DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20250217001　　http://www.yykxjz.cn/

李璐, 李宝山, 黄炳山, 王忠全, 王晓艳, 郝甜甜, 李培玉, 相智巍, 王成强, 宋志东. DHA 营养强化对半滑舌鳎仔鱼脂肪酸代谢模式和 DNA 甲基化修饰的影响. 渔业科学进展, 2026, 47(1): 106–115
LI L, LI B S, HUANG B S, WANG Z Q, WANG X Y, HAO T T, LI P Y, XIANG Z W, WANG C Q, SONG Z D. Effects of DHA nutrition programming on fatty acid metabolism and DNA methylation patterns in larvae of *Cynoglossus semilaevis*. Progress in Fishery Sciences, 2026, 47(1): 106–115

DHA 营养强化对半滑舌鳎仔鱼脂肪酸代谢模式和 DNA 甲基化修饰的影响*

李　璐　李宝山①　黄炳山　王忠全　王晓艳　郝甜甜
李培玉　相智巍　王成强　宋志东

(山东省海洋资源与环境研究院　烟台市海珍品质量安全控制与精深加工重点实验室
山东省海水渔用饲料工程技术研究中心　自然资源部莱州湾海洋生态系统野外科学观测研究站
山东省海洋生态修复重点试验室　山东　烟台　264006)

摘要　为优化半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)品质，探索表观遗传调控长链高不饱和脂肪酸(LC-HUFA)合成机制，本实验研究了二十二碳六烯酸(DHA)营养强化对半滑舌鳎仔稚鱼生存能力、脂肪酸沉积及表观遗传修饰调控脂肪酸代谢的影响，以期为养成优质半滑舌鳎鱼种提供理论基础。使用 DHA 强化剂对孵育中的卤虫(*Artemia*)进行强化，以强化卤虫开口仔鱼作为实验组，同时以未强化卤虫开口仔鱼作为对照组，养殖至孵化后 15 d (15 dph)进行取样，统计孵化率、存活率、畸形率及体长，检测稚鱼全鱼脂肪酸组成及脂肪酸代谢基因表达，分析 *fads2* 基因 DNA 甲基化修饰状态。结果显示，15 dph 时，实验组存活率及体长显著提高，畸形率显著降低($P<0.05$)；亚油酸(LA)、花生四烯酸(ARA)、亚麻酸(LNA)和 DHA 含量显著升高，n-6 多不饱和脂肪酸(PUFA)和 n-3PUFA 含量显著升高；*pparα*、*acc1* 和 *fas* 基因表达量显著降低，*fads2* 和 *fabp1* 表达量显著升高，*elovlα* 基因表达量无显著性差异；距离 *fads2* 转录起始位点–750~ –1 050 bp 存在一个 CpG 岛，片段总长度为 301 bp，共有 8 个候选 CpG 位点，其中 5 个 CpG 位点发生显著去甲基化修饰，从总体甲基化水平来看，*fads2* 启动子区域存在高度去甲基化修饰现象。本研究使用 DHA 对半滑舌鳎仔鱼进行营养强化可提高稚鱼生存能力，通过促进脂肪酸转运和去饱和作用提高稚鱼鱼体 LC-HUFA 合成，从而改善脂肪酸代谢模式，同时，发现早期营养强化参与 *fads2* 启动子区域去甲基化修饰，从而提高 *fads2* 基因转录表达。本研究有助于半滑舌鳎高 LC-HUFA 优质仔稚鱼养成，为半滑舌鳎高效养殖提供了新思路。

关键词　营养强化；半滑舌鳎；DNA 甲基化；脂肪酸代谢；仔鱼
中图分类号　S962.2　**文献标识码**　A　**文章编号**　2095-9869(2026)01-0106-10

* 山东省重点研发计划(2021SFGC0701)、烟台市海珍品质量安全控制与精深加工重点实验室开放基金(QSCDP202311)共同资助。李　璐，E-mail: liluzhy@126.com

① 通信作者：李宝山，研究员，E-mail: bsleeyt@126.com

收稿日期: 2025-02-17, 收修改稿日期: 2025-03-31

脂肪酸是鱼类重要的营养物质，在机体生长和脂肪酸代谢中发挥重要作用。海水肉食性鱼类的必需脂肪酸——长链高不饱和脂肪酸(LC-HUFA)在调节代谢、维持细胞形态等方面有着积极影响，但自身合成能力有限，主要来源于营养摄入。LC-HUFA 的合成涉及脂肪酸转运、从头合成、β 氧化、去饱和、碳链延长等多个生物过程，通过长期进化形成了稳定的 LC-HUFA 代谢模式(Sargent *et al*, 2003)。但已有研究表明，通过外源摄入可提高鱼体 LC-HUFA 蓄积、调节代谢(艾庆辉等, 2016; 李信等, 2020)、优化鱼类品质、提升养殖鱼类经济价值，但投入成本颇高。

生命早期发育阶段的营养强化会影响机体的代谢状态，多伴随表观遗传的调控(Shao *et al*, 2014; Badeaux, 2013; Skjærven *et al*, 2023)。水产动物的营养强化研究集中在斑马鱼(*Danio rerio*)、金头鲷(*Sparus aurata*)及攀鲈(*Anabas testudineus*)等鱼类。例如对攀鲈通过多不饱和脂肪酸(PUFA)营养强化后，生长性能有所提高(Singh *et al*, 2024)。豆粕刺激可引起金头雕代谢相关蛋白 DNA 甲基化及组蛋白修饰模式改变(Perera *et al*, 2017)。生命早期葡萄糖刺激可引起尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肌肉和肝脏样本的 DNA 低甲基化，刺激糖代谢基因表达，并伴随更好的生长性能(Kumkhong *et al*, 2020)。微量营养素补充影响大西洋鲑(*Salmo salar*)雄性性腺 DNA 甲基化，并可能通过谷氨酸受体相关基因参与胚胎发育的代际表观遗传(Saito *et al*, 2022)。因此，探究如何通过鱼类早期外源营养影响表观遗传介导代谢，故而改善 LC-HUFA 合成限制，生成优质鱼种具有重要意义。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是海水肉食性鱼类的代表性物种，探究 LC-HUFA 合成改善途径可有效提高其经济和营养价值。本研究使用二十二碳六烯酸(DHA)强化剂强化卤虫(*Artemia salina*)作为开口饵料，将半滑舌鳎仔鱼养至稚鱼期，探究其存活率、畸形率及生长速度，分析营养强化后稚鱼脂肪酸沉积状态，脂肪酸代谢相关基因转录水平及 DNA 甲基化修饰状态，最终探索 DHA 营养强化对半滑舌鳎稚鱼生存、脂代谢模式及表观修饰应答的影响。

1　材料与方法

1.1　实验材料

实验所用半滑舌鳎受精卵购于天津一方乐海水产有限公司，卤虫卵和 DHA 强化剂，其主要成分为裂殖壶藻(*Platymonas subcordiformis*)粉，购于天津丰产饲料有限公司，DHA 强化剂营养组成见表 1。

表 1　DHA 强化剂脂肪酸组成

Tab.1　The fatty acid profile of DHA fortification

脂肪酸组成 FA profile	DHA 强化剂 DHA fortifier
14: 00	2.52±0.07
15: 00	0.81±0.24
16: 00	49.14±1.65
17: 00	0.19±0.02
18: 00	1.64±0.14
22: 5n-3	7.49±0.38
22: 6n-3 (DHA)	38.21±1.41
∑PUFA	45.70±1.62

1.2　DHA 强化

本实验在山东省海洋资源与环境研究院东营实验基地苗种繁养车间进行，受精卵破膜的同时，对卤虫卵进行孵化以备后续仔鱼开口。孵化卤虫时水温 26 ℃，盐度 30~33，pH 8.0~8.2，溶氧 5 mg/L。孵育 24 h 后，分离卵壳与卤虫无节幼体，随机将卤虫无节幼体分至 2 个孵化桶内，密度为 300 个/mL。取 0.3 g/L 的 DHA 强化剂加入水中搅拌至糊化，过滤后投喂卤虫无节幼体进行强化，卤虫无节幼体的脂肪酸组成见表 2，强化时间持续 12 h 后投喂仔鱼。

表 2　DHA 强化后卤虫无节幼体脂肪酸组成

Tab.2　The fatty acid profile of *A. salina* nauplius fortified with DHA fortifier

脂肪酸 Fatty acid	普通卤虫 Regular *A. salina*	DHA 强化卤虫 DHA fortified *A. salina*
14: 00	0.93±0.05	0.98±0.03
16: 00	9.78±0.20	9.83±0.31
18: 00	12.76±1.13	12.63±1.07
20: 00	2.89±0.07	2.81±0.06
∑SFA	26.36±1.45	26.65±1.47
16: 1n-7	11.31±0.13	11.28±1.20
18: 1n-9	25.20±1.61	26.27±1.89
∑MUFA	36.51±1.74	37.55±3.09
18: 2n-6 (LA)	9.12±0.23	9.04±0.41
20: 4n-6 (ARA)	1.52±0.08	1.43±0.07
∑n-6PUFA	10.64±0.31	10.47±0.48
18: 3n-3 (LNA)	11.14±0.84	11.01±0.79
20: 5n-3 (EPA)	5.33±0.13	5.24±0.09
22: 6n-3 (DHA)	0.62±0.07	1.93±0.14*
∑n-3PUFA	17.09±1.04	18.18±1.02

注：每行肩标“*”表示差异显著(P<0.05)，无肩标说明两组差异不显著(P>0.05)，下同。

Note: Data in the same row with “*” are significantly different (P<0.05), no “*” represents insignificant difference (P>0.05). The same blow.

实验分为 2 组，每组 3 个平行，每个平行 1 万粒受精卵放入孵化桶内，实验组(Pro 组)仔鱼开口所用卤虫为 DHA 强化卤虫，对照组(Con 组)仔鱼开口所用卤虫为正常条件下孵育卤虫。

1.3 养殖管理

受精卵孵化期间，设置水温为 23 ℃，盐度 30~33，pH 8.0~8.2，溶氧 5 mg/L，总氨氮≤0.1 mg/L，仔鱼使用卤虫开口，投喂量为 4~5 个/mL，养殖水量为孵化桶容积的 2/3，开口前 7 d 每天加水至目标水量，至孵化后 7 d (7 dph)时，开始换水，换水量为 30%，养至 15 dph 进行取样(Li *et al*, 2005)。

1.4 仔鱼质量评价

从每个孵化桶中分别取 500 粒受精卵布入 6 个 1 000 mL 装有海水的烧杯中(每组 3 个平行)，破膜后 2 d (2 dph)分别使用正常卤虫(Con 组)和 DHA 强化卤虫(Pro 组)进行仔鱼开口，烧杯模拟与孵化桶相同养殖环境，养殖至 15 dph，计算孵出仔鱼数、存活稚鱼数及畸形稚鱼数，统计存活率和畸形率，其中畸形是指鱼尾部或脊柱出现弯曲现象。测量并记录 1 dph 和 15 dph 仔稚鱼体长。

存活率(%)=存活稚鱼数/孵出仔鱼数×100%

畸形率(%)=畸形稚鱼数/孵出仔鱼数×100%

以上评价指标每孵化桶设置 3 个技术重复。

1.5 样品采集

实验期间，每天在各平行随机取 3 尾仔稚鱼观察生长状态。养殖周期结束后，各平行随机取 500 尾稚鱼放入冻存管–20 ℃保存，用于检测稚鱼脂肪酸组成；各平行随机取 1 000 尾分别装入 2 个冻存管中，–80 ℃保存，用于基因表达分析及 DNA 甲基化修饰研究。

1.6 脂肪酸组成和基因表达

将待测样品使用冷冻干燥机冻干后研磨为粉状，置于 15 cm×2.5 cm 带螺帽试管中，加入 3 mL 甲醇盐酸和 1 mL 正己烷，盖紧螺帽缓慢混匀。接着将试管 80 ℃金属浴加热 2 h，冷却至室温后，向试管中加入 5~10 mL 6% K_2CO_3 水溶液，待液体分层后，将上清液转移到离心管中，2 000 r/min 离心 2~6 min，将上层的正己烷转移至 GC 的样品瓶中，供高效气相色谱仪(Shimadzu GC-2010，日本)测试。

使用 Trizol 法进行总 RNA 提取，通过琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 质量，并使用痕量检测仪(NanoDrop 2000，美国)检测核酸浓度、分析 RNA 纯度。使用反转录试剂盒 PrimeScript^{TM} RT reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa，日本)合成 cDNA。NCBI 网站调取脂肪酸合酶(*fas*)、乙酰辅酶 a 羧化酶 1 (*acc1*)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (*pparα*)、脂肪酸结合蛋白 1 (*fabp1*)、脂肪酸去饱和酶 2 (*fads2*)和脂肪酸延长酶 α (*elovlα*)等基因序列，选择 *β-actin* 作为内参基因，使用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计，引物序列见表 3。将所有引物交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成，以之前合成的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 分析，反应程序：95 ℃，30 s；95 ℃，5 s；T_m ℃，30 s；40 个循环。

表 3 实时荧光定量 PCR 引物的序列和退火温度

Tab.3 Primer sequences and annealing temperatures used for RT-qPCR

基因 Gene	引物 Primer	序列 Sequence (5′~3′)	退火温度 T_m/℃
fas	fas-F	TCAACAATCCCAACACCGAC	57
	fas-R	CCGCCAAATCCGAAAGAG	
acc1	acc1-F	AGAACGGGCATTACGACAA	56
	acc1-R	CAAGGTGGGAAGCAATCAA	
pparα	pparα-F	CTCAAGGCAGAAAGCAGAAT	56
	pparα-R	GGGCTCACCGTTTACCATA	
fabp1	fabp1-F	TTACCTTCGCCGTCTGCT	57
	fabp1-R	CCTTGCCCTTCTGGATGA	
fads2	fads2-F	GGATTTCCGCACTTTACGC	56
	fads2-R	CAGTTAGTTCCCCAAAACCATA	
elovlα	elovlα-F	CCAGTTCCCCATCTTTGTCT	57
	elovlα-R	CGTGCTTTCCGTGATTTGC	
β-actin	β-actin-F	GCTGTGCTGTCCCTGTA	56
	β-actin-R	GAGTAGCCACGCTCTGTC	

1.7 DNA 甲基化修饰

实验组与对照组共 6 个样品使用基因组 DNA 提取试剂盒(Vazyme，DNA Isolation Mini Kit-BOX_2)提取基因组 DNA，DNA 样品使用 DNA 重亚硫酸盐转化试剂盒(TIANGEN，DP215)根据说明书要求将基因组 DNA 变性和硫酸铵盐转变。通过 NCBI 网站选择 *fads2* 基因(由先前实验得出差异显著关键基因)前 2 000 bp，利用 Methprimer 网站预测其 CpG 岛及位点分布，同时生成甲基化引物(表 4)。使用硫化 DNA 为模板进行 PCR 扩增，程序设定为：95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s; 54.8 ℃ 30 s; 72 ℃ 30 s; 72 ℃ 7 min; 4 ℃ 10 s; 40 个循环。PCR 产物采用 Vazyme FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 进行凝胶纯化，并克隆到 TOPO 载体上进行培养。挑取单克隆样品进行测序，通过甲基化定量工具网站对序列结果进行分析。

表 4　半滑舌鳎稚鱼 *fads2* 基因甲基化引物序列和退火温度

Tab.4　Primer sequences and annealing temperatures used for methylation in *fads2* promoter of *C. semilaevis* larvae

基因 Gene	引物 Primer	序列 Sequence (5′~3′)	退火温度 T_m/℃
fads2	cs-CpG-fads2-F	GTTATGATAGGTAGGAAAGAGGGTG	54.8
	cs-CpG-fads2-R	AATTCTTAACACAAAAATTCAATCC	

1.8 数据统计与分析

采用 SPSS 17.0 软件进行单样本 *T* 检验检测数据分布的正态性，采用单因素方差分析(one-way ANOVA)与 Duncan 多重比较。结果以平均值±标准误(Mean±SE)表示，$P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 营养强化对半滑舌鳎仔稚鱼生存质量的影响

半滑舌鳎仔鱼孵化率、畸形率及存活率如表 5 所示，两组孵化率无显著性差异($P>0.05$)，营养强化后，Pro 组存活率显著高于 Con 组($P<0.05$)，畸形率显著低于 Con 组($P<0.05$)。受精卵孵化破膜当天两实验组体长无显著性差异($P>0.05$)，孵化 15 d 后 Pro 组稚鱼体长显著高于 Con 组($P<0.05$)。

表 5　半滑舌鳎稚鱼生存、生长指标

Tab.5　Survival and growth indices of *C. semilaevis* larvae

项目 Items	Con 组	Pro 组
存活率 Survival rate/%	80.97±0.26	84.13±0.32*
畸形率 Abnormal rate/%	4.87±0.12	3.73±0.17*
1 dph 体长 1 dph length/mm	2.57±0.05	2.59±0.03
15 dph 体长 15 dph length/mm	7.50±0.05	9.35±0.05*

2.2 营养强化对半滑舌鳎稚鱼脂肪酸沉积的影响

DHA 营养强化后半滑舌鳎仔鱼的脂肪酸组成如表 6 所示，16:1n-7、亚油酸(LA)、花生四烯酸(ARA)、亚麻酸(LNA)和 DHA 含量显著升高($P<0.05$)；n-6PUFA 和 n-3PUFA 含量显著升高($P<0.05$)；18: 1n-9 含量显著降低($P<0.05$)，其他类型脂肪酸含量无显著性差异($P>0.05$)。

表 6　半滑舌鳎稚鱼脂肪酸组成

Tab.6　The fatty acid profile of *C. semilaevis* larvae

FA profile	Con 组	Pro 组
14: 00	4.93±0.52	4.23±0.44
16: 00	8.97±0.26	8.13±0.32*
18: 00	4.87±0.12	3.73±0.17*
20: 00	2.57±0.05	2.59±0.03
∑SFA	21.34±0.95	18.68±0.96
16: 1n-7	5.21±0.13	6.78±1.20*
18: 1n-9	22.02±2.41	20.38±2.65*
∑MUFA	27.23±2.54	27.16±3.85
18: 2n-6 (LA)	9.34±0.22	10.20±0.19*
20: 4n-6 (ARA)	0.92±0.04	1.23±0.06*
∑n-6PUFA	10.26±0.26	11.43±0.25*
18: 3n-3 (LNA)	1.21±0.36	2.07±0.51*
20: 5n-3 (EPA)	4.41±0.41	4.92±0.84
22: 6n-3 (DHA)	9.73±0.77	10.37±0.56*
∑n-3PUFA	15.35±1.54	17.36±1.91*

2.3 营养强化对半滑舌鳎稚鱼脂肪酸代谢基因表达的影响

营养强化对半滑舌鳎稚鱼脂肪酸代谢基因表达的影响见图 1。Pro 组 *pparα*、*acc1* 和 *fas* 基因表达量显著低于 Con 组($P<0.05$)；*elovlα* 基因表达量在两组之间无显著性差异($P>0.05$)；Pro 组 *fads2* 和 *fabp1* 表达量显著高于 Con 组($P<0.05$)。

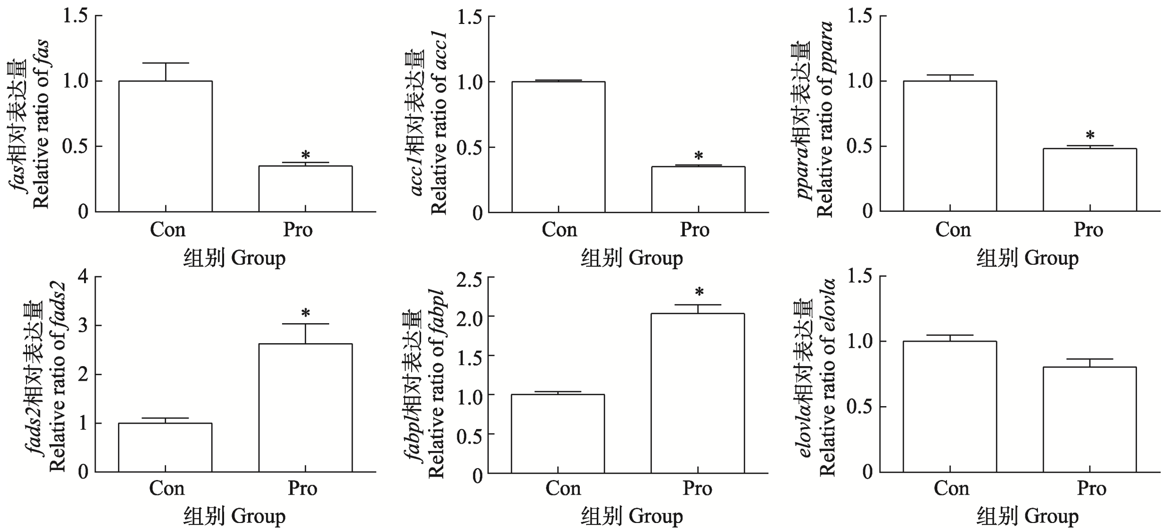

图 1 半滑舌鳎稚鱼脂代谢相关基因表达量

Fig.1 The transcript levels of genes for fatty acid metabolism of *C. semilaevis* larvae

Pro 组柱子上方存在“*”则表示与 Con 组差异显著(P<0.05)，无标识说明与 Con 组差异不显著(P>0.05)。
Vertical bars sharing “*” on Pro group are significantly different from Con group (P<0.05), and no identifier represents insignificant difference (P>0.05).

2.4 营养强化对半滑舌鳎 *fads2* 基因 DNA 甲基化修饰的影响

在 NCBI 网站调取 *fads2* 起始位点 ATG (命名为 0)上游 –2 000 bp 的序列，发现距离转录起始位点–750~–1 050 bp 存在 1 个 CpG 岛，片段总长度为 301 bp，GC 含量大于 50%，期望值>0.6，共有 8 个候选 CpG 位点，分别位于–811 bp、–813 bp、–896 bp、–928 bp、–974 bp、–982bp、–992bp 和–1 004 bp 处，详见图 2。

利用亚硫酸盐测序法分析了半滑舌鳎稚鱼 *fads2* 启动子 DNA 甲基化水平。在预测的 8 个 CpG 位点中，Con 组的 7 个位点存在高度甲基化，Pro 组 3 个位点存在高度甲基化。营养强化显著下调了 *fads2* 基因–811 bp、–813 bp、–896 bp、–982 bp 和–992 bp 位点的甲基化水平(图 3 和表 7)。

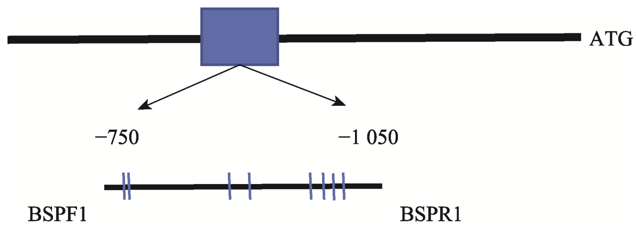

图 2 *fads2* 启动子 CpG 位点分布

Fig.2 CpG sites distribution of *fads2* promoters

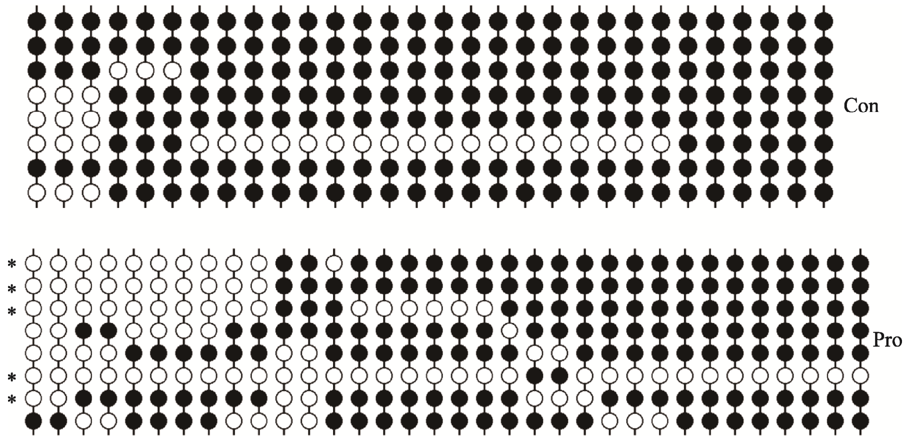

图 3 半滑舌鳎稚鱼 *fads2* 基因上游 2 000 bp 甲基化模式

Fig.3 The DNA methylation patterns at upstream 2 000 bp of *fads2* in *C. semilaevis* larvae

白色圆圈代表未发生甲基化，黑色圆圈代表发生甲基化。
White circles show unmethylated CpGs, and black circles show methylated CpGs.

表 7　半滑舌鳎稚鱼 *fads2* 基因 CpG 岛各位点 DNA 甲基化水平

Tab.7　Methylation level of each CpG of the *fads2* gene in *C. semilaevis* larvae

CpG position	–811	–813	–896	–928	–974	–982	–992	–1 004	总计 Total
Me-CpG	30/30	30/30	27/30	27/30	27/30	9/30	30/30	27/30	207/240
(Con)	100.0%	100.0%	90.0%	90.0%	90.0%	30.0%	100.0%	90.0%	86.2%
Me-CpG	23/34	24/34	18/34	27/34	26/34	2/34	27/34	25/34	172/272
(Pro)	67.6%	70.6%	52.9%	79.4%	76.5%	5.9%	79.4%	73.5%	63.2%
Significance	*	*	*	—	—	*	*	—	*

注：*表示该位点两组间具有显著性差异(P<0.05)，—表示无显著性差异(P>0.05)。

Note: * indicates significant difference between the two groups (P<0.05), — indicates insignificant difference (P>0.05).

3　讨论

现如今硬骨鱼类的营养研究多集中于小规格幼鱼的需求探索，鲜有对仔稚鱼生命早期营养强化的研究。有学者发现，通过外源摄入可提高鱼体 LC-HUFA 蓄积并调节代谢，提升鱼体营养价值(Desai *et al*, 1995)，但养殖成本颇高。如何通过外源营养环境的介入改善海水肉食性鱼类 LC-HUFA 合成限制，培育出稳定高产 LC-HUFA 鱼种是行业亟需破解的难题。

已有研究证明，成年后机体代谢(包括脂肪代谢)会受早期营养刺激影响(Desai *et al*, 1995)。机体发育某些关键阶段(又称“窗口期”)的营养状况，会影响成年后机体的代谢情况，多伴随表观遗传的调控，并可能遗传给后代(Shao *et al*, 2014; Badeaux, 2013; Skjærven *et al*, 2023)。该结论为本研究传递了一种信号，是否可以使用特定 LC-HUFA 对鱼类发育“窗口期”进行营养强化，通过表观遗传的调控改善 LC-HUFA 合成限制，最终培育出优质鱼种。基于此，本研究以半滑舌鳎为研究对象，探索 DHA 营养强化对仔稚鱼的影响，发现生长至稚鱼期生存效率显著提高，脂肪酸代谢模式倾向于 LC-HUFA 合成，表观遗传修饰参与了转录调控代谢的过程。以上结论初步证实了本研究的假设，接下来对已有结论分段进行讨论。

3.1　DHA 营养强化可影响半滑舌鳎仔稚鱼生存效率

20 世纪 60 年代就已开始进行哺乳动物生命早期营养与生长之间的关联研究。大鼠(*Rattus norvegicus*)妊娠晚期和哺乳期的营养不良会引起子代青春期延迟及体重降低等现象，生命早期营养状态与生存效率息息相关(Winick *et al*, 1966; Desai *et al*, 1966; Bieswal *et al*, 2006)。水产动物的研究始于 21 世纪，多集中于模式动物及少数鱼类，使用优质脂肪酸及蛋白源处理均可有效上调仔鱼生存效率。在斑马鱼的研究中，使用植物蛋白原料进行强化处理，增重量较未处理组显著升高(Kwasek *et al*, 2020)。使用富含 LC-HUFA 的小球藻、裂殖壶菌和乳化鱼油等饲喂 10 dph 的黄姑鱼(*Nibea albiflora*)仔鱼，增重率、特定生长率和成活率均有升高，并伴随抗逆性的增加(叶坤等, 2023)。在攀鲈的研究中发现，使用硒–维生素 LC-HUFA 复合处理 3 dph 仔鱼会显著提高存活率、生长率和平均增重，从而优化仔鱼生存效率(Singh *et al*, 2024)。对红鼓鱼(*Sciaenops ocellatus*)母体进行 LC-HUFA 补充，产卵孵化后仔鱼成活率和生长指标均显著改变(Fuiman *et al*, 2015)。使用 PUFA 和维生素补充剂处理内塞加尔鳎(*Solea senegalensis*)雌鱼后，可有效降低子代幼鱼畸形率(Morais *et al*, 2014)。本研究对半滑舌鳎生命早期阶段进行 DHA 强化处理可有效提高稚鱼生存能力，主要表现在提高存活率、降低畸形率，同时增加稚鱼生长速度，在其他生物生命早期的营养研究中也发现过类似结论。本研究发现，*fads2* 启动子区域去甲基化修饰，伴随 mRNA 表达量上调，从而提高 DHA 内源合成能力，进一步引起细胞膜完整性增强(Jacobs *et al*, 2021)，发育异常现象减少，从而提高生存效率，具体表现为畸形率降低，存活率和生长速度上升。另一方面 DHA 具备抑制脂质过氧化的抗氧化特性(Ji *et al*, 2025)，减少细胞凋亡。综上，适当营养强化可优化养殖鱼类存活率、生长速度及畸形率等生存状态。

3.2　DHA 营养强化可促进半滑舌鳎稚鱼 LC-HUFA 沉积

对开口仔鱼进行 DHA 营养强化可有效提高 ARA 和 DHA 等 LC-HUFA 的含量，与此同时，LA 和 LNA 等 PUFA 的含量也显著升高。说明通过外源营养物对开口仔鱼进行营养强化的处理方式可有效影响机体脂肪酸组成，验证了本实验的可行性。推测脂肪酸组成出现显著差异有两个原因：一是机体脂肪酸受饮食中脂肪酸含量的影响(Xie *et al*, 2018)；二是由于“窗口

期”的 DHA 处理激活了半滑舌鳎仔鱼合成 LC-HUFA 的能力。

饮食影响机体脂肪酸沉积在水产动物中已有较多研究，在大黄鱼(*Larmichthys crocea*)的研究中发现，使用共轭亚油酸处理后，肝脏和肌肉中共轭亚油酸同分异构体的沉积显著增加(Zuo *et al*, 2013)。在翘嘴鳜(*Siniperca chuatsi*)的研究中，亚麻酸含量同样与摄食成正比(Li *et al*, 2021)，以上结论有效佐证了本研究的第一个推论。而对生命早期脂肪酸营养强化的研究多发现于哺乳动物中，对奶牛(*Bos taurus*)饲喂植物性口粮，可改变牛奶中脂肪酸含量模式，表现为提高了共轭亚油酸、EPA 等脂肪酸组成(Benbrook *et al*, 2018)。水产动物的研究种类相对较少，使用富含 LC-HUFA 的轮虫(*Rotifera*)作为 3 dph 攀鲈开口饵料，可有效提高 EPA 和 DHA 等 LC-HUFA 组成(Singh *et al*, 2024)。以上研究结论与本研究类似，初步佐证了本研究的第二个推论。

为了进一步探索 DHA 营养强化对脂肪酸组成的作用机制及其对脂代谢模式的影响，本研究对脂代谢相关基因进行了实时荧光定量 PCR 检测。结果发现，营养强化可抑制脂肪酸合成及 β 氧化相关基因(*fas*、*acc1* 及 *pparα*)表达量，激活脂肪酸去饱和酶 2 (*fads2*)及脂肪酸结合蛋白 1 (*fabp1*)表达，推测对生命早期半滑舌鳎营养强化可改变其脂肪酸代谢模式。国内外对于营养强化调控脂肪酸代谢的研究大都集中在人类和哺乳动物当中。人类怀孕母体或哺乳期的鱼油营养处理会影响婴儿 *fads1* 及 *elovl5* 的表达(Krzysztof *et al*, 2012)。水产动物中，在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的研究中发现，使用亚麻籽油对仔鱼进行营养强化处理，可有效影响 Δ6 去饱和酶表达量(Izquierdo *et al*, 2015)。使用含有适量 ARA 的微饲料饲喂 9 dph 金头鲷，可使实验动物根据摄食营养状态调节脂肪酸代谢模式(Alves Martins *et al*, 2012)。关于鱼类脂肪酸代谢，游离脂肪酸在 *fabp1* 的作用下以脂蛋白的形式在肝脏细胞内转运(Sharma *et al*, 2006)，并在各种特异性蛋白的作用下进行脂肪合成、β 氧化、去饱和及碳链延长。本研究中实验组(Pro 组) *fabp1* 显著上调说明肝脏细胞内脂肪酸转运速率升高，*fads2* 表达上调说明更多脂肪酸参与去饱和作用生成 LC-HUFA。与此同时，*fas*、*acc1* 和 *pparα* 表达下调代表肝脏脂肪合成和 β 氧化速率均降低，整体脂肪酸代谢模式更倾向于 LC-HUFA 合成，即营养强化后肝脏脂肪酸代谢重点由脂肪合成及 β 氧化过程转为细胞内脂蛋白转运用于去饱和作用，从而生成更多 LC-HUFA。此结论与脂肪酸组成结论相吻合，有力佐证了本研究对脂肪酸组成差异显著的第 2 种推测原因，即 DHA 营养强化激活了半滑舌鳎仔鱼合成 LC-HUFA 的能力。

总的来说，对半滑舌鳎“窗口期”进行 DHA 营养强化处理，可通过饮食影响及激活 LC-HUFA 内源合成渠道两方面共同促进半滑舌鳎稚鱼 LC-HUFA 沉积。

3.3 DHA 营养强化介导 DNA 甲基化激活 *fads2* 基因表达

营养强化改变表型的研究已有诸多推论，其参与表观遗传调控一直是研究热点。哺乳动物中对胚胎 PUFA 印记后可修饰脂代谢相关基因 DNA 甲基化状态，从而调节脂肪酸代谢。例如，人类怀孕母体或哺乳期的鱼油印记会影响婴儿 *fads1* 及 *elovl5* 的 DNA 甲基化，母体进行胆碱营养摄入可共同调节幼儿 DNA 甲基化和组蛋白 H3K4、H3K9 及 H3K27me 修饰(Krzysztof *et al*, 2012)。怀孕后期大鼠日粮去除胆碱，导致脑内 H3K9me 修饰下降，H3K4me 水平增加。水产动物营养强化调控代谢的研究集中在斑马鱼、虹鳟、金头鲷及攀鲈等。通过 PUFA 等营养素对研究对象营养强化处理后生长性能有所提高(Singh *et al*, 2024)，代谢相关蛋白 DNA 甲基化及组蛋白修饰模式均有所改变(Perera *et al*, 2017)。以上研究均表明，鱼类仔稚鱼期营养强化影响表观遗传调控。本研究发现 *fads2* 启动子区域存在含有 8 个甲基化位点的 CpG 岛，经 DHA 强化后有 5 个 DNA 甲基化位点出现了显著去甲基化修饰，从总体甲基化水平来看，*fads2* 启动子区域存在高度 DNA 去甲基化修饰现象。结合相对表达量上调的结果分析，营养强化刺激 *fads2* 启动子区域发生去甲基化修饰，从而提高该基因表达量。

DNA 甲基化由 DNA 甲基转移酶(DNMT)蛋白家族催化在 DNA 的 CpG 位点上添加甲基($-CH_3$)，抑制基因表达(Moore *et al*, 2013)。组蛋白甲基化是表观遗传调控的另一种调控机制，其中，组蛋白 H3K4 三甲基化(H3K4me3)由赖氨酸甲基转移酶(KDM)蛋白家族介导甲基的去留，激活基因表达(Yao *et al*, 2002)。DNA 甲基化调控转录通过两种方式：一是控制转录因子与 DNA 结合；二是作为甲基结合位点募集组蛋白修饰，引起染色质凝聚，进而调控转录(Hashimoto *et al*, 2010)，特别是 H3K4me3 的富集与 CpG 岛高度重合，H3K4me3 阻断 DNMT3A 的结合，阻止 CpG 位点甲基化，进而影响 DNA 甲基化修饰(Dahl *et al*, 2016)，由此可见，DNA 甲基化与组蛋白甲基化互相作用。*Fads* 基因簇中，特别是 *fads1* 和 *fads2* 启动子之间的一个或多个关键位点出现 CpG 甲基化显著性，并推测该区域可能存在显著组蛋白修饰状态(Howard *et al*, 2014)。基于此，推测本研究中 *fads2* 启动子区域 DNA 去甲基化修饰很可能伴随组蛋白甲基化修饰，二者互相作用并共同参与营养强化调控脂肪酸代谢，具体调控机制待后续探索。研究证明，DNA 甲基化模式的建立及维持由不同亚型 DNMT 介导(Goll *et al*, 2005)，本研究只探索了仔稚鱼期表观修饰对营养强化的应答模式，对于生长至幼鱼期及商品鱼期该模式的演变有待进一步研究。另有研究证明，斑马鱼父本的 DNA 甲基化模式在胚胎重编辑过程中保持不变，即鱼类精子的表观修饰具有遗传性，后代的表观修饰主要来源于父本(Jiang *et al*, 2013; Potok *et al*, 2013)。近期在非模式硬骨鱼类，暹罗斗鱼(*Betta splendens*)、斑点叉尾鮰(*Ietalurus punetaus*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)的研究中也发现了类似调控机制(Wang *et al*, 2022; Yang *et al*, 2022; Saito *et al*, 2022)，为下一步研究提供了方向。基于此，推测生命早期 DHA 营养强化介导的 DNA 甲基化重编程现象会在 DNMT1 的作用下维持整个生命周期，并具备代际遗传的特性，为培育优质鱼种提供理论基础。

4　小结

通过本研究发现，使用 DHA 对半滑舌鳎仔鱼进行营养强化可提高稚鱼生存能力，通过促进脂肪酸转运和去饱和作用提高稚鱼鱼体 LC-HUFA 沉积，从而改善脂肪酸代谢模式。与此同时，发现早期营养强化参与 *fads2* 启动子区域去甲基化修饰，从而提高 *fads2* 基因转录表达。本研究有助于养成半滑舌鳎高 LC-HUFA 优质仔稚鱼，为半滑舌鳎高效养殖提供了新思路。

参　考　文　献

艾庆辉, 严晶, 麦康森. 鱼类脂肪与脂肪酸的转运及调控研究进展. 水生生物学报, 2016, 40(4): 859–868 [AI Q H, YAN J, MAI K S. Research progresses of lipids and fatty acids transport in fish. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(4): 859–868]

李信, 高坚. 泥鳅 *elovl2* 和 *elovl5* 基因克隆、表达及其延长活性分析. 华中农业大学学报, 2020, 39(2): 71–81 [LI X, GAO J. Cloning, expression analysis and functional study of loach (*Misgurnus anguaudatus*) *elovl2* and *elovl5* genes and their effects on the synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA). Journal of Huazhong Agricultural University, 2020, 39(2): 71–81]

叶坤, 闫云杰, 王秋荣, 等. 饵料营养强化对黄姑鱼仔稚鱼生长和抗逆的影响. 集美大学学报(自然科学版), 2023, 28(2): 97–105 [YE K, YAN Y J, WANG Q R, *et al*. Growth performance and ant-stress capacity of yellow drum larvae fed with nutrition-intensified diet. Journal of Jimei University (Natural Science), 2023, 28(2): 97–105]

ALVES MARTINS D, ROCHA F, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ G, *et al*. Teleost fish larvae adapt to dietary arachidonic acid supply through modulation of the expression of lipid metabolism and stress response genes. The British Journal of Nutrition, 2012, 108(5): 864–874

BADEAUX A I, SHI Y. Emerging roles for chromatin as a signal integration and storage platform. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2013, 14(4): 211–224

BENBROOK C M, DAVIS D R, HEINS B J, *et al*. Enhancing the fatty acid profile of milk through forage-based rations, with nutrition modeling of diet outcomes. Food Science & Nutrition, 2018, 6(3): 681–700

BIESWAL F, AHN M T, REUSENS B, *et al*. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. Obesity, 2006, 14(8): 1330–1343

CHILTON F, MATHIAS R, SEEDS M, *et al*. DNA methylation in an enhancer region of the FADS cluster is associated with FADS activity in human liver (373.8). The FASEB Journal, 2014, 28: 373(8)

DAHL J A, JUNG I, AANES H, *et al*. Broad histone H3K4me3 domains in mouse oocytes modulate maternal-to-zygotic transition. Nature, 2016, 537(7621): 548–552

DESAI M, CROWTHER N J, LUCAS A, *et al*. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. The British Journal of Nutrition, 1996, 76(4): 591–603

DESAI M, CROWTHER N J, OZANNE S E, *et al*. Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. Biochemical Society Transactions, 1995, 23(2): 331–335

FUIMAN L A, PEREZ K O. Metabolic programming mediated by an essential fatty acid alters body composition and survival skills of a marine fish. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2015, 282(1819): 20151414

GOLL M G, BESTOR T H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. Annual Review of Biochemistry, 2005, 74: 481–514

HASHIMOTO H, VERTINO P M, CHENG X D. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. Epigenomics, 2010, 2(5): 657–669

IZQUIERDO M S, TURKMEN S, MONTERO D, *et al*. Nutritional programming through broodstock diets to improve utilization of very low fishmeal and fish oil diets in gilthead sea bream. Aquaculture, 2015, 449: 18–26

JACOBS M L, FAIZI H A, PERUZZI J A, *et al*. EPA and DHA differentially modulate membrane elasticity in the presence of cholesterol. Biophysical Journal, 2021, 120(11): 2317–2329

JI S H, XUE R R, ZHOU L, *et al*. The individual and combined effect of DHA and high-fat diet on flesh quality, antioxidant capacity and myofiber characteristics of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Aquaculture, 2025, 595: 741487

JIANG L, ZHANG J, WANG J J, *et al*. Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. Cell, 2013, 153(4): 773–784

KRZYSZTOF BLUSZTAJN J, MELLOTT T J. Choline nutrition programs brain development *via* DNA and histone methylation. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry, 2012, 12(2): 82–94

KUMKHONG S, MARANDEL L, PLAGNES-JUAN E, *et al*. Glucose injection into yolk positively modulates intermediary metabolism and growth performance in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Frontiers in Physiology, 2020, 11: 286

KWASEK K, WOJNO M, IANNINI F, *et al*. Nutritional programming improves dietary plant protein utilization in zebrafish *Danio rerio*. PLoS One, 2020, 15(3): e0225917

LI L, LIANG X F, CAI W J, *et al*. Dietary with proper ratio of alpha-linolenic acid to linoleic acid enhanced the unsaturated fatty acids deposition of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*). Aquaculture Nutrition, 2021, 27: 73–85

LI Y Y, CHEN W Z, SUN Z W, *et al*. Effects of n-3 HUFA content in broodstock diet on spawning performance and fatty acid composition of eggs and larvae in *Plectorhynchus cinctus*. Aquaculture, 2005, 245(1/2/3/4): 263–272

MOORE L D, LE T, FAN G P. DNA methylation and its basic function. Neuropsychopharmacology, 2013, 38(1): 23–38

MORAIS S, MENDES A C, CASTANHEIRA M F, *et al*. New formulated diets for *Solea senegalensis* broodstock: Effects of parental nutrition on biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids and performance of early larval stages and juvenile fish. Aquaculture, 2014, 432: 374–382

PERERA E, YÚFERA M. Effects of soybean meal on digestive enzymes activity, expression of inflammation-related genes, and chromatin modifications in marine fish (*Sparus aurata* L.) larvae. Fish Physiology and Biochemistry, 2017, 43(2): 563–578

POTOK M E, NIX D A, PARNELL T J, *et al*. Reprogramming the maternal zebrafish genome after fertilization to match the paternal methylation pattern. Cell, 2013, 153(4): 759–772

SAITO T, WHATMORE P, TAYLOR J F, *et al*. Micronutrient supplementation affects DNA methylation in male gonads with potential intergenerational epigenetic inheritance involving the embryonic development through glutamate receptor-associated genes. BMC Genomics, 2022, 23(1): 115

SARGENT J R, TOCHER D R, BELL J G. The lipids. Fish Nutrition, 2003, 181–257

SHAO C W, LI Q Y, CHEN S L, *et al*. Epigenetic modification and inheritance in sexual reversal of fish. Genome Research, 2014, 24(4): 604–615

SHARMA M K, LIU R Z, THISSE C, *et al*. Hierarchical subfunctionalization of *fabp1a*, *fabp1b* and *fabp10* tissue-specific expression may account for retention of these duplicated genes in the zebrafish (*Danio rerio*) genome. The FEBS Journal, 2006, 273(14): 3216–3229

SINGH P K, MUNILKUMAR S, SUNDARAY J K, *et al*. Evaluation of enriched freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus* as first feed on growth performance, nutrient availability and fatty acid composition of *Anabas testudineus* (Bloch, 1792) larvae. Animal Feed Science and Technology, 2024, 309: 115901

SINGH P K, MUNILKUMAR S, SUNDARAY J K, *et al*. Evaluation of enriched freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus* as first feed on growth performance, nutrient availability and fatty acid composition of *Anabas testudineus* (Bloch, 1792) larvae. Animal Feed Science and Technology, 2024, 309: 115901

SKJÆRVEN K H, ADAM A C, SAITO T, *et al*. Epigenetics in aquaculture, Chapter 10: Epigenetics in fish nutritional programming. Wiley, 2023, 231–244

WANG L, SUN F, WAN Z Y, *et al*. Transposon-induced epigenetic silencing in the X chromosome as a novel form of dmrt1 expression regulation during sex determination in the fighting fish. BMC Biology, 2022, 20(1): 5

WINICK M, NOBLE A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. The Journal of Nutrition, 1966, 89(3): 300–306

XIE D Z, LIU X B, WANG S Q, *et al*. Effects of dietary LNA/LA ratios on growth performance, fatty acid composition and expression levels of *elovl5*, Δ*4 fad* and Δ*6*/Δ*5 fad* in the marine teleost *Siganus canaliculatus*. Aquaculture, 2018, 484: 309–316

YANG Y J, ZHOU T, LIU Y, *et al*. Identification of an epigenetically marked locus within the sex determination region of channel catfish. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(10): 5471

ZUO R T, AI Q H, MAI K S, *et al*. Effects of conjugated linoleic acid on growth, non-specific immunity, antioxidant capacity, lipid deposition and related gene expression in juvenile large yellow croaker (*Larmichthys crocea*) fed soybean oil-based diets. The British Journal of Nutrition, 2013, 110(7): 1220–1232

(编辑　冯小花)

Effects of DHA Nutrition Programming on Fatty Acid Metabolism and DNA Methylation Patterns in Larvae of *Cynoglossus semilaevis*

LI Lu, LI Baoshan[①], HUANG Bingshan, WANG Zhongquan, WANG Xiaoyan,
HAO Tiantian, LI Peiyu, XIANG Zhiwei, WANG Chengqiang, SONG Zhidong

(*Shandong Marine Resource and Environment Research Institute; Yantai Key Laboratory of Quality and Safety Control and Deep Processing of Marine Food; Engineering and Research Center of Marine Fishery Feed of Shandong Province; Observation and Research Station of Laizhou Bay Marine Ecosystem, MNR; Shandong Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Yantai* 264006, *China*)

Abstract Lipids are the second largest nutrient source of fish, and play an important role in nutrient metabolism. As the essential fatty acid, the main component of lipid, long chain highly unsaturated fatty acids (LC-HUFA) play an important role in regulating metabolism and maintaining cell morphology. The synthesis of LC-HUFA involves many biological processes such as fatty acid transport, de novo synthesis, β-oxidation, desaturation, and carbon chain elongation. A stable LC-HUFA metabolic pattern has formed through long-term evolution. Previous studies have shown that exogenous intake can increase LC-HUFA accumulation and regulate metabolism in juvenile fish, however, there are few studies on this aspect in larvae. Early nutritional programming can affect the metabolism of the body, accompanied by epigenetic regulation. It is therefore crucial to explore how to activate LC-HUFA synthesis limitations by early nutrition programming in fish, which are further regulated by epigenetic mechanisms. This study explored the effects of docosahexaenoic acid (DHA) nutrition programming on the viability, fatty acid deposition, and epigenetic modification of fatty acid metabolism in larvae of *Cynoglossus semilaevis* to provide a theoretical basis for the development of high-quality *C. semilaevis* fish. *Artemia salina* hatchlings were fortified with a DHA fortifier. Larvae of *C. semilaevis* fed with fortified *A. salina* were used as the experimental group, while those fed with unfortified *A. salina* were used as the control group. The larvae were cultured for 15 days post-hatching (15 dph), and the hatching rate, survival rate, malformation rate, and body length were recorded. The whole body fatty acid profile and gene expression of fatty acid metabolism of larvae were analyzed. The DNA methylation status of *fads2* gene was analyzed. Survival rate and body length of the experimental group was significantly increased, and the malformation rate was significantly decreased (P<0.05) at 15 dph. The contents of linoleic acid (LA), arachidonic acid (ARA), linolenic acid (LNA), DHA, n-6PUFA, and n-3PUFA increased significantly (P<0.05). The expression levels of *pparα*, *acc1*, and *fas* genes were significantly decreased, *fads2* and *fabp1* were significantly increased, and there was no significant difference in the expression level of *elovlα* (P>0.05). There was a CpG island from –750 bp to –1,050 bp from the *fads2* transcription start site, and the total length of the fragment was 301 bp. There were 8 candidate CpG sites, of which 5 were significantly demethylated (P<0.05). The *fads2* promoter region was highly demethylated (P<0.05). This study revealed that nutrition programming of larvae of *C. semilaevis* with DHA can improve the survival ability of larvae, enhancing LC-HUFA synthesis by promoting fatty acid transport and desaturation in larvae to improve fatty acid metabolism. Early nutritional programming is involved in the demethylation of *fads2* promoter, which promotes the transcription of *fads2* gene, one of the root causes of the increase in LC-HUFA. This study will aid in the development of high LC-HUFA quality larvae of *C. semilaevis* and provide a basis for efficient breeding of this species.

Key words Nutrition programming; *Cynoglossus semilaevis*; DNA methylation; Fatty acid metabolism; Larvae

---

① Corresponding author: LI Baoshan, Email: bsleeyt@126.com