

低鱼粉饮食中添加半胱氨酸对卵形鲳鲹幼鱼脂质和蛋白质代谢的影响

刘佳兴^{1,2,3}, 郭华阳^{2,3}, 朱克诚^{2,3}, 刘宝锁^{2,3}, 张楠^{2,3}, 冼霖^{2,3}, 张殿昌^{2,3}

1. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所/农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300

3. 广东省海洋生物种业工程技术研究中心, 广东 广州 510300

摘要: 为研究半胱氨酸对低鱼粉引起的卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 幼鱼 [(10.05 ± 0.05) g] 代谢紊乱的影响, 采用动植物蛋白 (鸡粉、大豆浓缩蛋白、发酵豆粕等) 部分替代鱼粉制作卵形鲳鲹基础饮食, 分别添加 0 (C0组, 对照组)、0.30% (C1组)、0.60% (C2组)、0.90% (C3组) 和 1.20% (C4组) 半胱氨酸制成 5 种等氮等脂饲料。56 d 的饲养实验结果显示: 1) 半胱氨酸通过激活 S6K/PI3K/TOR/4E-BP1 通路, 提高卵形鲳鲹蛋白质合成代谢能力。补充 0.6%~0.9% 半胱氨酸通过上调肌肉核糖体蛋白 S6 激酶 (S6K)、雷帕霉素靶蛋白 (TOR)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 和 4E 结合蛋白 1 (4E-BP1) 基因的 mRNA 水平, 增加肌肉和血清总蛋白 (Total protein, TP) 含量与肌肉粗蛋白含量, 降低血氨 (Serum ammonia, SA)、肌肉和肝脏尿素氮 (Urea nitrogen, UN) 含量, 促进肌肉蛋白质沉积。2) 补充 0.6%~0.9% 半胱氨酸通过下调肌肉中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 基因的 mRNA 水平, 降低乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC)、脂肪酸合成酶 (FAS) 基因的 mRNA 水平与酶活水平, 抑制脂肪合成代谢; 同时, 上调肌肉中过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α) 基因的表达水平, 使激素敏感性脂肪酶 (HSL) 和肉毒碱棕榈酰转移酶 1 (CPT1) 基因高表达并伴随酶活提高, 进而促进肌肉中脂肪酸 β 氧化反应, 减少蛋白质因分解供能所带来的消耗, 促进肌肉中蛋白质沉积。

关键词: 卵形鲳鲹; 半胱氨酸; 脂代谢; 蛋白质代谢; 鱼粉替代

中图分类号: S 963.73

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Effects of cysteine addition to low-fishmeal diets on metabolism of lipid and protein in juvenile *Trachinotus ovatus*

LIU Jiaying^{1,2,3}, GUO Huayang^{2,3}, ZHU Kecheng^{2,3}, LIU Baosuo^{2,3}, ZHANG Nan^{2,3}, XIAN Lin^{2,3}, ZHANG Dianchang^{2,3}

1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation and Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300, China

3. Guangdong Provincial Engineer Technology Research Center of Marine Biological Seed Industry, Guangzhou 510300, China

Abstract: To investigate the effect of cysteine on the metabolic disorders of juvenile *Trachinotus ovatus* [(10.05±0.05) g] caused by low fishmeal, we prepared a basal pomfret diet by using plant and animal proteins (Chicken meal, soybean protein concentrate, fermented soybean meal, etc.) as partial substitutes for fishmeal, and then added 0 (Group C0, control group),

收稿日期: 2023-03-02; 修回日期: 2023-03-30

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (U20A2064); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2021SD12); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2022TD29); 国家海水鱼产业技术体系资助 (CARS-47); 广东省现代农业产业技术体系海水鱼产业创新项目 (2019KJ143)

作者简介: 刘佳兴 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养。E-mail: liujiaying96@163.com

通信作者: 张殿昌 (1977—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为水产种质资源与遗传育种。E-mail: zhangdch@scsfri.ac.cn

0.30% (Group C1), 0.60% (Group C2), 0.90% (Group C3) and 1.20% (Group C4) cysteine to make five isonitrogenous and isoenergetic diets. The results of a 56-day feeding trial show that: 1) Cysteine enhanced the protein synthesis and metabolism ability of *T. ovatus* by activating the S6K/PI3K/TOR/4E-BP1 pathway. Supplementation with 0.6%–0.9% cysteine up-regulated the mRNA levels of ribosomal protein S6 kinase (S6K), target of rapamycin (TOR), phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) in muscle, increased total protein (TP) in muscle and serum as well as muscle crude protein content, reduced serum ammonia (SA) and urea nitrogen (UN) in muscle and liver, promoting protein deposition in muscle. 2) Supplementation with 0.6%–0.9% cysteine inhibited lipid anabolism by down-regulating the expression level of peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPAR γ) in muscle, decreasing the transcript level and enzyme activity level of Acetyl-CoA carboxylase (ACC) and fatty acid synthetase (FAS), while it up-regulated the expression level of peroxisome proliferator activated receptors-alpha (PPAR α) in muscle, resulting in high hormone-sensitive lipase (HSL) and carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1) expression with increasing enzyme activity, which in turn promoted β -oxidation of fatty acids in muscle, reducing protein consumption due to catabolism for energy supply. Thus, protein deposition in muscle is promoted.

Keywords: *Trachinotus ovatus*; Cysteine; Lipid metabolism; Protein metabolism; Fishmeal replacement

鱼粉资源的波动下滑促使其价格上涨, 严重制约了水产饲料行业的发展, 研发鱼粉替代品成为解决这一问题的关键^[1]。以来源广泛、价格低廉且蛋白含量丰富的动植物蛋白替代鱼粉符合当前水产饲料行业的发展趋势。然而, 豆粕^[1]、发酵豆粕^[2]和玉米蛋白粉^[3]等植物蛋白存在适口性差、抗营养因子多等缺点; 动物蛋白(如家禽副产品粉^[3]和鸡肉粉^[4])成本较高且品质难以保证。采用动植物蛋白过度替代鱼粉会造成脂代谢与蛋白质代谢紊乱, 例如低鱼粉饲料增加了三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[5]和加拿大军曹鱼(*Rachycentron canadum*)^[6]的蛋白质分解能力, 同时抑制 PI3K、TOR、4E-BP1、S6K 基因的表达水平, 进而抑制机体蛋白质合成, 使得蛋白质沉积减少。因此, 寻找合适的添加剂来弥补动植物蛋白的不足, 是改善鱼粉限制问题的有效方法^[7]。

含硫氨基酸(牛磺酸、半胱氨酸和蛋氨酸等)是近年水产饲料添加剂的研究热点之一^[8]。作为一种功能性氨基酸, 牛磺酸对水产动物脂质与蛋白质代谢具有显著影响。研究显示, 牛磺酸可以有效降低大西洋白姑鱼(*Argyrosomus regius*)^[7]、塞内加尔舌鳎(*Solea senegalensis*)^[9]和大西洋鲑(*Salmo salar*)^[10]等水产动物的脂肪含量, 增加蛋白质沉积。半胱氨酸是生物体合成牛磺酸的前体物质, 也是一种功能性氨基酸^[11]。对肉仔鸡的研究结果显示, 补充半胱氨酸可以使其具有更低的体脂率和更高的蛋白质水平^[12]。然而, 半胱氨酸在水产动物中的研究相对较少。有研究显示, 半胱氨酸摄入不足造成黄条鲷(*Seriola lalandi*)肝脏脂肪沉积^[13], 补

充半胱氨酸增加了大西洋鲑对蛋白质、脂肪、淀粉的消化率以及氮保留^[14]。

卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)又名金鲳, 是中国最主要的水产养殖鱼类之一^[15]。笔者实验室早前的研究表明, 在低鱼粉饮食中补充半胱氨酸, 可以提高卵形鲳鲹抗氧化应激能力与肠道免疫能力^[11]。然而, 半胱氨酸对卵形鲳鲹脂质和蛋白质代谢的影响和机制尚未见报道。因此, 本实验探讨了补充半胱氨酸的低鱼粉饮食(20% 鱼粉)对卵形鲳鲹幼鱼的脂代谢和蛋白质代谢能力的影响, 旨在了解半胱氨酸对水生动物脂质和蛋白质代谢的作用机制, 为半胱氨酸在水产饲料中的使用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

实验饮食中食品级半胱氨酸纯度为 99.99% (浙江一诺生物科技有限公司), 其他成分由广州联鲲生物科技有限公司提供。日粮配方和营养水平见表 1。本实验采用了动物蛋白(鱼粉和鸡粉)和植物蛋白(大豆浓缩蛋白、发酵豆粕和玉米蛋白粉)作为基础蛋白, 脂肪来源于鱼油和大豆油。C0 (对照组)、C1、C2、C3 和 C4 组半胱氨酸添加量分别为 0、0.30%、0.60%、0.90% 和 1.20%, 以高筋面粉配平。所有固体成分通过 40 目筛, 按照表 1 所示比例混合 30 min, 然后将混合物通过双螺杆制粒机制成 3 种规格的球形颗粒(直径分别为 1、2 和 3 mm)以适应鱼的生长状态。最后, 将饲料置于 45 °C 干燥, 直到水分质量分数降至约 10%, 4 °C

表1 实验日粮配方和营养水平 (以干物质百分比为基础)
Table 1 Formulation and nutrition level of the experimental diets (Dry matter basis)

参数 Parameter	半胱氨酸添加量 Added amount of cysteine				
	C0 (0)	C1 (0.3%)	C2 (0.6%)	C3 (0.9%)	C4 (1.2%)
鱼粉 Fish meal ^①	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
鸡肉粉 Chicken meal ^①	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
大豆浓缩蛋白 Soy protein concentrate ^①	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
鱿鱼膏 Squid paste	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
豆粕 Soybean meal ^①	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
发酵豆粕 Fermented soybean meal ^①	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
玉米蛋白粉 Corn gluten meal ^①	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
高筋面粉 High gluten flour ^①	18.37	18.07	17.77	17.47	17.17
鱼油 Fish oil ^①	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
豆油 Soybean oil ^①	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ^①	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
氯化胆碱 Choline chloride ^①	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
维生素预混 Vitamin mix ^{①②}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
矿物质预混 Mineral mix ^{①③}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
L-赖氨酸盐酸盐 L-lysine monohydrochloride ^①	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
DL-蛋氨酸 DL-Methionine ^①	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
苏氨酸 Threonine ^①	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
乙氧喹 Ethoxyquin ^①	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
半胱氨酸 Cysteine ^①	0.00	0.30	0.60	0.90	1.20
营养水平 Nutrition level ^③					
粗蛋白 Crude Protein (% dry matter)	42.79	42.74	42.69	42.63	42.58
粗脂肪 Crude Lipid (% dry matter)	13.42	13.40	13.38	13.37	13.35
水分 Moisture (% dry matter)	10.15	10.76	11.24	10.98	11.32
灰分 Ash (% dry matter)	8.53	8.65	8.33	8.71	8.39
半胱氨酸 Cysteine	0.52	0.82	1.13	1.45	1.84

注：① 维生素预混料提供以下 (每千克)：维生素 A 8×10⁶ IU，维生素 D₃ 2×10⁶ IU，维生素 E 40 000 mg，维生素 B 17 000 mg，维生素 B₆ 12 000 mg，维生素 B₁₂ 100 mg，维生素 K₃ 10 000 mg，D-泛酸 35 000 mg，叶酸 1 000 mg，烟酰胺 90 000 mg，生物素 200 mg，肌醇 80 000 mg；② 矿物混合物提供以下 (每千克)：铁 10 000 mg，铜 1 200 mg，锌 7 000 mg，锰 5 500 mg，钴 250 mg，碘 250 mg，硒 50 mg，钾 60 000 mg，钠 24 000 mg，镁 60 000 mg；③ 营养水平为实测值。

Note: ① Vitamin mix provides the following (Per kilogram): vitamin A 8×10⁶ IU, vitamin D₃ 2×10⁶ IU, vitamin E 40 000 mg, vitamin B 17 000 mg, vitamin B₆ 12 000 mg, vitamin B₁₂ 100 mg, vitamin K₃ 10 000 mg, D-pantothenic acid 35 000 mg, folic acid 1 000 mg, nicotinamide 90 000 mg, Biotin 200 mg, inositol 80 000 mg. ② Mineral provides the following (Per kilogram content): Fe 10 000 mg, Cu 1 200 mg, Zn 7 000 mg, Mn 5 500 mg, Co 250 mg, I₂ 250 mg, Se 50 mg, K 60 000 mg, Na 24 000 mg, Mg 60 000 mg; ③ Nutrition level is measured.

储存备用。日粮氨基酸组成见表 2。

1.2 实验设计

为模拟卵形鲳鲹大规模养殖环境，实验于中国深圳龙岗区离岸网箱 (长 1 m×宽 1 m×高 1.5 m) 中进行。实验开始前挑选 1 050 尾体型相近且健康的

卵形鲳鲹幼鱼 [(10.05 ± 0.05) g] 平均放入 15 个网箱 (5 种饮食，每种饮食投喂 3 个网箱，每个网箱 70 尾鱼)，先投喂 C0 组饮食暂养 1 周。养殖实验持续 8 周，每天饱食投喂 4 次 (8:00、10:00、14:00 和 16:00) 并记录各组饲料投喂量，水体条件

表2 每 100 g 实验日粮的氨基酸组成
Table 2 Amino acid composition of per 100 g experimental diets

氨基酸 Amino acid	半胱氨酸添加量 Added amount of cysteine				
	C0 (0)	C1 (0.3%)	C2 (0.6%)	C3 (0.9%)	C4 (1.2%)
天冬氨酸 Aspartic acid	4.35	4.39	4.24	4.31	4.45
苏氨酸 Threonine	1.90	2.02	2.11	1.91	2.02
丝氨酸 Serine	2.04	2.05	2.04	2.12	2.05
谷氨酸 Glutamic acid	8.41	8.66	8.69	8.36	8.62
甘氨酸 Glycine	3.04	3.10	3.02	2.98	3.08
丙氨酸 Alanine	3.06	3.09	3.06	2.95	3.07
脯氨酸 Proline	3.21	3.13	3.04	3.16	3.13
缬氨酸 Valine	2.13	2.11	2.07	2.12	2.11
蛋氨酸 Methionine	1.18	1.15	1.12	1.31	1.12
异亮氨酸 Isoleucine	1.77	1.84	1.84	1.82	1.80
亮氨酸 Leucine	4.42	4.50	4.42	4.41	4.39
酪氨酸 Tyrosine	1.27	1.30	1.31	1.29	1.22
苯丙氨酸 Phenylalanine	2.24	2.32	2.25	2.37	2.25
赖氨酸 Lysine	3.54	3.43	3.50	3.54	3.50
组氨酸 Histidine	1.11	1.13	1.12	1.07	1.15
精氨酸 Arginine	3.15	3.10	3.14	3.15	3.11
半胱氨酸 Cysteine	0.52	0.82	1.13	1.45	1.84

保持如下: 温度 28~32 ℃, pH 7.4~8.3, 盐度 34‰~36‰, 溶解氧质量浓度>6.0 mg·L⁻¹。

1.3 样品采集

养殖实验结束前 24 h 停止投喂, 之后对每个网箱里的鱼进行称质量和计数。每个网箱随机选择 9 尾鱼, 用丁香酚 (100~200 mg·L⁻¹) 进行麻醉, 将其中 3 尾鱼在液氮中速冻后转移到-80 ℃ 冰箱保存, 用于分析常规营养成分; 然后抽取 3 尾鱼的血液并将其离心 (3 500×g, 4 ℃) 以获得血清, 用于测量血清生化参数; 最后分别收集 3 尾鱼的肝脏和肌肉, 用于基因表达分析和组织生化分析。

1.4 全鱼常规营养成分分析

全鱼常规营养成分分析按以下方式进行^[16]: 粗蛋白、粗脂肪、水分和灰分含量分别通过凯氏定氮法 (GB 5009.5—2016)、索氏提取法 (GB 5009.6—2016)、105 ℃ 下干燥至恒质量法 (GB 5006.3—2016) 和马弗炉中 [(550±25) ℃] 灼烧法确定 (GB 5006.4—2016)。

1.5 肌肉、肝脏和血清生化指标

本实验分别检测了血清、肝脏和肌肉中脂代谢

和蛋白质代谢相关生化指标, 如总蛋白 (Total protein, TP)、血氨 (Serum ammonia, SA)、尿素氮 (Urea nitrogen, UN)、甘油三酯 (Triglycerides, TG)、总胆固醇 (T-CHO)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、游离脂肪酸 (FFA)、肌肉粗脂肪、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 等含量以及乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC)、脂肪酸合成酶 (FAS)、激素敏感性脂肪酶 (HSL)、肉毒碱棕榈酰转移酶 1 (CPT1) 等酶活性。各检测试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。

1.6 实时荧光定量 PCR

本实验检测了卵形鲳鲹肌肉中脂肪酸合成相关基因 (FAS、PPAR γ 和 ACC)、脂肪酸分解相关基因 (PPAR α 、CPT1 和 HSL) 的 mRNA 水平, 以及核糖体蛋白 S6 激酶 (S6K)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)、雷帕霉素靶蛋白 (TOR) 和 4E 结合蛋白 1 (4E-BP1) 等氨基酸合成相关基因的 mRNA 水平。EF-1 α 为内参基因^[17], 所有引物见表 3。RNA 提取、cDNA 制备和 qPCR 基于以前的研究^[15], 使用通用型 RNA 抽提 Mini 试剂盒 (MGBio, 中国) 提取卵形鲳鲹肌肉总 RNA。使用 1% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳评估 RNA 完整性, Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 测定 RNA 浓度。使用带有 gDNA Erase 的 PrimeScript™ 逆转录试剂盒 (Accurate Biology, 中国) 进行逆转录。使用 SYBR® Green Premix Pro Taq HS qPCR 试剂盒 (Accurate Biology, 中国) 进行 qPCR, 实验结果用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 方法计算目标基因 mRNA 的相对水平^[18]。

1.7 统计学分析

基因表达和血清参数分别用 GraphPad Prism 8 和 Origin Pro 2021 软件进行单因素分析 (One-way ANOVA), 分析结果以 “平均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$)” 表示。当有显著性差异时 ($P<0.05$), 采用 Tukey's 检验进行多重比较。

2 结果

2.1 全鱼常规营养组成

全鱼常规营养组成见表 4。C2、C3 和 C4 组粗蛋白质量分数显著高于 C0 和 C1 组 ($P<0.05$), C0、C1 组之间均无显著性差异 ($P>0.05$)。对照组水分质量分数显著低于各实验组 ($P<0.05$)。各组间全鱼粗脂肪与灰分质量分数均无显著性差异 ($P>0.05$)。

表3 qPCR 引物序列
Table 3 qPCR primer sequences

引物 Primer	引物序列 (5'—3') Primer sequence (5'—3')	来源 Source
FAS-F	GATGGATACAAAGAGCAAGG	[19]
FAS-R	GTGGAGCCGATAAGAAGA	
PPAR γ -F	TCAGGGTTTCACTATGGCGT	[19]
PPAR γ -R	CTGGAAGCGACAGTATTGGC	
ACC-F	GTTGTCAATCCCAGCCGATC	[19]
ACC-R	ATCCACAATGTAGGCCCCAA	
PPAR α -F	AATCTCAGCGTGTCTCTT	[19]
PPAR α -R	GGAAATGCTTCGGATACTTG	
CPT1-F	CTTTAGCCAAGCCCTTCATC	[19]
CPT1-R	CACGGTTACCTGTTCCTCT	
HSL-F	TCATACCTCCACACCAACCC	[19]
HSL-R	GTCTCGCAGTTTCTTGCAA	
PI3K-F	AACGGCAAGAGCAAGAAGGGC	[20]
PI3K-R	CTATGGGCAGGCAGAGGAGGG	
4E-BP1-F	ACACCCAGCAGGAACTTT	[19]
4E-BP1-R	GTGACCATCAACGACGCAG	
TOR-F	GGGTCTTATGAGCCAGTGCCAGG	[19]
TOR-R	CTTCAGGGTTGTCAGCGGATTGT	
S6K-F	GCTGGCTGGCTTTACTCCATTG	[20]
S6K-R	CCTGCCTAGCAGTCAGTCTCTGA	
EF-1 α -F	AAGCCAGGTATGGTTGTCAACTTT	[21]
EF-1 α -R	CGTGGTGCATCTCCACAGACT	

2.2 肌肉、肝脏和血清中蛋白质代谢指标

肌肉、肝脏和血清中蛋白质代谢指标检测结果见图 1。C2 组肝脏、肌肉和血清中总蛋白质量分数最大且显著高于 C0 组 ($P<0.05$ ，图 1-a)。C0 组血氨浓度显著高于各实验组 ($P<0.05$ ，图 1-b)。肌肉、肝脏和血清中尿素氮浓度随着饲料半胱氨酸水平增加而下降，C0 组肌肉和肝脏中尿素氮质量摩

尔浓度最高且显著高于各实验组 ($P<0.05$ ，图 1-c)。

2.3 肌肉、肝脏和血清中脂代谢指标

肌肉、肝脏和血清脂代谢指标检测结果见图 2。C2、C3 和 C4 组肌肉和肝脏中甘油三酯含量显著低于 C0 和 C1 组 ($P<0.05$)，但 C1 和 C2 组血清甘油三酯含量显著高于 C0 组 ($P<0.05$ ，图 2-a)。同时，半胱氨酸显著降低了肌肉、肝脏和血清中的总胆固醇含量 (图 2-b) 以及肌肉粗脂肪含量 ($P<0.05$ ，图 2-f)。随着半胱氨酸水平的增加，肌肉、肝脏和血清中的低密度脂蛋白胆固醇含量呈下降趋势，C0 组低密度脂蛋白胆固醇含量均最高 (图 2-c)。相反，肌肉、肝脏和血清中的高密度脂蛋白胆固醇含量呈上升趋势，C0 组肌肉和肝脏中高密度脂蛋白胆固醇含量显著低于其他各组 ($P<0.05$ ，图 2-d)，但 C0 组血清高密度脂蛋白胆固醇含量与 C1 组无显著性差异 ($P>0.05$)。C0 组肌肉和肝脏中的游离脂肪酸含量显著高于其他各组 ($P<0.05$)，除 C1 组外，其他组血清游离脂肪酸含量均显著低于 C0 组 ($P<0.05$ ，图 2-e)。

2.4 肌肉、肝脏和血清脂代谢酶活

肌肉、肝脏和血清脂代谢酶活见图 3。C0 组肝脏、肌肉和血清中的 PPAR γ 质量摩尔浓度显著高于 C2、C3 和 C4 组 ($P<0.05$ ，图 3-a)。随饲料半胱氨酸水平的增加，FAS 活性呈下降趋势，C0 组肌肉和肝脏中的 FAS 活性显著高于其他各组 ($P<0.05$)，C0 组血清 FAS 活性与 C1 和 C3 组之间无显著性差异 ($P>0.05$)，但显著高于 C2 和 C4 组 ($P<0.05$ ，图 3-b)。同样，ACC 活性随饲料半胱氨酸水平的增加呈下降趋势，C0 组肝脏、肌肉和血清中的 ACC 活性显著高于 C2、C3 和 C4 组 ($P<0.05$ ，图 3-c)。PPAR α 质量摩尔浓度均呈先升后降的趋势，C1、C2 和 C3 组肌肉、肝脏和血清

表4 每 100 g 全鱼常规营养成分
Table 4 Conventional nutritional composition of per 100 g whole fish

成分 Component	半胱氨酸添加量 Added amount of cysteine				
	C0 (0)	C1 (0.3%)	C2 (0.6%)	C3 (0.9%)	C4 (1.2%)
粗蛋白 Crude protein	15.27±0.32 ^a	16.40±0.41 ^{ab}	17.80±0.50 ^{bc}	18.13±0.81 ^c	16.83±0.58 ^{bc}
粗脂肪 Crude lipid	6.77±0.35	7.13±0.21	6.60±0.30	6.63±0.15	6.43±0.35
水分 Moisture	69.10±0.26 ^a	71.23±0.15 ^b	71.33±0.98 ^{bc}	71.30±0.87 ^{bc}	72.93±0.42 ^c
灰分 Ash	3.07±0.06	3.10±0.10	3.13±0.06	3.07±0.06	3.07±0.06

注：同行数据不同字母上标表示差异显著 ($P<0.05$)。
Note: Values with different superscript letters within the same line are significantly different ($P<0.05$).

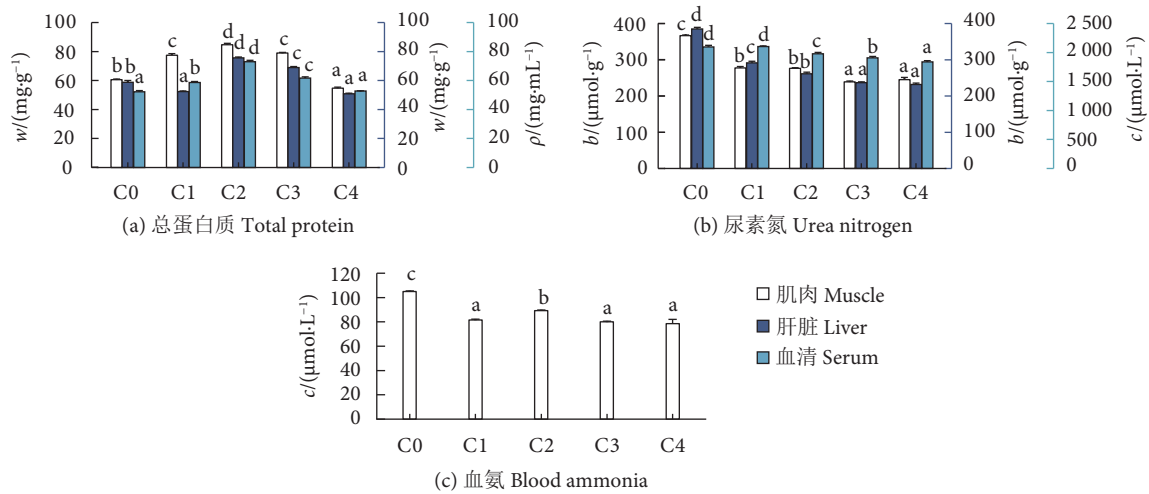


图1 半胱氨酸对卵形鲳鲹肌肉、肝脏和血清中蛋白质代谢参数的影响

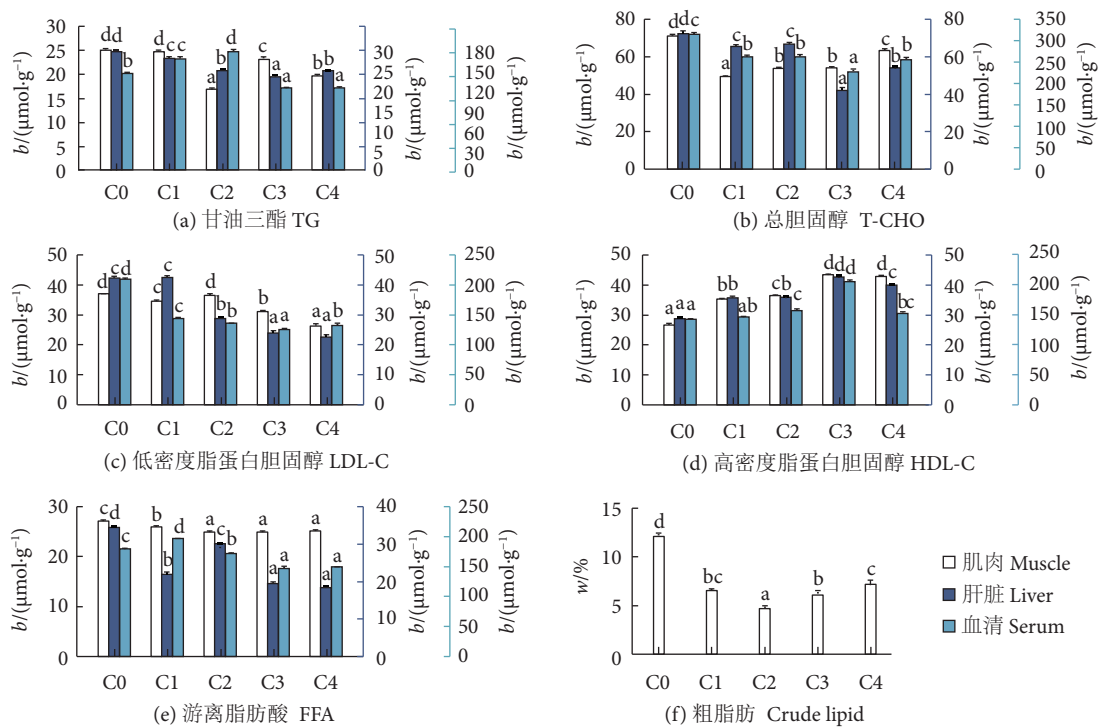
注: 同组数据不同字母上标表示差异显著 ($P < 0.05$)。后图同此。Fig. 1 Effects of cysteine on protein metabolism parameters in muscle, liver and serum of *T. ovatus*Note: Values with different superscripts for the same group are significantly different ($P < 0.05$). The same case in the following figures.

图2 半胱氨酸对卵形鲳鲹肌肉、肝脏和血清脂代谢参数的影响

Fig. 2 Effects of cysteine on lipid metabolism parameters in muscle, liver and serum of *T. ovatus*

中的 $PPAR\alpha$ 质量摩尔浓度显著高于 C0 组 ($P < 0.05$, 图 3-d)。肌肉、肝脏和血清中的 HSL 活性均呈上升趋势, C0 组 HSL 活性显著低于 C2、C3 和 C4 组 ($P < 0.05$, 图 3-e)。由图 3-f 可知, C0 组肌肉、肝脏和血清中的 CPT1 活性最低且显著低于各实验组 ($P < 0.05$)。

2.5 肌肉脂肪酸合成相关基因表达

卵形鲳鲹肌肉脂肪酸合成相关基因 (*FAS*、

PPAR\gamma 和 *ACC*) 的 mRNA 水平见图 4-a。随饲料半胱氨酸添加量的增加, *FAS*、*PPAR\gamma* 和 *ACC* 基因的 mRNA 水平均显著下降。各实验组 *FAS*、*ACC* 基因的 mRNA 水平显著低于 C0 组 ($P < 0.05$)。C0 与 C1 组的 *PPAR\gamma* 基因 mRNA 水平无显著性差异 ($P > 0.05$), 但显著高于其他实验组 ($P < 0.05$)。

2.6 肌肉脂肪分解相关基因表达

卵形鲳鲹肌肉脂肪水解与脂肪酸分解酶基因

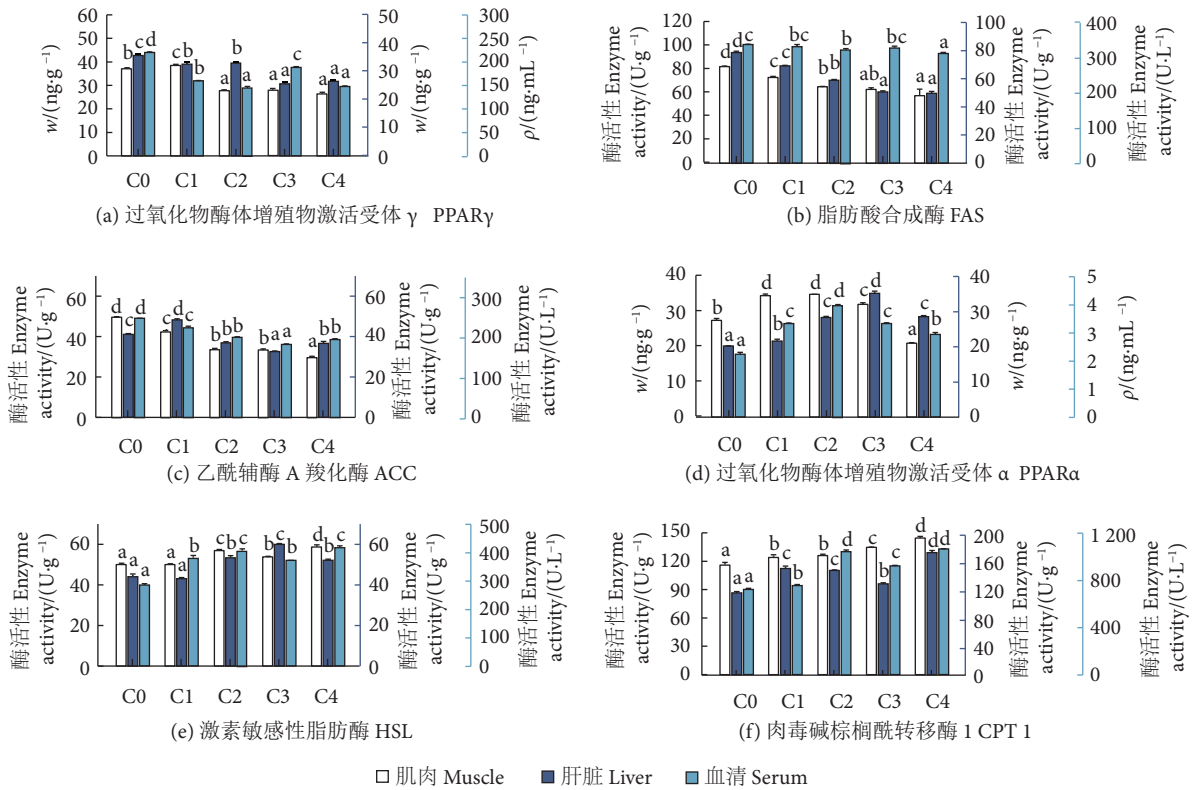


图3 半胱氨酸对卵形鲳鲋肌肉、肝脏和血清脂代谢酶活的影响

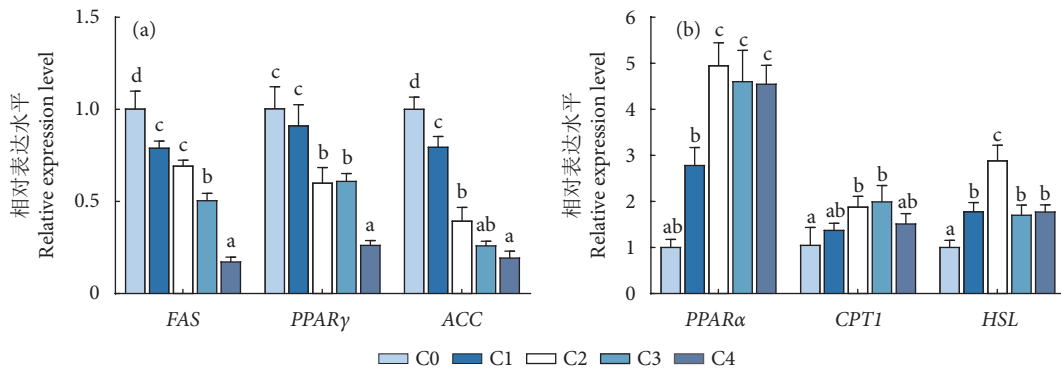
Fig. 3 Effect of cysteine on lipid metabolism enzyme activity in muscle, liver and serum of *T. ovatus*

图4 半胱氨酸对卵形鲳鲋肌肉脂肪合成代谢 (a) 与分解代谢 (b) 相关基因相对表达水平的影响

Fig. 4 Effect of cysteine on relative expression levels of genes related to lipid synthesis (a) and catabolism (b) in *T. ovatus* muscle

(PPAR α 、CPT1 和 HSL) 的 mRNA 水平见图 4-b。C2、C3 与 C4 组 PPAR α 基因的 mRNA 水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 但 C2、C3 与 C4 组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。C2 和 C3 组 CPT1 基因的 mRNA 水平显著高于 C0 组 ($P < 0.05$), 但与 C1 和 C4 组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。对照组的 HSL 基因的 mRNA 水平显著低于其他实验组 ($P < 0.05$), 但 C1、C3 与 C4 组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.7 肌肉蛋白质合成相关基因表达

肌肉蛋白质合成相关基因 (S6K、PI3K、TOR

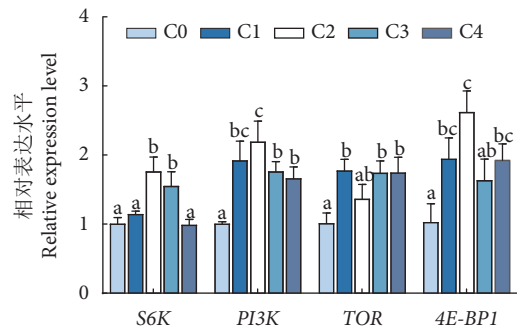


图5 半胱氨酸对卵形鲳鲋肌肉蛋白质合成代谢相关基因相对表达水平的影响

Fig. 5 Effect of cysteine on relative expression levels of genes related to protein anabolism in *T. ovatus* muscle

和 *4E-BP1* 的 mRNA 水平见图 5。C0 组 *S6K* 基因的 mRNA 水平与 C1、C4 组之间无显著性差异 ($P>0.05$), 但显著低于 C2 和 C3 组 ($P<0.05$)。C0 组 *PI3K* 基因的 mRNA 水平均显著低于其他实验组 ($P<0.05$), 但 C1、C3 与 C4 组之间无显著性差异 ($P>0.05$)。C0 组与 C2 组之间 *TOR* 基因的 mRNA 水平无显著性差异 ($P>0.05$), 但显著低于 C1、C3 和 C4 组 ($P<0.05$)。C0 组与 C3 组之间 *4E-BP1* 基因的 mRNA 水平无显著性差异 ($P>0.05$), 但显著低于 C1、C2 和 C4 组 ($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 外源半胱氨酸对卵形鲳鲹蛋白质代谢生化指标的影响

细胞中蛋白质的合成与分解是一个动态过程, 当其合成速率超过分解速率时可形成蛋白质沉积^[22]。血氨和尿素氮是蛋白质分解过程的主要产物, 它们的减少和血浆总蛋白的增加表明代谢朝着促进蛋白质合成的方向发展^[23]。有研究表明, 含硫氨基酸对鱼类蛋白质代谢有很大影响。例如, 牛磺酸可增加黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*)^[24] 和大西洋白姑鱼^[7] 血清总蛋白含量, 增加其体内的蛋白质沉积。作为牛磺酸前体, 半胱氨酸已被证实能够促进动物生长和蛋白质代谢^[22]。据报道, 半胱氨酸可显著降低大鼠^[25] 和肉鸡^[26] 的尿素氮水平, 减少蛋白质分解消耗。本研究表明, 半胱氨酸改善了卵形鲳鲹的蛋白质合成代谢能力, 补充 0.3%~0.9% (C1、C2 和 C3 组) 半胱氨酸显著增加了卵形鲳鲹肌肉和血清的总蛋白含量。同时, 半胱氨酸限制了蛋白质的分解代谢能力, 补充 0.3%~1.2% (C1、C2、C3 和 C4 组) 半胱氨酸显著降低了血氨以及肌肉和肝脏尿素氮含量, 促进肌肉粗蛋白沉积。

3.2 外源半胱氨酸对卵形鲳鲹蛋白质合成通路基因表达的影响

PI3K/TOR/S6K/4E-BP1 通路是调控蛋白质合成的关键通路^[27]。*PI3K* 可以解除 *TOR* 的抑制作用, 激活的 *TOR* 可以使 *S6K* 磷酸化, 进而磷酸化 *S6* (核糖体蛋白 *S6* 激酶), 从而启动蛋白质合成^[28]。此外, *TOR* 还可以启动 *4E-BP1* (翻译起始因子 *4E* 结合蛋白 1) 磷酸化, 从而促进翻译和编码细胞周期调节蛋白^[29]。对三疣梭子蟹^[5]、加拿大军曹鱼^[6] 和大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[30] 的研究显

示, 采用植物蛋白过度替代鱼粉会致使 *PI3K*、*TOR*、*4E-BP1*、*S6K* 基因表达水平下降, 进而抑制机体蛋白质合成。含硫氨基酸 (如蛋氨酸^[6]、牛磺酸^[31] 和半胱氨酸^[14]) 可以通过激活 *PI3K/TOR/S6K/4E-BP1* 通路改善机体蛋白质合成能力。本研究表明, 当半胱氨酸补充量低于 0.6% 时 (C2 组), *PI3K*、*TOR*、*4E-BP1*、*S6K* 基因表达水平显著上调, 当半胱氨酸补充量高于 0.6% 时下调, 这表明适量补充半胱氨酸可以刺激卵形鲳鲹体内蛋白质合成, 但过多摄入半胱氨酸会抑制蛋白质合成。有研究报道, 脂肪水解和 β 氧化可影响蛋白质代谢, 以减少蛋白质分解, 促进机体蛋白质沉积^[32]。

3.3 外源半胱氨酸对卵形鲳鲹脂代谢生化指标的影响

半胱氨酸对哺乳动物脂质代谢有积极影响。有研究表明, 角蛋白中的半胱氨酸可以降低大鼠对脂肪的消化率, 从而降低体脂比^[33]。同样, 半胱氨酸对于水产动物脂质代谢能力也很重要。据报道, 缺乏半胱氨酸会影响黄条鲈肝脏健康, 增加肝脏脂肪沉积^[13]。高密度脂蛋白胆固醇是一种有益胆固醇, 可以帮助降低体内低密度脂蛋白胆固醇和总胆固醇水平^[34]。本研究中, 补充 0.3%~1.2% 半胱氨酸增加了卵形鲳鲹肌肉、肝脏和血清中的高密度脂蛋白胆固醇水平, 降低了总胆固醇和血清低密度脂蛋白胆固醇水平。甘油三酯可以增加体内游离脂肪酸水平, 从而增加肌肉粗脂肪水平^[9]。本研究中, 补充半胱氨酸对全鱼粗脂肪水平无影响, 但显著降低了肌肉粗脂肪含量以及肌肉和肝脏中的甘油三酯、游离脂肪酸含量。

3.4 外源半胱氨酸对卵形鲳鲹脂代谢酶活与基因表达的影响

脂代谢包括合成代谢和分解代谢两部分, 前者通过一系列反应将乙酰辅酶 A (CoA) 转化为脂肪储存在生物体内, 后者则是将脂肪分解为甘油和脂肪酸, 进行 β 氧化供能的过程^[35]。作为脂肪酸合成的限速酶, *ACC* 和 *FAS* 可以促进脂肪酸合成^[36]。*PPAR γ* 是一种调节脂肪酸合成的转录因子, 它可以通过促进 *FAS* 和 *ACC* 基因表达, 从而调节脂肪酸合成^[37]。有研究显示, 半胱氨酸显著降低了小鼠前脂肪细胞中 *PPAR γ* 基因表达^[38]。本研究表明, 补充 0.6%~1.2% 半胱氨酸可以显著降低卵形鲳鲹肌肉、肝脏和血清中的脂肪代谢相关酶 (*ACC* 和 *FAS*) 活性和 *PPAR γ* 含量, 显著下调肌肉

中 ACC、FAS 和 PPAR γ 基因的 mRNA 水平, 由此可见, 半胱氨酸可以通过抑制脂肪酸合成来降低卵形鲳鲹体内游离脂肪酸水平。

HSL 和 CPT1 是脂肪酸 β 氧化关键酶^[36]。HSL 可将甘油三酯分解成脂肪酸从而被细胞利用^[36]。CPT1 可将脂肪酸代谢产物脂酰 CoA 转移到线粒体内进行 β 氧化^[39]。PPAR α 可以通过激活 HSL 和 CPT1 来促进脂肪酸氧化, 从而改善脂质代谢, 降低总胆固醇和甘油三酯水平^[40]。本研究表明, 补充 0.6%~0.9% 半胱氨酸可以显著增加卵形鲳鲹肌肉、肝脏和血清中的 PPAR α 含量、HSL 和 CPT1 酶活性, 上调肌肉 PPAR α 、CPT1 和 HSL 基因的 mRNA 水平, 由此可见, 补充半胱氨酸可以通过促进脂肪酸 β 氧化来增加卵形鲳鲹体内脂肪消耗, 改善脂肪沉积。

4 结论

综上所述, 在本实验条件下, 低鱼粉饮食中补充 0.6%~0.9% 半胱氨酸可能通过下调卵形鲳鲹肌肉中 PPAR γ 基因的表达水平, 降低 ACC、FAS 基因的转录水平并伴随肌肉、肝脏和血清中 ACC、FAS 酶活水平下降, 从而抑制肌肉中脂肪合成代谢。同时, 半胱氨酸可能通过上调卵形鲳鲹肌肉中 PPAR α 基因的表达水平, 使 HSL 和 CPT1 基因高表达并伴随肌肉、肝脏和血清中 HSL 和 CPT1 酶活水平的提高, 进而促进肌肉中脂肪酸的 β 氧化反应, 减少蛋白质因为分解供能所带来的消耗。此外, 补充半胱氨酸可能通过激活 S6K/PI3K/TOR/4E-BP1 通路, 提高卵形鲳鲹肌肉中蛋白质的合成代谢能力, 增加蛋白质沉积。

参考文献:

- [1] 李宁宇, 刘利平, 华雪铭, 等. 豆粕影响日本鳊黑仔鳊饲料中发酵豆粕对鱼粉的替代效果: 生长、抗氧化能力以及生化指标 [J]. 海洋渔业, 2020, 42(3): 352-364.
- [2] 冯建, 王萍, 何娇娇, 等. 发酵豆粕替代鱼粉对大黄鱼幼鱼生长性能、体成分、血清生化指标及肝脏组织形态的影响 [J]. 动物营养学报, 2016, 28(11): 3493-3502.
- [3] GUIMARÃES I G, PEZZATO L E, BARROS M M. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Aquac Nutr, 2008, 14(5): 396-404.
- [4] 崔锡帅. 鸡肉粉、黑水虻幼虫粉和乙醇梭菌蛋白替代鱼粉对暗纹东方鲀生长性能、蛋白代谢及相关基因表达的影响 [D]. 上

海: 上海海洋大学, 2022: 25.

- [5] XIE S C, ZHOU Q C, ZHANG X S, et al. Effect of dietary replacement of fish meal with low-gossypol cottonseed protein concentrate on growth performance and expressions of genes related to protein metabolism for swimming crab (*Portunus trituberculatus*) [J]. Aquaculture, 2022, 549: 737820.
- [6] HE Y F, CHI S Y, TAN B P, et al. dl-Methionine supplementation in a low-fishmeal diet affects the TOR/S6K pathway by stimulating ASCT2 amino acid transporter and insulin-like growth factor-I in the dorsal muscle of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) [J]. Brit J Nutr, 2019, 122(7): 734-744.
- [7] de MOURA L B, DIÓGENES A F, CAMPELO D A V, et al. Nutrient digestibility, digestive enzymes activity, bile drainage alterations and plasma metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) feed high plant protein diets supplemented with taurine and methionine [J]. Aquaculture, 2019, 511(15): 734231.
- [8] LI S H, LUO X, LIAO Z B, et al. Additional supplementation of sulfur-containing amino acids in the diets improves the intestinal health of turbot fed high-lipid diets [J]. Fish Shellfish Immunol, 2022, 130: 368-379.
- [9] RICHARD N, COLEN R, ARAGÃO C. Supplementing taurine to plant-based diets improves lipid digestive capacity and amino acid retention of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles [J]. Aquaculture, 2017, 468(1): 94-101.
- [10] ESPE M, RUOHONEN K, EL-MOWAFI A. Effect of taurine supplementation on the metabolism and body lipid-to-protein ratio in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Aquac Res, 2012, 43(3): 349-360.
- [11] LIU J X, ZHU K C, GUO H Y, et al. Effects of cysteine addition to low-fishmeal diets on the growth, anti-oxidative stress, intestine immunity, and *Streptococcus agalactiae* resistance in juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*) [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1066936.
- [12] ELAHI U, WANG J, MA Y B, et al. The response of broiler chickens to dietary soybean meal reduction with glycine and cysteine inclusion at marginal sulfur amino acids (SAA) deficiency [J]. Animals, 2020, 10(9): 1686.
- [13] CANDEBAT C L, STEPHENS F, BOOTH M A, et al. Adequate levels of dietary sulphur amino acids impart improved liver and gut health in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) [J]. Brit J Nutr, 2022, 129(8): 1289-1312.
- [14] NORDRUM S, KROGDAHL Å, RØSJØ C, et al. Effects of methionine, cysteine and medium chain triglycerides on nutrient digestibility, absorption of amino acids along the intestinal tract and nutrient retention in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) under pair-feeding regime [J]. Aquaculture, 2000, 186(3): 341-360.
- [15] GAO J, LIU M J, GUO H Y, et al. ROS Induced by *Streptococcus agalactiae* activate inflammatory responses via the TNF- α /NF- κ B signaling pathway in golden pompano *Trachinotus ovatus* (Linnaeus, 1758) [J]. Antioxidants, 2022, 11(9): 1809.

- [16] LIU J X, GUO H Y, ZHU K C, et al. Effects of exogenous taurine supplementation on the growth, antioxidant capacity, intestine immunity, and resistance against *Streptococcus agalactiae* in juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*) fed with a low-fish-meal diet[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1036821.
- [17] LIU M J, GUO H Y, ZHU K C, et al. Effects of acute ammonia exposure and recovery on the antioxidant response and expression of genes in the Nrf2-Keap1 signaling pathway in the juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. Aquat Toxicol, 2021, 240: 105969.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [19] QIN Y W, HE C Q, GENG H Y, et al. Muscle nutritive metabolism changes after dietary fishmeal replaced by cottonseed meal in golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. Metabolites, 2022, 12(7): 576.
- [20] ZHOU C P, HUANG Z, LIN H Z, et al. Effects of dietary leucine on glucose metabolism, lipogenesis and insulin pathway in juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus*[J]. Aquac Rep, 2021, 19: 100626.
- [21] LIU M J, GUO H Y, LIU B, et al. Gill oxidative damage caused by acute ammonia stress was reduced through the HIF-1 α /NF- κ B signaling pathway in golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. Ecotox Environ Safe, 2021, 222: 112504.
- [22] MÉTAYER S, SEILIEZ I, COLLIN A, et al. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status[J]. J Nutr Biochem, 2008, 19(4): 207-215.
- [23] ZHANG H, LUO Y, LU D L, et al. Diacylglycerol oil reduces fat accumulation and increases protein content by inducing lipid catabolism and protein metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Aquaculture, 2019, 510: 90-99.
- [24] TONG S L, WANG L, KALHORO H, et al. Effects of supplementing taurine in all-plant protein diets on growth performance, serum parameters, and cholesterol 7 α -hydroxylase gene expression in black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*[J]. J World Aquac Soc, 2020, 51(4): 990-1001.
- [25] EL DALY E S. Protective effect of cysteine and vitamin E, *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in rats[J]. J Pharm Belg, 1998, 53(2): 87-93.
- [26] DONATO D C Z, SAKOMURA N K, SILVA E P, et al. Manipulation of dietary methionine+cysteine and threonine in broilers significantly decreases environmental nitrogen excretion[J]. Animal, 2016, 10(6): 903-910.
- [27] 周乐, 常晨城, 王宇, 等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控牛细胞生长作用的研究进展 [J]. 饲料研究, 2022, 45(9): 138-142.
- [28] 徐稳. 日粮补充亮氨酸调控 IUGR 仔猪蛋白质代谢及胰岛素信号通路相关基因的机制研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2017: 69.
- [29] 冯文荣, 冯伟, 张明胤, 等. 中华绒螯蟹 4E-BP1 基因的克隆、表达特征及其在蜕壳中的作用 [J]. 中国水产科学, 2022, 29(12): 1714-1727.
- [30] TIAN S J, WU Y, YUAN J, et al. Replacement of dietary fishmeal by cottonseed protein concentrate on growth performance, feed utilization and protein metabolism of large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. Aquac Rep, 2022, 26: 101313.
- [31] HAO Q, WANG L L, ZHANG M H, et al. Taurine stimulates protein synthesis and proliferation of C2C12 myoblast cells through the PI3K-ARID4B-mTOR pathway[J]. Brit J Nutr, 2021, 128(10): 1-12.
- [32] SHI X C, JIN A, SUN J, et al. The protein-sparing effect of α -lipoic acid in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*: effects on lipolysis, fatty acid β -oxidation and protein synthesis[J]. Brit J Nutr, 2018, 120(9): 977-987.
- [33] WOLBER F M, MCGRATH M, JACKSON F, et al. Cysteic acid in dietary keratin is metabolized to glutathione and liver taurine in a rat model of human digestion[J]. Nutrients, 2016, 8(2): 104.
- [34] LIU X, DENG H Y, XU Q Q, et al. Effects of tea tree essential oil supplementation in low fish meal diet on growth, lipid metabolism, anti-oxidant capacity and immunity of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Aquac Rep, 2022, 27: 101380.
- [35] 史晓晨. 硫辛酸对草鱼脂质代谢、蛋白质代谢及其抗氧化能力影响的研究 [D]. 咸阳: 西北林科技大学, 2018: 45.
- [36] 张幸开. 维生素 A 对肉牛肌肉脂肪沉积及 ACC/HSL、PPAR γ 基因表达的影响 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2005: 35-45.
- [37] WANG X X, BAI F K, NIU X J, et al. The lipid-lowering effect of dietary taurine in orange-spotted groupers (*Epinephelus coioides*) involves both bile acids and lipid metabolism[J]. Front Mar Sci, 2022, 9: 859428.
- [38] HAJ-YASEIN N N, BERG O, JERNERÉN F, et al. Cysteine deprivation prevents induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 and adipose differentiation of 3T3-L1 cells[J]. BBA-Mol Cell Biol L, 2017, 1862(6): 623-635.
- [39] 郭亚男, 杨茹艳, 张芷毓, 等. *Mstn* 基因干扰通过上调基因 *Cpt1b* 促进肌间脂肪的 β 氧化 [J]. 生物工程学报, 2022, 38(8): 3076-3089.
- [40] SHEN J, SUN B F, YU C, et al. Choline and methionine regulate lipid metabolism via the AMPK signaling pathway in hepatocytes exposed to high concentrations of nonesterified fatty acids[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(8/9): 3667-3678.