



河南师范大学

NENAN NORMAL UNIVERSITY

厚德博学 止于至善

# 读书报告

2019年12月29日  
宋东莹



# 读书报告

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 230 (2019) 91–99



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

## Comparative Biochemistry and Physiology, Part A

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cbpa](http://www.elsevier.com/locate/cbpa)



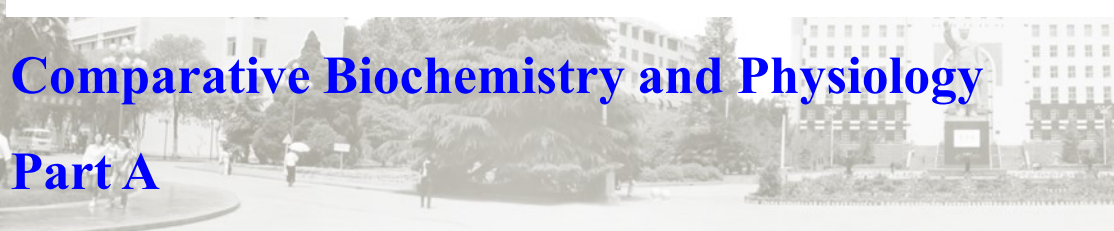
This article is a part of the Special Issue on Aquaculture

### Muscle growth mechanisms in response to isoenergetic changes in dietary non-protein energy source at low and high protein levels in juvenile rainbow trout<sup>☆</sup>

Hélène Alami-Durante<sup>a,\*</sup>, Marianne Cluzeaud<sup>a</sup>, Didier Bazin<sup>a</sup>, Johan W. Schrama<sup>b</sup>, Subramanian Saravanan<sup>b</sup>, Inge Geurden<sup>a</sup>

<sup>a</sup>INRA, Univ. Pau & Pays Adour, E2S UPPA, UMR 1419, Nutrition, Métabolisme, Aquaculture, Saint Pée sur Nivelle F-64310, France

<sup>b</sup>Aquaculture and Fisheries Group, Wageningen Univ., 6700 AH Wageningen, the Netherlands



Name COMP BIOCHEM PHYS A	
comparative biochemistry and physiology a-molecular & integrative physiology	
2015	2.039
2016	1.812
2017	2.258
2018	2.142

# Introduction

- 肌生性的决定和后续分化依赖于MyoD（生肌决定因子）家族，其属于肌源性调控因子（MRFs），具有基本的螺旋-环-螺旋（bHLH）结构的转录因子；
- 在无肌细胞中过表达，会激活肌源性程序（myogenic program），可以压制其他细胞命运和已分化肌细胞的形成；
- **肌转化现象**仍然非常显著因为单个转录因子可以发挥压倒一切的作用。

# Introduction

- 高等动物中，MyoD、Myf5、Mrf4/Myf6的功能作为肌源性决定因子。成肌素（Myog）、Mrf4和MyoD作为分化因子，决定成肌细胞向骨骼肌纤维的分化。
- 肌祖细胞可以激活Myf5和MyoD，进行分化或增殖，在发育过程中为肌肉生长提供储备细胞群体。

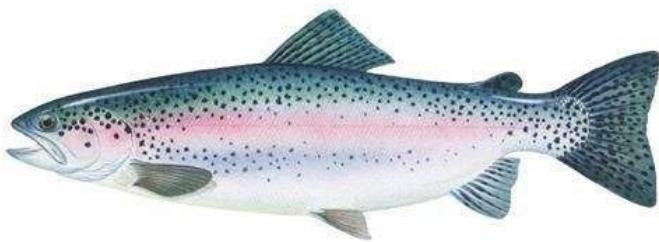


# Introduction

- MRFs在肌卫星细胞激活过程中也起到重要作用。高等动物中，这些细胞通常是静息的，在应对外界压力的情况下，被激活，重新进入细胞周期。
- 激活的肌卫星子细胞经过多轮的分裂融合到已经形成或形成新的肌纤维。
- 增殖阶段，激活的肌卫星细胞首先表达Myf5或MyoD，或共表达。
- 在鱼类中，肌源性调控因子（MRFs）同样调控着肌生成。

# Introduction

- 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*),同其他鱼类一样, 胚后白肌生长存在新的肌纤维的产生和已形成肌纤维的增大。
- 鱼类中肌源性基因的转录调控受特殊营养素的调控的研究依旧是不完整的。然而, 研究发现, 在幼鱼饲料中, 常量营养素来源和组成的改变可以调节某些MRFs的转录水平。



# Introduction

- 改变最初是在分子水平，通过基因控制肌肉生长机制（增生或/和增粗），可能导致肌肉细胞学性质的改变，如：肌纤维的数目或/和大小分布的差异。
- 在幼鱼中，白肌细胞结构可以被饲料蛋白源和氨基酸的添加，以及饲料蛋白水平的改变。更重要的是，蛋白水平的改变同时伴随着非蛋白能量水平和/或来源的改变，如脂质和/或糖类。

# Introduction

- 研究发现，虹鳟幼鱼白肌细胞结构，受到蛋白/能量比值不同而发生改变。但是，在快速生长期幼鱼的肌生长机制，饲料因子潜在的复杂影响仍然知之甚少，如蛋白水平和可消化非蛋白能量水平和来源（digestible non-protein energy (NPE)）。
- 本文作者利用分子生物学和细胞学方法研究等能、不同水平可消化蛋白、主要非蛋白能量来源的饲料对虹鳟幼鱼肌生长机制。



# Materials and methods

Formulation and composition of the experimental diets.

Diets <sup>a</sup>	H <sub>P/E</sub> F	H <sub>P/E</sub> C	L <sub>P/E</sub> F	L <sub>P/E</sub> C
<i>Ingredients (%)</i>				
Protein mixture <sup>b</sup>	66.0	66.0	VS 35.9	35.9
Oils <sup>c</sup>	11.0 → 1.0		19.1 → 9.1	
Gelatinized maize starch <sup>d</sup>	5.0 → 30.0		24.3 → 49.3	
Cellulose <sup>e</sup>	15.0	0.0	15.0	0.0
Other <sup>f</sup>	3.0	3.0	5.7	5.7
<i>Analyzed nutrient content on DM basis (g/kg)<sup>g</sup></i>				
Dry matter (DM; g kg <sup>-1</sup> diet)	938	924	949	947
Crude protein (N × 6.25)	519	511	276	261
Crude fat	152	34	207	143
Total carbohydrates	254	380	444	528
Starch	49	303	246	456
Ash	75	75	73	68
Digestible energy (DE, kJ g <sup>-1</sup> )	18.70	18.27	18.74	18.19
DP/DE (mg kJ <sup>-1</sup> )				

相同家系虹  
 鳟12组×35尾  
 (4处理3平行)、  
 150L循环水养  
 殖缸，泉水  
 T=17±°C，2-4  
 月自然光照，每  
 天饱食投喂两次，  
 7周养殖实验；4  
 个待测饵料配方。



# Materials and methods

实验虹鳟养殖实验 7 Weeks

2w×3, 分析饲料摄取、生长指标

7w, 取样, 组织学和分子生物学分析

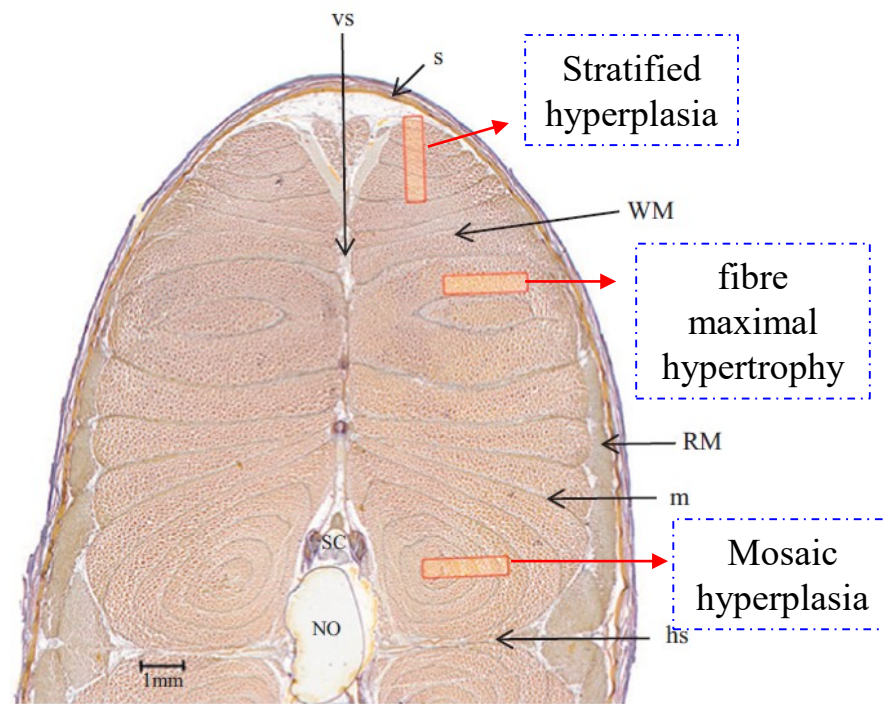
白肌总横切面积

白肌纤维数目

白肌纤维直径

*myf5,*  
*myod1a,*  
*myog,*  
*mrf4/m*  
*yf6,*

*Pcna,*  
*fmhc,*  
*fmlc2,*  
*ctsd,*  
*capn2,*  
*mstn1a,*  
*mstn1b*



统计学分析采用双因素方差分析，检测DP/DE和NPE源的影响及其交互作用。

# Results

## Trout growth performance

Growth performance of the rainbow trout juveniles fed with the H<sub>P/E</sub>F-, H<sub>P/E</sub>C-, L<sub>P/E</sub>F- and L<sub>P/E</sub>C-diets for 6 weeks.

	Diets <sup>1</sup>								P-Value		
	H <sub>P/E</sub> F		H <sub>P/E</sub> C		L <sub>P/E</sub> F		L <sub>P/E</sub> C		DP/DE ratio	NPE source	DP/DE × NPE
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD			
Initial BW <sup>2</sup>	32.4	0.6	32.5	0.7	32.3	0.5	32.4	0.7	0.79	0.79	1.00
Final BW	103.7 <sup>a</sup>	9.0	96.6 <sup>ab</sup>	4.0	84.4 <sup>b</sup>	5.0	59.5 <sup>c</sup>	2.4	< 0.01	< 0.01	< 0.05
TGC <sup>3</sup>	2.1 <sup>a</sup>	0.2	2.0 <sup>ab</sup>	0.1	1.7 <sup>b</sup>	0.1	1.0 <sup>c</sup>	0.1	< 0.01	< 0.01	< 0.01
FI <sup>4</sup>	16.6 <sup>a</sup>	0.2	14.7 <sup>b</sup>	0.3	15.4 <sup>ab</sup>	0.9	11.6 <sup>c</sup>	0.3	< 0.01	< 0.01	< 0.01
PG <sup>5</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.01	0.15 <sup>a</sup>	0.004	0.11 <sup>b</sup>	0.01	0.06 <sup>c</sup>	0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
LG <sup>6</sup>	0.12	0.01	0.07	0.01	0.12	0.02	0.06	0.01	0.92	< 0.01	0.50
PRE <sup>7</sup>	31.6 <sup>b</sup>	2.5	35.4 <sup>b</sup>	1.5	44.0 <sup>a</sup>	2.1	34.1 <sup>b</sup>	4.0	< 0.01	0.08	< 0.01

<sup>2</sup> BW, body weight (g).

<sup>3</sup> TGC, thermal growth coefficient. 积温生长系数 (TGC) =  $(FBW^{1/3} - IBW^{1/3}) / \sum(T+D) \times 100$

<sup>4</sup> FI, feed intake (g/kg metabolic BW per day).

<sup>5</sup> PG, protein gain (g/kg metabolic BW per day).

<sup>6</sup> LG, lipid gain (g/kg metabolic BW per day).

<sup>7</sup> PRE, protein retention efficiency (% digestible intake).

$$\text{预测终重(TGC)} = (IBW^{1/3} + \sum(TGC/100 \times T + D))^3$$

# Results

## Transcription of genes

Relative mRNA abundance of myogenic and muscle growth-related genes in the juvenile rainbow trout fed with the H<sub>P/E</sub>F-, H<sub>P/E</sub>C-, L<sub>P/E</sub>F- and L<sub>P/E</sub>C-diets for 7 weeks.

	Diets <sup>1</sup>								P-Value		
	H <sub>P/E</sub> F		H <sub>P/E</sub> C		L <sub>P/E</sub> F		L <sub>P/E</sub> C		DP/DE ratio	NPE source	DP/DE × NPE
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE			
<i>myod1a</i>	1.03	0.08	0.88	0.05	1.37	0.14	0.94	0.06	0.033	0.004	0.229
<i>mrf4</i>	1.01 <sup>b</sup>	0.06	1.04 <sup>b</sup>	0.08	1.55 <sup>a</sup>	0.10	1.09 <sup>b</sup>	0.09	0.006	0.040	0.020
<i>pcna</i>	1.02	0.07	0.84	0.03	0.98	0.04	0.91	0.05	0.323	0.022	0.574
<i>fmhc</i>	1.00 <sup>a</sup>	0.04	1.08 <sup>a</sup>	0.04	1.07 <sup>a</sup>	0.05	0.88 <sup>b</sup>	0.04	0.079	0.201	0.005
<i>fmlc2</i>	1.01 <sup>a</sup>	0.05	1.05 <sup>a</sup>	0.05	0.99 <sup>a</sup>	0.06	0.81 <sup>b</sup>	0.03	0.017	0.172	0.039
<i>ctsd</i>	1.03	0.09	1.23	0.07	0.89	0.04	0.96	0.06	0.006	0.063	0.355
<i>mstn1a</i>	1.14	0.23	0.75	0.12	0.81	0.15	0.77	0.16	0.416	0.182	0.452
<i>mstn1b</i>	1.03	0.08	0.92	0.14	0.65	0.08	0.51	0.07	< 0.001	0.100	0.881





# Res

## Rec

Cellularity of the dorsal skeletal wh

Diets<sup>1</sup>

H<sub>p</sub>/eF

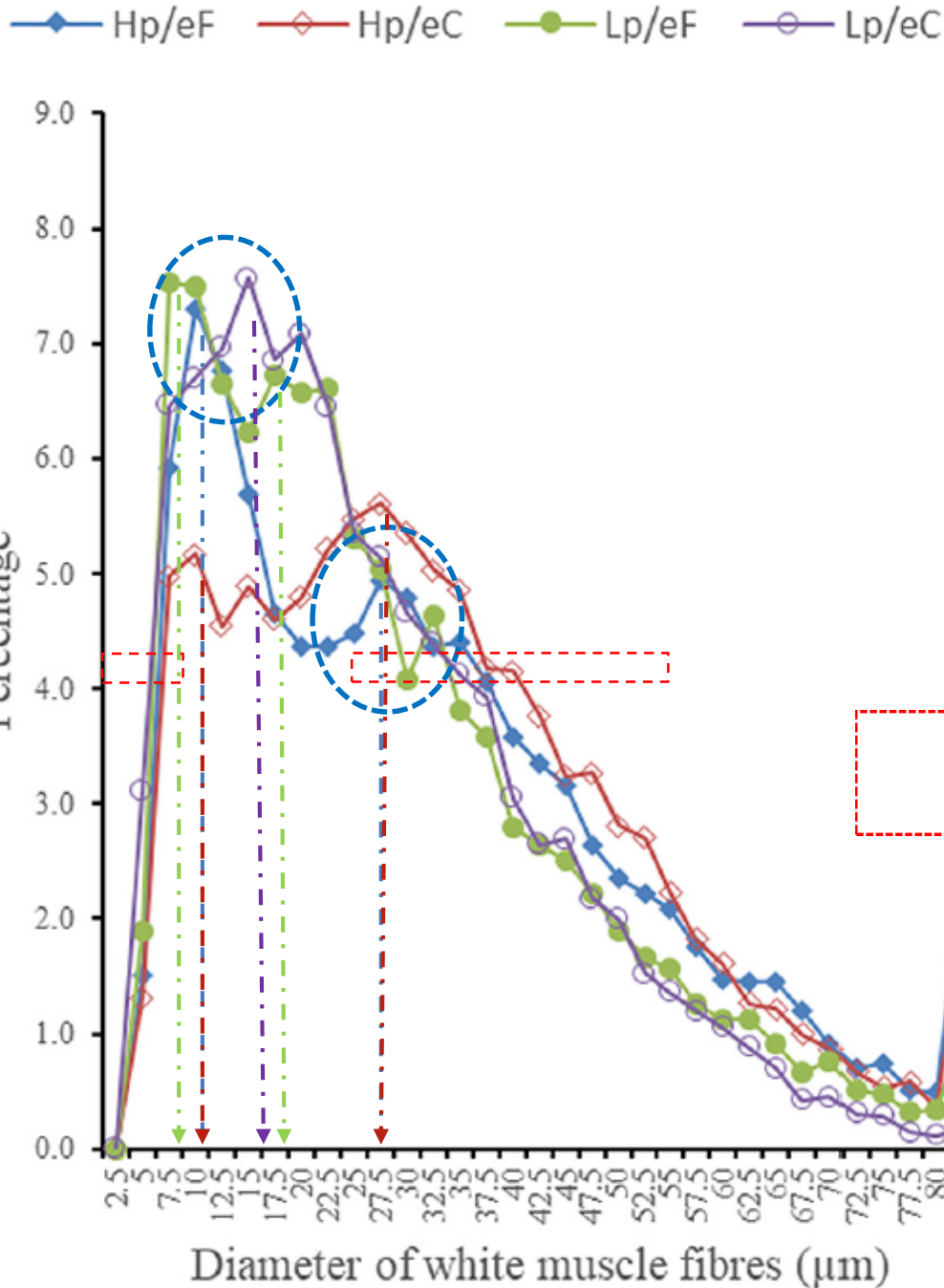
Mean

Dorsal white muscle

TCSA (mm <sup>2</sup> )	79.2
TNWF	33659

White muscle fibres

d mean (μm)	32.1
d median (μm)	28.0
d ≤ 20μm (%)	36.2 <sup>b</sup>
20 < d ≤ 40μm (%)	35.0
40 < d ≤ 60μm (%)	19.0
60 < d ≤ 80μm (%)	7.5
d > 80μm (%)	2.3
d max (μm)	117.4



## muscle fibres

s for 7 weeks.

NPE source	DP/DE × NPE
< 0.001	0.105
< 0.001	0.964
0.640	0.240
0.642	0.147
0.110	0.023
0.032	0.167
0.189	0.130
	0.194
	0.076
	0.946



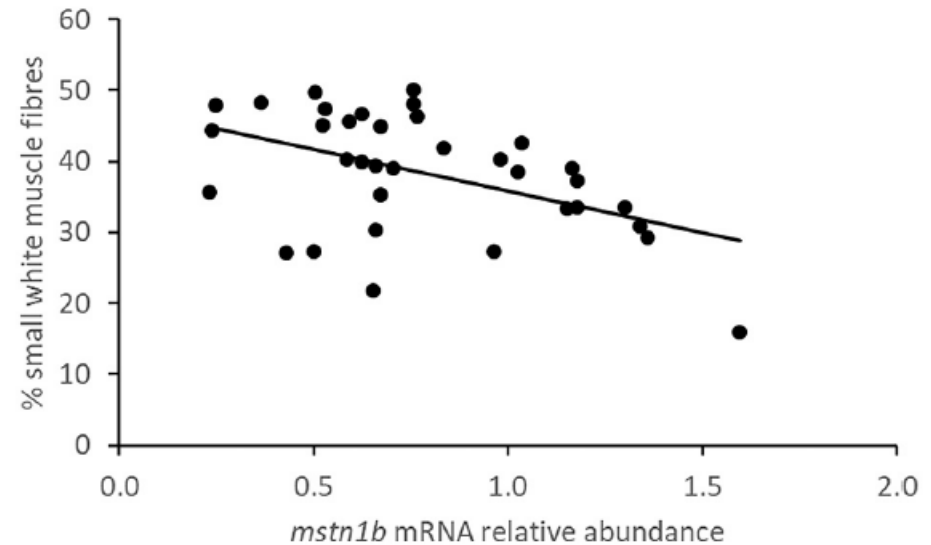
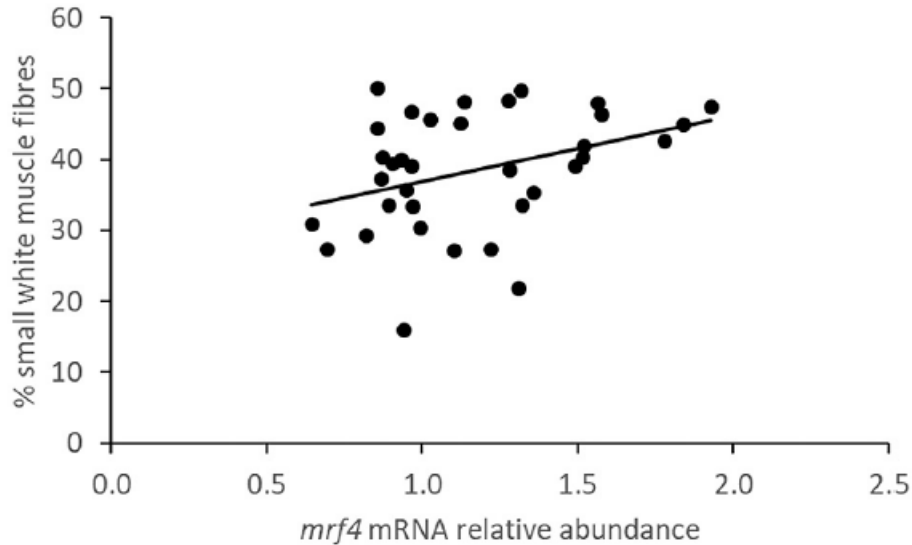
# Results

## Correlations between individual trout body growth, muscle cellularity and muscle transcript levels

Correlations (Pearson's coefficients) between individual body growth, muscle cellularity and muscle gene expressions ( $n = 35$ ) after 7 weeks of feeding.

	<i>mrf4</i>	<i>fmhc</i>	<i>fmlc2</i>	<i>mstn1a</i>	<i>mstn1b</i>
$L_F$	-0.095	0.330 <sup>#</sup>	0.394* <sup>↑</sup>	0.383* <sup>↑</sup>	0.602*** <sup>↑</sup>
BW	-0.139	0.317	0.423* <sup>↑</sup>	0.440** <sup>↑</sup>	0.654*** <sup>↑</sup>
TCSAWM	-0.212	0.232	0.328 <sup>#</sup>	0.438** <sup>↑</sup>	0.654*** <sup>↑</sup>
TNWF	0.012	0.261	0.270	0.279	0.354* <sup>↑</sup>
WF, dmean	-0.372*	0.034	0.134	0.145	0.435**
WF, $d \leq 20 \mu\text{m}$	0.336* <sup>↑</sup>	-0.166	-0.220	-0.103	-0.470** <sup>↓</sup>
WF, $d > 80 \mu\text{m}$	-0.114	0.204	0.283	0.289	0.645***
WF, dmax	-0.091	0.095	0.242	0.263	0.516**

# Results



Scatter plots showing the relations between the individual gene expression of *mrf4* and percentage of small ( $d < 20 \mu\text{m}$ ) white muscle fibres ( $y=27.584+9.280x$ ;  $R=0.316$ ;  $P=0.033$ ) and between the individual gene expression of *mstn1b* and percentage of small ( $d < 20 \mu\text{m}$ ) white muscle fibres ( $y=47.548-11.670x$ ;  $R=0.476$ ;  $P=0.004$ ) in rainbow trout juveniles after 7 weeks of feeding ( $n=36$ ).

# Discussion

本研究研究了**常量营养素(macronutrient)**诱导的虹鳟肌生长的改变。作者为虹鳟幼鱼提供含有**高对比**的**可吸收蛋白水平(DP, digestible protein)**和**DP/DE比**的饲料，同时在每个DP/DE的饲料中，**非蛋白能量源(NPE)**将脂质替换成淀粉。

①饲料摄取和体生长在饲喂**低的DP/DE比**和被**淀粉替代脂质**的饲料组中呈现下降趋势；

②**脂质**作为主要的**NPE源**的情况下，**蛋白沉积率(PRE)**在低蛋白水平比高蛋白水平高；相反，NPE在DP水平**高于鱼类需求水平时**，不产生任何影响。

③常量营养素的**供给改变**可**操纵(manipulate)** MRFs和编码肌肉**结构蛋白**的表达，但是DP，DE或NPE未进行探讨。

本实验从**不同蛋白生长应答模式**为常量营养素对肌生长决定机制方面的进一步研究提供了**独特**的实验开端。



# Discussion

## Effect of dietary protein level

**LP/E diets**: containing a protein and amino acid level below established requirements.

**myod1a**<sup>↑</sup>: *myod1* gene expressed in proliferating and differentiating cells.

**myod1a**的上调可能是氨基酸的缺乏所致。在虹鳟幼鱼中，蛋氨酸缺乏饲料以及在其他鱼类中，赖氨酸和组氨酸缺乏饲料产生相似的结果。

在L<sub>P/E</sub>-fed虹鳟中，低浓度氨基酸的提供还是某种氨基酸的缺乏导致了**myod1a**的上调，仍待继续研究。

# Discussion

**mstn**: 分泌性生长因子，哺乳动物中，对肌卫星细胞增殖和分化行负调控，减弱肌核的添加和肌肉蛋白的合成。L<sub>P/E</sub> diets 下调虹鳟幼鱼 **mstn** 的表达。

在虹鳟研究中发现，高脂（40%P:25%L替代40%P:10%L）饲料 **下调** **mstn** 的表达；高脂饲料中，15%鱼油替代为15%麦粉，饲料脂质、能量和蛋能比均可调节 *mstn1a* 的表达；50%P:15%L相对于62%P:6%L和43%P:20%L饲料增强 *mstn1a* 的表达，*mstn1b* 没有差异。这三组饲料都表现为能量的差异，为常量营养素的 **交互作用** 的结果。

# Discussion

- 本实验中，何种NPE，饲料DP和DP/DE降低时，*mstn1b*表达下调，*mstn1b*上调和下调导致了大的 ( $H_{P/E}$ ) 和小的 ( $H_{P/E}$ ) 的TCSAWM，作者认为MSTN的作用可能包括控制组织体积的大小。不仅TCSAWM，包括白肌纤维总数、大规格纤维数目、最大白肌纤维直径和增生/增粗过程在7weeks的实验中均发生了变化。这些过程可能受*mstn*表达水平的差异调控，并且肌肉*mstn*在生长慢的虹鳟中表达量降低，以达到部分抵消饵料诱导肌肉生长的限制。
- 该假说由罗非鱼养殖实验所印证：在不利的营养条件下，*mstn* mRNA起初高表达，但是如果该条件持续进行，*mstn* mRNA表达量持续降低。
- 作者推测，实验中肌肉*mstn*的上述表达活动可在肌纤维直径 $<20\mu\text{m}$ 检测出来，因为这个级别的肌纤维代表着最新的肌形成事件，即新的肌管形成和早期的生长。实验数据显示：该级别肌纤维比例与*mstn1b* mRNA水平成负相关 ( $P=0.00143$ )。

# Discussion

- 细胞学层面： $L_{P/E}$  饲料很大程度降低了白肌的生长，即TCSAWM相比于 $H_{P/E}$  饲料降低了30%，与增生和增粗的改变相关联，分别体现在较少的白肌纤维和较少的大直径纤维（ $>40\mu\text{m}$ ）。在黑鲷中，相似的DP变化，没有发现类似结果（24–64%，vs 27–51% in the present study）。在海鲷中，低蛋白饲料确实会减少白肌纤维的数目，但是对白肌生长（TCSA）和白肌平均直径没有影响。
- 这些差异，可能是由于饲料中常量营养素的平衡和/或DE的含量不同有关。

# Discussion

## ■ Effect of NPE source

- 饲喂虹鳟幼鱼的C-替代F-diets后，降低了肌肉*myod1a*, *pcna*（增殖细胞核抗原）的转录水平，会导致肌细胞的生长和分化减弱的潜在结果。虹鳟幼鱼饲喂高糖饲料，*myod1b*具有相似的下调结果；这些结果证实糖类没有脂质促进细胞增殖的效率高，潜在的对肌纤维增生和增粗均有影响。
- 细胞学分析证实了C-fed虹鳟，肌纤维减少了19%，揭示了糖类没有脂质维持肌细胞增生的效率高，并且与蛋白的水平无关。同时揭示了C-fed虹鳟肌纤维增粗效率降低，体现在大规格直径的肌纤维减少。
- 但这并不意味着虹鳟幼鱼饲料中应去除糖类物质，去除糖类的饲料不仅会降低肌肉蛋白/DNA，加剧肌蛋白水解，同时下调*myod1b*, *myf5*和*myog*的表达。饲料糖类水平的平衡可以通过减少蛋白和脂类向能量供给方向的分解代谢，增加P和L的沉积，为生物合成提供代谢产物，对白肌的增生和增粗有利。

# Discussion

- **Effect of DP/DE ratio-NPE source interaction**
- DP/DE ratio-NPE source interaction调控*mrf4*的表达。本研究发现，L<sub>P/E</sub>F-fed 虹鳟*mrf4*的表达量最高，具有最好的蛋白沉积率（PRE，44% vs 32-35%）。这意味着*mrf4*可能是虹鳟幼鱼的PRE的分子marker。
- *mrf4*的表达同具有小直径白肌纤维（<20μm）的含量成正相关，意味着*mrf4*可能是肌生成早期的相关分子marker。
- 交互作用还体现在调控肌球蛋白链（myosin chains）相关基因的表达：在L<sub>P/E</sub>F-fed 虹鳟，*fmhc* and *fmlc2*转录水平显著降低，可以解释该组鱼的最底的蛋白生长和体生长。myosin chains低的合成能力与肌纤维增粗成负相关，单峰的肌纤维分布和小的肌纤维数量，证实肌纤维的增粗性生长的抑制。

# Discussion

- $L_{P/E}$ C-trout和 $H_{P/E}$ F-trout的肌纤维生长**动态不同**， $H_{P/E}$ F-trout**归因于最**  
**高速肌生长**，因为**小直径白肌纤维（ $<20\mu\text{m}$ ）**清晰的与大直径肌纤维  
**群体分开**：小直径白肌纤维（ $<20\mu\text{m}$ ）可能代表着新肌肉早期的募集  
和生长，另外的群体在实验初始就已存在。因此，有趣的是：**小直径**  
**肌纤维生长可以被DP/DE和NPE源的交互作用调控。**
- $H_{P/E}$ F-trout中，总体**小直径肌纤维比例较低的原因**是**高的肌纤维增粗**  
**比例所致**，减少了增生肌纤维的比例（在 $H_{P/E}$ F-trout中，肌纤维的数  
目比较高）。
- $H_{P/E}$ C-trout中，较小比例的小直径肌纤维原因最可能是**肌肉增生的降**  
**低和增粗降低**，反映在细胞总纤维数目，大规格直径纤维的减少。

# 文献感悟

- 文章数据的相互关联**整体性**、分析的**透彻性**、实验设计的方法及文章的撰写值得好好领悟；
- 文章的研究内容具有很大启发性，有必要将Hélène Alami-Durante的文章和文献引用的重要文章拿来细细品读；
- 统计学方法还需继续加深学习，增加数据挖掘的能力。





快

元旦

乐

