

## 豆粕对松浦镜鲤肠黏膜能量代谢、肠道健康相关基因表达的影响及 $\alpha$ -酮戊二酸缓解作用

赵静怡<sup>1,2</sup>, 金检生<sup>3</sup>, 杨丽丽<sup>3</sup>, 陈丽萍<sup>3</sup>, 叶金云<sup>1</sup>, 徐奇友<sup>1\*</sup>

(1. 湖州师范学院生命科学学院, 水生动物繁育与营养国家地方联合工程实验室, 浙江省水生生物资源养护与开发技术研究重点实验室, 浙江 湖州 313000;  
2. 小顽童(山东)生物科技有限公司, 山东 临沂 276000;  
3. 湖州市吴兴区农业技术推广服务中心, 浙江 湖州 313000)

**摘要:** 为探究豆粕对松浦镜鲤肠道健康及能量水平的影响及 AKG 缓解肠道损伤的作用机制。选取初始体重为  $(9.51 \pm 0.06)$ g 松浦镜鲤幼鱼 609 尾, 随机分为 7 组, 每组 3 个重复, 每缸 29 尾鱼。对照组 (FM) 饲喂 30.8% 鱼粉为蛋白源饲料, 实验组以 40% 豆粕为基础饲料 (SM), AKG 组、Met 组和 Com 组分别在 SM 基础上添加 1%AKG、300 mg/kg Metformin 和 0.2 mg/kg Compound-c, Met+AKG 组和 Com+AKG 组为在 AKG 组上分别添加 Metformin 和 Compound-c。实验共 59 d。结果显示, 与 FM 组比, SM 组后肠黏膜 ATP 和 ADP 含量显著升高; 前肠 ACC、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TGF $\beta$ 2、caspase9、Claudin7、Claudin11、Claudin3c、Occludin, 中肠 AMPK- $\alpha$ 、TOR、ACC、IL-1 $\beta$ 、TGF $\beta$ 1、Caspase8、Claudin7、Occludin 及后肠 TGF $\beta$ 1、Caspase8、Caspase9 基因表达显著降低; 后肠 TNF- $\alpha$ 、Claudin11、Claudin3c 和 Occludin 显著升高。与 SM 组比, AKG 组前肠 TGF $\beta$ 1、Claudin7、Claudin11, 前肠及中肠 TOR 显著升高; 中肠 caspase8、TNF- $\alpha$ 、Claudin11, 后肠 Claudin11、Occludin 显著降低。Met 组和 Com 组上调后肠 ADP 和 AMP 含量。Met 组上调前肠 AMPK- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、Caspase9、Claudin7、Claudin11、Claudin3c, 中肠 TGF $\beta$ 1、Claudin11, 后肠 IL-1 $\beta$ 、Claudin7, 中肠及后肠 TOR 表达量; 下调后肠 Occludin 表达量; Com 组上调前肠 Occludin 表达量, 下调中肠及后肠 Claudin11 和后肠 Occludin 表达量。与 AKG 组相比, Com+AKG 组后肠 ATP、ADP 及 AMP 含量和 Met+AKG 组后肠 ADP 含量均显著升高。Met+AKG、Com+AKG 降低前肠 Claudin7、Claudin11 和中肠 TOR 的表达量。Met+AKG 上调前肠 caspase8、中肠 Claudin11 和后肠 Claudin7 表达量。Com+AKG 显著提高后肠 Claudin11 和 Occludin 表达量。研究表明, 豆粕降低前肠及中肠能量水平, 抑制 AMPK- $\alpha$  和 TOR 表达, 降低前肠及中肠紧密连接蛋白的基因表达; 引起后肠肠道炎症。AKG 通过提高前肠 TOR、紧密连接、抗炎因子的表达, 减少中肠及后肠促炎因子的产生, 减缓中肠及后肠的细胞凋亡, 缓解豆粕对鲤肠道的损伤。

**关键词:** 松浦镜鲤; 豆粕;  $\alpha$ -酮戊二酸; 能荷水平; 基因表达

中图分类号: S 963.31

文献标志码: A

收稿日期: 2022-06-23 修回日期: 2022-08-16

资助项目: 国家自然科学基金 (31972800); 国家现代农业产业技术体系专项

第一作者: 赵静怡 (照片), 从事水产动物饲料与营养研究, E-mail: 357011903@qq.com

通信作者: 徐奇友, 从事水产动物饲料与营养研究, E-mail: xuqiyu@sina.com



随着集约化水产养殖的发展, 鱼粉资源短缺, 价格攀升, 已不能满足需求。大豆蛋白氨基酸组成好、价格合理和资源丰富, 是替代鱼粉的主要植物蛋白源之一。但当大豆蛋白源替代鱼粉超过一定范围时会影响鱼类肠道健康, 降低生长性能。如当大豆分离蛋白替代鱼粉比例大于 60% 时, 建鲤 (*Cyprinus carpio* var. *jian*) 幼鱼肠道上皮完整性受损, 生长发育受阻<sup>[1]</sup>。大豆蛋白替代鱼粉比例达 75% 时, 日本鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 前肠和中肠绒毛高度显著降低<sup>[2]</sup>。豆粕替代鱼粉超过 40% 时, 鱼类生长性能显著降低<sup>[3-4]</sup>, 肠道健康受到损害<sup>[5-6]</sup>。豆粕中抗营养因子是限制其在水产饲料中广泛应用的主要瓶颈<sup>[7]</sup>。3.5% 大豆凝集素<sup>[8]</sup>会显著损害大西洋鲑 (*Salmo salar*) 肠道后绒毛的完整性。胰蛋白酶抑制剂<sup>[9]</sup>可能与蛋白酶的必需基团发生反应, 抑制蛋白酶与底物的结合, 降低甚至阻止蛋白酶的活性。豆粕中单宁在与碳水化合物结合后可以抑制胃酶活性<sup>[10]</sup>。大豆球蛋白 (Glycinin)、 $\beta$ -伴大豆球蛋白 ( $\beta$ -conglycinin) 是引起肠道过敏反应的主要过敏原<sup>[7]</sup>。据 Jiang 等<sup>[11]</sup>在建鲤上的研究表明, 大豆球蛋白导致肠细胞之间紧密连接破坏, 干扰细胞因子, 诱导细胞凋亡。据 Zhang 等<sup>[12]</sup>在建鲤的研究表明,  $\beta$ -伴大豆球蛋白诱导肠道发生炎症和氧化反应, 导致鱼类肠道消化和吸收功能障碍, 造成前肠及中肠 TOR 表达量下降, 提高后肠 4E-BP 表达, 降低鱼类生长。肠  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活性也显著下降。Jiang 等<sup>[11]</sup>研究发现, Glycinin 显著降低建鲤中肠  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 的活性。 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 作为一种重要的膜转运蛋白, 能分解体内 ATP, 为机体各项生理活动提供能量, 其活力是肠黏膜生长发育的重要标志之一<sup>[13]</sup>, 但大豆蛋白对鱼类肠道能量水平的影响还有待研究。

AKG 是生命体三羧酸循环中重要的中间分子, 是谷氨酰胺的前体物质<sup>[14]</sup>。饲料中添加外源 AKG 可以替代部分谷氨酸和谷氨酰胺, 为肠黏膜细胞和肠道菌群的代谢提供能量, 诱导肠黏膜细胞增殖, 促进营养物质吸收<sup>[15]</sup>。研究表明 AKG 有助于缓解豆粕对水产动物肠道的损伤, 提高松浦镜鲤和建鲤的生长性能。据李晋南等<sup>[16-17]</sup>研究发现, 1.5%AKG 显著提高松浦镜鲤前肠淀粉酶和脂肪酶活性, 肠绒毛发育良好, 排列整齐紧密。饲料中添加 1.5%AKG 显著提高松浦镜鲤前肠  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活性<sup>[18][19]</sup>。以上研究说明 AKG 可以促进

鲤鱼肠道生长发育, 缓解豆粕对肠道的损伤。

AKG 对鲤肠道损伤的缓解作用机理还不明确, 是否与调节肠道能量代谢存在因果关系尚未有研究证明。二甲双胍 (Metformin) 是一种 AMPK 激活剂, 其能够抑制 mTOR 信号传导、自噬和细胞凋亡, 减少氧自由基生成、DNA 损伤和炎症反应。化合物 C (Compound-c) 是一种常见的 AMPK 抑制剂。因此, 本实验以松浦镜鲤为研究对象, 在 AKG 基础饲料中分别添加 Metformin 和 Compound-c, 探究大豆蛋白损害肠道健康的途径、对鱼类肠黏膜能量代谢的影响及 AKG 缓解肠道损伤的作用机制, 旨在为提高大豆和 AKG 在水产动物生产中的应用提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

实验中 AKG (纯度为 98%)、Metformin (纯度为 97%) 和 Compound-c (纯度为 98.59%) 购自 Sigma-Aldrich 公司。松浦镜鲤幼鱼由中国水产科学院黑龙江水产研究所提供。

### 1.2 饲料配方

根据鲤营养需要<sup>[20]</sup>, 对照组 (FM) 饲喂 30.8% 鱼粉为蛋白源饲料, 试验组 (SM) 以 40% 豆粕为基础饲料, AKG 组在 SM 基础上添加 1%AKG, Met 组和 Com 组为在 SM 基础上饲料中分别添加 300 mg/kg Metformin 和 0.2 mg/kg Compound-c, Met+AKG 组和 Com+AKG 组为在 AKG 组基础上分别添加 300 mg/kg Metformin 和 0.2 mg/kg Compound-c。共配制成 7 种等氮等脂的试验饲料。各原料经粉碎过 60 目筛, 按配方准确称其质量, 用制粒机制成粒径 2.5 mm 颗粒饲料。风干后置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。实验饲料配方及营养水平见表 1。

### 1.3 饲养管理

养殖实验在湖州师范学院生命科学学院循环水养殖系统中进行, 实验前预饲 15 d, 饱食投喂对照组饲料, 预饲结束后, 挑选体重 ( $9.51 \pm 0.06$ ) g 松浦镜鲤 609 尾, 随机饲养于 21 个水族箱中, 每 3 个水族箱为 1 个实验组。每天投饵 2 次 (上午 8:00, 下午 17:00), 日投饵率为体重的 4%~6%。整个实验过程中水质保持稳定, 水温  $24\sim 29\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 溶解氧  $5.0\sim 8.0\text{ mg/L}$ , 氨氮  $< 0.1\text{ mg/L}$ , 亚硝酸盐  $<$

表 1 基础饲料配方及营养水平

Tab. 1 Composition and nutrition levels of experimental diets (air dry basis)

原料 ingredients	组别 groups						
	FM	SM	AKG	Met	Com	Met+AKG	Com+AKG
鱼粉 fish meal	30.8	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
玉米蛋白粉 corn gluten meal	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
花生粕 peanut meal	7.18	7.18	7.18	7.18	7.18	7.18	7.18
豆粕 soybean meal	—	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
面粉 wheat-middling	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0
纤维素 cellulose	17.16	0.36	0.36	0.33	0.36	0.33	0.36
鱼油 fish oil	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
豆油 soya-bean oil	1.37	2.56	2.56	2.56	2.56	2.56	2.56
磷脂 phospholipid	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
维生素预混料 vitamin premix	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
矿物质预混料 mineral premix	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
氯化胆碱 choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
磷酸二氢钙 Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.20	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45
羧甲基纤维素钠 sodium carboxymethyl cellulose	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
赖氨酸 lysine	0.33	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39
蛋氨酸 methionine	—	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
苏氨酸 threonine	0.26	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
α-酮戊二酸 α-ketoglutaric acid	—	—	1.00	—	—	1.00	1.00
葡萄糖 glucose	1.00	1.00	—	1.00	1.00	—	—
metformin/(mg/kg)	—	—	—	300	—	300	—
compound-c/(mg/kg)	—	—	—	—	0.2	—	0.2
合计 total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
营养水平 nutrient levels							
粗蛋白 CP	35.49	35.85	35.85	35.03	35.17	34.71	35.51
粗脂肪 EE	5.90	5.86	5.93	6.30	6.40	6.19	7.99
粗灰分 CA	6.93	6.72	6.56	6.61	6.60	6.62	6.64

注: 1. Vitamin premix provided the following per kg of diets (per kg): VA 8 000 IU, VD 3 000 IU, VE 60 mg, VK 35 mg, VC 500 mg, VB<sub>1</sub> 15 mg, VB<sub>2</sub> 30 mg, VB<sub>6</sub> 15 mg, VB<sub>12</sub> 0.5 mg. 2. Mineral premix provided the following per kg of diets (per kg): Fe 190 mg, Cu 3.02 mg, Mn 12.88 mg, Zn 15.75 mg, Se 0.53 mg, I 1.05 mg, Co 1.05 mg.

0.05 mg/L, 养殖试验持续 59 d。

#### 1.4 样品采集

养殖实验开始后, 分别在第 7 天和 59 天进行采样, 每个水族箱随机选取 9 尾鱼, 使用 MS-222(100 mg/L) 麻醉后置于冰盘上解剖。其中 3 尾鱼取前肠、中肠及后肠, 迅速置于液氮中用于肠道健康相关基因表达检测; 另 6 尾鱼肠道纵向切开, 0.86% 生理盐水冲洗, 刮取肠黏膜, 每 3 尾混为一个样品, 共 6 个样品, 迅速置于液氮中, -80 °C 保存, 用于高效液相色谱法测定腺苷酸含量。

#### 1.5 肠黏膜腺苷酸含量测定

采用高效液相色谱法测定腺苷酸 ANP(ATP、ADP 和 AMP) 含量。称取 100 mg 肠黏膜样品, 加入已预冷的 0.4 mol/L 高氯酸冰浴中充分匀浆, 4 °C, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液加 5 mol/L KOH 调 pH 至 6.8~7.2, 再以上述条件离心 10 min, 取上清经 0.22 μm 滤膜过滤, 上机检测。使用 Agilent 1260 高效液相色谱仪测定。条件为: 色谱柱 Agilent Pursuit XRs 5 C8 (250 mm×4.6 mm), 流动相为 pH=7.1 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (经 0.22 μm 滤膜过滤)。流动性配比 100%, 流速

1 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 20  $\mu$ L, DAD 紫外检测器的检测波长为 254 nm, 运行时间 25 min。外标法定量, ATP, ADP 和 AMP 标准品购自 Sigma 公司, 均为色谱级。

能荷水平计算方法如下:

能荷水平 (EC) = (ATP+1/2ADP) / (ATP+ADP+AMP)。

## 1.6 基因表达检测

采用实时荧光定量法测定 AMPK- $\alpha$ 、TOR、ACC、炎性因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TGF $\beta$ 1 和 TGF $\beta$ 2)、紧密连接蛋白 (Claudin3c、Claudin7、Claudin11 和 Occludin) 和凋亡因子 (Caspase-8 和 Caspase-9) 的 mRNA 相对表达量。使用北京艾德莱细胞 RNA 快速提取试剂盒提取待测肠道样品的 RNA。超微量紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, 测定值浓度应高于 100 ng/ $\mu$ L, OD260/OD280 应在 1.8~2.2 之间。使用 MonScript™ RTIII All-in-One Mix 试剂盒进行反转录, MonAmp™ SYBR® Green qPCR Mix (None ROX) 试剂盒和 RT-PCR 仪进行实时荧光定量 PCR。以  $\beta$ -actin 为内参基因, 引物序列如表 2。

## 1.7 统计分析

使用 IBM SPSS Statistics 25.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA),

并采用 Tukey 法进行多重比较, 以  $P < 0.05$  为显著性差异标准, 实验结果用“平均值 $\pm$ 标准差”表示。

## 2 结果

### 2.1 对肠黏膜能荷水平的影响

各实验组前肠及中肠 ATP、ADP 和 AMP 含量均无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (表 3)。与 FM 组比, SM 组后肠 ATP 和 ADP 含量显著升高 ( $P < 0.05$ ), SM 前肠及中肠 EC 有降低趋势 ( $P > 0.05$ )。AKG 组与 SM 组相比各个肠段 ATP、ADP、AMP 含量和 EC 均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。Met 组和 Com 组对后肠 ADP 和 AMP 含量均显著高于 SM 组 ( $P < 0.05$ )。Com+AKG 组后肠 ATP、ADP 及 AMP 含量均显著高于 AKG 组 ( $P < 0.05$ )。Met+AKG 组后肠 ADP 含量均显著高于 AKG 组 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 对肠 AMPK- $\alpha$ 和 TOR 相关基因表达的影响

与 FM 组比, SM 组显著下调中肠 AMPK- $\alpha$  表达量 ( $P > 0.05$ ); 与 SM 组相比, Met 组显著上调前肠 AMPK- $\alpha$  表达量 ( $P < 0.05$ ), 中肠 AMPK- $\alpha$  有上调趋势 ( $P > 0.05$ )。与 FM 组相比, SM 组显著下调中肠 TOR 表达量 ( $P < 0.05$ ), 前肠有下调趋势 ( $P > 0.05$ )。与 SM 组相比, AKG 组显著上调前肠及中肠 TOR 表达量 ( $P < 0.05$ ), Met 组显著上调中

表 2 引物序列

Tab. 2 Primer sequence

目的基因 target genes	正向引物 primer sequence forward (5'-3')	反向引物 primer sequence reverse (5'-3')
AMPK- $\alpha$	GATGCCCTCTGGATGCTCTC	GATGTTCGTATGGTTTGCTCTGG
TOR	ATCTACGGCAAGACGAGAGG	GTTGGTGGAGAGTGGGATCA
ACC	GTCACCTGGCGTATGAGGATATT	TCCACCTGTGGTTCTTTGG
Caspase-8	AAGCTCCTCATTGAAGAACCG	ATCGTCCTGAACCACAACCTC
Caspase-9	GCAAGCCCAAACCTGTTCTTCAT	CGTCCATCTGGTCTATATCCC
Occludin	ATCGGTTTCAGTACAATCAGG	GACAATGAAGCCATAACAA
Claudin-3c	GCACCAACTGTATCGAGGATG	GGTTGTAGAAGTCCCGAATGG
Claudin-11	TCGGAAGTGAACCAGAAAGC	GAAGCCAAAGGACATCAAGC
Claudin-7	CTTCTATAACCCCTTACACCAG	ACATGCCTCCACCCATTATG
TNF- $\alpha$	AAGTCTCAGAACAAATCAGGAA	TGCCTTGAAGTGACATT
IL-1 $\beta$	AACCTCACACTTGAGGAT	GACAGAACAATAACAACAAC
TGF $\beta$ 2	CAGCACGCAATATCCTT	GTTCCAGATCTGAGACA
TGF $\beta$ 1	ACACGGTCACCTTGGTGTCA	CAATGTGGGTTGCAGAACAG
$\beta$ -actin	GATTGGCTGTGAGATGATGCT	CGTTGTAGAAGGTGTGATGCC



表 3 不同处理对前肠、中肠及后肠中 ANP 及能荷水平影响

Tab. 3 ANP and energy charge levels in PI, MI and DI of different treatment (n = 6)

项目	items	FM	SM	AKG	Met	Com	Met+AKG	Com+AKG
PI	ATP( $\mu\text{g}/\text{mgprot}$ )	0.18 $\pm$ 0.09	0.24 $\pm$ 0.11	0.27 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.08	0.20 $\pm$ 0.08	0.16 $\pm$ 0.11	0.17 $\pm$ 0.10
	ADP( $\mu\text{g}/\text{mgprot}$ )	0.39 $\pm$ 0.10	0.62 $\pm$ 0.32	0.63 $\pm$ 0.10	0.48 $\pm$ 0.05	0.52 $\pm$ 0.17	0.51 $\pm$ 0.19	0.47 $\pm$ 0.21
	AMP( $\mu\text{g}/\text{mgprot}$ )	0.95 $\pm$ 0.21	2.10 $\pm$ 1.46	2.25 $\pm$ 0.47	1.91 $\pm$ 0.41	1.96 $\pm$ 0.74	2.27 $\pm$ 0.85	1.72 $\pm$ 0.80
	EC	0.24 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.21 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	0.19 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	0.17 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.17 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.14 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.17 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>
MI	ATP( $\mu\text{g}/\text{mgprot}$ )	0.24 $\pm$ 0.08	0.25 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.09	0.27 $\pm$ 0.09	0.16 $\pm$ 0.11	0.16 $\pm$ 0.09	0.22 $\pm$ 0.15
	ADP( $\mu\text{g}/\text{mgprot}$ )	0.59 $\pm$ 0.11	0.57 $\pm$ 0.13	0.53 $\pm$ 0.03	0.61 $\pm$ 0.12	0.52 $\pm$ 0.16	0.57 $\pm$ 0.09	0.53 $\pm$ 0.08
	AMP( $\mu\text{g}/\text{mgprot}$ )	0.92 $\pm$ 0.57	1.30 $\pm$ 0.81	0.99 $\pm$ 0.44	1.41 $\pm$ 0.51	1.34 $\pm$ 0.61	1.45 $\pm$ 0.82	1.03 $\pm$ 0.45
DI	ATP( $\mu\text{g}/\text{mgprot}$ )	0.14 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.30 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	0.22 $\pm$ 0.05 <sup>bc</sup>	0.24 $\pm$ 0.08 <sup>abc</sup>	0.30 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>	0.30 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.37 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
	ADP( $\mu\text{g}/\text{mgprot}$ )	0.22 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>	0.59 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.39 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.40 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.64 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	0.70 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	0.78 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>
	AMP( $\mu\text{g}/\text{mgprot}$ )	0.33 $\pm$ 0.12 <sup>cd</sup>	0.90 $\pm$ 0.21 <sup>d</sup>	0.55 $\pm$ 0.10 <sup>d</sup>	0.61 $\pm$ 0.24 <sup>ab</sup>	1.19 $\pm$ 0.40 <sup>abc</sup>	1.24 $\pm$ 0.16 <sup>bcd</sup>	1.50 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>
	EC	0.33 $\pm$ 0.10	0.46 $\pm$ 0.02	0.38 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.07	0.42 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.07	0.36 $\pm$ 0.07

注: 同行数据肩标不同表示差异显著( $P<0.05$ ), 相同或无字母表示差异不显著( $P>0.05$ )。

Notes: In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ( $P>0.05$ ).

肠及后肠 TOR 表达量 ( $P<0.05$ ), Met 组对前肠 TOR 表达量有上调趋势 ( $P>0.05$ )。与 FM 组相比, SM 组显著下调前肠及中肠 ACC 表达量 ( $P<0.05$ ), 后肠 ACC 显著上调 ( $P<0.05$ )。AKG 组与 SM 组相比对前肠 ACC 表达量有上调的趋势 ( $P>0.05$ )。Met+AKG, Com+AKG 与 AKG 组相比, 各试验组前肠、中肠以及后肠 AMPK- $\alpha$  和 ACC 的表达量均无显著差异 ( $P>0.05$ ), 但显著降低了中肠 TOR 的表达量 ( $P<0.05$ ) (图 1)。

### 2.3 对肠炎性因子相关基因表达的影响

与 FM 组比, SM 组显著下调前肠促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和中肠 IL-1 $\beta$  的表达量, 显著上调后肠 TNF- $\alpha$  ( $P<0.05$ ), 显著下调前肠抗炎因子 TGF $\beta$ 2 和中肠及后肠 TGF $\beta$ 1 ( $P<0.05$ ) (图 2)。与 SM 组比, AKG 组显著下调中肠 TNF- $\alpha$  ( $P<0.05$ ), 显著上调前肠 TGF $\beta$ 1 ( $P<0.05$ ); Met 组显著上调前肠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和后肠 IL-1 $\beta$  ( $P<0.05$ ), 显著上调中肠 TGF $\beta$ 1 ( $P<0.05$ ); Com 组显著上调前肠促炎因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  ( $P<0.05$ ), 对各肠段抗炎因子 TGF $\beta$ 1 和 TGF $\beta$ 2 无显著影响 ( $P>0.05$ )。与 AKG 组相比 Met+AKG、Com+AKG 组与 AKG 组相比对抗炎因子及促炎因子的表达均无显著影响 ( $P>0.05$ )。

### 2.4 对肠细胞凋亡因子相关基因表达的影响

与 FM 组比, SM 组显著下调前肠 Caspase9、中肠 Caspase8 和后肠 Caspase8、Caspase9 ( $P<0.05$ )。

AKG 组与 SM 组相比显著下调中肠 Caspase8 ( $P<0.05$ ), 前肠 Caspase8、Caspase9 有上调趋势 ( $P>0.05$ ), 后肠 Caspase8 有下调趋势 ( $P>0.05$ )。与豆粕组相比, Met 组和 Com 组均显著上调前肠 Caspase9 表达量 ( $P<0.05$ )。Met+AKG 与 AKG 组相比显著上调前肠 caspase8 表达量 ( $P<0.05$ )。而 Com+AKG 组与 AKG 组相比对细胞凋亡因子均无显著影响 ( $P>0.05$ ) (图 3)。

### 2.5 对肠紧密连接蛋白相关基因表达的影响

与 FM 组相比, SM 组显著下调前肠紧密连接蛋白 Claudin7、Claudin11、Claudin3c 和 Occludin 表达量, 中肠 Claudin7、Occludin 表达量 ( $P<0.05$ ); 显著上调后肠 Claudin11、Claudin3c 和 Occludin 表达量 ( $P<0.05$ )。与 SM 组相比, AKG 组显著上调前肠 Claudin7、Claudin11 表达量 ( $P<0.05$ ) (图 4), 显著下调中肠 Claudin11 ( $P<0.05$ )、后肠 Claudin11 和 Occludin 表达量 ( $P<0.05$ )。Met 和 Com 组前肠 Claudin7、Claudin11、Claudin3c 表达量均显著高于 SM 组 ( $P<0.05$ )。与 SM 组比, Met 组显著上调中肠 Claudin11 和后肠 Claudin7 表达量 ( $P<0.05$ ), 显著下调后肠 Occludin 表达量 ( $P<0.05$ ); Com 组显著上调前肠 Occludin 表达量 ( $P<0.05$ ), 显著下调中肠及后肠 Claudin11 和后肠 Occludin 表达量 ( $P<0.05$ )。与 AKG 组比, Met+AKG、Com+AKG 组前肠 Claudin7、Claudin11 表达量显著降低 ( $P<0.05$ ), 且 Met+AKG 还显著上调

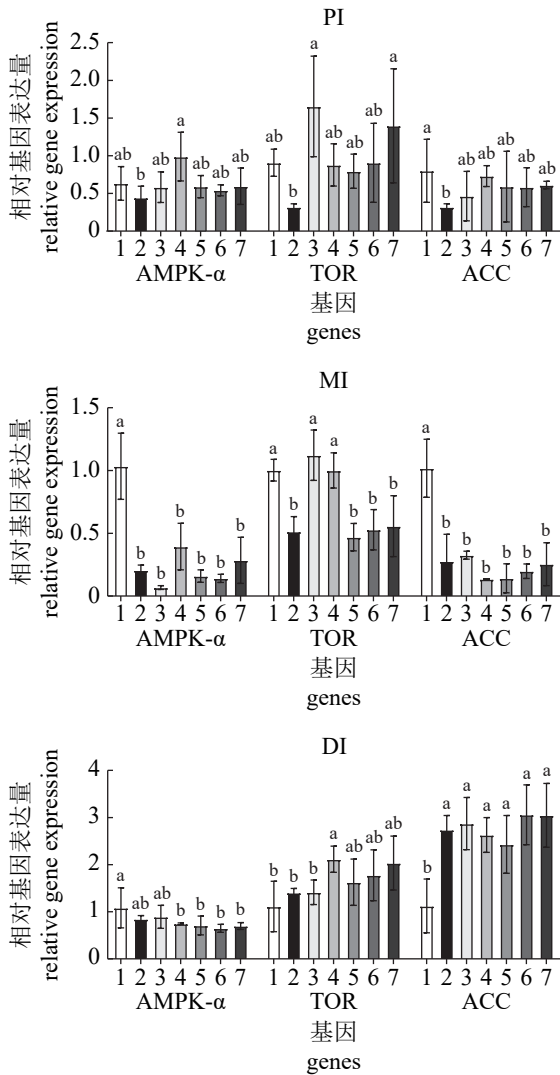


图 1 不同处理对前肠、中肠及后肠 AMPK-α、TOR 和 ACC mRNA 表达量的影响

Fig. 1 Effects of different treatments on the mRNA expression levels of AMPK-α, TOR and ACC in PI, MI and DI

1. FM, 2. SM, 3. AKG, 4. Met, 5. Com, 6. Met+AKG, 7. Com+AKG, The same below.

中肠 Claudin11 和后肠 Claudin7 表达量 ( $P < 0.05$ ), Com+AKG 组显著提高后肠 Claudin11 和 Occludin 表达量 ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

#### 3.1 对肠黏膜能荷水平的影响

ATP 是一种高能磷酸化合物, 在细胞内通过与 ADP 相互转化实现能量存储和释放。EC 反映细胞能量合成和消耗的动态平衡<sup>[21]</sup>。维持机体生理功能需要大量的 ATP, 线粒体是生物体需氧细

胞生产 ATP 的主要细胞器。研究表明, 大豆球蛋白<sup>[11]</sup> 和  $\beta$ -伴大豆球蛋白<sup>[12]</sup> 引发鱼类肠道炎症、降低能量代谢酶的活性。本研究发现豆粕组对前、中肠 EC 有降低趋势, AMP 有增加的趋势, 说明豆粕降低鲤前肠及中肠黏膜的能量水平。机体感染或损伤后会产生各种炎症和抑制反应, 以重新恢复稳态。嘌呤能系统在机体受抗原入侵后参与调节机体免疫反应<sup>[22]</sup>, 释放细胞内 ATP 是嘌呤能信号传导第一步, 同时胞外 ATP 也是一种促炎代谢物<sup>[23]</sup>。本研究中豆粕显著提高后肠 ATP 和 ADP 含量, 可能与嘌呤能信号通路有关。

#### 3.2 对肠 AMPK 和 TOR 信号通路的影响

腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 调控脂肪酸、胆固醇和葡萄糖及蛋白质合成等代谢途径<sup>[24-25]</sup>, 当细胞能量状态改变时, AMP/ATP 比值增加, AMPK 被磷酸化激活, 启动 AMPK 信号通路, 促进机体供能<sup>[26]</sup>。周祖亮<sup>[27]</sup> 研究表明, 大豆球蛋白和  $\beta$ -伴大豆球蛋白均显著降低松浦镜鲤后肠 AMPK 表达量, 这与本实验结果一致。同时, 豆粕饲料中添加 Compound-c 有降低中肠及后肠 AMPK- $\alpha$  表达量的趋势。在肠黏膜上皮细胞超微结构观察中也发现豆粕组和 Com 组细胞线粒体数目均增多, 证明豆粕抑制 AMPK- $\alpha$  表达, 通过 AMPK 信号通路导致线粒体裂变增多, 对肠道造成损伤。

乙酰 CoA 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 是脂肪酸生物合成代谢中关键的限速酶<sup>[28]</sup>, 当 ACC 被 pAMPK 磷酸化失活或含量降低时, 细胞中脂肪酸从头合成减少, 游离脂肪酸在线粒体内发生氧化分解产生 ATP<sup>[29]</sup>。研究表明, 大豆球蛋白和  $\beta$ -伴大豆球蛋白显著下调鲤鱼中、后肠 ACC 基因表达量<sup>[27]</sup>。本研究也发现了相似结果, 豆粕降低前肠及中肠 AMPK- $\alpha$  表达量的同时也显著降低前、中肠 ACC 表达量。Metformin 激活 AMPK, 从而抑制 ACC 活性, 减少脂肪酸合成<sup>[29]</sup>。本实验中 Met 组显著提高前肠 AMPK-a 表达量, 中肠和后肠 ACC 表达量呈降低趋势, 符合其机制。

雷帕霉素靶蛋白 (Target of rapamycin, TOR) 是 AMPK 调控的下游靶蛋白之一, 研究表明, TOR 形成的复合体 TORC1 参与调控蛋白质合成代谢、糖代谢和脂代谢<sup>[30]</sup>, TOR 也通过调节核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 活性来调控机体

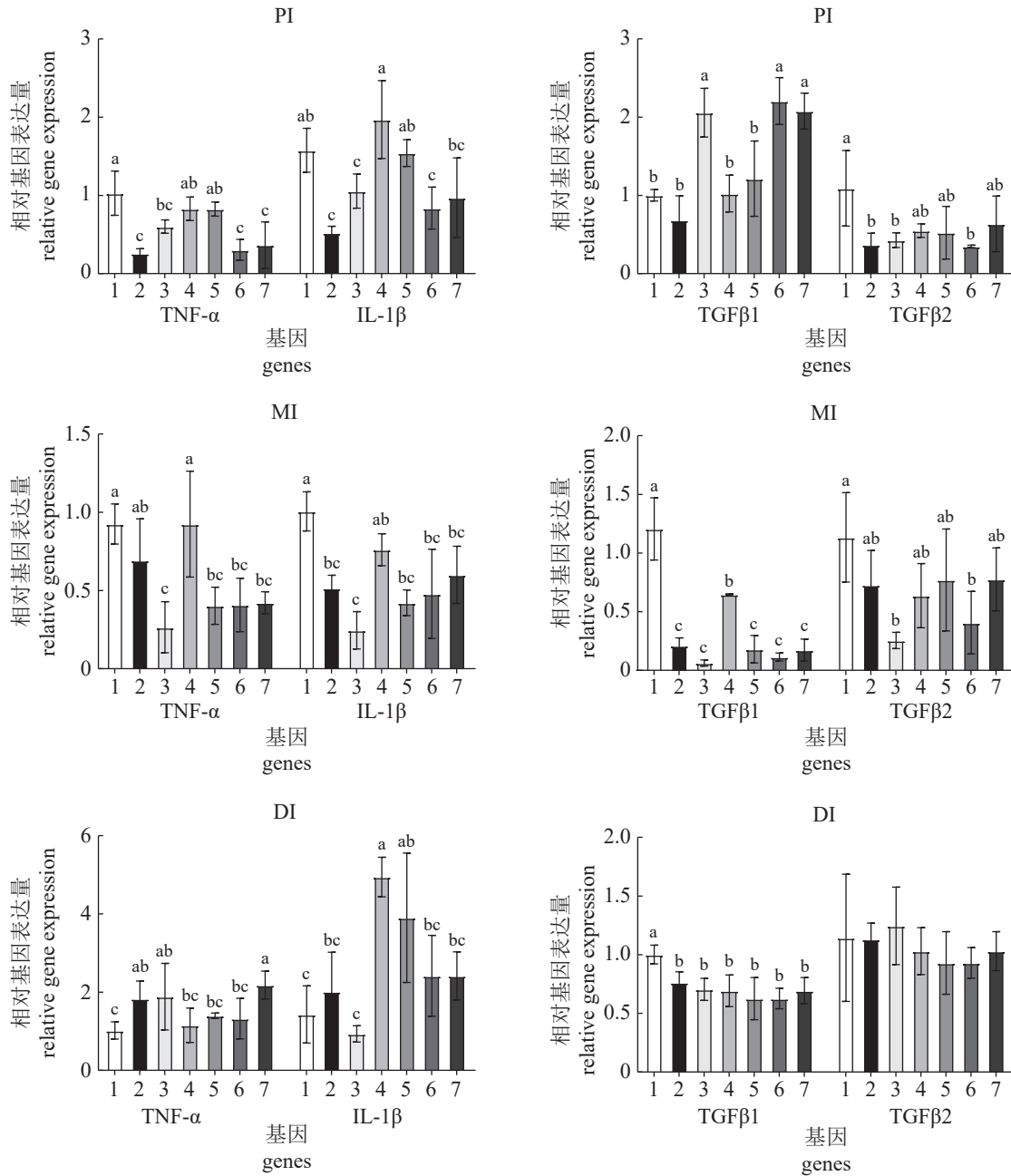


图 2 不同处理对前肠、中肠及后肠抗炎因子和促炎因子 mRNA 表达量的影响

Fig. 2 Effects of different treatments on the mRNA expression levels of anti-inflammatory and pro-inflammatory factors in PI, MI and DI

免疫<sup>[31]</sup>。研究表明, β-伴大豆球蛋白显著降低鲤中、后肠 TOR 基因表达<sup>[12]</sup>, 大豆球蛋白降低 TOR 在鲤前肠和中肠的表达<sup>[11]</sup>。本研究发现, 豆粕组显著降低中肠 TOR 表达。AMPK 激活剂 Met 与豆粕组相比显著提高中肠及后肠 TOR 表达量, AMPK 抑制剂 Com 各肠段 TOR 表达量均与豆粕组无显著差异, 结合豆粕显著下调中肠 AMPK-α 表达量的结果, 说明豆粕下调前肠及中肠 TOR 基因表达量可能与 AMPK-α 受到抑制有关。在陆地

动物中, AMPK 被磷酸化激活后, 会抑制合成代谢, 促进分解代谢, 生产 ATP 为机体供能, 因此抑制 mTOR 的表达<sup>[32]</sup>。本研究中豆粕对 AMPK-α 和 TOR 表达量影响的趋势一致。

此外, AKG 作为生物体的重要能源物质, 日粮中添加 1%AKG 通过激活 mTOR 信号通路缓解仔猪肠黏膜损伤<sup>[33]</sup>, 在鲤研究中发现, AKG 也显著提高 TOR 在各肠段的基因表达<sup>[27]</sup>, 与本实验结果一致。

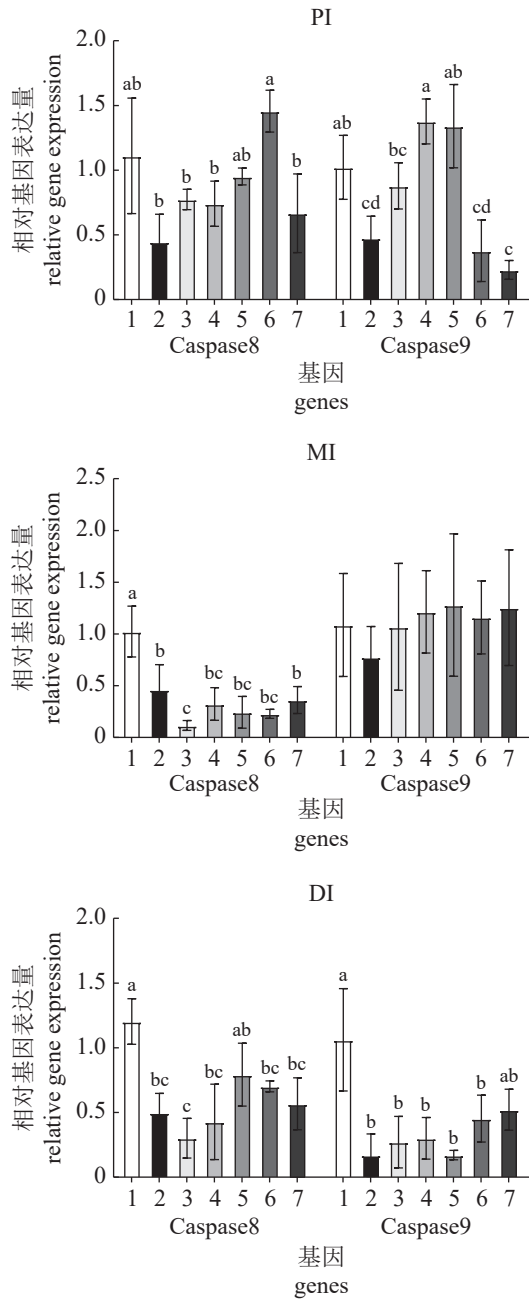


图3 不同处理对前肠、中肠及后肠凋亡因子 mRNA 表达量的影响

Fig. 3 Effects of different treatments on the mRNA expression levels of apoptosis factors in PI, MI and DI

### 3.3 对肠炎性因子基因表达的影响

大豆中的抗原蛋白具有较强的致敏性和免疫原性<sup>[7]</sup>, 水生动物不能有效降解饲料中的大豆抗原蛋白, 经消化道消化后, 极小部分会透过肠黏膜进入机体引发免疫反应<sup>[34]</sup>。激活机体免疫应答后, 免疫细胞或非免疫细胞合成与分泌抗炎或促炎因子参与免疫等生理功能的调节<sup>[35]</sup>, TNF- $\alpha$  和

IL-1 $\beta$  是促炎因子, TGF $\beta$ 1 和 TGF $\beta$ 2 是抗炎因子, 常被用于水产动物发生免疫反应的研究<sup>[12][36]</sup>。本实验中, 豆粕显著下调前肠促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和中肠 IL-1 $\beta$ , 显著上调后肠 TNF- $\alpha$ , 对后肠 IL-1 $\beta$  有上调的趋势, 显著下调前肠抗炎因子 TGF $\beta$ 2、中肠及后肠 TGF $\beta$ 1。前、中、后肠中促炎因子的变化不一致, 这可能与豆粕在肠道内的消化与吸收过程有关。据 Li 等<sup>[37]</sup> 对大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 幼鱼的研究表明, 饲料中大豆球蛋白引起大菱鲆幼鱼肠道炎症, 且随饲料中大豆球蛋白添加量的增加, TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  基因表达量先增后减, TGF- $\beta$ 1 基因表达量亦呈现先增后减。周祖亮<sup>[27]</sup> 研究也发现了相同的结果。Met 和 Com 添加组与豆粕组相比均显著上调前肠促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和后肠 IL-1 $\beta$  的表达, 而对前肠及后肠抗炎因子无显著影响。说明豆粕主要引起后肠肠道炎症, 且不受 AMPK 激活剂或抑制剂添加的影响。

据周祖亮<sup>[27]</sup> 研究, 添加 1%AKG 降低鱼类前肠及后肠促炎因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的基因表达, 并提高其抗炎性细胞因子的表达。本实验中 1%AKG 显著上调前肠抗炎因子 TGF $\beta$ 1, 对中肠和后肠的促炎因子 IL-1 $\beta$  有下调趋势, 说明添加 AKG 通过减少中肠及后肠促炎因子的产生, 增加前肠抗炎因子表达从而减缓肠道炎症。

### 3.4 对肠细胞凋亡基因表达的影响

细胞凋亡基本特征是细胞色素 C 从线粒体中被释放, 激活下游促凋亡蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspase)<sup>[38]</sup>。其中, 内源性凋亡是由有毒物质刺激、DNA 损伤、生长因子分泌、内质网应激和活性氧超载等造成线粒体外膜通透性增加导致的, 进而形成凋亡小体激活 Caspase9, 裂解下游凋亡蛋白酶执行其凋亡功能<sup>[38]</sup>。外源性途径是死亡受体介导的 Procaspase 激活途径, 细胞死亡信号与质膜上的相应受体结合后激活受体, 所形成的聚集体 FADD 和 DED 与质膜内的 Procaspase8 发生作用, 从而聚集成死亡诱导信号复合物, 使 Procaspase8 自动激活为 Caspase8, 从而作用于下游凋亡蛋白酶执行凋亡功能<sup>[39]</sup>。据 Jiang 等<sup>[11]</sup> 研究表明, 大豆球蛋白显著增加鲤后肠 Caspase8 和 Caspase9 表达量, 降低前肠和中肠 Caspase8 和 Caspase9 的表达, 在大豆抗原蛋白饲料添加谷氨酰胺可降低后肠 Caspase8 和 Caspase9 的表达, 提



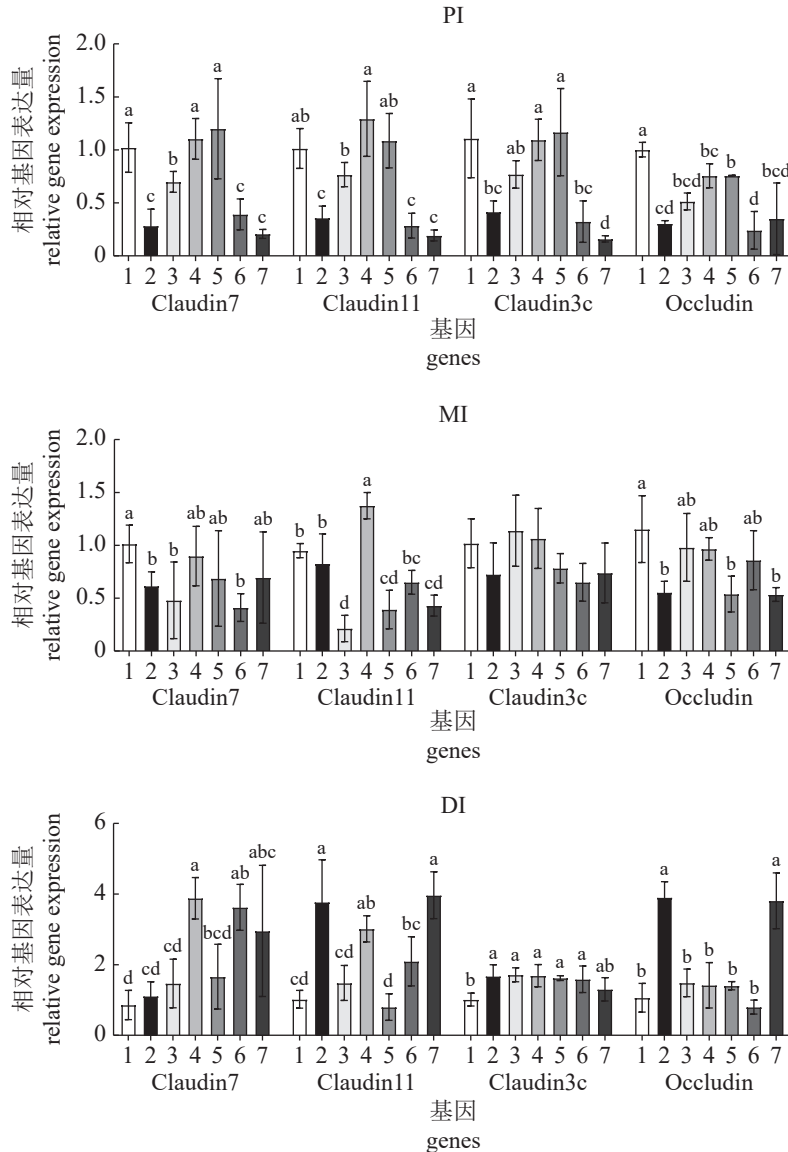


图 4 不同处理对前肠、中肠及后肠紧密连接蛋白 mRNA 表达量的影响

Fig. 4 Effects of different treatments on mRNA expression levels of tight junction proteins in PI, MI and DI

高前肠和中肠 Caspase9 的表达。周祖亮<sup>[27]</sup>研究表明, 大豆球蛋白和  $\beta$ -伴大豆球蛋白低浓度时均会引发肠道细胞凋亡的发生, 但在高浓度时, 肠道细胞凋亡路径却受到抑制, 且凋亡主要发生在后肠。本研究也为豆粕增加线粒体裂变, 在消耗氧用于 ATP 合成时产生大量的活性氧, 当防御机制不足以对抗活性氧持续升高时, 启动细胞凋亡机制清除过度损伤的细胞。

AKG 作为能源物质可直接为小肠供能, 可减少线粒体呼吸链底物端电子漏的发生, 从而减少超氧自由基产生, 进而减缓细胞凋亡<sup>[40]</sup>。添加 1%AKG 显著降低后肠 Caspase9 表达量, 缓解抗原蛋白引起的细胞凋亡<sup>[27]</sup>。本研究中, 与豆粕组

比 AKG 显著下调中肠 Caspase8, 后肠 Caspase8 有降低的趋势。AKG 主要通过抑制内源性凋亡减缓中肠及后肠的细胞凋亡。Metformin 作为 AMPK 的激活剂, 显著提高前肠 Caspase9 的表达, 对前肠 Caspase8、中肠 Caspase9 表达量均有升高的趋势, 这说明 Metformin 引起的细胞分解代谢的增加导致氧自由基增多, 从而加速受损细胞凋亡。研究表明 Compound-c 诱导细胞凋亡的机制与 AMPK 通路不相关<sup>[41]</sup>。

### 3.5 对肠紧密连接蛋白基因表达的影响

紧密连接 (TJ) 是由多种蛋白相互作用形成的复合结构, 紧密连接结构对维持肠道上皮屏障功

能具有重要作用<sup>[42]</sup>。Occludin 及 Claudin 家族是细胞膜上的跨膜蛋白, Claudin 家族按功能可以分为形成屏障、提供 TJ 细胞旁密封性的连接蛋白(如 Claudin3c、Claudin11)及形成孔道, 提供 TJ 细胞旁通透性的连接蛋白, Claudin7 具有上述两种功能<sup>[43]</sup>。研究表明慢性炎症和黏膜损伤均会导致肠上皮屏障功能障碍<sup>[44]</sup>。Jiang 等<sup>[11]</sup>研究表明,  $\beta$ -伴大豆球蛋白上调鲤各肠段 Claudin11 及后肠 Claudin7, 而中肠及后肠中的 Occludin 和 Claudin3c 显著下调, 说明  $\beta$ -伴大豆球蛋白所引起的紧密连接的破坏主要发生在中肠及后肠。本实验中, 随肠道的延长豆粕影响肠道紧密连接蛋白的表达呈现由低到高的趋势, 这种趋势与 TOR 和 ACC 的表达趋势相同, 说明豆粕降低前、中肠的 TOR 和 ACC 的表达从而降低了紧密连接蛋白的表达, 在后肠中提高 TOR 和 ACC 的表达从而提高紧密连接蛋白表达。

Met 和 Com 组前肠紧密连接蛋白表达量显著高于豆粕组, Met 组中肠 Claudin11 表达量显著高于豆粕组和 AKG 组, Com 组显著低于豆粕组, 与 Met 组或 Com 组前肠及中肠 TOR 表达趋势完全一致, 进一步验证提高 TOR 表达可以提高紧密连接蛋白表达。

据周祖亮<sup>[27]</sup>研究, 饲料中添加 1%AKG 一定程度提高鲤各肠段 Occludin 和 Claudin3c 的基因表达。本实验中, 饲料中添加 1%AKG 与豆粕组相比显著提高鲤前肠 Claudin7 和 Claudin11, 降低中肠及后肠 Claudin11 和后肠 Occludin 表达量, 与鱼粉组无显著差异。说明 AKG 通过提高前肠 TOR 的表达量, 提高前肠紧密连接的表达, 一定程度缓解豆粕导致的前肠细胞紧密连接的破坏。

此外, 与 AKG 组相比, 同时添加 Met 和 AKG、Com 和 AKG 对前肠和后肠 TOR 表达量无显著影响, 各肠段的炎性因子、细胞凋亡因子基因表达量均无显著影响。说明豆粕对肠道凋亡因子的影响不受 AMPK 激活剂或抑制剂的影响, AKG 对肠道炎症的修复作用不受激活剂和抑制剂添加的影响。

## 4 结论

豆粕降低前肠及中肠能量水平, 抑制 AMPK- $\alpha$ 、TOR 和 ACC 表达, 降低前肠及中肠紧密连接蛋白的基因表达; 主要引发后肠肠道炎症。

AKG 通过提高前肠 TOR、紧密连接、抗炎因子的表达, 减少中肠及后肠促炎因子的产生,

通过抑制内源性凋亡减缓中肠及后肠的细胞凋亡, 缓解豆粕对鲤肠道的损伤。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

## 参考文献 (References):

- [1] 张锦秀, 周小秋, 倪学勤, 等. 分离大豆蛋白对幼建鲤生长性能及肠道的影响[J]. 水产学报, 2008, 32(1): 84-90.  
Zhang J X, Zhou X Q, Ni X Q, et al. Effects of soybean protein isolate on growth performance and intestine of *Cyprinus carpio* var. Jian juveniles[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(1): 84-90 (in Chinese).
- [2] Zhang C X, Rahimnejad S, Wang Y R, et al. Substituting fish meal with soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*): effects on growth, digestive enzymes activity, gut histology, and expression of gut inflammatory and transporter genes[J]. *Aquaculture*, 2018, 483: 173-182.
- [3] 刘洋, 孟连仲, 张建雄. 豆粕替代鱼粉对褐点石斑鱼生长、营养组成及血液指标影响[J]. 中国饲料, 2018(4): 60-64.  
Liu Y, Meng L Z, Zhang J X. Effect of partial fish meal replacement by soybean meal on the growth performance, nutritional composition and blood biochemical indices of juvenile *Epinephelus fuscoguttatus*[J]. China Feed, 2018(4): 60-64 (in Chinese).
- [4] 谢敏, 曾国清, 向建国, 等. 豆粕部分替代鱼粉对鳢生长、肌肉成分及血浆生化指标的影响[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(13): 165-169.  
Xie M, Zeng G Q, Xiang J G, et al. Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal on growth performance, muscle composition, and plasma biochemical indices of yellow cheek carp, *Elopichthys bambusa*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(13): 165-169 (in Chinese).
- [5] 吴莉芳, 瞿子惠, 周锴, 等. 豆粕替代鱼粉对黄金鲈生长及肠道组织的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(6): 1-8.  
Wu L F, Qu Z H, Zhou K, et al. Effects of replacing fish meal with soybean meal on growth and intestinal tissue of *Perca flavescens*[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2017, 45(6): 1-8 (in Chinese).
- [6] 吴钊, 陈乃松, 华雪铭, 等. 4种豆粕替代鱼粉对大黄鱼生长、抗氧化及抗菌能力的影响[J]. 海洋渔业, 2016, 38(5): 495-506.  
Wu Z, Chen N S, Hua X M, et al. Effects of replacement of dietary fish meal by four kinds of soybean meal on growth, antioxidant and antibacterial ability of

- Pseudosciaena crocea* R.[J]. Marine Fisheries, 2016, 38(5): 495-506 (in Chinese).
- [ 7 ] 李德发. 大豆抗营养因子研究进展[J]. 饲料与畜牧, 2019(1): 52-58.
- Li D F. Research progress of soybean anti nutritional factors[J]. Journal of Feed and Animal Husbandry, 2019(1): 52-58 (in Chinese).
- [ 8 ] Buttle L G, Burrells A C, Good J E, *et al.* The binding of soybean agglutinin (SBA) to the intestinal epithelium of atlantic salmon, *Salmo salar* and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed high levels of soybean meal[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2001, 80(3-4): 237-244.
- [ 9 ] Maytorena-Verdugo C I, Córdova-Murueta J H, García-Carreño F L. Peptidase compensation in the digestive system of whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* against dietary kunitz-type soybean trypsin inhibitor[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2017, 23(5): 1095-1103.
- [10] Becker K, Makkar H P S. Effects of dietary tannic acid and quebracho tannin on growth performance and metabolic rates of common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Aquaculture*, 1999, 175(3-4): 327-335.
- [11] Jiang W D, Hu K, Zhang J X, *et al.* Soyabean glycinin depresses intestinal growth and function in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var jian): protective effects of glutamine[J]. *British Journal of Nutrition*, 2015, 114(10): 1569-1583.
- [12] Zhang J X, Guo L Y, Feng L, *et al.* Soybean  $\beta$ -conglycinin induces inflammation and oxidation and causes dysfunction of intestinal digestion and absorption in fish[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58115.
- [13] Veillette P A, Young G. Temporal changes in intestinal  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity and in vitro responsiveness to cortisol in juvenile Chinook salmon[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2004, 138(3): 297-303.
- [14] Pierzynowski S G, Sjodin A. Perspectives of glutamine and its derivatives as feed additives for farm animals[J]. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 1998, 7(S1): 79-91.
- [15] Filip R, Wdowiak L, Harrison A P, *et al.* Dietary supplementation with phytohemagglutinin in combination with  $\alpha$ -ketoglutarate limits the excretion of nitrogen via urinary tract[J]. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2008, 15(2): 309-315.
- [16] 李晋南, 徐奇友, 位莹莹, 等. 谷氨酰胺及其前体物对松浦镜鲤生长性能、体成分和血清生化指标的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2013, 44(12): 119-125.
- Li J N, Xu Q Y, Wei Y Y, *et al.* Effect of glutamine precursors on growth performance, body composition and plasma biochemical parameters of Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio specularis*)[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2013, 44(12): 119-125 (in Chinese).
- [17] 李晋南, 魏玉强, 徐奇友, 等.  $\alpha$ -酮戊二酸对松浦镜鲤肠道形态与功能的影响[J]. *水产学杂志*, 2016, 29(4): 43-47.
- Li J N, Wei Y Q, Xu Q Y, *et al.* Effects of  $\alpha$ -ketoglutarate supplementation on intestinal morphology and function of Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio* Songpu)[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2016, 29(4): 43-47 (in Chinese).
- [18] 李晋南, 徐奇友, 王常安, 等. 谷氨酰胺及其前体物对松浦镜鲤肠道消化酶活性及肠道形态的影响[J]. *动物营养学报*, 2014, 26(5): 1347-1352.
- Li J N, Xu Q Y, Wang C A, *et al.* Effects of glutamine and its precursors on intestinal digestive enzyme activity and intestinal morphology of Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio specularis*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(5): 1347-1352 (in Chinese).
- [19] 魏玉强.  $\alpha$ -酮戊二酸对松浦镜鲤氮代谢、抗氧化能力和小肠粘膜形态与功能的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- Wei Y Q. Effects of  $\alpha$ -ketoglutarate supplementation on nitrogen metabolism, antioxidant capacity and intestinal mucosal morphology and function of *Songpu* mirror carp (*Cyprinus carpio*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015 (in Chinese).
- [20] 徐奇友. 鲤鱼营养需要研究进展[J]. *饲料工业*, 2019, 40(14): 1-10.
- Xu Q Y. Research progress on nutrition requirement of common carp[J]. *Feed Industry*, 2019, 40(14): 1-10 (in Chinese).
- [21] 付大波.  $\alpha$ -酮戊二酸对脂多糖刺激仔猪肌肉、肠黏膜和肝脏能量代谢的影响[D]. 武汉: 武汉工业学院, 2010.
- Fu D B. Effects of  $\alpha$ -ketoglutarate on energy metabolism of muscles, intestinal mucosa and livers in weanling piglets chronically challenged with lipopolysaccharide[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2010 (in Chinese).
- [22] Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2016, 16(3): 177-192.
- [23] Corriden R, Insel P A. Basal release of ATP: An auto-crine-paracrine mechanism for cell regulation[J]. *Science Signaling*, 2010, 3(104): re1.
- [24] Hayashi T, Hirshman M F, Fujii N, *et al.* Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism

- ism[J]. *Diabetes*, 2000, 49(4): 527-531.
- [25] Barnes B R, Marklund S, Steiler T L, *et al.* The 5'-AMP-activated protein kinase  $\gamma$ 3 isoform has a key role in carbohydrate and lipid metabolism in glycolytic skeletal muscle[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(37): 38441-38447.
- [26] Chen T C, Hsieh S S. The Effects of repeated maximal voluntary isokinetic eccentric exercise on recovery from muscle damage[J]. *Research Quarterly for Exercise and Sport*, 2000, 71(3): 260-266.
- [27] 周祖亮. 大豆球蛋白和大豆  $\beta$ -伴球蛋白对松浦镜鲤生长性能、肠道健康及代谢通路的影响 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2021.
- Zhou Z L. Effects of glycinin and  $\beta$ -conglycinin on growth performance, health of intestine and metabolic pathway of Songpu mirror carp[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021 (in Chinese).
- [28] Abu-Elheiga L, Jayakumar A, Baldini A, *et al.* Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(9): 4011-4015.
- [29] Hardie D G, Sakamoto K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle[J]. *Physiology*, 2006, 21(1): 48-60.
- [30] Laplante M, Sabatini D M. mTOR signaling in growth control and disease[J]. *Cell*, 2012, 149(2): 274-293.
- [31] Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, *et al.* The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response[J]. *Immunity*, 2008, 29(4): 565-577.
- [32] Cao C, Zhou J Y, Xie S W, *et al.* Metformin enhances nomegestrol acetate suppressing growth of endometrial cancer cells and may correlate to downregulating mTOR activity in vitro and in vivo[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(13): 3308.
- [33] Hou Y Q, Yao K, Wang L, *et al.* Effects of  $\alpha$ -ketoglutarate on energy status in the intestinal mucosa of weaned piglets chronically challenged with lipopolysaccharide[J]. *British Journal of Nutrition*, 2011, 106(3): 357-363.
- [34] 李登来, 杨智勇, 朱瑞, 等. 大豆抗原蛋白对水生动物肠道健康的影响及改善对策[J]. *大豆科学*, 2021, 40(3): 420-425.
- Li D L, Yang Z Y, Zhu R, *et al.* Effects of glycinin on intestinal health of aquatic animals and its improvement measures[J]. *Soybean Science*, 2021, 40(3): 420-425 (in Chinese).
- [35] 殷海成, 黄进, 贾峰, 等. 大豆B-伴球蛋白对黄河鲤头肾TLR2/NF- $\kappa$ B p65及其炎症因子基因表达的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2020, 35(2): 223-228.
- Yin H C, Huang J, Jia F, *et al.* Effects of  $\beta$ -conglycinin on expression of TLR2/NF- $\kappa$ B p65 and inflammatory-related genes in head kidney of juvenile common carp *Cyprinus carpio haematopterus*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2020, 35(2): 223-228 (in Chinese).
- [36] Scapigliati G, Buonocore F, Bird S, *et al.* Phylogeny of cytokines: Molecular cloning and expression analysis of sea bass *Dicentrarchus labrax* interleukin-1 $\beta$ [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2001, 11(8): 711-726.
- [37] Li Y X, Hu H B, Liu J T, *et al.* Dietary soya allergen  $\beta$ -conglycinin induces intestinal inflammatory reactions, serum-specific antibody response and growth reduction in a carnivorous fish species, turbot *Scophthalmus maximus* L.[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(8): 4022-4037.
- [38] 王刚, 杨飞飞, 罗茂. 细胞调节性死亡及其机制的研究 [J]. *西南医科大学学报*, 2021, 44(5): 511-519.
- Wang G, Yang F F, Luo M. Study of regulated cell death and its mechanism[J]. *Journal of Southwest Medical University*, 2021, 44(5): 511-519 (in Chinese).
- [39] Fan T J, Han L H, Cong R S, *et al.* Caspase family proteases and apoptosis[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2005, 37(11): 719-727.
- [40] 赵云罡, 徐建兴. 线粒体, 活性氧和细胞凋亡[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 40(2): 168-171.
- Zhao Y G, Xu J X. Mitochondria, reactive oxygen species and apoptosis[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2001, 40(2): 168-171 (in Chinese).
- [41] Jin J J, Mullen T D, Hou Q, *et al.* AMPK inhibitor compound c stimulates ceramide production and promotes bax redistribution and apoptosis in MCF7 breast carcinoma cells[J]. *Journal of Lipid Research*, 2009, 50(12): 2389-2397.
- [42] 娄文静, 刘冬妍. 肠道紧密连接跨膜蛋白研究进展[J]. *实用药物与临床*, 2019, 22(11): 1214-1219.
- Lou W J, Liu D Y. Research progress in intestinal tight junction membrane proteins[J]. *Practical Pharmacy and Clinical Remedies*, 2019, 22(11): 1214-1219 (in Chinese).
- [43] Bagherie-Lachidan M, Wright S I, Kelly S P. Claudin-3 tight junction proteins in *Tetraodon nigroviridis*: cloning, tissue-specific expression, and a role in hydromineral balance[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2008, 294(5): R1638-R1647.
- [44] Xiao B, Zhang Z, Viennois E, *et al.* Combination therapy for ulcerative colitis: orally targeted nanoparticles prevent mucosal damage and relieve inflammation[J]. *Theranostics*, 2016, 6(12): 2250-2266.



## Effects of soybean meal on intestinal mucosal energy metabolism, intestinal health gene expression and alleviating effect of $\alpha$ -ketoglutaric on *Cyprinus carpio* Songpu

ZHAO Jingyi<sup>1,2</sup>, JIN Jiansheng<sup>3</sup>, YANG Lili<sup>3</sup>, CHEN Liping<sup>3</sup>, YE Jinyun<sup>1</sup>, XU Qiyou<sup>1\*</sup>

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Aquatic Bioresource Conservation and Development Technology, Nation Local Joint Engineering Laboratory of Aquatic Animal Genetic Breeding and Nutrition, College of Life Science,

Huzhou University, Huzhou 313000, China;

2. Problem Child Biotechnology Co., Ltd, Linyi 276000, China;

3. Wuxing District Agricultural Technology Extension Service Center of Huzhou, Huzhou 313000, China)

**Abstract:** This experiment was performed to investigate the effects of soybean meal on intestinal health of Songpu Mirror carp (*Cyprinus carpio* Songpu) as well as the mechanism of AKG alleviating intestinal injury. A total of 609 juvenile Songpu mirror carp with an initial body weight of (9.51±0.06) g were randomly divided into 7 groups with 3 replicates per group and 29 fish per group. The control group was fed with 30.8 % fish meal (FM group) as the protein source. The experimental group was fed with 40 % soybean meal (SM group) as basic diet. The AKG group were fed with the basic diet supplemented with 1%  $\alpha$ -ketoglutarate. Groups Met and Com were fed with the basic diet supplemented with 300 mg/kg Metformin and 0.2 mg/kg Compound C respectively. Groups Met+AKG and Com+AKG were supplemented with Metformin and Compound C on the basis of AKG group respectively. The experiment lasted for 59 days. Compared with FM group, mucosa ATP and ADP contents of the distal intestine (DI) were significantly increased ( $P<0.05$ ) in SM group. Meanwhile, the expression of ACC, tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), transforming growth factor-beta (TGF $\beta$ 2), caspase9, Claudin7, Claudin11, Claudin3c, Occludin in the proximal intestine (PI), the expression of AMP-activated protein kinase alfa (AMPK- $\alpha$ ), target of rapamycin (TOR), ACC, IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ 1, Caspase8, Claudin7, Occludin in the mid intestine (MI), the expression of TGF $\beta$ 1, caspase8, caspase9 in the DI were significantly decreased and the expression of TNF- $\alpha$ , Claudin11, Claudin3c, Occludin in the DI were significantly increased ( $P<0.05$ ) in SM. Compared with SM, the expression of TGF $\beta$ 1 (PI), Claudin7 (PI), Claudin11 (PI, MI and DI), TOR (PI and MI), caspase8(MI), TNF- $\alpha$  (MI) and Occludin (DI) were significantly decreased ( $P<0.05$ ) in AKG group. The ADP and AMP contents of mucosa of DI were significantly increased in Met and Com group. Subsequently, the expression of AMPK- $\alpha$  (PI), TOR (MI and DI), TNF- $\alpha$  (PI), IL-1 $\beta$  (PI), Caspase9 (PI), Claudin7 (PI), Claudin11 (PI and MI), Claudin3c (PI), TGF $\beta$ 1 (MI) were significantly increased and the expression of Occludin were significantly decreased in Met group. The expression of Occludin (PI) were significantly increased and the expression of Claudin11(MI and DI) and Occludin (DI) were significantly decreased in Com group. Compared with AKG, the ATP, ADP and AMP contents of mucosa of DI were significantly increased in Com+AKG group. The ADP contents of mucosa of DI were significantly increased in Met+AKG group. The expression of Claudin7 (PI), Claudin11(PI) and TOR (MI) were significantly decreased in Met+AKG and Com+AKG. Moreover, the expression of caspase8 (PI), Claudin11 (MI) and Claudin7(DI) were significantly increased in Met+AKG. The expression of Claudin11 (DI) and Occludin (DI) were significantly increased in Com+AKG ( $P<0.05$ ). In conclusion, soybean meal decreased the energy level of PI and MI, but inhibited the expression of AMPK- $\alpha$ , TOR and ACC, and further decreased the expression of tight junction protein in PI and MI. Intestinal inflammation in DI was triggered. AKG can improve the expression of TOR, tight junction and anti-inflammatory factors in PI, reduce the expression of pro-inflammatory factors in MI and DI, alleviate the apoptosis of MI and DI by inhibiting endogenous apoptosis, and alleviate the damage of soybean meal to the intestine of carp. This study found the way that soy protein would damage intestinal health, and its effect on intestinal mucosal energy metabolism and the mechanism of AKG in alleviating intestinal injury. So this may provide a theoretical basis for improving the application of soybean in aquatic animal production.

**Key words:** Songpu mirror carp; soybean meal; alpha-ketoglutaric acid; energy charge level; gene expression

**Corresponding author:** XU Qiyou. E-mail: xuqiyou@sina.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (NSFC) (31972800); Supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA