

无鱼粉日粮条件下黄颡鱼生长性能和肝胰脏转录组差异表达的研究

周露阳, 叶元土, 蔡春芳, 吴萍, 高敏敏, 郁浓, 孙飞, 吕昊, 石瑶瑶, 吕斌, 易皓明

(苏州大学 基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 本研究以黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)为试验对象, 设计两种饲料: 鱼粉组和无鱼粉组, 在池塘网箱中投喂 70 d, 研究其生长性能和肝胰脏转录组表达的差异。同鱼粉组相比, 无鱼粉组黄颡鱼特定生长率下降了 30.25% ($P < 0.05$), 饲料系数显著增加了 83.94% ($P < 0.05$), 全鱼脂肪含量显著下降 ($P < 0.05$), 血清甘油三酯含量显著下降 ($P < 0.05$), 血清转氨酶活力显著增加 ($P < 0.05$)。肝胰脏转录组结果显示, 总计有 12 020 个基因差异表达, 其中差异表达上调的基因有 5 020 个, 差异表达下调的基因有 7 000 个。同鱼粉组相比, 无鱼粉组分别有 1 013 个基因表达显著上调、2749 基因表达显著下调 ($P < 0.05$)。将组间具有差异表达的基因进行 GO Term、KEGG pathway 分类, 结果显示: 无鱼粉组的肝胰脏细胞组成、细胞生物过程、细胞分子功能等绝大多数基因差异表达下调, 提示肝胰脏的细胞组织结构和功能受到很大的影响; KEGG 通路富集到 15 个显著差异代谢通路。本研究结果表明, 日粮中鱼粉可能含有某些生理活性物质, 这些物质以神经分泌、激素调控、代谢信号通路等为作用靶点, 通过对这些代谢信号通路的调节, 对鱼的整体生理代谢强度、细胞结构与功能、生理健康状态等产生明显积极促进影响。缺乏这些物质则会造成黄颡鱼生长性能下降、部分器官组织细胞(肝细胞、神经轴突)受到损伤、鱼体抗应激能力和免疫防御能力下降。

关键词: 鱼粉; 生长; 信号通路; 神经; 激素; 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)

中图分类号: S965.199 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2019)12-0097-13

DOI: 10.11759/hyxx20190517002

鱼粉对于水产养殖动物的特殊性作用一直是动物营养与饲料研究的热点和难点问题, 而较多的研究报告显示, 鱼粉作为一种海洋动物蛋白质原料, 在水产动物日粮中具有不可替代性或特殊性^[1, 2]。从营养学与生理学方面考虑, 鱼粉为什么具有特殊性而不可替代? 这种特殊性是鱼粉作为蛋白质原料的营养作用, 还是鱼粉中含有的特殊成分所产生的生理代谢作用? 与含有鱼粉的日粮比较, 无鱼粉日粮对水产动物的生长性能、尤其是生理代谢途径会产生怎样的影响? 这些影响的作用位点在哪里? 作用的途径是哪些? 传统上选用不同的蛋白质原料、通过养殖试验来研究鱼粉的替代效果不能解决鱼体生理代谢存在的问题, 现代组学技术和研究方法为这方面的研究提供了很好的方法和思路。作者以黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)为试验对象, 在池塘网箱中分别用鱼粉日粮和无鱼粉日粮饲养 70 d 后, 通过鱼体肝胰脏转录组的测定结果, 对鱼粉日粮对黄颡

鱼不同的生理代谢途径、尤其是在基因表达水平上具有显著差异表达的代谢途径的分析, 期望揭示日粮鱼粉对黄颡鱼生理代谢的作用位点、作用途径以及作用结果等深层次的问题, 以及从摄食无鱼粉日粮后, 鱼体生理代谢响应方面来认知日粮鱼粉的生理作用和存在的营养学与生理学问题, 为水产动物日粮营养供给和鱼粉使用技术提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验设计与饲料制作

鱼粉为秘鲁生产的超级蒸汽鱼粉, 其原料鱼主要为秘鲁鳀(*Peruvian anchovy*)。

收稿日期: 2019-05-17; 修回日期: 2019-07-13

基金项目: 校企合作项目(P113410618)

[Foundation: School Enterprise Cooperation Project, No. P113410618]

作者简介: 周露阳(1992-), 男, 浙江宁波人, 硕士研究生, 主要从事水产动物营养与饲料研究, E-mail: 598731905@qq.com; 叶元土, 通信作者, E-mail: yeyt@suda.edu.cn

按照等氮、等脂、等磷进行黄颡鱼试验日粮的配方设计, 配方见表 1。鱼粉组(对照组, FM)含有 28% 的鱼粉, 无鱼粉组(试验组, NF)以鸡肉粉(美国 Tyson)、棉籽蛋白(新疆泰昆)、大豆浓缩蛋白(河南曙光)作为蛋白质原料。以磷酸二氢钙平衡试验配方总磷含量, 以混合油脂(鱼油: 磷脂油: 豆油=1: 1: 2)平衡试验日粮中脂肪含量。

表 1 试验日粮配方及化学组成(干物质基础)
Tab. 1 Formulation and proximate analysis of the experimental diets (dry matter)

指标(g/kg)	鱼粉组	无鱼粉组
鱼粉	280	-
米糠粕	150	101
鸡肉粉	65	168
棉籽蛋白	65	168
大豆浓缩蛋白	65	168
磷酸二氢钙	5	16
混合油脂 ¹	15	24
细米糠	150	150
玉米蛋白粉	50	50
小麦粉	125	125
沸石粉	20	20
预混料	10	10
合计	1000	1000
日粮化学组成(g/kg 干物质)		
干物质	94.98	95.87
蛋白质	44.58	44.09
脂肪	11.89	11.79
灰分	13.79	12.78
总磷	1.68	1.67
总能(MJ/kg)	19.94	19.72

注: 1. 混合油脂: 鱼油: 磷脂油: 豆油=1: 1: 2

按照吴代武^[3]的方法, 原料粉碎后过 60 目筛, 按照表 1 的配方进行日粮原料的配合。各类原料用混合机混合均匀后, 用华祥牌 HKj200 制粒机加工制成直径 1.5 mm, 长 3~5 mm 的颗粒饲料。颗粒饲料采用自然风干的方式风干, 在-20℃密封保存备用。测定试验日粮化学组成结果见表 1, 日粮粗蛋白、粗脂肪、粗灰分、总磷、总能在 FM 组和 NF 组无显著差异。

1.2 试验鱼体

试验用黄颡鱼幼鱼购自浙江省湖州农业合作社, 以鱼粉组日粮在网箱中驯养 2 周后分组。选取规格

整齐、平均质量为(12.02±0.11)g 的黄颡鱼种 360 尾, 0.3% 食盐溶液浸泡 15 min 消毒后, 随机分成 2 组, 每组设 4 个重复(n=4), 共 8 个试验单元(网箱), 每个网箱投放 45 尾黄颡鱼。

1.3 饲养管理

养殖试验在浙江一星集团海盐养殖基地的池塘网箱中进行。在面积为 40 m×60 m 的池塘中设置试验网箱(网箱规格为长 1.5 m×宽 1.5 m×深 2.0 m)8 个, 以海盐县长山河河水为水源。参照吴代武^[3]等方法, 日投喂量为试验鱼体质量的 3%~5%, 日投喂两次(5:30~7:00, 17:00~19:00), 两餐日粮的投喂比例为 4: 6。每 10 d 估算 1 次鱼体增质量, 调整试验日粮投喂量, 正式投喂 70 d。

1.4 样品采集

参照吴代武^[3]等方法, 试验开始时, 随机抽取黄颡鱼 6 尾, 作为初始样本进行全鱼常规体成分分析。养殖 70 d 后, 停食 24 h 采样: (1)对每个网箱黄颡鱼进行称质量、计数, 用于计算成活率、特定生长率和饲料系数; (2)从 3 个网箱随机抽取 3 尾、每组 9 尾鱼保留全鱼样品, 用于体成分测定, 并计算蛋白质沉积率、脂肪沉积率; (3)从每个网箱随机取 10 尾鱼, 尾静脉采血、静置 1 h 后 3 500 r/min 离心 10 min。每个网箱鱼血样混合为 1 个样品、每组 4 个血清样品, 液氮速冻后于-80℃冰箱保存待测用于血清化学组成分析。

冰盘上解剖鱼体, 采集每个网箱 3 尾、每个组为 12 尾黄颡鱼的肝胰脏, 液氮速冻运回实验室用于总 RNA 的提取。

1.5 样品分析

参照周露阳等^[4]方法, 每个网箱随机抽取 3 尾全鱼, 合并后搅碎、均质作为全鱼样品。之后取部分全鱼样品, 采用 LGJ-18B 型冷冻干燥机干燥至恒重用于测定水分含量。所有样品蛋白质(N×6.25)采用凯氏定氮法(ISO 5983-1997)测定; 脂肪酸含量用石油醚索氏抽提法(AOCS Ba 3-38)测定; 用马弗炉(ISO 5984-2002)测定灰分; 采用分光光度法(ISO 6491-1998)测定日粮总磷的含量; 日粮能量采用 XRY-1C 型氧弹式热量计测定。

血清样本采用雅培 C800 全自动生化分析仪测定血清生化成分分析谷草转氨酶、谷丙转氨酶、总胆红素、总蛋白、葡萄糖、胆固醇和甘油三酯等含量。

按照叶元土等^[5-9]方法,每尾鱼分别提取肝胰脏总 RNA,电泳检测 RNA 质量,选取电泳条带亮度高、清晰、无拖尾的高质量 RNA 进行等量混合。鱼粉组、无鱼粉组各 2 个总 RNA 样本(每个样本至少有 5 尾试验鱼的总 RNA 样本组成),RNA 质量大于 4 μg。

总 RNA 样本经过 RNA-Seq、无参转录组转录本拼接后进行基因功能注释。用于无参转录组转录本拼接的读段长度 150 bp。用于转录本基因注释的数据库包括 SwissProt、KOG、KEGG GENES 序列数据库。基因注释结果主要用于无鱼粉组与鱼粉组结果的差异表达分析,并进行 GO 条目和 KEGG 通路统计分析。对于所有基因,当其表达量在无鱼粉组、鱼粉组两个不同样品间具有差异、且统计分析中 *P* 值(假阳性率) <0.05 时,认为其在两个不同样品中具有显著差异表达。依据基因在样本中的表达量,先计算无鱼粉组中与鱼粉组表达量的倍数,在计算以 2 为底、差异表达倍数的对数值,即 $\log_2(\text{NF}/\text{FM})$ 值。 $\log_2(\text{NF}/\text{FM})$ 值为负值为差异表达下调,正值为差异表达上调。

以 GO BP、GO CC、GO MF 条目和 KEGG Pathway 为单位,应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比、在差异表达基因中显著性富集的条目、Pathway,以 corrected *P*-value ≤ 0.05 为阈值,满足此条件的定义为在差异表达基因中显著富集的 GO 条目、KEGG 路径。

1.6 数据分析

参照吴代武^[3]等方法,原始数据经 Excel 2003 初步整理后,用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),事后进行 Duncan 氏多重比较,分析试验数据的差异显著性,结果以平均值 \pm 标准差(mean \pm S.D.)表示,以 $P<0.05$ 为差异显著水平。

2 试验结果

2.1 黄颡鱼的生长性能

由表 2 可见,相对鱼粉组,无鱼粉组黄颡鱼的生长速度则显著下降了 30.25% ($P<0.05$);无鱼粉组的饲料系数显著增加了 83.94% ($P<0.05$)。无鱼粉组的成活率和鱼粉组没有显著差异 ($P>0.05$);蛋白质沉积率下降了 57.05%,脂肪沉积率下降了 54.45%。结果表明,无鱼粉日粮导致黄颡鱼的生长速度显著下降;饲料效率显著降低。

表 2 黄颡鱼生长速度和日粮利用效率($n=4$)

Tab. 2 Growth performance and feed efficiency of yellow catfish ($n=4$)

指标	鱼粉组	无鱼粉组
初均质量(g)	11.98 \pm 0.11	12.04 \pm 0.14
末均质量(g)	50.06 \pm 2.36 ^b	32.71 \pm 0.19 ^a
成活率(%)	95.83 \pm 3.82	94.17 \pm 6.29
特定增长率(%/d) ¹	2.38 \pm 0.10 ^b	1.66 \pm 0.03 ^a
饲料系数	1.37 \pm 0.09 ^a	2.52 \pm 0.04 ^b
蛋白质沉积率(%) ²	20.44 \pm 1.46 ^b	8.78 \pm 0.21 ^a
脂肪沉积率(%) ³	66.96 \pm 3.52 ^b	30.50 \pm 0.29 ^a

注:1. 特定增长率(%/d)=100 \times (ln W_t - ln W_0)/ t ; 式中 W_t 、 W_0 分别表示终末均质量、初始均质量, t 为饲养天数; 饲料系数=饲料消耗量/鱼体增加质量; 2. 蛋白沉积率(%)=100 \times (试验结束时体蛋白含量-试验开始时体蛋白含量)/摄食蛋白总量; 3. 脂肪沉积率(%)=100 \times (试验结束时体脂肪含量-试验开始时体脂肪含量)/摄食脂肪总量; a、b 表示显示性差异(表 3、表 4 同)

2.2 鱼体常规组成

鱼体常规组成可见表 3,无鱼粉组黄颡鱼干物质、粗蛋白、粗脂肪含量均下降,灰分含量增加,其中脂肪含量下降达到显著性差异 ($P<0.05$)。表明摄食无鱼粉日粮后,黄颡鱼鱼体水分含量增加,而营养物质的积累量则降低。

表 3 试验日粮对黄颡鱼体成分的影响(干物质基础)($n=4$)

Tab. 3 Effects of experimental diets on the body composition of yellow catfish (dry matter) ($n=4$)

指标	鱼粉组	无鱼粉组
干物(%)	35.66 \pm 2.90	30.37 \pm 0.62
蛋白质(%)	53.50 \pm 2.59	48.76 \pm 2.90
脂肪(%)	36.08 \pm 3.72 ^b	27.50 \pm 2.41 ^a
灰分(%)	13.15 \pm 0.17	14.42 \pm 1.07

2.3 鱼体血清生化指标

鱼体血清生化指标可见表 4。无鱼粉组的谷草转氨酶和谷丙转氨酶含量显著高于鱼粉组 ($P<0.05$),鱼体肝细胞通透性增加,肝细胞受到损伤。无鱼粉组的总胆红素、总蛋白、胆固醇和葡萄糖的含量与鱼粉组比较有下降的趋势,但无显著差异 ($P>0.05$);无鱼粉组的甘油三酯含量显著低于鱼粉组 ($P<0.05$)。结果表明,摄食无鱼粉日粮 70 d 后,黄颡鱼肝胰脏受到损伤;血清营养物质浓度下降,其中血清甘油三酯为显著下降,这可能导致鱼体脂肪含量显著下降。

2.4 显著差异表达的基因数

无鱼粉组与鱼粉肝胰脏转录组基因经过统计分

析(表 5), 总计有 12 020 个基因差异表达, 其中差异表达上调的基因有 5 020 个、差异表达下调的基因有 7 000 个, 差异表达的基因数量很大。在具有差异表达的基因中, 依据 $\log_2(\text{NF}/\text{FM})$ 的绝对值大于 2(具有显著差异)、并进行分段统计结果见表 5。具有显著差异表达上调的基因数为 1 013 个基因、下调的基因数为 2 749, 显著差异表下调基因数远大于上调基因数。

表 4 试验日粮对黄颡鱼血清生化指标的影响(n=4)
Tab. 4 Effects of experimental diets on the serum biochemical indices of yellow catfish (n=4)

指标	鱼粉组	无鱼粉组
谷草转氨酶(U/L)	386.3±65.26 ^a	533.0±86.43 ^b
谷丙转氨酶(U/L)	12.33±0.58 ^a	30.67±6.03 ^b
总胆红素(μmol/L)	0.47±0.12	0.27±0.06
总蛋白(g/L)	31.67±1.15	30.73±3.01
葡萄糖(mmol/L)	5.77±1.77	3.90±1.15
胆固醇(mmol/L)	4.35±0.96	4.13±0.5
甘油三酯(mmol/L)	7.20±0.78 ^b	4.30±1.49 ^a

2.5 转录组 GO 分类结果

将经过 GO 注释的差异表达基因进行分类, 在细胞组成(cellularcomponent, CC)、生物过程(biologicalprocess, BP)和分子功能(molecularfunction, MF) 3 个一级条目下的二级条目(Term)中, 上调和下调的基因数统计见表 6。

表 6 黄颡鱼摄食无鱼粉日粮后肝胰脏转录组差异表达基因的 GO Term 分类结果
Tab. 6 The GO Term classification results of differentially expressed genes in the liver transcriptome after feeding NF diet to yellow catfish

基因	二级 GO 条目	上调基因数(个)	上升百分比①	下调基因数(个)	下降百分比②
CC	细胞部分	1 091	21.73	3 559	50.84
	细胞器	743	14.8	2 405	34.36
	细胞器部分	594	11.83	1 762	25.17
	膜	487	9.7	1 557	22.24
	膜部分	399	7.95	1 245	17.79
	大分子复合物	356	7.09	981	14.01
	细胞外区域部分	322	6.41	696	9.94
	细胞外区域	129	2.57	204	2.91
	细胞连接	109	2.17	342	4.89
	膜封闭的管腔	87	1.73	125	1.79
	超分子复合物	43	0.86	194	2.77
	突触部分	40	0.8	154	2.2
	突触	15	0.3	87	1.24
	BP	细胞过程	980	19.52	3 107
代谢过程		732	14.58	1 940	27.71

表 5 无鱼粉日粮与鱼粉日粮的转录组差异表达基因数量统计

Tab. 5 Statistical analysis of differentially expressed genes in the transcriptome of the NF diet compared with the FM diet

$\log_2(\text{NF}/\text{FM})$	下调基因数(个)	$\log_2(\text{NF}/\text{FM})$	上调基因数(个)
(≤ -2)~(-4)	2 147	$\geq 2-4$	814
(≤ -4)~(-6)	571	$\geq 4-6$	176
(≤ -6)~(-8)	30	$\geq 6-8$	20
$\leq (-8)$	1	≥ 8	3
小计	2 749		1 013
差异表达基因总数(个)	7 000		5 020

在细胞组成中, 基因表达受影响最大的是细胞、细胞器和膜的组成, 其中细胞部分有超过 50%的基因差异表达下调, 细胞器和细胞器部分合计也有 60%左右的基因差异表达下调。在生物过程中, 细胞过程受影响较大, 有 19.52%差异表达上调基因、44.39%差异表达下调基因, 其次为代谢过程、生物调节、对刺激的反应、细胞成分组织或生物发生、发展过程等受影响较大。在分子功能中, 受影响最大的是结合, 有 18.27%基因差异表达上调、44.76%的基因差异表达下调, 其次为催化活性、分子功能调节剂等。

续表

基因	二级 GO 条目	上调基因数(个)	上升百分比①	下调基因数(个)	下降百分比②
BP	生物调节	663	13.21	2 471	35.3
	对刺激的反应	347	6.91	1 023	14.61
	细胞成分组织或生物发	331	6.59	1 192	17.03
	发展过程	314	6.25	1 170	16.71
	定位	284	5.66	943	13.47
	多细胞生物过程	187	3.73	676	9.66
	免疫系统过程	139	2.77	402	5.74
	多生物过程	108	2.15	207	2.96
	生物黏附	65	1.29	275	3.93
	运动	64	1.27	298	4.26
	生殖过程	55	1.1	257	3.67
	细胞增殖	37	0.74	137	1.96
	有节奏的过程	30	0.6	83	1.19
	信号	29	0.58	78	1.11
	行为	26	0.52	97	1.39
	生长	19	0.38	110	1.57
	MF	结合	917	18.27	3 133
催化活性		462	9.2	1 511	21.59
结构分子活动		123	2.45	117	1.67
分子功能调节剂		121	2.41	441	6.3
转运活动		80	1.59	251	3.59
转录调节活性		76	1.51	348	4.97
分子换能器活动		74	1.47	254	3.63
信号传感器活动		72	1.43	344	4.91

① 注释到 GO 条目的上调差异表达基因占全部上调差异表达基因的比例; ② 注释到 GO 条目的下调差异表达基因占全部下调差异表达基因的比例

这些结果表明, 摄食无鱼粉日粮 70 d 后, 鱼体细胞的组成、细胞代谢过程和分子功能方面均受到了重大的影响, 可能导致了细胞组织结构与功能的重大改变。在差异表达上调与下调的基因比例看, 多数是差异表达下调。因此, 无鱼粉日粮可能更多地是对细胞组成、细胞过程等产生不良的影响。

2.6 转录组 KEGG 通路分类结果

KEGG 通路是将具有显著差异表达的基因, 依据 KO 注释结果按照 KEGG pathway 进行分类。结果见表 7。有细胞衰老、蛋白质消化吸收、轴突导向、趋化因子信号通路、MAPK 信号通路等共 15 个代谢通路的基因显著差异表达, 且这些通路中, 均是差异表达下调的基因数大于差异表达上调的基因数。

依据表 7 的信息, 黄颡鱼摄食无鱼粉日粮 70 d 后, 其肝胰脏转录组 KEGG 通路差异基因表达可以得到以下结果: 无鱼粉日粮对黄颡鱼生理代谢的作用位

点主要集中在几个重要的信号通路、神经分泌与调控系统, 作用方式表现为对信号通路、神经分泌与激素调控系统形成较大的干扰。这些信号通路主要为细胞增殖与分化(细胞衰老、癌症中的微小 RNA 通路、PI3K-Akt 信号通路、ErbB 信号通路)、炎症因子产生与抗炎因子(趋化因子信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、TRP 通道的炎症介质调节)、激素调控(GnRH 信号通路、胰岛素信号通路)和蛋白质消化吸收、糖代谢等, 显示对细胞增殖、分化的负面影响, 并引起炎症介质产生与传导、免疫防御反应等生理响应。尤其是引起神经系统(轴突导向)、下丘脑激素调控系统(GnRH 信号通路、5-羟色胺能突触)、胰腺分泌系统等的重大变化; 无鱼粉日粮对黄颡鱼作用结果主要表现为对细胞损伤增强, 损伤作用的路径主要为细胞炎症因子传导; 鱼体的生理响应主要为抗炎反应、清除损伤的细胞和蛋白质等成分、免疫防御系统结构损伤和能力的下降, 在鱼体可能

出现抗应激能力下降、抗病力下降等表象; 对日粮蛋白质消化吸收(蛋白质消化吸收)、胰腺分泌、胰高血糖素(胰岛素信号通路、胰岛素信号通路、胰高血糖

素信号通路)系统等产生重大不利影响, 降低了鱼体对日粮营养物质利用能力, 鱼体沉积的营养物质减少、生长速度降低。

表 7 黄颡鱼摄食无鱼粉日粮后肝胰脏转录组显著差异表达基因的 KEGG pathway 分类结果

Tab. 7 The KEGG pathway classification results of differentially expressed genes in the liver transcriptome after feeding NF diet to yellow catfish

通路名称	上调 基因数(个)	下调 基因数(个)	差异表达趋势
细胞衰老	8	75	整体差异表达下调
蛋白质消化吸收	3	36	肠内消化和黏膜细胞基底转运基因差异表达下调
轴突导向	6	98	整体差异表达下调
趋化因子信号通路	9	79	整体差异表达下调
信号通路 MAPK	10	100	AKT、ATF4 上调, 其他途径 MAP3K1、JNK、HRAS、NLK 等 下调
癌症中的微小 RNA	11	69	整体差异表达下调
型流感 A	8	65	整体差异表达下调
细胞因子-细胞因子受体 相互作用	21	52	CC 族中 CCL2、3、4、26 上调, CCL18、19、20、24、25 下调; IL6ST 族整体下调; IL2RB 族整体上调, PDGF 族下调, TGF-β 族下调
GnRH 信号通路	3	47	GNAS→ATF4 上调; PRKCA 为节点路径整体下调; CGA 上调
5-羟色胺能突触	5	41	整体差异表达下调
长期抑郁症	4	32	PRKCA 为节点路径整体下调
信号通路 IL-17	13	22	IL17RC、HSP90A 上调, NFKB1、P38 等下调
胰腺分泌 PaN	10	43	ATP1A 等上调, ATP2B 等下调
胰岛素信号通路	4	69	AKT 上调, 其他整体下调
TRP 通道的炎症介质调节	2	49	TRPV1、2、4 下调, 对温度敏感性下降

2.7 极显著差异表达的部分基因

以 log₂ 值的绝对值大于 5、GO BP 注释结果和 KO 注释结果的基因信息统计列入表 8, 显示极显著差异表达的单一基因。可以得到以下结果: (1)涉及到细胞增殖、分化, 尤其是细胞吞噬、神经细胞突触发育的基因极显著的差异表达、且为差异表达下调; (2)涉及到细胞免疫、体液免疫的多数基因差异表达下调, 显示鱼体免疫防御系统能力具有下降的趋势; (3)参与细胞或组织中蛋白质泛素化标记和降解

的基因极显著地差异表达, 清除损伤的细胞组成物质如蛋白质的作用增强。

黄颡鱼摄食无鱼粉日粮 70 d 后, 肝胰脏转录组中极显著差异表达的基因信息提示, 鱼体自身的免疫防御系统的结构与功能发生重大变化, 且为下调的趋势; 鱼体多数细胞受到衰老、吞噬的生理代谢变化, 激活细胞自我修复、清除变性蛋白质等生理变化; 同时, 鱼体消化能力有下降的趋势。这与生长性能下降、鱼体营养物质含量下降的结果有一致性。

表 8 log₂ 值的绝对值大于 5 的 GO BP 注释结果和 KO 注释结果的基因信息统计表

Tab. 8 Gene information statistics table with GOBP annotation and KO annotation with absolute value of log₂ value greater than 5

log ₂ (NF/FM)	KO ID 基因	GO BP 描述
-10.94	K09029 <i>FOSB</i> ; 蛋白质 FosB	GO: 0032870 对激素刺激的细胞反应
-7.68	K09878 <i>AQP10</i> ; 水通道蛋白 10	GO: 0009636 对有毒物质的反应
-7.54	K05412 <i>CD80</i> ; CD80 抗原	GO: 0042102 T 细胞增殖的正调节
-7.43	K09033 <i>JDP2</i> ; jun 二聚化蛋白 2	GO: 0006357 RNA 聚合酶 II 启动子的转录调控
-6.87	K07497 K07497; 转座酶	GO: 0032197 转座, RNA 介导

log ₂ (NF/FM)	KO ID 基因	GO BP 描述
-6.84	K06238 <i>COL6A</i> ; 胶原蛋白, VI 型, α	GO: 0007155 细胞黏附
-6.40	K11840 <i>USP9_24</i> ; 泛素羧基末端水解酶 9/24	GO: 0006511 泛素依赖性蛋白质分解代谢过程
-6.40	K05100 <i>MST1R, RON</i> ; 巨噬细胞刺激 1 受体	GO: 0045087 先天免疫应答
-6.15	K08115 <i>CSPG4</i> ; 硫酸软骨素蛋白多糖 4	GO: 0001525 血管生成
-6.15	K06271 <i>TLN; Talin-2</i>	GO: 0007155 细胞黏附
-6.04	K01081 <i>E3.1.3.5; 5'-核苷酸酶</i>	GO: 0046085 腺苷代谢过程
-6.02	K14286 <i>AGXT2L1, ETNPPL</i> ; 乙醇胺磷酸盐磷酸裂解酶	GO: 0035162 造血
-5.98	K16342 <i>PLA2G4, CPLA2</i> ; 细胞溶质磷脂酶 A2	GO: 0090594 对创伤的炎症反应
-5.94	K06271 <i>TLN; Talin-2</i>	GO: 0007155 细胞黏附
-5.94	K05724 <i>FGD5_6; FYVE, RhoGEF</i> 和 PH 域 5/6	GO: 0035023 Rho 蛋白信号转导的调节
-5.94	K15690 <i>RC3H</i> ; RING 手指和含 CCCH 型锌指结构域的蛋白质	GO: 0071347 对白细胞介素-1 的细胞应答
-5.84	K19526 <i>VPS13B</i> ; 液泡蛋白分选相关蛋白 13B	GO: 0015031 蛋白质转运
-5.84	K08789 <i>MAST</i> ; 微管相关丝氨酸/苏氨酸激酶	GO: 0035556 细胞内信号转导
-5.79	K04959 <i>ITPR2</i> ; 肌醇 1, 4, 5-三磷酸受体 2 型	GO: 0001666 对缺氧的反应
-5.74	K10413 <i>DYNClH</i> ; 动力蛋白重链 1, 胞质	GO: 0060236 有丝分裂纺锤体组织的调节
-5.74	K05850 <i>ATP2B</i> ; Ca ²⁺ 转运 ATP 酶, 质膜	GO: 0006874 细胞钙离子稳态
-5.69	K11860 <i>OTUD7A_B</i> ; 含 OTU 结构域蛋白 7	GO: 0032717 白细胞介素-8 的负调节产生
-5.69	K05691 <i>CTNNA</i> ; 连环蛋白 α	GO: 0007409 轴突形成附
-5.69	K03348 <i>APC1</i> ; 后期促进复合亚基 1	GO: 0051437 泛素-蛋白质连接酶活性的正调节 参与调节有丝分裂细胞周期转变
-5.69	K16342 <i>PLA2G4, CPLA2</i> ; 细胞溶质磷脂酶 A2	GO: 0090594 炎症反应
-5.64	K17388 <i>ROCK2</i> ; Rho 相关蛋白激酶 2	GO: 0030036 肌动蛋白细胞骨架组织
-5.64	K10413 <i>DYNClH</i> ; 动力蛋白重链 1, 胞质	GO: 0031122 细胞质微管组织
-5.64	K10055 <i>ZBTB16, PLZF</i> ; 锌指和含 BTB 结构域的蛋白质 16	GO: 0032481 I 型干扰素产生的正调节
-5.64	K06821 <i>PLXNB</i> ; 丛蛋白 B.	GO: 0048675 轴突延伸
-5.58	K19028 <i>PFKFB1</i> ; 6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-双磷酸酶 1	GO: 0006003 果糖 2, 6-二磷酸代谢过程
-5.58	K10586 <i>BIRC6, BRUCE</i> ; 杆状病毒 IAP 重复序列蛋白 6 (apollon)	GO: 2001237 外源性凋亡信号通路的负调节
-5.52	K08826 <i>HIPK</i> ; 同源域相互作用蛋白激酶	GO: 0043066 凋亡过程的负调节
-5.52	K10395 <i>KIF4_21_27</i> ; 驱动因素家庭成员 4/21/27	GO: 0007018 基于微管的运动
-5.52	K07188 <i>LIPE, HSL</i> ; 激素敏感性脂肪酶	GO: 0008203 胆固醇代谢过程
-5.52	K07372 <i>GJA1, CX43</i> ; 间隙连接蛋白, $\alpha 1$	GO: 0033334 鳍形态发生
-5.46	K04959 <i>ITPR2</i> ; 肌醇 1, 4, 5-三磷酸受体 2 型	GO: 0006816 钙离子转运
-5.46	K06245 <i>LAMB4</i> ; 层粘连蛋白, $\beta 4$	GO: 0007155 细胞黏附
-5.46	K10413 <i>DYNClH</i> ; 动力蛋白重链 1, 胞质	GO: 0019886 抗原加工和通过 MHC II 类呈递 外源肽抗原
-5.46	K19008 <i>SIK1</i> ; 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 SIK1	GO: 0055007 心肌细胞分化
-5.40	K05160 <i>TNFRSF25</i> ; 肿瘤坏死因子受体超家族成员 25	GO: 0033209 肿瘤坏死因子介导的信号传导途径
-5.40	K14437 <i>CHD7</i> 染色质-解旋-DNA 结合蛋白 7	GO: 0006338 染色质重塑
-5.33	K10413 <i>DYNClH</i> ; 动力蛋白重链 1, 胞质	GO: 0031122 细胞质微管组织
-5.33	K13024 <i>PP1P5K, VIP</i> ; 肌醇六-磷酸盐/二磷酸肌醇-五磷酸盐 1-激酶	GO: 0006020 肌醇代谢过程
-5.33	K11857 <i>USP47</i> ; 泛素羧基末端水解酶 47	GO: 0006511 泛素依赖性蛋白质分解代谢过程

log ₂ (NF/FM)	KO ID 基因	GO BP 描述
-5.33	K19036 <i>IGHMBP2</i> ; ATP 依赖性 RNA / DNA 解旋酶 IGHMBP2	GO: 0006310 DNA 重组
-5.33	K04498 <i>EP300, CREBBP, KAT3</i> ; E1A / CREB 结合蛋白	GO: 0009887 动物器官形态发生
-5.33	K18082 <i>MTMR3_4, ZFYVE10_11</i> ; 肌管相关蛋白 3/4	GO: 0007179 转化生长因子 β 受体信号通路
-5.33	K11446 <i>KDM5, JARID1</i> ; 组蛋白去甲基化酶 JARID1	GO: 0034720 组蛋白 H3-K4 去甲基化
-5.33	K05628 <i>RERE</i> ; 精氨酸 - 谷氨酸二肽重复蛋白质	GO: 0048755 神经的分支形态发生
-5.26	K06238 <i>COL6A</i> ; 胶原蛋白, VI 型, α	GO: 0007155 细胞黏附
-5.26	K10693 <i>MYCBP2, PAM</i> ; E3 泛素 - 蛋白连接酶 MYCBP2	GO: 0016567 蛋白质泛素化
-5.26	K10594 <i>HERC1</i> ; E3 泛素 - 蛋白连接酶 HERC1	GO: 0010507 自噬的负调节
-5.26	K10352 <i>MYH</i> ; 肌球蛋白重链	GO: 0031032 肌动蛋白结构组织
-5.26	K09278 <i>RUNX2, AML3</i> ; 与 runt 相关的转录因子 2	GO: 0002063 软骨细胞发育
-5.26	K11446 <i>KDM5, JARID1</i> ; 组蛋白去甲基化酶 JARID1	GO: 0034720 组蛋白 H3-K4 去甲基化
-5.26	K14571 <i>RLX7, NVL</i> ; 核糖体生物发生 ATP 酶	GO: 0051973 端粒酶活性的正调节
-5.26	K16529 <i>AKAP13</i> ; A 激酶锚蛋白 13	GO: 0071883 通过肾上腺素能受体信号传导途径激活 MAPK 活性
-5.18	K09228 <i>KRAB</i> ; 含 KRAB 结构域的锌指蛋白	GO: 0006355 转录调节, DNA 模板化
-5.18	K04534 <i>GNAO, G-ALPHA-O</i> ; 鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 G(o)亚基 α	GO: 0007186 G 蛋白偶联受体信号通路
-5.18	K02649 <i>PIK3R</i> ; 磷酸肌醇-3-激酶, 调节亚基	GO: 2001275 响应胰岛素刺激的葡萄糖输入的正调节
-5.18	K06065 <i>NCOR2, SMRT</i> ; 核受体共抑制因子 2	GO: 0000122 来自 RNA 聚合酶 II 启动子的转录的负调节
-5.11	K06070 <i>PKD</i> ; 蛋白激酶 D	GO: 0002250 适应性免疫应答
-5.11	K03164 <i>TOP2</i> ; DNA 拓扑异构酶 II	GO: 0006265 DNA 拓扑变化
-5.11	K15603 <i>TCF4_12</i> ; 转录因子 4/12	GO: 0006955 免疫应答
-5.11	K06496 <i>SELP</i> ; 选择素, 血小板	GO: 0007155 细胞黏附
-5.11	K09239 <i>HIVEP</i> ; 人类免疫缺陷病毒 I 型增强子结合蛋白	GO: 0006366 转录自 RNA 聚合酶 II 启动子
-5.11	K03900 <i>VWF</i> ; 血管性血友病因子	GO: 0007596 血液凝固
-5.11	K04882 <i>KCNAB1</i> ; 钾电压门控通道振荡器相关亚家族 A, β 成员 1	GO: 1901379 钾离子跨膜转运的调节
-5.11	K17701 <i>SIPAIL1, E6TPI</i> ; 信号诱导的增殖相关蛋白 1	GO: 0031532 肌动蛋白细胞骨架重组
-5.11	K16527 <i>AKAP11</i> ; A 激酶锚蛋白 11	GO: 0035556 细胞内信号转导
-5.11	K18730 <i>GIGYF, PERQ</i> 富含氨基酸, 含有 GYF 结构域的蛋白质	GO: 0048009 胰岛素样生长因子受体信号通路
-5.11	K10398 <i>KIF11, EG5</i> ; 驱动蛋白家庭成员 11	GO: 0051301 细胞分裂
-5.11	K05197 <i>GRIAI</i> ; 谷氨酸受体 1	GO: 0071230 对氨基酸刺激的细胞反应
-5.02	K16732 <i>PRCI</i> ; 胞质分裂蛋白调节剂 1	GO: 0000022 有丝分裂纺锤体伸长
-5.02	K10511 <i>ZBTB39</i> ; 锌指和含 BTB 结构域的蛋白质 39	GO: 0006355 转录调节
-5.02	K06645 <i>CDC25A</i> ; M 期诱导剂磷酸酶 1	GO: 1902751 细胞周期的正调节 G2 / M 期转变
-5.02	K04366 <i>RAF1</i> ; RAF 原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	GO: 0030154 细胞分化
-5.02	K15728 <i>LPIN</i> ; 磷脂酰磷酸酶 LPIN	GO: 0032869 对胰岛素刺激的细胞反应
-5.02	K16536 <i>HOOK3</i> ; 蛋白质 HOOK3	GO: 0031122 细胞质微管组织
-5.02	K06115 <i>SPTB</i> ; 血影蛋白 β	GO: 0007411 轴突导向
5.06	K10802 <i>HMGB1</i> ; 高迁移率族蛋白 B1	GO: 0002250 适应性免疫应答

log ₂ (NF/FM)	KO ID 基因	GO BP 描述
5.06	K08762 <i>DBI, ACBP</i> ; 地西洋结合抑制剂(GABA 受体调节剂, 酰基辅酶 A 结合蛋白)	GO: 0006637 酰基辅酶 A 代谢过程
5.06	K07253 <i>MIF</i> ; 苯丙酮酸互变异构酶	GO: 0006954 炎症反应
5.06	K00940 <i>Ndk, NME</i> ; 核苷 - 二磷酸激酶	GO: 0071333 对葡萄糖刺激的细胞反应
5.06	K16449 <i>RGS</i> ; G 蛋白信号调节因子	GO: 0007186 G 蛋白偶联受体信号通路
5.06	K02126 <i>ATPeF0A, MTATP6, ATP6</i> ; F 型 H ⁺ 转运 ATP 酶亚基 a	GO: 0015986 ATP 合成偶联质子转运
5.06	K02256 <i>COXI</i> ; 细胞色素 c 氧化酶亚基 1	GO: 0006123 线粒体电子转运, 细胞色素 c 转氧
5.07	K07605 <i>KRT2</i> ; II 型角蛋白	GO: 0097191 外源性细胞凋亡信号传导途径
5.15	K02976 <i>RP-S26e, RPS26</i> ; 小亚基核糖体蛋白 S26e	GO: 0006412 翻译
5.15	K13361 <i>FXYD3, MAT8</i> ; 含 FXDY 结构域的离子迁移调节剂 3	GO: 0034220 离子跨膜转运
5.15	K13959 <i>KLHL38</i> ; kelch 样蛋白 38	GO: 0016567 蛋白质泛素化
5.15	K06230 <i>GLI3</i> ; 锌指蛋白 GLI3	GO: 0007411 轴突指导
5.23	K10091 <i>LGALS4</i> ; 半乳糖凝集素 4	GO: 0007155 细胞黏附
5.23	K07752 <i>CPD</i> ; 羧肽酶 D	GO: 0071352 对白介素-2 的细胞反应
5.39	K15528 <i>FAAH</i> ; 脂肪酸酰胺水解酶	GO: 0009062 脂肪酸分解代谢过程
5.46	K03990 <i>C3</i> ; 补体 3	GO: 0006956 补体激活
5.52	K00657 <i>SPEG</i> ; 二胺 N-乙酰转移酶	GO: 0001525 血管生成
5.59	K04612 <i>CASR</i> ; 钙感受受体	GO: 0007193 腺苷酸环化酶抑制 G 蛋白偶联受体信号通路
5.59	K02896 <i>RP-L24e, RPL24</i> ; 大亚基核糖体蛋白 L24e	GO: 0000027 核糖体大亚基装配
5.82	K01382 <i>CTSE</i> ; 组织蛋白酶 E	GO: 0019886 抗原加工和通过 MHC II 类呈递外源肽抗原
5.97	K06497 <i>CD63, MLAI, TSPAN30</i> ; CD63 抗原	GO: 0007160 细胞-基质黏附
6.02	K17549 <i>PPP1R1C</i> ; 蛋白磷酸酶 1 调节亚基 1C	GO: 0006469 蛋白激酶活性的负调节
6.06	K17349 <i>TSPAN8</i> ; 四跨膜蛋白-8	GO: 0007166 细胞表面受体信号通路
6.11	K00355 <i>NQO1</i> ; NAD(P)H 脱氢酶(醌)	GO: 0043066 凋亡过程的负调节
6.62	K17093 <i>ANXA4</i> ; 膜联蛋白 A4	GO: 0030855 上皮细胞分化
6.93	K01360 <i>PCSK2</i> ; 前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/ kexin 2 型	GO: 0034230 脑啡肽加工
7.13	K01377 <i>PGC</i> ; 胃泌素	GO: 0006914 自噬
7.21	K06499 <i>CEACAM</i> ; 癌胚抗原相关细胞黏附分子	GO: 0007267 细胞 - 细胞信号传导
8.01	K03984 <i>SERPINA1, AAT</i> ; α -1 抗胰蛋白酶	GO: 0007596 血液凝固
8.52	K13915 <i>LYZ</i> ; 溶菌酶 C	GO: 0050830 对革兰氏阳性细菌的防御反应

注: Log₂FoldChange: 两组的标准化后的数值倍数的比例的 log₂ 值; GO-biological-process: 注释到的描述生物进程的 GO Term; KO: 注释到的 KEGG 中的 ID.

3 讨论

3.1 无鱼粉日粮对黄颡鱼的生长性能和生理代谢产生了重大影响

周歧存^[10]、吉红^[11]等总结了水产动物饲料中鱼粉替代的研究情况, 多数研究结果表明水产动物饲料中鱼粉被植物蛋白、陆生动物蛋白或单细胞蛋白替代后,

鱼体生长速度下降、饲料效率降低, 鱼体免疫能力下降, 肝细胞受到损伤、肠道黏膜受到损害等^[1-2, 10-11]。本试验结果与这些研究结果基本一致。与鱼粉组比较, 无鱼粉组黄颡鱼的特定生长率显著下降了 30.25%、饲料系数显著增加了 83.94%。试验结束时, 黄颡鱼鱼体粗蛋白、粗脂肪、灰分等含量下降, 其中鱼体粗脂肪含量显著下降。鱼体血清总蛋白、血糖、血脂(甘

油三酯)含量下降,其中血脂含量显著下降;而血清转氨酶活力显著增加,显示肝胰脏受到损伤。

依据试验结束时鱼体肝胰脏转录组分析结果中GO注释分类、KEGG注释分类结果显示,无鱼粉日粮诱导了较多的生理代谢通路基因差异表达多数为差异表达下调。本文试验结果表明,无鱼粉日粮使黄颡鱼的生长性能显著下降,鱼体营养物质的沉积量减少,对鱼体神经系统发育与神经细胞分泌、激素调控系统、炎症与抗炎、免疫防御等多方位的影响。可以认为,无鱼粉日粮对黄颡鱼生理代谢的影响是多方面、深层次的整体性的影响,且是不利的影响。

3.2 日粮中鱼粉不仅有营养作用,还有生理代谢的调控作用

在两个饲料配方中,仅有28%鱼粉的差异,日粮的总蛋白、总脂肪、总能量和总磷是一致的,日粮对黄颡鱼的生长性能和生理代谢作用为什么会有这样大的差异,是需要研究和讨论的问题。需要从鱼粉的营养作用和生理活性作用两个方面来理解饲料原料、日粮的作用。

从鱼粉的营养作用来分析,蛋白质和氨基酸、脂肪和脂肪酸、糖类、维生素和矿物质等营养素在几乎所有的生物性饲料原料存在,而不同饲料原料中差异除了营养素的百分含量的差异外,就是氨基酸的组成模式、脂肪酸的组成模式、不同营养素之间的组成模式。饲料原料或饲料中营养素的组成模式与养殖动物需要的营养素组成模式越接近,则营养素的平衡性越好,对养殖动物的生长效果越显著。鱼粉作为来自于海洋鱼类的代表性原料,在营养素的组成模式如氨基酸组成模式、消化利用率等方面具有优势,这是鱼粉优于其他饲料原料的主要优势。然而,仅仅是在营养素方面的优势不足以对养殖动物生产性能产生如此大的差异,应该是含有对养殖动物生理代谢产生重大影响的物质存在,并且对养殖动物的生理代谢产生了积极的影响,并结合在营养素中的优势而成为养殖动物、尤其是水产养殖动物饲料中具有特殊性的饲料原料,成为一类不可替代的动物蛋白质原料。对于鱼粉的这些特殊活性分子,作者进行了离体细胞试验,分离排除,推测究竟可能属于哪类物质,结果将另文发表。

有研究指出,日粮中、尤其是鱼粉中氨基酸可以通过氨基酸受体信号通路和TOR信号通路促进蛋白质的合成^[1, 12-13]。本试验中,这2个代谢通路没有显著差

异表达, mTOR (serine/threonine-protein kinase mTOR) $\log_2(\text{NF}/\text{FM})$ 值-0.3238, 没有达到显著差异水平。Regulatory-associated protein of mTOR 的 $\log_2(\text{NF}/\text{FM})$ 值-1.39、eif-2-alpha kinase GCN2 的 $\log_2(\text{NF}/\text{FM})$ 值-0.4130。生命起源于海洋,鱼粉作为海洋动物蛋白质原料,还有海洋生物的一些成分,而这些成分应该是水产动物所必需的,也是其他陆生动物性饲料原料和植物性原料所不具备的。是一类什么特殊物质目前还是未知的,一些学者称之为“未知生长因子”。可以推测的是:这类物质含量不会很高、且来源于海洋生物。这些物质有什么作用目前也不清楚。如果含量不高、作用又很大,可以推测的是,这类物质应该是能够对水产动物生理健康维护、生理代谢调控产生良好的作用,只有如此才能放大日粮中鱼粉对水产动物生产性能、生理健康的作用效果。

作者之前的研究发现用酶解的鱼溶浆(粉)、酶解的鱼浆等产品替代鱼粉,在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[14, 15]、黄颡鱼^[16-17]日粮中试验,其养殖效果优于鱼粉。尤其是以10%水分含量计的酶解鱼溶浆,在黄颡鱼日粮中仅仅8%~9%的添加量达到了与28%和30%的鱼粉等效的结果^[17]。这些结果表明,来自于海洋鱼类的酶解产品用于日粮中的养殖效果远优于传统鱼粉的结果,而单纯从蛋白质和氨基酸的营养角度去理解是不完整的,更多地应该是这些产品中含有的生理活性物质对鱼体生理代谢产生了重大影响。

3.3 无鱼粉日粮干扰多个信号通路,营养代谢被抑制,鱼体免疫防御能力下降

按照一般生物学规律理解,鱼粉等产品中含有的生理活性物质要产生生理调节作用,应该满足以下条件:(1)从物质来源分析,要有物质基础。这类生理活性物质只有鱼粉或来自于海洋生物如鱼、虾、蟹、软体动物(乌贼、鱿鱼)、海藻等含有或经过加工(酶解)后所产生,而在其他陆生动物、植物性原料中所没有;(2)从作用位点或作用环境分析,这类生理活性物质既可以在消化道中发挥作用,也通过消化道吸收进入鱼体血液、淋巴液并转送鱼体各器官组织中发挥作用;(3)从作用方式或作用途径分析,这类物质能够对不同的代谢通路、尤其是神经分泌或激素信号通路形成干扰,放大作用效果,而不仅仅是营养需要的作用;(4)从作用结果来分析,这类生理代谢作用的结果是对鱼体生长、发育和生理健康

的维护具有正向的结果,反之为负面影响的结果。

首先,从转录组差异表达基因数的结果看(表 5),肝脏是动物的代谢中心,无鱼粉日粮对黄颡鱼肝脏在转录组水平的基因表达产生了重大的影响,且影响的面很广(差异表达基因数量多、差异表达的 KEGG 通路多)、影响的程度较深(对细胞组织结构有影响、对神经分泌和激素信号通路有重大影响)。显示出无鱼粉日粮对黄颡鱼生理代谢的影响是多层面、广泛性的影响,而不是对单一器官组织、单一作用途径的影响。其结果无鱼粉日粮是对鱼体生长性能(表 2、表 3)和生理健康(表 4)造成整体性的负面影响。如果从鱼粉日粮角度来分析,就是鱼粉中含有某些生理活性物质,这些生理活性物质是以神经分泌、激素调控信号通路,以及其他重要的生理代谢信号通路作为作用位点,通过对信号通路的实施干扰,从而对鱼体生长、生理健康等造成重大的影响。

其次,无鱼粉日粮对生理代谢作用位点或作用层次主要是生理代谢信号通路,包括了神经分泌信号通路和激素调控信号通路。即鱼粉中可能含有对代谢信号通路产生重大影响的生理活性物质,并通过干扰生理代谢信号通路对鱼体整体生理代谢产生重大的影响。

受到日粮鱼粉影响的生理代谢通路主要包含了以下 KEGG 通路(表 7)和 GO 条目(表 6),受到无鱼粉日粮影响极显著差异表达的基因也为此提供了部分证据(表 8)。

转录组分析结果表明:神经系统组织结构和神经分泌活动受到损伤或抑制;多个重要信号通路受到干扰,生理代谢受到广泛性的影响;抗应激、免疫防御系统受到深层次的影响,鱼体生理健康受到不利影响;营养代谢通路基因差异表达下调,鱼体整体代谢强度和生长速度下降。

结合养殖试验结果也表明,无鱼粉日粮导致黄颡鱼的末端神经系统发育受到一定程度的损伤作用,而神经分泌、神经激素的调控作用受到抑制。作用的结果是对鱼体生长、生理代谢产生整体性的、广泛性的、深层次的不利影响,导致鱼体生长性能下降、生理代谢的紊乱或被抑制。而养殖试验结果如特定生长率低,血清转氨酶活性增加,营养性物质如血清总蛋白、血脂、血糖等的含量降低等结果与上述分析是一致的,也提供了有效的证据。无鱼粉组黄颡鱼对日粮营养物质的消化吸收受到抑制、胰岛素、胰高血糖素等激素调节活动受到抑制,其结果就

是对饲料利用效率下降、鱼体沉积的营养物质减少。在养殖试验结果中,与摄食鱼粉组日粮比较,摄食无鱼粉日粮组黄颡鱼血清总蛋白、血糖、血脂是下降的,且甘油三酯含量下降达到显著性水平。饲料系数增加,显示鱼体对饲料利用效率显著下降。鱼体组成中,蛋白质、脂肪含量下降。这些结果与转录组基因差异表达结果是相互印证的。

4 结论

无鱼粉日粮与含 28%秘鲁鱼粉日粮比较,在池塘网箱中饲喂黄颡鱼 70 d,无鱼粉日粮组黄颡鱼生长性能显著下降。转录组基因差异表达分析结果显示,无鱼粉日粮导致黄颡鱼神经系统细胞结构损伤、神经分泌和激素分泌出现紊乱,对多个重要代谢信号通路形成干扰,放大了无鱼粉日粮对鱼体代谢的作用程度。无鱼粉日粮对黄颡鱼生理代谢的作用是多位点、多途径的,导致鱼体生理代谢强度整体下降、抗炎症和抗应激能力下降、免疫防御能力下降。综合表现为黄颡鱼生长性能下降、抗应激和抗病能力的下降。

参考文献:

- [1] 许丹丹. 大菱鲆幼鱼对不同蛋白源营养感知与应答机制的初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
Xu Dandan. Preliminary study on the mechanisms of nutrient sensing and responses of different protein sources in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.)(D). Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [2] 吴玉波. 利用大豆蛋白原料替代卵形鲳鲹饲料鱼粉的潜力和营养学机理[D]. 宁波: 浙江大学, 2014.
Wu Yubo. The potential and nutritional mechanisms to replace dietary fish meal with soy protein ingredients in golden pompano *Trachinotus ovatus* diet[D]. Ningbo: Zhejiang University, 2014.
- [3] 吴代武. 鳀鱼自溶鱼浆、金枪鱼酶解鱼溶浆对黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)生长、健康的影响[D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
Wu Daiwu. Effects of dietary anchovy autolysis hydrolysate and tuna stickwater hydrolysate for yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) on growth performance and physiological health[D]. Suzhou: Soochow University, 2018.
- [4] 周露阳, 吴代武, 高敏敏, 等. 鱼溶浆、酶解鱼溶浆和酶解鱼浆完全替代鱼粉对黄颡鱼生长的影响[J]. 水生生物学报, 2019, 3: 504-516.
Zhou Luyang, Wu Daiwu, Gao Minmin, et al. Effects of stickwater, stickwater hydrolysate and fish protein hy-

- drollysate completely replacing fish meal on growth performance of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 3: 504-516.
- [5] 叶元土, 蔡春芳, 许凡, 等. 灌喂氧化鱼油使草鱼肠道黏膜胆固醇胆汁酸合成基因通路表达上调[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(1): 90-100.
Ye Yuantu, Cai Chunfang, Xu Fan, et al. Feeding grass carp (*Ctenopharyncodo idellus*) with oxidized fish oil up-regulates the gene expression in the cholesterol and bile acid synthesis pathway in intestinal mucosa[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 90-100.
- [6] 叶元土, 蔡春芳, 许凡, 等. 氧化鱼油对草鱼肠道黏膜抗氧化应激通路基因表达水平的影响[J]. *水生生物学报*, 2016, 40(4): 758-766.
Ye Yuantu, Cai Chunfang, Xu Fan, et al. Effects oxidized fish oil on oxidative stress pathway of intestinal mucosa of grass carp (*Ctenopharyncodo idellus*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(4): 758-766.
- [7] 叶元土, 吴萍, 蔡春芳, 等. 在患 CyHV-2 病的异育银鲫肠道黏膜中胆固醇、胆汁酸代谢通路基因的差异表达[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(5): 956-962.
Ye Yuantu, Wu Ping, Cai Chunfang, et al. Gene difference expression of cholesterol and bile acid metabolism pathway in intestinal mucosa with the CyHV-2 disease carassius auratus gibelio[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(5): 956-962.
- [8] 叶元土, 吴萍, 蔡春芳, 等. 灌喂氧化鱼油后黄颡鱼胃肠道黏膜黑色素细胞分化和黑色素合成途径基因的差异表达[J]. *水生生物学报*, 2018, 42(1): 57-67.
Ye Yuantu, Wu Ping, Cai Chunfang, et al. Transcription analysis of melanocyte differentiation and the melanin synthesis metabolic pathway in the gastrointestinal mucosa of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) fed oxidized fish oil[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(1): 57-67.
- [9] 高敏敏, 叶元土, 吴萍, 等. 灌喂氧化鱼油对黄颡鱼胃肠道黏膜胆固醇和胆汁酸合成途径基因差异表达的影响[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(5): 1912-1925.
Gao Minmin, Ye Yuantu, Wu Ping, et al. Effects of oxidized-fish-oil-feed on genetic differential expression of cholesterol and bile acid synthetic pathways in gastrointestinal mucosa of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(5): 1912-1925.
- [10] 周歧存, 麦康森, 刘永坚, 等. 动植物蛋白源替代鱼粉研究进展[J]. *水产学报*, 2005, 29(3): 404-410.
Zhou Qicun, Mai Kangsen, Liu Yongjian, et al. Advances in animal and plant protein sources in place of fish meal[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(3): 404-410.
- [11] 吉红, 朱天和, 单世涛. 非肉食性鱼类饲料中用动植物蛋白源替代鱼粉的研究进展[J]. *大连水产学院学报*, 2009, 24(4): 343-349.
Ji Hong, Zhu Tianhe, Shan Shitao. Current status of dietary fish meal replacement research for non-carnivorous fish species[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2009, 24(4): 343-349.
- [12] Gallinetti J, Harputlugil J R. Amino acid sensing in dietary-restriction-mediated longevity: roles of signal-transducing kinases GCN2 and TOR[J]. *Biochemical Journal*, 2013, 449(1): 1-10.
- [13] 许丹丹, 何良. 氨基酸感知与代谢调控的研究进展[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(2): 342-351.
Xu Dandan, He Gen. Advances in Amino acid sensing and metabolic regulation[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(2): 342-351.
- [14] 罗其刚, 叶元土, 蔡春芳, 等. 日粮中添加鱼溶浆粉和鱼油对草鱼生长、肝脏脂肪含量和血清理化指标的影响[J]. *水产学报*, 2015, 39(6): 888-898.
Luo Qigang, Ye Yuantu, Cai Chunfang, et al. Effects of adding stickwater meal and fish oil into basal diets on grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) growth, liver fat content and serum indicators[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(6): 888-898.
- [15] 吴代武, 叶元土, 蔡春芳, 等. 鱼溶浆粉替代鱼粉对草鱼生长及健康的影响[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(7): 2094-2105.
Wu Daiwu, Ye Yuantu, Cai Chunfang, et al. Effects of fish meal replacement by stickwater meal on growth and health of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(7): 2094-2105.
- [16] 吴代武, 何杰, 叶元土, 等. 日粮中鱼蛋白水解物对黄颡鱼生长、体成分和血清生理指标的影响[J]. *水产学报*, 2017, 41(3): 415-427.
Wu Daiwu, He Jie, Ye Yuantu, et al. Effects of fish protein hydrolysate on growth, body composition and serum biochemical parameters of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(3): 415-427.
- [17] Wu D W, Zhou L Y, Gao M M, et al. Effects of stickwater hydrolysates on growth performance for yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Aquaculture*, 2018, 488: 161-173.

Fishmeal-free diet can reduce the growth performance and the hepatopancreas transcriptional significant differential expression of yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*

ZHOU Lu-yang, YE Yuan-tu, CAI Chun-fang, WU Ping, GAO Min-min, Yu Nong, SUN Fei, LV Hao, SHI Yao-yao, LV Bin, YI Hao-ming

(School of Basic Medical Sciences and Biotechnology, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Received: May, 17, 2019

Key words: Fish meal; growth performance; signaling pathway; nerve; hormone; yellow catfish

Abstract: In the present study, the effects of dietary fish meal on the growth performance and physiological metabolism of yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*, were investigated. We prepared two diets containing 28% Peruvian fish meal (control diet, FM) and fishmeal-free (test diet, NF), which were isonitrogenous, isoenergetic, and isophosphate. Diets were offered to yellow catfish reared in net cages (12.02 ± 0.11 g) for 70 days. Special growth rate (SGR) decreased by 30.25% ($P < 0.05$), feed coefficient rate (FCR) increased to 83.94% ($P < 0.05$), and crude lipid content significantly decreased in the fish fed the NF diet compared with those fed the FM diet ($P < 0.05$). In addition, the concentration of triglycerides in their serum significantly decreased ($P < 0.05$) and the activity of serum aminotransferase significantly increased in fish fed the NF diet ($P < 0.05$). Hepatopancreas transcriptome annotation showed that in total, 12 020 genes were differentially expressed, of which 5 020 were upregulated and 7 000 were downregulated. In total, 1 013 genes were significantly upregulated and 2 749 genes were downregulated in the NF diet compared with the FM diet ($P < 0.05$). The GO term and KEGG pathway were used to classify differentially expressed genes between the two diets. Results showed that most of the differentially expressed genes were downregulated in the cell composition, cell biological processes, and cell molecular function in the hepatopancreas of fish fed the NF diet, suggesting that the cellular tissue structure and function of their hepatopancreas were affected to a certain extent. Fifteen considerably different metabolic pathways were enriched by KEGG, including axons, neurohormone secretion, hormone secretion and regulation, metabolic signaling pathway, inflammatory factor transmission, anti-stress, immune defense, and other important pathways. These results indicated that fish meal may contain some physiologically active substances. These physiologically active substances can affect neurosecretory, hormone regulation, metabolic signal pathway, and other processes and have a positive effect on the entire physiological metabolism intensity, cell structure and function, and physiological health state by regulating these target metabolic pathways of the hepatopancreas. The lack of these physiologically active substances in fish meal will result in a decline in growth performance, cause damage to some organs and cells (such as liver cells, nerve axons), and decrease anti-stress ability and immune defense of the fish.

(本文编辑: 谭雪静)