



α -硫辛酸对摄食高脂饲料的大口黑鲈生长性能和肝脏脂质代谢的影响

陆梓晔¹, 姚春风², 车明晓¹, 迟淑艳^{1*}, 谭北平¹

(1. 广东海洋大学水产学院, 水产动物营养与饲料实验室, 广东 湛江 524088;

2. 广东粤海饲料有限公司, 广东 湛江 524017)

摘要: 实验旨在探究高脂饲料中添加 α -硫辛酸 (α -LA) 对大口黑鲈生长性能和肝脏脂质代谢的影响, 配制 3 组等氮实验饲料, 分别为粗脂肪 14% 的基础饲料组 (D1), 粗脂肪 14% 添加 α -LA 组 (D2), 粗脂肪 16% 添加 α -LA 组 (D3), 投喂大口黑鲈幼鱼 [初体质量 (5.01±0.02) g], 养殖实验持续 8 周。结果显示, D3 组与 D1 组之间的鱼体增重率和特定生长率差异不显著, 显著高于 D2 组; D3 组的蛋白质效率和蛋白沉积率显著高于 D1 和 D2 组; D2 和 D3 组血清甘油三酯、谷草转氨酶和谷丙转氨酶活性比 D1 组显著降低, 各组间总胆固醇含量差异不显著。D2 和 D3 组的肝脏空泡化面积和脂肪含量显著低于 D1 组; D2 和 D3 组肝脏的脂肪甘油三酯脂肪酶和肉碱棕榈酰转移酶 I 活性显著提高, 脂肪酸合成酶和乙酰辅酶 A 羧化酶的活性显著降低; 肝脏代谢组学结果显示, D3 组不饱和脂肪酸的生物合成代谢通路相比 D1 组显著上调。D3 组肌肉十五烷酸、十七烷酸和二十一碳酸含量显著升高, D2 和 D3 组花生四烯酸 (ARA)、二十碳五烯酸 (EPA) 和二十二碳六烯酸 (DHA) 的含量显著升高。研究表明, 高脂饲料中添加 α -LA, 通过不饱和脂肪酸的生物合成代谢通路增强脂质分解并抑制脂质合成, 减少肝脂积累, 促进肝脏健康, 增加肌肉 ARA、DHA 和 EPA 的沉积。

关键词: 大口黑鲈; α -硫辛酸; 高脂饲料; 脂质代谢; 生长性能

中图分类号: S 963.73

文献标志码: A

与蛋白质相比, 脂类被认为是更经济的能量来源, 也是影响鱼虾生长性能的关键营养因素之一^[1]。高脂饲料可促进机体增重和蛋白质沉积^[2]、减少氨氮排放^[3], 改善养殖环境。然而, 也易导致肝脏脂质蓄积、代谢紊乱和氧化应激^[4], 造成机体免疫力下降^[5]而影响生长, 若受到病原等应激易导致死亡, 造成经济损失。

在对肉鸡^[6]、鼠^[7]和草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[8]的研究中发现, α -硫辛酸 (α -lipoic acid, α -

LA) 有降低脂质合成和增加脂质分解的作用。用 α -LA 处理 3T3 脂肪细胞后, 可显著增加细胞线粒体面积和数量, 通过调节丙酮酸脱氢酶活性催化合成乙酰辅酶 A, 增加线粒体脂肪酸 β -氧化能力, 加速脂质分解供能^[9-14]。 α -LA 激活小鼠肝脏 AMP 依赖的蛋白激酶 (AMP-dependant protein kinase, AMPK) 和 FOXO1/ATGL 信号通路, 抑制甘油-3-磷酸酰基转移酶 (glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT) 和二酰基甘油-O-酰基转移酶-2

收稿日期: 2021-10-28 修回日期: 2021-11-08

资助项目: 广东省现代农业产业技术体系创新团队专项 (2021KJ150)

第一作者: 陆梓晔 (照片), 从事水产动物营养研究, E-mail: luziye2015@126.com

通信作者: 迟淑艳, 从事水产动物营养研究, E-mail: chishuyan77@163.com



(diacylglycerol acyltransferase, DGAT) 的基因表达, 降低甘油三酯的含量, 抑制肝脏脂质积累^[15-17]。

2020年淡水鲈的全国养殖总产量近62万t^[18], 主要为大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)。大口黑鲈1983年首次被引进广东省, 深受消费者喜爱, 养殖产量逐年攀升, 然而, 大口黑鲈由于摄食高脂饲料易导致脂肪在肝脏与腹腔中大量沉积, 诱发机体脂代谢紊乱, 影响其养殖产量。因此, 本研究评估大口黑鲈摄食添加 α -LA的高脂饲料后其生长性能、脂质代谢和肝脏健康的变化, 为推动大口黑鲈健康养殖提供策略。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

配制3组等氮实验饲料(粗蛋白含量为54%), 分别为粗脂肪14%的基础饲料组(D1), 粗脂肪14%添加 α -LA组(D2), 粗脂肪16%添加 α -LA组(D3)(表1)。饲料原料经粉碎后过60目筛, 各原

表1 基础饲料组成及营养水平

Tab. 1 Composition and nutrient levels of the basal diet %

原料 ingredients	D1	D2	D3
红鱼粉 brown fish meal	56.00	56.00	56.00
鸡肉粉 chicken meal	10.00	10.00	10.00
发酵豆粕 fermented soybean meal	4.00	4.00	4.00
小麦谷朊粉 wheat gluten flour	3.00	3.00	3.00
高筋面粉 wheat flour	7.70	7.70	7.70
木薯淀粉 tapioca starch	4.00	4.00	4.00
血浆蛋白粉 plasma protein powder	2.00	2.00	2.00
溶血磷脂 lysophospholipids	0.10	0.10	0.10
鱼油 fish oil	7.14	7.14	9.14
α -硫辛酸 α -lipoic acid ¹		0.06	0.06
维生素预混料 vitamin premix ²	1.00	1.00	1.00
矿物质预混料 mineral premix ²	3.00	3.00	3.00
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	2.06	2.00	
总计 total	100.00	100.00	100.00
营养成分(干重) proximate composition			
水分 moisture	9.17	9.14	9.20
粗蛋白质 crude protein	54.20	53.79	54.29
粗脂肪 crude lipid	13.99	14.17	16.27
粗灰分 crude ash	7.45	7.97	7.31

注: 1. α -硫辛酸, 生工生物工程上海股份有限公司; 2. 维生素预混料和矿物质预混料, 湛江粤海饲料集团。

Notes: 1. α -LA, Sangong Biological Engineering Co., Ltd., (Shanghai); 2. vitamin premix and mineral premix, Yuehai Feed Group (Zhanjiang).

料按配方准确称重, 逐级混匀后膨化制粒(3.0 mm), 晾干后于-20 °C冰箱中储存备用。

1.2 实验用鱼与饲养管理

养殖实验在室内循环水养殖系统中进行(国联饲料有限公司, 湛江)。实验用鱼购自高州市英熙鱼虾苗场, 投喂商业饲料(粗蛋白>48%, 粗脂肪>7%)驯养2周。挑选体格健壮、规格均一的大口黑鲈幼鱼[初始体重(5.01±0.02)g]270尾, 随机分为3组, 每组3个重复, 每个重复30尾鱼。每天分别于8:00和16:00投喂实验饲料, 初始投喂量为体重的3%, 并根据摄食情况适当调整, 记录饱食投喂的摄食量。实验期间水温23.5~26.1 °C, 溶解氧≥5 mg/L, 实验持续8周。

1.3 样本采集及处理

养殖实验开始前, 随机取3尾鱼, 用于全鱼常规营养成分分析。养殖实验结束, 饥饿24 h后取样。记录存活尾数, 称重, 计算成活率、增重率、特定生长率和饲料效率。随机取3尾鱼, 检测全鱼粗蛋白, 用于计算蛋白沉积率。随机取3尾鱼, 剥离肝脏和肌肉, 用于常规营养成分分析。随机取3尾鱼, 剥离肝脏, 固定于4%甲醛溶液中, 用于制作肝脏切片。随机取3尾鱼, 尾静脉采血, 放入1.5 mL离心管中, 4 °C静置12 h, 4 000×g, 4 °C离心10 min, 分离血清, -80 °C冷冻保存, 用于血清生化指标测定。随机取3尾鱼, 剥离肝脏, 迅速于液氮中保存, 之后置于-80 °C冷冻保存, 用于检测肝脏脂代谢酶活性。另取每重复6尾鱼的肝脏, 迅速于液氮中保存, 置于-80 °C冷冻保存, 用于肝脏代谢组学分析。实验过程中操作人员严格遵守实验动物相关伦理规范。

肝脏油红O和H.E染色切片委托武汉塞维尔生物科技有限公司制作, 肝脏代谢组学委托广州基迪奥生物技术有限公司检测。血清生化指标甘油三酯(TG)、总胆固醇(T-CHO)、谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)采用试剂盒检测(南京建成生物工程研究所), 肝脏肉碱棕榈酰转移酶I(CPT I)、脂肪甘油三酯脂肪酶(ATGL)、脂肪酰合成酶(FAS)和乙酰辅酶A羧化酶(ACC)活性采用ELISA试剂盒检测(上海酶联生物科技有限公司)。

分析饲料、肝脏和肌肉常规养分含量, 水分测定采用105 °C烘干恒重法(GB/T 6435—2006), 粗蛋白质测定采用凯氏定氮法(GB/T 6432—2018),

粗脂肪测定采用索式抽提法 (GB/T 6433—2006), 粗灰分测定采用 550 °C 灼烧恒重法 (GB/T 6438—2007)。

肌肉脂肪酸含量委托河南海瑞正检测技术有限公司测定 (GB 5009.168—2016 检测)。

1.4 指标测定

成活率 (survival rate, SR, %) = $N_t/N_0 \times 100\%$

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

特定生长率 (special growth rate, SGR, %/d) = $(\ln W_t - \ln W_0)/t \times 100\%$

蛋白质效率 (protein efficiency ratio, PER, %) = $(W_t \times N_t - W_0 \times N_0)/(W_d \times p) \times 100\%$

蛋白质沉积率 (protein production value, PPV, %) = $(W_t \times p_t - W_0 \times p_0)/(W_d \times p) \times 100\%$

饲料系数 (feed coefficient rate, FCR) = $W_d/(W_t - W_0)$

摄食率 (feed intake, FI, %) = $W_d / [(W_t + W_0)/2] \times t \times 100\%$

式中, N_t 为终末尾数, N_0 为初始尾数, W_t 为终末体重 (g), W_0 为初始体重 (g), W_d 为采食饲料干重 (g), t 为养殖天数 (d), p 为饲料粗蛋白质含量 (%), p_0 为初鱼体蛋白含量 (%), p_t 为终末鱼体蛋白含量 (%)。

1.5 数据分析

采用 SPSS 26.0 统计软件对数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 如有显著差异 ($P < 0.05$), 则进行 Duncan 氏多重比较检验。数据用“平均值±标准误” (mean±SE) 表示。

2 结果

2.1 大口黑鲈生长性能及饲料利用

三个处理组之间的成活率没有显著差异 ($P > 0.05$) (表 2)。D3 组大口黑鲈终末体重、增重率和特定生长率显著高于 D2 组 ($P < 0.05$), 与 D1 组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。D3 组蛋白质效率显著高于 D1 和 D2 组 ($P < 0.05$), 且 D1 和 D2 组没有显著差异 ($P > 0.05$)。D3 组蛋白质沉积率显著高于 D1 和 D2 组 ($P < 0.05$)。D1 组摄食率比 D3 组高 11.8%, 未见显著差异 ($P > 0.05$), 但是显著高于 D2 组 ($P < 0.05$)。D3 组饲料系数显著低于 D1 和 D2 组 ($P < 0.05$), D1 和 D2 组间差异不显著 ($P > 0.05$), 但 D1 组饲料系数比 D2 组低 6.41%。

表 2 α -LA 对摄食高脂饲料的大口黑鲈生长性能以及饲料利用的影响

Tab. 2 Effect of α -LA on the growth performance and feed utilization of *M. salmoides* fed diets with high lipid levels

指标 index	D1	D2	D3
初始体重/g IBW	4.99±0.02	5.01±0.00	5.01±0.01
终末体重/g FBW	46.27±0.06 ^a	39.93±0.31 ^b	46.86±0.14 ^a
增重率/% WGR	826.50±1.21 ^a	697.07±6.21 ^b	826.86±1.98 ^a
特定生长率/% SGR	3.98±0.01 ^a	3.71±0.01 ^b	3.98±0.01 ^a
蛋白质效率/% PER	2.78±0.03 ^b	2.67±0.09 ^b	3.14±0.10 ^a
蛋白质沉积率/% PPV	46.01±0.50 ^b	40.32±1.16 ^c	51.37±1.91 ^a
摄食率/% FI	0.93±0.01 ^a	0.68±0.01 ^c	0.82±0.03 ^b
饲料系数 FCR	0.73±0.01 ^a	0.78±0.03 ^a	0.65±0.02 ^b
成活率/% SR	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00

注: 同行肩标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。
Notes: IBW, initial body weight, FBW, final body weight; values with different letter superscripts are significantly different ($P < 0.05$), the same below.

2.2 大口黑鲈血清生化指标

D2 和 D3 组甘油三酯显著低于 D1 组 ($P < 0.05$), 但 D2 和 D3 组差异不显著 ($P > 0.05$) (表 3)。各处理组总胆固醇之间无显著差异 ($P > 0.05$), 但 D2 组较 D1 组数值下降 4.41%。D1 组 AST 和 ALT 显著高于 D2 和 D3 组 ($P < 0.05$), 且 D2 组显著高于 D3 组 ($P < 0.05$)。

表 3 α -LA 对摄食高脂饲料的大口黑鲈血清生化指标的影响

Tab. 3 Effect of α -LA on the serum biochemical indicators of *M. salmoides* fed diets with high lipid levels

指标 index	D1	D2	D3
甘油三酯/(mmol/L) TG	12.40±1.95 ^a	2.70±0.40 ^b	5.53±0.64 ^b
总胆固醇/(mmol/L) T-CHO	51.66±1.62	49.38±1.19	52.25±1.74
谷草转氨酶/(U/L) AST	25.26±1.02 ^a	16.65±1.21 ^b	11.75±0.43 ^c
谷丙转氨酶/(U/L) ALT	72.26±0.48 ^a	61.00±0.13 ^b	58.54±0.14 ^c

2.3 大口黑鲈肝脏脂肪沉积

由油红 O 染色 (图 1-a~c, 图 2-b) 可知, D1 组肝脏油红 O 染色面积显著高于 D2 和 D3 组 ($P < 0.05$), D2 与 D3 组差异不显著 ($P > 0.05$)。肝脏切片 H.E 染色结果显示, D1 组中肝脏细胞相对松散, 细胞簇稀少, 细胞间质与胞浆内出现较多空泡, 细胞核向细胞边缘移动 (图 1-d)。D2 和 D3 组肝脏细胞边界清晰, 排列整齐, 细胞簇增多, 空泡化减少。D3 组空泡化面积 (图 2-a) 显著低于 D1 组 ($P <$

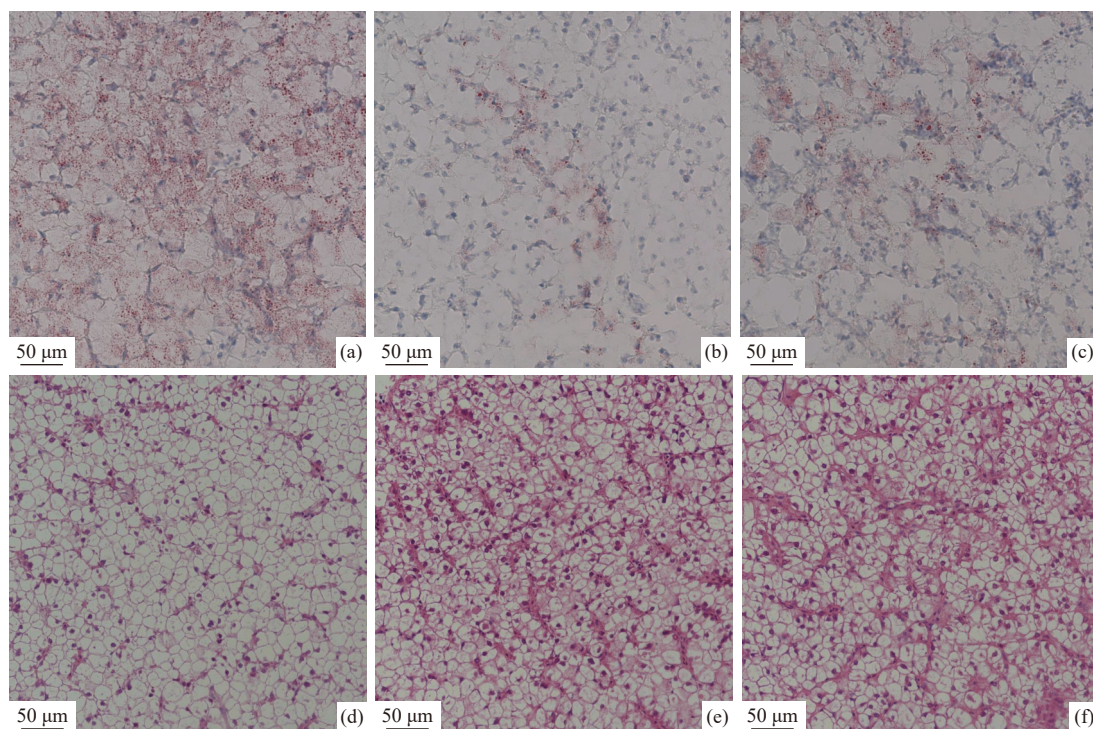


图 1 添加 α -LA 对摄食不同脂肪水平饲料的大口黑鲈肝脏组织学的影响

(a)~(c) 油红 O 染色; (d)~(f) H.E 染色; (a) (d) 基础饲料组 D1, (b) (e) 粗脂肪 14% + α -LA 组 D2, (c) (f) 粗脂肪 16% + α -LA 组 D3。

Fig. 1 Effect of α -LA on the histology of the liver of *M. salmoides* fed diets with high lipid levels

(a)~(c) oil red O staining; (d)~(f) H.E staining; (a) (d) basic diet group D1, (b) (e) 14% crude lipid+ α -LA group D2, (c) (f) 16% crude lipid+ α -LA group D3.

0.05), 但 D2 组与 D3 组差异不显著 ($P>0.05$)。D1 组的肝脏粗脂肪含量显著高于 D2 和 D3 组 (图 2-c) ($P<0.05$), D2 和 D3 组间差异不显著 ($P>0.05$)。

2.4 大口黑鲈肝脏脂肪代谢酶活性

D2 组 FAS 活性显著低于 D1 组, 显著高于 D3 组 ($P<0.05$) (表 4)。D1 和 D3 组 ACC 活性显著高于 D2 组 ($P<0.05$), D3 组的数值比 D1 组高 10.36%, 但差异不显著 ($P>0.05$)。各处理组大口黑鲈肝脏 CPT I 活性没有显著差异 ($P>0.05$), 但 D2 和 D3 组与 D1 组相比, 分别上升了 10.91% 和 27.27%。ATGL 在 D2 和 D3 组显著高于 D1 组 ($P<0.05$), 且 D2 组显著高于 D3 组 ($P<0.05$)。

2.5 大口黑鲈肝脏代谢组学

偏最小二乘法判别 (PLS-DA) 分析 采用 PLS-DA 数据分析法分析两处理组大口黑鲈肝脏样本在正、负离子模式下的差异代谢物 (图 3)。D1 组 (A) 和 D3 组 (F) 的样品点分别聚成一簇, 分布在不同位置且不相交, 实现不同样品组间的完全分离, 表明大口黑鲈摄食这两组饲料后, 在肝脏代谢物种类和含量上存在差异。

差异代谢物筛选 D1 与 D3 组共注释到 1358

个代谢物, 正离子模式下注释到 861 个代谢物, 负离子模式下注释到 497 个。将主要差异代谢产物用 progenesis QI 代谢数据处理软件进行结构和名称比对确认, 结果显示, 54 个差异代谢物有明显差异 ($VIP>1$, $P<0.05$), 再根据差异代谢物的 class 分类和 KO 注释信息筛选出 23 种脂质和 6 种氨基酸类差异代谢物 (图 4), 主要集中在羧酸及其衍生物 [N6,N6,N6-三甲基-L-赖氨酸、肌酐、苏氨酸、L-组氨酸、腺苷酸基琥珀酸、D-(-)-谷氨酰胺等]、脂类分子 [11-脱氧前列腺素、十六烷酰胺、硬脂酸酰胺、N-硬脂酰牛磺酸、MAG (18:3)、十四酸乙酯、肾上腺酸、反式-10-十七碳烯酸、 γ -亚麻酸二乙醇胺、羟甲戊二酸、5 β -雄烷二醇-二酮、 α -桐酸、二十二碳五烯酸、二十碳五烯酸、花生四烯酸和十五烷酸等]、甘油磷脂类 [溶血磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰胆碱 16:1、溶血磷脂酰胆碱 18:1、卵磷脂磷脂酰胆碱 (16:0/22:6)、溶血磷脂酰丝氨酸 22:6、溶血磷脂酰甘油 20:0 和溶血磷脂酸 (18:1) 等]。

差异代谢通路分析 将 D1 和 D3 组差异代谢物导入 KEGG 数据库进行代谢通路富集分析, 共富集到 56 条代谢通路。利用 P 值最小的前 20

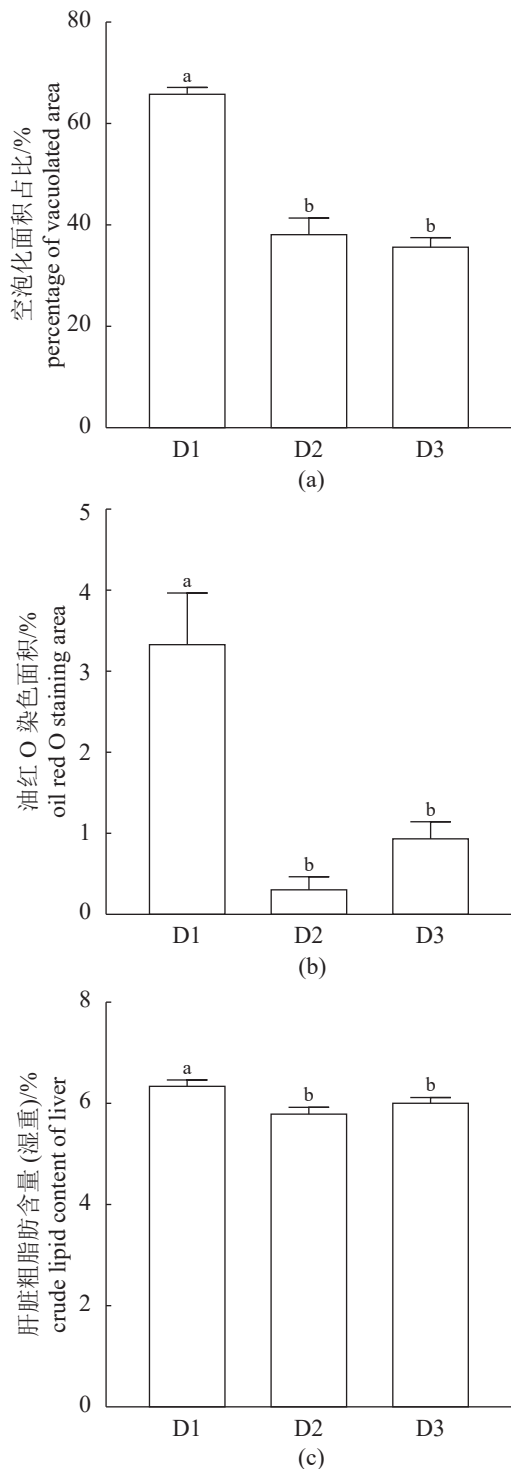


图2 α -LA对摄食不同高脂饲料的大口黑鲈肝脏组织切片和粗脂肪定量分析结果

(a) 空泡化占比; (b) 油红O染色面积; (c) 肝脏粗脂肪含量, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 2 Quantitative analysis of the effect of α -LA on liver tissue sections and crude lipid of *M. salmoides* fed diets with different high lipid levels

(a) percentage of vacuolation; (b) area of oil red O staining; (c) liver crude fat content, different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

表4 α -LA对摄食不同高脂饲料的大口黑鲈肝脏脂肪代谢酶活性的影响

Tab. 4 Effect of α -LA on the fat metabolizing enzymes of *M. salmoides* fed diets with high lipid levels

指标 index	D1	D2	D3
脂肪合成 lipogenesis			
脂肪酸合成酶/(U/ μ g) FAS	2.69 \pm 0.11 ^a	2.23 \pm 0.01 ^b	1.79 \pm 0.17 ^c
乙酰辅酶A羧化酶/(U/ μ g) ACC	44.14 \pm 2.08 ^a	39.12 \pm 1.64 ^b	49.24 \pm 2.96 ^a
脂肪分解 steatolysis			
肉碱棕榈酰转移酶 I/(U/mg) CPT I	0.55 \pm 0.00	0.61 \pm 0.04	0.70 \pm 0.07
脂肪甘油三酯脂肪酶/(U/mg) ATGL	305.24 \pm 7.69 ^c	441.55 \pm 10.86 ^a	352.80 \pm 5.02 ^b

个通路作图, 进行 KEGG 通路富集分析, 通过 KO 富集条形图发现, 不饱和脂肪酸的生物合成是其影响的主要代谢通路 (图 5)。不饱和脂肪酸的生物合成中, 花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸和肾上腺酸显著上调 ($P < 0.05$), γ -亚麻酸二乙醇胺显著下调 ($P < 0.05$)。

2.6 肌肉脂肪酸含量

D3 与 D1 组相比, 有 6 种脂肪酸含量发生变化 (表 5)。相比 D1 组, 大口黑鲈在投喂 D3 组饲料后, 肌肉中十五烷酸 C15:0、十七烷酸 (C17:0) 和二十一碳酸 (C21:0) 含量显著升高 ($P < 0.05$), 但饱和脂肪酸 (SFA) 含量差异不显著 ($P > 0.05$)。高脂饲料中添加 α -LA 后, 肌肉中 ARA、EPA 和 DHA 的含量显著升高 ($P < 0.05$)。

3 讨论

研究表明, 小鼠摄食含有 α -LA 的高脂饲料后也同样出现增重率下降的情况^[7]。 α -LA 可通过激活肥胖大鼠肌肉的 AMPK, 减少肌肉中甘油三酯积累, 导致体重明显下降^[19]。草鱼饲料中添加 α -LA 会增加小肠和胃胆囊收缩素和多肽 YY mRNA 表达而抑制摄食^[8], 本实验中 D2 组摄食率较 D1 组显著降低, 表明在同样的饲料粗脂肪水平下, 添加 α -LA 可能通过抑制下丘脑 AMPK 的 mRNA 表达, 导致摄食减少^[20]。另外, 在对缘边鲳鲆 (*Trachinotus marginatus*) 的研究中发现, 在饲料粗脂肪含量相同的情况下, 添加一定量的 α -LA 对蛋白质效率影响不显著^[21], 本实验 D2 组的蛋白质效率与 D1 组相比显著降低, 然而 D3 组的蛋白

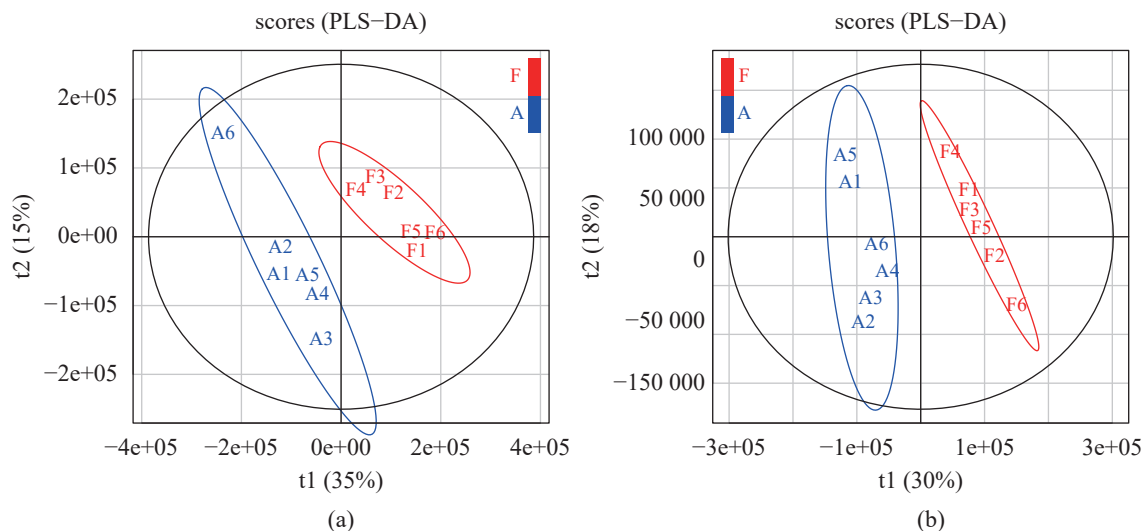


图3 大口黑鲈 D1 (A) 组与 D3 (F) 组差异代谢物 PLS-DA 对比得分图

(a) 基于 POS 模式; (b) 基于 NEG 模式。

Fig. 3 PLS-DA scores for the differential metabolites of the *M. salmoides* groups D1 (A) and D3 (F)

(a) based on POS mode; (b) based on NEG mode.

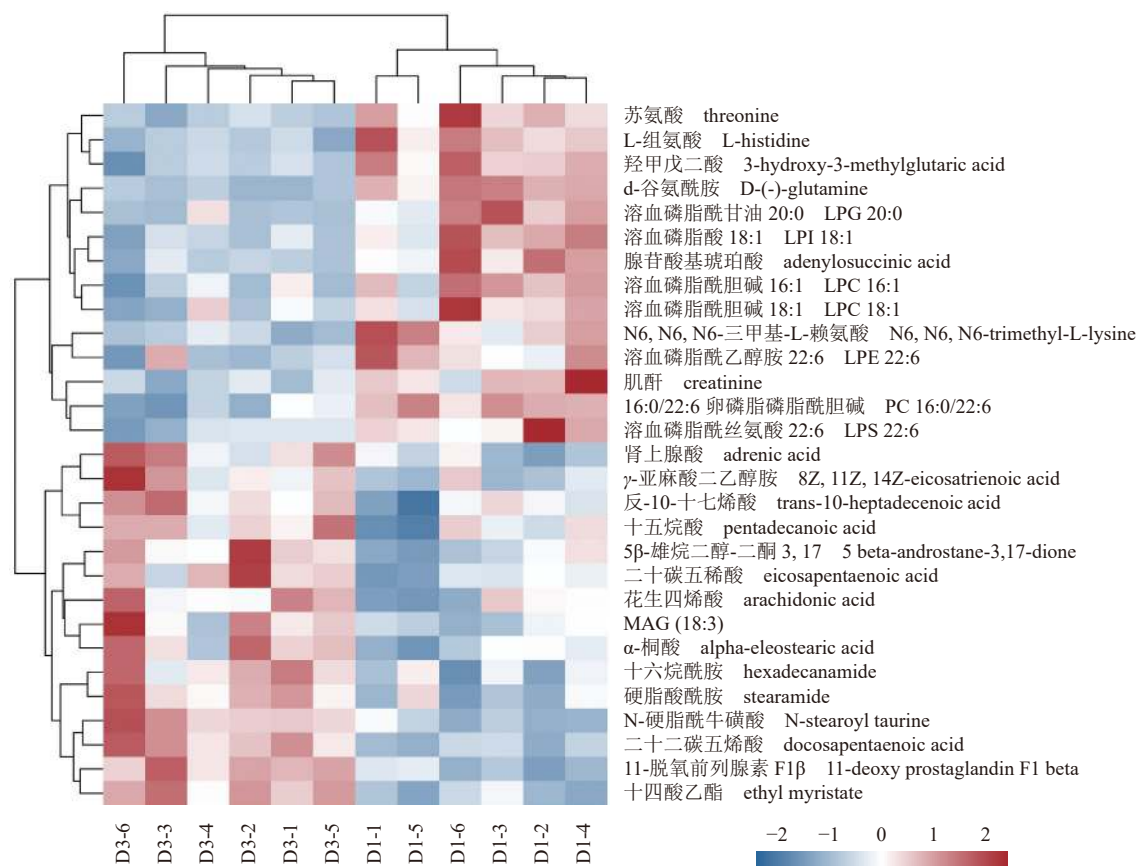


图4 大口黑鲈肝脏中脂质和氨基酸类差异代谢物热图

Fig. 4 Heat map of differential metabolites of lipids and amino acids in the liver of *M. salmoides*

质效率较 D1 和 D2 组显著升高。在对草鱼的研究中发现, 添加 α-LA 并增加饲料脂肪含量后, 高脂肪组的蛋白质效率较低脂肪组显著升高^[8], 与本

实验结果相似。添加 α-LA 对蛋白质沉积率可产生负面影响, 但提高脂肪含量后可以显著提高鱼体蛋白质沉积率, 说明大口黑鲈可以通过 α-LA 促

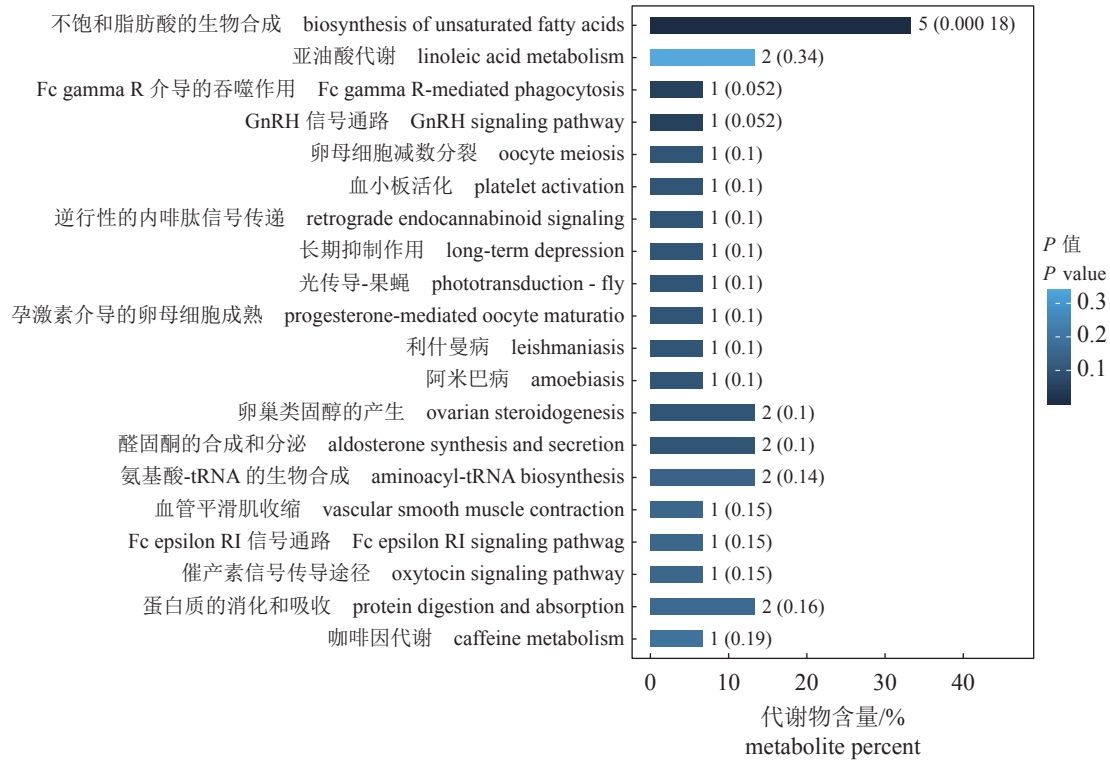


图 5 大口黑鲈肝脏中差异代谢物的 KEGG 功能通路富集条形图

括号外数字含义为参与代谢通路显著变化的代谢物数量, 括号内为 P 值。

Fig. 5 KEGG functional pathway enrichment bar graph for differential metabolites in the liver of *M. salmoides*

The numbers outside the brackets denote the number of metabolites involved in significant changes in metabolic pathways, and the values in the brackets are P values.

进 D3 组饲料中脂质的代谢, 为机体提供满足生长的有效能量, 从而提高饲料蛋白质的利用效率, 改善机体的蛋白质沉积效率。

α -LA 可以抑制肝脏合成甘油三酯, 减少极低密度脂蛋白的分泌^[17], 可以显著降低摄食高脂饲料的大鼠^[22]、小鼠^[23] 肝脏脂质和空泡化, 降低蛋鸡血清甘油三酯含量^[24]。本实验 D2 和 D3 组的大口黑鲈肝脏 CPT I 和 ATGL 酶活性升高, FAS 和 ACC 酶活性降低, 表明添加 α -LA 可促进肝脏脂肪酸 β 氧化进程, 抑制脂肪酸合成, 肝脏油红 O 和 H.E 染色切片结果显示, D2 和 D3 组的肝脏脂滴面积和空泡化面积显著低于 D1 组, 肝脏粗脂肪含量也印证了脂肪在肝脏中沉积减少的趋势。同时, 血清 TG、AST 和 ALT 活性显著降低, 进一步证明 α -LA 减少脂质沉积, 改善了肝脏损伤。

当 D3 组饲料粗脂肪含量升高到 16% 后补充 α -LA, 鱼体又获得了和 D1 组同样的增重率, 更高的蛋白质效率和蛋白质沉积率, 两组代谢组学分析显示肝脏代谢产物发生变化, 主要涉及脂肪酸代谢通路。D3 组饲料显著影响大口黑鲈肝脏中

不饱和脂肪酸的生物合成和亚油酸代谢通路, 其中二十碳五烯酸 (EPA)、二十二碳五烯酸 (DPA)、肾上腺酸 (AA)、花生四烯酸 (ARA) 含量显著上升, γ -亚麻酸二乙醇胺含量显著下降。

n-3PUFA 能抑制生脂基因转录, 促进解脂基因转录, 从源头上降低脂肪在肝脏中异位堆积^[25-27]。EPA 和 DPA 属于 n-3PUFA, EPA 可由 C18:0 经过脱氢酶和延长酶的作用合成^[28], 本实验 D3 组的大口黑鲈肌肉脂肪酸 C18:0 含量下降, 而 EPA 的含量显著升高, 推测 D3 组饲料有助于大口黑鲈合成 EPA。体外研究发现, EPA 的分子结构可能有助于膜的稳定性^[29], EPA 可以在延长酶 2 和延长酶 5 的作用下生成 DPA^[30], 而 DPA 可通过抑制 TLR-4/NF- κ B 信号通路, 降低肝脏脂肪^[31] 和血清 ALT 和 AST 活性^[32]。本实验肝脏代谢组学数据显示, EPA 和 DPA 含量在 D3 组显著上调, 与上述结果存在相似性, 推测 D3 组可能通过促进不饱和脂肪酸的生物合成, 提高肝细胞膜的稳定性, 缓解大口黑鲈肝脏脂质沉积和损伤。

ARA 和 AA 属 n-6PUFA, 其含量在 D3 组显

表 5 α -LA 对摄食不同高脂饲料的大口黑鲈肌肉脂肪酸含量的影响

Tab. 5 Effect of α -LA on the muscle fatty acids of *M. salmoides* fed diets with high lipid levels

脂肪酸 fatty acid	D1	D2	D3
C14:0	3.29±0.20	3.16±0.15	3.51±0.06
C15:0	0.46±0.01 ^c	0.51±0.00 ^b	0.54±0.01 ^a
C16:0	21.94±0.29	22.50±0.37	21.89±0.23
C17:0	0.68±0.01 ^b	0.73±0.02 ^b	0.79±0.02 ^a
C18:0	4.72±0.23	5.05±0.04	4.39±0.31
C21:0	0.97±0.05 ^b	0.98±0.06 ^b	1.25±0.09 ^a
ΣSFA	31.93±0.36	32.93±0.43	32.62±0.20
C16:1	6.05±0.35	4.93±0.20	5.95±0.59
C17:1	0.60±0.03	0.58±0.05	0.65±0.05
C18:1n9	18.42±0.59	16.78±0.54	17.01±1.03
C20:1	2.43±0.09	2.38±0.11	2.95±0.26
C22:1	1.46±0.09 ^{ab}	1.25±0.07 ^b	1.75±0.21 ^a
C24:1	0.39±0.03	0.40±0.01	0.41±0.04
C18:3n3	0.82±0.04 ^b	0.82±0.03 ^b	1.01±0.05 ^a
C20:5n3	4.90±0.09 ^b	5.61±0.21 ^a	6.18±0.19 ^a
C22:6n3	21.95±1.02 ^b	24.68±0.48 ^a	23.58±0.41 ^{ab}
Σn-3PUFA	29.33±0.30	31.12±0.37	30.30±1.49
C18:2n6	5.57±0.30	6.42±0.37	5.70±0.12
C20:4n6	2.31±0.11 ^b	3.09±0.05 ^a	3.18±0.18 ^a
Σn-6PUFA	8.59±0.24 ^{ab}	9.35±0.04 ^a	8.38±0.27 ^b

著上调。适量 ARA 可以抑制 3T3-L1 细胞分化^[33], 抑制草鱼肝脏 FAS 基因表达, 促进 CPT I 和 ATGL 基因表达。AA 可以有效减轻体内炎症^[34], 从而减少肝脏脂质积累和损伤^[35-36], 与本实验中肝脏脂质代谢酶活性结果相呼应。此外, 肌肉脂肪酸 ARA 也显著升高, 推测 D3 组饲料有助于大口黑鲈通过合成 ARA 减少肝脏脂肪积累。

腺苷酸基琥珀酸 (adenylosuccinic acid, ASA) 是 AMP 的结构类似物, 可能具有活化 AMPK, 提高糖代谢、脂代谢等功能^[37], 有研究表明, ASA 通过提高 HepG2 细胞 AMPK 下游的 ATGL 和 ACC 的表达量和磷酸化, 活化脂肪酸氧化和脂肪分解通路, 减少肝脏脂质积累^[38]。苏氨酸 (Thr) 通过 ACC 和丙酮酸参与机体能量代谢^[39]。D3 组肝脏 Thr 和 ASA 的含量显著下调, ACC 酶活性相较 D1 组存在升高趋势, 说明 α -LA 可以通过 Thr 和 ASA 的变化而影响机体脂质代谢。有研究表明, Thr 和组氨酸可以分别通过降低大西洋鲑 (*Salmo*

salar) 体内的胰岛素和瘦素水平^[40], 下调促食欲因子神经肽 Y 的表达^[41-42] 而降低采食量, 本研究中 D3 组摄食率显著低于 D1 组, 与此结果相互印证, 提示 α -LA 对机体摄食的影响可能与 Thr 和 His 有关。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Council N R. Nutrient requirements of fish and shrimp[M]. Washington, DC: The National Academies Press, 2011.
- [2] 陈光辉, 罗智. 水产动物锌营养生理及其与脂类代谢相关研究进展[J]. 水产学报, 2021, 45(4): 632-645.
Chen G H, Luo Z. Nutritional physiology of Zn and its relationship with lipid metabolism for aquatic animals: a review[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(4): 632-645 (in Chinese).
- [3] 张加润. 斑节对虾饲料鱼粉替代研究及商品饲料环境安全性评价 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
Zhang J R. Replacement of fish meal in diets for *Penaeus monodon* and the environmental safety evaluation on the commercial feeds[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013 (in Chinese).
- [4] 罗兴, 毕清竹, 孟晓雪, 等. 高脂饲料中添加含硫氨基酸对大菱鲆脂肪代谢的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(4): 893-905.
Luo X, Bi Q Z, Meng X X, et al. Effects of supplementation of sulfur-containing amino acids in high-lipid diets on lipid metabolism of turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022, 31(4): 893-905 (in Chinese).
- [5] 杨鸿昆. 卵磷脂、胆碱和肌醇在罗非鱼脂肪肝病变中的作用机制 [D]. 南宁: 广西大学, 2006.
Yang H K. Mechanism in tilapia's fatty liver pathological changes of lecithin, choline and inositol in the feed[D]. Nanning: Guangxi University, 2006 (in Chinese).
- [6] Hamano Y. Effects of dietary lipoic acid on plasma lipid, *in vivo* insulin sensitivity, metabolic response to corticosterone and *in vitro* lipolysis in broiler chickens[J]. *British Journal of Nutrition*, 2006, 95(6): 1094-1101.
- [7] Seo E Y, Ha A W, Kim W K. α -Lipoic acid reduced weight gain and improved the lipid profile in rats fed

- with high fat diet[J]. *Nutrition Research and Practice*, 2012, 6(3): 195-200.
- [8] Huang C C, Sun J, Ji H, *et al.* Influence of dietary alpha-lipoic acid and lipid level on the growth performance, food intake and gene expression of peripheral appetite regulating factors in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Aquaculture*, 2019, 505: 412-422.
- [9] Monsénégo J, Mansouri A, Akkaoui M, *et al.* Enhancing liver mitochondrial fatty acid oxidation capacity in obese mice improves insulin sensitivity independently of hepatic steatosis[J]. *Journal of Hepatology*, 2012, 56(3): 632-639.
- [10] Shen W L, Hao J J, Feng Z H, *et al.* Lipoamide or lipoic acid stimulates mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 adipocytes via the endothelial NO synthase-cGMP-protein kinase G signalling pathway[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2011, 162(5): 1213-1224.
- [11] Cronan J E. Assembly of lipoic acid on its cognate enzymes: an extraordinary and essential biosynthetic pathway[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(2): 429-450.
- [12] Shay K P, Moreau R F, Smith E J, *et al.* Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2009, 1790(10): 1149-1160.
- [13] Mayr J A, Feichtinger R G, Tort F, *et al.* Lipoic acid biosynthesis defects[J]. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2014, 37(4): 553-563.
- [14] Fernández-galilea M, Pérez-Matute P, Prieto-Hontoria P L, *et al.* α -lipoic acid reduces fatty acid esterification and lipogenesis in adipocytes from overweight obese subjects[J]. *Obesity*, 2014, 22(10): 2210-2215.
- [15] Kuo Y T, Lin T H, Chen W L, *et al.* Alpha-lipoic acid induces adipose triglyceride lipase expression and decreases intracellular lipid accumulation in HepG2 cells[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2012, 692(1-3): 10-18.
- [16] Kim M S, Park J Y, Namkoong C, *et al.* Anti-obesity effects of α -lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase[J]. *Nature Medicine*, 2004, 10(7): 727-733.
- [17] Butler J A, Hagen T M, Moreau R. Lipoic acid improves hypertriglyceridemia by stimulating triacylglycerol clearance and downregulating liver triacylglycerol secretion[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2009, 485(1): 63-71.
- [18] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 (2020)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural areas, National General Fisheries Technology Extension Station, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook (2020) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020 (in Chinese).
- [19] Lee W J, Song K H, Koh E H, *et al.* α -lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 332(3): 885-891.
- [20] Wang Y F, Everaert N, Song Z G, *et al.* Alpha-lipoic acid impairs body weight gain of young broiler chicks via modulating peripheral AMPK[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2017, 211: 34-40.
- [21] Kütter M T, Monserrat J M, Primel E G, *et al.* Effects of dietary α -lipoic acid on growth, body composition and antioxidant status in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* (Pisces, Carangidae)[J]. *Aquaculture*, 2012, 368-369: 29-35.
- [22] Chen W L, Kang C H, Wang S G, *et al.* α -Lipoic acid regulates lipid metabolism through induction of sirtuin 1 (SIRT1) and activation of AMP-activated protein kinase[J]. *Diabetologia*, 2012, 55(6): 1824-1835.
- [23] Yang Y, Li W, Liu Y, *et al.* Alpha-lipoic acid improves high-fat diet-induced hepatic steatosis by modulating the transcription factors SREBP-1, FoxO1 and Nrf2 via the SIRT1/LKB1/AMPK pathway[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2014, 25(11): 1207-1217.
- [24] Dai H J, Lv Z P, Hu C H, *et al.* Alpha-lipoic acid improves the reproduction performance of breeder hens during the late egg-laying period[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2020, 104(6): 1788-1797.
- [25] 曹景玉, 吴力群, 郭卫东, 等. ω -3多不饱和脂肪酸对肝癌细胞生长抑制的作用及机制[J]. 中国普通外科杂志, 2009, 18(2): 150-155.
- Cao J Y, Wu L Q, Guo W D, *et al.* Inhibitory effects of ω -3 polyunsaturated fatty acid on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Chinese Journal of*

- General Surgery, 2009, 18(2): 150-155 (in Chinese).
- [26] 李湛军, 乐嘉静, 阎安庄, 等. 海狗油 ω -3多不饱和脂肪酸对大鼠实验性脂肪肝的预防作用[J]. *药物分析杂志*, 2004, 24(2): 178-184.
- Li Z J, Le J J, Yan A Z, *et al.* Prevention effect of ω -3 polyunsaturated fatty acids from seal oil on fatty liver in experimental rats[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2004, 24(2): 178-184 (in Chinese).
- [27] 陈榕, 郭清, 朱文静, 等. ω -3多不饱和脂肪酸胶丸对非酒精性脂肪肝患者的治疗作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(18): 2002-2006.
- Chen R, Guo Q, Zhu W J, *et al.* Therapeutic efficacy of ω -3 polyunsaturated fatty acid capsule in treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2008, 16(18): 2002-2006 (in Chinese).
- [28] 朱路英, 张学成, 宋晓金, 等. n-3多不饱和脂肪酸DHA、EPA研究进展[J]. *海洋科学*, 2007, 31(11): 78-85.
- Zhu L Y, Zhang X C, Song X J, *et al.* Advances in n-3 polyunsaturated fatty acids DHA and EPA[J]. *Marine Sciences*, 2007, 31(11): 78-85 (in Chinese).
- [29] Sherratt S C R, Juliano R A, Mason R P. Eicosapentaenoic acid (EPA) has optimal chain length and degree of unsaturation to inhibit oxidation of small dense LDL and membrane cholesterol domains as compared to related fatty acids *in vitro*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2020, 1862(7): 183254.
- [30] Wang Y, Botolin D, Christian B, *et al.* Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases[J]. *Journal of Lipid Research*, 2005, 46(4): 706-715.
- [31] Guo X F, Sinclair A J, Kaur G, *et al.* Differential effects of EPA, DPA and DHA on cardio-metabolic risk factors in high-fat diet fed mice[J]. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2018, 136: 47-55.
- [32] 高雅, 蒯博婷, 曹后康, 等. 基于氧化应激和TLR-4/NF- κ B通路研究算盘子根总黄酮保肝作用及其机制[J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(4): 74-77.
- Gao Y, Xi B T, Cao H K, *et al.* Protective effects and mechanism of total flavonoids from the root of *Glochidion puberum* (Linn.) Hutch. on acute liver injury based on oxidative stress and TLR-4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2018, 34(4): 74-77 (in Chinese).
- [33] Petersen R K, Jørgensen C, Rustan A C, *et al.* Arachidonic acid-dependent inhibition of adipocyte differentiation requires PKA activity and is associated with sustained expression of cyclooxygenases[J]. *Journal of Lipid Research*, 2003, 44(12): 2320-2330.
- [34] Brouwers H, Jónasdóttir H S, Kuipers M E, *et al.* Anti-inflammatory and proresolving effects of the omega-6 polyunsaturated fatty acid adrenic acid[J]. *The Journal of Immunology*, 2020, 205(10): 2840-2849.
- [35] Xu H G, Wang C Q, Zhang Y Q, *et al.* Moderate levels of dietary arachidonic acid reduced lipid accumulation and tended to inhibit cell cycle progression in the liver of Japanese seabass *Lateolabrax japonicus*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 10682.
- [36] 田晶晶. 花生四烯酸 (ARA) 对草鱼脂质代谢的影响及其机制分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- Tian J J. Effects and mechanism analysis of arachidonic acid (ARA) on lipid metabolism of grass carp (*Ctenopharygodon idella*)[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2017 (in Chinese).
- [37] Garcia D, Shaw R J. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance[J]. *Molecular Cell*, 2017, 66(6): 789-800.
- [38] 王洋, 姜允嘉, 成钟, 等. 腺苷酸基琥珀酸活化AMPK抑制肝细胞内脂质蓄积的作用机制[J]. *中国医药生物技术*, 2020, 15(3): 240-248.
- Wang Y, Jiang Y J, Cheng Z, *et al.* Adenylosuccinate, a metabolite in purine salvage pathway, binds to AMP-activated protein kinase(AMPK) γ subunit and enhances the metabolic efficiency of lipid[J]. *Chinese Medicinal Biotechnology*, 2020, 15(3): 240-248 (in Chinese).
- [39] 王宗伟, 付建中, 杨志平, 等. L-苏氨酸在畜禽营养中的作用研究进展[J]. *中国饲料*, 2015(12): 23-26.
- Wang Z W, Fu J Z, Yang Z P, *et al.* The function of L-threonine in livestock and poultry nutrition[J]. *China Feed*, 2015(12): 23-26 (in Chinese).
- [40] Abboudi T, Ooghe W, Larondelle Y, *et al.* Determination of the threonine requirement for maintenance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry with the diet dilution procedure[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2007, 13(4): 281-290.
- [41] 翟煜, 霍小林, 王永利. 左旋组氨酸对匹罗卡品致病大鼠海马区神经肽Y表达和神经细胞凋亡影响的实验研究[J]. *河北医学*, 2016, 22(1): 1-4.

- Zhai Y, Huo X L, Wang Y L. Experimental study of influences of l-histidine in Y neuropeptide expression on the hippocampus and neuronal apoptosis of pilocarpine-induced seizures rats[J]. *Hebei Medicine*, 2016, 22(1): 1-4 (in Chinese).
- [42] 朱强胜, 何珊, 梁旭方, 等. 组氨酸及组胺对翘嘴鳊摄食调控的影响[J]. *华中农业大学学报*, 2020, 39(6): 180-186.
- Zhu Q S, He S, Liang X F, *et al.* Effect of histidine and histamine on feeding regulation of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2020, 39(6): 180-186 (in Chinese).

Effects of dietary alpha-lipoic acid on growth performance and hepatic lipid metabolism of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed diet with high lipid supplementation

LU Ziye¹, YAO Chunfeng², CHE Mingxiao¹, CHI Shuyan^{1*}, TAN Beiping¹

(1. Aquatic Economic Animal Nutrition and Feed Laboratory, College of Fisheries,

Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Guangdong Yuehai Feed Co., Ltd., Zhanjiang 524017, China)

Abstract: The experiment aims to investigate the effect of adding alpha-lipoic acid (α -LA) to high-fat diets on the growth performance and liver lipid metabolism of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Three isonitrogenous experimental diets were prepared: a basal diet with 14% crude lipid (D1), the second diet with 14% crude lipid added to α -LA (D2) and the third diet with 16% crude lipid added to α -LA (D3). *M. salmoides* [(5.01±0.02) g initial weight] juveniles ingested the three diets for 8 weeks. The results showed that the weight gain rate and specific growth rate of *M. salmoides* in groups D3 and D1 were not significantly different ($P>0.05$), but significantly higher than in group D2 ($P<0.05$); the protein efficiency and protein deposition rate of *M. salmoides* in group D3 were significantly higher than those in groups D1 and D2 ($P<0.05$). Serum triglycerides levels, glutamic oxaloacetic transaminase, and glutamic alanine transaminase activity were significantly lower in groups D2 and D3 compared to group D1 ($P<0.05$), while the difference in total cholesterol levels was not significant between the groups ($P>0.05$). Liver vacuolation and fat deposition were significantly lower in groups D2 and D3 than in group D1 ($P<0.05$). The hepatic metabolome results showed that the biosynthetic metabolic pathway of unsaturated fatty acids was significantly upregulated in group D3 compared to group D1 ($P<0.05$). Muscle fatty acids were significantly elevated in group D3 for pentadecanoic acid, heptadecanoic acid, and 21 carbonic acids ($P<0.05$). The contents of arachidonic acid (ARA), eicosapentaenoic acid (EPA), and docosahexaenoic acid (DHA) in muscle were significantly higher in groups D2 and D3 ($P<0.05$). High-lipid diet with α -LA enhanced lipolysis, inhibited lipid synthesis through the biosynthetic metabolic pathway of unsaturated fatty acids, and reduced hepatic lipid accumulation, as well as increased ARA, DHA, and EPA deposition in muscle.

Key words: *Micropterus salmoides*; α -lipoic acid; high-lipid diet; lipid metabolism; growth performance

Corresponding author: CHI Shuyan. E-mail: chishuyan77@163.com

Funding projects: Guangdong Modern Agricultural Industry Technology System Innovation Team Construction Project (2021KJ150)