

西伯利亚鲟脂肪肝模型的建立

张洪玉¹ 夏磊^{1,2} 彭翔¹ 刘晓勇¹ 赵明军^{1*} 齐茜¹

(¹ 中国水产科学研究院, 北京 100141)

(² 北京鑫洋水产高新技术有限公司, 北京 102488)

摘要 选择规格相近[体重(8.41 ± 0.82)g, 体长(10.12 ± 0.44)cm]的西伯利亚鲟225尾, 分为3组, 每组3个平行, 分别用8% (对照组)、12% (中脂组)、16% (高脂组) 油脂含量的饲料投喂。养殖42 d后, 测定体长、体重, 尾静脉取血, 解剖。通过生长指标、生理生化指标及肝脏组织切片观察等评价建模是否成功。结果表明, 高脂组生长最快, 终末体长、体重显著高于对照组和中脂组($P < 0.05$), 肝指数显著高于对照组和中脂组($P < 0.05$), 存活率与另两组差异不显著($P > 0.05$); 高脂组血清AST、ALT及TC、TG显著高于对照组($P < 0.05$), 肝脏TG显著高于中脂组和对照组; 对照组肝脏呈暗红色, 中脂组肝脏呈浅红色, 高脂组呈暗白色, 病理切片观察表明, 高脂组部分肝细胞坏死, 细胞破裂, 脂肪颗粒融成一个大的脂肪滴, 细胞呈现透明空泡化, 细胞核破裂或溶解。通过肝指数、血清生化指标、肝脏TG、肝脏外观颜色及病理组织切片分析, 高脂饲料组成功地建立了鲟鱼脂肪肝模型。

关键词 鲟鱼; 脂肪肝; 高脂饲料

中图分类号 S963.7 文献标志码 A 文章编号 1000-7075(2014)02-0060-06

Establishment of fatty liver model for sturgeon *Acipenser baeri*

ZHANG Hong-yu¹ XIA Lei^{1,2} PENG Xiang¹ LIU Xiao-yong¹

ZHAO Ming-jun^{1*} QI Qian¹

(¹ Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141)

(² Beijing Seasun Fishery Co. Ltd, Beijing 102488)

ABSTRACT In this study, the fatty liver model for sturgeon *Acipenser baeri* was successfully established by analyzing hepatosomatic index, serum biochemical indexes, triglyceride in liver, color of liver and pathologic tissue section of sturgeon fed with high-fat diets. Sturgeons at similar body weight (8.41 ± 0.82)g and length (10.12 ± 0.44)cm, were divided into three groups and fed with three diets at oil contents of 8% (control group), 12% (mid-fat), and 16% (high-fat), respectively. After cultured for 42 d, their body length and body weight were measured, and blood was sampled from the caudal vein, then dissection was performed. The growth, serum and liver biochemical indexes and liver biopsy were employed to evaluate the model. Results showed that the final body length, body weight and hepatosomatic index of high-fat treatment was significantly higher than the other treatments ($P < 0.05$), but the survival rate showed no significant difference ($P > 0.05$). In high-fat treatment, the serum biochemical indexes, including aspartate aminotransferase, alanine transaminase, triglyceride

中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2012A0603)资助

* 通讯作者。E-mail: zhaomj@cafs.ac.cn

收稿日期: 2013-03-23; 接受日期: 2013-07-14

作者简介: 张洪玉(1981-), 男, 助理研究员, 主要从事渔用药物开发研究。E-mail: zhanghy@cafs.ac.cn

and total cholesterol were significantly higher than those of control ($P < 0.05$). Also, the liver triglyceride in high-fat treatment was significantly higher than the other treatments ($P < 0.05$). The colour of the fish liver was dark-red in control, light red in mid-fat treatment and grey-white in high-fat treatment. Necrosis and ruptured liver cells were found in high-fat treatment, with fat particles merged into bigger fat droplets, cells became transparent and the nucleus were ruptured or dissolved.

KEY WORDS *Acipenser baeri*; Fatty liver; High-fat diet

随着集约化和规模化养殖的推广,我国鲟鱼养殖产量不断提高,2011年我国鲟鱼养殖量达到44211 t(农业部渔业局 2012),超过世界鲟鱼养殖产量的80%。然而由于配合饲料营养不合理等原因,导致鲟鱼肝病频发,给养殖户带来一定的损失。

鱼类肝胆病是一个比较笼统的概念——“鱼类肝胆综合症”,主要是指由各种非寄生性因素引起的肝脏损伤、肝功能障碍的疾病(刘迁 2009)。引起鱼类肝胆综合症的因素主要有营养性因素、毒性物质和药源性因素(潘连德 1999)。由营养性因素引起鱼类的肝胆病,与临床医学上人发病相似,故将由此类因素引起的肝胆病定义为脂肪肝。脂肪肝发病模型的建立,是研究发病机制和开发药物的基础。在人类医学上,常利用大鼠 *Rattus norvegicus* 和小鼠 *Mus musculus* 摄食高脂肪饲料建立脂肪肝模型,模拟人体非酒精性脂肪肝,技术已经很成熟(孙要武等 2005;潘华等 2005)。在水产动物上,这方面的研究才刚刚起步。向朝林等(2011)通过注射硫代乙酰胺及饲喂不同油脂水平饲料建立了草鱼肝损伤实验模型,具备了脂肪肝和肝纤维化病理特征。冯健等(2005)利用不同蛋白质和脂肪含量成功诱导红姑鱼脂肪肝,其病变程度与日粮脂肪含量水平成正相关。在鲟鱼上建立脂肪肝模型的研究还未见报道。本研究通过在饲料中添加高水平油脂,探讨鲟鱼脂肪肝模型建立的可行性,为进一步研究鲟鱼脂肪肝病变及保肝药物的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验鱼

试验用鲟鱼为西伯利亚鲟 *Acipenser baeri*,来自中国水产科学研究院鲟鱼繁育技术工程中心,体质健康无伤,体重为 (8.41 ± 0.82) g,体长为 (10.12 ± 0.44) cm,将试验鱼分为3组,每组3个平行,每个平行25尾鱼。试验于2012年5月24日在中国水产科学研究院鲟鱼繁育技术工程中心循环水系统中进行,温度控制在 (21 ± 0.5) °C,整个养殖过程充气(溶解氧含量为7.0-9.5)。日投饵量为鱼体重的2%-3%,每天投饵3次。在试验42 d后,将所有实验鱼全部统一处理。

1.1.2 饲料制作

鱼油和玉米油作为脂肪来源,油脂添加量分别为8%(L8)、12%(L12)和16%(L16)。其他饲料原料见表1。饲料粒径为2.5 mm,室温下阴干,-20°C储存备用。每组饲料取样本进行成分分析。

1.1.3 试验试剂

总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)试剂盒由浙江东瓯诊断产品有限公司提供。谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。检测方法均按试剂盒操作说明进行。

1.2 试验方法

样品采集:鲟鱼实验前停食12 h。量取每尾鲟鱼体长,称重。尾静脉采血,室温放置1-2 h,离心取上清液,用于血清中ALT、AST、TC、TG的测定。采血后,解剖,将完整肝脏取下,滤纸吸干表面水分和血液后,精确称取重量,小心切取大小为1 cm × 1 cm × 0.5 cm肝组织,用4%甲醛固定,石蜡包埋,切片,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察。另取0.2 g肝组织,匀浆,离心取上清液,测定肝组织中TC与TG。

1.3 指标测定及数据分析

为剔除体长、体重等差异的影响,以初始体长和体重作为协变量,应用SPSS 16.0 软件进行协方差分析。肝指数计算公式如下:

$$\text{肝指数} = \text{肝脏重量(g)} / \text{体重(g)} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 生长及存活指标

经过 42 d 养殖, L16 组鲟鱼终末体长与终末体重均显著高于 L8 和 L12 组 ($P < 0.05$), L8 和 L12 组之间终末体长与终末体重差异不显著 ($P > 0.05$) (表 2)。L16 组肝脏指数显著高于 L8 和 L12 组 ($P < 0.05$) (图 1), L8 组和 L12 组差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 组鲟鱼均有死亡, L16 组死亡率较低,但与其他两组差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 血清生化指标的变化

AST 和 ALT 是物质代谢过程中两种关键的酶, ALT 主要存在于肝细胞浆中, AST 存在于肝细胞浆和线粒体内。正常细胞由于细胞膜的包裹, ALT 和 AST 不会释入血中。肝细胞受到损害后, 细胞变性、坏死, 细胞膜破碎或细胞膜的通透性增加, 肝细胞中所含的 ALT 和 AST 就会被释放到血液中, 使血中 ALT、AST 活性增加 (Olueh 1999)。本研究中 L12 组 (302.40 ± 35.07)、L16 组 (363.23 ± 25.06) 鲟鱼血清的 AST 含量显著高于 L8 组 (179.67 ± 13.46) ($P < 0.05$), L12 组和 L16 组差异不显著 ($P > 0.05$)。L16 组 (31.20 ± 4.53) 血清的 ALT 含量显著高于 L8 组 (16.01 ± 1.17) ($P < 0.05$), 略高于 L12 组 (26.03 ± 2.22), 但差异不显著 ($P > 0.05$), L12 组与 L8 组差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 1 试验饲料配方及基本营养成分

Table 1 Ingredients and composition of the diets

原料成分	Ingredient (g/100 g)	L8	L12	L16
鱼粉	Fish meal	40	40	40
古元粉	Wheat gluten	20	20	20
鱼油	Fish oil	6	8	10
玉米油	Corn oil	2	4	6
淀粉	α -Starch	14	14	14
复合维生素	Vitamin mix	1	1	1
复合矿物质	Mineral mix	1	1	1
结晶纤维素	Crystalline cellulose	16	12	8
饲料主要成分	Proximate composition (g/100 g dry matter)			
水分	Moisture	7.52	6.99	6.93
粗蛋白	Crude protein	45.64	44.45	43.63
粗脂肪	Crude lipid	10.57	14.68	16.52
粗灰分	Ash	8.64	8.19	7.74

注: a. 每千克复合矿物质含 $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 333 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 67 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 200 g, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 200 g, Na_2SeO_3 45 g, CoCl_2 1.7 g KI 53 g

b. 每千克复合维生素含 V_A 186 700 IU, V_D 93 300 IU, V_E 200 g, V_B 18 g, V_{B6} 10.7 g, V_{B3} 53 g, V_{K3} 13.33 g, B_{12} 0.13 g

Note: a. Mineral premix per kilogram including $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 333 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 67 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 200 g, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 200 g, Na_2SeO_3 45 g, CoCl_2 1.7 g, KI 53 g.

b. Vitamins premix per kg including V_A 186 700 IU, V_D 93 300 IU, V_E 200 g, V_B 18 g, V_{B6} 10.7 g, V_{B3} 53 g, V_{K3} 13.33 g, B_{12} 0.13 g

表 2 不同脂肪含量的饲料对鲟鱼体长、体重、肝脏指数及存活率的影响

Table 2 Effects of experimental diets on body length, body weight, hepatosomatic index and survival of *A. baeri* (Mean \pm SD, $n = 25$)

实验组 Treatment	初始体重 Initial body weight (g)	终末体重 Final body weight (g)	初始体长 Initial body length (cm)	终末体长 Final body length (cm)	终末肝指数 Final hepatosomatic index (%)	存活率 Survival rate (%)
L8	8.47 \pm 0.11	26.81 \pm 2.21 ^c	10.92 \pm 0.06	17.54 \pm 0.50 ^c	1.24 \pm 0.10 ^c	86.67 \pm 2.67
L12	8.51 \pm 0.08	25.74 \pm 2.12 ^c	10.14 \pm 0.04	17.20 \pm 0.51 ^c	1.43 \pm 0.08 ^c	88.00 \pm 4.62
L16	8.25 \pm 0.09	33.43 \pm 1.63 ^{ab}	10.14 \pm 0.05	19.08 \pm 0.40 ^{ab}	1.64 \pm 0.10 ^{ab}	78.67 \pm 3.53

注: 上标字母不同表示与其对应组差异显著 ($P < 0.05$)

Note: The different superscript indicate significant difference ($P < 0.05$)

血清甘油三酯和总胆固醇含量是临床血液生化的重要指标。L16 组血清中 TG (4.29 ± 0.25) 与 TC (2.26 ± 0.20) 含量均显著高于 L8 组 ($P < 0.05$)。L12 组血清中 TG 与 TC 与 L16 组和 L8 组差异不显著 ($P > 0.05$)。

肝脏中 L16 组 TG (5.91 ± 0.25) 含量显著高于 L12 组 (4.74 ± 0.20) 和 L8 组 (5.02 ± 0.13) ($P < 0.05$)，L8 组和 L12 组差异不显著 ($P > 0.05$)。3 组之间肝脏 TC 含量不存在显著性差异 ($P > 0.05$)。

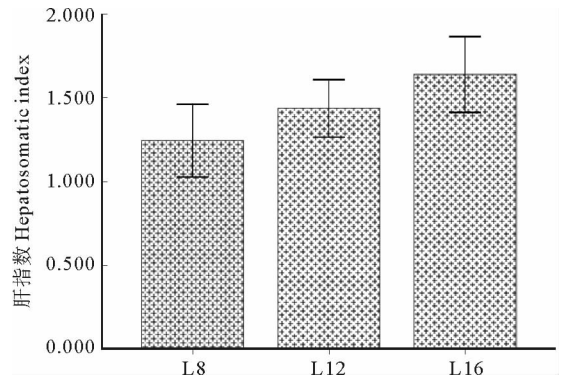


图1 肝指数变化

Fig. 1 Variation of the hepatosomatic index

表3 不同脂肪含量饲料对鲟鱼血清和肝脏生化指标的影响

Table 3 Effects of experimental diets on serum and liver biochemical indexes of *A. baeri* (Mean ± SD)

饲料 Diets	血清 Serum				肝脏 Liver	
	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/g prot)	TC (mmol/g prot)
L8	179.67 ± 13.46 ^{bc}	16.01 ± 1.17 ^c	3.13 ± 0.28 ^c	1.56 ± 0.05 ^c	5.02 ± 0.13 ^c	0.442 ± 0.021
L12	302.40 ± 35.07 ^a	26.03 ± 2.22	3.43 ± 0.49	1.99 ± 0.23	4.74 ± 0.20 ^c	0.458 ± 0.014
L16	363.23 ± 25.06 ^a	31.20 ± 4.53 ^a	4.29 ± 0.25 ^a	2.26 ± 0.20 ^a	5.91 ± 0.25 ^{ab}	0.459 ± 0.106

注:上标字母不同表示与其对应组差异显著 ($P < 0.05$)

Note: The different superscripts mean significant difference ($P < 0.05$)

2.3 肝脏组织学研究

实验结束后解剖发现,L8 实验组多数肝脏呈暗红色,L12 饲料组肝脏颜色较 L8 组颜色浅,呈浅红色,L16 组肝脏颜色呈暗白色,质脆易碎,在取肝脏过程中不容易取完整(图2)。

正常史氏鲟肝细胞体积较大,呈多角形,胞核大而圆,位于细胞中心附近,有的肝细胞浆内可见到较大的脂泡(曲秋芝等 2003)。石蜡组织切片中,肝脏脂肪被酒精、二甲苯等溶剂所溶解,表现为空泡状,脂肪含量可以通过空泡程度来观察。3 组肝脏组织切片在 10×40 视野下观察,见图3。3 组肝细胞均存在不同程度的空泡,细胞核被压迫于一侧。L8 组细胞轮廓清晰,脂肪呈小颗粒状分布在细胞内。L12 组细胞轮廓清晰,肝细胞内空泡聚集变大,部分细胞空泡充斥整个细胞。L16 组部分肝细胞破裂,多个肝细胞脂肪颗粒融成一个大的脂肪滴,细胞呈现透明空泡化,一些肝细胞变性坏死,细胞核破裂或溶解,变性的肝细胞相互离散,肝小叶结构破坏,故外观观察显得柔软粉糊,也是导致 L16 组无法取得完整肝脏样品的原因。

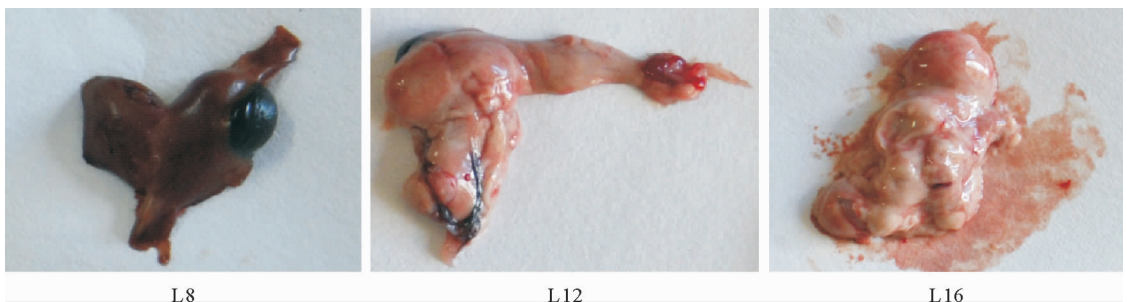


图2 3 个处理组的鲟鱼肝脏外观检查

Fig. 2 Visual observation of liver in three treatments

3 讨论

3.1 3种脂肪含量饲料对鲟鱼生长指标影响分析

饲料脂肪含量与鱼类生长存在一定的相关性。Hung 等(1997)发现,高脂肪饲料(258–357 g/kg)与白鲟生长呈正相关;Keramat 等(2012)研究表明,高脂饲料能够提高欧洲鳊生长速度,摄食量未受影响。本研究结果与上述研究相一致,在8%–16%脂肪含量范围内,鲟鱼生长与脂肪含量呈正相关。然而,也有学者得出不同的结果,Wang 等(2005)研究表明,25%脂肪含量的饲料,军曹鱼鱼苗生长速度要慢于5%、15%饲料组。甘暉等(2009)研究表明,在0、2%、4%、6%、8%等饲料脂肪水平下,随着脂肪水平的升高,奥尼罗非鱼幼鱼的增重率呈现先上升后下降的趋势。出现这种情况的原因,可能是因为鲟鱼为肉食性,脂肪需求较高,在16%脂肪含量范围内,未能达到生长抑制点,若进一步提高饲料脂肪含量,鲟鱼摄食量和生长速度会受到抑制。

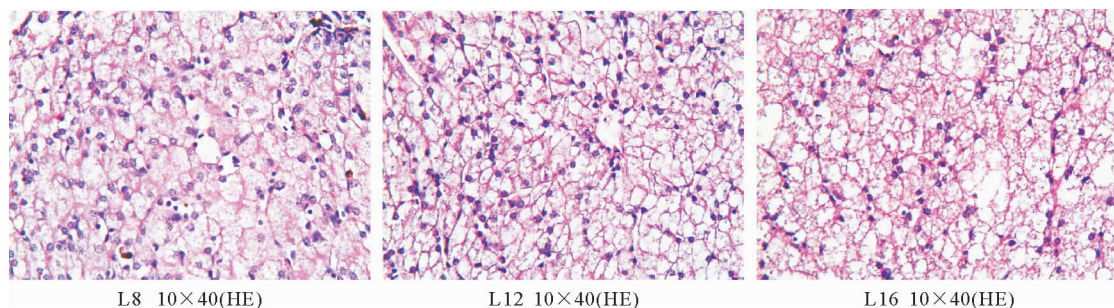


图3 肝脏病理组织切片观察

Fig. 3 Histopathology observation of the liver in three treatments

3.2 鲟鱼脂肪肝模型建立分析

3.2.1 存活率

实验期间,3组均有不同程度死亡,L16组存活率为78.7%,保证了一定的存活数量,符合David 等(2002)报道实验模型要求。

3.2.2 血清生化指标分析

血清中转氨酶、TC、TG含量是临床诊断脂肪肝的重要手段(吴丽珍等 2012)。正常情况下,细胞内转氨酶由于细胞膜的屏障作用,不易逸出,仅由于细胞的不断更新而少量释入血液(康格菲 1989)。只有当肝细胞受到破坏,转氨酶释放入血液的速度大大提高时,血清酶活性才明显升高。本研究中,L16组血清中AST、ALT两种酶指标显著高于L8组。说明肝细胞可能遭受一定程度的损伤,细胞膜通透性加大,导致肝细胞内转氨酶大量逸出(Lin *et al.* 1990)。L16组血清中TC、TG含量升高,推测由于肝细胞受到损伤,脂类代谢引起异常。

3.2.3 肝脏TC、TG含量分析

肝脏主要参与内源性脂肪的合成与转运,当磷脂合成障碍或载脂蛋白合成障碍就会影响TG的转运,聚集在肝脏中易于形成脂肪肝(李之清等 2004)。本研究中,L16组的甘油三酯显著升高,说明肝脏代谢负荷加重。推测是由于肝脏从血液中摄取或合成甘油三酯过多,且不能及时转运出去,在肝脏中蓄积,有形成脂肪肝的趋势。胆固醇的合成部位主要在肝脏,同时,肝脏具有胆固醇的合成和代谢的调节功能。外源性胆固醇(食物摄取)会阻碍细胞内胆固醇的合成,反之,当胆固醇分解代谢增加时,则促进胆固醇的合成(赵水平 2009)。在本研究中,L16组肝脏中TC含量未显著提高,推测是由于外源性胆固醇摄入较多,肝脏在合成代谢中起到了调节作用。

3.2.4 肝脏病理分析

肝脏肿大是鱼类肝胆病的重要症状之一,Nanton 等(2001)研究表明,鲟鱼 *Melanogrammus aeglefinus* 日粮中脂

肪含量超过14%时,其肝体指数和肝脂含量显著升高。利用大鼠建立脂肪肝模型,肝指数升高也是重要评价指数(潘华等 2005)。本研究中L16组肝指数显著高于L8组,与上述报道一致。

鱼类肝脏的颜色与脂肪含量有关,一般情况下脂肪含量高则肝色越淡,脂肪含量低则肝色较深(温海深 2009)。从外观来看,3个处理组中,L16组肝脏颜色呈暗白,易碎,说明L16脂肪含量高于L8和L12组。病理切片中L16组肝脏脂肪微粒聚集呈脂肪滴也佐证了这一结论。

4 结论

经过42 d饲喂试验,从肝指数、血清生化指标(AST、ALT、TC、TG)、肝脏TC、肝脏外观颜色及病理组织切片分析,L16脂肪含量组具备了脂肪肝模型的特征,成功建立了鲟鱼脂肪肝模型。

致谢:本研究在试验过程中得到了中国水产科学研究院鲟鱼繁育技术工程中心张永旺、王国峰、白喜军等的帮助,在此表示感谢!

参 考 文 献

- 甘晖,李坚明,冯广朋,龚竹林,黄凯,李家乐. 2009. 饲料脂肪水平对奥尼罗非鱼幼鱼生长和血浆生化指标的影响. 上海海洋大学学报, 18(1):35-41
- 冯健,贾刚. 2005. 饲料中不同脂肪水平诱导红姑鱼脂肪肝病的研究. 水生生物学报, 29(1):61-64
- 刘迁. 2009. 草鱼“肝胆综合症”病理变化及菜籽粕对其肝脏毒性的研究. 见:华中农业大学硕士研究生学位论文
- 农业部渔业局. 2012. 中国渔业年鉴. 北京:中国农业出版社, 224
- 曲秋芝,华育平,曾朝辉,齐艳萍,王永林,王兵. 2003. 史氏鲟消化系统形态学与组织学观察. 水产学报, 27(1):1-6
- 孙要武,何宝国,吴嘉慧,李省三. 2005. 大鼠脂肪肝实验模型的建立. 齐齐哈尔医学院学报, 26(4):361-362
- 向朝林,叶元土,蔡春芳,殷永风,朱磊,胡显琼. 2011. 注射硫代乙酰胺及饲喂不同油脂水平饲料建立草鱼肝损伤实验模型. 中国实验动物学报, 19(6):505-511
- 李之清,马晓军. 2004. 脂肪肝. 北京:中国中医药出版社, 12:5-8
- 吴丽珍. 2012. 转氨酶水平检验在脂肪肝诊断中的应用价值. 中国卫生产业, (7):99
- 赵水平. 2009. 血脂异常. 上海:上海交通大学出版社, 1-2
- 康格菲. 1989. 临床生物化学. 北京:人民卫生出版社, 232-249
- 温海深. 2009. 水产动物生理学. 青岛:中国海洋大学出版社, 3:226
- 潘华,姚菊芳,朱萍妹,敖红,周光兴. 2005. 高脂饮食性脂肪肝模型大鼠动态病理学观察. 实验动物与比较医学, 25(2):83-85, 128
- 潘连德. 1999. 集约化水产养殖动物的非寄生性疾病及其防治. 水产科技情报, 26(1):40-41
- David P, Alexandre E, Chenard-Neu MP and 3 others. 2002. Failure of liver cirrhosis induction by thioacetamide in Nagase albuminaemic rats. Lab Animals 36(2):158-164
- Hung, SSO, Storebakken T, Cui Y and 1 other. 1997. High-energy diets for white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson. Aquacul Nutr 3(4):281-286
- Keramat AA, Mahdavi S, Hosseini SA. 2012. Dietary fat content and feed supply influence growth and body composition in juvenile beluga sturgeon (*Huso huso*). Aquacul Nutr 20:859-867
- Lin D, Mao YQ, Cai FS. 1990. Nutritional lipid liver disease of grass carp *ctenopharyngodon idullus*. Chin J Oceanol Limnol 8(4):363-373
- Nanton DA, Lall SP, McNiven MA. 2001. Effects of dietary lipid level on liver and muscle lipid deposition in juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. Aquacul Res 32(S1):225-234
- Oluah NS. 1999. Plasma aspartate aminotransferase activity in the catfish *Clarias albopunctatus* exposed to sublethal zinc and mercury. Bull Environ Contam Toxicol 63(3):343-349
- Wang JT, Liu YJ, Tian LX and 4 others. 2005. Effect of dietary lipid level on growth performance, lipid deposition, hepatic lipogenesis in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). Aquaculture 249(1-4):439-447