

文章编号: 1000-0615(2018)05-0787-10

DOI: 10.11964/jfc.20170410810

杜仲对草鱼生长、肌肉品质和胶原蛋白基因表达的影响

许晓莹^{1,2,3}, 李小勤^{1,2,3}, 孙文通¹, 姜维波¹, 潘雯倩¹,
汪军鹏¹, 土志涵¹, 冷向军^{1,2,3*}

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

2. 农业部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海海洋大学, 上海 201306;

3. 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海海洋大学, 上海 201306)

摘要: 为研究杜仲对草鱼生长性能、肌肉品质及胶原蛋白基因 $COL1A1$ 和 $COL1A2$ 表达的影响, 实验采用初始体质量为 (215.0 ± 0.4) g的草鱼120尾, 随机分为2处理组(每组3重复, 每重复20尾鱼), 分别饲喂基础饲料(对照组)和添加2%杜仲的实验饲料(杜仲组), 养殖时间为8周。结果显示, 与对照组相比, 添加2%杜仲对草鱼生长性能无显著影响, 但能显著增加肌肉、皮肤和肝脏胶原蛋白水平, 增加肌肉总必需氨基酸(TEAA)、总氨基酸(TAA)水平。2%杜仲可显著降低草鱼肌肉的冷冻失水率、离心失水率, 但对肌纤维密度和肌纤维直径无显著影响。在胶原蛋白基因表达方面, 2%杜仲显著增加了第4周、8周时草鱼的肌肉、皮肤和第8周时的肝脏组织 $COL1A1$ 、 $COL1A2$ 基因mRNA表达量。研究表明, 饲料中添加2%杜仲可改善大规格草鱼的肌肉品质。

关键词: 草鱼; 杜仲; 生长; 胶原蛋白; 肌肉品质; $COL1A1$; $COL1A2$; 基因表达

中图分类号: Q 785; S 963.7

文献标志码: A

杜仲(*Eucommia ulmoides*)属杜仲科(Eucommiaceae), 杜仲属, 具有很高的经济价值和药用价值。现代医学研究表明, 杜仲具有补肝肾、强筋骨、止痛、利尿^[1]、降脂肪和血糖^[2-3]、降血压^[4]、抗氧化^[5]、抗肿瘤及增强免疫, 促进胶原蛋白合成^[6]等功效。在动物养殖中的研究表明, 杜仲可改善猪生长性能和肉质^[7-8]、增加鸡^[9]、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)^[10]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[11]肌肉胶原蛋白含量, 提高鸡^[12]、异育银鲫^[10]的免疫功能。

胶原蛋白是一种白色透明、无分支的纤维状细胞外基质蛋白, 分子量约300 ku, 具有超螺旋结构, 是动物体内最为丰富和重要的蛋白质之一, 广泛分布于肌肉、皮肤、软骨、肌腱、韧带等部位, 参与细胞迁移、分化和增殖, 在维持组织器官正常结构、功能方面发挥着重要

作用^[13-14]。在鱼类肌肉组织中, 胶原蛋白作为肌肉连接组织的结构蛋白, 在维持鱼类肌肉质构与肌纤维的形成中发挥着重要作用。

草鱼是我国重要的经济鱼类, 在高密度集约化养殖下, 草鱼肉质表现出下降的趋势, 影响了养殖的经济效益。杜仲作为天然植物, 具有改善养殖动物肉质的功效。但关于杜仲改善肉质的机理尚不清楚, 对草鱼胶原蛋白合成相关基因的表达也未见报道。为此, 本实验以草鱼为研究对象, 探讨饲料中添加杜仲对草鱼生长性能、肌肉品质、胶原蛋白含量和胶原蛋白基因 $COL1A1$ 、 $COL1A2$ 表达的影响, 为改善养殖鱼类肉质提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验设计与实验饲料

在基础饲料(对照组)中添加2%杜仲(杜仲

收稿日期: 2017-04-24 修回日期: 2017-10-11

资助项目: 国家自然科学基金(31772858)

通信作者: 冷向军, E-mail: xjleng@shou.edu.cn

组), 相应减少2%麦麸, 共2种饲料。各原料经粉碎后过40目筛, 逐级混匀经挤压机制成直径2 mm的沉性颗粒饲料(单螺杆挤压机SLP-45, 中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所, 中国; 制粒温度90~95 °C), 晾干, 塑料袋密封保存。饲料组成及营养指标见表1, 实验饲料氨基酸组成见表2。

表1 实验饲料配方与营养组成
Tab. 1 Ingredients and proximate composition of experimental diets %

饲料原料 ingredients ^a	对照组 control	杜仲组 EU
豆粕 soybean meal	15.0	15.0
棉粕 cottonseed meal	14.0	14.0
菜粕 rape seed meal	16.0	16.0
麦麸 wheat bran	25.0	23.0
次粉 wheat middlings	25.4	25.4
豆油 soybean oil	1.0	1.0
氯化胆碱 choline chloride (60%)	0.6	0.6
维生素预混料 vitamin premix ^b	0.5	0.5
矿物质预混料 mineral premix ^c	1.0	1.0
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.5	1.5
杜仲 <i>Eucommia ulmoides</i>	0.0	2.0
合计 total	100.0	100.0
营养成分 proximate composition		
水分 moisture	9.7	9.6
粗蛋白 crude protein	28.7	29.1
粗脂肪 crude lipid	3.8	3.7
灰分 ash	7.0	7.1

注: a. 配方中的饲料原料购于苏州通威饲料公司, 所用豆粕, 棉粕和菜粕的粗蛋白含量分别为45.3%、50.0%、39.1%

Notes: a. The ingredients in formula were purchased from the Tongwei Feed company (Suzhou, China), and the protein contents are as follow: soybean meal (45.3%), cottonseed meal (50.0%), rapeseed meal (39.1%); b. vitamin premix (mg or IU/kg diet): VA, 6000IU; VD₃, 2000IU; VC, 200mg; VE, 50mg; VK₃, 5mg; VB₁, 15mg; VB₂, 15mg; VB₃, 30mg; VB₅, 35mg; VB₆, 6mg; VB₁₂, 0.03mg; biotin, 0.2mg; folic acid, 3mg; inositol, 200mg;

c. mineral premix (mg/kg diet): I, 0.4mg; Cu, 4mg; Zn, 80mg; Fe, 150mg; Mn, 20mg; Mg, 100mg; Co, 0.1mg; Se, 0.1mg

1.2 实验用鱼与饲养管理

实验用草鱼的初始体质量为(215.0±0.4) g, 购于上海市青浦水产养殖场。取120尾规格一致, 体质健壮个体, 随机分配于6个网箱(1.5×1.2×1.2)中, 每网箱20尾, 网箱置于室内水泥池(5.0×3.0×1.2)中。养殖实验在上海海洋大学滨海基地

表2 实验饲料氨基酸组成(干物质, %)

Tab. 2 Amino acid composition of the experimental diets (dry matter, %)

氨基酸 amino acids	对照组 control	杜仲组 EU
必需氨基酸 EAA		
苏氨酸 Thr	0.72	0.75
缬氨酸 Val	0.90	0.92
蛋氨酸 Met	0.31	0.32
异亮氨酸 Ile	0.54	0.56
亮氨酸 Leu	1.90	1.87
苯丙氨酸 Phe	1.45	1.44
组氨酸 His	1.52	1.45
赖氨酸 Lys	1.21	1.26
精氨酸 Arg	2.27	2.28
非必需氨基酸 NEAA		
天冬氨酸 Asp	2.74	2.74
丝氨酸 Ser	1.58	1.56
谷氨酸 Glu	6.19	6.32
甘氨酸 Gly	1.64	1.65
丙氨酸 Ala	1.42	1.44
半胱氨酸 Cys	0.38	0.39
酪氨酸 Tyr	0.76	0.75
脯氨酸 Pro	1.30	1.35
总氨基酸 TAA	26.81	27.04

进行, 饲养时间为8周。

在养殖期间, 各网箱保持基本一致的投饲量, 每天按体质量3%~5%分3次(8:00, 12:30, 17:00)投喂, 并依据天气、水温和鱼体增重等情况作适当调整, 以投饲结束后无残饵为宜。饲喂期间, 每5天更换1/3池水, 10天吸污一次, 水体24 h不间断充气, 溶解氧大于5.0 mg/L, pH 7.3~7.8, 水温24~30 °C, 氨氮浓度低于0.2 mg/L。

1.3 样品采集

养殖结束, 停食24 h, 统计每个网箱草鱼尾数并称总重, 计算增重率(WG)和饲料系数(FCR); 每网箱随机选取3尾鱼, 分别测量体长和体质量, 计算肥满度(CF); 解剖后取内脏和肝脏并称量, 计算脏体比(VSI)和肝体比(HSI)。取背部肌肉25 g于-20 °C冷冻, 用于肌肉成分分析;

从草鱼右侧背部采集肌肉样品(0.5 cm×0.5 cm×2 cm)保存于固定液中用于组织形态分析;另取3块各约3 g重的背部肌肉,立即用于肌肉失水率(3种方法:蒸肉法、冷冻法和离心法)的测定。

此外,分别在养殖试验的第4、8周末,每网箱分别随机取鱼2尾(每处理组6尾),进行酒精消毒,取侧线上方背鳍后方的白肌及肝脏、皮肤组织,于液氮中冷冻24 h,转入-80 °C冰箱中冻存,用于胶原蛋白基因表达和胶原蛋白含量的测定。

1.4 测定指标

生长性能和形体指标 增重率(weight gain, WG,%)=100×[末鱼体质量(g)-初鱼体质量(g)]/初鱼体质量(g)

饲料系数(feed conversion ratio, FCR)=摄食量(g)/[末鱼体质量(g)-初鱼体质量(g)]

肥满度(condition factor, CF, g/cm³)=100×末鱼体质量(g)/末鱼体长(cm)³

脏体比(viscero-somatic index, VSI,%)=100×末鱼内脏重(g)/末鱼体质量(g)

肝体比(hepato-somatic index, HIS,%)=100×末鱼肝脏重(g)/末鱼体质量(g)

肌肉与饲料成分测定 参照AOAC^[15]方法分析肌肉和饲料常规成分。水分测定采用105 °C烘干法,粗蛋白质测定采用凯氏定氮法(Kjeltec 2300, Foss, Sweden),粗脂肪测定采用氯仿甲醇法,粗灰分测定采用550 °C灼烧法。

肌肉和饲料氨基酸测定 称取约50 mg饲料和20 mg肌肉样品(干样),以6 mol/L盐酸于真空状态下110 °C水解24 h,采用Sykam433D氨基酸自动分析仪(德国赛卡姆sykam公司,德国)测定样品氨基酸组成。

胶原蛋白含量测定 胶原蛋白测定采用羟脯氨酸法(南京建成生物技术研究所提供试剂盒),其原理为羟脯氨酸在氧化剂的作用下所产生的氧化产物与二甲氨基苯甲醛作用呈现紫红色,根据呈色深浅测算羟脯氨酸含量,参照AOAC方法990.26^[16],乘以换算系数8得到胶原蛋白含量。本实验使用紫外分光光度计(UV759,上海精密科学仪器,中国)在560 nm波长下测定羟脯氨酸含量。

失水率 失水率采取蒸肉法、冷冻法和离心法测定。测定参照Srikanchai等^[17]、Barrera等^[18]的方法,并作修改。

蒸肉法:取约3 g背肌,称重,在沸水锅中蒸10 min,取出冷却,拭去表面水分,称量末重,蒸肉损失的重量与初始重量之比即为蒸失水率。

冷冻法:取约3 g背肌,称重,置于-20 °C冰箱中24 h,常温解冻,拭去表面水分,称量末重,冷冻损失重量与初始重量之比即为冷冻失水率。

离心法:取约3 g背肌,称重,放入5 mL离心管底部,置于离心机中3000 × g离心10 min,拭去表面水分,称量末重,离心损失重量与初始重量之比即为离心失水率。

1.5 肌肉组织学

参照Periago等^[19]、Johnston等^[20]的方法,将肌肉样品于Bouin氏液中固定24 h后取出,分别经70%、85%、90%及100%无水乙醇梯度脱水,置于二甲苯中透明,石蜡包埋、切片(6 μm;徕卡RM2245,德国),用苏木精-伊红染色进行形态分析。使用图像分析系统观察肌肉的肌纤维特征,每个样品数300根肌纤维,测量肌纤维直径(20倍镜),计算肌纤维密度(20倍镜)。

1.6 COL1A1和COL1A2基因表达检测

使用Trizol试剂提取总RNA,紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的浓度和纯度,利用TaKaRa反转录试剂盒(PrimeScript™ RT)将总RNA反转录为cDNA。反转录产物于-20 °C保存备用。根据草鱼18S(EU047719.1)及GenBank中草鱼COL1A1、COL1A2基因的cDNA全序列设计荧光定量PCR引物(表3)。实时荧光定量PCR采用20 uL反应体系:反转录产物1 uL、SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (TaKaRa) 10 uL、上下游引

表3 实时荧光定量PCR引物

Tab. 3 The primer for real-time PCR

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence from 5' to 3'	用途 usage
18srRNA-F	GGAATGAGCGTATCCTAAACCC	qRT-PCR
18srRNA-R	CTCCCGAGATCCAACAAGC	qRT-PCR
COL1A1-F	ACGCACACAAACAATCTCAAGT	qRT-PCR
COL1A1-R	GCATGGGGCAAGACAGTCA	qRT-PCR
COL1A2-F	ACTCCGATAGAGCCCAGCTT	qRT-PCR
COL1A2-R	ACATTGGTGGCGCAGATCA	qRT-PCR

物各0.5 uL、ddH₂O 8 uL。反应程序为95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40个循环, 最后95 °C 15 s, 65 °C至95 °C, 5 s升高0.5 °C进行溶解曲线检测。每个样品重复3次, 平行样间相对偏差不大于10%。

以4周时对照组草鱼肌肉、皮肤和肝脏组织的表达量为基准, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算4周时杜仲组和8周时对照组、杜仲组COL1A1、COL1A2基因mRNA的相对表达水平。

1.7 数据统计与分析

实验结果用平均值±标准差表示, 采用SPSS 17.0统计软件进行单因素或多因素方差分析, 差异显著者进行Duncan氏多重比较, 差异显著水平为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 生长性能和形体指标

与对照组相比, 杜仲组草鱼在增重率、饲料系数、脏体比、肝体比及肥满度指标上均无显著差异(表4)($P>0.05$)。

表4 杜仲对草鱼生长性能和形体指标的影响

Tab. 4 Effects of EU on growth performance and physical indicators of grass carp

指标 indicator	对照组 control	杜仲组 EU
初重/g IBW	214.8±0.4	215.1±0.4
末重/g FBW	495.1±14.9	484.1±10.5
增重率/% WG	130.3±6.9	125.2±4.9
饲料系数 FCR	2.03±0.06	2.09±0.07
脏体比/% VSI	6.61±0.13	6.26±0.38
肝体比/% HSI	2.11±0.13	1.98±0.14
肥满度/% CF	1.94±0.07	1.91±0.14

2.2 肌肉常规成分和肌肉组织学指标

养殖8周后, 两组草鱼肌肉水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分含量均无显著差异($P>0.05$)。与对照组相比, 杜仲组肌肉冷冻失水率和离心失水率均显著降低($P<0.05$), 蒸失水率两组之间无显著差异($P>0.05$)(表5)。两组草鱼在肌纤维密度、肌纤维直径上也无显著差异($P>0.05$)。

2.3 胶原蛋白

双因素方差分析结果表明, 饲料与养殖时

表5 8周时杜仲对草鱼肌肉品质(湿重)的影响

Tab. 5 Effects of EU on muscle quality of grass carp at the 8th week (wet basis)

成分 composition	对照组 control	杜仲组 EU
水分/% moisture	77.17±0.35	77.19±0.59
蛋白质/% crude protein	19.80±0.26	19.87±0.43
脂肪/% crude lipid	1.67±0.13	1.63±0.14
灰分/% crude ash	1.27±0.02	1.25±0.04
蒸失水率/% cooking loss	23.31±1.52	22.50±1.13
冷冻失水率/% thawing loss	6.90±0.18 ^a	4.81±0.24 ^b
离心失水率/% centrifugal loss	8.70±0.53 ^a	6.89±0.67 ^b
肌纤维密度/(根/mm ²) muscle fiber density	215±14.8	216±13.9
肌纤维直径/μm muscle fiber diameter	57.3±2.1	57.3±1.9

注: 同一行数据后不同小写字母表示两者有显著差异($P<0.05$)

Note: Means in the same row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

间对草鱼肌肉、皮肤和肝脏的胶原蛋白水平均有显著的影响($P<0.05$), 二者的交互作用对皮肤和肝脏胶原蛋白水平有显著影响($P<0.05$), 但对肌肉胶原蛋白水平没有显著影响($P>0.05$)(表6)。

杜仲组草鱼在4周、8周时肌肉胶原蛋白含量显著高于对照组($P<0.05$), 而皮肤、肝脏胶原蛋白含量在4周时与对照组没有显著差异($P>0.05$), 但在8周时较对照组显著升高($P<0.05$); 在整个饲

表6 杜仲对草鱼肌肉、皮肤、肝脏胶原蛋白含量的影响(湿重, g/kg)

Tab. 6 Effect of diet style and cultured time on muscle, skin and liver collagen content of grass carp (wet basis, g/kg)

时间 time	组别 groups	肌肉 muscle	皮肤 skin	肝脏 liver
4周 weeks	对照(P1)	2.36±0.06 ^a	27.94±0.96 ^a	1.62±0.07 ^a
	杜仲(E1)	2.67±0.09 ^b	28.22±1.17 ^a	1.67±0.07 ^a
8周 weeks	对照(P2)	2.30±0.08 ^a	35.42±1.60 ^b	1.64±0.11 ^a
	杜仲(E2)	2.56±0.07 ^b	38.85±2.19 ^c	1.83±0.10 ^b

双因素方差分析 Two-Way ANOVA

饲料 diets	时间 time	交互作用 interaction
<0.001	0.013	0.002
0.007	<0.001	0.011
0.763	0.030	0.045

注: 同一列数据后不同小写字母表示两者有显著差异($P<0.05$)

Notes: Means in the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

养阶段, 随着养殖时间延长, 对照组草鱼肌肉、肝脏中胶原蛋白含量保持基本稳定, 而皮肤胶原蛋白含量显著增加($P<0.05$), 杜仲组的肌肉胶原蛋白含量保持基本稳定, 而皮肤和肝脏胶原蛋白含量显著增加($P<0.05$)。

2.4 肌肉氨基酸组成

养殖8周后, 杜仲组草鱼肌肉的必需氨基酸、非必需氨基酸、总氨基酸及苯丙氨酸、组氨酸、丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸含量显著高于对照组($P<0.05$), 而缬氨酸含量显著低于对照组($P<0.05$)(表7)。

2.5 COL1A1、COL1A2基因表达

杜仲组草鱼肌肉和皮肤组织COL1A1、COL1A2基因mRNA表达量在4周、8周时均显著高于对照组($P<0.05$), 而肝脏COL1A1、COL1A2基因表达量在4周时显著低于对照组, 在8周显著高于对照组($P<0.05$); 对照组和杜仲组草鱼肌肉、皮肤和肝脏组织中COL1A1、COL1A2基因在8周时的表达量均显著高于4周时的表达量($P<0.05$)(表8)。

双因素方差分析结果表明, 饲料和养殖时间对草鱼肌肉、皮肤COL1A1、COL1A2基因表达量均有显著影响($P<0.05$), 两者的交互作用对肌肉、皮肤COL1A1基因和肝脏COL1A1、COL1A2基因表达量也有显著影响($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 杜仲对草鱼生长的影响

有研究表明, 杜仲可改善养殖动物的生长性能。在鸡的研究中, 添加2.5%杜仲可提高日增重率3.15%, 提高存活率9.21%^[9]; 王建辉^[7]发现, 添加1.5%杜仲显著提高了猪日增重, 降低了料重比和日均腹泻评分。在水产动物, 饲料中添加0.15%杜仲提取物可分别提高罗非鱼^[21]、草鱼幼鱼^[22]、异育银鲫^[10]的增重率(27.09%、8.57%和12.9%); 添加6%杜仲叶粉提高了鲤(*Cyprinus carpio*)增重率21%^[23]; 在饲料中分别添加4%、2%杜仲能显著改善草鱼^[24]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生产性能^[25]。也有研究表明, 饲料中添加杜仲对猪、鸡的生长性能无影响^[8, 12], 本实验中, 添加2%杜仲是基于前期的工作基础确定的适宜添加比例^[22, 24], 但对草鱼

表7 8周时杜仲对草鱼肌肉氨基酸组成的影响
(干物质, %)

Tab. 7 Effects of EU on muscle amino acids composition of grass carp at the 8th week (DM basis, %)

氨基酸 amino acids	对照组 control	杜仲组 EU
必需氨基酸 EAA		
苏氨酸 Thr	3.23±0.09	3.02±0.22
缬氨酸 Val	2.56±0.12 ^a	2.03±0.24 ^b
蛋氨酸 Met	2.15±0.20	2.29±0.08
异亮氨酸 Ile	2.06±0.16	1.77±0.22
亮氨酸 Leu	6.19±0.12	6.15±0.18
苯丙氨酸 Phe	3.34±0.08 ^b	3.56±0.06 ^a
组氨酸 His	5.46±0.50 ^a	6.97±0.91 ^b
赖氨酸 Lys	7.36±0.06	7.32±0.29
精氨酸 Arg	4.87±0.09	4.82±0.22
总必需氨基酸 TEAA	37.23±0.31 ^a	37.92±0.40 ^b
非必需氨基酸 NEAA		
*天冬氨酸 Asp	9.86±0.34	10.26±0.28
丝氨酸 Ser	3.85±0.05 ^a	4.03±0.07 ^b
*谷氨酸 Glu	13.16±0.19	13.44±0.31
*甘氨酸 Gly	3.95±0.11 ^a	4.25±0.17 ^b
*丙氨酸 Ala	5.40±0.012 ^a	5.78±0.08 ^b
半胱氨酸 Cys	0.61±0.01	0.56±0.08
酪氨酸 Tyr	2.44±0.02	2.35±0.06
脯氨酸 Pro	1.79±0.41	1.94±0.25
总非必需氨基酸 TNEAA	41.07±0.73 ^a	42.61±0.22 ^b
鲜味氨基酸 DAA	32.37±0.44 ^a	33.73±0.41 ^b
总氨基酸 TAA	78.30±0.71 ^a	80.53±0.59 ^b

注: 同行数据不同字母表示差异显著($P<0.05$)。*鲜味氨基酸

Notes: The different letters in the same row indicate significant difference($P<0.05$). *means DAA

的生长性能无显著影响, 其原因可能与采用实验动物的大小和生理阶段有关。在大都数生长实验中, 一般采用幼鱼生长速度快, 对饲料成分反应敏感。本实验采用初始体质量215 g的草鱼, 养殖结束时, 体质量已达600 g, 属成鱼阶段, 在生长反应上远不如幼鱼灵敏。

此外, 养殖期间发现杜仲组草鱼抢食活跃, 这种现象与罗庆华等^[23]、冷向军等^[24]的报道类似, 说明饲料中添加适量杜仲会起到一定的

表8 草鱼肌肉、皮肤和肝脏中COL1A1和COL1A2 mRNA相对表达水平

Tab. 8 The mRNA relative expression level of COL1A1 and COL1A2 mRNA in muscle, skin and liver of grass carp

时间 time	组别 groups	肌肉 muscle		皮肤 skin		肝脏 liver	
		COL1A1	COL1A2	COL1A1	COL1A2	COL1A1	COL1A2
4周 weeks	对照	1.00±0.12 ^a	1.00±0.08 ^a	1.00±0.04 ^a	1.00±0.06 ^a	1.00±0.08 ^b	1.00±0.09 ^b
	杜仲	1.26±0.06 ^b	1.58±0.08 ^c	1.44±0.06 ^b	1.20±0.08 ^b	0.46±0.03 ^a	0.34±0.03 ^a
8周 weeks	对照	1.70±0.11 ^c	1.40±0.11 ^b	1.74±0.03 ^c	2.06±0.16 ^c	1.53±0.08 ^c	0.66±0.05 ^c
	杜仲	2.07±0.08 ^d	2.03±0.16 ^d	1.89±0.10 ^d	2.29±0.18 ^d	2.27±0.16 ^d	0.79±0.07 ^d

双因素方差分析 Two-Way ANOVA

饲料 diets	<0.001	0.001	<0.001	0.001	0.259	<0.001
时间 time	<0.001	0.021	<0.001	<0.001	<0.001	0.200
交互作用 interaction	0.030	0.367	<0.001	0.813	<0.001	<0.001

注：同一列数据后不同小写字母表示两者有显著差异($P<0.05$)

Notes: Data in the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

诱食作用。由于本实验的目的是考察饲料质量对草鱼生长的影响，故两个处理组的投喂量基本一致，若采用饱食投喂，杜仲组草鱼可能会采食更多的饲料，从而具有更高增重率，这有待于今后进一步研究。

3.2 杜仲对草鱼胶原蛋白含量及COL1A1、COL1A2基因mRNA的影响

胶原蛋白是构成肌肉结缔组织的重要蛋白质，具有维持组织结构稳定性和保持其完整性的特征，是影响肌肉品质的重要因素^[19]。胶原蛋白含量及特征主要决定肌肉的坚实度，鱼类肌肉胶原蛋白含量的增加会使肌肉具有较高的机械强度^[26]。杜仲及其提取物已被证实可提高异育银鲫^[10]、草鱼^[11, 24]、鳊^[27]、凡纳滨对虾^[25]肌肉胶原蛋白水平。在小鼠^[28]、鸡^[9]的研究中也发现杜仲对胶原形成有促进作用。本实验中，杜仲显著增加了8周时的肌肉、皮肤和肝脏中胶原蛋白水平，这种作用与杜仲的活性成分绿原酸^[29, 11]、京尼平苷^[30]等有关，这方面有待进一步研究。

鱼类肌肉和皮肤中胶原蛋白的主要成分是I型胶原蛋白，其蛋白肽链包含两个 $\alpha 1$ 和一个 $\alpha 2$ 链，分别由COL1A1和COL1A2所编码。I型胶原蛋白对鱼类肌肉纤维的形成有特殊的重要作用，可在肌原纤维形成过程中增强肌肉的硬度^[31]， $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 起着正向调节肌肉组织分化的核心作用^[32]。关钧声等^[33]发现杜仲总提取物可显著促进大鼠成骨细胞增殖、分化和COL1A1的表达；来源于杜仲的松脂醇二葡萄糖苷、白桦脂醇和黄芩素均

能促进人皮肤成纤维细胞CO I、CO III基因的表达，增加成纤维细胞中胶原含量^[34]。本实验中，饲料中添加2%杜仲显著提高肌肉、皮肤和肝脏中COL1A1、COL1A2的相对表达量。杜仲促进胶原蛋白基因表达，应该是包括松脂醇二葡萄糖苷、黄芩素等多种活性成分共同作用的结果，这方面有待进一步研究。

值得注意的是，杜仲组草鱼肝脏组织在4周时COL1A1、COL1A2基因表达水平降低，可能杜仲对肝脏COL1A1、COL1A2基因在短期内有反向抑制现象，在8周时则显著提高了COL1A1、COL1A2的表达水平，具体的作用机制值得进一步探讨。

3.3 杜仲对草鱼肌肉品质的影响

氨基酸是蛋白质合成和其他含氮化合物的重要组成部分，也参与主要代谢途径的调控^[35]。在饲料中添加4%杜仲叶粉显著提高了草鱼肌肉^[24]鲜味氨基酸、必需氨基酸和氨基酸总量；杜仲提取物可显著提高猪肉总氨基酸和鲜味氨基酸含量^[7]；Sun等^[11]在饲料中添加400~800 mg/kg绿原酸、2%杜仲，显著增加了草鱼肌肉总必需氨基酸和总氨基酸水平；饲料中添加杜仲叶提取物增加了鸡胸肌的丝氨酸、谷氨酸和赖氨酸含量^[9]。本实验中，添加2%杜仲提高了草鱼肌肉鲜味氨基酸、必需氨基酸及总氨基酸水平，改善了肌肉的风味和品质，这可能是杜仲通过影响草鱼肌肉中的葡萄糖代谢，葡萄糖氧化生成乙酰CoA增多，而抑制了氨基酸生成乙酰CoA的

过程,从而使氨基酸在肌肉中沉积增多;也可能杜仲刺激了肌肉中某些蛋白质的合成,而导致氨基酸增加。

系水力(WHC)是指当肌肉受外力作用(加压、切碎、加热、冷冻)时仍保持原有水分的能力,是重要的肉质指标之一。常见评价系水力的指标包括滴水损失、解冻失水率、蒸煮失水率^[17]。肌纤维作为构成肌肉的基本单位,组织结构的变化影响肌肉的嫩度、多汁性、保水性和口感等指标,决定了肌肉品质。Hurling等^[36]发现肌纤维大小与肉质硬度密切联系,肌纤维直径越小,硬度越高。研究发现,杜仲可降低草鱼肌肉失水率及肌纤维直径,提高肌肉耐折力^[10, 22, 24];添加杜仲提取物1500~2000 mg/kg降低了猪肉滴水损失,增加了眼肌面积、肉色评分和肌肉大理石纹评分^[7]。本实验中,2%杜仲能够降低肌肉的冷冻失水率和离心失水率,可能是肌肉胶原蛋白含量增加,增强了肌肉的坚实度和机械强度,也可能与是杜仲较强的抗氧化功能和丰富的VE含量能增强了肌纤维的保水能力^[3]。

本实验中,杜仲对草鱼肌纤维密度及肌纤维直径没有显著影响,这与冷向军等^[24]、Sun等^[11]得到杜仲显著增加草鱼肌纤维密度,降低肌纤维直径的研究结果不一致,可能与本实验所用草鱼个体较大和养殖周期不够长有关。

4 结论

本实验结果表明,饲料中添加2%杜仲可增加草鱼肌肉、皮肤和肝脏胶原蛋白水平,肌肉氨基酸水平和COL1A1和COL1A2基因mRNA表达量,降低肌肉冷冻、离心失水率,从而改善草鱼肌肉品质。

参考文献:

- [1] Horii Y, Tanida M, Shen J, *et al.* Effects of *Eucommia* leaf extracts on autonomic nerves, body temperature, lipolysis, food intake, and body weight[J]. *Neuroscience Letters*, 2010, 479(3): 181-186.
- [2] Park S A, Choi M S, Kim M J, *et al.* Hypoglycemic and hypolipidemic action of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliver) leaves water extract in C57BL/KsJ-*db/db* mice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 107(3): 412-417.
- [3] Dai X P, Huang Q, Zhou B T, *et al.* Preparative isolation and purification of seven main antioxidants from *Eucommia ulmoides* Oliv. (Du-zhong) leaves using HSCCC guided by DPPH-HPLC experiment[J]. *Food Chemistry*, 2013, 139(1-4): 563-570.
- [4] Kwan C Y, Chen C X, Deyama T, *et al.* Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the aqueous extracts of the *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf and bark: implications on their antihypertensive action[J]. *Vascular Pharmacology*, 2003, 40(5): 229-235.
- [5] Park S A, Choi M S, Jung U J, *et al.* *Eucommia ulmoides* Oliver leaf extract increases endogenous antioxidant activity in type 2 diabetic mice[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2007, 9(4): 474-479.
- [6] Li Y M, Metori K, Koike K, *et al.* Granuloma maturation in the rat is advanced by the oral administration of *Eucommia ulmoides* OLIVER leaf[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2000, 23(1): 60-65.
- [7] 王建辉, 贺建华, 易宣, 等. 杜仲提取物对猪胴体品质及肌肉氨基酸含量的影响[J]. *动物营养学报*, 2007, 19(3): 269-276.
- Wang J H, He J H, Yi X, *et al.* Effect of *Eucommia ulmoides* Oliv extract on growth performance, carcass characteristics, meat qualities and muscular amino acid contents in growing pig[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2007, 19(3): 269-276(in Chinese).
- [8] Lee S D, Kim H Y, Song Y M, *et al.* The effect of *Eucommia ulmoides* leaf supplementation on the growth performance, blood and meat quality parameters in growing and finishing pigs[J]. *Animal Science Journal*, 2009, 80(1): 41-45.
- [9] Wang M Q, Du Y J, Ye S S, *et al.* Effects of Duzhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) on growth performance and meat quality in broiler chicks[J]. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2012, 11(9): 1385-1389.
- [10] 石英, 冷向军, 李小勤, 等. 杜仲叶提取物对异育银鲫生长、血清非特异性免疫和肌肉品质的影响[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2008, 34(2): 200-206.
- Shi Y, Leng X J, Li X Q, *et al.* Effect of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliver) leaf extract on growth, serum non-specific immune response and meat quality of crucian carp[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 2008, 34(2): 200-206(in Chinese).
- [11] Sun W T, Li X Q, Xu H B, *et al.* Effects of dietary chlorogenic acid on growth, flesh quality and serum bioche-

- mical indices of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2017, 23(6): 1254-1263.
- [12] Kim Y J, Choi I H. Evaluation of dietary duzhong (*Eucommia ulmoides* Oliver) and castor aralia (*Kalopanax pictus* Nakai) leaf powder on growth performance, serum cholesterol, and meat quality in broilers[J]. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A—Animal Science*, 2013, 63(4): 183-189.
- [13] Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55(12): 1531-1546.
- [14] Ottani V, Raspanti M, Ruggeri A. Collagen structure and functional implications[J]. *Micron*, 2001, 32(3): 251-260.
- [15] Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*[M]. 16th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 1995
- [16] Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*[M]. 17th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 2000
- [17] Srikanthai T, Murani E, Wimmers K, *et al.* Four loci differentially expressed in muscle tissue depending on water-holding capacity are associated with meat quality in commercial pig herds[J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(1): 595-601.
- [18] Barrera A M, Ramírez J A, González-Cabrales J J, *et al.* Effect of pectins on the gelling properties of surimi from silver carp[J]. *Food Hydrocolloids*, 2002, 16(5): 441-447.
- [19] Periago M J, Ayala M D, López-Albors O, *et al.* Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.[J]. *Aquaculture*, 2005, 249(1-4): 175-188.
- [20] Johnston I A, Alderson R, Sandham C, *et al.* Muscle fibre density in relation to the colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Aquaculture*, 2000, 189(3-4): 335-349.
- [21] 谢丽玲, 曹俊辉, 杨素霞, 等. 中草药作为饲料添加剂养殖罗非鱼试验[J]. *水产科学*, 2009, 28(1): 11-14.
Xie L L, Cao J H, Yang S X, *et al.* The impact of dietary Chinese herbal medicines on growth performance and muscular composition in juvenile tilapia[J]. *Fisheries Science*, 2009, 28(1): 11-14(in Chinese).
- [22] 孟晓林, 冷向军, 李小勤, 等. 杜仲对草鱼种生长和血清非特异性免疫指标的影响[J]. *上海水产大学学报*, 2007, 16(4): 329-333.
Meng X L, Leng X J, Li X Q, *et al.* Effect of *Eucommia ulmoides* on growth and serum non-specific immune index of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fingerling[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2007, 16(4): 329-333(in Chinese).
- [23] 罗庆华, 卢向阳, 李文芳. 杜仲叶粉对鲤鱼肌肉品质的影响[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2002, 28(3): 224-226.
Luo Q H, Lu X Y, Li W F. Effects of *Eucommia* leaf powder on carp's muscle quality[J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2002, 28(3): 224-226(in Chinese).
- [24] 冷向军, 孟晓林, 李家乐, 等. 杜仲叶对草鱼生长、血清非特异性免疫指标和肉质影响的初步研究[J]. *水产学报*, 2008, 32(3): 434-440.
Leng X J, Meng X L, Li J L, *et al.* Effect of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliver) leaf on growth, serum non-specific immune index and meat quality of grass carp[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(3): 434-440(in Chinese).
- [25] 刘波, 冷向军, 李小勤, 等. 杜仲对凡纳滨对虾生长、血清非特异性免疫和肌肉成分的影响[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(2): 869-875.
Liu B, Leng X J, Li X Q, *et al.* Effect of *Eucommia ulmoides* on growth, serum non-specific immunity, and muscle composition of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(2): 869-875(in Chinese).
- [26] Johnston I A, Alderson R, Sandham C, *et al.* Patterns of muscle growth in early and late maturing populations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Aquaculture*, 2000, 189(3-4): 307-333.
- [27] Tanimoto S Y, Ikuma K, Takahashi S. Improvement in raw meat texture of cultured eel by feeding of Tochu leaf powder[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1993, 57(2): 205-208.
- [28] Hidehiko Y, Hayase K, Yamazaki J, *et al.* Effects of administration of an extract of Tu-chung leaf (*Eucommia ulmoides*, Oliver) on muscle protein synthesis in mice[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1991, 55(12):

- 3133-3134.
- [29] 李乃顺, 冷向军, 李小勤, 等. 绿原酸对草鱼鱼种生长、非特异性免疫和肉质的影响[J]. 水生生物学报, 2014, 38(4): 619-626.
- Li N S, Leng X J, Li X Q, *et al.* The effects of chlorogenic acid on the growth, non-specific immune index and the meat quality of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(4): 619-626(in Chinese).
- [30] Sun W T, Li X Q, Xu H B, *et al.* Effects of dietary geniposide on growth, flesh quality, and lipid metabolism of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2017, 48(6): 927-937.
- [31] Prockop D J, Kivirikko K I. Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1995, 64: 403-434.
- [32] Rossert J, De Crombrughe B. Type I collagen structure, synthesis, and regulation[M]//Bilezikian J P, Raisz L G, Martin T J. *Principles of Bone Biology*. San Diego: Academic Press, 2002
- [33] 关钧声, 郭海玲, 张紫佳, 等. 杜仲总提物对大鼠成骨细胞增殖、分化及 I 型胶原蛋白表达的影响[J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(7): 95-98.
- Guan J S, Guo H L, Zhang Z J, *et al.* Effects of Du-Zhong cortex extract on osteoblast cell proliferation, differentiation and Col1 α I expression[J]. *Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2014, 48(7): 95-98(in Chinese).
- [34] 邹海曼. 杜仲和补骨脂中活性植物雌激素成分对ESF-1细胞抗衰老基因调控机制的研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2013
- Zou H M. Study on the regulative effect on ESF-1 cell anti-aging gene of active phytoestrogens from *Eucommia* and *psoralea*[D]. Harbin: Heilongjiang university of Chinese Medicine, 2013 (in Chinese)
- [35] Jobgen W S, Fried S K, Fu W J, *et al.* Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2006, 17(9): 571-588.
- [36] Hurling R, Rodell J B, Hunt H D. Fiber diameter and fish texture[J]. *Journal of Texture Studies*, 1996, 27(6): 679-685.

Effects of dietary *Eucommia ulmoides* on growth, flesh quality, and collagen gene expression of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

XU Xiaoying^{1,2,3}, LI Xiaoqin^{1,2,3}, SUN Wentong¹, JIANG Weibo¹, PAN Wenqian¹,
WANG Junpeng¹, TU Zhihan¹, LENG Xiangjun^{1,2,3*}

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

2. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition of the Ministry of Agriculture,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The present study was conducted to investigate the effects of dietary *Eucommia ulmoides* (EU) on growth performance, flesh quality, collagen genes *COL1A1* and *COL1A2* expression of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). A total of 120 grass carp with an initial body weight of (215.0±0.4) g were randomly allocated into 2 groups with 3 replicates per group and 20 fish per replicate. The fish were fed formula diet without (control) or with the supplementation of 2% *Eucommia ulmoides* (EU) for 8 weeks. The supplementation of 2% EU did not significantly affect the growth performance of grass carp when compared with the control ($P>0.05$), but increased the collagen content in muscle, skin and liver ($P<0.05$). Total essential amino acids (TEAA), total non-essential amino acids (TNEAA) and total amino acids (TAA) in muscle of grass carp fed EU diet were significantly higher than those of control group. Fish fed EU showed significantly lower flesh thawing loss and centrifugal loss (higher water holding capacity) ($P<0.05$), but muscle fiber density and muscle fiber diameter showed no difference between the two groups ($P>0.05$). Moreover, dietary EU significantly promoted the relative expression level of *COL1A1* and *COL1A2* mRNA in muscle, skin at the 4th week, the 8th week, and the expression in liver at the 8th week ($P<0.05$). In conclusion, dietary EU could improve the flesh quality of large-size grass carp.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *Eucommia ulmoides*; growth; collagen; flesh quality; *COL1A1*; *COL1A2*; gene expression

Corresponding author: LENG Xiangjun. E-mail: xjleng@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31772858)