脱氢酶及17 β -羟基类固醇脱氢酶在各处理组间均没有显著性差异($P > 0.05$)。

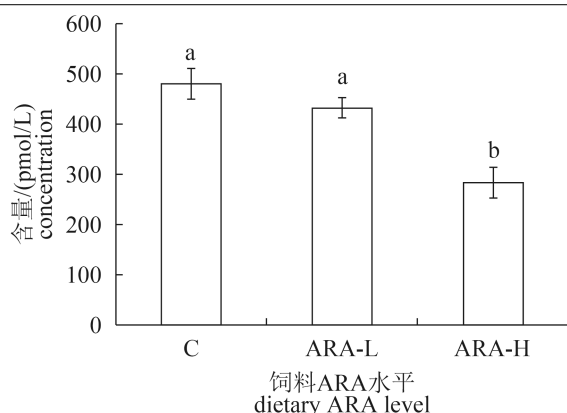


图1 饲料ARA水平对雌鱼血清中雌二醇含量的影响
数据以平均值±标准误表示($n=3$), 不同上标字母的数据间具有显著性差异($P<0.05$), 下同

Fig. 1 The effects of dietary ARA on the estradiol concentration in serum of females

values (means±standard error, $n=3$) in bars that have different letters are significantly different ($P<0.05$), the same below

2.3 性腺、肝脏和肌肉脂肪酸组成

在卵巢中, 随着饲料ARA含量的升高, 卵巢中ARA的含量极显著升高($P<0.01$), 而C18:2n-6、EPA (C20:5n-3)及DPA (C22:5n-3)呈现显著降低的趋势($P<0.05$)(表5)。卵巢中DHA(C22:6n-3)的含量在ARA-H处理组显著高于ARA-L处理组及对照组C ($P<0.05$)。在精巢中, 随着饲料ARA含量的升高, 精巢中ARA的含量极显著升高($P<0.01$), 同时C18:0及C18:2n-6的含量也逐渐显著升高($P<0.05$), 但是EPA、DPA及DHA的含量均显著

表4 饲料中花生四烯酸对大菱鲆性腺中性类固醇激素合成相关蛋白质相对mRNA表达量的影响

Tab. 4 Effects of dietary ARA on the relative mRNA expressions of sex steroid-synthesizing proteins in gonads

蛋白质 protein	组别 groups					
	卵巢 ovaries			精巢 testes		
	C	ARA-L	ARA-H	C	ARA-L	ARA-H
促卵泡激素受体 FSHR	1.00±0.08 ^a	0.66±0.07 ^{ab}	0.64±0.08 ^b	1.00±0.10	1.53±0.11	1.29±0.08
促黄体激素受体 LHR	1.00±0.34	0.78±0.22	0.96±0.45	1.00±0.28	1.49±0.01	1.37±0.04
固醇合成急性调节蛋白 StAR	*	*	*	1.00±0.24 ^a	0.10±0.04 ^b	0.21±0.08 ^{ab}
胆固醇侧链裂解酶 P450ssc	1.00±0.28	0.88±0.30	1.20±0.44	1.00±0.17	1.05±0.13	0.78±0.24
17 α 羟化酶 P450c17	1.00±0.28 ^b	2.78±0.03 ^a	1.56±0.33 ^{ab}	1.00±0.25 ^a	0.16±0.03 ^b	0.25±0.10 ^{ab}
3 β -羟基类固醇脱氢酶 3 β -HSD	1.00±0.35	1.21±0.61	1.15±0.79	1.00±0.35	0.38±0.12	0.50±0.09
17 β -羟基类固醇脱氢酶 17 β -HSD	1.00±0.19	1.33±0.44	0.98±0.51	1.00±0.24	1.25±0.42	1.24±0.32
芳香化酶 aromatase	1.00±0.60	1.60±0.14	0.92±0.42	1.00±0.24 ^b	3.12±0.66 ^a	0.69±0.16 ^b

注: 同行不同上标字母的数值间具有显著性差异($P<0.05$), *表示表达量极低

Notes: values in the same row with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$), * means very low expression levels

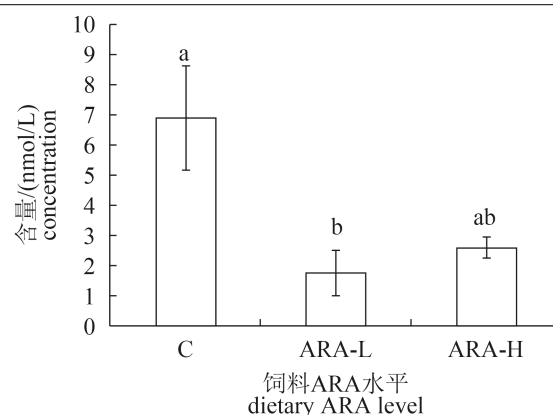


图2 饲料ARA水平对雄鱼血清中睾酮含量的影响

Fig. 2 The effects of dietary ARA on the testosterone concentration in serum of males

下降($P<0.05$)。

雌鱼肝脏中随着饲料中ARA含量的升高, C14:0($P<0.01$)及饱和脂肪酸($P<0.05$)的含量逐渐降低, 而ARA($P<0.01$)及n-6系列脂肪酸($P<0.05$)含量显著升高, n-3/n-6显著下降($P<0.05$)(表6)。在雄鱼肝脏中, 与对照组C相比, ARA-L处理组中亚油酸(C18:2n-6, $P<0.05$)、亚麻酸(C18:3n-3, $P<0.01$)及n-3系列脂肪酸含量($P<0.05$)显著降低。随着饲料ARA含量的升高, 雄鱼肝脏中ARA含量逐渐升高, 在ARA-H处理组显著高于对照组和ARA-L处理组($P<0.05$)。

在雌鱼和雄鱼中, 随着饲料ARA含量的增加, 肌肉中ARA显著上升而亚油酸(C18:2n-6)、DPA(C22:5n-3)、DHA(C22:6n-3)及n-3系列脂肪酸

表 5 饲料中花生四烯酸对大菱鲆性腺中脂肪酸组成的影响(总脂肪酸)
 Tab. 5 Gonadal fatty acid compositions of *S. maximus* fed the experimental diets (total fatty acids) %

脂肪酸 fatty acid	组别 groups					
	雌鱼 female			雄鱼 male		
	C	ARA-L	ARA-H	C	ARA-L	ARA-H
C 14:0	1.48±0.08	1.34±0.10	1.21±0.14	1.11±0.10	0.96±0.11	1.41±0.08
C 16:0	20.44±0.62	19.89±0.99	18.58±1.71	18.37±0.39	18.22±0.99	18.37±0.86
C 18:0	7.88±0.31	7.83±0.56	7.35±0.39	6.14±0.22 ^b	7.11±0.08 ^a	7.37±0.06 ^a
饱和脂肪酸 ΣSFA	29.81±0.98	29.06±1.59	27.14±1.47	25.62±0.32	26.28±1.02	27.15±1.00
C 16:1n-7	2.64±0.30	2.02±0.07	2.07±0.37	1.51±0.11	1.35±0.15	1.85±0.22
C 18:1n-7	2.52±0.09	2.50±0.15	2.25±0.05	7.32±0.77	6.48±0.91	6.29±0.03
C 18:1n-9	13.46±0.96	12.29±1.09	12.07±0.19	7.31±0.28	8.41±0.77	9.04±0.82
C 20:1n-9	0.93±0.07	0.98±0.08	0.90±0.03	2.22±0.30	2.80±0.41	2.73±0.03
单不饱和脂肪酸 ΣMUFA	19.55±1.38	17.80±1.36	17.29±0.64	18.35±0.88	19.04±2.24	19.91±1.04
C 18:2n-6	2.94±0.06 ^a	2.76±0.20 ^b	2.00±0.20 ^b	1.47±0.05 ^b	1.62±0.07 ^b	1.99±0.10 ^a
C 20:4n-6	7.40±0.27 ^c	11.92±0.09 ^b	14.45±0.20 ^a	3.65±0.44 ^c	7.19±0.02 ^b	13.07±0.55 ^a
n-6多不饱和脂肪酸 Σn-6 PUFA	10.33±0.28 ^c	14.69±0.30 ^b	16.46±0.00 ^a	5.12±0.41 ^c	8.81±0.08 ^b	15.06±0.65 ^a
C 20:5n-3	7.70±0.45 ^a	5.95±0.27 ^a	3.75±0.49 ^b	4.85±0.32 ^a	3.29±0.13 ^b	3.18±0.01 ^b
C 22:5n-3	2.51±0.10 ^a	2.03±0.06 ^b	1.98±0.17 ^b	4.76±0.16 ^a	4.57±0.11 ^a	3.18±0.26 ^b
C 22:6n-3	16.81±0.31 ^b	16.65±0.77 ^b	20.56±0.25 ^a	28.05±0.94 ^a	22.28±0.15 ^b	19.64±1.26 ^b
n-3多不饱和脂肪酸 Σn-3 PUFA	27.03±0.50	24.63±0.91	26.29±0.41	37.66±1.11 ^a	30.15±0.10 ^b	26.00±1.53 ^b
总n-3/总n-6 Σn-3/Σn-6	2.62±0.06 ^a	1.68±0.09 ^b	1.60±0.02 ^b	7.48±0.74 ^a	3.42±0.02 ^b	1.73±0.18 ^b

含量显著降低($P<0.05$), 相应的n-3/n-6显著降低($P<0.05$)(表7)。在雌鱼中, 肌肉中C18:0及饱和脂肪酸含量也随着饲料ARA含量增加而降低($P<0.05$)。

3 讨论

本实验发现, 饲料中添加一定量的花生四烯酸, 不但没有提高大菱鲆亲鱼性类固醇激素的产量, 反而降低了雌鱼中雌二醇和雄鱼中睾酮的合成量。这虽然与本实验的预期不符, 但却是一个新发现。关于饲料中花生四烯酸对性类固醇激素合成的影响, 相关研究非常少。Norambuena等^[23]在塞内加尔鳎(*Solea senegalensis*)上的研究表明, 饲料6%(占总脂肪酸)的ARA能够提高血液内11-酮基睾酮及睾酮的含量。一些体外细胞实验也表明ARA及它的代谢产物前列腺素E₂能够刺激金鱼(*Carassius auratus*)卵巢和精巢中促性腺激素诱导的睾酮的合成量^[31-35]。然而,

本实验却得出了相反的结果, 这可能主要与发育阶段有关。上述实验中, 均存在较强的促性腺激素刺激这一条件。而本实验中, 性腺样品取自性腺发育前期的大菱鲆亲鱼, 促性腺激素水平较低, 这可能是造成不同实验间结果差异的主要原因。已有研究表明, 促性腺激素水平的高低会直接影响ARA的功能作用^[35-39]。这也是动物体内存在的适应生殖周期的调节机制之一。本实验的结果显示, 可能只有在性腺发育活跃期, 鱼体才调用性腺中的ARA加速性类固醇激素的合成以进一步加速性腺成熟。

另一方面, 虽然饲料中ARA均降低了雌鱼和雄鱼性类固醇激素的合成, 但是, 产生调节作用的有效剂量却不同, 在雌鱼中, 只有高剂量才产生抑制作用, 而在雄鱼中, 抑制作用只发生在低剂量处理组。这首先体现了ARA作用在雌雄间的差异。虽然之前对ARA调节雌二醇的研究较少, 但是仅有的研究也都体现了ARA

表 6 饲料中花生四烯酸对大菱鲆肝脏中脂肪酸组成的影响(总脂肪酸)
 Tab. 6 Liver fatty acid compositions of *S. maximus* fed the experimental diets (total fatty acids) %

脂肪酸 fatty acid	组别 groups					
	雌鱼 female			雄鱼 male		
	C	ARA-L	ARA-H	C	ARA-L	ARA-H
C 14:0	5.75±0.29 ^a	4.69±0.36 ^{ab}	3.97±0.05 ^b	4.38±0.51	4.12±0.23	5.06±0.33
C 16:0	17.19±0.42	15.53±0.69	15.14±0.40	15.87±0.83	13.74±0.83	14.12±0.39
C 18:0	2.20±0.13	2.19±0.33	1.58±0.13	1.79±0.26	1.83±0.13	1.62±0.17
饱和脂肪酸 Σ SFA	25.13±0.80 ^a	22.40±1.35 ^{ab}	20.69±0.32 ^b	22.04±0.34	19.70±1.20	20.80±0.84
C 16:1n-7	10.15±0.58	9.05±0.39	8.60±0.19	8.70±0.67	10.39±0.31	10.42±0.35
C 18:1n-7	3.84±0.14	3.79±0.17	3.31±0.15	3.47±0.45	4.21±0.27	3.59±0.17
C 18:1n-9	24.40±1.54	21.44±2.34	20.18±1.20	16.78±2.87	24.41±0.48	20.73±1.64
C 20:1n-9	2.17±0.10	2.33±0.42	2.24±0.10	2.56±0.31	3.36±0.26	2.61±0.18
单不饱和脂肪酸 Σ MUFA	16.16±0.56	15.17±0.96	14.14±0.17	14.73±1.41	17.96±0.73	16.62±0.67
C 18:2n-6	3.12±0.14	4.07±0.78	3.24±0.04	4.20±0.29 ^a	2.53±0.21 ^b	2.98±0.39 ^{ab}
C 20:4n-6	0.65±0.06 ^c	2.35±0.21 ^b	4.48±0.22 ^a	0.72±0.08 ^b	0.98±0.27 ^b	3.29±0.67 ^a
n-6多不饱和脂肪酸 Σ n-6 PUFA	3.77±0.20 ^b	6.42±0.98 ^{ab}	7.71±0.29 ^a	4.69±0.05 ^b	3.51±0.47 ^b	6.26±0.70 ^a
C 18:3n-3	0.56±0.03	0.73±0.18	0.69±0.08	0.94±0.05 ^a	0.58±0.02 ^b	0.68±0.08 ^b
C 20:5n-3	4.90±0.16	5.17±0.83	5.23±0.27	5.71±0.37	3.80±0.15	4.92±0.62
C 22:5n-3	3.02±0.46	3.07±0.16	3.22±0.11	2.64±0.19	3.09±0.21	3.27±0.06
C 22:6n-3	10.26±1.89	10.84±0.74	13.35±0.42	14.81±0.91	11.82±0.87	11.54±0.25
n-3多不饱和脂肪酸 Σ n-3 PUFA	18.73±2.45	19.81±1.89	22.40±0.80	24.65±0.94 ^a	19.29±0.98 ^b	20.40±0.54 ^{ab}
总n-3/总n-6 Σ n-3/ Σ n-6	4.93±0.44 ^a	3.14±0.18 ^b	2.92±0.22 ^b	5.22±0.24	5.69±0.80	3.40±0.44

对性类固醇激素合成的调节在雌雄间的差异。尤其是在塞内加尔鲷中的研究清晰表明了这种差异, 该实验初步发现ARA对雄性激素合成的重要性要高于雌性^[23, 40-41]。而这种雌雄差异也可以通过反馈调节来解释, 已有报道称, 在海水鱼中, 雌鱼和雄鱼之间存在不同含量的促性腺激素 II, 而促性腺激素 II 会对ARA的作用发挥产生影响, 从而使得雌鱼中ARA的调节作用受到一定程度的抑制^[42]。本实验雌雄间的ARA有效剂量差异在另一方面还体现了ARA在发挥调控作用时的剂量效应特点。ARA的剂量效应特点在以往的实验中都得到了充分的证实^[23, 34, 43-46]。针对不同的生理过程, 过低或者过高的ARA剂量都会损害体内的EPA和ARA之间的平衡, 从而引起代谢失常^[13]。因此, 在饲料中添加ARA时应额外关注剂量的多少。

在ARA调控性类固醇激素合成相关蛋白质

的基因表达方面, 本实验发现, 在雌鱼卵巢中, ARA主要降低了促卵泡激素受体的基因表达量。对促性腺激素的响应是性腺内合成类固醇激素的第一个关键步骤。因此, 本实验中ARA对促卵泡激素受体基因表达的抑制很可能直接造成了雌二醇合成量的下降。也就是说, 在性腺发育前期, ARA对雌二醇合成的抑制主要是通过抑制促卵泡激素受体的表达来实现的。本实验中, ARA对其他的类固醇激素合成关键蛋白如胆固醇侧链裂解酶、 3β -羟基类固醇脱氢酶、 17β -羟基类固醇脱氢酶及芳香化酶等都没有显著影响, 甚至低剂量的ARA还促进了 17α 羟化酶的表达, 这也从侧面充分表明了ARA对促卵泡激素受体的调节在其调节雌二醇合成中的主导作用。

在雄鱼的精巢中, 情况则完全不一样, 低剂量的ARA降低了固醇合成急性调节蛋白及 17α 羟化酶的表达量, 表明ARA对睾酮合成的抑

表 7 饲料中花生四烯酸对大菱鲆肌肉中脂肪酸组成的影响(总脂肪酸)
 Tab. 7 Muscle fatty acid compositions of *S. maximus* fed the experimental diets (total fatty acids) %

脂肪酸 fatty acid	组别 groups					
	雌鱼 female			雄鱼 male		
	C	ARA-L	ARA-H	C	ARA-L	ARA-H
C 14:0	1.74±0.37	2.29±0.83	2.41±0.23	2.81±0.18	2.96±0.44	2.95±0.44
C 16:0	25.45±0.68	23.91±1.88	19.98±1.49	20.61±1.57	20.66±1.40	22.72±1.28
C 18:0	7.49±0.46 ^a	6.75±1.07 ^{ab}	3.93±0.53 ^b	4.36±0.76	4.68±0.95	5.25±0.32
饱和脂肪酸 ΣSFA	34.67±0.91 ^a	32.96±2.14 ^{ab}	26.32±1.57 ^b	27.77±2.21	28.30±1.89	30.92±1.32
C 16:1n-7	2.79±0.82	3.62±1.46	4.35±0.40	5.30±0.81	5.50±1.01	5.13±0.76
C 18:1n-7	2.04±0.22	2.26±0.24	2.02±0.05	2.61±0.38	2.60±0.17	2.42±0.22
C 18:1n-9	10.60±1.29	12.08±1.26	10.85±0.41	12.43±1.60	13.30±0.78	12.99±1.65
单不饱和脂肪酸 ΣMUFA	17.24±2.08	17.95±2.95	17.23±0.27	20.34±2.78	21.39±1.94	20.54±2.53
C 18:2n-6	5.01±0.50 ^a	4.20±0.58 ^{ab}	2.69±0.22 ^b	4.10±0.33 ^a	3.27±0.10 ^{ab}	3.13±0.05 ^b
C 20:4n-6	3.81±0.38 ^b	7.01±0.48 ^a	7.33±0.82 ^a	2.64±0.68 ^b	3.15±0.64 ^b	6.35±1.31 ^a
n-6多不饱和脂肪酸 Σn-6 PUFA	8.82±0.40	11.21±1.05	10.02±1.04	6.74±0.86	6.42±0.72	9.49±0.79
C 20:5n-3	8.05±0.38	7.17±0.37	6.51±0.67	7.32±0.92	7.09±0.15	6.95±0.69
C 22:5n-3	3.14±0.26 ^a	2.87±0.06 ^{ab}	2.27±0.21 ^b	3.72±0.21 ^a	3.16±0.14 ^{ab}	3.07±0.06 ^b
C 22:6n-3	26.45±0.34 ^a	24.25±2.28 ^{ab}	18.60±1.28 ^b	25.52±0.84 ^a	24.75±0.63 ^{ab}	22.00±0.81 ^b
n-3多不饱和脂肪酸 Σn-3 PUFA	37.64±0.22 ^a	34.29±1.14 ^a	27.38±1.13 ^b	36.56±0.81 ^a	35.00±0.45 ^{ab}	32.02±1.47 ^b
总n-3/总n-6 Σn-3/Σn-6	4.28±0.18 ^a	3.11±0.37 ^{ab}	2.79±0.30 ^b	5.58±0.60 ^a	5.57±0.50 ^a	3.41±0.24 ^b

制很可能是通过对这 2 个关键蛋白的抑制来实现的。固醇合成急性调节蛋白是调节类固醇激素合成的原料胆固醇转运的关键蛋白, 其在大菱鲆精巢中的表达量要远高于卵巢, 表明其在大菱鲆的精巢可能具有更重要的作用。另外, 在大菱鲆精巢中, 与固醇合成急性调节蛋白和17 α 羟化酶变化趋势相反的是, 低剂量的ARA反而升高了芳香化酶的基因表达量, 因为芳香化酶介导的是睾酮的后续代谢过程, 这也可能是使已合成的睾酮加速消耗的原因之一。

ARA调节性类固醇激素合成的结果还显示, 在雌鱼和雄鱼中, ARA对微观代谢过程的影响也是存在较大差异的。因为现有的相关文献资料非常少, 对此很难找到更加细致的解释。但是对固醇合成急性调节蛋白来说, 在哺乳动物中已证明卵母细胞和精巢的莱氏细胞在合成性类固醇激素时利用的胆固醇原料是通过不同的路径供应的^[47], 这种现象在鱼类中或许同样存在并且导致了固醇合成急性调节蛋白在雌雄鱼间

的功能差异。

组织中的脂肪酸含量是其发挥功能的物质基础^[48-49], 通常, 相比养殖鱼类, 野生的鱼类性腺中含有更多的ARA累积, 并且这可能是野生鱼类繁殖力高的原因之一^[8, 16-19], 而且, 发育期的鱼类, 与其他组织相比, 性腺中通常含有更多的ARA累积。本实验中, 从脂肪酸组成来看, 性腺中ARA的沉积量明显高于肝脏和肌肉组织, 这说明, 虽然大菱鲆的性腺发育还未开始, 但是, ARA从其他组织往性腺中的动员已经开始。ARA在动物性腺中随生殖周期的变化而变化已经有过报道, 在雌性招潮蟹(*Uca tangeri*)性腺中, 产卵后期, ARA含量急剧下降, 待下一个周期性腺发育时重新富集^[50]。性激素对性腺脂肪酸组成的负反馈调节可能是促成这一变化过程的主要机制^[51-52]。另外, ARA在大菱鲆卵巢中含量略高于精巢, 这与前面提到的剂量效应有一定程度的吻合。但是, 产生差异的具体原因仍需进一步研究。

对其他脂肪酸来说, 性腺中EPA随饲料ARA的升高而显著下降, 表明了二者之间的竞争关系。这一竞争关系在以往的研究中也得到了证实^[47, 53-54]。但是, 在本实验中, 肝脏和肌肉中EPA并没有随ARA的升高而降低, 这可能表明, EPA在肌肉和肝脏中的重要性高于在性腺中的重要性, 所以在肌肉和肝脏中的含量会相对保持恒定以维持相关生理功能的正常发挥。

在性腺中, 另一个值得关注的现象是在精巢中DHA的含量随着饲料ARA升高而显著下降, 但在卵巢中, 在ARA最高含量处理组, DHA含量同样达到了最高。这表明DHA极有可能对卵巢来说更重要。鉴于DHA在其他鱼类繁育中的重要性已经得到了很多阐述^[9, 55], 而且在本实验中, 性腺DHA的含量远高于肝脏, 因此, 在大菱鲆繁育营养学中, DHA是下一个值得进一步研究的重要脂肪酸。

4 小结

饲料中一定量的花生四烯酸降低了发育前期雌性大菱鲆亲鱼雌二醇及发育前期雄性大菱鲆亲鱼睾酮的合成量, 其对雌二醇合成的抑制可能是通过对促卵泡激素受体的抑制来实现, 而对睾酮合成的抑制可能是通过抑制固醇合成急性调节蛋白以及 17α 羟化酶来实现。饲料花生四烯酸提高了鱼体性腺及其他组织中的花生四烯酸的含量但降低了EPA的含量。本实验结果为通过营养手段精准调控大菱鲆亲鱼繁育性能提供基础数据。

基于本实验的结果, 在大菱鲆性腺发育的前期, 饲料中花生四烯酸的含量宜控制在较低的水平(建议低于总脂肪酸的6%)。

参考文献:

- [1] Izquierdo M S, Fernández-Palacios H, Tacon A G J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish[J]. *Aquaculture*, 2001, 197(1-4): 25-42.
- [2] Harel M, Tandler A, Kissil G W, *et al.* The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead seabream (*Sparus aurata*) females and the subsequent effects on egg composition and egg quality[J]. *British Journal of Nutrition*, 1994, 72(1): 45-58.
- [3] Cerdá J, Zanuy S, Carrillo M, *et al.* Short- and long-term dietary effects on female sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Seasonal changes in plasma profiles of lipids and sex steroids in relation to reproduction[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1995, 111(1): 83-91.
- [4] Abi-Ayad A, Mélard C, Kestemont P. Effects of n-3 fatty acids in Eurasian perch broodstock diet on egg fatty acid composition and larvae stress resistance[J]. *Aquaculture International*, 1997, 5(2): 161-168.
- [5] Navas J M, Bruce M, Thrush M, *et al.* The impact of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass[J]. *Journal of Fish Biology*, 1997, 51(4): 760-773.
- [6] Almansa E, Martián M V, Cejas J R, *et al.* Lipid and fatty acid composition of female gilthead seabream during their reproductive cycle: Effects of a diet lacking n-3 HUFA[J]. *Journal of Fish Biology*, 2001, 59(2): 267-286.
- [7] Watanabe T, Vassallo-Agius R. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan[J]. *Aquaculture*, 2003, 227(1-4): 35-61.
- [8] Rodríguez-Barreto D, Jerez S, Cejas J R, *et al.* Comparative study of lipid and fatty acid composition in different tissues of wild and cultured female broodstock of greater amberjack (*Seriola dumerili*)[J]. *Aquaculture*, 2012, 360-361: 1-9.
- [9] Beirão J, Soares F, Pousão-Ferreira P, *et al.* The effect of enriched diets on *Solea senegalensis* sperm quality[J]. *Aquaculture*, 2015, 435: 187-194.
- [10] Butts I A E, Baeza R, Støttrup J G, *et al.* Impact of dietary fatty acids on muscle composition, liver lipids, milt composition and sperm performance in European eel[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2015, 183: 87-96.
- [11] Luo L, Ai L C, Li T L, *et al.* The impact of dietary DHA/EPA ratio on spawning performance, egg and offspring quality in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*)[J]. *Aquaculture*, 2015, 437: 140-145.
- [12] Bruce M, Oyen F, Bell G, *et al.* Development of broodstock diets for the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of n-3 and n-6 highly unsaturated fatty acid to reproductive performance[J]. *Aquaculture*, 1999, 177(1-4): 85-97.
- [13] Furuita H, Yamamoto T, Shima T, *et al.* Effect of

- arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Aquaculture*, 2003, 220(1-4): 725-735.
- [14] Mazorra C, Bruce M, Bell J G, *et al.* Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)[J]. *Aquaculture*, 2003, 227(1-4): 21-33.
- [15] Zhou Q B, Wu H D, Zhu C S, *et al.* Effects of dietary lipids on tissue fatty acids profile, growth and reproductive performance of female rice field eel (*Monopterus albus*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2011, 37(3): 433-445.
- [16] Grigorakis K, Alexis M N, Taylor K D A, *et al.* Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*): composition, appearance and seasonal variations[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2002, 37(5): 477-484.
- [17] Salze G, Tocher D R, Roy W J, *et al.* Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): Egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock[J]. *Aquaculture Research*, 2005, 36(15): 1488-1499.
- [18] Støttrup J G, Jacobsen C, Tomkiewicz J, *et al.* Modification of essential fatty acid composition in broodstock of cultured European eel *Anguilla anguilla* L.[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2013, 19(2): 172-185.
- [19] Hauville M R, Rhody N R, Resley M J, *et al.* Comparative study of lipids and fatty acids in the liver, muscle, and eggs of wild and captive common snook broodstock[J]. *Aquaculture*, 2015, 446: 227-235.
- [20] Van Der Kraak G, Biddiscombe S. Polyunsaturated fatty acids modulate the properties of the sex steroid binding protein in goldfish[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1999, 20(2): 115-123.
- [21] Sorbera L A, Asturiano J F, Carrillo M, *et al.* Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine teleost, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 64(1): 382-389.
- [22] Patiño R, Yoshizaki G, Bolamba D, *et al.* Role of arachidonic acid and protein kinase C during maturation-inducing hormone-dependent meiotic resumption and ovulation in ovarian follicles of Atlantic croaker[J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 68(2): 516-523.
- [23] Norambuena F, Estévez A, Mañanós E, *et al.* Effects of graded levels of arachidonic acid on the reproductive physiology of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Fatty acid composition, prostaglandins and steroid levels in the blood of broodstock bred in captivity[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 191: 92-101.
- [24] Johnson A L, Tilly J L, Levors J M. Possible role for arachidonic acid in the control of steroidogenesis in hen theca[J]. *Biology of Reproduction*, 1991, 44(2): 338-344.
- [25] Lopez-Ruiz M P, Choi M S, Rose M P, *et al.* Direct effect of arachidonic acid on protein kinase C and LH-stimulated steroidogenesis in rat Leydig cells; evidence for tonic inhibitory control of steroidogenesis by protein kinase C[J]. *Endocrinology*, 1992, 130(3): 1122-1130.
- [26] Xu H G, Huang L N, Liang M Q, *et al.* Effect of dietary vitamin E on the sperm quality of turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2015, 14(4): 695-702.
- [27] 黄利娜, 梁萌青, 张海涛, 等. 饲料中添加不同水平维生素A对大菱鲆亲鱼繁殖性能的影响[J]. *渔业科学进展*, 2013, 34(4): 62-70.
- Huang L N, Liang M Q, Zhang H T, *et al.* The effect of dietary vitamin A level on reproductive performance of broodstock *Scophthalmus maximus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(4): 62-70 (in Chinese).
- [28] 张海涛, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 饲料中维生素C对大菱鲆繁殖性能的影响[J]. *渔业科学进展*, 2013, 34(2): 73-81.
- Zhang H T, Liang M Q, Zheng K K, *et al.* Impact of dietary vitamin C on the reproductive performance of turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(2): 73-81 (in Chinese).
- [29] Xu H G, Mu Y C, Zhang Y, *et al.* Graded levels of fish protein hydrolysate in high plant diets for turbot (*Scophthalmus maximus*): Effects on growth performance and lipid accumulation[J]. *Aquaculture*, 2016, 454: 140-147.
- [30] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [31] Van Der Kraak G, Chang J P. Arachidonic acid stimulates steroidogenesis in goldfish preovulatory ovarian follicles[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1990, 77(2): 221-228.

- [32] Wade M G, Van Der Kraak G. Arachidonic acid and prostaglandin E2 stimulate testosterone production by goldfish testis *in vitro*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1993, 90(1): 109-118.
- [33] Wade M G, Van der Kraak G, Gerrits M F, *et al.* Release and steroidogenic actions of polyunsaturated fatty acids in the goldfish testis[J]. *Biology of Reproduction*, 1994, 51(1): 131-139.
- [34] Mercure F, Van Der Kraak G. Inhibition of gonadotropin-stimulated ovarian steroid production by polyunsaturated fatty acids in teleost fish[J]. *Lipids*, 1995, 30(6): 547-554.
- [35] Mercure F, Van Der Kraak G. Mechanisms of action of free arachidonic acid on ovarian steroid production in the goldfish[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1996, 102(1): 130-140.
- [36] Lee Y H, Du J L, Yen F P, *et al.* Regulation of plasma gonadotropin II secretion by sex steroids, aromatase inhibitors, and antiestrogens in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* Bleeker[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 129(2-3): 399-406.
- [37] Sohn Y C, Kobayashi M, Aida K. Regulation of gonadotropin β subunit gene expression by testosterone and gonadotropin-releasing hormones in the goldfish, *Carassius auratus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 129(2-3): 419-426.
- [38] Yamaguchi S, Gen K, Okuzawa K, *et al.* Regulation of gonadotropin subunit genes expression by 11-ketotestosterone during early spermatogenesis in male red seabream, *Pagrus major*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28(1-4): 111-112.
- [39] Yamaguchi S, Gen K, Okuzawa K, *et al.* Influence of estradiol-17 β , testosterone, and 11-ketotestosterone on testicular development, serum steroid hormone, and gonadotropin secretion in male red sea bream *Pagrus major*[J]. *Fisheries Science*, 2006, 72(4): 835-845.
- [40] Norambuena F, Estévez A, Sánchez-Vázquez F J, *et al.* Self-selection of diets with different contents of arachidonic acid by Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstock[J]. *Aquaculture*, 2012, 364-365: 198-205.
- [41] Norambuena F, Morais S, Estévez A, *et al.* Dietary modulation of arachidonic acid metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstock reared in captivity[J]. *Aquaculture*, 2013, 372-375: 80-88.
- [42] Lee Y H, Du J L, Yueh W S, *et al.* 17 β -estradiol, but not testosterone stimulates gonadotropin II concentrations in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* Bleeker[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1999, 21(4): 345-351.
- [43] Zheng F, Takeuchi T, Yoseda K, *et al.* Requirement of larval cod for arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid using by their enriched *Artemia nauplii*[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1996, 62(4): 669-676.
- [44] Estévez A, Ishikawa M, Kanazawa A. Effects of arachidonic acid on pigmentation and fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel)[J]. *Aquaculture Research*, 1997, 28(4): 279-289.
- [45] Ishizaki Y, Takeuchi T, Watanabe T, *et al.* A preliminary experiment on the effect of *Artemia* enriched with arachidonic acid on survival and growth of yellowtail[J]. *Fisheries Science*, 1998, 64(2): 295-299.
- [46] Xu H G, Ai Q H, Mai K S, *et al.* Effects of dietary arachidonic acid on growth performance, survival, immune response and tissue fatty acid composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*[J]. *Aquaculture*, 2010, 307(1-2): 75-82.
- [47] Hu J, Zhang Z H, Shen W J, *et al.* Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones[J]. *Nutrition & Metabolism*, 2010, 7(1): 1-25.
- [48] Bell J G, Sargent J R. Arachidonic acid in aquaculture feeds: Current status and future opportunities[J]. *Aquaculture*, 2003, 218(1-4): 491-499.
- [49] Emata A C, Ogata H Y, Garibay E S, *et al.* Advanced broodstock diets for the mangrove red snapper and a potential importance of arachidonic acid in eggs and fry[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28(1-4): 489-491.
- [50] Mourente G, Medina A, González S, *et al.* Changes in lipid class and fatty acid contents in the ovary and midgut gland of the female fiddler crab *Uca tangeri* (Decapoda, Ocypodiidae) during maturation[J]. *Marine Biology*, 1994, 121(1): 187-197.
- [51] McNamara R K, Able J, Jandacek R, *et al.* Gender

- differences in rat erythrocyte and brain docosahexaenoic acid composition: role of ovarian hormones and dietary omega-3 fatty acid composition[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2009, 34(4): 532-539.
- [52] Marks K A, Kitson A P, Stark K D. Hepatic and plasma sex differences in saturated and monounsaturated fatty acids are associated with differences in expression of elongase 6, but not stearoyl-CoA desaturase in Sprague-Dawley rats[J]. *Genes & Nutrition*, 2013, 8(3): 317-327.
- [53] Estévez A, McEvoy L A, Bell J G, *et al.* Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in Arachidonic and Eicosapentaenoic acids[J]. *Aquaculture*, 1999, 180(3-4): 321-343.
- [54] Willey S, Bengtson D A, Harel M. Arachidonic acid requirements in larval summer flounder, *Paralichthys dentatus*[J]. *Aquaculture International*, 2003, 11(1-2): 131-149.
- [55] Yanes-Roca C, Rhody N, Nystrom M, *et al.* Effects of fatty acid composition and spawning season patterns on egg quality and larval survival in common snook (*Centropomus undecimalis*)[J]. *Aquaculture*, 2009, 287(3-4): 335-340.

Effects of dietary arachidonic acid on the sex steroid hormone synthesis in turbot broodstock before maturation

ZHANG Yuanqin^{1,2}, XU Houguo², CAO Lin², WEI Yuliang²,
ZHENG Keke², LIANG Mengqing^{1,2,3*}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China)

Abstract: To investigate the effects of dietary arachidonic acid (ARA) on the sex steroid hormone production and the gene expressions of the key proteins in steroidogenesis in gonads of turbot *Scophthalmus maximus* broodstocks, three isonitrogenous and isolipidic (lipid content 13%) experimental diets were formulated to contain different ARA levels: the control diet without ARA supplementation (C, 0.72% ARA of total fatty acids) and two diets with low (5.63% of total fatty acids, ARA-L) or high ARA (15.03% of total fatty acids, ARA-H) level. The experimental diets were randomly assigned to 9 tanks of 3-year-old turbot (25 fish in each tank). Fish were reared in an indoor flowing seawater system and fed to apparent satiation twice daily. At the end of the feeding trial, sex steroid hormone production was assayed and gonad samples from females and males were collected to determine the gene expressions of sex steroid-synthesizing proteins. The results showed that compared to the control group, ARA-H significantly reduced the estradiol production in females but in males ARA-L significantly reduced the testosterone production. In ovaries, ARA-H significantly reduced the mRNA expression of follicle stimulating hormone receptor, but ARA-L significantly increased the mRNA expression of 17α -hydroxylase. In testes, ARA-L significantly reduced the mRNA expression of steroidogenic acute regulatory protein and 17α -hydroxylase, but significantly increased the mRNA expression of aromatase. Dietary ARA supplementation increased the ARA accumulation but decreased the EPA accumulation in fish tissues. The ARA concentration in ovaries was higher than that in testes. In conclusion, certain content of dietary ARA inhibited the estradiol and testosterone production in immature turbot broodstock. In ovaries, this inhibition may be attributed to the inhibition on follicle stimulating hormone receptor, but in testes it may be attributed to the inhibition on steroidogenic acute regulatory protein and 17α -hydroxylase.

Key words: *Scophthalmus maximus*; broodstock; diet; arachidonic acid; sex steroid hormone synthesis; gene expression

Corresponding author: LIANG Mengqing. E-mail: liangmq@ysfri.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31402309); Financial Grant from the China Postdoctoral Science Foundation (2014M551991, 2015T80763); Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-50-G08)