

doi: 10.7541/2017.63

## 饲料脂肪水平对大菱鲂幼鱼TOR信号通路的影响

唐卓懿 崔坤 陈强 谭朋 廖凯 麦康森 艾庆辉

(中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 青岛 266003)

**摘要:** 研究旨在探究饲料脂肪水平对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)幼鱼雷帕霉素受体(TOR)信号通路的影响。以大菱鲂幼鱼[初始体重(8.6±0.01) g]为实验对象, 配制脂肪水平分别为11.69% (适宜脂肪组)和16.58% (高脂组)的2种等氮饲料在室内循环水系统中进行投喂实验, 养殖周期为97d。结果显示: (1)饲料脂肪水平升高对大菱鲂幼鱼存活和特定生长率(SGR)无显著影响( $P>0.05$ )。 (2)与适宜脂肪组相比, 肝脏中TOR和4EBP1 mRNA水平在高脂组上调( $P<0.05$ )而4EBP2 mRNA水平在高脂组下调( $P<0.05$ )。此外, 与适宜脂肪组相比, 肌肉中TOR和4EBP1 mRNA水平在高脂组下调( $P<0.05$ )而4EBP2 mRNA水平在高脂组无显著变化。 (3)饲料脂肪水平显著影响AKT、TOR和4EBPs磷酸化水平。肝脏中p-AKT (T308和S473)/AKT、p-mTOR(S2448)/mTOR和p-4EBP1 (T37/46)/4EBP1在高脂组显著高于适宜脂肪组, 而p-p70S6K (T389)/p70S6K在高脂组显著低于适宜脂肪组。肌肉中p-AKT (S473)/AKT、p-mTOR (S2448)/mTOR和p-4EBP1 (T37/46)/4EBP1在高脂组显著低于适宜脂肪组, 而p-p70S6K (T389)/p70S6K在高脂组显著高于适宜脂肪组。结果表明: 大菱鲂幼鱼肝脏和肌肉TOR、4EBP1和4EBP2的mRNA表达量与AKT、TOR、4EBP1和p70 S6K磷酸化受到饲料脂肪水平调控, 饲料脂肪水平升高, 激活了肝脏TOR信号通路, 同时肌肉TOR信号通路受到部分抑制。

**关键词:** 大菱鲂; 脂肪水平; 基因表达; 磷酸化; TOR信号通路

**中图分类号:** S963.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3207(2017)03-0491-06

雷帕霉素受体(TOR)信号通路是细胞感知营养物质并调控生长的主要通路, 在进化上极其保守。TOR是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 它包含了两个结构功能不同的复合物——mTORC1和mTORC2。在mTORC1激活后, 其下游主要作用因子4EBPs和S6K发生磷酸化。S6K的磷酸化促进了多种蛋白的转录激活和翻译起始延伸。磷酸化的4EBPs与真核生物翻译起始因子eIF-4E脱离, 激活后者, 使40S核糖体亚基与mRNA的5'端结合<sup>[1-3]</sup>, 启动蛋白质的翻译。

在哺乳动物中, TOR信号通路的研究已经非常广泛和深入<sup>[4]</sup>。在鱼类上, 以斑马鱼(*Danio rerio*)为模式生物, 研究发现TOR信号通路调控肠道上皮细胞形成、细胞自噬<sup>[5, 6]</sup>、心肌炎发生<sup>[7, 8]</sup>和非酒精脂肪肝的发生<sup>[9]</sup>等。此外, 在大菱鲂(*Scophthalmus*

*maximus*)<sup>[10]</sup>、建鲤(*Cyprinus carpio* var. *Jian*)<sup>[11-13]</sup>、军曹鱼(*Rachycentron canadum*)<sup>[14]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[15-19]</sup>和草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)<sup>[20, 21]</sup>中分别进行了饲料中精氨酸、色氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、油酸、胆碱水平以及豆粕替代鱼粉和不同蛋能比对TOR信号通路的调控作用的研究。

然而, 目前关于饲料中脂肪水平对养殖鱼类TOR信号通路的相关研究较少。大菱鲂肉质鲜美, 营养价值高, 经济价值高, 是我国重要养殖品种。在大菱鲂中, TOR信号通路受到饲料脂肪水平调控的研究目前尚未见报道。通过研究饲料脂肪水平对大菱鲂幼鱼TOR信号通路的影响, 有助于深入了解饲料脂肪对大菱鲂蛋白质合成调控的机理。

**收稿日期:** 2016-05-16; **修订日期:** 2016-11-04

**基金项目:** 国家重点基础研究发展计划(973计划)养殖鱼类蛋白质高效利用的调节机制(2014CB138600)资助 [Supported by Mechanisms of Protein Efficient Utilization in Farmed Fish, National Program on Key Basic Research Projects (973 Program) (2014CB138602)]

**作者简介:** 唐卓懿(1990—), 男, 广东韶关人; 硕士研究生; 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: tzypublic@163.com

**通信作者:** 艾庆辉, 教授; 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: qhai@ouc.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 实验过程与样品采集

配制粗蛋白含量为50%，粗脂肪含量分别为11.69%和16.58%的两种饲料(表1)。大菱鲂幼鱼购自山东青岛七好生物科技有限公司，在青岛鳌山卫国家海洋科研中心实验基地暂养15d后，饥饿24h。

表1 实验饲料的配方以及常规营养成分(%饲料干重)

Tab. 1 Formulation and proximate composition of the experimental diet (% dry matter)

原料Ingredient	饲料脂肪水平 Dietary lipid levels (%)	
	Diet1	Diet2
鱼粉Fish meal	50	50
豆粕Soybean meal	22	22
小麦粉Wheat flour	16.62	12.12
鱼油Fish oil	5	9.5
大豆卵磷脂Soybean lecithin	2	2
多维Vitamin premix	1	1
多矿Mineral premix	1	1
氯化胆碱Choline chloride	0.13	0.13
复合诱食剂Phagostimulant mix	1	1
海藻酸钠Sodium alginate	1	1
乙氧基喹啉Ethoxyquin	0.05	0.05
三氧化二钇Yttrium (III)-oxide	0.1	0.1
丙酸钙Calcium propionate	0.1	0.1
总计Total	100	100
粗蛋白Crude protein	50.04	50.01
粗脂肪Crude lipid	11.69	16.58

注: 1. 所有原料均为七好生物科技有限公司提供; 2. 维生素预混物(mg or g/kg diet): VD3, 5 mg; VA醋酸酯, 32 mg; 硫胺素 25 mg; VB12(1%), 10 mg; VB2, 45 mg; VB6, 20 mg; VC, 2000 mg; VE (50%), 240 mg; 亚硫酸氢钠甲萘醌(MSB), 10 mg; 泛酸钙, 60 mg; 肌醇, 800 mg; 尼克酸, 200 mg; 叶酸, 20 mg; 生物素(2%), 60 mg; 氯化胆碱(50%), 4000 mg; 微晶纤维素, 12.47 g; 3. 矿物质预混物(mg or g/kg diet): CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 10 mg; Ca (IO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1%), 60 mg; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1%), 50 mg; FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 80 mg; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1200 mg; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 45 mg; NaSeSO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (1%), 20 mg; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 50 mg; CaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 10 g; zoelite, 8.485 g; 4. 诱食剂: 甘氨酸和甜菜碱; 5. 防霉剂: 含50%丙酸钙和50%富马酸

Note: 1. All those ingredients were supplied by Great Seven Biotechnology Co., Ltd, China; 2. Vitamin premix (mg or g/kg diet): cholecalciferol, 5 mg; retinol acetate, 32 mg; thiamin 25 mg; vitamin B12 (1%), 10 mg; riboflavin, 45 mg; pyridoxine HCl, 20 mg; ascorbic acid, 2000 mg; alpha-tocopherol (50%), 240 mg; vitamin K3, 10 mg; pantothenic acid, 60 mg; inositol, 800 mg; niacin acid, 200 mg; folic acid, 20 mg; biotin (2%), 60 mg; choline chloride (50%), 4000 mg; microcrystalline cellulose, 12.47 g; 3. Mineral premix (mg or g/kg diet): CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 10 mg; Ca (IO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1%), 60 mg; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1%), 50 mg; FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 80 mg; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1200 mg; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 45 mg; NaSeSO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (1%), 20 mg; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 50 mg; CaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 10 g; zoelite, 8.485 g; 4. Attractant: glycine and betaine; 5. Mold inhibitor: contained 50% calcium propionic acid and 50% fumaric acid

然后随机选取体质健壮、规格整齐、平均体重为(8.75±0.01)g的大菱鲂幼鱼随机分为2组, 每组6个重复, 每个重复30尾。将2组饲料分别与6个养殖桶随机匹配, 每日8:00和18:00各饱食投喂一次, 光照时间为12L:12D (7:30至19:30), 养殖周期97d。在实验结束后, 将实验鱼禁食24h, 每桶随机选6尾鱼, 取肝脏、肌肉保存于-80℃, 用作分析实验。

### 1.2 计算及统计方法

存活率(Survival rate, SR, %)=(初始实验鱼数量-死亡实验鱼数量)/初始实验鱼数量×100

特定生长率(Specific growth rate, SGR, %)= $[\ln(\text{实验鱼终末体重})-\ln(\text{实验鱼初始体重})]/\text{实验天数} \times 100$

### 1.3 总RNA提取及反转录

在液氮中研磨组织样本, 使用TaKaRa RNAiso Reagent提取组织样本总RNA, 用异丙醇法沉淀RNA, 凝胶电泳检测RNA质量。使用PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser (Perfect Real Time)(TaKaRa, Japan)进行反转录, 反转录结束后检测cDNA浓度, 并稀释到300 ng/μL, 置于-80℃冰箱中保存。

### 1.4 验证引物扩增效率

荧光定量PCR引物参考张凯凯<sup>[22]</sup>(表2)。通过验证, 选用RPSD (DQ848899.1)为内参基因。通过制作浓度标准曲线验证目标序列与内参序列的扩增效率一致性<sup>[23]</sup>。

### 1.5 实时定量PCR

使用TransStart Top Green qPCR SuperMix (TRANSGEN, China)试剂盒进行荧光定量反应。定量程序设定为: 94摄氏度预热30s; 设置循环为: 94摄氏度5s, 引物T<sub>m</sub>值15s, 72摄氏度10s, 共45个循环。相对表达量采用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>的方法计算。

### 1.6 Western Blot

称取适量肝脏和肌肉样品, 冰上匀浆。使用试剂盒(Beyotime Institute of Biotechnology, Jiangsu, China)测定蛋白浓度。使用裂解液稀释所得蛋白, 加入5×蛋白上样缓冲液, 煮沸, 离心。配置聚丙烯酰胺凝胶(TOR使用6%, 其余蛋白使用12%), 150 V室温电泳70min。室温下100 V转膜60min, 于5%脱脂奶粉TBST溶液中封闭, 洗膜。一抗4℃孵育过夜, 洗膜。二抗37℃孵育60min, 洗膜。使用碧云天化学发光试剂(BeyoECL Plus kit)处理PVDF膜后于暗盒中压片, 在暗室用X光片自动洗片机(SGSB GROUP CO. LTD, Shanghai, China)中显影, 得到相应条带。使用image J软件进行灰度分析。

表 2 荧光定量PCR所用引物序列  
Tab. 2 Primers used for real-time PCR

基因Gene	引物序列Primer sequence (5'-3')	
	正向Forward	反向Reverse
TOR	GCAGGAAGTACATGCGGTCT	GCTGGTTGGGGTCATAAGTG
4EBP1	CCGCAAGTTCCTACTGGAC	AGGCTTGCCATCGTGGTTGT
4EBP2	GACTCCACCAGCTCGTCTGC	CTGAGCATCATCACCGGTTG
RPSD	CTGCTGTTCCCTAAAGAGTTCG	GAGCCGTGTAGTTCAGGGTCT

注: TOR. 雷帕霉素受体; 4EBP1. 4E结合蛋白1; 4EBP2. 4E结合蛋白2; RPSD. RNA聚合酶亚基D

Note: 4EBP1. 4E binding protein 1; 4EBP2. 4E binding protein 2; TOR. Target of Rapamycin; RPSD. RNA polymerase II subunit D

## 2 结果

### 2.1 存活、生长

大菱鲆幼鱼存活率(均为100%)和特定生长率(分别为2.34%/d和2.28%/d)在处理组间无显著差异( $P>0.05$ , 表 3)。

### 2.2 肝脏和肌肉TOR信号通路相关基因mRNA表达量

在肝脏中, 高脂组TOR和4EBP1的mRNA水平显著高于适宜脂肪组( $P<0.05$ ), 而4EBP2表达量低于适宜脂肪组( $P<0.05$ ); 在肌肉中, TOR和4EBP1表达量在高脂组显著低于适宜脂肪组( $P<0.05$ ), 而4EBP2表达量在两组间无显著差异( $P>0.05$ , 图 1)。

### 2.3 肝脏和肌肉TOR信号通路相关蛋白磷酸化水平变化

在肝脏中, 与适宜脂肪组相比, p-AKT (Thr308)/AKT、p-AKT (Ser473)/AKT、p-TOR (Ser2448)/TOR和p-4EBP1 (Thr37/46)/4EBP1蛋白水平在高脂组显著上调( $P<0.05$ ), 而p-p70 S6K (Thr389)/p70 S6K蛋白水平在高脂组显著下调( $P<0.05$ )。在肌肉中, 与适宜脂肪组相比, p-AKT (Thr308)/AKT和p-p70 S6K (Thr389)/p70 S6K蛋白水平在高脂组显著上调, 而p-AKT (Ser473)/AKT、p-TOR (Ser2448)/TOR和p-4EBP1 (Thr37/46)/4EBP1蛋白水平在高脂组显著

表 3 饲料脂肪水平对大菱鲆成活率(%) and 特定生长率(SGR) (%/d) 的影响(平均值±标准误,  $n=6$ )

Tab. 3 Effects of dietary lipid levels on the survival rate (%) and specific growth rate (SGR) (%/d) of juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) (means±SEM,  $n=6$ )

饲料脂肪水平 Dietary lipid levels (%)	存活率 Survival rate (%)	特定生长率 Specific growth rate (%)
Diet1 (L11.69)	100.00±0.00	100.00±0.00
Diet2 (L16.58)	2.34±0.07	2.28±0.06

注: 同行数值上标不同字母表示差异显著( $P<0.05$ ; 独立样本 $t$ 检验)

Note: Means in the same row with different superscripts indicate significant different ( $P<0.05$ ; independent-samples  $t$  test)

下调( $P<0.05$ )(图 2)。

## 3 讨论

目前, 鱼类TOR和4EBPs的mRNA表达量受饲料脂肪水平调控的研究目前尚未见报道。本研究发现大菱鲆幼鱼肝脏和肌肉TOR、4EBP1和4EBP2的mRNA表达量受到饲料脂肪水平调控。研究结果显示: 在肝脏中, 高脂组TOR和4EBP1的mRNA水平显著高于适宜脂肪组, 而4EBP2表达量低于适宜脂肪组; 在肌肉中, TOR和4EBP1的mRNA水平在高脂组低于适宜脂肪水平组, 4EBP2 mRNA水平在高脂组无显著变化。与本研究类似, 在建鲤中的研究发现, 饲料胆碱水平调控肝脏、肌肉、脾脏和头肾的TOR和4EBP2 mRNA表达量<sup>[11, 13]</sup>, 许丹丹<sup>[24]</sup>的研

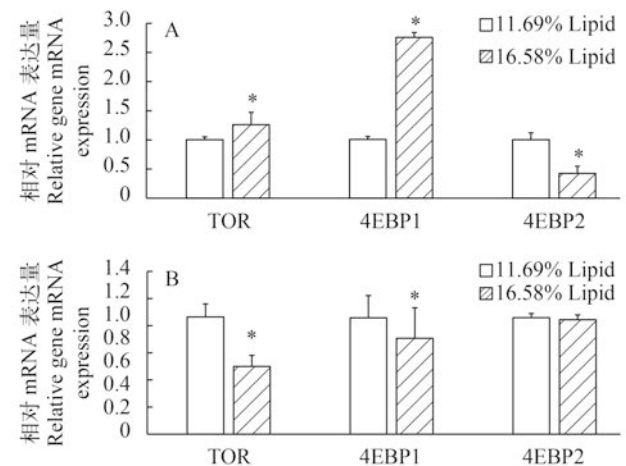


图 1 大菱鲆幼鱼不同组织TOR和4EBP1/2的mRNA表达量  
Fig. 1 Relative mRNA level of TOR and 4EBP1/2 in different tissues

A. 肝脏中相关基因表达; B. 肌肉中相关基因表达; 柱状图上标星号表示有显著差异( $P<0.05$ ; 独立样本 $t$ 检验)( $n=3$ ); TOR. 雷帕霉素受体; 4EBP1. 4E结合蛋白1; 4EBP2. 4E结合蛋白2

A. Related genes expression in liver. B. Related genes expression in muscle. Asterisk indicates significant differences ( $P<0.05$ ; independent-samples  $t$  test) among treatments ( $n=3$ ). TOR. Target of Rapamycin; 4EBP1. 4E binding protein 1; 4EBP2. 4E binding protein 2

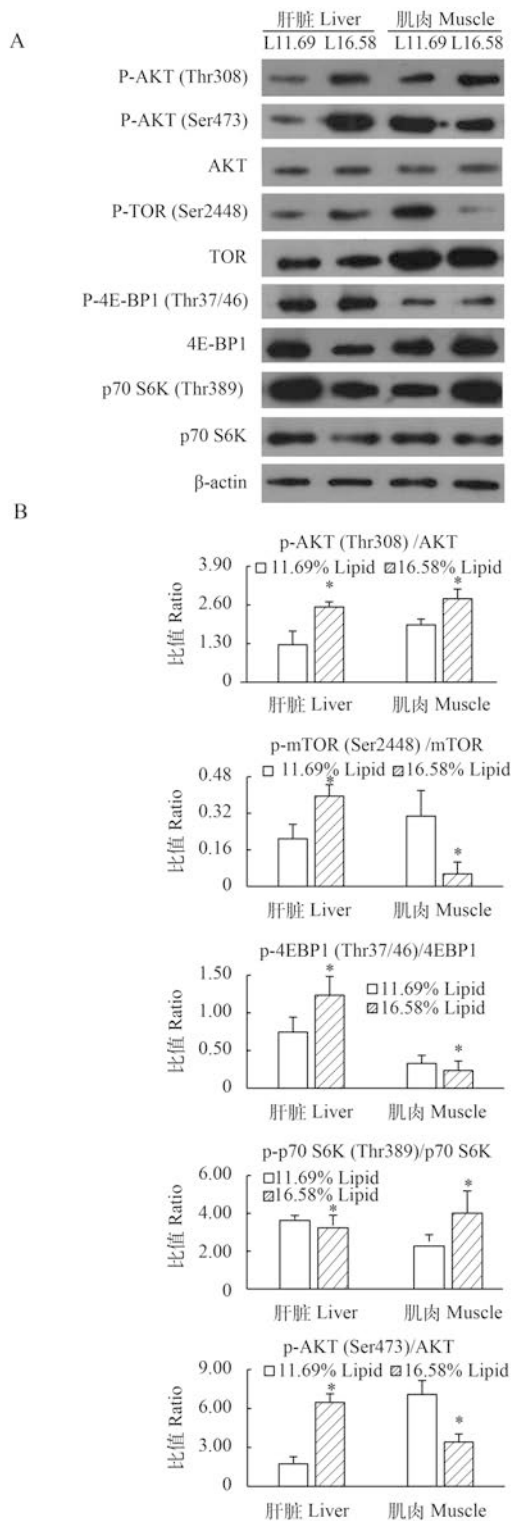


图2 大菱鲃TOR信号通路相关蛋白的蛋白印迹

Fig. 2 Western Blotting from tissues of turbot

A. 肝脏和肌肉中相关蛋白的蛋白印迹的代表图; B. 图A数据的定量分析; 柱状图上标星号表示有显著差异( $P < 0.05$ ), 独立样本 $t$ 检验)

A. Representative images of western blot from liver, muscle; B. Quantitative analysis of data from A. Asterisk indicates significant differences ( $P < 0.05$ ; independent-samples  $t$  test) among treatments ( $n=3$ )

究发现豆粕替代鱼粉影响大菱鲃幼鱼肠道4EBP1的mRNA表达而且4EBP1 mRNA表达量受摄食后取样时间点的影响。以上研究表明建鲤和大菱鲃幼鱼TOR和4EBPs的mRNA表达受到饲料营养素的调控。而在张凯凯<sup>[22]</sup>的研究中,支链氨基酸水平并未影响大菱鲃幼鱼肌肉TOR、4EBP1和4EBP2的mRNA表达;与张凯凯的研究类似,Luo等<sup>[14]</sup>的研究表明军曹鱼幼鱼TOR mRNA表达量不受饲料玉米蛋白粉水平调控,这可能是由于饲料营养素对TOR和4EBPs的调控存在种间差异。另外,不同饲料营养素对相同种类的鱼体中TOR和4EBPs的作用机制可能也存在差异。饲料营养素对鱼类TOR和4EBPs的mRNA表达的作用机制还有待于进一步研究。在人类的研究<sup>[25]</sup>表明,4EBP1和4EBP2具有非常相似的基因序列和晶体结构,4EBP2的氨基酸序列仅仅在60至63号位与4EBP1存在差异。4EBP1和4EBP2生理作用相同,二者均能够与真核翻译启动子——eIFs结合并抑制后者活性。在鱼类中,有关4EBP1和4EBP2的比较研究相对较少,二者受饲料营养素调控的差异还有待于进一步研究。

TOR是进化上非常保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,TOR信号通路是细胞感知营养素水平并调控生长的重要通路。mTORC1是TOR信号通路中整合营养素信息并调控下游作用因子——S6K和4EBPs的关键蛋白。胰岛素和生长因子通过PI3K-AKT和mTORC2-AKT途径使AKT激活并且在Thr308和Ser473位点磷酸化,AKT激活mTORC1使后者在Ser2448位点磷酸化,mTORC1激活使TOR信号通路下游两个重要作用因子——S6K和4EBPs磷酸化并启动蛋白质的翻译。在鱼类中,AKT、TOR、4EBP1和p70 S6K磷酸化受到饲料脂肪水平调控的研究相对较少。本研究发现大菱鲃幼鱼肝脏和肌肉中AKT、TOR、4EBP1和p70 S6K磷酸化受到饲料脂肪水平调控。研究结果显示:在肝脏中,与适宜脂肪组相比,AKT (Thr308)、AKT (Ser473)、TOR (Ser2448)和p-4EBP1 (Thr37/46)磷酸化水平在高脂组显著上调;而p70 S6K (Thr389)磷酸化水平在高脂组显著下调。在肌肉中,与适宜脂肪组相比,AKT (Thr308)和p70 S6K (Thr389)磷酸化水平在高脂组显著上调;而AKT (Ser473)、TOR (Ser2448)和4EBP1 (Thr37/46)磷酸化水平在高脂组显著下调。在塞内加尔鳎(*Solea senegalensis*)的研究中<sup>[26]</sup>,肌肉AKT磷酸化在高脂组受到抑制,此结果与本研究类似,但肌肉S6K磷酸化水平在高脂组降低,此结果与本研究结果相反。在人类的研究中,2型糖尿病患者肌肉普遍存在胰岛素抵抗现象。Treins等<sup>[27]</sup>研究

表明S6K敲除小鼠不会发生胰岛素抵抗, 并且S6K的激活对PI3K-AKT通路存在抑制, 加剧胰岛素抵抗。在本研究中, 肌肉AKT (Ser473)在高脂组降低, S6K磷酸化在高脂组升高, 与在哺乳动物中对胰岛素抵抗的研究结果一致。此外, 有研究表明4EBPs和S6K存在类似互补的作用, 当4EBPs被敲除后, S6K磷酸化水平上升, 同时发生胰岛素抵抗且p-AKT (Ser473)/AKT下调<sup>[28]</sup>, 在本研究中也发现了类似结果。

总之, 饲料脂肪水平升高, 肝脏TOR信号通路被激活, 肌肉TOR信号通路受到部分抑制。肝脏和肌肉TOR信号通路的变化规律不同, 可能与肌肉对胰岛素的敏感性发生变化有关。

### 参考文献:

- [1] Gingras A C, Gygi S P, Raught B, *et al.* Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism [J]. *Genes & Development*, 1999, **13**(11): 1422—1437
- [2] Banko J L, Francis P, Lingfei H, *et al.* The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus [J]. *Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2005, **25**(42): 9581—9590
- [3] Zid B, Rogers A, Katewa S, *et al.* 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila* [J]. *Cell*, 2009, **139**(1): 149—160
- [4] Wullschleger S, Loewith R, Hall M N. TOR signaling in growth and metabolism [J]. *Cell*, 2006, **124**(3): 471—484
- [5] Makky K, Tekiel J, Mayer A N. Target of rapamycin (TOR) signaling controls epithelial morphogenesis in the vertebrate intestine [J]. *Developmental Biology*, 2007, **303**(2): 501—513
- [6] Ding Y H, Sun X J, Xu X L. TOR-autophagy signaling in adult zebrafish models of cardiomyopathy [J]. *Autophagy*, 2012, **8**(1): 142—143
- [7] Sudhir K, Xu X L. Target of rapamycin (TOR)-based therapy for cardiomyopathy: evidence from zebrafish and human studies [J]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2012, **22**(2): 39—43
- [8] Ding Y, Sun X, Redfield M, *et al.* Target of rapamycin (TOR)-based therapeutics for cardiomyopathy [J]. *Cell Cycle*, 2012, **11**(3): 428—429
- [9] Sapp V, Matthews R P, Gaffney L, *et al.* Fructose leads to hepatic steatosis in zebrafish that is reversed by mTOR inhibition [J]. *Hepatology*, 2014, **60**(5): 1581—1592
- [10] Xu D D, He G, Mai K S, *et al.* Postprandial nutrient-sensing and metabolic responses after partial dietary fish-meal replacement by soyabean meal in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *British Journal of Nutrition*, 2015, **115**(3): 1—10
- [11] Wu P, Feng L, Kuang S Y, *et al.* Effect of dietary choline on growth, intestinal enzyme activities and relative expressions of target of rapamycin and eIF4E-binding protein2 gene in muscle, hepatopancreas and intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) [J]. *Aquaculture*, 2011, **317**(1-4): 107—116
- [12] Chen G F, Feng L, Kuang S Y, *et al.* Effect of dietary arginine on growth, intestinal enzyme activities and gene expression in muscle, hepatopancreas and intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) [J]. *British Journal of Nutrition*, 2012, **108**(2): 195—207
- [13] Wu P, Jiang J, Liu Y, *et al.* Dietary choline modulates immune responses, and gene expressions of TOR and eIF4E-binding protein2 in immune organs of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, **35**(3): 697—706
- [14] Luo Y W, Ai Q H, Mai K S, *et al.* Effects of Dietary Corn Gluten Meal on Growth Performance and Protein Metabolism in Relation to IGF-I and TOR Gene Expression of Juvenile Cobia (*Rachycentron canadum*) [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2012, **12**(3): 418—426
- [15] Dai W W, Stéphane P, Mennigen J A, *et al.* Post-prandial regulation of hepatic glucokinase and lipogenesis requires the activation of TORC1 signaling in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2013, **216**(Pt 23): 4483—4492
- [16] Sánchezgurmaches J, Cruzgarcía L, Gutiérrez J, *et al.* Endocrine control of oleic acid and glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle cells in culture [J]. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative & Comparative Physiology*, 2010, **299**(2): R562-R572
- [17] Marine L, Stéphane P, Elisabeth P J, *et al.* Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR [J]. *Amino Acids*, 2010, **39**(3): 801—810
- [18] Marine L, Stéphane P, Elisabeth P J, *et al.* L-leucine, L-methionine, and L-lysine are involved in the regulation of intermediary metabolism-related gene expression in rainbow trout hepatocytes [J]. *Journal of Nutrition*, 2011, **141**(1): 75—80
- [19] Seiliez I, Panserat S, Lansard M, *et al.* Dietary carbohydrate-to-protein ratio affects TOR signaling and metabolism-related gene expression in the liver and muscle of rainbow trout after a single meal [J]. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2011, **300**(3): R733-R743
- [20] Jiang J, Wang B, Liu Y, *et al.* Effects of dietary arginine supplementation on growth performance, flesh quality, muscle antioxidant capacity and antioxidant-related signalling molecule expression in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Food Chemistry*, 2015, **167C**: 91—99
- [21] Wen H L, Feng L, Jiang W D, *et al.* Dietary tryptophan

- modulates intestinal immune response, barrier function, antioxidant status and gene expression of TOR and Nrf2 in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, **40**(1): 275—287
- [22] Zhang K K. Studies on nutritional metabolism of several functional amino acids for juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [D]. Thesis for Doctor of Science. Ocean University of China, Qingdao. 2014 [张凯凯. 大菱鲆幼鱼几种功能性氨基酸营养代谢的研究. 博士学位论文, 中国海洋大学, 青岛. 2014]
- [23] Livak J, Schmittgen D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402—408
- [24] Xu D D. Preliminary study on the mechanisms of nutrient sensing and responses of different protein sources in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [D]. Thesis for Doctor of Science. Ocean University of China, Qingdao. 2014 [许丹丹. 大菱鲆幼鱼对不同蛋白源营养感知与应答机制的初步研究. 博士学位论文, 中国海洋大学, 2014]
- [25] Fukuyo A, Yasuko I, Ishida T, *et al.* Structural scaffold for eIF4E binding selectivity of 4E-BP isoforms: crystal structure of eIF4E binding region of 4E-BP2 and its comparison with that of 4E-BP1 [J]. *Journal of Peptide Science*, 2011, **17**(9): 650—657
- [26] Borges P, Valente L M, Véron V, *et al.* High dietary lipid level is associated with persistent hyperglycaemia and downregulation of muscle Akt-mTOR pathway in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) [J]. *PloS One*, 2014, **9**(7): e102196
- [27] Treins C, Alliouachene S, Hassouna R, *et al.* The combined deletion of S6K1 and Akt2 deteriorates glycemic control in a high-fat diet. [J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2012, **32**(19): 4001—4011
- [28] Le B O, Petroulakis E, Paglialunga S, *et al.* Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2 [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2007, **117**(2): 387—396

## EFFECTS OF DIETARY LIPID LEVELS ON TOR PATHWAY IN JUVENILE TURBOT (*SCOPHTHALMUS MAXIMUS* L.)

TANG Zhuo-Yi, CUI Kun, CHEN Qiang, TAN Peng, LIAO Kai, MAI Kang-Sen and AI Qing-Hui

(The Key Laboratory of Mariculture (Ministry Education of China), Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** This study investigated the effects of dietary lipid levels on the TOR pathway in juvenile turbot using diets containing graded levels of lipid 11.69% (L11.69) and 16.58% (L16.58) (dry weight) to feed triple groups of juvenile turbot (8.6±0.01 g) for a 97d trial. The lipids level in diet did not impact survival rate and *SGR*. Compared those in L11.69 group, L16.58 group increased the gene expression of TOR, 4EBP1 but decreased 4EBP2 in liver, and it increased the phosphorylation of pAKT-S473, pAKT-T308, pmTOR-S2448, and p4EBP1-T37/46. In the muscle, L16.58 group had decreased TOR and 4EBP1 associated with pAKT-S473, pmTOR-S2448 and p4EBP1-T37/46 compared with those in L11.69 group. In conclusion, L16.58 diet can activate TOR pathway in liver while partially suppress TOR pathway in muscle of juvenile turbot compare with L11.69 diet.

**Key words:** Turbot; Dietary lipid level; Gene expression; Phosphorylation; TOR pathway