

doi: 10.7541/2014.16

饲料中植物油替代鱼油对大西洋鲑肝细胞油酸跨膜吸收的影响

周继术^{1,2} Bente E. Torstensen² Ingunn Stubhaug^{2,3}

(1. 西北农林科技大学动物科技学院水产科学系, 杨凌 712100; 2. National Institute of Nutrition and Seafood Research (NIFES), P.O.Box 2029, Nordnes, 5817 Bergen, Norway; 3. Skretting ARC, Stavanger, Norway)

摘要: 以 $[1-^{14}\text{C}]$ 油酸(oleic acid; 18:1n-9, OA)为指示剂, 研究了不同饲料油源饲喂下大西洋鲑肝细胞膜脂肪酸组成受到改变时该细胞对 OA 吸收的状况, 以探讨植物油(Vegetable oil, VO)替代鱼油(Fish oil, FO)对大西洋鲑肝细胞脂肪酸跨膜吸收的影响, 为大西洋鲑饲料中植物油替代鱼油的可行性提供理论依据。试验先以鱼油和大豆油为油源配制两种全价配合饲料, 分别饲喂大西洋鲑幼鲑 5 个月, 使其产生不同的脂肪酸组成。在饲养结束后, 分离并培养试验鱼肝细胞, 将细胞与 $[1-^{14}\text{C}]$ OA 及 $37.5\ \mu\text{mol/L}$ OA (1/30, mol/mol, $0.3\ \mu\text{Ci/瓶}$) 共孵育 2h, 收集并测定细胞内 OA 放射活性, 再计算细胞内 OA 吸收量 $[\text{nmol}/(\text{h}\cdot\text{million cells})]$ 。同时, 试验采取 RT-PCR 方法测定了细胞脂肪酸运送蛋白(Fatty acid transport protein, FATP)、脂肪酸移位蛋白(Fatty acid translocase, FAT/CD36)的基因表达量。结果表明, FO 和 VO 组肝细胞对 OA 吸收分别为 (0.924 ± 0.258) 及 $(0.888\pm 0.179)\ \text{nmol}/(\text{h}\cdot\text{million cells})$, 两组间无显著差异($P>0.05$)。RT-PCR 的检测结果表明, *FAT/CD36* 和 *FATP* 基因表达量在 FO 与 VO 两组间均无显著差异($P>0.05$)。结果表明, 从植物油替代鱼油不影响大西洋鲑肝细胞对长链脂肪酸的跨膜吸收方面来看, 大西洋鲑饲料中以植物油替代鱼油具有可行性。

关键词: 植物油; 鱼油; 大西洋鲑; 肝细胞; 脂肪酸; 跨膜吸收

中图分类号: S965.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2014)01-0121-08

长链脂肪酸(Long chain fatty acid, LCFA)跨膜吸收是细胞内脂质代谢的基础, 长期的观点认为, 该跨膜吸收过程是一种简单扩散, 不需要膜蛋白的协助就能完成^[1]。随着一系列如脂肪酸运输蛋白(Fatty acid transport protein, FATP)^[2]、脂肪酸移位蛋白(Fatty acid translocase, FAT/CD36)^[3]等脂肪酸跨膜转运蛋白的发现, 脂肪酸依靠膜蛋白进行跨膜吸收的观点也获得了相应的理论支持。在大西洋鲑的肝脏和红肌等组织中也发现有 *FAT/CD36* 和 *FATP* 基因的表达^[4], 而在脂肪代谢中具有重要作用的脂肪酸结合蛋白(Liver basic fatty acid binding protein, Lb-Fabp)基因在鲤体中也有相应表达^[5]。不论 LCFA 的跨膜吸收以何种方式进行, 细胞膜的各种特性都是实现其跨膜吸收的关键, 而细胞膜的各类特性与该膜脂肪酸组成密切相关, 而后者又易受饲用油源

的影响。研究发现, 当以鱼油、花生四烯酸、EPA^[6]和 DHA^[7]等油源或脂肪酸饲喂动物后, 其细胞膜的流动性就会增强, 而细胞膜的流动性与细胞膜功能密切相关, 反映出油源脂肪酸改变了细胞膜的结构和功能^[8, 9], 而细胞乃至细胞膜脂肪酸组成的差异会引起细胞膜脂质组成的变化, 进而引起膜张力结构的改变, 最终影响膜结合蛋白的功能^[10]。因此推测, 在“油源-细胞膜-膜蛋白-脂肪酸吸收”这样一个脂肪酸吸收链上, 不同脂肪源所引起的细胞膜脂肪酸组成的差异可能会最终导致该细胞对脂肪酸跨膜吸收的不同, 而这种吸收的不同可能与细胞膜或膜蛋白的结构或功能有关。

目前, 大西洋鲑(*Salmo salar* L.)所需能源的 20%—30%来自饲料中的鱼油(Fish oil, FO)^[11], 对鱼油的需求量大, 而在全球渔业资源的紧缺以及动物

收稿日期: 2012-11-19; 修订日期: 2013-09-28

基金项目: 西北农林科技大学科研启动(2010BSJJ008); 国家留学基金委员会联合培养项目及挪威国家海产品营养研究所(the National Institute of Nutrition and Seafood Research, NIFES)资助

通信作者: 周继术(1973—), 女, 重庆人; 博士; 主要从事水产动物营养、健康与饲料研究。E-mail: zhoujishu@163.com

饲养对鱼油需求量增加的状况下, 鱼油供应越为缺乏, 寻求来源广、价格适宜的植物油(Vegetable oil, VO)则成为当务之急^[12]。植物油与鱼油的差别主要体现在其脂肪酸组成的差异, 这种差异虽然对鱼类生长没有影响, 但会改变鱼体脂肪酸组成^[13, 14], 而这种改变是否会影响到大西洋鲑机体组织细胞对 LCFA 的跨膜吸收, 相关研究则较为缺乏。为此, 本试验以 FO 与 VO 为油源制成两种试验饲料, 对大西洋鲑进行为期 5 个月的饲养, 然后分析鱼体肝脏脂肪酸组成并分离培养大西洋鲑肝细胞以进行油酸跨膜吸收试验, 通过探讨两组细胞对 OA 吸收的差异, 为大西洋鲑饲料中植物油替代鱼油提供理论依据, 为养殖鱼类饲料油源的选择及其养殖业的可持续发展提供参考。

1 材料与方法

1.1 饲养试验

将 100 尾大西洋鲑(*Salmo salar* L.) 幼鲑(165 ± 15) g 随机均分为两组, 饲养于挪威海洋研究所水产实验室(IMR, 挪威卑尔根)室内养殖系统内的两个养殖缸中, 分别饲以 VO 与 FO 为脂肪源的两组试验饲料, 饲养周期为 5 个月。试验饲料由 Nofima 公司(Titlestad, 挪威)生产, 其组成及成分请见表 1。每千克饲料含粗蛋白 439 g, 粗脂肪 284 g, 碳水化合物 121 g, 水 61 g, 灰分 89 g, 能量 238 MJ。饲养期间平均水温为 10℃, 盐度为 32‰—34‰, 采用 24h 连续光照。

表 1 试验饲料组成
Tab. 1 Feed composition (g/kg)

饲料组成 Feed composition (g/kg)	鱼油组 植物油组	
	FO	VO
鱼粉 Fish meal (Nordsildmel, Norway)	596	596
鱼油 Capelin oil (Nordsildmel, Norway)	230	0
大豆油 Soybean oil (Denofa, Norway)	0	230
小麦 Wheat (Statkorn, Norway)	150	150
维生素与矿物质添加剂 Vitamin and mineral mix ¹	24	24

注: ¹ 维生素与矿物质添加剂参照 NRC, 1993^[15]

Note: ¹Vitamin and mineral supplementation is estimated to cover requirements according NRC, 1993

1.2 饲料及试验鱼肝脏脂质的脂肪酸及脂类组成测定

在饲养试验结束后, 每组随机采鱼 2 尾[(524 ± 23) g], 剥离其肝脏, 同时采集饲料样品, 用氯仿/甲醇(2:1 v/v)^[16]分别抽提其总脂, 然后参照 Lie and

Lambertsen^[17]的方法测定其脂肪酸组成, 同时采用高效薄层色谱(HPTLC, Darmstadt, Germany)法^[18]测定其脂类组成。

脂肪酸组成测定 先将抽提的脂肪皂化, 再用 12% BF₃ (Sigma, Poole, UK)甲醇溶液甲基化, 最后将甲酯用气相色谱 2000 进行分离。分离条件为: 进样时柱温冷却, 进样后升温, 20s 升至 60℃, 25℃/min; 28min 升至 160℃, 25℃/min; 17min 升至 190℃, 25℃/min; 9min 升至 220℃。色谱硅毛细管柱内径(id) 0.32 mm。与标准品的甲酯混合物为对照, 以脂肪酸滞留时间来确定脂肪酸的组成, 脂肪酸的定量测定采用 Totalchrom 软件 (version 6.2, Perkin Elmer) 进行分析计算。每克组织脂肪酸的含量是以 19:0 脂肪酸甲酯作内标进行测定。

脂类组成测定 将脂质溶于含 0.05% BHT 氯仿后, 取约 10 μg (1 μL) 总脂点样于 HPTLC (10 cm × 20 cm)上样孔中。然后将该薄层于乙酸甲酯: 异丙醇: 氯仿: 甲醇: 0.25% KCl 水溶液 (25:25:25:10:9 v/v)^[19]混合试剂中展开至薄层 2/3 高度, 自然干燥后再将该薄层于异己烷: 二乙醚: 乙酸(80:25:1.5, v/v/v) 混合溶剂中分离薄层余下的 1/3 高度。将 8%磷酸溶液中溶有 3%乙酸铜的混合溶液喷洒于薄层上, 再将该薄层于 160℃下炭化 15min, 与标准品对照并识别各类脂质, 然后于 CAMAG TLC 扫描仪 3 上读取各类脂质密度值。

1.3 肝细胞的分离和培养

在饲养结束后, 每组随机选取 FO 组 [(580 ± 23) g] 和 VO 组[(500 ± 143) g] 大西洋鲑各 3 尾, 分别用 50 L 加有充氧海水的桶运到实验室, 进行肝细胞的分离和培养。

将大西洋鲑用 0.1 g/L MS222 (3-氨基苯甲酸乙酯甲烷磺酸盐, metacain, Sigma Poole, UK)麻醉, 剖开鱼腹, 找出肝静脉, 从肝静脉以两步灌注法^[20]给肝进行试剂灌注。第一步灌注 HEPES 缓冲液 (NaCl 8.4 g/L, KCl 0.5/g L, EDTA 0.0074 mg/L), 同时剪破心脏, 使灌注液从此处流出。当肝体由最初的淡红变为淡黄色时, 将灌注液换为 0.1 mg/mL 胶原酶-HEPES 缓冲液。当肝脏呈松软肿胀和半透明状态时, 将肝剪下放入 PBS 溶液中, 用镊子撕裂肝组织并轻轻搅拌混匀。将该溶液用 100 μm 尼龙网过滤, 再将滤液并于 4℃下离心(50 g) 5min。倒掉上清, 加入 PBS 后再轻轻混匀, 并于同等条件下离心。如

此条件下再重复两次离心, 然后将细胞溶于 20 mL L-15 完全培养基中制成细胞悬液。

用台盼蓝测定细胞悬液的细胞活力, 以活率 >85% 为宜。将活率适宜的细胞悬液进行一定程度稀释, 再分别接种于 25 cm² 培养瓶(BD Bioscience, Erembodegem, 比利时)和 6 孔板(TPP, Trasadingen, 瑞士)中, 活细胞接种量分别为 10⁷ 个/瓶和 3.8×10⁶ 个/孔。培养用瓶和 6 孔板的接种表面预先用 (2 μg/cm²) 层黏蛋白进行了包被。细胞于 12℃ 培养 24h。每尾鱼肝细胞有两个重复($n=6$)。

胎牛血清(FBS)和谷氨酸酯购于 Gibco-brl/Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA), L-15 培养基、油酸、层粘连蛋白、胶原酶(VIII)、羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、牛血清白蛋白 (BSA)、台盼蓝等试剂均购自 Sigma(Poole, UK)。

1.4 脂肪酸跨膜吸收测定

将分离并培养于培养瓶内的贴壁细胞与含 [1-¹⁴C]OA (美国放射化学有限公司, Laborel, 奥斯陆, 挪威)的培养液(0.3 μCi/瓶)共孵育 2h。在这培养液中, 参照大西洋鲑血液脂肪酸浓度, 另添加 OA, 使其在培养基中的浓度为 37.5 μmol/L([1-¹⁴C]OA/OA: 1/30, mol/mol)。[1-¹⁴C]OA 与 OA 均与 BSA 结合。孵育结束后收集细胞。将培养液移除, 加入 1.4 μL PBS 液分两次将细胞转入离心管中, 4℃ 下离心(500 g) 5min。移除上清, 在获得的细胞团内加入 0.5 mL 0.88% KCl 溶液制成细胞混悬液。用破碎仪将细胞混悬液中的细胞破碎, 再移取细胞破碎液 50 μL 与 8 mL 闪烁液(Ecoscint A, National Diagnostics, USA)混合, 由闪烁计数器(TRI-CARB 2000CA, United Technologies Packard, U.K.)测其放射活性(M)。

OA 吸收量由细胞内测得的放射活性(M)为依据, 经[1-¹⁴C]OA 放射活性比活度(μCi/mmol) 转换为 [1-¹⁴C]OA 摩尔数, 再由 OA 与 [1-¹⁴C]OA 分子比 (30:1) 换算为总 OA 摩尔数。具体计算公式如下:

OA 吸收量 [nmol/(h·million cells)]=[$(M \times 10) / [1-^{14}\text{C}] \text{OA 比活度}(\mu\text{Ci}/\text{mmol}) \times 1000 \times (1+30) / 10/2$]

1.5 脂肪酸膜结合蛋白的基因表达测定

将培养于 6 孔板的细胞用含膜蛋白抑制剂的培养液进行与 1.3 相同条件的处理, 以未进行抑制剂处理的细胞为对照, 2h 后收集细胞并按 TRIZOL[®] (Invitrogen, California, USA) 法提取细胞总 RNA, 再由 RNA_{wiz} protocolTM(Ambion) 试剂盒对其纯化,

经 DNA 酶(DNA-freeTM, Ambion) 处理后用分光光度法($A_{260/280}$)测其质量。

cDNA (500 ng) 是根据 TaqMan 反转录试剂盒 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 在 50 μL 反应系统内合成。在这个反应系统内含 1×TaqMan RT 缓冲液, 5.5 mmol/L MgCl₂, 每种脱氧核苷(dNTP) 含量为 500 μmmol/L, 18S rRNA 寡 d(T)₁₆/六聚物为 2.5 μmmol/L, RNase 抑制剂和反转录酶分别为 0.4 和 1.67 U/μL。每个反应系统三个重复。反应条件为初始温度 25℃ 下反应 10min, 48℃ 下反应 60min, 然后 95℃ 下作用 5min, 最后降至 4℃。对总 RNA 进行两倍稀释以测定计算效率。稀释曲线由 6 个系列的稀释浓度(31—1000 ng) 制成, 每个稀释浓度 3 个重复。每批次 96 孔反应板中均有 RT 对照。PCR 引物序列, GenBank 序列号以及每个基因的扩增大小见表 2。

定量 PCR 采用 FAM 荧光化学原理的 LightCycler[®] 480 RT PCR 系统 (Roche Applied Sciences, Basel, 瑞士)。RT-PCR 反应采用 SYBR Green Master Mix (LightCycler 480 SYBR Green master mix kit, Roche), 其 20 μL 反应混合物包括 FastStart DNA 多聚酶, 基因的特异性引物和 2 μL cDNA (2 μL)。每个样品 3 次重复同时以同一反应板中无模板组为对照。PCR 开始时在 50℃ 下反应 2min, 然后在 95℃ 下反应 10min, 然后进行 40 次循环反应: 95℃ 反应 15s, 60℃ 反应 1min。

参照 Roche Applied Science [21] 的 E-Method 对目的基因和管家基因的扩增效率进行了分析, 以 *EF1-αβ* 和 *β-actin* 两个管家基因为基础, $-\Delta C_t$ 法计算表 2 所示基因的相对表达量。

1.6 数据处理

所有数据表示为平均数±标准差 (n =培养瓶数或培养孔数)。采用随后用 EXCEL 中 t -test 对试验组和对照组进行统计学检验。 $P<0.05$ 表示为差异显著。

2 结果

2.1 不同油源对大西洋鲑肝脏脂肪酸组成及脂类组成的影响

经过 5 个月饲喂, 饲料油源对肝脏脂肪酸组成的影响非常显著, 表现为植物油源组肝脏比鱼油组肝脏含有更低水平的 $n-3$ 脂肪酸以及饱和与单不饱和脂肪酸, 同时含有较高水平的 $n-6$ 脂肪酸, 这与植物油源组饲料比鱼油组饲料含更低水平 $n-3$ 系列脂肪

表 2 基因表达中的基因序列信息和引物设计
Tab. 2 The sequence information and primer-design in the relative gene expression.

基因 Gene	方向 Direction	序列 Sequence (5'-3')	扩增元大小 Amplicon size (bp)	序列号 Accession number	引物效率 Primer efficiency	退火温度 Annealing temperature
FATP	F	TGGGAGCTTGTGGGTTCAA	64	CA373015/ AF023258	2.17	58
	R	ACTTTCATGAGCGGATTGG				
FAT/CD36	F	TTTCCTGCTGCGCACCTT	70	gi:51949896	2.12	54
	R	GGTGCGGGTCATGAAGATT				
EF1- $\alpha\beta$	F	CACCACCGGCCATCTGATCTACAA	59	AF321836	2.01	60
	R	TCAGCAGCCTCCTTCTCGAACTTC				
β -actin	F	CCAAAGCCAACAGGGAGAAG	91	BG933897	1.99	60
	R	AGGGACAACACTGCCTGGAT				

酸、饱和与单不饱和脂肪酸以及含更高水平 n-6 脂肪酸一致(表 3)。此外,FO 及 VO 组肝脏的 n-3/n-6 比例也与该组鱼所喂饲料油源的 n-3/n-6 比例一致(表 3)。

由表可知,两组油源饲喂后,对大西洋鲑肝脏各类极性脂质含量、三酰甘油、胆固醇含量等大量成分均无显著影响,仅对脂类组成中的微量成分,如二酰甘油、游离脂肪酸等(0.3—1.1 mg/g)有显著影响,表现为 VO 组高于 FO 组。总体来看,大豆油与鱼油对鲑肝脏脂类含量影响较小。

2.2 油酸的吸收

FO 与 VO 组大西洋鲑肝细胞对油酸的吸收值分别为 (0.924 ± 0.258) 和 (0.888 ± 0.179) nmol/(h·million cells), 组间无显著差异($P=0.459$)(图 1)。

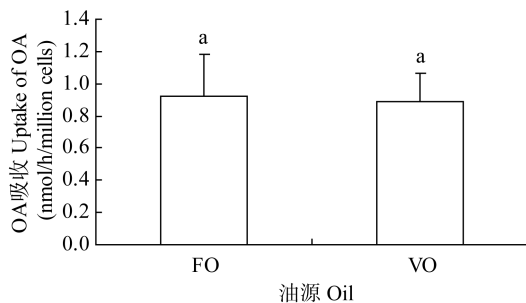


图 1 植物油替代鱼油对大西洋鲑肝细胞 OA 跨膜吸收的影响
Fig. 1 Effect of replacing dietary fish oil (FO) with vegetable oil (VO) on trans-membrane OA uptake in Atlantic salmon hepatocytes
图柱间字母相同为差异不显著($P>0.05$), 反之则为差异显著($P<0.05$)。下同

The column with same letters means no significant different, meanwhile the column with different letters means significantly different ($P<0.05$). The same applies below

2.3 协助脂肪酸跨膜吸收膜蛋白的基因表达量

FATP 是协助脂肪酸跨膜吸收的重要膜蛋白之一,其基因的表达量在 FO 与 VO 组间无显著差异($P>0.05$)(图 2A)。另一重要膜蛋白是 FAT/CD36,其组间基因表达量的差异也未达显著水平($P=0.0515$)(图 2B)。

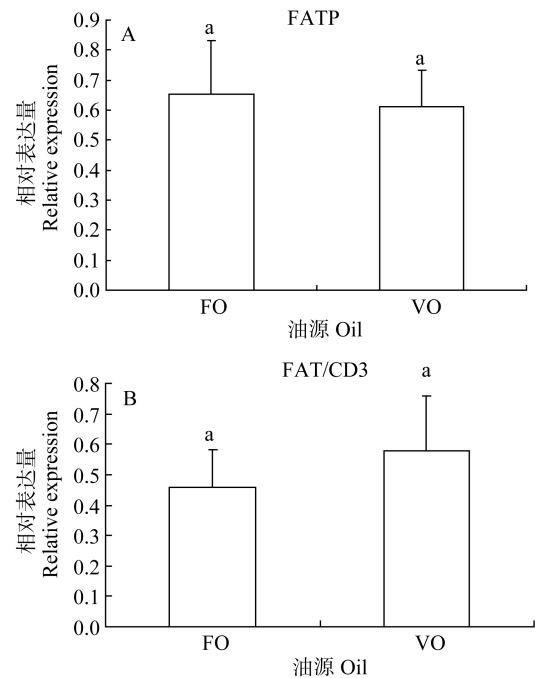


图 2 饲料油源对大西洋鲑肝细胞 FATP(A)和 FAT/CD36(B)基因表达的影响

Fig. 2 Relative gene expression of fatty acid transport protein (FATP, A) and fatty acid translocase (FAT/CD36, B) in hepatocytes of Atlantic salmon

数据表示为平均数±标准差 ($n=34$)

Data are means±SD ($n=34$)

3 讨论

饲喂 FO 和 VO 两组饲料的大西洋鲑肝脏脂肪酸组成在饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸、n-6 或 n-3 系列脂肪酸方面均有显著差异,且分别与所饲油源的脂肪酸组成相一致,这与以往对大西洋鲑^[22—24]、鼠脂肪细胞^[25]、虹鳟红细胞^[26, 27]等的研究结果一致,反映出动物机体组织和细胞的脂肪酸组成与所食油源脂肪酸组成保持高度一致的特性。以往试验^[28]及本次试验(图 1)也发现,大西洋鲑肝细胞对脂肪酸的跨膜吸收受到细胞膜蛋白抑制剂的抑制,反映出该

表 3 饲喂 5 个月后饲料和大西洋鲑肝脂肪酸(%)及脂类(mg/g hepatic tissue)组成

Tab. 3 Dietary and hepatic fatty acid composition (%) and lipid class composition (mg/g hepatic tissue) after 5 months of feeding and prior to hepatocyte isolation

	饲料 Diets		肝脏组织 Hepatic tissue	
	FO	VO	FO	VO
14:0	6.7	1.2	2.4±0.4	0.9±0.1*
16:0	12.4	11.8	16.3±0.0	13.7±0.7* ¹⁾
18:0	1.4	3.1	3.2±0.5	6.2±1.0*
Saturated	21.3	17.1	23.3±0.5	21.2±0.5*
18:1n-7	2	1.8	2.1±0.2	1.4±0.2
18:1n-9	10.6	19.5	9.0±1.6	13.5±1.3*
20:1n-9	12.5	2.3	4.6±0.4	1.8±0.4*
20:1n-11	1.5	0.2	0.8±0.1	0.1±0.1
22:1n-11	19.2	2.9	2.5±0.1	0.8±0.6*
Monoenes	53.9	28.3	24.2±1.4	19.8±2.4
18:2n-6	2.1	44.2	1.4±0.3	19.2±2.0*
20:2n-6	0.2	0	0.0±0.0	3.4±0.7*
20:3n-6	0	0	0.2±0.1	3.4±0.5*
20:4n-6	0.4	0.1	2.7±0.4	3.2±0.2*
Sum n-6	2.7	44.2	4.2±0.1	29.2±3.1*
18:3n-3	0.8	4.6	0.2±0.1	1.2±0.1*
18:4n-3	2.2	0.5	0.1±0.1	0.1±0.1
20:4n-3	0.5	0.1	0.9±0.1	0.6±0.1
20:5n-3	6.4	1.9	9.5±0.1	4.4±0.8*
22:5n-3	0.7	0.2	3.8±0.1	1.5±0.2*
22:6n-3	7.8	2.9	31.5±2.1	21.4±1.2*
Sum n-3	18.9	10.2	46.0±1.8	29.1±1.8*
n-3/n-6	7.1	0.2	11.1±0.3	1.0±0.2*
Total FA (mg/g)	217.0	217.6	26.1±0.3	33.2±4.3ns
SM ²⁾	1.4	1.2	2.1±0.3	2.4±0.2ns
PC	12.9	11.3	26.5±3.1	29.5±2.1ns
PS	nd ³⁾	nd	2.6±0.1	2.2±0.3ns
PI	nd	nd	3.5±0.5	3.9±0.4ns
PE	2.1	2	13.5±0.0	14.1±0.6ns
Total polar lipids	16.3	14.6	48.2±4.0	52.1±2.7ns
DAG	nd	nd	0.7±0.1	1.1±0.2*
CHOL	7.7	5.7	3.9±0.0	3.2±0.4ns
FFA	16.1	8.6	0.3±0.0	1.0±0.2*
TAG	204.6	248.2	3.2±1.8	9.0±3.0ns
Total neutral lipids	228.4	262.5	8.1±1.6	14.2±2.6*
Total lipids	244.8	277.1	56.3±5.6	66.4±2.8*

注: 数据表示为平均数±标准差。VO 组, $n=5$ 尾鱼; FO; $n=2$ 尾鱼;¹⁾ *显示 VO 和 FO 组间统计显著性差异, ns 表示通过 one-WAY ANOVA 分析无显著性差异;²⁾ SM: 鞘磷脂, PC: 磷脂酰胆碱, PS: 磷脂酰丝氨酸, PI: 磷脂酰肌醇, PE: 磷脂酰乙醇胺, DAG: 二酯酰甘油, CHOL: 胆固醇, FFA: 自由脂肪酸, TAG: 三酯酰甘油;³⁾ nd 表示未检测出

Note: Data are presented as mean ± S.D., VO; $n=5$ fish and FO; $n=2$ fish;¹⁾ *denotes statistical difference between hepatic tissue from VO and FO fed fish, ns denotes no statistical differences revealed by one-WAY ANOVA and significance was not tested where nothing is indicated;²⁾ SM: sphingomyeline, PC: phosphatidyl choline, PS: phosphatidyl serine, PI: phosphatidyl inositol, PE: phosphatidyl ethanolamine, DAG: diacylglycerol, CHOL: cholesterol, FFA: free fatty acids, TAG: triacylglycerol;³⁾ nd= not detected

吸收对膜蛋白的依赖性。然而与本研究小组的预设不同的是,虽然两组间大西洋鲑肝细胞膜的脂肪酸组成已受到所饲油源的改变,但两组细胞对油酸的吸收并没有出现明显差异($P>0.05$),显示出尽管细胞膜脂肪酸组成因饲料油源而有所改变,但膜结合蛋白的功能或活性等可能并未因此受到影响。

为进一步了解“油源-细胞膜-膜蛋白-脂肪酸吸收”这一过程中各环节间的关系,本试验测定了协助脂肪酸跨膜吸收的膜蛋白基因表达量。与脂肪酸跨膜吸收密切相关的膜蛋白包括 FAT/CD36、FATP 等,该类蛋白协助了细胞对长链脂肪酸的吸收^[29]。在纤维原细胞^[30]、内皮细胞^[31]和肌细胞^[32]的研究中已发现,增加 FAT/CD36 基因表达量能提高细胞对长链脂肪酸的吸收。本试验发现,在 FO 与 VO 两组油源饲喂下, FATP 和 FAT/CD36 两基因表达量在两组间均无显著差异($P>0.05$)。Torstensen, *et al.*^[4]在大西洋鲑的研究中也发现,在 100% FO 和 100% VO 饲喂下,肝脏和红肌的 FAT/CD36 和 FATP 基因表达在组间无显著差异。本试验 FO 与 VO 组 FATP 与 FAT/CD36 基因表达量的结果与其肝细胞对油酸吸收量无差异的结果一致,表明饲料油源对大西洋鲑肝细胞的脂肪酸跨膜吸收无显著影响,为大西洋鲑饲料中植物油替代鱼油的可行性提供了一定的理论依据。

在本试验中选择 OA 作为研究 LCFA 跨膜吸收的指示性脂肪酸,是由于这种脂肪酸在鱼油和植物油中均存在,是两类油脂共有的脂肪酸,也是 LCFA 中的典型脂肪酸。研究发现,在同种油源饲喂下大西洋鲑的肝细胞对不同 LCFA 的吸收仅有量的区别,表现为 $20:5n-3 \geq 22:6n-3 > 18:3n-3 = 18:2n-6 > 18:1n-9$ ^[28],而不同油源饲喂下鲑的肝细胞对不同脂肪酸的吸收没有显示互作效应^[33],表明细胞对不同脂肪酸的吸收相对独立且效果一致,因此在本文中细胞对油酸的跨膜吸收情况一定程度上可代表其他 LCFA 的吸收状况。

4 结论

植物油替代鱼油对大西洋鲑肝细胞跨膜吸收长链脂肪酸无显著影响,从跨膜吸收方面来看,大西洋鲑饲料中用植物油替代鱼油具有一定可行性。

致谢:

感谢挪威国家海产品营养研究所(the National Institute of Nutrition and Seafood Research, NIFES)的

Betty Irgens 女士和 Thu Thao Nguyen 女士在实验技术上的帮助。

参考文献:

- [1] DeGrella R F, Light R J. Uptake and metabolism of fatty acids by dispersed adult rat heart myocytes [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1980, **255**(20): 9739—9745
- [2] Schaffer J E, Lodish H F. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein [J]. *Cell*, 1994, **79**(3): 427—436
- [3] Abumrad N A, El-Maghrabi M R, Amri E Z, *et al.* Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36 [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, **268**(24): 17665—17668
- [4] Torstensen B E, Nanton D A, Olsvik P A, *et al.* Gene expression of fatty acid-binding proteins, fatty acid transport proteins (cd36 and FATP) and β -oxidation-related genes in (*Salmo salar* L.) fed fish oil or vegetable oil [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2009, **15**: 440—451
- [5] Chen W B, Liu L L, Li W S, *et al.* Analysis of expressed sequence tags from hepatopancreatic cDNA library of common carp (*Cyprinus carpio*) and characterization of LB-Fabp mRNA [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(3): 376—384 [陈文波, 刘黎黎, 李文笙, 等. 鲤鱼肝胰脏 cDNA 文库的表达序列标签分析及 Lb-Fabp mRNA 的特征. 水生生物学报, 2009, **33**(3): 376—384]
- [6] Lutz M, Aivarado J, Barraza P, *et al.* Effects of dietary oils and cholesterol supplement on fluidity and enzyme activities of liver microsomes in the rat [J]. *Lipids*, 1999, **34**(1): S 119
- [7] Yang X G, Sheng W, Sun G Y, *et al.* Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and α -secretase-dependent amyloid precursor protein processing [J]. *Neurochemistry International*, 2011, **58**(3): 321—329
- [8] Shaikh S R, Edidin M. Polyunsaturated fatty acids and membrane organization: elucidating mechanisms to balance immunotherapy and susceptibility to infection [J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2008, **153**(1): 24—33
- [9] Pepe S. Dietary polyunsaturated fatty acids and age-related membrane changes in the heart [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, **1114**: 381—388
- [10] Jensen M Ø, Mouritsen O G. Lipids do influence protein function—the hydrophobic matching hypothesis revisited [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, **1666**(1-2): 205—226
- [11] Van den Thillart G. Energy metabolism of swimming trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Lipids*, 1986, **156**(4): 511—520
- [12] Barlow S. Fishmeal and oil: sustainable feed ingredients for aquafeeds [J]. *Global Aquaculture Advocate*, 2000, **4**: 85—88
- [13] Bell J G, Douglas R, Tocher R, *et al.* Altered fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets

- containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet [J]. *Journal of Nutrition*, 2003, **133**(9): 2793—2801
- [14] Torstensen B E, Bell J G, Rosenlund G, *et al.* Tailoring of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) flesh lipid composition and sensory quality by replacing fish oil with a vegetable oil blend [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53**(26): 10166—10178
- [15] NRC. Nutrient Requirement of Fish [M]. Washington D.C.: The National Academy Press. 1993, p83—91
- [16] Folch J, Lees M, Sloane Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1957, **226**(1): 497—509
- [17] Lie Ø, Lambertsen G. Fatty acid composition of glycerophospholipids in seven tissues of cod (*Gadus morhua*), determined by combined high-performance liquid chromatography and gas chromatography [J]. *Journal of Chromatography*, 1991, **565**(1-2): 119—129
- [18] Bell J G, Dick J R, Mc Vicar, *et al.* Dietary sunflower, linseed and fish oils affect phospholipids fatty acid composition, development of cardiac lesions, phospholipase activity and eicosanoid production in Atlantic salmon [J]. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, 1993, **49**(3): 665—673
- [19] Vitiello F, Zanetta J P. Thin layer chromatography of phospholipids [J]. *Journal of Chromatography*, 1978, **166**(2): 637—640
- [20] Dannevig B H, Berg T. Endocytosis of galactose-terminated glycoproteins by isolated liver cells of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1985, **82**(4): 683—688
- [21] Tellmann G. The E-Method: a highly accurate technique for gene-expression analysis [J]. *Nature Methods*, 2006, **3**(7): 894. i-ii. doi:10.1038/nmeth
- [22] Torstensen B E, Frøyland L, Ørnsrud R, *et al.* Tailoring of a cardioprotective muscle fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed vegetable oils [J]. *Food Chemistry*, 2004, **87**(4): 567—580
- [23] Brodtkorb T, Rosenlund G, Lie Ø. Effects of dietary levels of 20:5n-3 and 22:6n-3 on tissue lipid composition in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*, with emphasis on brain and eye [J]. *Aquaculture Nutrition*, 1997, **3**: 175—187
- [24] Rollin X, Peng J, Pham D, *et al.* The effects of dietary lipid and strain difference on polyunsaturated fatty acid composition and conversion in anadromous and landlocked salmon (*Salmo salar* L.) parr [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2003, **134**(2): 349—366
- [25] Fickova M, Hubert P, Cremel G, *et al.* Dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids rapidly modify fatty acid composition and insulin effects in rat adipocytes [J]. *Journal of Nutrition*, 1998, **128**: 512—519
- [26] Leray C, Nonnotte G, Nonnotte L. The effect of dietary lipids on the trout erythrocyte membrane [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1986, **1**(1): 27—35
- [27] Di Costanzo G, Duportail G, Florentz A, *et al.* The brush border membrane of trout intestine: influence of its lipid composition on ion permeability, enzyme activity and membrane fluidity [J]. *Molecular Physiology*, 1983, **4**(5/6): 279—290
- [28] Zhou J S, Stubhaug I, Torstensen B E. Trans-membrane uptake and intracellular metabolism of fatty acids in Atlantic salmon (*Salmo Salar* L.) hepatocytes [J]. *Lipids*, 2010, **45**(4): 301—311
- [29] Bonen A, Chabowski A, Luiken J J F P, *et al.* Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence [J]. *Physiology*, 2007, **22**: 15—28
- [30] Ibrahimi A, Sfeir Z, Maghariaie H, *et al.* Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 1996, **93**(7): 2646—2651
- [31] Kerkhoff C, Sorg C, Tandon N N, *et al.* Interaction of S100A8/S100A9-arachidonic acid complexes with the scavenger receptor CD36 may facilitate fatty acid uptake by endothelial cells [J]. *Biochemistry*, 2001, **40**(1): 241—248
- [32] Garcia-Martinez C, Marotta M, Moore-Carrasco R, *et al.* Impact on fatty acid metabolism and differential localization of FATP1 and FAT/CD36 proteins delivered in cultured human muscle cells [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2005, **288**(6): C1264—C1272
- [33] Stubhaug I, Tocher D R, Bell J G, *et al.* Fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes and influence of dietary vegetable oil [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, **1734**(3): 277—288

OLEIC ACID TRANS-MEMBRANE UPTAKE IN HEPATOCYTES OF ATLANTIC SALMON (*SALMO SALAR* L.) AND EFFECT OF REPLACING DIETARY FISH OIL WITH VEGETABLE OIL

ZHOU Ji-Shu^{1, 2}, Bente E. Torstensen² and Ingunn Stubhaug^{2, 3}

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100 China; 2. National Institute of Nutrition and Seafood Research (NIFES), P.O.Box 2029, Nordnes, 5817 Bergen, Norway; 3. Skretting ARC, Stavanger, Norway)

Abstract: Taking [$1\text{-}^{14}\text{C}$] OA (oleic acid; 18:1n-9) as the indicator, the uptake of OA in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocyte with different membrane fatty acid composition induced by dietary fish oil (FO) and vegetable oil (VO) diets was determined to investigate the effect of replacing dietary fish oil with vegetable oil on fatty acid uptake and to provide the probability of replacing dietary fish oil with vegetable oil in Atlantic salmon diet. Atlantic salmon post smolt was fed diets containing either 100% FO or VO for 5 months to produce hepatocytes with typical FO and VO fatty acid composition, then OA uptake in isolated hepatocytes were studied by incubating with [$1\text{-}^{14}\text{C}$] OA and $37.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ OA ($1/30$, mol/mol, $0.3\text{ }\mu\text{Ci/flask}$) for 2h and by calculating the radioactivity in the cells. Meanwhile total RNA of the other same batch of FO and VO hepatocytes were extracted and the relative expression of FATP (fatty acid transport protein) and FAT/CD36 (fatty acid translocase) were determined by RT-PCR. The result showed that OA uptake in FO and VO was $(0.924\pm 0.258)\text{ nmol/(h}\cdot\text{million cells)}$ and $(0.888\pm 0.179)\text{ nmol/(h}\cdot\text{million cells)}$ respectively and there was no significant different between them ($P>0.05$). The relative expression of FATP and FAT/CD36 were not significantly different between FO and VO hepatocytes too. The results indicate that by the same OA uptake between FO and VO hepatocytes, replacing dietary FO with VO was available in Atlantic salmon diet.

Key words: Vegetable oil; Fish oil; Atlantic salmon; Hepatocyte; Fatty acid; Trans-membrane uptake