

doi: 10.7541/2016.143

GH重组蛋白对达氏鲟生长、血液生化 and 体组成的影响

李创举^{1,2} 单喜双^{1,2,3} 岳华梅¹ 阮 瑞¹ 危起伟¹

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业部淡水生物多样性保护重点实验室, 武汉 430223; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 3. 江苏农牧科技职业学院水产科技系, 泰州 225300)

摘要: 为研究生长激素(GH)重组蛋白对达氏鲟生长、代谢及鱼体肝组分的影响, 构建了GH成熟肽融合原核表达载体pET32a-AdGH, 并将其在宿主菌BL21(DE3)中诱导表达, 重组蛋白rAdGH以包涵体的形式存在。设置了4个试验组, 分别在鲟鱼商品饲料中添加含量为0(对照组)、10(低处理组)、50(中处理组)和100 mg/kg(高处理组)的粉状rAdGH, 连续投喂8周。结果表明, 低水平rAdGH添加能够显著促进鱼体生长, 提高特定生长率, 降低饵料系数, 提高肝体比和脏体比; 进一步的分析表明, 低水平rAdGH添加可提高除血糖外所有测定的血液指标数值, 反映了机体代谢水平的增强。各浓度rAdGH的添加均能提高鱼体肝和肌肉中蛋白质、水分含量, 降低脂肪含量。rAdGH对鱼体生长和代谢的影响可能与其剂量相关, 低水平的添加可显著增强鱼体代谢水平, 加快肝中蛋白质的沉积与脂肪的消耗, 促进鱼体生长; 高水平的添加进一步增强其代谢水平, 但其促生长的功能下降, 部分血液指标异常, 肝组分异常, 疑似肝损伤。研究探索了鲟鱼重组生长激素的生长调控功能, 为重组生长激素在鲟鱼养殖中的应用提供了基础。

关键词: 达氏鲟; 原核表达; 生长激素重组蛋白; 生长性能; 血液生化指标; 体组分

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2016)06-1106-08

达氏鲟(*Acipenser dabryanus*)是我国长江特有的淡水定居型鲟类^[1,2], 由于过度捕捞、航运、水利工程和污染等原因, 其生存环境受到了极大破坏, 野生资源量极少, 物种处于极度濒危状况。人工养殖成为保护这一古老物种的重要途径, 但与其他鲟类一样, 达氏鲟生长发育较慢、初次性成熟时间较迟, 这不但会大大提高养殖成本, 也延长了全人工繁殖的时间进程, 影响达氏鲟物种资源恢复。因此, 探寻促进达氏鲟生长发育的技术和方法具有重要意义^[3]。

生长激素(Growth Hormone, GH)是鱼类重要的生长调控物质, 主要由垂体合成并分泌释放到血液中, 在肝中发挥功能, 内源性GH能够促进细胞的增殖和分化、加快蛋白质合成进而促进鱼体生长^[4-6]。将GH开发成促生长添加剂并应用到水产产业中具有

重要的科研意义和商业价值, 但直接从鱼体中提取获得GH不但技术复杂且成本较高, 原核表达技术为GH的获得提供了新的思路。基于原核表达的人用基因重组GH和牛用重组GH技术十分成熟, 重组GH已经成为一种常规、稳定、高效的医用治疗药品和畜牧用保健产品^[7,8]。因而利用原核表达方法获得鱼类重组GH作为鱼类促生长剂或能量分配剂是极具前景的。

本研究通过基因工程方法构建达氏鲟GH成熟肽原核表达载体, 并在宿主菌中高效表达, 经超声破碎、冷冻干燥等步骤获得重组GH粉状蛋白, 将其按不同比例添加到达氏鲟幼鱼的日粮中, 研究外源GH对达氏鲟幼鱼生长、饲料利用、血液生化指标、体组分的影响, 探寻GH参与鱼体新陈代谢的方式, 丰富GH功能的研究, 为rAdGH的应用提供基础。

收稿日期: 2016-04-03; 修订日期: 2016-07-14

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(No. 201203086); 国家重点基础研究发展计划(973计划, No. 2015CB150702)资助 [Supported by the Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest (No. 201203086); National Basic Research Program of China (973 Program, No. 2015CB150702)]

作者简介: 李创举(1980—), 男, 湖南邵阳人; 博士, 副研究员; 主要研究方向为鱼类分子遗传。E-mail: lcj@yfi.ac.cn

通信作者: 危起伟, 博士; 研究员, 博士研究生导师; E-mail: weiqw@yfi.ac.cn

1 材料与方法

1.1 达氏鲟GH原核表达载体的构建

根据达氏鲟GH cDNA序列(GenBank登录号: KJ650095.1)成熟肽编码基因设计引物,上游引物 $rdsF$ 从成熟肽序列开始,5'端引入EcoR I酶切位点GAATTC,其序列为GAATTCTACCTATAATTC CACTATCCAG,下游引物 $rdsR$ 引入TAA强终止密码子和Xho I酶切位点CTCGAG,其序列为CTCGAG TTACAGAGTACAGTTGCTCTCC,引物由上海生工生物工程有限公司合成。从达氏鲟垂体SMART cDNA中扩增得到GH成熟肽序列(扩增方法参照单喜双等^[3]),回收纯化后连入pMD19-T载体,转化大肠杆菌感受态细胞DH5 α ,挑取阳性克隆,经测序确认后,提取质粒;使用EcoR I/Xho I双酶切,割胶回收,连入经同样双酶切的pET-32a表达载体,转入表达宿主菌BL21(DE3)中,挑取阳性克隆,测序验证。重组蛋白约为39 kD。

1.2 基因重组GH的诱导表达及大量制备

将测序正确的菌体在LB液体培养基中扩大培养(Amp浓度为100 $\mu\text{g/mL}$),37℃ 200 r/min震荡培养过夜,吸取适量(1:100稀释)菌液接种于新鲜的LB液体培养基内,37℃ 200 r/min震荡培养至细菌达到对数生长期($A_{600}=0.6\sim 0.8$),设置了25、28、30、32、35和37℃等多个温度进行诱导,IPTG终浓度为1 mmol/L。诱导4h后分别吸取1 mL菌体,8000 r/min离心5min后移弃培养基,加入SDS Loading Buffer,沸水变性后经SDS-PAGE (12%分离胶)电泳,考马斯亮蓝染色检测蛋白表达情况。大规模培养采用1 L摇瓶(200 mL培养基)批量获得宿主菌。

在菌体进入平台期前离心收集菌体,用灭菌水“洗”两次后,加入清水重悬菌体,冰浴超声破碎(宁波新芝,Scientz-IID);分别收集上清和沉淀SDS-PAGE检测分析。将沉淀用灭菌清水“洗”两次后,放于-40℃冷冻12h,使用冷冻干燥机(Christ Beta1-8LD),冷冻干燥约48h,收集干燥的粉状重组蛋白(rAdGH)。

1.3 养殖试验设计

养殖试验用鱼为2014年4月14日出膜的同一批次全人工繁殖达氏鲟子二代幼鱼。试验在中国水产科学院长江水产研究所太湖试验场(湖北荆州)进行。选用山东升索鲟鱼商品颗粒饲料(主要营养成分:粗蛋白 ≥ 40 ,粗脂肪 $\geq 10\%$,粗纤维 $\leq 6\%$,粗灰分 $\leq 18\%$,水分 $\leq 12\%$)。

选用初始重量为(18.70 $\pm$ 0.09) g的达氏鲟幼鱼600尾,随机分4组,每组3个平行,每个平行50尾,养于半径40 cm,深40 cm的圆形玻璃纤维养殖桶内

(满载约0.2 m³),流水养殖。

试验分别在鲟商品饲料中添加0(对照组)、10(低处理组)、50(中处理组)和100 mg/kg(高处理组)的粉状rAdGH,先将rAdGH按比例溶于灭菌水,液体与饲料按照10 mL:100 g的比例进行混合,待饲料充分吸收液体后投喂,剩于饲料4℃暂存,放置不超过12h,试验进行8周。

1.4 试验管理

试验开始前按照试验投喂模式驯养试验鱼两周,每天投喂3次(8:00、15:00、22:00),以投喂20min内池中无或仅少量残饵为准,每两周停喂1d(隔天采样)。每日记录水质指标并观察试验鱼的摄食及健康状况。养殖用水为曝气后的地下水,养殖水温恒定在20—22℃,溶解氧充足(7.2—8.5 mg/L),其他水质指标均处于鲟鱼适宜范围内。

1.5 采样与测定方法

在试验过程中,每2周测量每缸鱼体重,计算均重;试验结束,每池随机选取6尾鱼在鱼体臀鳍基部采集血液,取血清,-20℃保存待测。分离肝、内脏,并称重,计算肝体指数和肥满度。采集肌肉和肝,测定其水分、粗蛋白、粗脂肪。水分利用冷冻干燥机(德国Christ Beta1-8LD)冷冻干燥72h后测定。粗蛋白采用凯氏定氮法(GB/T 6432-94)、粗脂肪利用索氏抽提法(GB/T 9695.7-2008)测定。血液生化指标的测定使用Sysmex全自动生化分析仪(CHEMIX-800),参照邵辉等^[9]。

根据以下公式分别计算各指标:

存活率(Survival rate, SR, %)=100 $\times$ 终末尾数/初始尾数;

摄食率(%BW/d)=100 $\times$ 摄食量/[养殖天数 $\times$ (初始体重+终末体重)/2];

增重率(Weight gain rate, WGR, %)=100 $\times$ (终末体重-初始体重)/初始体重;

特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d)=(Ln终末体重-Ln初始体重) $\times$ 100/投喂天数;

饲料系数=摄食量/(终末体重-初始体重);

肝体比(Hepatosomatic index, HIS, %)=肝质量(g)/体质量(g) $\times$ 100;

脏体比(Viscerosomatic index, VSI, %)=内脏质量(g)/体质量(g) $\times$ 100;

肥满度(Condition factor, CF, g/cm³)=个体质量(g)/体长³(cm³) $\times$ 100。

1.6 数据分析

试验数据使用SPSS Statistics 17.0统计软件进行分析,以Duncan多重比较方法检测组间差异,使用平均值 $\pm$ 标准误(means $\pm$ SE)表示, $P<0.05$ 表示差异

显著, $P>0.05$ 不具有显著性差异。

2 结果

2.1 原核表达载体的构建及GH的诱导、表达

从达氏鲟垂体SMART cDNA中扩增获得符合预期的585 bp单一条带, 克隆到表达载体pET-32a, 经测序验证为达氏鲟GH成熟肽表达载体pET32a-AdGH。将pET32a-AdGH转化BL21(DE3)并诱导表达, SDS-PAGE分析检测出分子量约39 kD诱导表达蛋白条带, 符合预期融合蛋白rAdGH (Recombinant *A. dabryanus* GH protein)大小。通过诱导温度梯度试验, 综合考虑大肠杆菌培养速度及重组蛋白纯度最终确定培养温度30℃, IPTG浓度1 mmol/L, 分别收集不同诱导时间菌体, SDS-PAGE分析, 根据表达量和宿主菌生长情况确定最佳的诱导时间为诱导后4h。诱导表达后的菌体, 经超声波破碎, SDS-PAGE检验上清及沉淀, rAdGH在沉淀中表达, 即其以包涵体的形式存在。将包涵体离心冷冻干燥后获得白色粉状rAdGH。

2.2 达氏鲟幼鱼生长性能

如表 1所示, 与对照组相比3个处理组表现出了明显不同的生长特性。低处理(10 mg/kg)组达氏鲟幼鱼体重增长最快, 显著高于对照组($P<0.05$), 比对照组重约8%。中处理(50 mg/kg)和高处理(100 mg/kg)幼鱼的增重也不同程度的高于对照组。综合整个试验过程中采集的体重数据(表 2), 第一次采样时(2周后)各组体重已经出现差别但差异不显著($P>0.05$), 第二次采样时10和50 mg/kg处理组的重量已经显

著高于对照组($P<0.05$)。各组的存活率、摄食率、饱满度无显著性差异($P>0.05$)。3个处理组饵料系数不同程度的低于对照组, 但差异不显著($P>0.05$)。

鱼体的增重率和特定生长率表现出了类似的趋势, 在低处理组中两者都达到了最大值, 显著高于另外三组($P<0.05$); 虽然在中、高两个处理组中增重率和特定生长率都表现出逐渐下降, 但数值上仍高于对照组, 但差异不显著($P>0.05$)。肝体比、脏体比随着rAdGH添加量的增加而逐渐增大, 当添加量达到最高剂量100 mg/kg时, 肝体比、脏体比与对照组的差异具有显著性($P<0.05$)。

2.3 达氏鲟幼鱼血液生化指标

如表 3所示, 各处理组血糖指标差异不显著($P>0.05$), 低处理组白蛋白(ALB)显著高于对照组($P<0.05$), 总蛋白(TP)、球蛋白(GLB)虽然高于对照组但差异不显著($P>0.05$)。随着rAdGH添加量加大, TP和GLB含量逐渐增大, 显著高于对照组($P<0.05$), ALB在中处理组中数值上达到了最高值, 当添加rAdGH含量达到100 mg/kg时, 与中处理相比ALB数值显著下降($P<0.05$), ALB/GLB在高处理组中同样出现下降, 显著低于另外三组($P<0.05$)。

血液中甘油三酯(TG)、总胆固醇(TCHO)含量在低处理中显著高于对照组($P<0.05$), 随着添加量的增大二者也处于逐渐变大的趋势, 当添加量最高时二者的数值也达到了最大, 显著高于其他处理组($P<0.05$)。血液中两类脂蛋白的含量在rAdGH添加组中显著高于对照组($P<0.05$)。

血液中谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)

表 1 rAdGH对达氏鲟幼鱼生长性能的影响(平均值±标准误)

Tab. 1 Effects of dietary rAdGH levels on growth performance of juvenile Dabry's sturgeon (Mean±SE)

参数 Parameter	饵料中rAdGH添加量 Diet group with additive rAdGH (mg/kg)			
	0	10	50	100
初重Initial weight (g)	18.63±0.08	18.69±0.04	18.70±0.01	18.73±0.07
末重Final weight (g)	106.48±1.71 ^b	115.46±1.52 ^a	110.7±1.38 ^{ab}	109.1±0.86 ^b
摄食率FR (%)	2.44±0.09	2.43±0.10	2.47±0.08	2.41±0.08
饵料系数FCR	0.8425±0.08	0.8100±0.08	0.8375±0.07	0.8175±0.06
增重率WGR (%)	472±7.29 ^b	518±8.57 ^a	492±7.21 ^b	483±6.13 ^b
特定生长率SGR (%/d)	2.77±0.02 ^b	2.89±0.02 ^a	2.82±0.02 ^b	2.80±0.02 ^b
存活率SR (%)	99.31±0.69	100±0.00	100±0.00	98.61±1.39
肝体比HSI (%)	3.60±0.001 ^b	3.63±0.002 ^b	3.84±0.001 ^b	4.12±0.002 ^a
脏体比VSI (%)	8.88±0.004 ^b	9.34±0.003 ^{ab}	9.54±0.002 ^{ab}	9.89±0.003 ^a
饱满度CF (g/cm ³)	0.681±0.010	0.683±0.019	0.722±0.016	0.688±0.013

注: 同一行中数据右上方不同字母代表有显著性差异($P<0.05$), 反之无显著性差异($P>0.05$)(平均值±标准误), 以下各表同

Note: Data presented are Means±SE, Values in the same row with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$); the same applies below

表 2 rAdGH对达氏鲟均重的影响(平均值±标准误)

Tab. 2 Effects of dietary rAdGH on average weight of Dabry's sturgeon in different time (Mean±SE)

均重 Mean weigh (g)	饵料中rAdGH添加量 Diet group with additive rAdGH (mg/kg)			
	0	10	50	100
初始均重Initial weight	18.63±0.08	18.69±0.04	18.70±0.01	18.73±0.07
第2周均重The second week	33.58±0.23	35.31±0.23	34.36±1.36	33.51±0.85
第4周均重The fourth week	51.60±0.30 ^b	55.29±1.02 ^a	53.86±0.64 ^a	51.22±0.22 ^b
第6周均重The sixth week	78.44±0.77 ^b	83.70±3.90 ^a	79.56±1.52 ^{ab}	77.79±1.25 ^b
第8周均重The eighth week	106.48±1.71 ^b	115.46±1.52 ^a	110.7±1.38 ^{ab}	109.1±0.86 ^b

表 3 rAdGH对达氏鲟幼鱼血液生化指标的影响(平均值±标准误)

Tab. 3 Effects of dietary rAdGH on serum biochemical indices of juvenile Dabry's sturgeon (Mean±SE)

参数 Parameter	饵料中rAdGH添加量 Diet group with additive rAdGH (mg/kg)			
	0	10	50	100
甘油三酯TG (mmol/L)	4.63±0.09 ^c	5.63±0.33 ^b	5.30±0.14 ^b	6.68±0.37 ^a
血糖Glu (mmol/L)	4.93±0.07	4.62±0.09	5.10±0.10	5.08±0.08
总蛋白TP (g/L)	14.25±0.50 ^b	14.75±0.96 ^b	16.00±0.58 ^a	17.00±0.82 ^a
白蛋白ALB (g/L)	3.35±0.06 ^c	3.65±0.06 ^b	3.83±0.06 ^a	3.69±0.06 ^b
球蛋白GLB (g/L)	10.50±0.58 ^c	10.75±0.29 ^c	11.75±0.29 ^b	14.00±1.15 ^a
ALB/GLB	0.32±0.01 ^a	0.34±0.002 ^a	0.33±0.004 ^a	0.27±0.01 ^b
谷草转氨酶AST (U/L)	201±5.29 ^c	209±4.19 ^c	227±2.50 ^{ab}	232±6.34 ^a
谷丙转氨酶ALT (U/L)	2.0±0.08 ^c	2.0±0.16 ^c	2.5±0.23 ^b	3.25±0.06 ^a
碱性磷酸酶ALP (U/L)	83±0.96 ^b	100±0.96 ^a	104±2.94 ^a	105±3.40 ^a
总胆固醇TCHO (mmol/L)	1.67±0.04 ^c	2.10±0.04 ^b	2.13±0.05 ^b	2.40±0.07 ^a
高密度脂蛋白HDL (mmol/L)	1.44±0.03 ^c	1.51±0.02 ^b	1.60±0.04 ^a	1.51±0.03 ^b
低密度脂蛋白LDL (mmol/L)	0.29±0.01 ^c	0.42±0.01 ^b	0.55±0.02 ^a	0.56±0.02 ^a

的含量在低处理组与对照组间差异不显著($P>0.05$),而在中处理组和高处理组中均逐渐增大且与对照组和低处理组差异显著($P<0.05$)。碱性磷酸酶(ALP)的含量随着rAdGH的添加量增大而逐渐增大,与对照组差异显著($P<0.05$),而3个处理组之间差异不显著($P>0.05$)。

2.4 肝及肌肉组分

如表 4所示,3个rAdGH添加组鱼体肝中的水分含量皆显著高于对照组($P<0.05$),但是随着rAdGH量的加大,水分含量表现出先升高后降低趋势;肝中蛋白质的含量也表现出先增加后降低趋势,但低处理组与对照组差异不显著($P>0.05$),而中、高处理组蛋白质含量显著高于对照组($P<0.05$);随着饲料中rAdGH含量加大,肝中脂肪的含量表现出先降低后升高趋势,中处理组脂肪含量达到最低值,与其他三组差异显著($P<0.05$),高浓度rAdGH添加,肝脂肪含量达到最高值,与另外三组差异显著($P<0.05$)。

3个添加rAdGH组鱼体肌肉中的水分含量与对照组相比差异不显著($P>0.05$),肌肉中蛋白质水平随着rAdGH添加量加大表现出先升高后降低趋势,

低、中两个处理组蛋白含量显著高于对照组和高处理组($P<0.05$)。低、中两个处理组肌肉中脂肪含量与对照组差异不显著($P>0.05$),高处理组粗脂肪含量显著低于对照组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 达氏鲟GH基因重组表达系统的构建

原核表达具有技术成熟、成本较低等优势^[10,11],国内外很多研究者选用大肠杆菌表达GH,获得了具有生物活性的重组蛋白。如白俊杰等^[12]利用大肠杆菌表达的鲑鱼生长激素能促进罗非鱼生长;原核表达牙鲈GH同样具有促牙鲈幼鱼生长的作用^[13]。本研究构建了达氏鲟成熟肽GH-pET-32a表达载体,标签蛋白大小约17 kD, GH成熟肽大小约22 kD,所得重组融合蛋白约39 kD。采用菌体超声波破碎、冷冻干燥的方法获得便于添加到饲料中粉状重组蛋白。

3.2 不同浓度rAdGH添加对达氏鲟相关生长指标的影响

对多种鱼类研究证实了重组GH对鱼体的促生长作用^[14],如重组牛GH能够促进大马哈鱼生长^[15]。

表 4 rAdGH对达氏鲟幼鱼肝、肌肉常规组分的影响(平均值±标准误)

Tab. 4 Effects of dietary rAdGH on proximate composition of liver and muscle of juvenile Dabry's sturgeon (Mean±SE)

参数 Parameter		饲料中rAdGH添加量 Diet group with additive rAdGH (mg/kg)			
		0	10	50	100
肝Liver	水分Moisture	58.75±0.34 ^c	62.69±1.10 ^{ab}	65.32±2.34 ^a	62.35±1.36 ^b
	粗蛋白Crude protein	19.29±0.37 ^b	20.49±0.99 ^{ab}	21.17±0.48 ^a	20.67±0.57 ^a
	粗脂肪Crude lipid	56.07±0.24 ^b	53.50±0.87 ^c	50.85±0.93 ^d	57.44±0.50 ^a
肌肉Muscle	水分Moisture	80.02±0.83 ^{ab}	79.38±0.27 ^b	81.03±0.91 ^a	80.61±0.46 ^{ab}
	粗蛋白Crude protein	65.16±1.34 ^b	68.18±1.09 ^a	69.25±0.59 ^a	63.78±0.29 ^b
	粗脂肪Crude lipid	18.85±0.46 ^{ab}	19.30±0.39 ^a	18.49±0.40 ^b	17.70±0.07 ^c

重组表达的金鲟GH通过投喂和注射的方式能促进金鲟幼鱼生长^[16]。此外在罗非鱼^[12, 17, 18]、虹鳟^[19]、斑点叉尾鲟^[20, 21]、条纹鲈^[22]、鲤鱼^[23]等鱼类中都得到了类似结果。在本研究中,通过日常饵料每餐添加rAdGH,使其促生长作用逐渐发挥,累积成显著促生长的效果。3个rAdGH处理组均能促进鱼体生长,但只有低处理组增重率和特定生长率显著高于对照组;当添加剂量进一步增加到低浓度的5倍和10倍时,增重效果减弱,即一定程度的添加rAdGH能够促进鱼体的生长,高水平添加促进作用减弱。这可能是由于过高水平重组GH添加提高了鱼体的代谢水平,过度消耗鱼体能量储存物质。在一些研究中同样发现GH虽然能够促进鱼体的新陈代谢,但对于生长并没有促进作用^[24]。

3.3 不同浓度rAdGH添加对达氏鲟血液生化指标的影响

血液中蛋白质在维持血浆渗透压、物质运输、免疫等过程发挥重要作用^[25, 26],血液中白蛋白水平反映了机体蛋白质合成的能力。而球蛋白水平与机体的特异性免疫直接相关^[27]。一般而言同龄鱼生长快的个体血清蛋白量偏多^[28]。在本试验中各处理组总蛋白、白蛋白、球蛋白的含量均高于对照组,说明GH能够促进鱼体蛋白质的代谢。但是值得注意的是高处理组中白蛋白的含量相对于中处理出现显著降低,对动物体而言白蛋白与球蛋白的比值比较稳定,即不会出现较大幅度的变化,若出现这一比值偏低则很可能意味着肝或肾脏出现炎症,在本试验中高处理组白蛋白比例表现出异常的低,极有可能是肝出现了炎症的病理性反应,间接说明鱼体的肝功能可能受损。

甘油三酯是血脂的重要组成部分,甘油三酯的升高,可以补充鱼体必需脂肪酸和促进脂溶性维生素的吸收利用^[29],使鱼体生长加快。机体储存脂肪的动员会提高血脂含量,本试验中rAdGH处理组血脂含量较高,可能与肝和肌肉中的脂肪的含量减少

有关。脂蛋白主要负责运输血液中的脂类,其中低密度脂蛋白负责由肝向组织转运胆固醇,而高密度脂蛋白负责把外周组织以及血浆中的胆固醇运回肝代谢^[25],二者含量一定程度的增高,意味着机体新陈代谢水平的提高。相对于中处理组,高密度脂蛋白和白蛋白在高添加组中均表现出数值上显著降低,可能与肝此时的生理状态有关。

谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)为肝组织特异性酶,只有当肝组织受损或组织病变后,血清中二者活性才会升高^[30],因此二者为判断鱼体肝损伤的参考指标,在本试验中AST、ALT在中、高处理组时数值上显著高于对照组和低处理,结合ALB/GLB在高处理组时的异常表现,可以推断此时鱼体相关指标已经不再是代谢增强的生理性反应,而是一种病理状态,即已经造成了肝细胞的损伤和肝功能障碍。

碱性磷酸酶(ALP)与蛋白质、脂肪和糖类的吸收、运输及机体钙磷代谢密切相关^[31, 32],可以在一定水平上反应动物的生长速度,ALP还是鱼类的一种非特异性免疫体液因子,鱼类血液中保持有较高活性的碱性磷酸酶对防御外界微生物的入侵具有积极作用^[33]。在本研究中rAdGH的添加使血液ALP显著的增加,是与提高了相关代谢水平密不可分的,但各处理组间差异不显著,可能意味着rAdGH对ALP参加的代谢促进作用有限。

3.4 不同浓度rAdGH添加对达氏鲟肝和肌肉组分的影响

肝是鱼体新陈代谢的核心器官,也是生长激素的主要靶器官,它的组分反映了鱼体的代谢水平。肝内能够发生脂质合成也可以同时进行着脂质氧化、清除^[34],故肝中脂肪的含量取决于二者反应强度,很多研究证实GH能够加快脂肪分解,降低肝脂肪含量。在本试验中低浓度添加rAdGH显著降低肝中脂肪的含量,当添加量达到中浓度时,肝中脂肪含量达到最低值显著低于其他3组。依此趋势在

最高值100 mg/kg时, 肝中脂肪含量应进一步下降, 但事实上这一指标出现了相对于中处理组的大幅度反弹, 脂肪含量甚至显著高于对照组, 结合高处理组鱼体的血液生化指标, 推测当高浓度添加时鱼体的肝已经受损, 发生肝功能障碍, 造成脂肪氧化^[35]、清除机制缺失, 最终导致脂肪在肝中蓄积。肝内蛋白质含量在低、中两个处理组中逐渐增多, 在高处理组中出现下降趋势, 反映了肝蛋白质合成情况。

鱼类肝是脂肪的主要存储部位^[36, 37], 内源性脂肪的动员及消耗主要发生在肝中, 当低、中浓度添加rAdGH时肝中脂肪含量显著降低, 而肌肉中脂肪含量与对照组无显著差异, 但当添加量达到最高值时, 肌肉的脂肪含量出现了显著下降, 根据笔者分析此时肝已经出现功能障碍导致脂肪蓄积, 说明肝和肌肉对rAdGH的应答是有最低剂量差别或敏感度不同, 亦可能是因此时机体整体代谢水平加大, 肌肉中的储能物质(蛋白质、脂肪)被动员、消耗。各处理组与对照组相比肌肉水分变化不大, 而在低、中两个处理组中蛋白质含量增量较快显著高于对照组, 事实上发生了蛋白质的沉积, 但此时肌肉脂肪含量并没有出现显著性变化, 说明此时的蛋白质沉积与肌肉脂肪动员、消耗关系不大, 而应该是机体整体水平处于促进肌肉组织蛋白合成的状态。肌肉在高处理组中蛋白含量和脂肪含量出现了显著下降(相对于中处理), 很可能是高剂量的rAdGH添加提高了机体基础新陈代谢水平, 迫使肌肉中的蛋白质和脂肪开始出现消耗, 影响到肌肉组分。肝和肌肉组分的区别可能与他们占机体的比重有直接关系。

在本研究所选用的4个处理浓度中, 10 mg/kg处理组取得了较好的促进代谢效果, 发挥了促生长作用。而过高水平的GH尽管也能够促进相关代谢水平提高, 但反映到生长指标上并没有取得较为理想的结果, 甚至出现了“代谢病”。因此, 鱼类中重组GH蛋白的使用剂量及方式还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Wei Q W, He J, Yang D, *et al.* Status of sturgeon aquaculture and sturgeon trade in China: a review based on two recent nationwide surveys [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2004, **20**(5): 321—332
- [2] Chen X H. Biology and Resources of Acipenseriformes Fishes [M]. Beijing: China Ocean Press. 2007, 53—57 [陈细华. 鲟形目鱼类生物学与资源现状. 北京: 海洋出版社. 2007, 53—57]
- [3] Shan X S, Yue H M, Chen X H, *et al.* cDNA cloning, expression and immunolocalization of growth hormone in *Acipenser dabryanus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, **39**(2): 307—314 [单喜双, 岳华梅, 陈细华, 等. 达氏鲟生长激素基因cDNA克隆、表达及免疫荧光定位研究. 水生生物学报, 2015, **39**(2): 307—314]
- [4] Reinecke M, Bjornsson B T, Dickhoff W W, *et al.* Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, **142**(1): 20—24
- [5] Fuentes E N, Valdes J A, Molina A, *et al.* Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone-insulin-like growth factor system [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, **192**(1): 136—148
- [6] Canosa L F, Chang J P, Peter R E. Neuroendocrine control of growth hormone in fish [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, **151**(1): 1—26
- [7] Chen B, Zhu W. Advances on human growth hormone [J]. *Journal of Biology*, 2004, **21**(1): 9—11 [陈蓓, 朱威. 人生长激素研究进展. 生物学杂志, 2004, **21**(1): 9—11]
- [8] Soliman E B, EL-Barody M A. Physiological responses of dairy animals to recombinant bovine somatotropin: A review [J]. *Journal of Cell and Animal Biology*, 2014, **8**(1): 1—14
- [9] Shao H, Wen H, Liu W, *et al.* Dietary choline requirements of adult GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, **20**(5): 1007—1014 [邵辉, 文华, 刘伟, 等. 吉富罗非鱼成鱼胆碱的最适需要量. 中国水产科学, 2013(5): 1007—1014]
- [10] Xie L, Sun J B, Zhang S Q, *et al.* Research progress in the *E. coli* expression system [J]. *Journal of Tropical Biology*, 2004, **10**(2): 16—20 [谢磊, 孙建波, 张世清, 等. 大肠杆菌表达系统及其研究进展. 华南热带农业大学学报, 2004, **10**(2): 16—20]
- [11] Rong J J, Diao Z Y, Zhou G H. Research progress on *E. coli* expression system [J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2005, **12**(6): 416—420 [戎晶晶, 刁振宇, 周国华. 大肠杆菌表达系统的研究进展. 药物生物技术, 2005, **12**(6): 416—420]
- [12] Bai J J, Jian Q, Ma J, *et al.* Expression of salmon growth hormone cDNA in *E. coli* and its enhancement for Tilapia growth [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1998, **6**(4): 343—346 [白俊杰, 简清, 马进, 等. 鲑鱼生长激素cDNA在大肠杆菌中的表达及表达产物对罗非鱼促. 农业生物技术学报, 1998, **6**(4): 343—346]
- [13] Hoon S J, Chun H K, Hong K L, *et al.* Recombinant flounder growth hormone from *Escherichia coli*: overexpression, efficient recovery, and growth-promoting effect on juvenile flounder by oral administration [J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, **60**(3): 183—193
- [14] Mede M. Absorption of bioactive proteins by the gastrointestinal tract of fish: a review [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1990, **2**(1): 1—11
- [15] N.E.(Ted) D E, Helen M D, Keith L, *et al.* Recombinant bovine somatotropin more than doubles the growth rate of

- coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) acclimated to seawater and ambient winter conditions [J]. *Aquaculture*, 1988, **68**(2): 141—155
- [16] Atia B. Preparation of recombinant Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) growth hormone and its use for stimulation of larvae growth by oral administration [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1999, **113**(1): 155—164
- [17] Wille K, McLean E, Goddard J S, *et al.* Dietary lipid level and growth hormone alter growth and body conformation of blue tilapia, *Oreochromis aureus* [J]. *Aquaculture*, 2002, **209**(1): 219—232
- [18] Leedom T A, Uchida K, Yada T, *et al.* Recombinant bovine growth hormone treatment of tilapia: growth response, metabolic clearance, receptor binding and immunoglobulin production [J]. *Aquaculture*, 2002, **207**(3): 359—380
- [19] Garber M, Byatt J C, Lellis W A, *et al.* Dose-response effects of recombinant bovine somatotropin (Posilac) on growth performance and body composition of two-year-old rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Journal of Animal Science*, 1995, **73**(11): 3216—3222
- [20] Jeffrey T, Silverstein W, Munetaka S, *et al.* Bovine growth hormone treatment of channel catfish: strain and temperature effects on growth, plasma IGF-I levels, feed intake and efficiency and body composition [J]. *Aquaculture*, 2000 (1): 77—88.
- [21] Peterson B C, Small B C, Bosworth B G. Effects of bovine growth hormone (Posilac®) on growth performance, body composition, and IGF-BPs in two strains of channel catfish [J]. *Aquaculture*, 2004, **232**(1): 651—663
- [22] Farmanfarman A, Sun L Z. Growth hormone effects on essential amino acid absorption, muscle amino acid profile, N-retention and nutritional requirements of striped bass hybrids [J]. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 1999, **15**(3): 107—113
- [23] Fine M, Sakal E, Vashdi D, *et al.* Recombinant carp (*Cyprinus carpio*) growth hormone: expression, purification, and determination of biological activity in vitro and in vivo [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1993, **89**(1): 51—61
- [24] Danznan R G, Kraak G, Thomas T C, *et al.* Metabolic effects of bovine growth hormone and genetically engineered rainbow trout growth hormone in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at a high temperature [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1990, **47**(7): 1292—1303
- [25] Zou S X. Animal Biochemistry (The 5 Edition) [M]. Beijing: China Agriculture Press. 2013 [邹思湘. 动物生物化学(第五版). 北京: 中国农业出版社. 2013]
- [26] Lin H R. Fish Physiology [M]. Guangzhou: Sun Yatsen University Press. 2011 [林浩然. 鱼类生理学. 广州: 中山大学出版社. 2011]
- [27] Liu H B. Immunological study on Amur sturgeon *Acipenser Schrencki* Brandt [D]. Harbin: Northeast Forestry University. 2004 [刘红柏. 史氏鲟免疫学研究. 哈尔滨: 东北林业大学. 2004]
- [28] Ozaki K. Fish Blood and Circulation Physiology [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press. 1982, 109 [尾崎久雄. 鱼类血液与循环生理. 上海: 上海科学技术出版社. 1982, 109]
- [29] Bai D Q. Research on digestive physiology and parts of physiological and biochemical indexes of four kinds of fish [D]. Tianjin: Tianjin Agricultural College. 2012 [白东青. 四种鱼消化生理及部分生理生化指标的研究. 天津: 天津农学院. 2012]
- [30] Narayang J. Effect of phorate on certain profiles of serum in freshwater *Clarias batrachus* (Linn) [J]. *Journal of Applied Environmental Biology*, 1997, **18**(2): 137—140
- [31] Wang X H, Ni S C. The relationship between growth and Serum alkaline phosphatase activity, inorganic phosphorus, protein levels in Shao duck [J]. *Journal of Biology*, 1997, **14**(1): 18—20 [王旭晖, 倪士澄. 绍鸭生长与血清碱性磷酸酶活性、无机磷、蛋白质水平的相互关系. 生物学杂志, 1997, **14**(1): 18—20]
- [32] Zhang T, Xu Q Y, Xu H, *et al.* Effects of dietary Vitamin D 3 supplementation on body composition and activity of alkaline phosphatase in the serum of juvenile mirror carp (*C. carpio* Songpu mirror carp) [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2011, **26**(supplement): 258—263 [张桐, 徐奇友, 许红, 等. 饲料中维生素D3对松浦镜鲤幼鱼体成分和血清碱性磷酸酶的影响. 华北农学报, 2011, **26**(增刊): 258—263]
- [33] Qiu D G. Study on Impact of immune functions of different immunostimulants for fish [D]. Chongqing: Southwest University. 2009 [仇登高. 不同免疫增强剂对鱼类免疫功能影响的研究. 重庆: 西南大学. 2009]
- [34] Huang C H, Xiao D Y, Hu Y, *et al.* Analysis on research status of fatty liver disease in aquaculture fish [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, **26**(7): 1715—1722 [黄春红, 肖调义, 胡毅, 等. 养殖鱼类脂肪肝研究现状分析. 动物营养学报, 2014, **26**(7): 1715—1722]
- [35] Du Z Y. Causes of fatty liver in farmed fish: a review and new perspectives [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, **38**(9): 1628—1638 [杜震宇. 养殖鱼类脂肪肝成因及相关思考. 水产学报, 2014, **38**(9): 1628—1638]
- [36] Wang X Q, Duan Q Y, Mai K S, *et al.* Studies on fatty liver of cultured fishes: a review [J]. *Ocean Science*, 2002, **26**(7): 36—39 [王兴强, 段青源, 麦康森, 等. 养殖鱼类脂肪肝研究概况. 海洋科学, 2002, **26**(7): 36—39]
- [37] Sheridan M A. Lipid dynamics in fish aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 1988, **90**: 679—690

EFFECTS OF RECOMBINANT GH ON GROWTH, BLOOD BIOCHEMISTRY, AND BODY COMPOSITION OF JUVENILE DABRY'S STURGEON *ACIPENSER DABRYANUS*

LI Chuang-Ju^{1,2}, SHAN Xi-Shuang^{1,2,3}, YUE Hua-Mei¹, RUAN Rui¹ and WEI Qi-Wei¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture of China, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China; 2. College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China)

Abstract: In this study, Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) mature growth hormone (GH) cDNA sequence was constructed with prokaryotic expression vector pET-32a and transfected into *E. coli* BL21 (DE3). Recombinant *A. dabryanus* GH protein (rAdGH) was expressed in *E. coli* cells as an inclusion body. The purified rAdGH were used as a feed additive to determine the effects of rAdGH on growth, blood biochemistry, and body composition of Dabry's sturgeon for an eight-weeks experiment with four groups including control group (0), low-treated group (10 mg/kg), middle-treated group (50 mg/kg), and high-treated group (100 mg/kg). Results showed that the complementary rAdGH improved weight gain rate, feed efficiency, hepatosomatic index, viscera index and growth performance in the low-treated group. In addition, the low level of rAdGH treatment promoted almost all blood indexes except blood glucose. Suitable level of exogenous GH improved the content of protein and moisture in the liver and muscle, and reduced the fat content in the liver and muscle. In general, its effects on growth and metabolism were dosage-dependent. Low level rAdGH treatment significantly improved the metabolism and growth of fish, and promoted deposition of liver protein and fat consumption. However, a higher dose induced metabolic disease, inhibited growth performance, triggered liver damage and changed components. These results suggest that the recombinant GH would benefit the application of recombinant GH in sturgeon culture.

Key words: *Acipenser dabryanus*; Prokaryotic expression; Recombinant GH protein; Growth performance; Index of blood biochemistry; Body composition