

邹家明,何珊,梁旭方,等. 脑室注射和饲料缺乏组氨酸或缬氨酸对翘嘴鲌摄食的调控作用[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(2): 168-175.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.02.020

脑室注射和饲料缺乏组氨酸或缬氨酸 对翘嘴鲌摄食的调控作用

邹家明,何珊,梁旭方,朱强胜

华中农业大学水产学院/华中农业大学鳊鱼研究中心/
长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心,武汉 430070

摘要 为研究中枢神经对营养物的直接感知及外周组织的间接感知,以翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)为试验对象,通过脑室注射和饲料缺乏方式探索组氨酸或缬氨酸对翘嘴鲌摄食的影响。脑室注射试验中,对照组注射磷酸盐缓冲液(PBS),试验组注射组氨酸或缬氨酸或同时注射一般性调控阻遏蛋白激酶2 (general control non-repressible-2, GCN2)的抑制剂GCN2iB,检测注射后1 h和4 h翘嘴鲌的摄食量变化。饲料缺乏试验中,对照组投喂氨基酸完全饲料,试验组投喂组氨酸或缬氨酸缺乏饲料,检测翘嘴鲌的摄食量、GCN2信号通路相关因子及食欲基因的变化。结果显示,与对照组相比,注射组氨酸或缬氨酸均显著降低了翘嘴鲌的摄食量;同时注射GCN2iB和组氨酸可使翘嘴鲌的摄食量恢复至正常水平。与对照组相比,投喂缺乏组氨酸或缬氨酸的饲料,翘嘴鲌的摄食量显著减少,且GCN2信号通路下游激活转录因子4 (activating transcriptional factor 4, *atf4*) mRNA表达水平显著降低,下丘脑中食欲因子神经肽Y基因(neuropeptide Y, *npY*)的mRNA表达水平显著降低,但小鼠相关蛋白(agouti-related protein, *agrp*)、促黑素细胞皮质素原(pro-opiomelanocortin, *pomc*)、可卡因-苯丙胺转录调节肽(amphetamine-regulated transcript, *cart*)基因的mRNA表达水平无显著变化。综上所述,组氨酸和缬氨酸通过脑室注射和饲料缺乏的方式均可抑制翘嘴鲌摄食,且翘嘴鲌摄食行为的变化与GCN2信号通路有关,饲料缺乏组氨酸或缬氨酸可能是通过下调促食欲因子 npY 基因的表达起到抑食作用。

关键词 翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*); 氨基酸传感机制; GCN2信号通路; 食欲因子; 摄食调控

中图分类号 Q959.483; S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)02-0168-08

近年研究证据表明,鱼类中存在营养感应机制^[1-2],但氨基酸传感机制与食物摄入调控的关系尚不清楚。鱼类中关于氨基酸的研究,主要集中在亮氨酸和精氨酸,在肌肉和肝脏等外周组织,以及氨基酸水平变化对哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路的影响等方面^[3-4]。有关鱼类中组氨酸和缬氨酸通过下丘脑信号整合调节食物摄入的研究较少^[5]。组氨酸是合成组胺的前体,在鱼类中含量丰富,是水产动物饲料中不可或缺的一种必需氨基酸^[5]。缬氨酸属于支链氨基酸,是参与蛋白合成与代谢的重要成分之一。氨基酸代谢受损会改变摄食行为并调节下丘脑中的食欲神经肽表达^[6]。此外,鱼类摄食的调控是通过中枢摄食系统和外周饱食系统协同作用实现的。脑室注射

氨基酸后会直接引起鱼类中枢系统对脑室氨基酸水平的感知从而传递摄食控制信号^[7-8],而鱼类摄食剥夺或缺乏氨基酸的饲料会间接刺激机体外周系统对营养信号的感知进一步调节饲料的摄入^[3,9]。下丘脑中GCN2信号通路是大多数真核生物中保守的氨基酸信号传感途径,可通过感知胞内氨基酸水平,调节下游Eif2 α 磷酸化并激活转录因子 $atf4$,进而调节动物的摄食^[10-11]。此外,下丘脑神经系统中的两类重要神经元(NPY/AGRP促食欲神经元和POMC/CART抑食欲神经元)可根据机体的营养状况整合摄食控制信号,调节动物的摄食行为^[12]。

对于试验对象翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*),笔者所在课题组前期已采用脑室注射的方式开展相关研究^[7-8],证明此方法具有可行性。为了研究中枢神经

收稿日期: 2021-10-22

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32172951)

邹家明, E-mail: 1790638413@qq.com

通信作者: 何珊, E-mail: heshan@mail.hzau.edu.cn

的直接信号感知以及外周组织的间接信号感知,本研究通过脑室注射组氨酸和缬氨酸和饲料缺乏组氨酸和缬氨酸2种方式来探索这2种氨基酸对翘嘴鲌摄食的影响,以及GCN2信号通路和食欲因子在其中可能存在的调控作用,以期完善必需氨基酸调控翘嘴鲌摄食的机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用翘嘴鲌及其饵料鱼麦鲢(0.37 ± 0.05 g)均由华中农业大学鳊鱼研究中心提供。翘嘴鲌人工配合饲料原料购自武汉高龙公司,饲料级氨基酸原料购自上海源叶生物科技有限公司,细胞级L-组氨酸、L-缬氨酸(晶体氨基酸)购自Sigma-Aldrich公司,GCN2抑制剂GCN2iB购自MCE公司。

1.2 试验分组及处理

1) 脑室注射试验。筛选40尾体表无伤、摄食状态优良的翘嘴鲌,平均质量(40 ± 4) g,随机分为4组,每组10尾,每个水族缸($50 \text{ cm} \times 40 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$)投放1尾翘嘴鲌。正式试验前在循环水系统中暂养1周,每天2次饱食投喂,记录摄食的饵料鱼数量以供正式试验时饵料鱼的投放数作参考。正式试验时,24 h饥饿处理后用MS-222将翘嘴鲌麻醉,选用10 μL 量程的微量注射器进行脑室注射,脑室注射方法参照文献[8]。氨基酸溶于PBS、注射剂量参照文献[8],GCN2抑制剂GCN2iB参照试剂说明溶于二甲基亚砜(DMSO)。试验设空白对照组、氨基酸注射组、GCN2iB抑制组和药物对照组。其中空白对照组注射2 μL DMSO 30 min后再注射2 μL PBS,氨基酸组注射2 μL DMSO 30 min后再注射20 μg (溶于2 μL PBS)的L-组氨酸、L-缬氨酸,抑制剂组注射10 μg GCN2iB (溶于2 μL DMSO) 30 min后再注射20 μg (溶于2 μL PBS)的L-组氨酸、L-缬氨酸,药物对照组注射10 μg GCN2iB (溶于2 μL DMSO) 30 min后再注射2 μL PBS。注射后15 min内翘嘴鲌恢复正常运动,每缸投放30尾饵料鱼,统计注射后1 h及4 h各组累计摄食量。

2) 饲料驯饲试验。200尾翘嘴鲌平均质量为(250 ± 10) g,暂养至水泥池中,筛选108尾大小规格一致、体表无伤、摄食状态优良的翘嘴鲌随机分为3组(对照组、组氨酸缺乏组、缬氨酸缺乏组),每组6个网箱,每个网箱($100 \text{ cm} \times 100 \text{ cm} \times 100 \text{ cm}$)投放6尾翘嘴鲌,网箱内水温维持在(26 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。饲料驯饲试

验前1周,采用对照组饲料投喂使试验鱼的生理状态趋于同一水平,各组饲料成分含量见表1、表2。其中,鱼粉中含64.5%粗蛋白和8.6%粗脂肪;酪蛋白中含88.7%粗蛋白和0.8%粗脂肪;淀粉中含0.3%粗蛋白和0.2%粗脂肪;鱼油中含98%粗脂肪;大豆油中含98%粗脂肪。维生素预混料的成分为(每千克饲料):胆碱,1 000 mg;肌醇,600 mg;维生素A,40 mg;维生素D,60 μg ;维生素C,210 mg;维生素E,200 mg;维生素K,10 mg;维生素B₆,20 mg;维生素B₁₂,0.1 mg;烟酸,200 mg;泛酸,50 mg;叶酸,10 mg;硫胺素,15 mg;核黄素,25 mg;生物素,3.2 mg。矿物质预混料(每千克饲料):CaHPO₄,94.9 g;KCl,7.1 g;MgSO₄,4.6 g;NaCl,3.8 g;CuSO₄,39.1 mg;FeSO₄,455.4 mg;ZnSO₄,220.3 mg;MnSO₄,39.9 mg;Na₂SeO₃,2.0 g;KI,1.4 mg;Na₂MoO₄,0.4 mg;CoSO₄,0.1 mg;KF,0.8 mg。氨基酸预混料中含86.27%粗蛋白。

表1 试验饲料成分

Table 1 Ingredients of experimental feed %			
项目 Item	对照 Control	组氨酸缺乏 His ^{-/-}	缬氨酸缺乏 Val ^{-/-}
原料 Ingredients			
鱼粉 Fish meal	33	33	33
酪蛋白 Casein	10	10	10
淀粉 Corn starch	8	8	80
鱼油 Fish oil	4	4	4
大豆油 Soybean oil	4	4	4
三藻胶 Alginates	4	4	4
微晶纤维 Microcrystalline cellulose	9	9	9
维生素预混料 Vitamin premix	2	2	2
矿物质预混料 Mineral premix	2	2	2
氨基酸预混料 Amino acid premix	24	24	24
总计 Total	100	100	100
成分 Compositions			
粗蛋白 Crude protein	50.93	51.11	50.42
粗脂肪 Crude lipid	10.77	10.77	10.77
干物质 Dry matter	56.64	56.64	56.64
灰分 Ash	4.62	4.62	4.62

每天2次饱食投喂,分别在上午8:00和下午5:00,且每次在固定点喂食,选用滴水、流水等作为投喂信号。为防止饲料过于硬,在投饲前喷洒池水,以改善饲料口感。正式试验中,提前24 h饥饿处理

表2 氨基酸预混料成分
Table 2 Compositions of amino acid premix %

成分 Compositions	对照 Control	组氨酸缺乏 His ^{-/-}	缬氨酸缺乏 Val ^{-/-}
苏氨酸 Threonine	4.85	4.85	4.85
胱氨酸 Cystine	0.79	0.79	0.79
缬氨酸 Valine	4.49	4.49	0.00
甲硫氨酸 Methionine	3.07	3.07	3.07
异亮氨酸 Isoleucine	4.75	4.75	4.75
亮氨酸 Leucine	8.93	8.93	8.93
酪氨酸 Tyrosine	3.35	3.35	3.35
苯丙氨酸 Phenylalanine	4.33	4.33	4.33
赖氨酸 Lysine	8.11	8.11	8.11
组氨酸 Histidine	2.27	0.00	2.27
精氨酸 Arginine	6.53	6.53	6.53
色氨酸 Tryptophan	0.85	0.85	0.85
天门冬氨酸 Aspartic acid	10.83	10.83	10.83
脯氨酸 Proline	3.10	3.10	3.10
丝氨酸 Serine	4.08	4.08	4.08
谷氨酸 Glutamic acid	18.14	18.14	18.14
甘氨酸 Glycine	4.93	4.93	4.93
丙氨酸 Alanine	6.60	8.87	11.09
总计 Total	100.00	100.00	100.00

后,对照组投喂氨基酸完全饲料,组氨酸缺乏组投喂组氨酸缺乏饲料,缬氨酸缺乏组投喂缬氨酸缺乏饲料,每组投饲30 min后,待80%的翘嘴鲌不摄食则停止投喂,计算摄入饲料颗粒数。每2次试验之间间隔3 d,期间用对照组饲料投喂以恢复各组翘嘴鲌生理状态。

1.3 总RNA提取及q-PCR分析

依据生产商的试剂说明,使用Trizol Reagent (TaKaRa公司)提取翘嘴鲌下丘脑组织总RNA。然后使用多重检测酶标仪(BioTek, Winooski, USA)检测总RNA浓度后,-80℃保存样品。依据产品说明书,使用Hiscript II Q RT SuperMix for qPCR逆转录试剂盒(诺唯赞,南京)将总RNA(1 μg)逆转录为cDNA,置于-20℃短期保存。

在鳃基因组数据库中检索相关基因的全长序列,由Primer Premier 5.0软件设计荧光定量引物。目的基因的表达量使用MyiQTM 2双色实时PCR检测系统(Bio-Rad, Hercules, USA)进行检测。mRNA的扩增程序为95℃3 min预变性,然后在95℃变性30 s,退火30 s,设置40个循环。熔解曲线分析从65℃开始,0.5℃/6 s逐渐增加至95℃,以验证PCR反应的特异性。*rp113a*作为内部对照基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算法量化目的基因的相对表达水平。各基因的PCR引物序列等信息详见表3。

表3 实时荧光定量PCR引物
Table 3 Primer sequences used for RT-PCR

基因 Genes	引物序列(5'-3') Primer sequences	退火温度/℃ Anneal temperature	扩增效率/% E-values	相关系数 R ²
<i>rp113a</i>	F: TATCCCCCACCTAT-GACA R: ACGCCCAAGGAGAGC-GAACT	59	97.7	0.995
<i>npy</i>	F: GGAAGGATACCCGGT-GAAA R: TCTTGACTGTGGAATC-GTG	53	95.4	0.993
<i>agrp</i>	F: GAGCCAAGCGAAGAC-CAGA R: GCAGCACGGCAAAT-GAGAG	60	99.4	0.978
<i>pomc</i>	F: TGTTAGTGGTGGTGAT-GGC R: CTGTCGCTGT-GGGCTTTC	58	104.0	0.990
<i>cart</i>	F: CTGCTGTCCGTCATTT-GTCAC R: TGGGAT-GCTTCCTCTTTTCTC	60	109.8	0.998
<i>atf4</i>	F: GGACCAAGAT-GAAGAAGAAGC R: CAGCCAGTGGAGCGA-GA	58	94.1	0.975

1.4 Western blotting

下丘脑组织使用含1% PMSF和1%去磷酸化酶抑制剂的1×RIPA蛋白裂解液(碧云天,中国)获取总蛋白。在4℃下以12 000 r/min离心10 min后,收集上清液并使用BCA蛋白浓度测定试剂盒(翊圣,上海)检测蛋白质浓度。按比例添加5×SDS蛋白上样缓冲液(碧云天,中国),混匀后于95℃高温变性10 min。取等量变性后的蛋白于10% SDS-PAGE中电泳分离条带,采用湿式转印系统(Bio Rad, USA)将蛋白转印至PVDF膜(Millipore, USA)。1×TBST(含0.1% Tween 20)洗膜2次后,在含10%脱脂奶粉的封闭液中室温封闭4 h,然后4℃过夜孵育一抗。目的抗体为P-eIF2a(1:1 000, CST)、ATF4(1:1 000, CST)、P-S6(1:1 000, CST),内参抗体选用β-tubulin(1:2 000, Bioss)。一抗4℃过夜孵育结束后,1×TBST(含0.1% Tween 20)洗膜2次,二抗室温孵育1 h。二抗选用Goat-anti-rabbit(1:30 000, CST)、Goat-anti-Mouse(1:15 000, CST)。1×TBST(含0.1% Tween 20)洗膜4次后,于扫描仪(Licor Odyssey, USA)中显影成像,用Image J软件进行条带分析。

1.5 数据分析

所有值均表示为“平均值±标准误”。SPSS 22.0软件进行数据的统计分析,使用独立样本 t 检验比较两组数据之间的差异,使用单因素方差分析(ANOVA)和Duncan's多重比较分析单变量多组数据,使用双因素方差分析(ANOVA)和Duncan's多重比较分析双变量多组数据。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

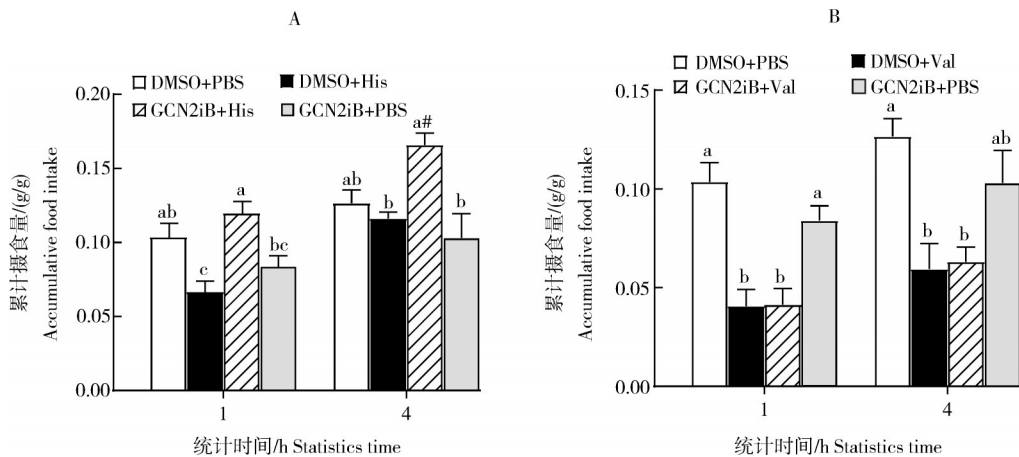
2.1 脑室注射组氨酸或缬氨酸对翘嘴鲈摄食的影响

经统计分析脑室注射组别与摄食统计时间对翘嘴鲈摄食量的影响无交互性($P > 0.05$)。与空白对照组(DMSO+PBS)相比,注射20 μg 组氨酸或缬氨酸1 h后均能显著降低翘嘴鲈的摄食量($P < 0.05$),注射组氨酸4 h后对翘嘴鲈的摄食量无影响($P >$

0.05),而注射缬氨酸4 h后能够显著降低翘嘴鲈的摄食量($P < 0.05$)。此外,注射10 μg GCN2iB,可使注射组氨酸1 h后降低的摄食水平恢复,但对注射缬氨酸引起的摄食降低无恢复作用($P > 0.05$)。同时注射10 μg GCN2iB和20 μg 组氨酸时,4 h组摄食量显著高于1 h组($P < 0.05$)(图1)。

2.2 饲料中缺乏组氨酸或缬氨酸对翘嘴鲈摄食的影响

试验一共开展5次独立的摄食量统计,且每2次试验之间间隔3 d,间隔期间投喂对照组饲料以恢复各组翘嘴鲈的生理水平。结果显示,与对照组饲料相比,翘嘴鲈对缺乏组氨酸或缬氨酸的饲料单次实验摄食量整体呈降低的趋势(图2A、B),而且对缺乏组氨酸或缬氨酸的饲料累计摄食量极显著减少($P < 0.01$)(图2C、D)。



含有不同字母的组别之间存在显著差异($P < 0.05$),图3、4同。#表示同一组别在1 h、4 h差异显著。Significant differences between groups are shown in the form of different letters ($P < 0.05$), the same as Fig.3, Fig.4. # indicates significant differences in the same group at 1 h and 4 h.

图1 脑室注射组氨酸(A)或缬氨酸(B)后翘嘴鲈的累计摄食量

Fig.1 Accumulative food intake of Chinese perch after ICV administration with histidine (A) or valine (B)

2.3 饲料中缺乏组氨酸或缬氨酸对翘嘴鲈下丘脑GCN2信号通路的影响

与对照组相比,翘嘴鲈摄食缺乏组氨酸或缬氨酸的饲料后,下丘脑中GCN2信号通路下游转录因子 $atf4$ 的基因表达显著降低($P < 0.05$)(图3A),但 $P-eif2\alpha$ 的蛋白水平无显著性差异($P > 0.05$)(图3B、C)。

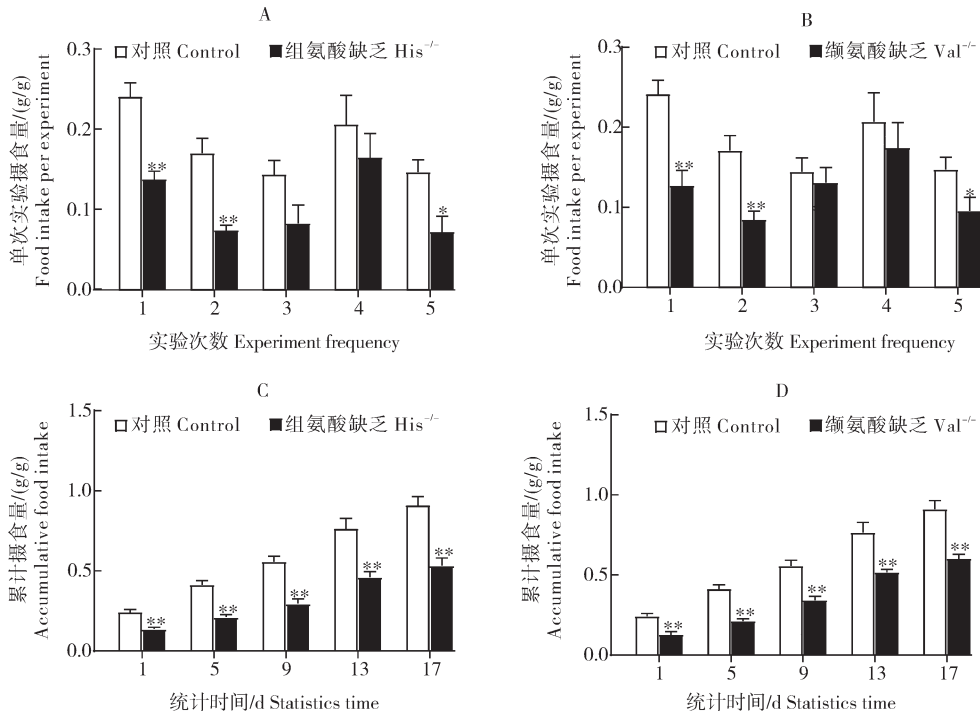
2.4 饲料中缺乏组氨酸或缬氨酸对翘嘴鲈下丘脑食欲基因的影响

翘嘴鲈摄食缺乏组氨酸或缬氨酸的饲料后,其下丘脑食欲基因的表达变化如图4所示。与对照组相比,翘嘴鲈摄食缺乏组氨酸或缬氨酸的饲料后下

丘脑 npv 、 $agrp$ 基因的mRNA表达水平呈现下降的趋势(图4A、B),且 npv 基因的mRNA表达水平受到显著下调($P < 0.05$)(图4A),而 $pomc$ 、 $cart$ 基因的mRNA表达水平呈现上升的趋势(图4C、D)。

3 讨论

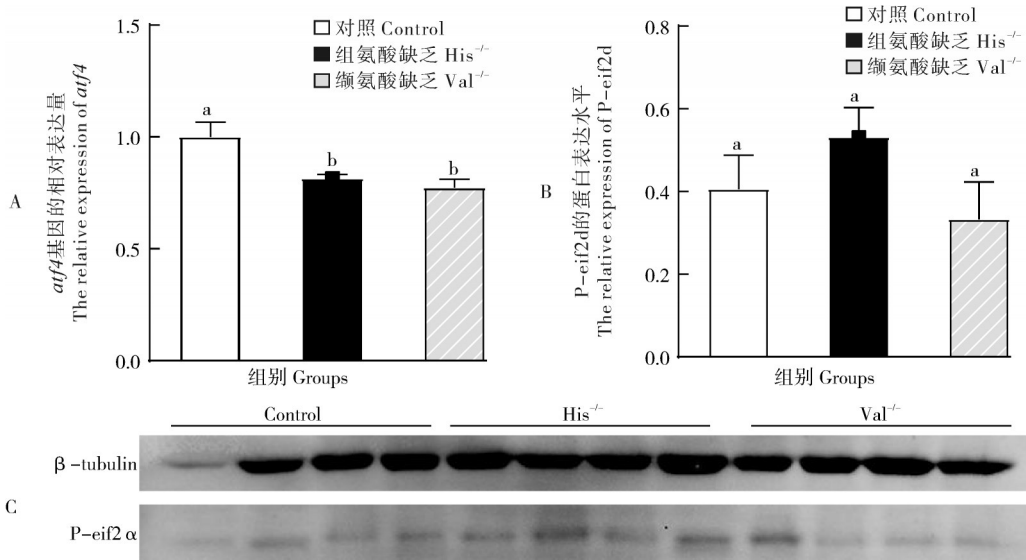
氨基酸是参与机体合成代谢的重要物质,食物中氨基酸的丰度一定程度上影响了动物对食物的摄入量。本研究结果显示,脑室注射20 μg 组氨酸或缬氨酸1 h后,翘嘴鲈的摄食量显著降低,表明脑室组氨酸或缬氨酸浓度的升高可在短时间内迅速抑制食物的摄入。这与虹鳟脑室注射亮氨酸后摄食减



*表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$). * indicated significant difference ($P < 0.05$), ** indicated extremely significant difference ($P < 0.01$). A, B: 单次实验摄食量; C, D: 累计摄食量. A, B: Food intake per experiment; C, D: Accumulative food intake.

图2 翘嘴鲈对缺乏组氨酸或缬氨酸饲料的摄食量

Fig.2 Food intake of Chinese perch on deprived feed of histidine or valine



A: *atf4*; B, C: P-eif2α.

图3 翘嘴鲈摄食缺乏组氨酸或缬氨酸饲料后下丘脑P-eif2α和 *atf4* 表达量

Fig.3 Expression of P-eif2α and *atf4* in hypothalamus after ingesting deprived feed of histidine or valine in Chinese perch

少^[13]、大鼠腹腔注射组氨酸2 h后其食物摄入量受到抑制^[14]的结果一致。而这也也许是因为一种氨基酸的浓度过高会影响其他氨基酸的吸收效率,从而间接影响鱼类的摄食生长^[15]。此外,本研究发现同时注

射氨基酸感知通路关键因子 GCN2 的抑制剂 GCN2iB 和组氨酸 1 h 后会使得翘嘴鲈下降的摄食水平恢复,表明 GCN2 信号通路被抑制后,组氨酸将无法发挥抑食作用。但 GCN2 信号通路被抑制 4 h 后,脑

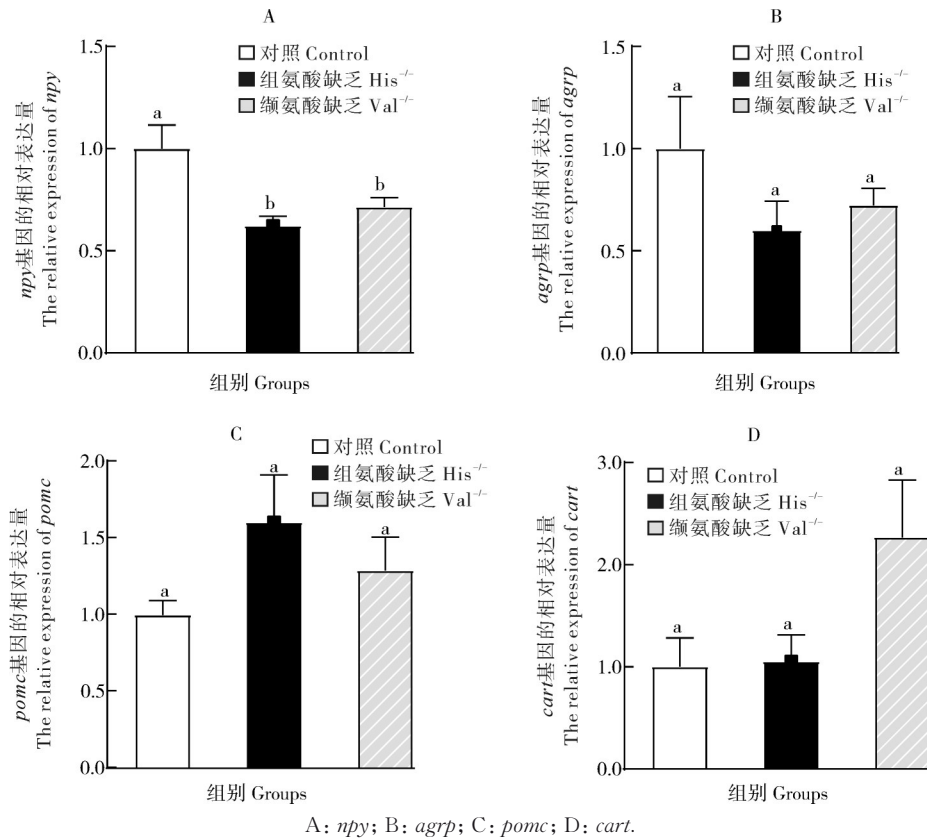


图4 翘嘴鲈摄食缺乏组氨酸或缬氨酸饲料后下丘脑食欲基因的表达变化

Fig.4 Expression changes of appetite genes in the hypothalamus after ingesting deprived feed of histidine or valine in Chinese perch

室注射缬氨酸的抑食作用依然存在,可能因为缬氨酸作为支链氨基酸还受到了mTOR信号通路的调控^[8]。以上结果表明,GCN2信号通路可能参与了脑室注射组氨酸抑制翘嘴鲈摄食行为的调节。

动物通常会拒绝必需氨基酸缺乏的食物,这是一种适应性行为^[16],食欲降低、生长缓慢、饲料利用率低是鱼类氨基酸不足的主要症状^[17]。本研究对翘嘴鲈投喂缺乏组氨酸或缬氨酸的饲料,结果显示翘嘴鲈会显著减少对缺乏组氨酸或缬氨酸饲料的摄入。类似地,大黄鱼摄食缺乏蛋氨酸的饲料后,其食欲减弱、摄食量降低^[18]。用缺乏缬氨酸的饮食喂食大鼠,发现大鼠产生了严重的厌食症(食物摄入量减少80%)^[19]。动物会减少单一必需氨基酸缺乏食物的摄入量,血清中所含有的该种必需氨基酸水平降低,而整体或其他氨基酸水平增加,缺乏非必需氨基酸不会导致动物体内氨基酸的消耗^[20]。因此,本研究组氨酸或缬氨酸缺乏饲料可能引起血液中氨基酸失衡,而这也许导致翘嘴鲈对该氨基酸缺乏食物的拒食。此外,前梨状皮质(anterior piriform cortex, APC)中的神经元能够直接感知食物摄入后血液中

氨基酸失衡从而迅速激活蛋白激酶GCN2^[21]。小鼠摄食必需氨基酸缺乏的膳食后,GCN2可识别必需氨基酸的消耗,并引起饮食拒绝及相应的适应性策略^[22]。然而,本研究结果显示翘嘴鲈摄食缺乏组氨酸或缬氨酸的饲料后,下丘脑GCN2信号通路Eif2 α 蛋白磷酸化水平无显著变化,但下游atf4基因表达受到显著性抑制。有研究表明,氨基酸缺乏对于atf4的激活存在定时调控,即长时间的氨基酸缺乏会引起atf4活性的降低以恢复机体整体蛋白的合成^[23]。因此,本研究结果可能是因为取样的时间点存在滞后产生的。但饲料中缺乏组氨酸或缬氨酸引起的摄食抑制与GCN2信号通路仍存在相关性。

中枢神经系统是动物摄食的主要调节器,接受外周刺激,感受血液中的营养和激素信号,影响中枢食欲因子的表达,最终调节摄食量。有研究表明不平衡氨基酸饮食摄入对脑中氨基酸浓度的影响主要集中在下丘脑区域^[24],NPY/AGRP和POMC/CART神经元则是下丘脑中参与摄食调控的一级神经元^[25]。因此,为了进一步研究翘嘴鲈下丘脑对氨基酸不平衡饮食的响应,我们检测了4种食欲因子的

mRNA 表达水平,结果显示,与对照组相比,翘嘴鲌摄食缺乏组氨酸或缬氨酸的饲料后下丘脑食欲因子 *npv* 基因的 mRNA 表达水平显著降低,但 *agrp*、*pomc*、*cart* 基因的 mRNA 表达水平无显著变化。笔者所在课题组以往研究结果表明组氨酸引起翘嘴鲌摄食减少与 *npv* 基因的表达降低有关^[7]。类似地,大鼠与小鼠喂食缬氨酸缺乏饮食后,*npv* 基因的 mRNA 表达水平也有降低的趋势^[26]。以上结果表明饲料中缺乏组氨酸或缬氨酸可能通过下调 *npv* 基因的表达从而抑制翘嘴鲌的摄食量。

综上所述,组氨酸和缬氨酸通过脑室注射和饲料缺乏的方式均可抑制翘嘴鲌摄食,且与 GCN2 信号通路有关,饲料缺乏组氨酸或缬氨酸可能通过下调促食欲因子 *npv* 基因的表达起到抑食作用。

参考文献 References

- [1] KAUSHIK S J, SEILIEZ I. Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs [J]. *Aquaculture research*, 2010, 41(3): 322-332.
- [2] CONDE-SIEIRA M, SOENGAS J L. Nutrient sensing systems in fish: impact on food intake regulation and energy homeostasis[J/OL]. *Frontiers in neuroscience*, 2016, 10: 603[2021-10-22].<https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00603>.
- [3] XU D D, HE G, MAI K S, et al. Postprandial nutrient-sensing and metabolic responses after partial dietary fishmeal replacement by soyabean meal in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *The British journal of nutrition*, 2016, 115(3): 379-388.
- [4] TU Y Q, XIE S Q, HAN D, et al. Dietary arginine requirement for gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III) reduces with fish size from 50 g to 150 g associated with modulation of genes involved in TOR signaling pathway [J]. *Aquaculture*, 2015, 449: 37-47.
- [5] 周凡, 邵庆均. 鱼类必需氨基酸营养研究进展 [J]. *饲料与畜牧*, 2010(8): 20-26. ZHOU F, SHAO Q J. Research progress on essential amino acid of nutrition in fish [J]. *Feed and husbandry*, 2010(8): 20-26 (in Chinese).
- [6] PURPERA M N, SHEN L, TAGHAVI M, et al. Impaired branched chain amino acid metabolism alters feeding behavior and increases orexigenic neuropeptide expression in the hypothalamus [J]. *The journal of endocrinology*, 2012, 212(1): 85-94.
- [7] 朱强胜, 何珊, 梁旭方, 等. 组氨酸及组胺对鳊鱼摄食调控的影响 [J]. *华中农业大学学报*, 2020, 39(6): 180-186. ZHU Q S, HE S, LIANG X F, et al. Effect of histidine and histamine on feeding regulation of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2020, 39(6): 180-186 (in Chinese with English abstract).
- [8] CHEN K, ZHANG Z, HE S, et al. Different regulation of branched-chain amino acid on food intake by TOR signaling in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) [J/OL]. *Aquaculture*, 2021, 530: 735792[2021-10-22]. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735792>.
- [9] GÓMEZ-REQUENI P, DE VAREILLES M, KOUSOULAKI K, et al. Whole body proteome response to a dietary lysine imbalance in zebrafish *Danio rerio* [J]. *Comparative biochemistry and physiology part D: genomics and proteomics*, 2011, 6(2): 178-186.
- [10] MAURIN A C, BENANI A, LORSIGNOL A, et al. Hypothalamic eIF2 α signaling regulates food intake [J]. *Cell reports*, 2014, 6(3): 438-444.
- [11] HAO S, SHARP J W, ROSS-INTA C M, et al. Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex [J]. *Science*, 2005, 307(5716): 1776-1778.
- [12] MORTON G J, CUMMINGS D E, BASKIN D G, et al. Central nervous system control of food intake and body weight [J]. *Nature*, 2006, 443(7109): 289-295.
- [13] COMESANA S, VELASCO C, CEINOS R M, et al. Evidence for the presence in rainbow trout brain of amino acid-sensing systems involved in the control of food intake [J]. *American journal of physiology: regulatory, integrative and comparative physiology*, 2018, 314(2): 201-215.
- [14] SHEINER J B, MORRIS P, ANDERSON G H. Food intake suppression by histidine [J]. *Pharmacology biochemistry behavior*, 1985, 23(5): 721-726.
- [15] ALAM M S, TESHIMA S I, KOSHIO S, et al. Arginine requirement of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* estimated by growth and biochemical parameters [J]. *Aquaculture*, 2002, 205(1/2): 127-140.
- [16] CAO Y C, LIU S M, LIU K, et al. Molecular mechanisms relating to amino acid regulation of protein synthesis [J]. *Nutrition research reviews*, 2019, 32(2): 183-191.
- [17] GOFF J B, GATLIN D M. Evaluation of different sulfur amino acid compounds in the diet of red drum, *Sciaenops ocellatus*, and sparing value of cystine for methionine [J]. *Aquaculture*, 2004, 241(1/2/3/4): 465-477.
- [18] MAI K S, WAN J L, AI Q H, et al. Dietary methionine requirement of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R. [J]. *Aquaculture*, 2006, 253(1/2/3/4): 564-572.
- [19] GOTO S, NAGAO K, BANNAI M, et al. Anorexia in rats caused by a valine-deficient diet is not ameliorated by systemic ghrelin treatment [J]. *Neuroscience*, 2010, 166(1): 333-340.
- [20] KAMATA S, YAMAMOTO J, KAMIJO K, et al. Dietary deprivation of each essential amino acid induces differential systemic adaptive responses in mice [J]. *Molecular nutrition & food research*, 2014, 58(6): 1309-1321.
- [21] KOEHNLE T J, RUSSELL M C, MORIN A S, et al. Diets deficient in indispensable amino acids rapidly decrease the concentration of the limiting amino acid in the anterior piriform cortex of rats [J]. *The journal of nutrition*, 2004, 134(9): 2365-2371.
- [22] MAURIN A C, JOUSSE C, AVEROUS J, et al. The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores [J]. *Cell metabolism*, 2005, 1(4): 273-277.
- [23] CHEN H, PAN Y X, DUDENHAUSEN E E, et al. Amino

- acid deprivation induces the transcription rate of the human asparagine synthetase gene through a timed program of expression and promoter binding of nutrient-responsive basic region/leucine zipper transcription factors as well as localized histone acetylation[J]. The journal of biological chemistry, 2004, 279(49): 50829-50839.
- [24] GIETZEN D W, LEUNG P M, ROGERS Q R. Dietary amino acid imbalance and neurochemical changes in three hypothalamic areas[J]. Physiology & behavior, 1989, 46(3): 503-511.
- [25] SCHWARTZ M W, WOODS S C, PORTE D, et al. Central nervous system control of food intake[J]. Nature, 2000, 404(6778): 661-671.
- [26] ZHU X X, KRASNOW S M, ROTH-CARTER Q R, et al. Hypothalamic signaling in anorexia induced by indispensable amino acid deficiency[J]. American journal of physiology-endocrinology and metabolism, 2012, 303(12): E1446- E1458.

Regulatory effects of intracerebroventricular injection and deprived feed of histidine or valine on feeding of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)

ZOU Jiaming, HE Shan, LIANG Xufang, ZHU Qiangsheng

*College of Fisheries/Chinese Perch Research Center, Huazhong Agricultural University/
Ministry of Education Engineering Research Center for the Green Development of Bulk Aquatic Biological
Industry in the Yangtze River Economic Zone, Wuhan 430070, China*

Abstract The regulatory effects of intracerebroventricular (ICV) injection and deprived feed of histidine or valine on the feeding of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) were studied to explore the direct signal perception of the central nervous system and the indirect signal perception of the peripheral tissues. In the ICV injection test, the control group was injected with phosphate buffered saline (PBS), and the experimental group was injected with histidine or valine or simultaneously with an inhibitor of general control non-repressible-2 (GCN2) GCN2iB. The changes in food intake of Chinese perch at 1 h and 4 h after injection were detected. In the feed deprivation test, the control group was fed with amino acid complete feed and the experimental group was fed with deprived feed of histidine or valine. The changes in food intake, GCN2 signaling pathway-related factors and appetite genes were detected. The results showed that the injection of either histidine or valine significantly reduced the food intake of Chinese perch compared with the control group ($P < 0.05$). Simultaneous injection of GCN2iB and histidine restored the food intake of Chinese perch to normal levels. Compared with the control group, the intake of deprived feed of histidine or valine was significantly decreased ($P < 0.05$). Moreover, the mRNA expression of activating transcriptional factor 4 (*atf4*), a key activating transcription factor downstream of GCN2 signaling pathway, was significantly down-regulated ($P < 0.05$) in deprived feed of histidine or valine. The mRNA expression level of the appetite factor neuropeptide Y (*npY*) in the hypothalamus was significantly decreased ($P < 0.05$). However, there were no significant changes in the mRNA expression levels of agouti-related protein (*agrp*), pro-opiomelanocortin (*pomc*), and amphetamine-regulated transcript (*cart*) genes. In conclusion, both histidine and valine can inhibit the feeding behavior of Chinese perch via ICV administration and feed deprivation. The changes of feeding behavior of Chinese perch are related to the GCN2 signaling pathway. The deprived feed of histidine or valine might result in the anorexia by down-regulating the expression of appetite-stimulating factor *npY* gene.

Keywords Chinese perch (*Siniperca chuatsi*); amino-acid sensing mechanism; GCN2 signaling pathway; appetite factors; food control

(责任编辑:边书京)