

doi: 10.7541/2022.2021.0275

## TGF- $\beta$ /Smads信号通路介导脯氨酸促进浅色黄姑鱼鱼鳔胶原蛋白沉积

荣 华<sup>1,2</sup> 李德强<sup>2</sup> 马敏伟<sup>2</sup> 豆腾飞<sup>2</sup> 史庆超<sup>3</sup> 孔令富<sup>2</sup> 毕保良<sup>2</sup> 宁丽军<sup>1</sup>

(1. 华南农业大学海洋学院, 广州 510642; 2. 云南农业大学动物科学技术学院, 昆明 650201; 3. 内江师范学院, 长江上游鱼类资源保护与利用四川省重点实验室, 内江 641112)

**摘要:** 为了进一步验证转化生长因子(TGF- $\beta$ )/Smads信号通路在脯氨酸(Pro)促进鱼鳔胶原蛋白沉积中的作用, 研究利用TGF- $\beta$ /Smads通路抑制剂干扰, 分析干扰前后鱼鳔中胶原蛋白含量及相关基因转录水平的变化。根据前期实验获得的Pro最佳添加量, 制定饲料配方, 饲喂浅色黄姑鱼1月后, 通过腹腔注射氧化苦参碱(Oxymatrine)为期1个月。在实验结束后, 测量各项指标, 评估干扰前后, Pro促进鱼鳔胶原蛋白沉积的效果及变化。实验结果表明: Pro能显著上调TGF- $\beta$ /Smads通路中相关基因的表达, 并促进鱼鳔胶原蛋白沉积, Oxymatrine干扰显著下调了TGF- $\beta$ /Smads通路中相关基因(*Colla1*、*Colla2*、TGF- $\beta$ 和*Smad2*)表达, 同时导致鱼鳔中胶原蛋白沉积下降。由此推断Pro通过激活TGF- $\beta$ /Smads通路促进鱼鳔中胶原蛋白沉积, 而Oxymatrine干扰抑制了TGF- $\beta$ /Smads通路, 导致*Smad2*与*Colla2*启动子结合受阻, 进而下调了*Colla2*基因的转录, 从而降低鱼鳔中胶原蛋白的沉积。综上所述, TGF- $\beta$ /Smads信号通路在Pro促进浅色黄姑鱼鱼鳔胶原蛋白沉积过程中起着重要调控作用, 其中*Colla1*、*Colla2*、TGF- $\beta$ 和*Smad2*扮演着重要角色, 研究结果可为鱼类胶原蛋白代谢的营养调控提供新思路和新方法。

**关键词:** 脯氨酸; TGF- $\beta$ /Smads信号通路; 鱼鳔; 胶原蛋白; 浅色黄姑鱼

中图分类号: Q344<sup>+</sup>.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2022)11-1649-09



氨基酸不仅是蛋白质合成的前体分子, 还可以作为信号分子介导一系列通路调控基因表达和蛋白质合成, 进而发挥生理功能, 如亮氨酸、精氨酸及谷氨酰胺等支链氨基酸可以作为信号分子激活mTOR、TGF- $\beta$ 和GCN2等通路<sup>[1,2]</sup>。脯氨酸(Pro)作为胶原蛋白合成的底物, 可以调控胶原蛋白代谢, 促进损伤组织的修复<sup>[3]</sup>。有研究表明, 在复杂的细胞代谢调节机制中, Pro参与调控基因表达、转录因子活化、细胞信号转导和氧化还原反应, 同时在鸟氨酸、精氨酸、多胺、谷氨酸代谢和胶原蛋白合成等方面发挥着重要作用, 且Pro的可用性决定了胶原蛋白生物合成的速率<sup>[4,5]</sup>。许多研究发现饲料中添加Pro能够促进鱼类胶原蛋白沉积<sup>[5-8]</sup>, 然而关于Pro促进鱼类胶原蛋白沉积的作用机制缺乏深入研究。有学者通过对人类I型胶原蛋白 $\alpha 2$ (*Colla2*)

基因启动子功能分析发现, 参与*Colla2*启动子内在活性上调的序列位于启动子-353和-186 bp之间, 这个区域包含多个转录因子的结合位点, 包括Smads、Sp1/3和Ets家族等<sup>[9]</sup>。转化生长因子(TGF- $\beta$ )/Smads信号通路是调控胶原蛋白代谢的经典途径之一, 主要参与细胞外基质胶原蛋白的沉积<sup>[10-12]</sup>。有学者在探讨“脆肉鲩”形成机制时发现, 蚕豆通过上调*Smad4*基因的表达来激活TGF- $\beta$ /Smads通路的活性, 进而上调*Colla1*和*Colla2*基因的表达, 最终促进肌肉中胶原蛋白沉积, 改善肌肉品质<sup>[13]</sup>。Pro促进鱼类胶原蛋白沉积是否也受TGF- $\beta$ /Smads信号通路的调控呢? 目前研究发现许多TGF- $\beta$ /Smads信号通路的干扰剂, 如积雪草皂苷(Asiaticoside)<sup>[14]</sup>、 $\beta$ -拉帕醌( $\beta$ -Lapachone)<sup>[15]</sup>和氧化苦参碱(Oxymatrine)<sup>[16,17]</sup>等可以作用于TGF- $\beta$ /Smads通路中特定配体, 使整

收稿日期: 2021-10-15; 修订日期: 2022-07-04

基金项目: 广东省基础与应用基础研究省市联合基金(2021A1515110179); 云南省基础研究计划面上项目(202201AT070251); 中国博士后科学基金项目(2022M711205)资助 [Supported by Guangdong Province Basic and Applied Basic Research Fund-Provincial and Municipal Joint Fund (2021A1515110179); Basic Research Program of Yunnan Province (202201AT070251); China Postdoctoral Science Foundation (2022M711205)]

作者简介: 荣华(1986—), 男, 实验师, 博士; 主要从事水产动物营养研究。E-mail: huarong@scau.edu.cn

通信作者: 宁丽军(1986—), 男, 讲师, 博士; 主要从事水产动物营养研究。E-mail: lijunning@scau.edu.cn

个信号通路效应发生变化,最终导致机体合成胶原蛋白的能力发生相应变化。Oxymatrine的分子式:  $C_{15}H_{24}N_2O_2$ , 是一种来自槐属植物根部的生物碱,具有抗炎、抗纤维化和抗肿瘤的作用,能抑制iNOS表达和TGF- $\beta$ /Smads信号通路,已在医学上被广泛应用于癌症药物的开发<sup>[18]</sup>。

浅色黄姑鱼(*Nibea coibor*)俗称白奈,隶属鲈形目,石首鱼科,黄姑鱼属,该鱼生长快、鱼鳔大、营养价值高,是我国东南沿海地区用于生产名贵鱼胶(白花胶,目前市场价格为10000—15000元/kg)的重要海水养殖品种<sup>[19]</sup>。鱼胶(鱼鳔的干制品)富含胶原蛋白,营养价值极高,与燕窝、鱼翅齐名,系“海洋八珍”之一,又有“海洋人参”之誉<sup>[20]</sup>。然而,目前关于鱼鳔胶原蛋白的研究鲜有报道,严重制约了鱼胶产业的快速发展和规模化进程。笔者前期研究发现Pro对浅色黄姑鱼鱼鳔中胶原蛋白沉积具有促进作用,并推测TGF- $\beta$ /Smads信号通路潜在参与Pro促进鱼鳔胶原蛋白沉积的调控<sup>[6, 7, 21]</sup>,然而以上推测还需进一步证实。因此,本研究在添加Pro后,利用Oxymatrine干扰TGF- $\beta$ /Smads信号通路,分析Pro添加/干扰前后,鱼鳔胶原蛋白沉积的变化情况,验证TGF- $\beta$ /Smads信号通路参与调控Pro促进浅色黄姑鱼鱼鳔胶原蛋白沉积。实验结果可以丰富鱼类胶原蛋白代谢研究的基础理论,为鱼类胶原蛋白代谢的营养调控提供新思路和新方法,对深度挖掘和高效利用海洋产胶鱼类鱼鳔资源具有重要的理论和现实意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 饲料配置

2组等氮等脂的实验饲料配制参考前期研究<sup>[6]</sup>,以鱼粉、混合氨基酸和结晶氨基酸为主要蛋白来源,鱼油为主要脂质来源。Blank组无额外添加Pro;Pro组添加15 g/kg Pro,用丙氨酸来平衡各实验饲料中的氮,参考美国国家科学研究委员会(NRC, 2011)中大黄鱼的营养需求设计其他营养成分的含量。实验饲料原料组成和营养成分如表1所示,饲料氨基酸组成如表2所示。饲料原料过60目筛,经充分彻底混合,用2.5 mm直径的膨化机制粒,在自然通风环境中风干。干颗粒饲料被密封在塑料袋里存储在-20℃,直到使用。

### 1.2 实验鱼及饲养管理

养殖实验在广东省汕头市南澳县汕头大学海洋生物临海实验站中进行。浅色黄姑鱼购自当地的一个苗种孵化场。在幼鱼购回后,暂养在一个大的浮动网箱(3 m×3 m×2 m,长×宽×深)2周,期间投

喂商业饲料(粗蛋白40.0%,粗脂肪10.0%,揭阳通威,中国)。实验前,鱼先禁食24h,同时用40 mg/L丁香酚溶液(阿拉丁试剂有限公司,中国)麻醉,称重并分组。225条实验鱼(11.621±0.154) g被随机分入9个网箱(1 m×1 m×1.5 m,长×宽×深),25尾鱼/网箱。

表1 实验饲料配方及近似成分

Tab. 1 Formulation and proximate composition of the experimental diets

| 原料组成<br>Ingredient composition (%)                    | 成分Diet |        |
|-------------------------------------------------------|--------|--------|
|                                                       | Blank  | Pro    |
| 鱼粉Fish meal <sup>1</sup>                              | 24.48  | 24.48  |
| 发酵豆粕 Fermented soybean meal                           | 9.8    | 9.8    |
| 大豆浓缩蛋白Soy protein concentrate                         | 14.2   | 14.2   |
| 鱼油Fish oil                                            | 9.6    | 9.6    |
| 木薯淀粉Starch                                            | 16.5   | 16.5   |
| $\alpha$ -淀粉 $\alpha$ -Starch                         | 4.4    | 4.4    |
| 混合晶体氨基酸Mixed crystalline amino acids <sup>2</sup>     | 12.8   | 12.8   |
| 氯化胆碱Choline chloride                                  | 1      | 1      |
| 微晶纤维素Cellulose microcrystalline                       | 1.29   | 1.29   |
| 磷酸二氢钙Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> | 1      | 1      |
| L-脯氨酸L-Proline                                        | 0      | 1.5    |
| 丙氨酸Alanine                                            | 2.93   | 1.43   |
| 矿物质预混料Mineral premix <sup>3</sup>                     | 1      | 1      |
| 维生素预混料Vitamin premix <sup>4</sup>                     | 1      | 1      |
| 合计 Sum                                                | 100    | 100    |
| 营养组成Proximate composition (%)                         |        |        |
| 水分Moisture                                            | 8.884  | 9.435  |
| 粗蛋白Crude protein                                      | 47.392 | 47.149 |
| 粗脂肪Crude lipid                                        | 10.153 | 10.263 |
| 粗灰分Crude ash                                          | 6.479  | 6.443  |

注: 1. 美国白鱼粉: 粗蛋白含量为64.7%, 粗脂肪含量为10%; 2. 混合晶体氨基酸(g/kg日粮): 甘氨酸, 96.09; 亮氨酸, 13.88; 异亮氨酸, 4.05; 蛋氨酸, 3.47; 精氨酸, 2.02; 苯丙氨酸, 2.24; 苏氨酸, 1.30; 赖氨酸, 4.92; 3. 矿物预混料(mg/kg日粮): NaF, 1; KI, 0.4; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 25; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 5; FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 40; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 25; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 30; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 600; Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1500; NaCl, 50; 沸石粉, 7725; 4. 维生素预混剂(mg/kg日粮): 维生素A, 32; 维生素B<sub>1</sub>, 25; 维生素B<sub>2</sub>, 45; 维生素B<sub>6</sub>, 20; 维生素B<sub>12</sub>, 0.1; 维生素C, 2000; 维生素D<sub>3</sub>, 5; 维生素E, 120; 维生素K<sub>3</sub>, 10; 肌醇, 800; 泛酸, 60; 烟酸, 200; 叶酸, 20; 生物素, 1.2; 乙氧喹, 150

Note: 1. The white fish meal of the United States: crude protein content of 64.7%, crude fat content of 10%; 2. Mixed crystalline amino acid (g/kg diet): Glycine, 96.09; Leucine, 13.88; Isoleucine, 4.05; Methionine, 3.47; Arginine, 2.02; Phenylalanine, 2.24; Threonine, 1.30; Lysine, 4.92; 3. Mineral premix (mg/kg diet): NaF, 1; KI, 0.4; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 25; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 5.0; FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 40; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 25; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 30; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 600; Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 1500; NaCl, 50; zeolite, 7725; 4. Vitamin premix (mg/kg diet): VA, 32; VB<sub>1</sub>, 25; VB<sub>2</sub>, 45; VB<sub>6</sub>, 20; VB<sub>12</sub>, 0.1; VC, 2000; VD<sub>3</sub>, 5; VE, 120; VK<sub>3</sub>, 10; inositol, 800; pantothenic acid, 60; niacin acid, 200; folic acid, 20; biotin, 1.2; ethoxyquin, 150

表 2 实验饲料的氨基酸组成

Tab. 2 Amino acid contents of experimental diets (μmol/g dry matter)

| 氨基酸谱<br>Amino acid profile | 组成Diet |        |
|----------------------------|--------|--------|
|                            | Blank  | Pro    |
| 必需氨基酸EAA                   |        |        |
| 精氨酸Arginine Arg            | 133.89 | 137.68 |
| 组氨酸Histidine His           | 37.42  | 37.79  |
| 缬氨酸Valine Val              | 217.83 | 216.16 |
| 苯丙氨酸Phenylalanine Phe      | 79.19  | 78.86  |
| 亮氨酸Leucine Leu             | 234.56 | 238.86 |
| 异亮氨酸Isoleucine Ile         | 99.33  | 100.93 |
| 半胱氨酸Cysteine Cys           | 10.67  | 10.59  |
| 苏氨酸Threonine Thr           | 133.27 | 133.97 |
| 蛋氨酸Methionine Met          | 48.51  | 48.01  |
| 赖氨酸Lysine Lys              | 212.88 | 205.28 |
| 非必需氨基酸NEAA                 |        |        |
| 天冬氨酸Aspartic Asp           | 289.20 | 290.50 |
| 丝氨酸Serine Ser              | 98.93  | 94.44  |
| 谷氨酸Glutamic Glu            | 279.09 | 275.34 |
| 丙氨酸Alanine Ala             | 489.73 | 354.36 |
| 甘氨酸Glycine Gly             | 509.95 | 506.30 |
| 酪氨酸Tyrosine Tyr            | 53.08  | 50.36  |
| 脯氨酸Proline Pro             | 70.94  | 181.98 |

3个网箱一组被随机分配到3个处理组(Blank、Pro和Oxymatrine), Blank为空白组, 饲喂Pro零添加饲料, Pro和Oxymatrine实验组饲喂Pro添加饲料。开展为期8周的养殖实验, 在第4周后开始干扰实验。Oxymatrine实验组采用腹腔注射氧化苦参碱(Oxymatrine)。Oxymatrine试剂购买于MedChem-Express(MCE)公司(中国, 上海), 粉末状的Oxymatrine在使用前用含DMSO的溶剂溶解, 然后用生理盐水按1:20比例稀释成注射液。一定浓度的DMSO对鱼体有毒副作用, 结合预实验结果: 实验鱼腹腔注射液体100 μL/次无死亡, 首先确定了Oxymatrine的稀释及注射方案如下: 在超声辅助下100 mg Oxymatrine溶于1 mL DMSO(100 mg/mL), 并按照上述方案稀释成注射液(终浓度5 mg/mL)。参考文献确定给药量为10 mg/kg<sup>[16, 17]</sup>, 当时鱼重约50 g, 所以按照100 μL/尾给药。为了消除注射应激和溶剂对鱼体基础代谢的影响, 减少实验系统误差, Blank和Pro实验组等量注射Oxymatrine的溶剂。在8周的饲养期内, 每天人工饱食投饵两次(07:00和16:30), 观察记录鱼的健康状况及环境变化等, 在实验过程中, 光照时间13—14h, 温度23—30℃, pH 7.8—8.1, 氨氮低于0.05 mg/L, 盐度31—33 g/L, 溶解氧5.2—6 mg/L。

1.3 样品采集

养殖实验结束后, 停食24h, 采用丁香酚(100 mg/L, 上海试剂, 中国)麻醉, 称重并计数, 计算鱼的生长和饲料利用率。每个网箱随机选取6尾实验鱼, 测量个体体重和体长, 计算肥满度和特定生长率等指标; 屠宰取鱼鳔称重, 计算鳔体比, 将鱼鳔置于-20℃用于后续胶原蛋白含量的测定。采集肝脏用于组织切片观察, 取出的肝脏(右侧)分成小块(1 cm×1 cm)固定于Bouin's 液中。此外, 另取4尾/网, 用于采集鱼鳔组织, 将样本分成两份, 一份置于-20℃用于后续氨基酸分析, 另一份快速收集好后立即浸入液氮, 随后储存在-80℃用于RNA的提取和基因表达分析。

1.4 肝脏组织形态学检测

肝脏组织形态学检测在武汉赛维尔生物科技有限公司协助下完成, 实验步骤简单介绍如下: 将新鲜的组织样品通过4%多聚甲醛固定24h; 用75%酒精-无水乙醇按梯度脱水6h; 使用二甲苯透明2次, 每次10min, 浸蜡3次, 每次1h; 包埋, 冷却; 切片, 切片厚度控制在5—6 μm; 烤干, HE染色, 脱水封片, 染色结果: 细胞核蓝色, 细胞质红色; 最后进行显微镜镜检, 利用Case Viewer软件进行图像采集分析。

1.5 氨基酸测定

饲料和鱼体组织氨基酸组成采用液相色谱-质谱联用仪TSQ-Endura(Thermo Scientific Dionex, USA), 根据国家标准方法(GB/T 18246-2000)进行测定, 用液相色谱质谱联用仪测的每种氨基酸的单一峰, 根据出峰时间和峰高计算出峰面积, 根据标准品氨基酸测得的标准曲线(浓度为横轴, 峰面积为纵轴), 计算出单一氨基酸在样品中的绝对浓度, 根据样品处理过程中的稀释倍数, 计算出干物质中氨基酸的含量, 由于色氨酸在酸水解后不能被检测到, 因此, 没有测定出色氨酸的数值。

1.6 胶原蛋白含量测定

Hyp含量测定采用试剂盒(Art. No. A030-2; 南京建成生物工程研究所, 南京, 中国)对样品进行处理。操作方法参考制造商的说明书, 使用Infinite® Pro 200酶标仪(Tecan, 瑞士)分析样品, 用酶标仪在550 nm波长下测定吸光度, Hyp浓度由标准品根据公式计算得到。胶原蛋白的含量由Hyp的含量乘以8估算得到(AOAC, 2002)。因为Hyp几乎只存在于胶原蛋白中, 而且因胶原蛋白结构的特殊性, Hyp含量在胶原蛋白中相对固定为12.5%。因此, 常用Hyp的含量来计算组织中胶原蛋白的含量。

1.7 基因表达分析

鱼鳔组织中总RNA提取根据TRIzol (Invitro-

gen™)试剂说明书使用氯仿-异丙醇法萃取,利用DNase I 消化去除污染基因组DNA (TaKaRa),通过1.2% (w/v)琼脂糖凝胶分析确定其完整性和质量,利用Nanodrop®ND-2000分光光度计(Thermo Scientific NanoDrop, USA)测定260/280 nm处的吸光度,从而确定RNA的最终浓度。RNA反向转录成cDNA使用TransScript® One-Step gDNA Removal和cDNA Synthesis Super-Mix Kit (Trans Gen生物技术, 北京)。简单介绍如下: 2 μg总RNA与1 μL Oligo (dT)<sub>18</sub>, 10 μL 2×TS反应混合液, 1 μL TransScript® RT/RI混合酶, 1 μL gDNA去除剂混合后补DEPC水至20 μL。在42℃下孵育15min, 然后加热到85℃, 5s灭活gDNA去除剂和TransScript® RT/RI酶。cDNA存储在-20℃, 直至使用。

利用Primer Premier 5.0软件(Premier Biosoft International, Palo Alto, USA)根据大黄鱼*Larimichthys crocea*、鳊*Siniperca chuatsi*和鲈*Micropterus salmoides*等的相关基因核心序列保守区设计该基因的特异性引物(表3), 引物均由华大基因(北京基因组研究所, 深圳)合成。采用应用生物系统Veriti™热循环仪(Thermo Fisher Scientific, USA)进行聚合酶链式反应(PCR), 扩增目的基因DNA片段。PCR片段在1.2% 琼脂糖凝胶电泳上检测, 确认产物大小与预期相符后, 将PCR产物送华大基因(北京基因组研究所、深圳)测序, 序列在NCBI上进行比对确认。

按如下体系配置20 μL的qRT-PCR反应混合液: 2 μL cDNA、7 μL DEPC水、10 μL SYBR Premix Ex Taq II (Takara)和1 μL 引物(管家基因或目标基因), 20 μL反应混合液在实时荧光定量PCR仪上运行(Roche Light Cycler® 480 System, 瑞士)。使用 $\Delta\Delta C_t$ 相对量化计算方法, 先使用管家基因( $\beta$ -actin)进行归一化处理, 3个样本, 每个样本一式3份被用来计算平均 $C_t$ ,  $\Delta C_t$ =目标基因 $C_t$ -管家基因 $C_t$ 。 $\Delta\Delta C_t$ =每个样本处理组 $\Delta C_t$ /控制组 $\Delta C_t$  (实验参考)。相对量化的表达式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示为目标基因处理组与控制组的相对表达量。基因表达绘图使用倍数变化(Fold change)法, 主要用了一个if函数, Fold change=IF(值>1; 值, -1/值), 将相对表达量换算成倍数变化。

### 1.8 计算与统计分析

特定生长率(Specific growth rate, %/d)=[Ln终末体重(g)-Ln初始体重(g)]/天数×100

饵料系数(Feed coefficient, FC)=采食量(g)/[终末体重(g)-初始体重(g)]

鱼鳔器官指数(Swim bladder somatic index, SB-

SI)=100×鱼鳔重(g)/鱼体重(g)

存活率(Survival rate, SR, %)=100×终末鱼数/初始鱼数

肥满度(Condition factor, CF, g/cm<sup>3</sup>)=100×鱼体重(g)/体长(cm)<sup>3</sup>

所有数据均采用SPSS 20.0程序(SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)进行单因素方差分析(One-way ANOVA, LSD), 并采用Tukey进行组间显著性检验。数据以“平均值±标准误”(mean±SE)呈现,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表3 胶原蛋白代谢相关基因的RT-PCR引物序列

Tab. 3 Sequences of real-time PCR primers for gene of collagen metabolism

| 基因<br>Gene          | 引物序列<br>Sequences of primers<br>(5'—3')                  | 退火温度<br>Annealing<br>temperature<br>(°C) | 扩增效率<br>PCR<br>efficiency<br>(%) | 登录号<br>Accession<br>number |
|---------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| <i>Coll1a1</i>      | AGACCTGCGTGA<br>CTCCCA<br>AGCCCTCGCTGC<br>CATACT         | 58                                       | 86                               | XM_0107<br>49494.3         |
| <i>Coll1a2</i>      | CAAGAACAGCGT<br>TGCCTACAT<br>ACGGAGAAGGTG<br>AAGCGG      | 59                                       | 92                               | XM_0192<br>62659.2         |
| <i>P4Ha1</i>        | GTGCTTGGCTCAC<br>TGGCTAC<br>CCACGTTGCTATG<br>CGATTG      | 58                                       | 96                               | XM_0192<br>69311.2         |
| <i>P4Ha2</i>        | ACCAAGTGTTC<br>CTCCAATGC<br>ATAGCCACAAGT<br>CGGCGTGT     | 60                                       | 94                               | XM_0192<br>64583.2         |
| <i>P4Ha3</i>        | CTGAGAATGAAG<br>GGACTTTGGA<br>CAAAACTCTTCC<br>ATTTCATCGG | 58                                       | 90                               | XM_0107<br>39670.3         |
| <i>TGF-β</i>        | AGAAACGAGCAG<br>AGGATTGAGC<br>CTGAAAGTGTTG<br>CAGGGACAA  | 56                                       | 91                               | XM_0107<br>52699.3         |
| <i>TGF-β<br/>RT</i> | TCAAGCGAGCCG<br>ACATCTAT<br>CTCTGCCAGCGG<br>TTAGGAAT     | 59                                       | 89                               | XM_0272<br>74176.1         |
| <i>Smad7</i>        | GCTGAAAATCGG<br>ACACGG<br>CGGAGCCTATGA<br>TAATGAAT       | 58                                       | 93                               | XM_0107<br>42557.3         |
| <i>Smad2</i>        | CAGTCGGTCAAT<br>CAGGGGTT<br>CATCTGGGTCAG<br>CACCTTATCC   | 58                                       | 92                               | XM_0192<br>71769.2         |
| <i>Smad3</i>        | TGCTCCAGTGTGT<br>CGTAGG<br>AGTCCTAAAAAC<br>GACCATCAA     | 55                                       | 93                               | XM_0107<br>35124.3         |
| <i>Smad4</i>        | CAGTGGCCGGGA<br>ACATTC<br>CAGCAGGGCGTC<br>TCTTTGA        | 59                                       | 95                               | HQ59621<br>3.1             |
| <i>β-actin</i>      | GGTTACTCCTTCA<br>CCACCACAG<br>TCCGTCGGGCAG<br>CTCATA     | 58                                       | 100                              | GU58418<br>9.1             |

## 2 结果

### 2.1 添加Pro及注射Oxymatrine对浅色黄姑鱼生长性能的影响

如表 4 所示, 特定生长率(SGR)、饵料系数(FC)、肥满度(CF)、鳔体比(SBSI)及存活率(SR)各项指标在Blank组、Pro组和Oxymatrine组间均无显著差异( $P>0.05$ )。且各组存活率均 $\geq 90\%$ , 由此可以看出实验鱼能很好的适应实验条件, 且干扰剂注射没有对鱼体健康造成重大影响。

### 2.2 添加Pro及注射Oxymatrine对浅色黄姑鱼鱼鳔胶原蛋白沉积的影响

如图 1 所示, Pro组显著高于Blank组和Oxymatrine组( $P<0.05$ ), 说明饲料中添加Pro促进了鱼鳔中胶原蛋白的沉积, 而腹腔注射干扰剂可以抑制胶原蛋白的沉积。

### 2.3 添加Pro及注射Oxymatrine对浅色黄姑鱼鱼鳔中氨基酸组成的影响

如表 5 所示, 在鱼鳔中, 有 11 种氨基酸(Pro、Glu、Gly、Ala、Thr、Tyr、Met、Leu、Ser、Lys和Asp)受影响( $P<0.05$ ), 剩余氨基酸水平相对稳定。通过多重比较分析Pro添加或注射干扰剂Oxymatrine对氨基酸代谢的影响, 如Pro和Oxymatrine组与Blank组比较发现, 添加Pro导致浅色黄姑鱼鱼鳔中一些氨基酸含量升高, 如Pro、Glu、Asp、Met和Ser; 同时也会导致Tyr、Ala和Thr含量降低。通过Oxymatrine组与Pro组比较发现, 注射干扰剂Oxymatrine会导致Glu和Ala含量升高, 同时导致Leu、Lys和Gly含量降低。

### 2.4 Oxymatrine腹腔注射对浅色黄姑鱼肝脏组织结构的影响

干扰剂Oxymatrine的溶剂中含有DMSO等有害成分, 可能会对鱼体健康造成危害, 实验中需要分析这种潜在危害程度。因此, 我们进行了肝脏组织

表 4 饲料中添加Pro并用Oxymatrine干扰对浅色黄姑鱼生长性能比较分析

Tab. 4 The effect of inhibitors on growth performance of *N. coibor* fed diets with Pro of optimal level

| 生长性能Growth performance     | 实验处理Experimental treatment |                   |                   |
|----------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|
|                            | Blank                      | Pro               | Oxymatrine        |
| 存活率SR (%)                  | 93.33 $\pm$ 1.333          | 97.33 $\pm$ 1.333 | 96.00 $\pm$ 2.309 |
| 特定生长率SGR (%/d)             | 1.40 $\pm$ 0.108           | 1.56 $\pm$ 0.078  | 1.55 $\pm$ 0.058  |
| 饵料系数FC                     | 1.95 $\pm$ 0.158           | 1.93 $\pm$ 0.043  | 1.88 $\pm$ 0.033  |
| 鳔体比SBSI                    | 0.47 $\pm$ 0.058           | 0.46 $\pm$ 0.015  | 0.41 $\pm$ 0.009  |
| 肥满度CF (g/cm <sup>3</sup> ) | 2.10 $\pm$ 0.116           | 2.21 $\pm$ 0.031  | 2.06 $\pm$ 0.046  |

注: 数据为平均值 $\pm$ 标准误( $n=3$ )

Note: Values represent mean $\pm$ SE ( $n=3$ )

切片分析, 通过形态学观察发现各实验组肝脏组织结构完整, 细胞排列紧密, 胞质界限分明且细胞数

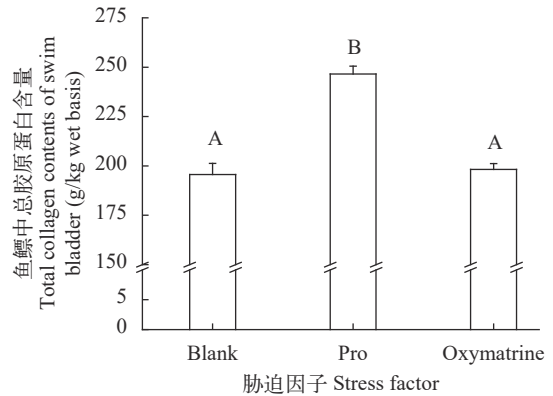


图 1 饲料中添加Pro及Oxymatrine干扰对浅色黄姑鱼鱼鳔胶原蛋白含量(g/kg湿重)的影响

Fig. 1 The effect of adding Pro in feed and Oxymatrine interference on the collagen content (g/kg wet matter) in swim bladder of *N. coibor*

上标中不同字母表示处理组间存在显著差异( $P<0.05$ ;  $n=3$ )

The absence of identical letters in the superscript indicate significant differences among the groups ( $P<0.05$ ;  $n=3$ )

表 5 饲料中添加Pro并用Oxymatrine干扰对浅色黄姑鱼鱼鳔氨基酸组成的影响

Tab. 5 The effect of inhibitors on collagen in swim bladder of *N. coibor* fed diets with Pro of optimal level (10  $\mu$ mol/g dry matter)

| 氨基酸谱Amino acid profile | 实验处理Experimental treatment       |                                 |                                 |
|------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                        | Blank                            | Pro                             | Oxymatrine                      |
| 脯氨酸Proline             | 49.49 $\pm$ 2.895 <sup>a</sup>   | 80.95 $\pm$ 1.706 <sup>b</sup>  | 78.65 $\pm$ 2.487 <sup>b</sup>  |
| 异亮氨酸Isoleucine         | 8.18 $\pm$ 0.359                 | 8.12 $\pm$ 0.303                | 8.85 $\pm$ 0.349                |
| 谷氨酸Glutamic            | 42.17 $\pm$ 0.914 <sup>a</sup>   | 47.31 $\pm$ 1.162 <sup>b</sup>  | 51.61 $\pm$ 2.276 <sup>c</sup>  |
| 酪氨酸Tyrosine            | 5.77 $\pm$ 0.226 <sup>a</sup>    | 4.48 $\pm$ 0.330 <sup>b</sup>   | 4.34 $\pm$ 0.166 <sup>b</sup>   |
| 缬氨酸Valine              | 17.43 $\pm$ 0.667                | 18.37 $\pm$ 0.858               | 19.25 $\pm$ 0.376               |
| 半胱氨酸Cysteine           | 0.65 $\pm$ 0.026                 | 0.78 $\pm$ 0.031                | 0.71 $\pm$ 0.019                |
| 天冬氨酸Aspartic           | 28.49 $\pm$ 0.204 <sup>a</sup>   | 30.85 $\pm$ 1.409 <sup>ab</sup> | 31.14 $\pm$ 0.571 <sup>b</sup>  |
| 丙氨酸Alanine             | 85.12 $\pm$ 0.360 <sup>c</sup>   | 62.31 $\pm$ 2.390 <sup>a</sup>  | 78.59 $\pm$ 1.206 <sup>b</sup>  |
| 蛋氨酸Methionine          | 6.22 $\pm$ 0.230 <sup>a</sup>    | 7.95 $\pm$ 0.056 <sup>b</sup>   | 7.66 $\pm$ 0.337 <sup>b</sup>   |
| 苏氨酸Threonine           | 18.28 $\pm$ 0.083 <sup>b</sup>   | 15.56 $\pm$ 0.046 <sup>a</sup>  | 14.96 $\pm$ 0.086 <sup>a</sup>  |
| 丝氨酸Serine              | 15.77 $\pm$ 0.323 <sup>a</sup>   | 17.16 $\pm$ 0.293 <sup>b</sup>  | 16.97 $\pm$ 0.071 <sup>b</sup>  |
| 亮氨酸Leucine             | 18.87 $\pm$ 0.882 <sup>b</sup>   | 19.19 $\pm$ 1.498 <sup>b</sup>  | 15.68 $\pm$ 1.316 <sup>a</sup>  |
| 赖氨酸Lysine              | 20.25 $\pm$ 1.271 <sup>ab</sup>  | 20.46 $\pm$ 0.760 <sup>b</sup>  | 18.79 $\pm$ 0.680 <sup>a</sup>  |
| 精氨酸Arginine            | 33.16 $\pm$ 1.156                | 34.33 $\pm$ 2.475               | 35.85 $\pm$ 0.953               |
| 组氨酸Histidine           | 4.19 $\pm$ 0.127                 | 4.55 $\pm$ 0.269                | 4.60 $\pm$ 0.090                |
| 苯丙氨酸Phenylalanine      | 10.28 $\pm$ 0.836                | 10.63 $\pm$ 0.509               | 10.83 $\pm$ 0.323               |
| 甘氨酸Glycine             | 188.59 $\pm$ 4.981 <sup>ab</sup> | 217.25 $\pm$ 4.068 <sup>b</sup> | 182.73 $\pm$ 3.739 <sup>a</sup> |

注: 数据为平均值 $\pm$ 标准误( $n=3$ ); 在同一行数据的上标中, 不同的小写字母表示处理组间存在显著差异( $P<0.05$ )

Note: Values represent mean $\pm$ SE ( $n=3$ ). Different lowercase letters in superscript of the same row indicate significant differences among the groups ( $P<0.05$ )

量较多,无病理性现象(图2)。

## 2.5 Oxymatrine干扰对浅色黄姑鱼鱼鳔胶原蛋白代谢相关基因表达的影响

如图3所示, *Colla1*、*Colla2*、*P4Ha(I)*、*TGF-β*和*Smad2*基因相对表达量在Pro组中均显著高于Blank组( $P<0.05$ ),说明饲料中添加Pro,上调了这些基因的表达。同时, Oxymatrine组与Pro组比较发现,这些基因也存在显著差异,说明Oxymatrine干扰导致这些基因显著下调。除此以外,浅色黄姑鱼鱼鳔中P4Ha(II)、P4Ha(III)、*TGF-βRT*、*Smad3*、*Smad4*和*Smad7*基因的表达相对稳定,均不受干扰和Pro添加的影响( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

鉴于Pro作为胶原蛋白合成的必需底物,许多研究发现饲料中添加Pro对胶原蛋白沉积具有一定影响<sup>[3-8]</sup>,然而,至今关于Pro促进胶原蛋白代谢的作用机制研究鲜有报道。作者前期开展了一系列相关研

究,发现饲料中添加Pro显著增加了黄姑鱼鱼鳔中胶原蛋白含量<sup>[6]</sup>。深入研究发现,Pro添加上调了鱼鳔细胞中胶原蛋白基因(*Colla1*和*Colla2*)的表达,同时被上调的还有*TGF-βRT*和*Smad2*等基因<sup>[7]</sup>。*TGF-β/Smads*信号通路是调控基质胶原蛋白代谢的经典途径<sup>[22-25]</sup>。进一步对*TGF-β/Smads*通路中相关基因及*Colla1*和*Colla2*基因表达、鱼鳔中胶原蛋白含量与Pro的添加水平展开聚类和相关分析,发现Pro促进双棘黄姑鱼鱼鳔胶原蛋白沉积潜在受到*TGF-β/Smads*信号通路的调控<sup>[7]</sup>;为了进一步验证*TGF-β/Smads*信号通路在调控Pro促进浅色黄姑鱼鱼鳔胶原蛋白沉积的重要作用,本研究在饲料中添加Pro和注射*TGF-β/Smads*通路抑制剂Oxymatrine,分析添加或干扰前后,浅色黄姑鱼生长、鱼鳔中氨基酸及胶原蛋白含量的变化。Pro的添加和抑制剂干扰对浅色黄姑鱼的生长没有显著影响,但能导致鱼鳔部分氨基酸及胶原蛋白含量发生显著变化。其中Pro、Glu、Gly、Ala、Thr、Tyr、Met、Leu、Ser、Lys

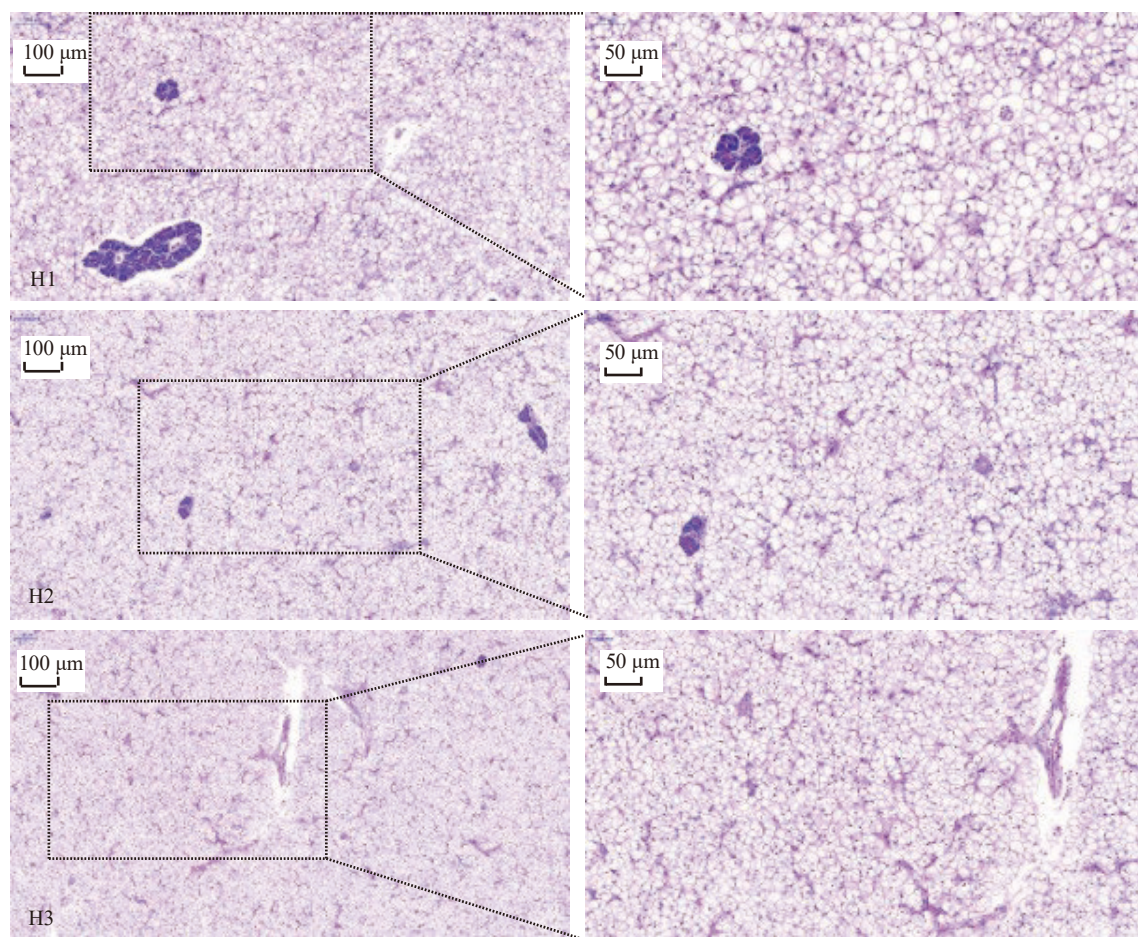


图2 Oxymatrine干扰对浅色黄姑鱼肝脏组织结构的影响

Fig. 2 Effect of Oxymatrine interference on the liver tissue structure of *N. coibor*

H1、H2和H4分别为Blank组、Pro组和Oxymatrine组的浅色黄姑鱼肝脏组织结构图

H1, H2 and H4 have shown the liver organization structure of *N. coibor* in the Blank group, Pro group and Oxymatrine group, respectively

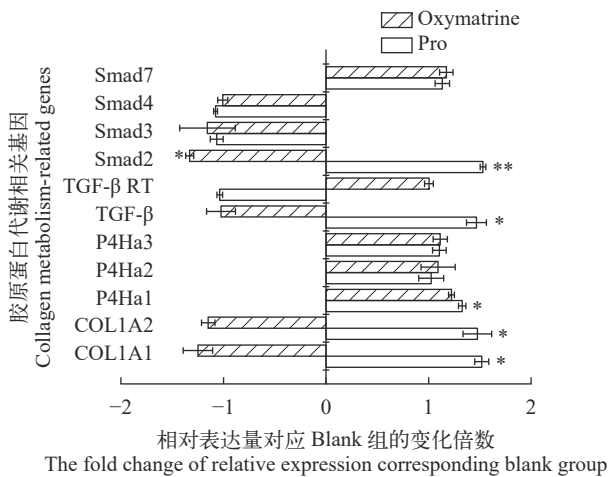


图3 与空白对照组相比, Pro添加组和Oxymatrine干扰组胶原蛋白代谢相关基因表达的变化情况

Fig. 3 Compared with the blank control group, ratio changes of collagen metabolism related genes expression in Pro added and Oxymatrine interference groups

以对照组为基线, X轴上的数值大于0表示与对照组相比表达上调, 具体数值代表上调的倍数。相反小于0表示表达下调, 具体数值的绝对值代表下调的倍数; “\*”个数不同代表了相应处理组间具有显著差异( $P < 0.05$ ;  $n = 3$ )

Taking the control group as the baseline, a value greater than 0 on the X-axis indicates that the expression is up-regulated compared with the control group, and the specific value represents the fold of the up-regulation. On the contrary, less than 0 means down-regulation, and the absolute value of the specific value represents the fold of down-regulation; The different number of “\*” represents a significant difference between the corresponding treatment groups ( $P < 0.05$ ;  $n = 3$ )

和Asp受到Pro添加或干扰的显著影响。Li等<sup>[26]</sup>报道了机体氨基酸组成受到饲料AA组成的影响, 可能因为这些氨基酸的代谢与Pro的代谢途径有共通之处。例如, Pro在一些哺乳动物的小肠合成Glu, Pro、Hyp、Arg和鸟氨酸影响彼此的新陈代谢<sup>[4]</sup>。AA之间存在着非常复杂的相互关系, 本研究也仅为复杂的AA代谢及其相互作用提供简单依据。另外, 鱼鳔中Pro含量与饲料中Pro添加水平一致, 而鱼鳔中胶原蛋白含量与之恰好相反, 受Oxymatrine干扰的显著影响, 说明Pro虽然是胶原蛋白合成的重要底物, 但Pro并不是胶原蛋白含量的有效“指示剂”。这也符合Li等<sup>[4]</sup>的研究报道, 自然界中不存在(或存在极少)游离的Hyp, Hyp只存在于胶原蛋白中, 所以常用Hyp, 而不是Pro含量来计算胶原蛋白含量。Oxymatrine干扰还引起了鱼鳔中一些非必需氨基酸AA含量的变化, 主要有Gly、Glu及Ala, 间接反映了Oxymatrine干扰没有导致生长受影响, 因为均衡的必需氨基酸组成是动物生长和维持机体氮平衡的重要反馈。分析肝脏组织形态是了解机体健康情况的

一个重要手段。机体对药物的耐受力有限, 过度的给药会导致机体肝肾代谢负担过重, 长期给药会导致组织受损, 危及动物健康。本研究通过肝脏形态学检测, 观察注射干扰剂对浅色黄姑鱼健康的影响。结果显示各实验组中的肝脏切片细胞界限较为明显, 细胞核清晰可见, 无细胞核朝质膜移位等肝脏病变现象。结合实验中生长数据及死亡率分析, 说明我们给药量和频率是实验鱼可承受的, 实验结果可为其他鱼类相关实验提供科学借鉴。

值得注意的是, Pro对浅色黄姑鱼鱼鳔胶原蛋白沉积具有显著的促进作用, 而Oxymatrine干扰对浅色黄姑鱼鱼鳔中胶原蛋白沉积表现出显著的抑制效果。许多研究都发现了Oxymatrine具有抑制胶原蛋白合成的作用<sup>[16-18]</sup>, 特别是Oxymatrine可以通过抑制TGF- $\beta$ /Smads途径, 减轻不同组织损伤修复过程中的纤维化<sup>[18]</sup>。本研究随后对TGF- $\beta$ /Smads通路中相关基因进行表达量分析, 发现Pro显著上调了*Colla1*、*Colla2*、*P4Ha1*和TGF- $\beta$ 基因的表达, 说明Pro促进胶原蛋白沉积, 可能是通过调控这些基因的转录来实现的, 特别是I型胶原蛋白基因*Colla1*和*Colla2*显著受到Pro的影响。另一方面, 通过Oxymatrine干扰, 显著降低了Pro介导的浅色黄姑鱼鱼鳔中*Colla1*、*Colla2*、TGF- $\beta$ 和Smad2基因的表达, 胶原蛋白的沉积也随着显著下调。有研究表明TGF- $\beta$ 在促胶原发生过程中是关键信号启动并通过TGF- $\beta$ RT受体(TGF- $\beta$ RTI、TGF- $\beta$ RTII和TGF- $\beta$ RTIII)将信号传递给Smads, 激活通路促进蛋白的合成<sup>[27, 28]</sup>, 其中, 一类正调控的Smads蛋白(R-Smads), 即Smad2和Smad3, 在激活目标基因*Colla2*的表达上尤为重要<sup>[29]</sup>。Wu等<sup>[30]</sup>的研究结果也发现, Oxymatrine能有效抑制TGF- $\beta$ 1、Smad3和CBP基因的表达, 同时促进肝脏中Smad7的表达。综上所述, Pro可能通过激活TGF- $\beta$ 信号, 将信号传递给胞质中Smad2/3, 进而激活了*Colla2*基因的瞬时过表达, 最后导致鱼鳔中胶原蛋白的沉积增加。通过Oxymatrine干扰, 特异性抑制了Smad2/3, 使得Smad3和Smad2结合下降, 导致传递到细胞核内的信号减弱, 下调了*Colla2*基因的转录, 最后抑制了浅色黄姑鱼鱼鳔中胶原蛋白合成。

综上所述, 饲料中添加Pro和注射抑制剂Oxymatrine对浅色黄姑鱼的生长影响不显著, 但能显著影响鱼鳔中胶原蛋白的沉积。具体表现为Pro显著上调了*Colla1*、*Colla2*、*P4Ha1*和TGF- $\beta$ 基因的表达, 同时促进了鱼鳔中胶原蛋白沉积; 而Oxymatrine干扰显著抑制了TGF- $\beta$ /Smads通路中*Colla1*、*Colla2*、Smad2和TGF- $\beta$ 基因的表达, 且

鱼鳔中胶原蛋白含量也随之降低。因此,可以证实Pro促进浅色黄姑鱼鱼鳔胶原蛋白沉积受到TGF- $\beta$ /Smads信号通路的调控,且*Colla1*、*Colla2*、TGF- $\beta$ 和*Smad2*基因在其中起着重要作用。

## 致谢:

感谢汕头大学理学院海洋生物研究所为本实验提供实验场所,温小波教授和林帆博士对文稿所提的宝贵意见。

## 参考文献:

- [1] Kimball S R, Jefferson L S. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis [J]. *The Journal of Nutrition*, 2006, **136**(1): 227S-231S.
- [2] Meurer S K, Lahme B, Tihaa L, et al. N-Acetyl-L-cysteine suppresses TGF- $\beta$  signaling at distinct molecular steps: the biochemical and biological efficacy of a multifunctional, antifibrotic drug [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2005, **70**(7): 1026-1034.
- [3] Albaugh V L, Mukherjee K, Barbul A. Proline precursors and collagen synthesis: biochemical challenges of nutrient supplementation and wound healing [J]. *The Journal of Nutrition*, 2017, **147**(11): 2011-2017.
- [4] Li P, Wu G. Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth [J]. *Amino Acids*, 2018, **50**(1): 29-38.
- [5] Karna E, Szoka L, Huynh T Y L, et al. Proline-dependent regulation of collagen metabolism [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020, **77**(10): 1911-1918.
- [6] Lin F, Rong H, Lin J, et al. Enhancement of collagen deposition in swim bladder of Chu's croaker (*Nibea coibor*) by proline: view from in-vitro and in-vivo study [J]. *Aquaculture*, 2020, **523**: 735175.
- [7] Rong H, Lin F, Limbu S M, et al. Effects of dietary proline on swim bladder collagen synthesis and its possible regulation by the TGF- $\beta$ /Smad pathway in spotted drum, *Nibea diacanthus* [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2020, **26**(5): 1792-1805.
- [8] Rong H, Wang Z Y, Hao T T, et al. Research progress of glycine, proline and hydroxyproline mediated collagen metabolism [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2021, **49**(11): 53-61. [荣华, 王正阳, 郝亭亭, 等. 甘氨酸、脯氨酸及羟脯氨酸介导胶原蛋白代谢研究进展 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2021, **49**(11): 53-61.]
- [9] Jinnin M. Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis [J]. *The Journal of Dermatology*, 2010, **37**(1): 11-25.
- [10] Li Q N, Hong L. Research progress on signaling pathways of collagen metabolism [J]. *China Medical Herald*, 2017, **14**(10): 56-59. [李倩男, 洪莉. 胶原代谢相关信号通路研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2017, **14**(10): 56-59.]
- [11] Ma Y, Zou H, Zhu X X, et al. Transforming growth factor  $\beta$ : a potential biomarker and therapeutic target of ventricular remodeling [J]. *Oncotarget*, 2017, **8**(32): 53780-53790.
- [12] Hirose T, Nakazato K, Song H, et al. TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$  are involved in the transcription of type I collagen  $\alpha$ 2 gene in soleus muscle atrophied by mechanical unloading [J]. *Journal of Applied Physiology*, 2008, **104**(1): 170-177.
- [13] Yu E M, Ma L L, Ji H, et al. Smad4-dependent regulation of type I collagen expression in the muscle of grass carp fed with faba bean [J]. *Gene*, 2019(685): 32-41.
- [14] Tang B, Zhu B, Liang Y, et al. Asiaticoside suppresses collagen expression and TGF- $\beta$ /smad signaling through inducing Smad7 and inhibiting TGF- $\beta$ R I and TGF- $\beta$ R II in keloid fibroblasts [J]. *Archives of Dermatological Research*, 2011, **303**(8): 563-572.
- [15] Park S H, Jeong S H, Kim S W.  $\beta$ -lapachone regulates the transforming growth factor- $\beta$ -smad signaling pathway associated with collagen biosynthesis in human dermal fibroblasts [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2016, **39**(4): 524-531.
- [16] Huang M, Hu Y Y, Dong X Q, et al. The protective role of oxymatrine on neuronal cell apoptosis in the hemorrhagic rat brain [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012, **143**(1): 228-235.
- [17] Sun H L, Li L, Shang L, et al. Cardioprotective effects and underlying mechanisms of oxymatrine against ischemic myocardial injuries of rats [J]. *Phytotherapy Research*, 2008, **22**(7): 985-989.
- [18] Chai N L, Fu Q, Shi H, et al. Oxymatrine liposome attenuates hepatic fibrosis via targeting hepatic stellate cells [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2012, **18**(31): 4199-4206.
- [19] Gu Q H, Luo Z P, Wu P P, et al. Experiment on pond culture of *Nibea coibor* [J]. *China Fisheries*, 2011(8): 27-29. [古群红, 罗志平, 吴飘飘, 等. 浅色黄姑鱼的池塘养殖试验 [J]. *中国水产*, 2011(8): 27-29.]
- [20] Wen J, Zeng L, Chen Z, et al. Comparison of nutritional quality in fish maw product of croaker *Protonibea diacanthus* and perch *Lates niloticus* [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2016, **15**(4): 726-730.
- [21] Rong H, Lin F, Zhang Y, et al. Effects of dietary proline on growth, physiology, biochemistry and TOR pathway-related gene expression in juvenile spotted drum *Nibea diacanthus* [J]. *Fisheries Science*, 2020, **86**(3): 495-506.
- [22] Zhao D, Shi Y, Dang Y, et al. Daidzein stimulates collagen synthesis by activating the TGF- $\beta$ /smad signal pathway [J]. *The Australasian Journal of Dermatology*, 2015, **56**(1): e7-e14.
- [23] Xu F, Liu C, Zhou D, et al. TGF- $\beta$ /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis [J]. *The Journal of Histo-*

- chemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 2016, **64**(3): 157-167.
- [24] Massagué J. TGF- $\beta$  signal transduction [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1998, **67**: 753-791.
- [25] Frick C L, Yarka C, Nunns H, *et al.* Sensing relative signal in the Tgf- $\beta$ /Smad pathway [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, **114**(14): E2975-E2982.
- [26] Li X, Rezaei R, Li P, *et al.* Composition of amino acids in feed ingredients for animal diets [J]. *Amino Acids*, 2011, **40**(4): 1159-1168.
- [27] Wicks S J, Grocott T, Haros K, *et al.* Reversible ubiquitination regulates the Smad/TGF-beta signalling pathway [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2006, **34**(Pt 5): 761-763.
- [28] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling [J]. *Nature*, 2003, **425**(6958): 577-584.
- [29] Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors [J]. *Genes & Development*, 2005, **19**(23): 2783-2810.
- [30] Wu C, Huang W, Guo Y, *et al.* Oxymatrine inhibits the proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, **11**(6): 4129-4134.

## TGF-B/SMADS SIGNALING PATHWAY REGULATES PRO TO PROMOTE COLLAGEN DEPOSITION IN THE SWIM BLADDER OF CHU'S CROAKER (*NIBEIA COIBOR*)

RONG Hua<sup>1,2</sup>, LI De-Qiang<sup>2</sup>, MA Min-Wei<sup>2</sup>, DOU Teng-Fei<sup>2</sup>, SHI Qing-Chao<sup>3</sup>, KONG Ling-Fu<sup>2</sup>,  
BI Bao-Liang<sup>2</sup> and NING Li-Jun<sup>1</sup>

(1. College of Marine Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. Key Laboratory of Sichuan Province for Fishes Conservation and Utilization in the Upper Reaches of the Yangtze River, Neijiang Normal University, Neijiang 677000, China)

**Abstract:** Swim bladder is an ideal optional source for collagen production and has long been considered as a traditional tonic in China. Therefore, strategies are required improve collagen content in the swim bladder for producing products with high nutrition and economic value. Proline (Pro) is the main proteinogenic amino acid needed for collagen production. Our previous study found that Pro can promote collagen deposition in the swim bladder of Chu's croaker (*Nibea coibor*), and it is potentially regulated by TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway. In order to further verify the role of TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway in Pro promoting collagen deposition in swim bladder, the content collagen and transcription levels of related genes in the swim bladder of *N. coibor* were analyzed by inhibiting the TGF- $\beta$ /Smad pathway. It was demonstrated that proline improved significantly the collagen content in the swim bladder of *N. coibor*, although no obvious enhancement in growth performance was observed. Proline supplementation up-regulated genes involved in collagen biosynthesis in the swim bladder. However, oxymatrine interference reduced significantly collagen deposition and the expression of *Colla1*, *Colla2*, TGF- $\beta$  and *Smad2* genes in the swim bladder of *N. coibor*. These results suggested that proline promoted collagen deposition in swim bladder mainly through regulating TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway, most likely via transient overexpression of *Colla1*, *Colla2*, TGF- $\beta$  and *Smad2* genes. Our results help to understand the molecular mechanism of collagen deposition in *N. coibor* for developing new strategies of producing fish products with higher quality.

**Key words:** Proline; TGF- $\beta$ /Smads signaling pathway; Swim bladder; Collagen; *Nibea coibor*