



## 嗜黏蛋白阿克曼菌对鲤糖代谢的调控机制

王亚妮<sup>1</sup>, 黄真屹<sup>1</sup>, 杨博雅<sup>1</sup>, 游富<sup>1</sup>, 张新党<sup>1,2</sup>,  
杨国坤<sup>1,2</sup>, 常绪路<sup>1,2</sup>, 冯世坤<sup>1,2</sup>, 孟晓林<sup>1,2\*</sup>

(1. 河南师范大学水产学院, 河南新乡 453007;

2. 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南新乡 453007)

**摘要:** 为探究巴氏灭活的阿克曼菌 (Akk) 调控鲤糖代谢的分子机制, 实验通过不同糖水平 (20%、30%、40%、50% 葡萄糖) 探究体重 (10.5±1.0) g 的鲤 4 周和 8 周时胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 分泌及阿克曼菌定植的时空变化; 在不同糖水平实验基础上, 设置含有 40% 葡萄糖的 3 个不同 Akk 浓度 ( $10^8$ 、 $10^9$  和  $10^{10}$  CFU/g) P-Akk 组, 探究添加 P-Akk 4 周后对鲤 (16.38±0.39 g) 糖代谢及 GLP-1 的调控; 通过 P-Akk 孵育鲤原代肝脏、肠细胞实验, 共同探究不同糖水平下鲤肠道 Akk、GLP-1 对糖代谢的调控机制。结果显示, (1) 随着饲料中葡萄糖含量的升高, 鲤血清中 GLP-1b 含量显著降低, 4 周时高糖组鲤肠道 GLP-1a、GLP-1b 以及肠道内容物中 Akk 丰度均显著降低, 但 8 周时无显著性差异。(2) P-Akk 处理后, 鲤血清中葡萄糖、GLP-1 含量显著减少; 中肠绒毛高度、肌层厚度显著增加, GLP-1 含量减少, 短链脂肪酸含量增加, *muc2* mRNA 表达水平升高; 此外, P-Akk 上调肝脏中 *ampk*、*pi3k*、*akt* 及糖酵解基因 *gk*、*pfk* mRNA 表达量, 下调糖异生基因 *pepck* mRNA 表达量。(3) 原代肝脏、肠细胞孵育结果显示, P-Akk 处理肠细胞后 GLP-1 含量显著减少, 而 *gpr40* 的 mRNA 表达量升高; 此外肝脏细胞中糖酵解基因 *gk*、*pfk* mRNA 表达量显著升高。综上, 外源添加 P-Akk 可以缓解高糖饲料引起的血糖升高, 维持葡萄糖稳态。该研究结果可为 Akk 作为益生菌在水产饲料中的应用提供理论基础。

**关键词:** 鲤; 不同糖水平; 胰高血糖素样肽-1(GLP-1); 糖代谢

中图分类号: S 963.7

文献标志码: A

近年来, 随着水产品的需求量不断增加, 优质蛋白资源短缺已成为限制水产养殖快速发展的因素<sup>[1]</sup>。因此, 寻找新型蛋白源或使用低廉的非蛋白质能量物质是目前水产养殖行业的焦点之一<sup>[2]</sup>。糖类作为三大能源物质之一, 价格低廉、来源广泛, 研究表明, 在饲料中添加糖类不仅可以满足机体的能量需求, 还能够发挥“蛋白质节约”

效应<sup>[3]</sup>。有关糖类在水产饲料中的应用早在 20 世纪 40—50 年代就有迹可循, 研究发现, 糖类在鱼体内作为能源物质能够促进机体生长发育, 提高鱼类的生长效率和蛋白质效率<sup>[4]</sup>。除此之外, 在饲料中添加适宜水平的糖类一方面能够改善饲料的物理性状, 降低饲料成本, 另一方面可以进行生物氧化产生 ATP, 有利于机体活化氨基酸, 减

收稿日期: 2023-08-15 修回日期: 2023-10-08

资助项目: 国家自然科学基金 (U1904118, 32273149); 河南省科技研发计划项目 (222103810021)

第一作者: 王亚妮 (照片), 从事水产界面微生物生态学研究, E-mail: wangyaweiwww@126.com

通信作者: 孟晓林, 从事水产界面微生物生态学研究, E-mail: mengxiaolinqdio@126.com



轻氮排泄造成的养殖水体污染。然而, 与哺乳动物相比, 鱼类对糖类的耐受能力较低, 被认为是天然的“糖尿病患者”<sup>[5]</sup>, 饲料中添加的糖水平过高会导致鱼类发生应激反应, 降低饲料利用率, 葡萄糖-6-磷酸酶 (G6Pase) 活性下降, 血糖水平持续偏高, 且高糖还会导致肝脏肿大、糖原累积, 影响鱼类正常肝功能<sup>[6]</sup>。此外, 高糖饲料还会改变鱼类肠道内微生物的菌群组成与结构, 造成肠道菌群失调, 从而导致鱼类代谢紊乱<sup>[7]</sup>, 有研究分别用含 0%、10%、20%、30% 和 40% 糊精的饲料饲喂鲤 (*Cyprinus carpio*)、真鲷 (*Pagrus major*)、鲷 (*Seriola*) 30 d, 发现当糊精水平达到 40% 时鲤的生长才受到影响<sup>[8]</sup>。

研究表明, 肠道菌群可通过多种作用机制调控鱼类糖代谢, 包括调节胆汁酸代谢<sup>[9]</sup>、产生肠源性短链脂肪酸 (SCFAs)<sup>[10]</sup>、促进脂多糖 (LPS) 或肽聚糖的产生<sup>[11]</sup> 等。嗜黏蛋白阿克曼菌 (*Akkermansia muciniphila*, Akk) 作为二代益生菌, 于 2004 年首次从人体粪便中分离出来, 研究发现, Akk 能够促进机体肠道屏障完整性<sup>[12]</sup>、调节免疫反应<sup>[13]</sup>、抑制肠道炎症<sup>[14]</sup>、减轻肥胖以及防治胰岛素抵抗、总胆固醇升高和脂肪组织储存<sup>[15]</sup> 等代谢性疾病。此外, 相对于正常群体, 处于糖尿病前期的病人或 I 型糖尿病小鼠 (*Mus musculus*) 体内 Akk 丰度显著降低, 表明 Akk 与糖尿病之间存在联系<sup>[16-17]</sup>。在哺乳动物中, Akk 代谢产生乙酸、丙酸等短链脂肪酸, 与 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 结合后促进肠道 L 细胞分泌 GLP-1 调控机体糖代谢<sup>[18]</sup>。人体实验探究 Akk 作为补充剂的安全性及相关参数 (即胰岛素抵抗、循环脂质、内脏肥胖和体重), 证实 Akk 的安全性及耐受性<sup>[19]</sup>。由于 Akk 是严格厌氧菌, 限制了其在水产中的应用, 巴氏灭活的 Akk 是安全使用的有效方式之一, 研究发现, Akk 产生的有益效果不会随着巴氏灭活而减少, 即巴氏灭活的 Akk 同样能够降低胰岛素抵抗, 改善血脂异常, 且效果相对于活菌更加显著<sup>[20]</sup>。综上所述, 目前关于 Akk 作用的研究多聚焦在血糖平衡、脂肪堆积、肠道通透性和体重等方面, 且大多局限于人类及哺乳动物, 有关 Akk 在鱼类糖代谢调控中的具体作用机制目前尚不清楚。

因此, 本实验以鲤为研究对象, 探究 Akk 及 GLP-1 对饲料中不同糖水平的时空响应及其反馈调节, 阐明 P-Akk 介导 GLP-1 调控鲤葡萄糖代谢的分子作用机制。研究结果有助于进一步认识肠

道益生菌 Akk 在鲤糖代谢调控过程中的作用, 从肠道菌群-内分泌激素轴的角度完善杂食性鱼类糖代谢的内分泌调控网络, 为 Akk 应用于饲料添加剂奠定研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验饲料及养殖管理

不同葡萄糖水平实验 (实验 1) 以酪蛋白和明胶作为蛋白源, 鱼油和豆油作为脂肪源, 分别添加 20%、30%、40%、50% 的葡萄糖, 共配制 4 种饲料, 饲料配方见表 1。

配制饲料前, 所有原料必需经过粉碎机粉碎, 且全部过 60 目筛。将所有粉碎好的饲料原料按配方混匀后加入鱼油和豆油, 手工将油脂微粒搓散、混匀, 最后再加入适宜蒸馏水使粉状饲料成团, 用饲料颗粒机制成粒径 2.5 mm 的颗粒饲料, 晾干后置于 -20 °C 冰箱保存备用。

实验鲤购买自延津县渔场 (新乡, 河南)。实验开始前禁食 24 h, 选择初始体重为 (10.5±1.0) g、体格健壮的鲤幼苗 360 尾, 随机分为 4 组: C 组 (20% 葡萄糖)、L 组 (30% 葡萄糖)、M 组 (40% 葡萄糖)、H 组 (50% 葡萄糖), 每组 3 个养殖桶, 每桶 30 尾, 养殖实验在河南师范大学水产养殖基地进行, 养殖期间每 3 天换水量为总体积的 1/3, 光照: 黑暗=1:1, 水温维持在 (25±1) °C, pH 为 6.5~7.8, 每日 3 次定时、定量 (体重的 3%) 投喂。

在养殖 4 周 (4W)、8 周 (8W) 时分别进行取样, 取血清、肠道和肠道内容物置于离心管中, -80 °C 冰箱保存。本研究获得了河南师范大学实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守伦理规范, 并按照河南师范大学伦理委员会制定的规章制度执行。

添加 P-Akk 实验 (实验 2) Akk 的培养。嗜黏蛋白阿克曼菌购自德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ) DSM 22959。首先配制 BHI 黏蛋白培养基, 用 99.999% 的氮气除氧, 121 °C 灭菌 30 min, 放入厌氧箱中冷却备用, 将 Akk 接种在厌氧培养基中, 环境温度为 37 °C, 厌氧培养 36 h, 通过稀释涂布平板法计算活菌数, 以 OD 值为横坐标, 以平板计数浓度为纵坐标建立标曲。P-Akk: Akk 在 70 °C 灭菌 30 min。

根据实验 1 的结果, 将葡萄糖添加水平为 40% 组作为基础饲料, 选择大小为 (16.78±0.39) g、

表 1 实验饲料组成及营养水平 (干物质 %)

Tab. 1 Composition and nutrient levels of experimental diets (dry matter %)

原料 material	组别 groups			
	C	L	M	H
酪蛋白 casein	31.80	31.80	31.80	31.80
明胶 gelatin	5.00	5.00	5.00	5.00
鱼油 fish oil	2.00	2.00	2.00	2.00
豆油 soybean oil	3.00	3.00	3.00	3.00
维生素预混料 mineral premix <sup>a</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00
矿物质预混料 vitamin premix <sup>b</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00
微晶纤维 microcrystalline cellulose	35.00	25.00	15.00	5.00
磷酸二氢钙 calcium dihydrogen phosphate	0.50	0.50	0.50	0.50
氯化钠 sodium chloride	0.20	0.20	0.20	0.20
葡萄糖 glucose	20.00	30.00	40.00	50.00
氯化胆碱 choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50
总计(100%)	100	100	100	100
粗蛋白 crude protein	27.99	27.59	27.27	27.16
粗脂肪 crude lipid	4.87	4.93	4.84	4.75
粗灰分 ash	3.54	3.46	3.50	3.47

注: <sup>a</sup>维生素预混料(1 kg)含有 V<sub>A</sub> 800 000 IU, V<sub>B1</sub> 1 500 mg, V<sub>B</sub> 124 mg, V<sub>B2</sub> 1 250 mg, V<sub>B6</sub> 1 100 mg, V<sub>C</sub> 2.5 g, V<sub>D3</sub> 160 000 IU, V<sub>E</sub> 15 g, V<sub>K</sub> 3 325 mg, 肌酸5.5 g, 叶酸70 mg, 烟酸4 g, 泛酸4.5 g, 生物素125 mg。

<sup>b</sup>矿物质预混料(1 kg)含有: Ca 330 g, Mg 45 g, P 105 g, Fe 15 g, I 50 mg, Cu 0.35 g, Zn 3 g, Mn 1.5 g, Se 9 mg, Co 11 mg。

Notes: <sup>a</sup>The vitamin premix (1 kg) contain: V<sub>A</sub> 800 000 IU, V<sub>B1</sub> 1 500 mg, V<sub>B</sub> 124 mg, V<sub>B2</sub> 1 250 mg, V<sub>B6</sub> 1 100 mg, V<sub>C</sub> 2.5 g, V<sub>D3</sub> 160 000 IU, V<sub>E</sub> 15 g, V<sub>K</sub> 3 325 mg, creatine 5.5 g, folic acid 70 mg, niacin 4 g, pantothenic acid 4.5 g, biotin 125 mg.

<sup>b</sup>The mineral premix (1 kg) contain: Ca 330 g, Mg 45 g, P 105 g, Fe 15 g, I 50 mg, Cu 0.35 g, Zn 3 g, Mn 1.5 g, Se 9 mg, Co 11 mg.

体格健壮的黄河鲤 240 尾, 随机分为 NC 组 (40% 葡萄糖)、LP 组 (40% 葡萄糖+10<sup>8</sup> CFU/g P-Akk)、MP 组 (40% 葡萄糖+10<sup>9</sup> CFU/g P-Akk)、HP 组 (40% 葡萄糖+10<sup>10</sup> CFU/g P-Akk) 组, 每组 3 个重复, 每桶 20 尾, 养殖 4 周。接种 Akk, 测 OD 值, 计算每天添加到饲料中 3 个浓度 P-Akk 所需的量, 每次投喂前 1 h, 对 P-Akk 进行离心, 无菌磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 重悬后喷洒至基础饲料上, 晾干后进行饲喂, 养殖实验管理同实验 1。

## 1.2 样品采集

不同葡萄糖水平实验开展 4 W 时, 每桶随机选 4 尾鲤, 每组总共 12 尾鲤用 MS-222 麻醉, 测定其体长、体高、体宽和终末重量, 其后尾静脉取血置于 2 mL 离心管中, 室温静置 4 h 后 7 500×g 离心 10 min, 将血清分装后于 -20 °C 保藏备用。解剖分离内脏团, 取出肠道用 PBS 冲洗干净, 剪取 1 cm 左右前肠分别放入 4% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛中, 另取肠道内容物、肝脏和肠道 (前肠、中肠) 置于离心管中, -80 °C 保存; 剩余的鱼继续养殖, 第 8 W 时按照上述操作取样。添加 P-

Akk 实验开展 4 W 取样操作亦同上。

## 1.3 生长指标测定

在养殖 8 W 后, 每组选取 12 尾鲤测量体重、体长、内脏团及肝脏的重量, 以此计算如下生长指标:

存活率 (SR, %) = (终末鱼数/初始鱼数) × 100%;

增重率 (WGR, %) = (末重-初重)/初重 × 100%;

特定生长率 (SGR, %) = Ln(末重/初重)/天 × 100%;

饲料系数 (FCR, %) = 总饲料消耗量/(终末总重-初始总重) × 100%;

肝体比 (HIS, %) = (肝脏重/全鱼重) × 100%;

脏体比 (VSI, %) = (内脏重/全鱼重) × 100%;

肥满度 (CF, g/cm<sup>3</sup>) = (体重/体长<sup>3</sup>) × 100。

## 1.4 肠道组织形态分析

将肠道组织进行脱水、透明之后用自动包埋机进行包埋, 使用切片机进行切片, 厚度为 7 μm。按照试剂盒说明书染色, 封片后使用光学显微镜观察肠道绒毛高度及肌层厚度。

将肠道组织从戊二醛溶液中取出, 使用乙醇

溶液进行梯度脱水, 加入叔丁醇没过组织, 4 °C 放置至叔丁醇凝固, 真空干燥, 喷金处理后在扫描电子显微镜下进行观察、拍照。

### 1.5 GLP-1 含量测定

将 GLP-1a、GLP-1b 蛋白用 CBS 梯度稀释后 4 °C 过夜, 加入封闭液 37 °C 孵育 2 h; PBST 清洗 5 次, 拍干后分别加入 GLP-1a、GLP-1b 抗体稀释液, 37 °C 放置 2 h; PBST 清洗后拍干, 加入抗体稀释液于 37 °C 放置 1 h; 用 PBST 清洗 5 次后拍干, TMB 显色后 37 °C 放置 30 min, 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止显色, 酶标仪 OD<sub>450</sub> 读数, 绘制标准曲线。将血清或者肠道蛋白用 CBS 进行稀释, 其余操作同上。

### 1.6 糖代谢相关基因的检测

将收集好的样品加入 TRIzol 后进行破碎, 并按照试剂盒说明书提取肝脏、肠道组织 RNA, 提取的 RNA 调节好浓度后按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA, 以 cDNA 作为模板, 18S *rRNA* 基因作为内参进行实时荧光定量 PCR。所用引物如表 2 所示, 用公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算基因的 mRNA 相对表达水平。

### 1.7 肠道内容物短链脂肪酸及 Akk 丰度检测

短链脂肪酸 (SCFAs) 的检测 称取肠道内容物置于离心管中, 加入饱和氯化钠溶液混合均匀, 酸化后用涡旋仪处理使样品充分溶解, 加入乙醚振荡 30 s, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 加入无水硫酸钠, 振荡 30 s 后 4 °C、4 500 r/min 离心 3 min, 用 0.22 μm 滤膜过滤后将样品加入到进样瓶中, 使用气相色谱仪检测肠道内容物中短链脂肪酸含量。

Akk 定量分析 Akk 厌氧培养 36 h 后使用稀释涂布平板法计算活菌数。根据已有研究<sup>[21]</sup> 确定 Akk 引物序列如表 3, 并验证其具有特异性。通过构建含 Akk 16S *rRNA* 部分片段的重组质粒, 确定 Akk 实时荧光定量 PCR 标准曲线。按照 QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAamp, 德国) 说明书提取鲤肠道内容物 DNA, 检测 DNA 浓度后 -80 °C 冰箱保存。根据预实验确定每孔 100 ng DNA 的加样量, 按照反应体系和条件进行荧光定量 PCR, 根据标准曲线确定 Akk 丰度。

### 1.8 原代肝脏、肠细胞孵育实验

将鲤麻醉后用 75% 乙醇擦拭鱼体表面, 冰上

解剖后取出肝脏、肠道组织放入预冷的含有 HBSS 的 50 mL 离心管中, 在超净台中将组织转移至无菌培养皿, 挑出血块及结缔组织并将其剪碎后反复冲洗 3~4 次。向 30 mL HBSS 中加入 60 μL EDTA(0.5 mol/L), 轻摇 2~3 min 至肝脏组织蓬松。弃去上清液, 使用 HBSS 清洗肝脏碎片, 每次 3 min, 共 3 次。向 30 mL HBSS 中加入 150 ng 胶原酶 IV 和 400 U Dnase II (肠道组织用胶原酶 I、IV 处理), 密封后于 28 °C 水浴锅中均匀摇晃 25 min。消化完毕后, 用巴氏吸管反复吹打组织 30~40 次, 使用细胞筛 (200 目) 过滤后转移至 50 mL 离心管中, 离心后弃去上层 HBSS。加入预冷的 DMEM 培养基, 密封后离心。弃去上层液体, 用 DMEM 培养基 (含 10% FBS) 重悬细胞, 取等量台盼蓝及细胞悬液进行混合, 于倒置显微镜下计算细胞数量, 每孔细胞培养板接种约 10<sup>5</sup> 个细胞, 28 °C 生化培养箱过夜培养。第 2 天将培养基更换为无血清的 DMEM 培养基, 1 h 后进行后续处理。

使用不同浓度的 P-Akk (0、10<sup>8</sup>、10<sup>9</sup>、10<sup>10</sup> 个/mL, 分别记为 P0、P8、P9、P10) 孵育原代细胞 ( $n=6$ )。1、3 h 和 6 h 后吸弃培养基, 更换为 TRIzol 或 RIPA 以便收集细胞裂解液, -80 °C 冰箱保存直至提取 RNA, 方法同“糖代谢相关基因的检测”。

### 1.9 数据处理与分析

本实验中所有数据均使用 PASW Statistics 18.0 软件进行, 组间差异的计算采用单因素方差分析 (ANOVA)。相关基因的表达用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算。使用 GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., 美国) 作图, 所有数据均以平均值±标准误差 (Mean±SEM) 表示,  $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同糖水平对鲤生长性能的影响

不同葡萄糖水平饲喂 8 周后鲤的末重相对于 C 组均显著升高, 但各组间增重率、特定生长率及饲料转化率无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。与 C 组相比, L 组、M 组的肥满度显著升高, H 组有升高的趋势, 但未达到显著水平 ( $P > 0.05$ )。高糖饲喂后鲤的肝体比、脏体比相对于 C 组有所增加, 但仅在 M 组中达到显著水平 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物

Tab. 2 Real-time PCR primers

基因 genes	引物序列(5'-3') primer sequences (5'-3')	登录号 accession no.
葡萄糖激酶 <i>gk</i>	F: TGGAGTACGACCGTGTATTG R: CGCAAGCTCTCCCATATACTT	AF053332.2
磷酸果糖激酶 <i>pfk</i>	F: CGTTCGACAGGAATTTTGGC R: TTCATGCCGATCACACAAGC	XM_019074709.1
葡萄糖-6-磷酸酶 <i>g6pase</i>	F: GAGCCCTTCAACAGACAGAAA R: GAGCTTTGAGAAGCAGGTACAA	AF427863.1
磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 <i>pepck</i>	F: ACTCTTTGGGCAGACCTTTAC R: CTGTCTGGTGTCTAGGAAGATG	KP250869.1
糖原合成酶 <i>gys</i>	F: TTTTGGCCGCTGGTTGATTG R: ATAGGGTAGTCCAATGCTGCAC	XM_019090903.1
糖原磷酸化酶 <i>pygl</i>	F: TGGTTGACGACGATGCTTTC R: ACTGCGCAAATTCAGCTTG	LHQP01019294.1
黏糖蛋白2 <i>muc2</i>	F: ATTGGCATTGAGTTCACCGAG R: GACAGTGATGCCCATTTTGGGA	XM_019126656.1
腺苷酸活化蛋白激酶1 <i>ampk1</i>	F: GACGAGAAGTTGAGTGACAC R: TTCATAATGCGCCGGTTGTC	XM_042756316.1
腺苷酸活化蛋白激酶2 <i>ampk2</i>	F: AAATGTGTGCCAGCCTCATC R: ATGTTTGTGGCGCTACTGTG	XM_042746433.1
蛋白激酶B <i>akt</i>	F: ACTGTTATTGAGCGCACCTT R: TCCATTGGCTCCTCCTCTTC	XM_042774924.1
磷脂酰肌醇-3-激酶 <i>pi3k</i>	F: GAAGATGACGACTGGAGAG R: GCCTGTAGTGACTGATGAG	XM_042758407.1
G蛋白偶联受体40-g31 <i>gpr40-g31</i>	F: GCATCCAATCGCACAACA R: ACTGAAGACTGGAGTAATGATG	LN599998.1
G蛋白偶联受体40-g32 <i>gpr40-g32</i>	F: AACTGTGTTTCTGTATCGGA R: GCATGAAGCCATGACATAAC	LN590800.1
G蛋白偶联受体40-g34 <i>gpr40-g34</i>	F: TCTTTTCTTACAGAGTGTTCGTG R: GATACATACGCTGGCAGATTAT	LN594584.1
G蛋白偶联受体40-g13-1 <i>gpr40-g13-1</i>	F: CTGCTGTTTCGGTTCCTCT R: ACCTCTCAGAAAGTCAATGC	LN590683.1
G蛋白偶联受体40-g48-1 <i>gpr40-g48-1</i>	F: GAGTGTAGGCTTACTTCCG R: ATAAGTGAATAAATGTATCAATCCTTA	LN592880.1
G蛋白偶联受体40-g48-4 <i>gpr40-g48-4</i>	F: TGATCTTTCAAAAATAAAGGTTCTT R: GCTGTGAATCCCCCTCA	LN590703.1
嗜黏蛋白阿克曼菌 <i>Akk</i>	F: CAGCACGTGAAGGTGGGGAC R: CCTGCGGTTGGCTTCAGAT	NR_074436.1
18S rRNA	F: GAGACTCCGGCTTGCTAAAT R: CAGACCTGTTATTGCTCCATCT	FJ710826.1

## 2.2 饲料中不同葡萄糖水平对 GLP-1 含量、Akk 丰度的影响

与 20% 葡萄糖添加组相比, 高糖饲料显著降低鲤血清中 GLP-1b 含量, GLP-1a 无显著性变化 ( $P > 0.05$ )。4W 时, 高糖饲料显著降低鲤肠道中

GLP-1a 含量, GLP-1b 在 L 组、M 组显著降低 ( $P < 0.05$ )。8W 时, L 组中 GLP-1a 的含量显著降低, GLP-1b 在各组间无显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (图 1)。

随着葡萄糖添加水平升高, 4 W 时肠道内容物中 Akk 丰度逐渐降低, 并在 M 组及 H 组达到

表 3 不同糖水平饲喂对鲤生长指标的影响

Tab. 3 Effects of different sugar levels on *C. carpio* growth indexes

生长指标 growth index	组别 groups			
	C	L	M	H
初重/g IBW	10.32±0.24	10.17±0.16	10.19±0.37	9.67±0.16
末重/g FBW	27.98±4.09 <sup>a</sup>	33.96±4.64 <sup>b</sup>	36.94±6.16 <sup>b</sup>	33.13±3.83 <sup>b</sup>
增重率/% WGR	179.37±19.88	217.72±29.97	229.99±53.29	230.36±50.01
特定增长率/(%/d) SGR	1.83±0.13	2.06±0.16	2.12±0.30	2.12±0.26
存活率/% SR	88.89±19.24	97.78±1.92	96.67±3.34	97.78±1.92
饲料转化率 FCR	1.75±0.18	1.46±0.18	1.45±0.34	1.44±0.27
肥满度/(g/cm <sup>3</sup> ) CF	2.41±0.16 <sup>a</sup>	2.61±0.13 <sup>b</sup>	2.57±0.14 <sup>b</sup>	2.51±0.09 <sup>ab</sup>
脏体比/% VSI	9.05±0.75 <sup>a</sup>	9.27±1.37 <sup>ab</sup>	10.41±2.00 <sup>b</sup>	9.39±1.63 <sup>ab</sup>
肝体比/% HIS	2.48±0.36 <sup>a</sup>	2.75±0.61 <sup>ab</sup>	3.17±0.92 <sup>b</sup>	2.67±0.64 <sup>ab</sup>

注: 表中数据为平均值±标准差(n=12), 不同小写字母表示差异显著(P < 0.05), 字母相同或未标字母表示差异不显著(P > 0.05), 下同。  
Notes: The values are the mean ± SD (n=12). Different letters in the values indicate significant difference (P < 0.05), and the same or unmarked letters mean no significant difference (P > 0.05), the same below.

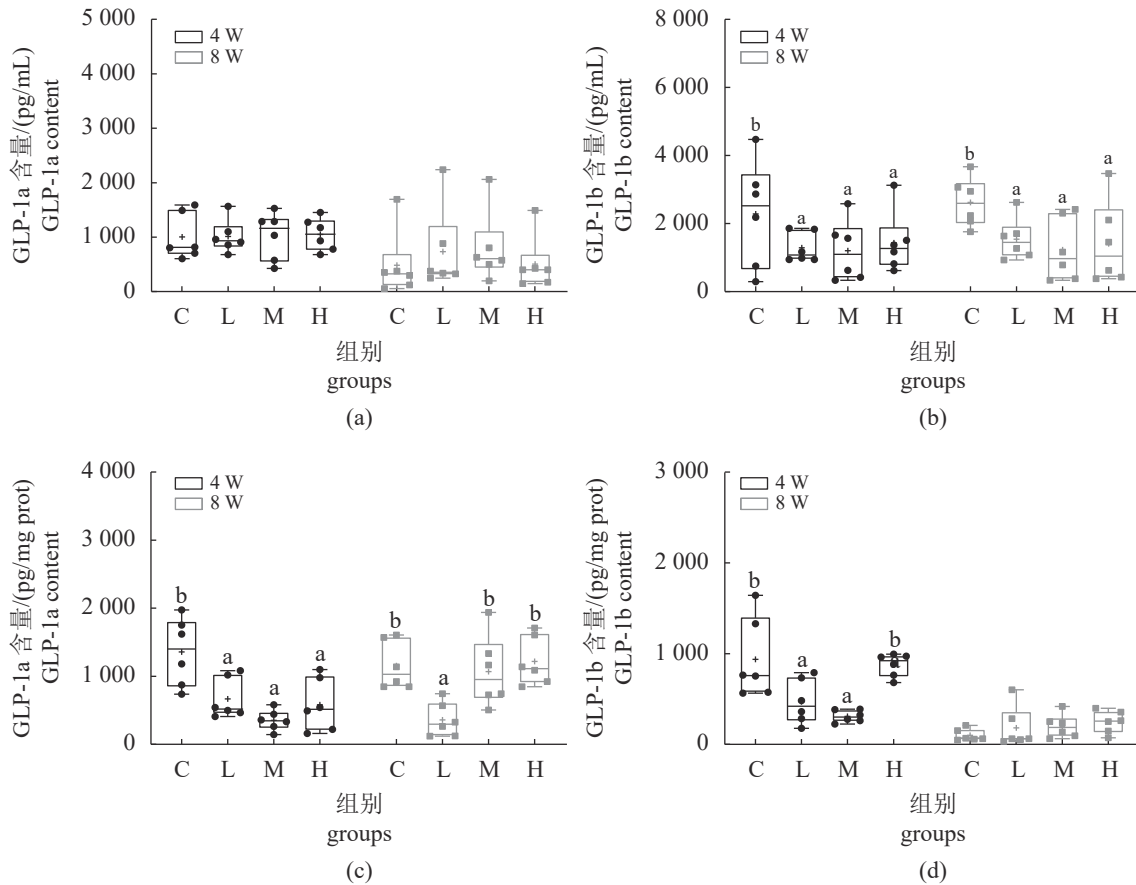


图 1 不同糖水平对鲤血清 (a) (b) 和肠道 (c) (d)GLP-1 含量的影响

C. 20% 葡萄糖组, L. 30% 葡萄糖组, M. 40% 葡萄糖组, H. 50% 葡萄糖组, 下同。

Fig. 1 Effects of different glucose levels on GLP-1 content in serum (a) (b) and intestine (c) (d) of *C. carpio*

C. 20% glucose group, L. 30% glucose, M. 40% glucose, H. 50% glucose, the same below.

显著水平, 但 8 W 后各组之间已无显著性差异 ( $P > 0.05$ )(图 2)。

### 2.3 P-Akk 对鲤血清生化指标及肠道组织形态的影响

添加 P-Akk 后检测鲤血清中葡萄糖、TG、ALT 及 AST 含量, 结果显示, 相较于对照组, 添加 P-Akk 后血清中葡萄糖浓度显著降低 ( $P < 0.05$ ), TG 含量在 LP 组、MP 组显著降低 ( $P < 0.05$ ), ALT、AST 相较于 NC 组无显著性差异 ( $P > 0.05$ )(图 3)。

肠道组织扫描电镜及 AB-PAS 染色结果显示, 绒毛上黏蛋白被染成紫色。NC 组肠绒毛破裂, 微绒毛稀释, 肠道损伤严重, 添加 P-Akk 恢复高糖饲料诱导的肠道损伤, 且 MP 组肠绒毛较为完整, 破裂情况明显减少, 肠绒毛上黏蛋白大量增多;

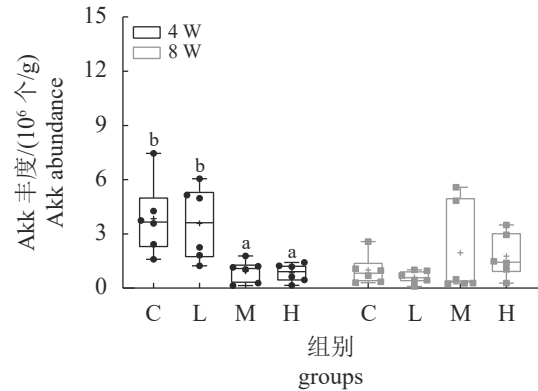


图 2 不同糖水平对鲤肠道内容物中 Akk 丰度的影响

Fig. 2 Effects of different glucose levels on the abundance of Akk in intestinal contents of *C. carpio*

此外, LP 组和 HP 组绒毛高度显著高于 NC 组, MP 组和 HP 组肌层厚度显著变厚 ( $P < 0.05$ )(图 4)。

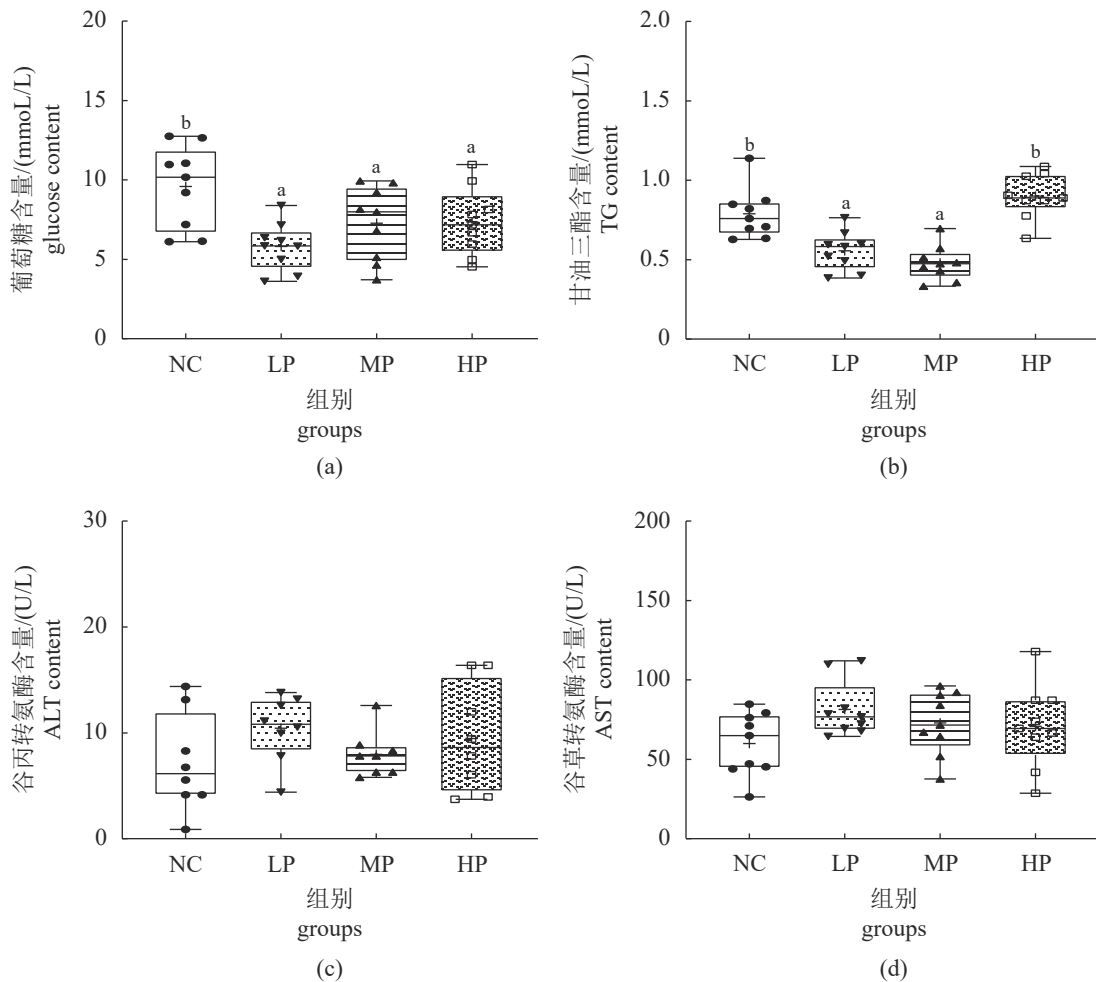


图 3 不同浓度 P-Akk 对鲤血清生化指标的影响

NC. 40% 葡萄糖, LP. 40% 葡萄糖+ $10^8$  CFU/g P-Akk, MP. 40% 葡萄糖+ $10^9$  CFU/g P-Akk, HP. 40% 葡萄糖+ $10^{10}$  CFU/g P-Akk, 下同。

Fig. 3 Effects of different P-Akk levels on serum biochemical indexes of *Cyprinus carpio*

NC. 40% glucose, LP. 40% glucose +  $10^8$  CFU/g P-Akk, MP. 40% glucose +  $10^9$  CFU/g P-Akk, HP. 40% glucose +  $10^{10}$  CFU/g P-Akk, the same below.

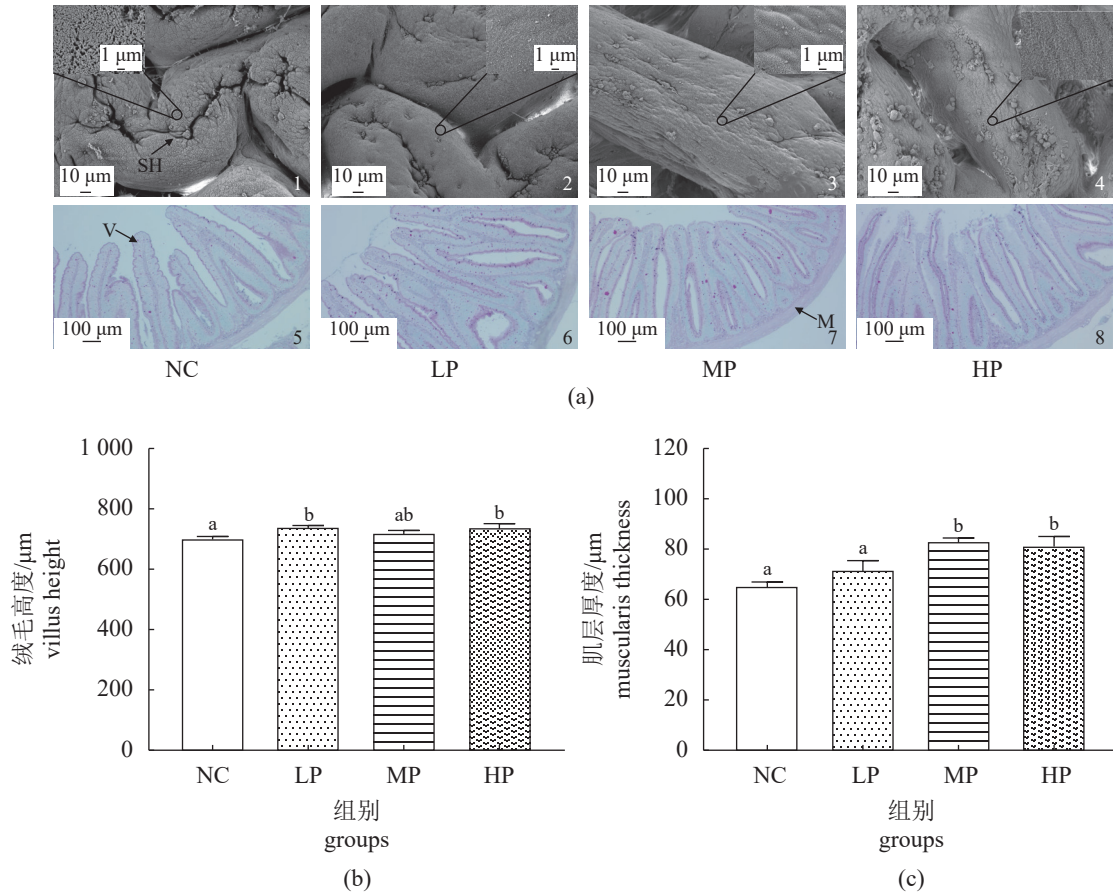


图 4 不同浓度 P-Akk 对鲤前肠组织形态的影响

(a) 1~4. 扫描电镜观察, 5~8. AB-PAS 染色; SH. 实验损伤, V. 肠绒毛, M. 肌层。

Fig. 4 Effects of different P-Akk levels on the intestine morphology of *C. carpio*

(a) 1-4. scanning electron microscope observation; 5-8. AB-PAS staining; SH. experimental damage, V. villus, M. muscularis.

## 2.4 P-Akk 对鲤 GLP-1 及糖代谢相关基因表达量的影响

饲喂 P-Akk 后相较于对照组, 鲤血清中 GLP-1a 无显著性变化, GLP-1b 含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。P-Akk 显著降低肠道组织中 GLP-1a、GLP-1b 的含量 ( $P < 0.05$ )。不同浓度的 P-Akk 处理原代肠细胞 1 h 后 GLP-1a 含量无显著性差异, GLP-1b 在 P10 组显著降低 ( $P < 0.05$ )。3 h 后, GLP-1a、GLP-1b 在 P9 组、P10 组显著降低 ( $P < 0.05$ )。P-Akk 处理 6 h 后, GLP-1a 含量无显著变化, GLP-1b 含量相对于 P0 组显著降低 ( $P < 0.05$ ) (图 5)。

P-Akk 处理显著升高 *pi3k* 的 mRNA 表达量, *pfk*、*ampk1* 的 mRNA 表达水平在 MP 组显著升高, *gk* 的 mRNA 表达量在 MP 组、HP 组显著升高, *pepck* mRNA 表达水平在 MP 组显著降低 ( $P < 0.05$ ) (图 6)。

原代肝细胞孵育结果显示, P-Akk 处理后 *gk*、

*pfk*、*gys* mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。P-Akk 处理 3 h 后, *pi3k* 的 mRNA 表达量在高浓度组显著升高, 6 h 时, *ampk2* 在 P8 组、P9 组显著升高, 其他基因无显著变化 ( $P > 0.05$ ) (图 7)。

添加 P-Akk 后 *muc2* mRNA 表达水平逐渐升高, 并在 MP 组、HP 组达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。肠细胞孵育实验结果显示, P-Akk 显著升高黏蛋白 *muc2* mRNA 表达水平, 但 6 h 时各组间已无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图 8)。

## 2.5 P-Akk 对鲤 SCFAs 及其受体的影响

P-Akk 处理后肠道内容物中乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、戊酸、异戊酸及总 SCFAs 含量相较于对照组都升高, 并在 MP 组达到显著水平 ( $P < 0.05$ ) (图 9)。

添加 P-Akk 后相对对照组, *gpr40* 的 mRNA 表达量升高, 其中 *g32* 在 MP 组、HP 组显著升高, *g34*、*g48-1*、*g48-4* 的 mRNA 表达量在 MP 组显著



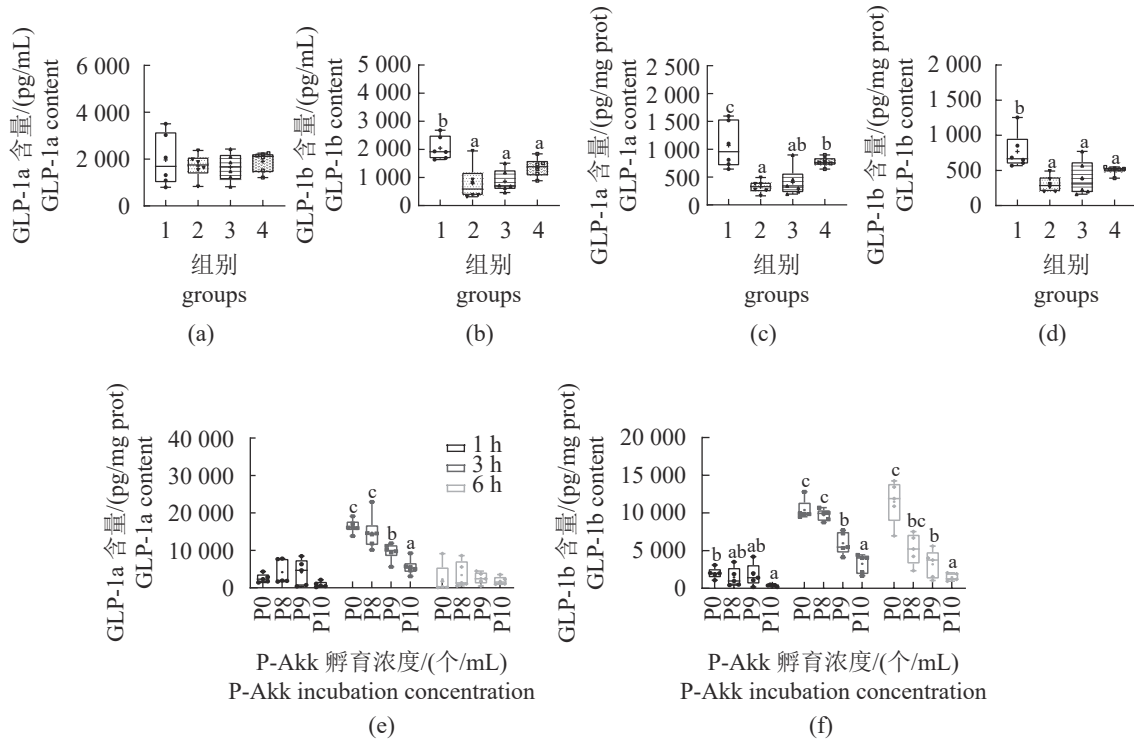


图 5 不同浓度 P-Akk 对鲤血清 (a) (b) 和肠道 (c) (d) 和肠细胞 (e) (f) 中 GLP-1 含量的影响

1. NC, 2. LP, 3. MP, 4. HP; P0. 0 个/mL P-Akk, P8. 10<sup>8</sup> 个/mL P-Akk, P9. 10<sup>9</sup> 个/mL P-Akk, P10. 10<sup>10</sup> 个/mL P-Akk, 下同。

Fig. 5 Effects of different P-Akk levels on GLP-1 content in the serum (a) (b), intestine (c) (d) and intestinal cells (e) (f) of *C. carpio*

1. NC, 2. LP, 3. MP, 4. HP; P0. 0 ind/mL P-Akk, P8. 10<sup>8</sup> ind/mL P-Akk, P9. 10<sup>9</sup> ind/mL P-Akk, P10. 10<sup>10</sup> ind/mL P-Akk, the same below.

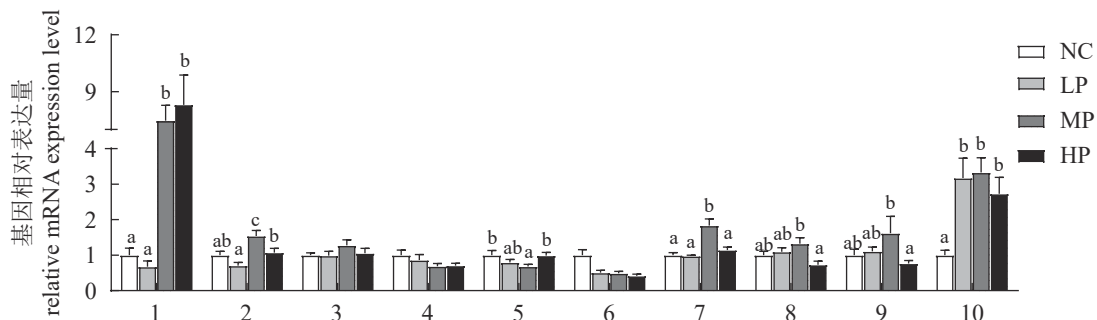


图 6 不同浓度 P-Akk 对鲤肝脏糖代谢相关基因表达的影响

Fig. 6 Effects of different P-Akk levels on the expression of glucose metabolism related genes in liver of *C. carpio*

1. *gk*, 2. *pfk*, 3. *gys*, 4. *g6pase*, 5. *pepck*, 6. *pygl*, 7. *ampk1*, 8. *ampk2*, 9. *akt*, 10. *pi3k*.

升高 ( $P < 0.05$ )。原代肠细胞再次证明 P-Akk 显著升高 *g34*、*g48-1*、*g13* 的 mRNA 表达水平 ( $P < 0.05$ ) (图 10)。

### 3 讨论

碳水化合物作为自然界常见的能源物质添加到饲料中可以起到节约蛋白质、降低成本的作用, 但不同环境、食性的鱼类对碳水化合物的利用能

力不同, 饲料中糖类过高或过低均会导致肠道菌群紊乱, 对鱼体产生不利影响, 如降低生长性能<sup>[22]</sup>、诱导肝脏和肠道损伤等。鲤作为杂食性鱼类对糖类物质的耐受能力相对于其他食性的鱼类较高, 但是这种能力不足以使鲤完全消化饲料中的糖类物质。摄入高糖后鱼体血糖含量随饲料中糖水平的升高而持续上升<sup>[23]</sup>, 诱导肝脏、肠道损伤, 肠道菌群紊乱<sup>[24]</sup>, 长期高糖毒性使得活性氧及炎性介质增加, 进而损伤肠道 L 细胞, 导致

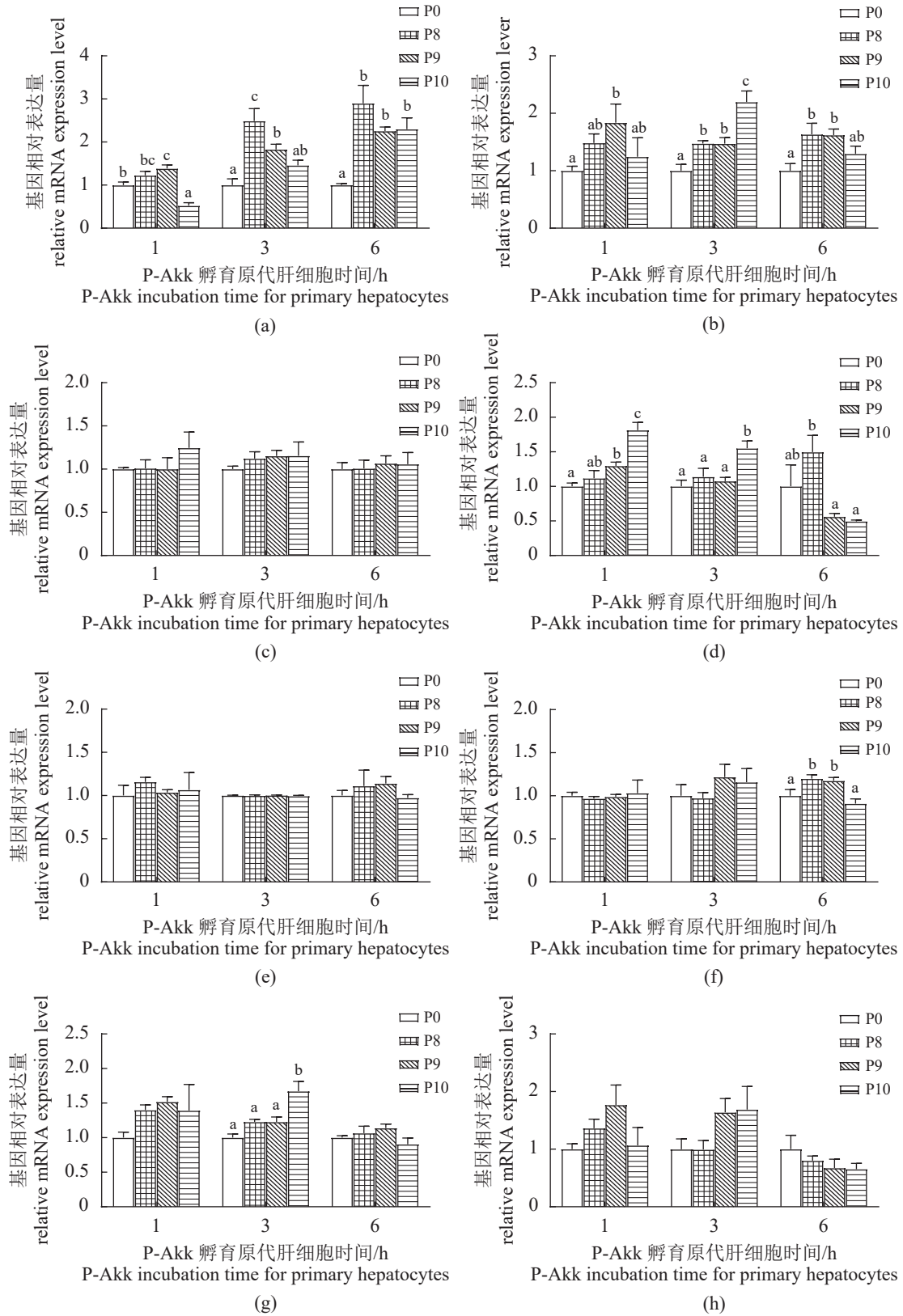


图 7 不同浓度 P-Akk 对鲤原代肝细胞糖代谢相关基因表达的影响

Fig. 7 Effects of different P-Akk levels on the expression of glucose metabolism related genes in primary hepatocytes cells of *C. carpio*

(a) *gk*, (b) *pfk*, (c) *pepck*, (d) *gys*, (e) *ampk1*, (f) *ampk2*, (g) *pi3k*, (h) *akt*.

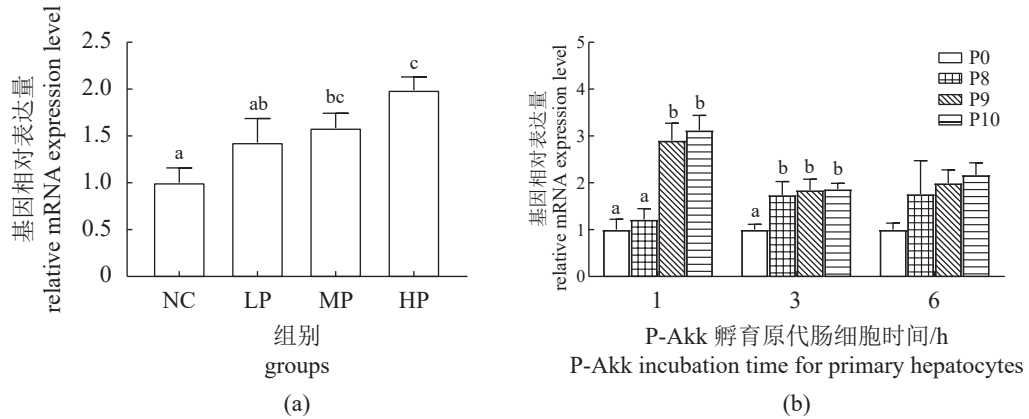


图 8 不同浓度 P-Akk 对鲤肠道 (a) 和肠细胞 (b) *muc2* mRNA 表达的影响

Fig. 8 Effects of different P-Akk levels on the *muc2* mRNA expression in intestine (a) and intestinal cells (b) of *C. carpio*

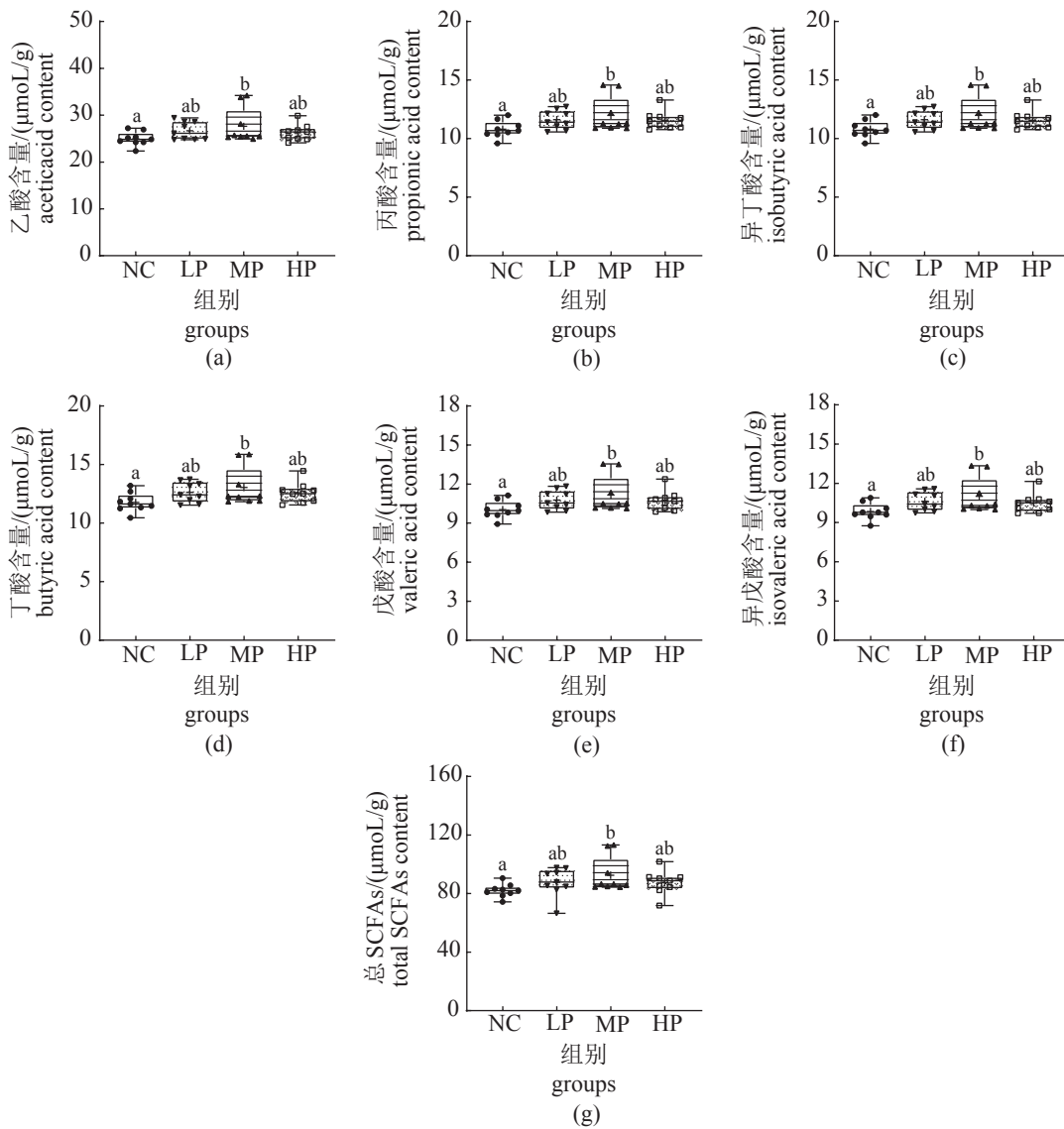


图 9 不同浓度 P-Akk 对鲤肠道内容物中短链脂肪酸含量的影响

Fig. 9 Effects of different P-Akk levels on the content of short chain fatty acids in the intestine of *C. carpio*

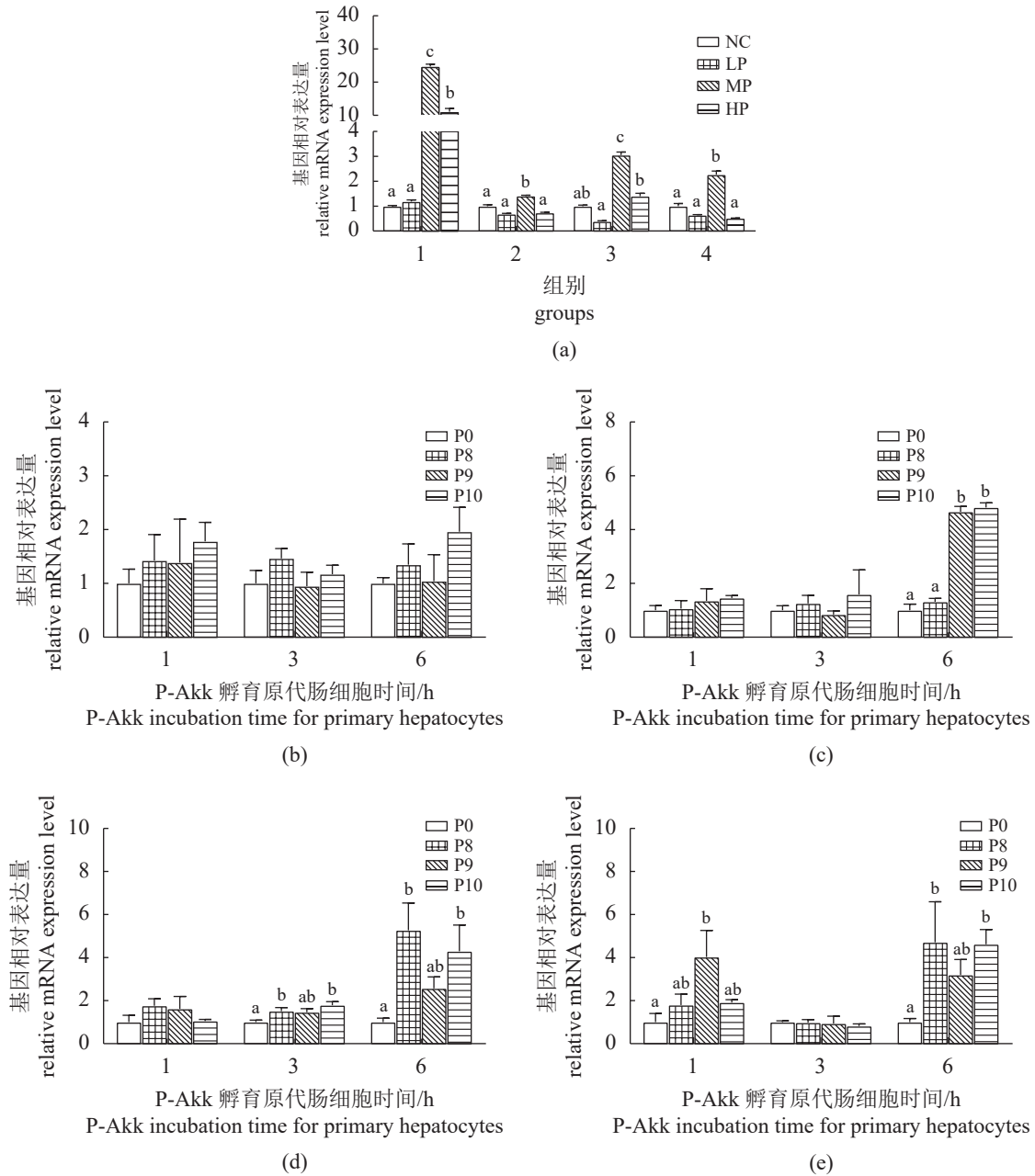


图 10 不同浓度 P-Akk 对鲤肠道 (a) 和肠细胞 (b) (c) (d) (e) *gpr40* mRNA 表达的影响

Fig. 10 Effects of different P-Akk levels on the *gpr40* mRNA expression in the intestine (a) and intestinal cells (b) (c) (d) (e) of *C. carpio*

(a) 1. *gpr40-g32*, 2. *gpr40-g34*, 3. *gpr40-g48-1*, 4. *gpr40-g48-4*; (b) *gpr40-g31*; (c) *gpr40-g34*; (d) *gpr40-g48-1*; (e) *gpr40-g13-1*.

GLP-1 分泌缺陷, 具体表现为 GLP-1 分泌减少、肠道炎症反应、肠道菌群失调、胰岛素抵抗等<sup>[25]</sup>。本研究发现, 高糖饲料显著增加鲤的末重、肝体比、脏体比和肥满度, 且 40% 的葡萄糖添加组效果较为显著, 与大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 和点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 的研究结果类似<sup>[26]</sup>。此外, 随着葡萄糖添加水平升高, 血清及肠道中 GLP-1a、GLP-1b 含量降低, 表明高糖饲料抑制肠

道组织中 GLP-1 分泌, 推测 GLP-1 具有升血糖的作用, 但具体作用机制尚不清楚。

肠道微生物与宿主之间相互影响, 具有营养、防御和免疫调节等生理功能, 能够促进机体生长发育<sup>[27]</sup>。Akk 作为二代益生菌, 其丰度与机体代谢疾病相关, 在各种肥胖或其他代谢紊乱的小鼠模型中显著减少, 具体表现为瘦素缺陷型<sup>[18]</sup>、高脂饲料饲喂<sup>[28]</sup>、T2DM 小鼠等, 添加 Akk 或巴氏

灭活的 Akk 能够改善肥胖、胰岛素抵抗、肝脏脂肪变性等代谢综合征<sup>[15]</sup>, 调节高脂、高糖饮食引起的代谢紊乱, 且  $10^9$  CFU/mL 的 Akk 灭活后效果相对更好<sup>[29-30]</sup>。本研究发现, 高糖饲料显著降低鲤肠道内容物中厌氧菌 Akk 丰度, 用 P-Akk 处理后鲤血清中葡萄糖、TG 含量显著降低, 肝脏糖酵解基因 mRNA 表达水平显著升高、糖异生基因 mRNA 表达量显著降低, 表明 P-Akk 通过调控糖代谢相关酶活力及基因表达调控机体糖代谢过程, 降低血糖含量, 即 P-Akk 同 Akk 一样能够调节糖、脂代谢, 缓解高糖饲料引起的代谢紊乱<sup>[31]</sup>。Dan 等<sup>[32]</sup> 研究发现, 肠绒毛密度、高度和肌层厚度对增加食糜接触面积、促进消化吸收至关重要, 随饲料中碳水化合物水平的升高而降低, 目前, 关于不同糖类及糖水平对鱼类肠道健康的影响已有报道, 对高体大鳞鲃 (*Tarphops oligolepis*) 的研究发现, 添加适宜水平的水苏糖使得远端小肠褶皱增多, 绒毛高度增加, 表明适宜的水苏糖促进肠道对营养物质的吸收, 维护肠道健康<sup>[33]</sup>。肠道组织形态观察结果显示高糖饲料导致鲤肠绒毛破裂, 微绒毛稀疏, 肌层厚度显著变薄, 表明高糖饲料破坏鲤肠道黏膜屏障, 降低肠道对营养物质的吸收能力, 导致肠道损伤, 而 P-Akk 处理后肠绒毛高度和肌层厚度显著增加, 肠道损伤情况明显改善, 表明 P-Akk 缓解高糖饲料诱导的肠道损伤, 促进糖类物质消化吸收。肠绒毛之间分布大量杯状细胞, 能够合成并分泌黏蛋白, 使黏液层增厚, 增强肠道屏障功能, 保护肠道健康<sup>[34]</sup>。黏蛋白具有聚糖、结合水的能力, 能够孵育黏液保持潮湿和润滑, 保护肠上皮细胞免于脱水和机械应力, 形成肠道黏膜保护屏障<sup>[35]</sup>。同时, 黏蛋白还能够为 Akk 等细菌的生长供能, 促使其在肠道中定植。Akk 是一种能够分解利用黏蛋白作为营养物质的黏液降解菌, Akk 分解黏蛋白产生乙酸、丙酸等短链脂肪酸, 又可以诱导黏蛋白的分泌<sup>[36]</sup>。本研究发现, P-Akk 处理后黏蛋白数量增多, *muc2* 的 mRNA 表达水平显著升高, SCFAs 含量增加, *gpr40* mRNA 表达量升高, 推测 P-Akk 促进包括 Akk 在内的产 SCFAs 菌在肠道中的定植, 且  $10^9$  CFU/g 效果较为显著。

Akk 代谢产生乙酸、丙酸等短链脂肪酸, 进而通过 G 蛋白偶联受体 (GPR) 影响肠道上皮 L 细胞分泌 GLP-1, GLP-1 是一种强效肠促激素, 能够调控胰岛  $\beta$  细胞分泌胰岛素, 在调节葡萄糖稳

态中具有重要作用<sup>[37]</sup>。哺乳动物和硬骨鱼类由不同的代谢途径调控, 其中几种主要激素的功能存在差异, 尤其是胰岛素和 GLP-1<sup>[38]</sup>。在哺乳动物中, GLP-1 通过抑制胰岛  $\alpha$  细胞分泌胰高血糖素, 同时刺激胰岛  $\beta$  细胞分泌胰岛素, 以达到降低血糖的目的<sup>[39]</sup>。在鱼类中, GLP-1 对葡萄糖的调控作用类似胰高血糖素, 促进糖质新生和肝糖原降解<sup>[40]</sup>, 升高血糖含量。本研究发现随着葡萄糖添加水平升高, 血清及肠道中 GLP-1a、GLP-1b 含量降低, GLP-1a、GLP-1b 与受体结合后激活 AMPK、PI3K/AKT 信号通路, 调节糖代谢相关酶活力及基因表达, 促进肝脏糖异生、抑制糖酵解, 升高鲤血糖含量。养殖实验及细胞实验发现 P-Akk 处理后 GLP-1a、GLP-1b 含量减少, 同时伴随血糖含量的降低, 结合糖代谢基因检测结果, 推测 P-Akk 影响 GLP-1 分泌, 激活下游信号通路, 如 AMPK、PI3K/AKT, 调控机体糖代谢, 与 Everard 等<sup>[18]</sup> 的研究结果一致。

目前, 添加益生菌已经成为促进水产养殖业绿色发展的重要战略手段, Akk 作为二代益生菌具有良好发展前景。近年来, 关于 Akk 的研究多集中在人类及哺乳动物上, Akk 在鱼类中的作用机制研究还需要不懈努力。本实验室前期研究发现 Akk 能够调控肠道中 GLP-1 分泌, 本研究进一步证实饲料中添加 P-Akk 的确可以通过介导 GLP-1 分泌调控鲤糖代谢。这一结果可为 P-Akk 调控鲤糖代谢提供理论依据, 解决了活菌添加不易的难题, 且安全性有保障, 更有希望广泛使用。

## 4 结论

综上, 鲤自身具有一定糖代谢调节能力, 通过肝脏糖酵解及糖异生途径抵抗高糖饲料引起的血糖升高, 但糖类水平过高会诱导鲤血糖升高, 造成肝脏、肠道损伤。外源添加 P-Akk 能够增加鲤肠道内容物中短链脂肪酸含量, 抑制肠道分泌 GLP-1, 缓解高糖饲料引起的血糖升高, 维持葡萄糖稳态。该研究结果可为 Akk 作为益生菌在水产饲料中的应用提供理论基础和实践依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

## 参考文献 (References):

- [1] Shi X, Luo Z, Chen G H, *et al.* Replacement of fishmeal by a mixture of soybean meal and *Chlorella* meal in

- practical diets for juvenile crucian carp, *Carassius auratus*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2017, 48(5): 770-781.
- [ 2 ] Wang T, Zhang N, Yu X B, *et al.* Inulin alleviates adverse metabolic syndrome and regulates intestinal microbiota composition in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with high-carbohydrate diet[J]. *British Journal of Nutrition*, 2021, 126(2): 161-171.
- [ 3 ] WILSON R. Utilization of dietary carbohydrate by fish[J]. *Aquaculture*, 1994, 124(1-4): 67-80.
- [ 4 ] Shiau S Y, Peng C Y. Protein-sparing effect by carbohydrates in diets for tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*[J]. *Aquaculture*, 1993, 117(3-4): 327-334.
- [ 5 ] Polakof S, Panserat S, Soengas J L, *et al.* Glucose metabolism in fish: a review[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2012, 182(8): 1015-1045.
- [ 6 ] Hemre G I, Mommsen T P, Krogdahl Å. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2002, 8(3): 175-194.
- [ 7 ] Liu T F, Li J, Liu Y X, *et al.* Short-chain fatty acids suppress lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through inhibition of NF-κB pathway in RAW264.7 cells[J]. *Inflammation*, 2012, 35(5): 1676-1684.
- [ 8 ] Zhang Y M, Xie S W, Wei H L, *et al.* High dietary starch impaired growth performance, liver histology and hepatic glucose metabolism of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2020, 26(4): 1083-1095.
- [ 9 ] Kaska L, Sledzinski T, Chomiczewska A, *et al.* Improved glucose metabolism following bariatric surgery is associated with increased circulating bile acid concentrations and remodeling of the gut microbiome[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 22(39): 8698-8719.
- [10] Qin J J, Li Y R, Cai Z M, *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes[J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 55-60.
- [11] Cani P D, Bibiloni R, Knauf C, *et al.* Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice[J]. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1470-1481.
- [12] Kalia V C, Gong C J, Shanmugam R, *et al.* The emerging biotherapeutic agent: *Akkermansia*[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2022, 62(1): 1-10.
- [13] Ouyang J, Lin J, Isnard S, *et al.* The bacterium *Akkermansia muciniphila*: a sentinel for gut permeability and its relevance to HIV-related inflammation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 645.
- [14] Zhang T, Ji X H, Lu G C, *et al.* The potential of *Akkermansia muciniphila* in inflammatory bowel disease[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(14-15): 5785-5794.
- [15] Luo Z C, Xu W C, Yuan T J, *et al.* *Platycodon grandiflorus* root extract activates hepatic PI3K/PIP3/Akt insulin signaling by enriching gut *Akkermansia muciniphila* in high fat diet fed mice[J]. *Phytomedicine*, 2023, 109: 154595.
- [16] Zhang X Y, Shen D Q, Fang Z W, *et al.* Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): E71108.
- [17] Mithieux G. Does *Akkermansia muciniphila* play a role in type 1 diabetes?[J]. *Gut*, 2018, 67(8): 1373-1374.
- [18] Everard A, Belzer C, Geurts L, *et al.* Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(22): 9066-9071.
- [19] Depommier C, Everard A, Druart C, *et al.* Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(7): 1096-1103.
- [20] Plovier H, Everard A, Druart C, *et al.* A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice[J]. *Nature Medicine*, 2017, 23(1): 107-113.
- [21] Png C W, Lindén S K, Gilshenan K S, *et al.* Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment *in vitro* utilization of mucin by other bacteria[J]. *American Journal of Gastroenterology*, 2010, 105(11): 2420-2428.
- [22] Li S L, Li Z Q, Zhang J C, *et al.* The impacts of dietary carbohydrate levels on growth performance, feed utilization, glycogen accumulation and hepatic glucose metabolism in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *E. lanceolatus*♂)[J]. *Aquaculture*, 2019, 512: 734351.
- [23] Metón I, Caseras A, Fernández F, *et al.* 6-Phosphofructo-

- 2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase gene expression is regulated by diet composition and ration size in liver of gilthead sea bream, *Sparus aurata*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 2000, 1491(1-3): 220-228.
- [24] 汪立平, 马相杰, 冷向军, 等. 甘露寡糖对罗非鱼肠道菌群的影响[J]. 食品工业科技, 2010, 31(10): 142-145.  
Wang L P, Ma X J, Leng X J, *et al.* Effect of mannan oligosaccharides on intestinal microflora of *tilapia*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31(10): 142-145 (in Chinese).
- [25] 徐丹. 2型糖尿病肠道菌群失调和GLP-1研究进展[J]. 新疆中医药, 2018, 36(3): 110.  
Xu D. Research progress on intestinal flora imbalance and GLP-1 in type 2 diabetes[J]. *Xinjiang Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 36(3): 110 (in Chinese).
- [26] Li X Y, Wang J T, Han T, *et al.* Effects of dietary carbohydrate level on growth and body composition of juvenile giant croaker *Nibea japonica*[J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(12): 2851-2858.
- [27] Wong S, Rawls J F. Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(13): 3100-3102.
- [28] Nobel Y R, Cox L M, Kirigin F F, *et al.* Metabolic and metagenomic outcomes from early-life pulsed antibiotic treatment[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7486.
- [29] Shahriary A, Hoseini-Tavassol Z, Soroush A R, *et al.* Comparing the effects of live and pasteurized *Akkermansia muciniphila* on management of obesity and diabetes[J]. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 2021, 30(193): 71-83.
- [30] Depommier C, Van Hul M, Everard A, *et al.* Pasteurized *Akkermansia muciniphila* increases whole-body energy expenditure and fecal energy excretion in diet-induced obese mice[J]. *Gut Microbes*, 2020, 11(5): 1231-1245.
- [31] Lawenius L, Scheffler J M, Gustafsson K L, *et al.* Pasteurized *Akkermansia muciniphila* protects from fat mass gain but not from bone loss[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2020, 318(4): E480-E491.
- [32] Dan Z J, Zhang W C, Zheng J C, *et al.* Effects of fish-meal substitution by  $\alpha$ -galactosidase hydrolytic soybean meal (EhSBM) on growth, antioxidant capacity, inflammatory responses and intestinal health of turbot juveniles (*Scophthalmus maximus* L. ) [J]. *Aquaculture*, 2023, 563: 738927.
- [33] Hu H B, Zhang Y J, Mai K, *et al.* Effects of dietary stachyose on growth performance, digestive enzyme activities and intestinal morphology of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2015, 14(5): 905-912.
- [34] Johansson M E V, Hansson G C. Mucus and the goblet cell[J]. *Digestive Diseases*, 2013, 31(3-4): 305-309.
- [35] Bansil R, Turner B S. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2006, 11(2-3): 164-170.
- [36] Ottman N, Geerlings S Y, Aalvink S, *et al.* Action and function of *Akkermansia muciniphila* in microbiome ecology, health and disease[J]. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2017, 31(6): 637-642.
- [37] Liu Z Y, Habener J F. Glucagon-like peptide-1 activation of TCF7L2-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta cell proliferation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(13): 8723-8735.
- [38] Plisetskaya E M, Mommensen T P. Glucagon and glucagon-like peptides in fishes[J]. *International Review of Cytology*, 1996, 168: 187-257.
- [39] Suga T, Kikuchi O, Kobayashi M, *et al.* SGLT1 in pancreatic  $\alpha$  cells regulates glucagon secretion in mice, possibly explaining the distinct effects of SGLT2 inhibitors on plasma glucagon levels[J]. *Molecular Metabolism*, 2019, 19: 1-12.
- [40] Mojsov S. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and the control of glucose metabolism in mammals and teleost fish[J]. *American Zoologist*, 2000, 40(2): 246-258.

## The regulation mechanism of *Akkermansia muciniphila* on glucose metabolism of the *Cyprinus carpio*

WANG Yawei<sup>1</sup>, HUANG Zhenyi<sup>1</sup>, YANG Boya<sup>1</sup>, YOU Fu<sup>1</sup>, ZHANG Xindang<sup>1,2</sup>,  
YANG Guokun<sup>1,2</sup>, CHANG Xulu<sup>1,2</sup>, FENG Shikun<sup>1,2</sup>, MENG Xiaolin<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** Currently, the majority of studies investigating the effects of *Akkermansia muciniphila* primarily focus on blood glucose homeostasis, adipose tissue accumulation, intestinal permeability, and body weight regulation. However, these studies are predominantly limited to human and mammalian subjects. The specific mechanism by which *A. muciniphila* regulates glucose metabolism in fish remains unclear. So we investigate the molecular mechanism of pasteurized *A. muciniphila* regulating glucose metabolism in *Cyprinus carpio*. In this study, different sugar concentrations (20%, 30%, 40%, 50% glucose) were examined to investigate the temporal and spatial variations in glucagon-like peptide-1 secretion and *A. muciniphila* colonization at 4 and 8 weeks of *C. carpio* (10.5±1.0 g). Based on the different sugar concentration tests, groups with a glucose level of 40% and three varying concentrations of pasteurized *A. muciniphila* (10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup> CFU/g) were established. The regulation of glucose metabolism and glucagon-like peptide-1 in *C. carpio* (16.38±0.39 g) after four weeks of pasteurized *A. muciniphila* supplementation was explored. Additionally, the regulatory mechanism of intestinal *A. muciniphila* and glucagon-like peptide-1 on carp's glucose metabolism at different glucose levels was investigated through experiments involving primary liver and intestinal cells incubated with pasteurized *A. muciniphila*. The results demonstrated the following findings: (1) with an increase in dietary glucose content, there was a significant decrease in serum glucagon-like peptide-1b levels ( $P < 0.05$ ). (2) following pasteurized *A. muciniphila* treatment, there was a significant reduction in serum glucose and glucagon-like peptide-1 levels ( $P < 0.05$ ). Moreover, there were notable increases in villus height and muscle thickness of the midintestine along with a decrease in glucagon-like peptide-1 content and an increase in short-chain fatty acid content; additionally, *muc2* mRNA expression level increased significantly ( $P < 0.05$ ). Furthermore, pasteurized *A. muciniphila* up-regulated mRNA expression levels of *ampk*, *pi3k*, *akt* as well as glycolytic genes *gk* and *pfk* in the liver while down-regulating mRNA expression levels of gluconeogenic gene *pepck* ( $P < 0.05$ ). (3) incubation results from primary liver and intestinal cells revealed that after pasteurized *A. muciniphila* treatment, there was a significant decrease in glucagon-like peptide-1 content within intestinal cells while simultaneously increasing *gpr40* mRNA expression; furthermore, hepatocytes showed significantly increased mRNA expressions of glycolysis genes *gk* and *pfk*. In conclusion, high glucose diet increases the blood glucose levels, and causes liver and intestinal damage of *C. carpio*. The addition of exogenous pasteurized *A. muciniphila* increases the content of short chain fatty acids in *C. carpio* intestinal contents, inhibits intestinal secretion of glucagon-like peptide-1, alleviates the increase in blood glucose caused by high glucose diet, maintains glucose homeostasis. This research can provide the practical basis for the application of *A. muciniphila* as a probiotic in aquatic feed.

**Key words:** *Cyprinus carpio*; different sugar levels; glucagon-like peptide-1(GLP-1); glucose metabolism

**Corresponding author:** MENG Xiaolin. E-mail: mengxiaolinqdio@126.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (U1904118, 32273149); Scientific and Technological Projects of Henan Province (222103810021)