

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220922002

http://www.yykxjz.cn/

霍欢欢, 李会涛, 王蔚芳, 刘宝良, 臧涛. 维生素 E 对半滑舌鲷垂体  $\alpha$ -生育酚转移蛋白基因表达的影响. 渔业科学进展, 2024, 45(1): 60–69

HUO H H, LI H T, WANG W F, LIU B L, ZANG T. Effects of vitamin E on  $\alpha$ -tocopherol transfer protein expression in the pituitary of *Cynoglossus semilaevis*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(1): 60–69

## 维生素 E 对半滑舌鲷垂体 $\alpha$ -生育酚 转移蛋白基因表达的影响\*

霍欢欢<sup>1</sup> 李会涛<sup>2</sup> 王蔚芳<sup>3①</sup> 刘宝良<sup>3</sup> 臧涛<sup>4</sup>

(1. 江西农业大学动物科学技术学院 江西 南昌 330045; 2. 青岛蔚蓝福邦生物科技有限公司 山东 青岛 266600; 3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071;  
4. 济南市农业技术推广服务中心 山东 济南 250004)

**摘要**  $\alpha$ -生育酚转移蛋白( $\alpha$ -tocopherol transfer protein,  $\alpha$ -TTP)是一种可以结合维生素 E 的蛋白, 在协助机体转运和调控维生素 E 含量等方面起到重要作用。维生素 E 能够影响鱼类垂体中生长和繁殖相关激素的分泌, 这是否与  $\alpha$ -TTP 有关, 值得进一步探讨。本实验旨在探究维生素 E 对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)垂体  $\alpha$ -TTP 基因表达的影响。在基础饲料中分别添加维生素 E (DL- $\alpha$ -生育酚乙酸酯) 0、200、400、800 和 1 600 mg/kg, 对半滑舌鲷成鱼(464.0±2.6) g 进行持续 60 d 的养殖实验; 另外, 在 L-15 培养基中添加 0、18 和 54  $\mu$ mol/L 的维生素 E, 对半滑舌鲷垂体细胞进行为期 3 d 的体外原代培养实验。分别取垂体组织和垂体原代细胞, 克隆  $\alpha$ -TTP 基因, 并通过实时荧光定量 PCR 分析  $\alpha$ -TTP 基因相对表达量。结果显示,  $\alpha$ -TTP 基因全长 3 964 bp, 编码 293 个氨基酸;  $\alpha$ -TTP 基因在半滑舌鲷各组织均有表达, 其中, 在脾脏中表达最高, 其次是肾脏, 在胃中表达量最低;  $\alpha$ -TTP 基因表达量随着饲料中维生素 E 含量的增加而呈先升高后下降的变化趋势, 400 mg/kg 组显著高于其他各组( $P<0.05$ ); 随着细胞培养液中维生素 E 浓度的升高,  $\alpha$ -TTP 基因相对表达量显著增加。综上所述, 本研究首次报道维生素 E 能够影响垂体中  $\alpha$ -TTP 基因的表达, 饲料中添加 400 mg/kg 的维生素 E 能够显著促进半滑舌鲷垂体  $\alpha$ -TTP 基因的表达。本研究为探讨  $\alpha$ -TTP 在介导维生素 E 影响鱼类生长与繁殖方面的潜在机制提供新思路。

**关键词** 维生素 E; 半滑舌鲷; 垂体;  $\alpha$ -生育酚转移蛋白( $\alpha$ -TTP)

**中图分类号** S968.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)01-0060-10

$\alpha$ -生育酚转移蛋白( $\alpha$ -tocopherol transfer protein,  $\alpha$ -TTP)是一种可以结合维生素 E 的蛋白, 在机体转运和吸收维生素 E 方面起到关键的调控作用(Arai *et al.*, 2021)。 $\alpha$ -TTP 促进  $\alpha$ -生育酚从细胞向外周介质转运的现象最早在鼠肝癌细胞中发现(Arita *et al.*, 1997),

随后, Qian (2005)在人肝癌细胞中也发现了同样的现象。 $\alpha$ -TTP 在哺乳动物中主要分布在肝脏组织, 除此之外, 在中枢神经系统、脾脏、肺、肾、子宫以及胎盘中也均检测到了  $\alpha$ -TTP(刘昆, 2014)。 $\alpha$ -TTP 对于小鼠胎盘滋养层的发育是必需的(Jishage *et al.*, 2001),

\* 国家自然科学基金面上项目(31872578)和国家海水鱼产业技术体系(CARS-47)共同资助。霍欢欢, E-mail: hhh16430@163.com

① 通信作者: 王蔚芳, 副研究员, E-mail: wangwf@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-09-22, 收修改稿日期: 2022-10-31

而且在抵抗药物毒性方面也起到非常重要的作用 (Shichiri *et al.*, 2012),  $\alpha$ -TTP 的缺失或变异会导致维生素 E 缺乏性共济失调症 (Gohil *et al.*, 2008)。 $\alpha$ -TTP 在维持机体维生素 E 水平、提高繁殖性能等方面起到重要作用。在斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎发育过程中,  $\alpha$ -TTP 可以将维生素 E 从蛋黄转移到发育中的胚胎, 同时促进维生素 E 从胎盘到胚胎的运输, 并调节胚胎发育中的神经系统细胞内的维生素 E 运输 (Head *et al.*, 2021)。目前, 关于维生素 E 对  $\alpha$ -TTP 表达的影响成为研究热点, 但仍没有明确一致的结论。

半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 属于近海大型底栖暖温性动物, 其味道鲜美、肉质嫩滑、营养丰富, 广受群众喜爱, 是我国重要的名贵海水养殖鱼类。目前, 关于维生素 E 对半滑舌鲷的生长、繁殖性能方面的研究已有相关报道 (肖登元等, 2015; 王蔚芳等, 2020), 且相关研究已证实维生素 E 能够影响鱼类垂体中生长激素和促性腺激素的基因表达 (Huang *et al.*, 2019; 王蔚芳等, 2020), 这是否与  $\alpha$ -TTP 有关? 目前未见维生素 E 对鱼类垂体中  $\alpha$ -TTP 的影响研究。因此, 本研究拟通过养殖和细胞培养实验, 在克隆  $\alpha$ -TTP 基因的基础上, 探究  $\alpha$ -TTP 基因在半滑舌鲷各组织分布情况以及维生素 E 浓度与垂体  $\alpha$ -TTP 基因表达量之间的关联性, 初步探讨  $\alpha$ -TTP 在介导维生素 E 影响鱼类生长与繁殖方面的潜在机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用鱼

实验用鱼购自莱州明波水产有限公司 (山东), 为当年的同一批孵化培育的成鱼, 大小为  $(464.0 \pm 2.6)$  g。

### 1.2 养殖实验

**1.2.1 饲料制备与养殖管理** 养殖实验饲料中维生素 E (DL- $\alpha$ -生育酚乙酸酯, Sigma) 添加量分别为 0、200、400、800 和 1 600 mg/kg, 设置 5 组, 每组 3 个重复。在基础饲料中, 以鱼粉、酪蛋白为主要蛋白源, 以鱼油、豆油为主要脂肪源, 维生素 E 以逐级混匀方式添加到高筋粉中。饲料配方及营养组成见表 1。所有原料过 60 目筛后充分混合均匀, 并经机械挤压形成颗粒饲料, 直径为 4 mm, 在 60 °C 的烘箱中干燥至湿度为 10%, 然后密封于塑料袋内并保存在 -20 °C 的冰柜中以待使用。

养殖实验在山东莱州明波水产有限公司养殖场进行。正式实验开始前, 对所有鱼投喂 7 d 的基础饲料 (表 1), 以适应实验条件。在测量鱼体长和称重后

随机分成 15 组, 在 15 个 15 m<sup>3</sup> 的圆形聚乙烯养殖桶中 (直径为 150 cm, 高度为 60 cm) 进行流水养殖实验, 每个桶里放养 10 尾半滑舌鲷, 养殖用水为过滤海水, 流速为 50 L/min。每 3 个养殖桶随机分成一组, 每天早晚 2 次投喂相同的饲料, 投喂率为鱼体质量的 2%,

表 1 实验基础饲料配方及营养组成  
Tab.1 Formulation and proximate composition of the experimental diet

组成成分 Ingredient	成分配比 (干重) Percent in diet (dry weight)/%
鱼粉 Fish meal	60.00
酪蛋白 Casein	10.00
高筋粉 Wheat meal	14.95
磷脂 Phospholipid	2.00
鱼油 Fish oil	7.00
大豆油 Soybean oil	1.00
胆碱 Choline chloride	0.50
磷酸二氢钙 Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.00
维生素 C Vitamin C	0.50
维生素混合物 <sup>1</sup> Vitamin premix	1.00
矿物质混合物 <sup>2</sup> Mineral premix	1.00
乙氧喹 Ethoxyquin	0.05
海藻酸钠 Alginate sodium	1.00
营养成分分析 Proximate composition	
粗蛋白 Crude protein	56.00
脂肪 Crude lipid	14.10
灰分 Ash	10.20
维生素 E Vitamin E/(mg/kg)	8.00

注: <sup>1</sup> 维生素混合物 (mg/kg 或 g/kg 饲料): 硫胺素, 25 mg; 核黄素, 45 mg; 盐酸吡哆醇, 20 mg; 维生素 B<sub>12</sub>, 0.1 mg; 维生素 K<sub>3</sub>, 10 mg; 肌醇, 800 mg; 泛酸, 60 mg; 烟酸, 200 mg; 叶酸, 20 mg; 生物素, 1.20 mg; 维生素 A, 32 mg; 维生素 D, 5 mg; 维生素 E, 0 mg; 次粉, 13.67 g;

<sup>2</sup> 矿物质混合物 (mg/kg 或 g/kg 饲料): 硫酸镁, 1 200 mg; 硫酸铜, 10 mg; 硫酸锌, 50 mg; 硫酸铁, 80 mg; 硫酸锰, 45 mg; 氟化钠, 2 mg; 氯化钴 (1%), 50 mg; 硒代硫酸钠 (1%), 20 mg; 碘酸钙 (1%), 60 mg; 沸石, 13.485 g。

Note: <sup>1</sup> Vitamin premix (mg or g/kg diet): Thiamin 25 mg; Riboflavin, 45 mg; Pyridoxine HCl, 20 mg; Vitamin B<sub>12</sub>, 0.1 mg; Vitamin K<sub>3</sub>, 10 mg; Inositol, 800 mg; Pantothenic acid, 60 mg; Niacin, 200 mg; Folic acid, 20 mg; Biotin, 1.20 mg; Retinol acetate, 32 mg; Cholecalciferol, 5 mg; Vitamin E, 0 mg; Wheat middling, 13.67 g.

<sup>2</sup> Mineral premix (mg or g/kg diet): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 200 mg; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 10 mg; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 50 mg; FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 80 mg; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 45 mg; NaF, 2 mg; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1%), 50 mg; NaSeSO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (1%), 20 mg; Ca(IO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1%), 60 mg; Zoelite, 13.485 g.

进行为期 60 d 的养殖实验。实验期间,水温为 24~27 °C,盐度为 30~31,pH 为 7.8~8.1。溶解氧>5.65 mg/L。每天早上清除粪便和多余的饲料以保持良好的水质条件。

**1.2.2 实验取样** 养殖结束后,所有鱼饥饿 24 h,丁香油(10 mg/L)麻醉后准确称重,记录终末体重;每个养殖桶随机取 3 尾鱼,无菌取出垂体用于后续实验。

### 1.3 垂体原代细胞培养

**1.3.1 细胞培养基配制** 称取 4.76 g HEPES 和 9.6 g L-15 培养基,充分混溶于水,4 h 后用 NaOH 将 pH 调至 7.4,抽滤(除菌),分装,即制成 L-15 基础培养基。在 L-15 基础培养基中加入胎牛血清(终浓度为 5%)、青霉素(终浓度为 100 U/mL)、链霉素(终浓度为 100 µg/mL),即制成完全培养基,4 °C 保存。所有操作在细胞培养室进行,有专用橱柜和冰箱放置物品,所有解剖工具、器皿等均经高压消毒后使用,实验用水、磷酸缓冲液(PBS)等为无菌型商品。

**1.3.2 细胞分离** 在细胞培养室的准备室内,用 75%酒精浸泡鱼头后,无菌条件下,取 20 条成鱼垂体组织,移入超净工作台内后更换培养液和培养皿,保证无菌操作。随后垂体组织剪成 1 mm<sup>3</sup> 小块,用 PBS 冲洗,加入 0.25%的胰蛋白酶,用量约为组织块的 10 倍,放入 18 °C 水浴锅中 45 min。水浴后用 2 mL PBS 吹打组织块,倒入 200 目的尼龙网过滤,取滤液以 100 ×g 速度离心 10 min,除去上清液,并重悬沉淀,分装至六孔板,1 mL/孔,置于 24 °C 培养箱中进行培养。参考王蔚芳等(2020)的方法进行操作。

**1.3.3 细胞培养** 细胞培养液中维生素 E (DL- $\alpha$ -生育酚乙酸酯, Sigma)浓度参照大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)的相关研究设置(Huang *et al*, 2019),实验分为 3 组,每组 3 个重复,维生素 E 添加量分别为 0、18 和 54 µmol/L。将维生素 E 预先溶解在无水乙醇中,然后加入到 L-15 完全培养基中(无水乙醇的终浓度为 0.1%, v/v),于 24 °C 培养箱中培养 3 d (黄滨等, 2017)。

### 1.4 RNA 的提取与 cDNA 文库的构建

养殖实验结束后,分别在每个养殖桶随机取 3 尾鱼,无菌取出垂体组织并置于无菌 1.5 mL 离心管中;细胞实验结束后,将每孔垂体细胞转移至 15 mL 离心管中,以 100 ×g 转速离心 10 min 之后取细胞沉淀,并置于 1.5 mL 无菌离心管中。加入 1 mL TRIzol (Invitrogen, 美国),按照程序提取总 RNA,使用 NanoDrop 2000 定量并调整至相同浓度备用,并取适量 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳,检测 RNA 完整性,取

质量较好的 RNA 作为 cDNA 文库构建的模板。以总 RNA 模板构建 cDNA 文库,选用 PrimeScript RT reagent kit with gDNA eraser (TaKaRa, 日本)进行反转录实验,操作流程参照该使用说明书进行,制成的 cDNA 文库保存于-20 °C 冰柜中。

### 1.5 RACE 扩增 $\alpha$ -TTP 基因

根据 GenBank 半滑舌鲷  $\alpha$ -TTP 预测基因(XM\_008335042.3)编码序列(Coding sequence, CDS)信息设计引物(表 2),使用 cDNA 末端快速扩增法(Rapid-amplification of cDNA ends, RACE)进行扩增,具体步骤如下:

**1.5.1 3'端扩增**  $\alpha$ -TTP 基因的 3'端序列的获得利用两步法,先利用 F1 和 3'Outer Primer 进行首轮扩增,然后使用首轮扩增的 PCR 产物为模板, F2 和 3'Inner Primer 为引物进行第 2 轮扩增。反应体系为 50 µL,反应条件: 94 °C 1 min 预热,然后 98 °C 10 s、55 °C 15 s、68 °C 1 min, 30 个循环。反应结束后,1%琼脂糖凝胶电泳,使用 TaKaRa Mini BEST agarose gel DNA extraction kit V4.0 切胶回收纯化;将纯化产物使用 DNA A-Tailing kit 处理后,使用 TaKaRa DNA ligation kit V2.1 中的连接酶,将产物与 T-Vector pMD<sup>TM</sup> 20 连接后,热转化至 *E. coli* 感受态细胞 JM109 中,涂布平板,37 °C 过夜培养。挑选阳性单克隆,使用通用引物 M13-47、RV-M 进行测序。

**1.5.2 5'端扩增**  $\alpha$ -TTP 基因的 5'端序列的获得同样利用两步法,先用 R3 和 5'Outer Primer 进行首轮扩增,然后利用首轮扩增的 PCR 产物为模板,以 R4 和 5'Inner Primer 为引物进行第 2 轮扩增。反应体系为 50 µL,反应条件: 94 °C 2 min 预热,然后 98 °C 10 s、55 °C 30 s、72 °C 1 min, 30 个循环,反应结束后,1%琼脂糖凝胶电泳,切胶回收纯化,连接转化,挑选阳性单克隆测序。

**1.5.3 基因验证** 最后,将扩增的序列组合在一起并设计引物 F-TTTTCCATCAGTGGTGTAGCCGGT C, R-GTGCCCCCTGATGGACATGACAAG 对产物进行验证。反应体系为 50 µL,反应条件: 94 °C 1 min 预热,然后,98 °C 10 s、55 °C 15s、68 °C 1 min, 30 个循环,反应结束后,1%琼脂糖凝胶电泳并测序。

### 1.6 定量 PCR 分析

根据半滑舌鲷  $\alpha$ -TTP 基因序列,通过 Primer Premier 5 软件进行引物设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成,引物浓度为 10 µmol/L。应用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)分析不同水平维生素 E 处理下垂体  $\alpha$ -TTP 基因的表达情况。以 20×cDNA

稀释液为模板进行 qRT-PCR 扩增, 参照 TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus)(RR820A)试剂盒说明书, 扩增体系为 20  $\mu$ L, 包括 10  $\mu$ L TB Green<sup>®</sup> 试剂、0.8  $\mu$ L PCR 正向引物、0.8  $\mu$ L PCR 反向引物、1  $\mu$ L cDNA 模板和 7.4  $\mu$ L RNase-free dH<sub>2</sub>O。为减小实验误差, 每个样品均设置 3 个重复, 18S 核糖体 RNA 基因作为内参引物, 与目的基因在相同条件下进行扩增, 引物序列见表 2。反应按 95  $^{\circ}$ C 10 min, 95  $^{\circ}$ C 10 s, 58.4  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 20 s, 再依次按照 95  $^{\circ}$ C 15 s、60  $^{\circ}$ C 15 s、95  $^{\circ}$ C 15 s 绘制溶解曲线。实验中, PCR 产物通过溶解曲线确定扩增准确性及特异性, 使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 mRNA 相对表达水平。

表 2 本研究所用引物的序列

Tab.2 The primer sequence used in the present study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Usage	大小 Size/bp
F1	GCCTTCCAGGTCTTTAGGGTCA	3'端扩增 cDNA-3' terminal qRT-PCR	22
F2	CTTCGACCTGAGTGGGTGGAGC		22
R3	AACTTTATTTTCCCCACAGACTCA	5'端扩增 cDNA-5' terminal qRT-PCR	24
R4	CAGAGACACCAGAGCCGGCCTTCA		24
F	TTTTCCATCAGTGGTGTAGCCGGGTC	验证 Verification	26
R	GTGCCCCCTGATGGACATGACAAG		24
M13-47	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	测序 Sequencing	24
RV-M	AGCGGATAACAATTTACACAGGA		24
$\alpha$ -TTP-F	GACCAATCACCTGCTCCAGTC	荧光定量 PCR qRT-PCR	21
$\alpha$ -TTP-R	CTTCCTGTGTCCCCTCAA		19
18S-F	GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	内参 Reference gene	23
18S-R	AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC		20

## 2 结果与分析

### 2.1 半滑舌鲷 $\alpha$ -TTP 基因的获得

经过 RACE 扩增, 拼接后获得一个全长为 3 964 bp 的序列(图 1), 经 NCBI 比对发现, 其与半滑舌鲷  $\alpha$ -TTP 预测基因(XM\_008335042.3)有 99% 的相似性。半滑舌鲷  $\alpha$ -TTP 基因编码 293 个氨基酸, 大小约为 33 kDa, 等电点为 6.21, 为不稳定蛋白(稳定系数为 63.56), 具有亲水性(总平均亲水性为 -0.263)。进一步进化树比对显示, 所扩基因(标记为 sequence)与半滑舌鲷聚为一支, 与其他鱼类相距较远, 再次说明所扩基因为半滑舌鲷  $\alpha$ -TTP 基因(图 2)。

### 2.2 $\alpha$ -TTP 基因在各组织中的表达情况

经 qRT-PCR 检测发现,  $\alpha$ -TTP 基因在半滑舌鲷

### 1.7 生物学信息与数据统计分析

扩增全长序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对和同源性分析, 利用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)推断其开放阅读框和编码氨基酸序列; 利用 ClustalX 结合 MEGA 4.0 软件构建系统进化树; 利用 ProtParam 工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析  $\alpha$ -TTP 蛋白质的基本理化性质。

所有实验均设置 3 个平行处理, 所得数据均以平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE)表示, 并通过 SPSS 19 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)分析及基于 LSD 最小显著差异法的多重比较。当  $P < 0.05$  时, 认为具有显著差异。

11 个不同组织中均有表达, 但表达量存在很大差异, 在脾脏中相对表达量最高, 其次是肾脏, 在胃中相对表达量最低, 具体表达情况见图 3。

### 2.3 维生素 E 对垂体 $\alpha$ -TTP 表达量的影响

在养殖实验中, 垂体中  $\alpha$ -TTP 的表达量随饲料中维生素 E 含量的增加而呈先升高后降低的趋势, 并在维生素 E 达到 400 mg/kg 时, 其表达量显著高于其他 4 组( $P < 0.05$ ), 比对照组高 7.11 倍, 比其他组高 3~4 倍, 而其他 4 组之间  $\alpha$ -TTP 表达量无显著差异(图 4); 在体外细胞实验中,  $\alpha$ -TTP 表达量随维生素 E 含量的持续升高而升高, 并在 54  $\mu$ mol/L 组达到最高, 显著高于对照组, 是对照组的 1.37 倍( $P < 0.05$ )(图 5)。

### 2.4 维生素 E 对半滑舌鲷生长的影响

经过 60 d 的养殖实验, 生长数据表明饲料中维

```

1 TAA AACCGCTGGACAGGAATTCAGTTCCTCCGTATACAAAACATGGAGGTGAGGATCAACACGTGGGTGGAGGCTGTCTGTCCACCTCAAACACAG
101 CCACCTCTGGACCTCGTGGTCTGAAGGCCGGCTCTGGTGTCTGTGCTCTGATTGGACGCTCCACCACAACATTCCTACGAAGGTCTGAGTCTGTGG
201 GGAATAAAGTTGAAGACAATGGACCTCACGTACAACTCCAGACACAGGATGGTCACTCTGCCCGCCCCCTCTCCCGACCCCCGAACCTCG
301 AGGTGCCCTGGACATCCTGACTATTTGACAGGCCAAAATAAATCCCTCTTAACGTAGACTCCTGTTTCAITTCATTTTTCGGGAAGATAAAATTC
401 CCTCTTCTCTCGACACCATGTTCTTGAAGTCTTGTCAATGTCATGTCATTCAGGGGGCACAAGCACCCCTGTTGGGACTGGCGGCTTCTCCTTGAGAA
501 ATATTTGTTCTTTATTTTGGCTAACATTAGCCATGCTAGGCTACTTTTAAATGTTTCTGTTAGCAAAGAAACGTGACTTTTATTTACCTTTCACCTCA
601 TGCTGTGGCTAACGTTAACTCCACGTTTGTACTCCACGTTTGTACTCCAGTTTGTACTCCAGTTTAACTCCACGTTTGTACTCCACGTTTAACTCCACCT
701 CAACCTTTAAATATTTAAACCAAGTTTCTGTGGCTCAGAAATTTGTGTTCAAACCTTTGGTTTGTGTTTGTGTTTCTTGGCAAACAAAGATAAACTGAA
801 TTCAAAGACTCGTTTTCCTAATGGGATTCATTTCAAACCTTTTTCAGTTCCTTTTACTTTAGCAAGTTAACTATTCGCTAACCGTTCATAAGCAA
901 AAACAACAACAACAACAACAACAACCTAACCGTTAATGATTTGGTCTTTTACTTACATTCACCTTTTGTATAATACCATTTTAAATGTTACYCGTCTGC
1001 TCTTAGGTTTATCCATTCAATTTGTCTGTGTCTTCCAGCTAGTCAACCTGACTACCGTGTAAATTTAGCTTAGCCTAGCTTTGTTGGTGGTGGTGGTGGT
1101 TTTAACTATCAAACATTCATTTAGCTAGCTAACATTCGACTTGTGCCATGTGATTGTGACAGATTTTATGAAATAATGAAGAGGATTTTATAGGTGAGGT
1201 CAGAAACAGGCTTAGCTTTAGCCTTCTGATCACACACACACACACACCAAGGCCCGTCATCATCCCCAGTCCGACAGATCGCTGTGTGGG
1301 GTCCCCCAGGACCTGGACCTGGTCCAGTTTAAATGCACCTGAAGAAGCCATGCTGACGGTACAATCATCCACGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
1401 TTGTGGAAGAAATGACTCTGAAAAGAAGATTCTTAATGAGCTGAGGATCAACGTGCTCACAAACGACAGGACCTCAGCCTGGACCGCGCTCCTCATGT
1501 TGTACCCAGAACTTACAGCTTGGTTTAAAGTCCATCGAGTCAGAGCTGACCGTGTCTGTTACTTCTGTTTGGTGGTCTGGCGCGCGGTGAGCTCG
1601 GCGACTGTGCTGTGGCGGTTGTGGACCAAGTTCCTGTTACAGTTTTCAGATAAAAACAGTTCACACATATAAAGTACTCTGGCTTCTCCTGTTTTCCTT
1701 CGTCTTCGTACAGGTTCCAGACAGAGTGTGGATGGACCTGACCAGGTGTGAACGTGAGTGAATGGCTTGTATGTCTCCACACTGCAGAGTTGTCTGT
1801 GGTGCAACCTGCCCTCTGCTGGTGAATTTGTAAGTCCGCTGGGAGATAAATGAAACAGACAGACTTTTTTTTCTTTTTTTTTTCTGTGATTCA
1901 TGTTTTGAATTTAAATCTTCCATTTGTGGAATAATGACAAATCTGTAAGTCTGATGATTATATGAAACGACGCCCACTACTGGTCAATGTTGTC
2001 TTACAGTTGGAGTTGCATTTGACTAGACAGGAGTGGGGGGCGGAGCTAACGTCCTCGTGGTGGTGGTGGAGAGCTCTGCACTGTTCTTAAAGTT
2101 AGAAAAAATAAATTTCAAATGACCTATTTGCTACTCTACCCCTGGCCTGGCCCTCCTGCTCTGCCCGGTGACGATGTCAGTGAACAGGAC
2201 ACGGAGCGATGAACGGCCGAGCTCAGCGAACTCCCGGACGAGCTCCGACGCTGCGGCCCGCTGAGTGGAGGACGAGCTGTGTGGAGG
M N G P E L S E L P D E A P Q L R P P V S E L R R R A L Q E
2301 CTCCCCGCTGTCAGGACGCTGTGACGGCTTCTCATCAGGTTCTCGGGCCAGAGACTTCGACGTGGAGCAGTCCGCTGAAGCTGGTGTGAACTACC
L P A V R T L S D G F L I R F L R A R D F D V E Q S L K L V L N Y
2401 AGCGGTGGAGGAAGGACAGTCCAGAGATCAGCGGCTGTCTGTCTCCGCTCCCTGGGACTCTTGGGCTCGTCTTATCACACCGTCTCGCCCGGAG
Q R W R K D S P E I S G C L S P S S V L G L L A S S Y H T V L P R R
2501 GGATCAGCGCCGAGCAGAGTCTGTCTACAGGATCGGCCAGTGGAAACCCCAAGGACTGGTCCGCTTCCAGGCTTTAGGGTCAGCCTGATGAGCTCA
D H A G S R V L V Y R I G Q W N P K D W S A F Q V F R V S L M T S
2601 GAACTTATCTCCATGGAGACGACGACGACGAGGGCGGGCTTGAAGTCACTTTCGACCTGAGTGGTGGAGCCTGGGACAGCCCTGCAGATTAACCCCT
E L I S M E T Q T Q R R G L K V I F D L S G W S L G H A L Q I N P
2701 CCCTGGGCAAGAAATCTCTCTGTCTGTCGGACTCGTTTCCACTGAAGTTCGGGGAATCCACCTGGTCAACGAGCCATCTTCTCCGACCCGCTT
S L G R K I S S V L S D S F P L K V R G I H L V N E P I F F R P V F
2801 CGCCATGTCGACTTCTGCCCCGAGAAGATAAAACAGGATCCACATGCAACGCGCGGATTCACGACACTCTGAGCGGACTTCTCTACCCGGAC
A M I R P F L P E K I K Q R I H M H G A D F H D T L S D F F S P D
2901 GTCCTGCCTCAGAGTACGGAGGCGAGGGTCTTGGGATAGAGGAGGCTGTGGCCACTGGACCAATCACCTGCTCCAGTCCAGAGCGGCTCTGCAGCAGA
V L P P E Y G E G L G I E A C G H W T N H L L Q Q
3001 TCTCCGTCACCCACCGCGGATGTGGCGTGGCTCTGGAAGACTGCCTCAGATTGGACGGGACACAGGAAGAACCCTTCTCAGACGGATGAGCCCTCGC
I S V H P T A D V A V A P E D C L R L D G T Q E E P F S D G *
3101 CGTCAAGGTGCTTTTGTGTTTGTGTTTAACTGGACCTACTGTGGCCCTCTAGAGGACGCTCAACCGTGGAGACTCCAGTTGATCATCAGCTGTT
3201 ACATCTTCAGACATCAAACCGGCTTTCAGGGGAAAACATTTTGTCTCTTAACTAACCTTTAGCTGTGACTTATCTCAAGGCTAAAGCCAGTCTG
3301 CTCTGATCAAAGACCTGCTGGACAACACACCATTCCTCATCAT CACAATTTACTGATTTCTTCTTTTAAATCTGTTAGCCAGAGATTTTCAGATTTTTT
3401 TTTTACCTAATTTTCTGTAATGTTTCTTGTGCTTTCCTAGCTCTTCTCTTCTTGGTAACTGTGAGAGGTTTATACTTTGTGTTGGCTAT
3501 CTCTTAGCTAAAGCTAACTGTTATCCTTCAGCATCTGCTGCTCTGCCCTGTACAGACTGGTACCAGTCTCCCCGACCCAGC TGCACGTGAGCC
3601 AGGACACCAGGACGTGGACAGTTAGTGTGACCTTTGACCGTACCAGTTATCTGTTGAACATTTCTTAGACCGCTCTGGGATCAATCCACGTTG
3701 GACTGGTCCAGCCAGGCTGATAGGACACAGATCTGGATGACCTCCGATCGACCCCGGCTGCTGGACCTGAGGTCAGAGGTTCTCTGGGACTGGA
3801 CATGTGACCAAGCTAGTGGACGCTACGTGACTGATTCAAGTTTCCAAATGTTTAAATGTTGTTTGTGCTGAACTGTGGACCTTAACTGCTGGTGC
3901 CTTTGTGCTTATTTCCAGGATCTTTTTTCCACACATTTATAAAACAATTTAAAAAATAA

```

图 1 半滑舌鲷  $\alpha$ -TTP 基因序列

Fig.1 The sequence of *C. semilaievis*  $\alpha$ -TTP gene

划横线部分为 CDS 区，大写字母为对应的编码氨基酸，\*为终止密码子。

The underlined part is the CDS region, the capital letter is the corresponding coded amino acid, and an asterisk represents the termination codon.

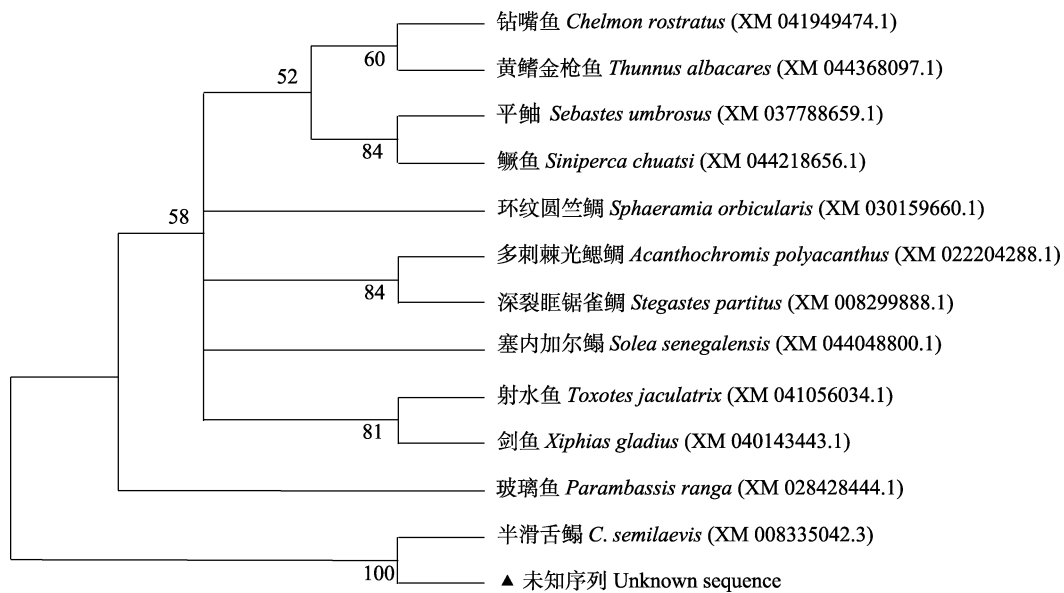


图 2 半滑舌鲷  $\alpha$ -TTP 基因进化树

Fig.2 The  $\alpha$ -TTP gene evolutionary tree of *C. semilaievis*

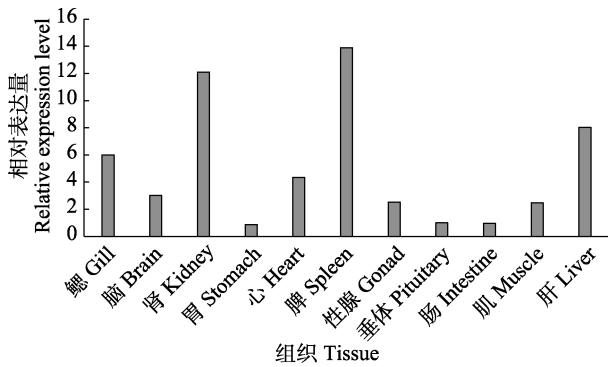


图 3  $\alpha$ -TTP 基因在半滑舌鳎各组织中的相对表达情况  
Fig.3 Relative expression of  $\alpha$ -TTP gene in tissues of *C. semilaewis*

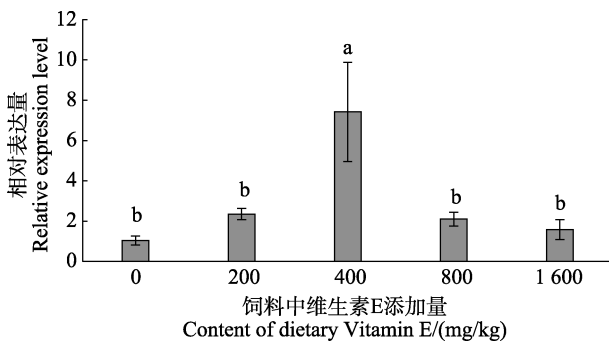


图 4 饲料中维生素 E 含量对半滑舌鳎垂体组织  $\alpha$ -TTP 基因表达的影响  
Fig.4 Effects of dietary vitamin E content on  $\alpha$ -TTP expression in pituitary tissue of *C. semilaewis*

不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ ), 下同  
Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ), the same below.

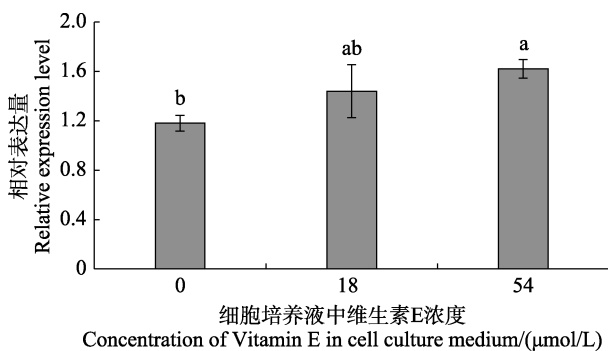


图 5 维生素 E 浓度对半滑舌鳎垂体原代细胞  $\alpha$ -TTP 基因表达的影响  
Fig.5 Effects of vitamin E concentration on  $\alpha$ -TTP expression in pituitary cells of *C. semilaewis*

生素 E 含量对半滑舌鳎的生长影响不显著( $P > 0.05$ ), 但其终末体重随着维生素 E 的添加呈先升高后降低的趋势, 并在维生素 E 添加 400 mg/kg 时最高(图 6)。

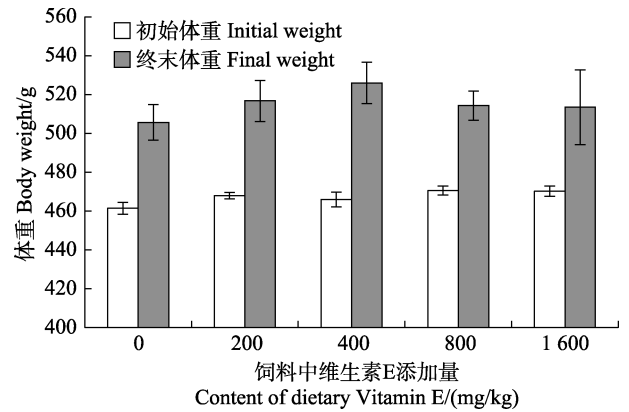


图 6 饲料中维生素 E 含量对半滑舌鳎生长的影响  
Fig.6 Effects of dietary vitamin E content on growth of *C. semilaewis*

### 3 讨论

维生素 E 是具有保护细胞膜免受过氧化损害的抗氧化剂,  $\alpha$ -生育酚转移蛋白( $\alpha$ -TTP)是调控机体维生素 E 含量的重要因子。目前, 关于  $\alpha$ -TTP 的研究主要集中在哺乳动物上, 有关鱼类  $\alpha$ -TTP 的研究还较少。本研究通过 RACE 法克隆了半滑舌鳎的  $\alpha$ -TTP 基因, 其编码 293 个氨基酸, 分子质量约为 33 kDa, 这与哺乳动物中  $\alpha$ -生育酚转移蛋白的大小几乎相一致, 但其 3 964 bp 的基因全长远大于绵羊的 1 098 bp (左兆云, 2014)。半滑舌鳎  $\alpha$ -TTP 基因在全身各组织广泛表达, 这与哺乳动物  $\alpha$ -TTP 表达情况类似 (Hosomi *et al*, 1998; Kaempf-Rotzoll *et al*, 2002; Shichiri *et al*, 2012), 但哺乳动物  $\alpha$ -TTP 主要在肝脏组织中表达 (Yoshida *et al*, 1992; Sato *et al*, 1993; Arita *et al*, 1995), 而半滑舌鳎  $\alpha$ -TTP 在脾脏和肾脏中表达量最高, 这可能是由种属差异导致的。

$\alpha$ -TTP 能够特异识别  $\alpha$ -生育酚(维生素 E)侧链结构 (Chow *et al*, 2015), 因此,  $\alpha$ -TTP 的突变也会相应引发维生素 E 缺乏症, 但  $\alpha$ -TTP 的表达量是否受维生素 E 摄入水平的影响尚不明确。近年来, 研究人员针对维生素 E 对  $\alpha$ -TTP 表达水平的影响进行了广泛的研究, 但研究结果并不尽一致, 有的甚至相互矛盾。Thakur 等(2010)在人肝癌细胞的研究中发现, 添加维生素 E 后显著提高了  $\alpha$ -TTP 的表达水平; 刘昆等(2014)在滩羊饲料中添加高水平的维生素 E 显著提高了滩羊肝脏中  $\alpha$ -TTP 的蛋白含量。本研究中, 无论是养殖实验还是体外细胞实验, 添加维生素 E 均可以显著提高垂体  $\alpha$ -TTP 基因的表达水平。然而, 在小鼠 (Chen *et al*, 2012)、猪 (Lauridsen *et al*, 2013) 和斑马鱼 (Watt

*et al.*, 2021)的研究中发现, 饲料中添加维生素 E 对其肝脏  $\alpha$ -TTP 基因表达水平均未产生显著影响。据此, 有学者认为, 由于肝脏中  $\alpha$ -TTP 的含量充足, 因此, 不会随着维生素 E 含量的变化而发生明显的改变 (Bella *et al.*, 2006)。但 Thakur 等(2010)研究发现, 维生素 E 可以同  $\alpha$ -TTP 结合并改变其构象, 然后降低其降解速率, 提高  $\alpha$ -TTP 的表达水平。维生素 E 对  $\alpha$ -TTP 表达的调节机制十分复杂, 研究结果存在差异, 其分子机制尚有待进一步的研究。

垂体在鱼类的生长和繁殖过程中发挥重要的作用(林浩然, 2011)。垂体在接收脑部传来的信号后合成生长激素、促性腺激素等, 并通过轴突将激素释放到血液中, 进而通过血液运送到靶细胞(组织或器官), 发挥激素的生理功能。由于垂体组织很小, 其大小接近半个米粒, 因此, 很难检测组织中营养素(如维生素 E)的含量, 限制了营养素对垂体影响的评估, 因此, 有必要寻找一个可替代评价的敏感指标。鉴于  $\alpha$ -TTP 与维生素 E 的密切关系, 以及维生素 E 与生长激素、促性腺激素等之间的关联已被证实(Huang *et al.*, 2019; 王蔚芳等, 2020), 本研究也试图探讨  $\alpha$ -TTP 成为评价维生素 E 影响鱼类生长和繁殖的一个潜在指标的可行性。本研究结果表明, 维生素 E 参与了垂体  $\alpha$ -TTP 基因的表达, 其表达量受维生素 E 剂量影响。在养殖实验中, 垂体  $\alpha$ -TTP 基因表达量随着饲料中维生素 E 添加量的增加呈先升高后下降的趋势, 并在添加量为 400 mg/kg 时表达量最高, 且显著高于其他各组( $P < 0.05$ ), 其结果也与本研究中半滑舌鳎的生长趋势吻合, 生长指标也在添加 400 mg/kg 维生素 E 时表现最优异。张志强等(2017)和覃希等(2014)的研究也指出, 饲料中维生素 E 的缺乏或过量能够影响鱼的生长, 其影响模式与本研究中  $\alpha$ -TTP 基因变化趋势相符。然而, 高剂量的维生素 E (1 200 mg/kg)却有效提升了半滑舌鳎亲鱼的繁殖性能(肖登元等, 2015)。在亲鱼垂体中  $\alpha$ -TTP 基因表达量是如何响应饲料中维生素 E 含量的变化, 值得进一步探索。另一方面, 体外细胞实验结果显示, 没有出现  $\alpha$ -TTP 基因表达量下调的现象, 今后可进一步增加其浓度梯度开展实验; 但体外实验进一步证实了垂体中  $\alpha$ -TTP 基因受到维生素 E 浓度的影响。本研究结果表明, 垂体  $\alpha$ -TTP 基因的表达响应了饲料中维生素 E 含量的变化, 可成为指示垂体中评价维生素 E 影响鱼类生长和繁殖的潜在评价指标, 在日后的相关研究中可以进一步考虑二者之间的关联性并加以验证。

## 4 结论

本研究克隆了半滑舌鳎  $\alpha$ -生育酚转移蛋白基因  $\alpha$ -TTP, 其在半滑舌鳎各组织均有表达, 并在脾脏中表达最高, 其次是肾脏, 在胃中表达量最低。饲料中添加 400 mg/kg 的维生素 E 时, 其垂体中  $\alpha$ -TTP 基因表达量最高, 饲料中维生素 E 含量不足或过量都会降低其表达。

## 参 考 文 献

- ARAI H, KONO N.  $\alpha$ -Tocopherol transfer protein ( $\alpha$ -TTP). *Free Radical Biology and Medicine*, 2021, 176: 162–175
- ARITA M Y, SATO Y, MIYATA A, *et al.* Human alpha-tocopherol transfer protein: cDNA cloning, expression and chromosomal localization. *Biochemical Journal*, 1995, 306(Pt2): 437–443
- ARITA M, NOMURA K, ARAI H.  $\alpha$ -Tocopherol transfer protein stimulates the secretion of  $\alpha$ -tocopherol from a cultured liver cell line through a brefeldin A-insensitive pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(23): 12437–12441
- BELLA D L, SCHOCK B C, LIM Y, *et al.* Regulation of the alpha-tocopherol transfer protein in mice: Lack of response to dietary vitamin E or oxidative stress. *Lipids*, 2006, 41(2): 105–112
- CHEN W H, LI Y J, WANG M S, *et al.* Elevation of tissue  $\alpha$ -tocopherol levels by conjugated linoleic acid in C57BL/6J mice is not associated with changes in vitamin E absorption or  $\alpha$ -carboxyethyl hydroxychroman production. *Nutrition*, 2012, 28(1): 59–66
- CHOW C K. Biological functions and metabolic fate of vitamin E revisited. *Journal of Biomedical Science*, 2004, 11(3): 295–302
- GOHIL K, OOMMEN S, QUACH H T, *et al.* Mice lacking  $\alpha$ -tocopherol transfer protein gene have severe  $\alpha$ -tocopherol deficiency in multiple regions of the central nervous system. *Brain Research*, 2008, 1201: 167–176
- HEAD B, DU J L, BARTON C, *et al.* RedEfish: Generation of the polycistronic mScarlet: GSG-T2A: Ttpa Zebrafish Line. *Antioxidants*, 2021, 10: 965
- HOSOMI A, GOTO K, KONDO H, *et al.* Localization of  $\alpha$ -tocopherol transfer protein in rat brain. *Neuroscience Letters*, 1998, 256(3): 159–162
- HUANG B, WANG N, SHI B, *et al.* Primary culture of pituitary cells in *Cynoglossus semilaevis*. *Open Journal of Fisheries Research*, 2017, 4(3): 71–78 [黄滨, 王娜, 史宝, 等. 半滑舌鳎垂体细胞体外原代培养方法研究. *水产研究*, 2017, 4(3): 71–78]
- HUANG B, WANG N, SHI B, *et al.* Vitamin E stimulates the

- expression of gonadotropin hormones in primary pituitary cells of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 2019, 509: 47–51
- JISHAGE K I, ARITA M, IGARASHI K, *et al.*  $\alpha$ -Tocopherol transfer protein is important for the normal development of placental labyrinthine trophoblasts in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(3): 1669–1672
- KAEMPF-ROTZOLL D E, IGARASHI K, AOKI J, *et al.* Alpha-tocopherol transfer protein is specifically localized at the implantation site of pregnant mouse uterus. *Biology of Reproduction*, 2002(2): 599–604
- LAURIDSEN C, THEIL P K, SOREN K J. Composition of  $\alpha$ -tocopherol and fatty acids in porcine tissues after dietary supplementation with vitamin E and different fat sources. *Animal Feed Science and Technology*, 2013, 179(1/2/3/4): 93–102
- LIN H R. *Fish physiology*. Guangzhou: Sun Yat-sen University Press, 2011, 240–249 [林浩然. 鱼类生理学. 广州: 中山大学出版社, 2011, 240–249]
- LIU K, LUO H L. Effect of vitamin E on  $\alpha$ -tocopherol transfer protein ( $\alpha$ -TTP) expression and its mechanism. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 22(5): 615–620 [刘昆, 罗海玲. 维生素 E 对  $\alpha$ -生育酚转移蛋白( $\alpha$ -TTP)表达的影响及其作用机制研究进展. *农业生物技术学报*, 2014, 22(5): 615–620]
- LIU K. Effect of vitamin E on  $\alpha$ -TTP expression in sheep and its mechanism. Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2014 [刘昆. 维生素 E 对绵羊  $\alpha$ -TTP 表达的影响及其作用机制. 中国农业大学博士研究生学位论文, 2014]
- QIAN J. Intracellular trafficking of vitamin E in hepatocytes: The role of tocopherol transfer protein. *Journal of Lipid Research*, 2005, 10: 2072–2082
- QIN X, HUANG K, LIU K, *et al.* Effects of dietary vitamin E and selenium on the growth and the antioxidant enzyme activity in serum of juvenile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Advances in Fishery Science*, 2014, 35(4): 77–84 [覃希, 黄凯, 刘康, 等. 维生素 E 和硒对吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼生长及血清抗氧化酶活性的影响. *渔业科学进展*, 2014, 35(4): 77–84]
- SATO Y, ARAI H, MIYATA A, *et al.* Primary structure of alpha-tocopherol transfer protein from rat liver: Homology with cellular retinaldehyde-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(24): 17705–17710
- SHICHIRI M, KONO N, SHIMANAKA Y, *et al.* A novel role for  $\alpha$ -tocopherol transfer protein ( $\alpha$ -TTP) in protecting against chloroquine toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(4): 2926–2934
- THAKUR V, MORLEY S, MANOR D. Hepatic  $\alpha$ -tocopherol transfer protein: Ligand-induced protection from proteasomal degradation. *Biochemistry*, 2010, 49(43): 9339–9344
- WANG W F, XIANG L, WANG L, *et al.* Optimal concentration of vitamin E promotes the expression of growth hormone gene in tongue sole. *Marine Sciences*, 2020, 44(2): 113–119 [王蔚芳, 向玲, 王琳, 等. 适宜浓度的维生素 E 促进半滑舌鳎生长激素基因的表达. *海洋科学*, 2020, 44(2): 113–119]
- WATT A T, HEAD B, LEONARD S W, *et al.* Gene expression of CRAL\_TRIO family proteins modulated by vitamin E deficiency in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2021, 97: 108801
- XIAO D Y, LIANG M Q, WANG X X, *et al.* Effects of dietary supplementation of different levels of vitamin E on reproductive performance and offspring quality of *Cynoglossus semilaevis*. *Advances in Fishery Science*, 2015, 36(2): 125–132 [肖登元, 梁萌青, 王新星, 等. 饲料中添加不同水平的维生素 E 对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)亲鱼繁殖性能及后代质量的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(2): 125–132]
- YOSHIDA H, YUSIN M, REN I, *et al.* Identification, purification, and immunochemical characterization of a tocopherol-binding protein in rat liver cytosol. *Journal of Lipid Research*, 1992, 33(3): 343–350
- ZHANG Z Q, JIANG M, WEN H, *et al.* Dietary vitamin E requirement of juvenile Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*). *Journal of Northwest A&F University (Natural Science)*, 2017, 45(2): 23–30, 36 [张志强, 蒋明, 文华, 等. 胭脂鱼幼鱼对饲料中维生素 E 需要量的研究. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2017, 45(2): 23–30, 36]
- ZUO Z Y. Molecular mechanism of dietary vitamin E on testis reproductive function in sheep. Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2014 [左兆云. 日粮维生素 E 对绵羊睾丸繁殖机能影响的分子机制初探. 中国农业大学博士研究生学位论文, 2014]

(编辑 冯小花)



## Effects of Vitamin E on $\alpha$ -Tocopherol Transfer Protein Expression in the Pituitary of *Cynoglossus semilaevis*

HUO Huanhuan<sup>1</sup>, LI Huitao<sup>2</sup>, WANG Weifang<sup>3①</sup>, LIU Baoliang<sup>3</sup>, ZANG Tao<sup>4</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. Qingdao Vland Fubang Biotech Co., Ltd., Qingdao 266600, China;

3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

4. Jinan Agro-Tech Extension and Service Center, Jinan 250004, China)

**Abstract**  $\alpha$ -Tocopherol transfer protein ( $\alpha$ -TTP) is a protein that exhibits a marked ligand specificity that selectively recognizes  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) and plays a key role in regulating concentrations of vitamin E. The primary function of  $\alpha$ -TTP is maintaining adequate vitamin E levels. However, the available data are insufficient to comprehensively understand the mechanisms by which  $\alpha$ -TTP regulates vitamin E supplementation. Related studies have been mainly focused on humans, mice, and rats as the primary subjects; however, little is currently known about fish. The pituitary gland plays an important role in the growth and reproduction of fish. It synthesizes growth hormone and gonadotropin after receiving signals from the brain and releases the hormones into the blood through the axons. It is then transported to the target cells (tissues or organs) through the blood to perform the physiological function of hormones. As the pituitary tissue is very small, being nearly half the size of a grain of rice, it is difficult to detect the nutrient contents (such as vitamin E, which has been verified to play an important role in the growth and reproduction of fish) in the tissue. This limits the evaluation of the effect of nutrients on the pituitary gland. Therefore, this experiment was conducted to investigate the effects of vitamin E concentrations on the expression of the  $\alpha$ -TTP gene in the pituitary tissue of a half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). DL- $\alpha$ -tocopherol acetate (vitamin E, Sigma) was added to the basic diet, which was formulated with fish meal, casein, and wheat meal as protein sources, as well as phospholipids, fish oil, and soybean oil as lipid sources. The finalized crude protein was 56.0%, and the crude lipid was 14.1% at concentrations of 0, 200, 400, 800, and 1 600 mg/kg to feed half-smooth tongue sole ( $464.0 \pm 2.6$  g) for 60 d. The fish were maintained in polyethylene tanks (diameter: 150 cm, height: 60 cm) with flowing filtered seawater at a rate of 50 L/min, and during the feeding trial, the water temperature ranged from 24 to 27 °C, salinity from 30 to 31, and pH from 7.8 to 8.1. Dissolved oxygen was greater than 5.65 mg/L. In addition, the pituitary glands of similar fish were collected, minced into small pieces (about 1 mm<sup>3</sup>), and digested with 0.25% trypsin-EDTA (Gibco) for approximately 15 min at 25 °C. Then, the digested glands were filtered through 70  $\mu$ m nylon mesh (BD Falcon), filtrates were collected and centrifuged at 100  $\times$ g for 10 min at 4 °C, and cell deposits were resuspended in 1 mL L-15 medium containing 5% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin (Gibco). Subsequently, the pre-dissolved vitamin E in ethanol solutions of 0, 18, and 54  $\mu$ mol/L were added to the L-15 medium for the primary pituitary cell culture of 3 d. The ethanol content in the cell medium (0.1% v/v) was tested to ensure that it was not harmful to the cells, and its purpose was to dissolve the fat-soluble vitamin E in the culture medium. Then, the  $\alpha$ -TTP gene was cloned using rapid amplification of cDNA ends PCR (RACE-PCR) technology, and the relative gene expression levels were analyzed *via* quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in the tissues and the primary pituitary cells. The results showed that the total length of the

① Corresponding author: WANG Weifang, E-mail: wangwf@ysfri.ac.cn

$\alpha$ -TTP gene was 3 964 bp, encoding a total of 293 amino acids. The evolutionary gene tree showed that the  $\alpha$ -TTP gene from *C. semilaevis* had a further genetic relationship with other fish. The  $\alpha$ -TTP gene was expressed in all 11 tissues of the half-smooth tongue sole, with the highest expression in the spleen, followed by the kidney, and the lowest expression in the stomach. The feeding experiment indicated that the expression of the  $\alpha$ -TTP gene showed an initial increase and then decreased with the increase in dietary vitamin E content. The  $\alpha$ -TTP gene expression of 400 mg/kg in this group was significantly higher than that in other groups ( $P < 0.05$ ). As vitamin E concentrations in the cell culture medium increased, the relative expression of the  $\alpha$ -TTP gene increased significantly ( $P < 0.05$ ), and no declining trend was observed. These findings suggested that vitamin E was involved in the expression of the pituitary  $\alpha$ -TTP gene, whose expression level was affected by the vitamin E dose. Since the pituitary  $\alpha$ -TTP gene expression could be a potential evaluation indicator to demonstrate the effect of vitamin E on fish growth and reproduction, the association should be further investigated and verified in subsequent related studies. In conclusion, vitamin E supplemented in the diet at the appropriate concentration of 400 mg/kg can significantly increase the expression of the  $\alpha$ -TTP gene in half-smooth tongue soles. This study offers novel insights into the underlying mechanisms of  $\alpha$ -TTP in mediating the effect of vitamin E on fish growth and reproduction.

**Key words** Vitamin E; *Cynoglossus semilaevis*; Pituitary;  $\alpha$ -Tocopherol transfer protein ( $\alpha$ -TTP)