

文章编号: 1000-0615(2018)05-0766-11

DOI: 10.11964/jfc.20170410790

## 不同糖及糖水平对松浦镜鲤养殖过程中糖代谢 相关基因表达的影响

李晋南, 王常安, 王连生, 赵志刚, 罗亮, 徐奇友\*

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

**摘要:** 为探讨在养殖不同阶段, 不同糖及糖水平对松浦镜鲤肝脏糖酵解酶(*GK*和*HK*)、糖异生酶(*G6Pase*和*PEPCK*)和糖代谢相关基因(*IGF- I*和*GHR*) mRNA表达水平的影响, 实验采用2×2双因素设计实验, 选择淀粉和葡萄糖2种糖源, 2个糖水平(25%和50%), 共4个实验组, 分别为低淀粉组(LS)、高淀粉组(HS)、低葡萄糖组(LG)和高葡萄糖组(HG)。选用初始体质量为(8.30±0.15)g的松浦镜鲤420尾, 随机分为4组, 每组3个重复, 每个重复35尾鱼。实验周期为7周。结果显示, 不同养殖阶段, *HK*基因和*IGF- I*基因在不同实验组中的表达趋势基本一致, *HK*基因在养殖1周时表达量显著升高, 之后开始降低, *IGF- I*基因在养殖3周时表达量显著升高。在不同养殖阶段, *GK*、*PEPCK*、*G6Pase*和*GHR*基因的表达趋势受糖水平和糖种类的影响。在低糖水平下(LS组和LG组), 这些基因表现了相同的变化趋势, *GK*和*GHR*基因在1周时表达量最高, 之后开始下降; *PEPCK*基因在3周时表达量最高; *G6Pase*在1周时表达量升高, 之后下降, 在7周时表达量又有上升趋势。在高糖水平下, HS组的*GK*基因的表达量在各个养殖阶段差异不显著, 而HG组的*GK*基因则在1周时表达量显著升高; HS组和HG组的*PEPCK*基因的表达量在各个养殖阶段差异不显著; HS组的*G6Pase*基因的表达量在各个养殖阶段差异不显著, 而HG组的*G6Pase*基因则在3周时表达量显著升高; HG组的*GHR*基因的表达量在各个养殖阶段差异不显著, 而HS组的*GHR*基因则在3周时表达量显著升高。在养殖初期(1周), 高糖饲料显著促进了*HK*基因的表达, 并抑制了*PEPCK*、*G6Pase*和*GHR*基因的表达。

**关键词:** 松浦镜鲤; 葡萄糖; 淀粉; 糖酵解酶; 糖异生酶; 基因表达

**中图分类号:** Q 785; S 963.7

**文献标志码:** A

糖类物质被认为是可以节约部分蛋白质, 为鱼类提供能量的最廉价的能源物质。鱼类饲料中添加适宜水平的糖类物质, 可以促进鱼体自身蛋白质的活化, 提高饲料蛋白质效率<sup>[1-3]</sup>, 同时还能降低氮磷排放, 减少环境污染<sup>[4-5]</sup>。但是, 鱼类摄入高糖饲料后, 其生长性能下降、抗病能力下降, 同时肝糖原含量增高, 容易损害鱼类肝脏的正常功能, 使其代谢功能下降<sup>[6-7]</sup>。研究表明, 不同鱼类对不同糖类的利用效率不

同, 杂食性鲤(*Cyprinus carpio*)比肉食性鱼类对饲料中糖类物质的利用率高, 而且鲤对淀粉的利用率要优于葡萄糖, 并且能耐受400 g/kg的糖类物质<sup>[8]</sup>。

鱼类对糖类物质的代谢过程, 需要经过激素、糖酵解和糖异生等作用的共同完成。生长激素(growth hormone, GH)是哺乳动物体内调控血糖平衡的激素之一, 它同时还调控动物的生长及特定组织器官发育, 其通过与受体*GHR*结

收稿日期: 2017-04-14 修回日期: 2017-07-14

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(HSY201605); 国家自然科学基金(31702353); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-45)

通信作者: 徐奇友, E-mail: xuqiyou@sina.com

合,调控着GH下游的一切生理功能。胰岛素样生长因子-I(insulin-like growth factor- I, IGF- I)就是GH下游调节细胞增殖与分化、抑制细胞凋亡,促进葡萄糖吸收与利用的重要因子<sup>[9]</sup>。Enes等<sup>[10]</sup>研究了IGF- I在调节舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)糖代谢中的作用。李晋南等<sup>[11]</sup>研究了IGF- I和GHR在松浦镜鲤(*Cyprinus carpio*)糖代谢中的调控机制。在糖酵解过程中,己糖激酶(hexokinase, HK)是起始酶,目前大多数的研究表明,其不受糖水平的诱导。葡萄糖激酶(glucose kinase, GK)被认为是鱼类糖代谢中的主要糖酵解酶,其活性与饲料碳水化合物水平密切相关,在控制鱼类对糖利用率和保持糖代谢的动态平衡方面起着非常重要的作用<sup>[12-13]</sup>。在糖异生中,葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6- phosphatase, G6Pase)是第一个限速酶,磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)是肝脏和肾脏中糖原异生的关键酶,目前关于糖异生酶活性与饲料糖水平之间的关系,还没有统一的结论<sup>[14]</sup>。但是,对于不同饲料糖水平下,糖类物质对养殖阶段中糖代谢相关基因和相关酶基因表达量的变化机制鲜有报道。

松浦镜鲤是黑龙江水产研究所在德国镜鲤选育系(F<sub>4</sub>)的基础上选育的新品种,具有鳞片少、生长速率快、含肉率高、肉质好,具有很高的经济价值。目前,已经在全国范围内广泛推广。本实验以松浦镜鲤为研究对象,选用葡萄糖和淀粉2种糖源,25%低糖水平和50%高糖水平,研究不同糖及糖水平在不同养殖阶段对松浦镜鲤糖代谢相关基因IGF- I和GHR,以及糖代谢相关酶GK、HK、PEPCK和G6Pase基因表达的影响,为研究鱼类糖代谢机制奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼

松浦镜鲤选自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所呼兰试验站。实验开始前,先暂养在循环水养殖系统中,饲喂商品饲料,使其适应养殖环境。预饲2周后,选择规格整齐,表现健康的鱼,共420尾,随机分为4组,每组3个重复,每个重复35尾鱼,分养于12个循环水族箱里(有效容积200 L)。实验鱼的初始体质量为(8.30±0.15)g。

### 1.2 实验饲料

实验以葡萄糖和淀粉为糖源,糖水平为25%和50%,酪蛋白和鱼粉为蛋白源,鱼油和豆油为脂肪源,配制成4种等氮等脂的饲料,具体饲料配方见表1。饲料原料经粉碎过60目筛后,按配比混合均匀,少量的组分采用逐级扩大法混合,然后用颗粒机制成2 mm颗粒饲料,自然风干,置于-20 °C冰箱中保存待用。

表1 基础饲料配方及营养组成(干重)

Tab. 1 Ingredients and approximate composition in the basal diets (air-dry matter) %

| 原料<br>ingredients             | 组别 groups |       |       |       |
|-------------------------------|-----------|-------|-------|-------|
|                               | HS        | LS    | HG    | LG    |
| 淀粉<br>starch                  | 50        | 25    | 0     | 0     |
| 葡萄糖<br>glucose                | 0         | 0     | 50    | 25    |
| 纤维素<br>cellulose              | 0         | 25    | 0     | 25    |
| <b>营养水平</b><br>nutrient level |           |       |       |       |
| 粗蛋白<br>crude protein          | 31.97     | 31.90 | 31.91 | 31.89 |
| 粗脂肪<br>crude fat              | 5.76      | 5.71  | 5.66  | 5.65  |

注:基础饲料中还有,鱼粉10%,酪蛋白30%,鱼油2.5%,豆粉1.5%,胆碱0.5%,磷酸二氢钙2%,磷脂1%,羧甲基纤维素钠2%,维生素预混料0.3%,矿物质预混料0.2%;维生素预混料和矿物质预混料(mg/kg or IU/kg): VA 8000 IU, VE 70 mg, VB<sub>1</sub> 18 mg, VB<sub>2</sub> 35 mg, VB<sub>6</sub> 18 mg, 泛酸 60 mg, 烟酸200 mg, 生物素 2.5 mg, VB<sub>12</sub> 0.6 mg, 叶酸 6 mg, 肌醇1000 mg, VC 500 mg, VD<sub>3</sub> 2000 IU, VK 7 mg, Zn 65 mg, Fe 75 mg, Cu 3.5 mg, Mn 16 mg, I 0.65 mg, Co 0.1 mg, Se 0.1 mg

Notes: basal diet, fish meal 10%, casein 30%, fish oil 2.5%, soybean oil 1.5%, choline chloride 0.5%, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 2%, soybean lecithin 1%, CMC 2%, vitamin premix 0.3%, mineral premix 0.2%; Vitamin premix and mineral element premix provide (mg/kg or IU/kg diet): VA 8000 IU, VE 70 mg, VB<sub>1</sub> 18 mg, VB<sub>2</sub> 35 mg, VB<sub>6</sub> 18 mg, calcium pantothenate 60 mg, niacin 200 mg, biotin 2.5 mg, VB<sub>12</sub> 0.6 mg folic acid 6 mg, inositol 1000 mg, VC 500 mg, VD<sub>3</sub> 2000 IU, VK 7 mg, Zn 65 mg, Fe 75 mg, Cu 3.5 mg, Mn 16 mg, I 0.65 mg, Co 0.1 mg, Se 0.1 mg

### 1.3 实验设计与饲养管理

采用2×2双因子实验设计。实验分为高淀粉组(HS)、低淀粉组(LS)、高葡萄糖组(HG)和低葡萄糖组(LG)。实验周期为7周,期间每天定时投喂4次,每次投喂以饱食无残饵为准。实验在室内控温循环水族箱里进行,温度为(24±1) °C,24 h不间断供氧,溶解氧大于5 mg/L,每日吸污,并观察记录鱼摄食和死亡情况,每周换去水族箱内2/3水并注入已曝气的水。

### 1.4 样品采集

4组实验鱼,分别在饲养1周、3周、5周、

7周后采集样品。样品采集前饥饿24 h后, 分别饲喂各自的饲料, 饲喂2 h后采集样品, 每缸3尾鱼。置于冰盘上解剖, 取出内脏, 并剥离出肝脏组织, 用生理盐水清洗干净, 迅速置于液氮中快速冷冻后存于-80 °C低温冰箱中, 用于RNA提取。

### 1.5 组织总RNA的提取

利用Trizol法提取肝脏组织总RNA。肝脏组织, 置于液氮中研磨成粉末, 转移至1.5 mL离心管中, 加入1 mL Trizol裂解液, 提取纯化总RNA。通过多功能酶标仪Evolution 260 Bio (Thermo Scientific, USA)检测总RNA的纯度和浓度, 同时利用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。利用PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa, Japan)试剂盒将1 μL的RNA进行反转录, 具体过程按试剂盒说明书进行, 反转录获得的cDNA保存于-20 °C。用于GK、HK、PEPCK、G6Pase、IGF- I和GHR基因的检测。

### 1.6 不同养殖阶段糖代谢相关酶和基因表达变化规律

根据GenBank上鲤糖代谢相关基因GHR和IGF- I, 糖代谢相关酶GK、HK、PEPCK和G6Pase的基因序列, 利用Premier 5.0引物设计软件设计荧光定量PCR特异引物, 引物大小为100~250 bp, 引物序列见表2。所有引物由上海英潍捷基公司合成。

各基因mRNA相对表达量采用SYBR Green I实时荧光定量PCR技术, 利用管家基因β-actin作为内标基因。Real-time PCR反应体系为20 μL, 包括2×SYBR预混液10 μL、10 μmol/L的上下游引物各0.8 μL、cDNA模板1 μL和灭菌蒸馏水7.4 μL。根据SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa, Japan)试剂盒说明书进行, 采用ABI 7500 Real-time PCR仪(Applied Biosystems, USA)进行分析。扩增条件为95 °C预变性30 s; 95 °C变性5 s, 60 °C退火34 s, 进行40个循环; 熔解曲线分析过程。数据分析采用比较CT法(ΔΔCT)。相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(\Delta CT_{处理} - \Delta CT_{对照})} = 2^{-[(CT_{处理} - CT_{内参}) - (CT_{对照} - CT_{内参})]}$ , 数据取3次重复的平均值。

### 1.7 统计分析

实验结果用SPSS 20.0软件进行单因素方差分析, 进行Duncan氏多重比较, 用平均值±标准

表2 糖代谢相关酶和相关基因引物表

Tab. 2 The primers of enzymes and genes related to carbohydrate metabolism

| 引物<br>primer | 序列(5'-3')<br>sequence from 5' to 3' | 登录号<br>accession no. |
|--------------|-------------------------------------|----------------------|
| HK-F         | 5'-GATGCTTTTGGTAAAGATTC-3'          | AF119837.1           |
| HK-R         | 5'-TTCTTCATCCCCATATAGTC-3'          |                      |
| GK-F         | 5'-TGCTGCCCACTTATGTCCG-3'           | AF053332.2           |
| GK-R         | 5'-TTCATCTCACCCACTTTCA-3'           |                      |
| PEPCK-F      | 5'-AGGCTGGACGGTTGAGTGT-3'           | AF427865.1           |
| PEPCK-R      | 5'-GTGTTCTCGAGATGGTTGC-3'           |                      |
| G6Pase-F     | 5'-TCGAGGAGTTATTTCAGG-3'            | AF427863.1           |
| G6Pase-R     | 5'-CCAGGGTCCACAGCAGAT-3'            |                      |
| GHR-F        | 5'-GGCACAGATACCAAGCAAAGAA-3'        | AY691176.1           |
| GHR-R        | 5'-TGAGAGAAGATGAGGAGGACAAGA-3'      |                      |
| IGF- I-F     | 5'-AGACAGCCCAAGGACAGCA-3'           | D83272.1             |
| IGF- I-R     | 5'-TACAGTGGAGCACATCTCTGGAA-3'       |                      |
| β-actin-F    | 5'-GGCAGGTCATCACCATCGG-3'           | JQ619774.1           |
| β-actin-R    | 5'-TTGGCATACAGGTCCTTTACGG-3'        |                      |

差(mean±SD)表示结果, 显著性水平P<0.05。

## 2 结果

### 2.1 HK基因表达量变化

4个实验组HK基因的表达趋势基本一致, 在养殖1周时HK基因的表达量显著高于其他养殖阶段(P<0.05), 3周时开始回落, 趋于平稳, 3~7周时HK基因表达量没有显著差异(P>0.05)(图1)。

### 2.2 GK基因表达量变化

HS组在各养殖阶段GK基因表达量差异不显著(P>0.05)(图2)。LS组、LG组和HG组的GK表达量在1周时达到最高值, 之后开始下降, 在5周时表达量最低。而葡萄糖组在养殖第7周时又有升高趋势(P<0.05)。

### 2.3 PEPCK基因表达量变化

低糖组与高糖组PEPCK基因在不同养殖阶段的表达趋势存在显著差异。在LS和LG组中PEPCK基因在养殖第3周时表达量最高, 显著高于7周时的表达量(P<0.05), 而在HS和HG组中PEPCK基因的表达量各个养殖阶段相比差异不显著(P>0.05)(图3)。

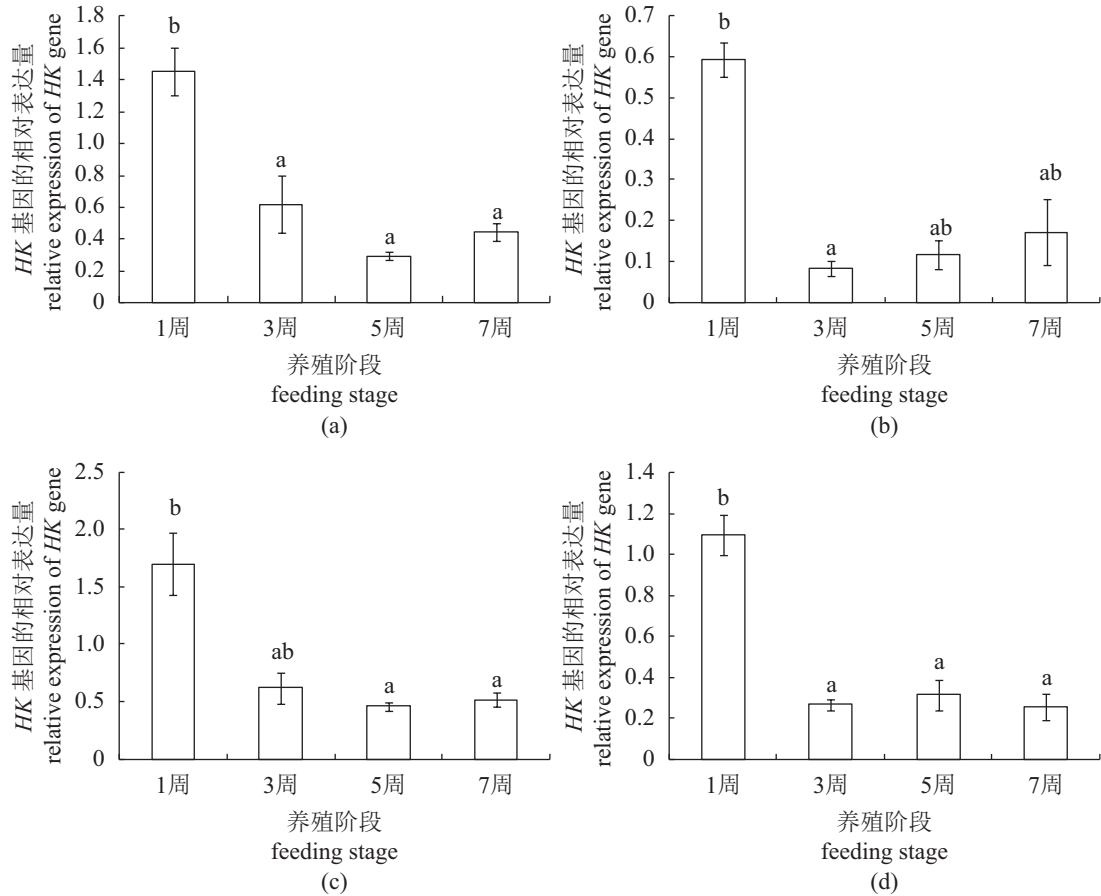


图1 不同实验组中HK基因在不同养殖阶段的变化趋势

(a)LS组; (b)LG组; (c)HS组; (d)HG组; 不同小写字母表示差异显著(P<0.05), 下同

Fig. 1 The change trend of HK gene in different culture stages in groups

(a)LS group; (b)LG group; (c)HS group; (d)HG group; value columns with different small letters mean significant difference (P<0.05), the same below

### 2.4 G6Pase基因表达量变化

不同养殖阶段G6Pase基因的表达趋势在各实验组间差异比较显著(图4)。LS组G6Pase基因表达量在养殖1周时开始升高, 3周后开始回落, 在5周时表达量最低, 7周时显著升高至1周水平(P<0.05)。LG组G6Pase基因表达量在养殖1周时开始升高, 在3周时表达量最低, 5~7周时有缓慢上升的趋势(P<0.05)。HS组G6Pase表达量变化趋势与低糖组一致, 但差异不显著(P>0.05)。HG组在养殖3周时G6Pase表达量达到最高(P<0.05), 养殖5周时回落, 养殖7周时表达量开始上升。

### 2.5 IGF- I 基因表达量变化

不同养殖阶段IGF- I 基因表达趋势基本一致, 养殖3周时表达量显著升高, 显著高于其他各养殖阶段(P<0.05)(图5)。HG组在养殖7周时IGF- I 表达量有上升趋势。

### 2.6 GHR基因表达量变化

LS组和LG组GHR基因在养殖1周时表达量最高, 之后开始下降, 养殖5和7周时GHR表达量显著低于养殖1周(P<0.05)。HS组在养殖3周时GHR基因表达量达到最高值(P<0.05), 之后开始下降, 在养殖7周时降到最低(P<0.05)。HG组在不同养殖阶段养殖GHR基因表达量差异不显著(P>0.05)(图6)。

### 2.7 养殖初期各基因表达量变化

在养殖初期, 高糖组中糖酵解酶HK基因的表达量显著高于低糖组(P<0.05), 而GK基因在各试验组中的表达量差异不显著(P>0.05)。糖异生酶PEPCK和G6Pase在高糖组的表达量均显著低于低糖组(P<0.05)。IGF- I 基因的表达量在养殖初期各组间没有显著差异(P>0.05), 而高糖组中GHR基因的表达量显著低于低糖组(P<0.05)(图7)。

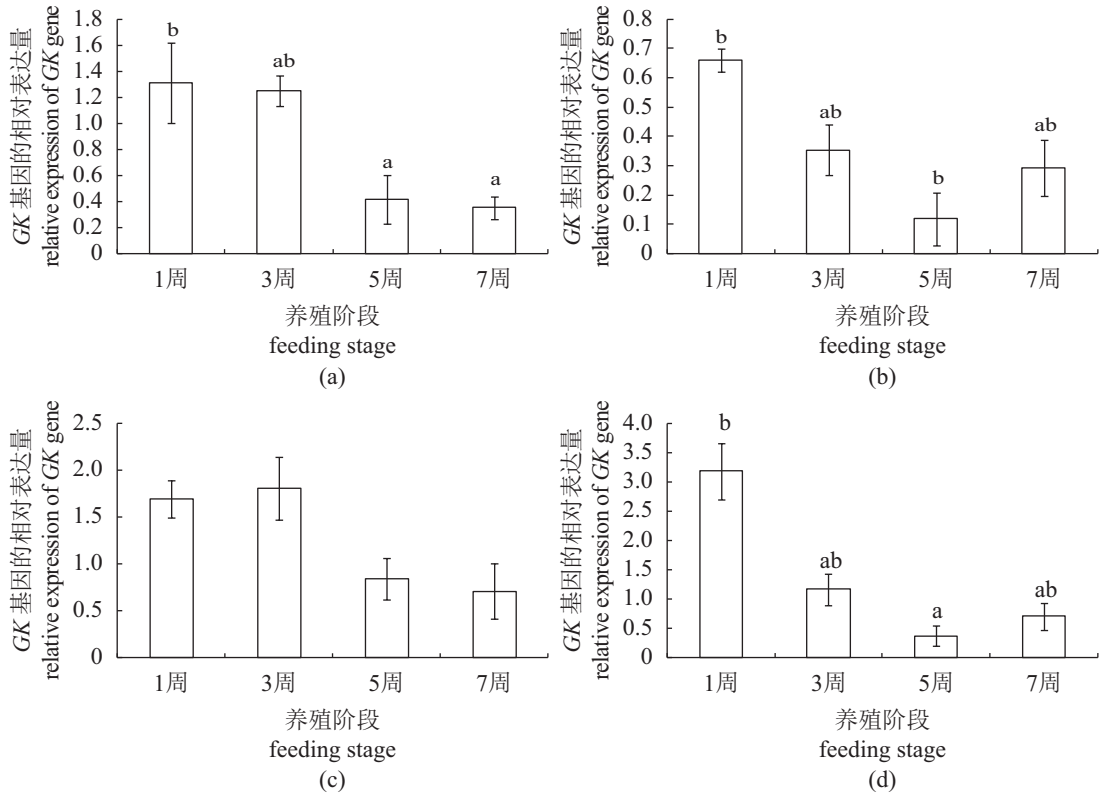


图 2 不同实验组中 GK 基因在不同养殖阶段的变化趋势

Fig. 2 The change trend of GK gene in different culture stages in groups

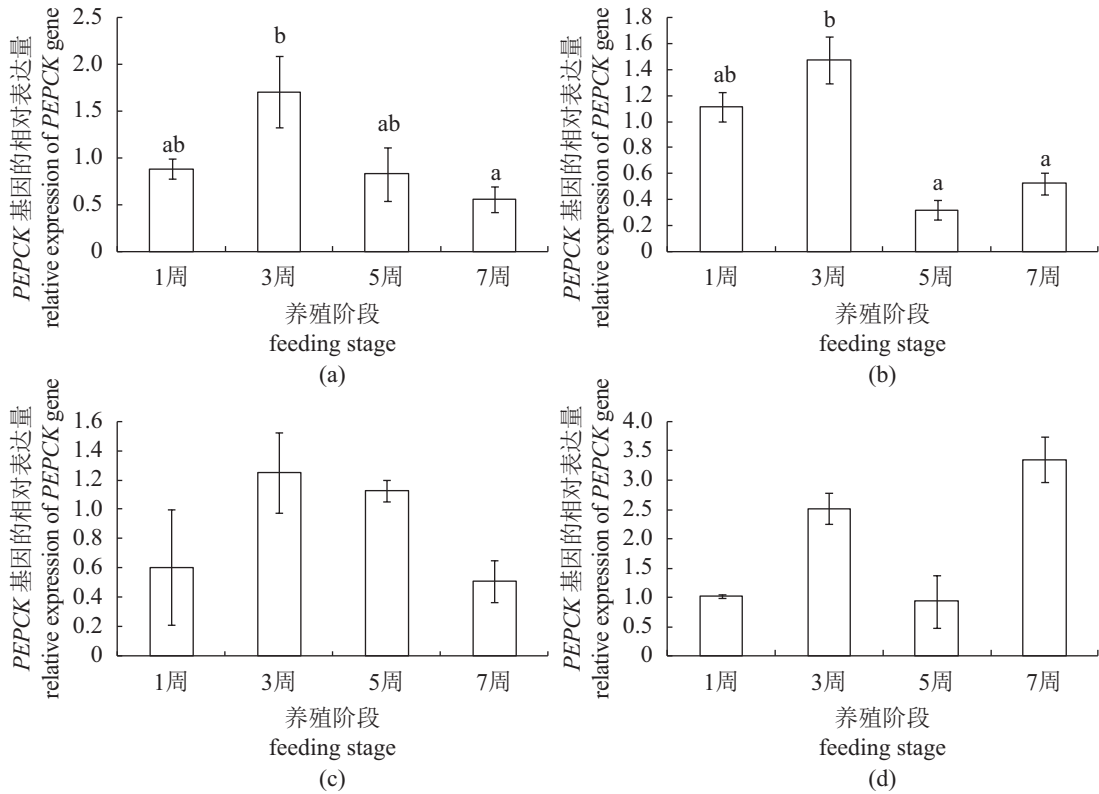


图 3 不同实验组中 PEPCK 基因在不同养殖阶段的变化趋势

Fig. 3 The change trend of PEPCK gene in different culture stages in groups



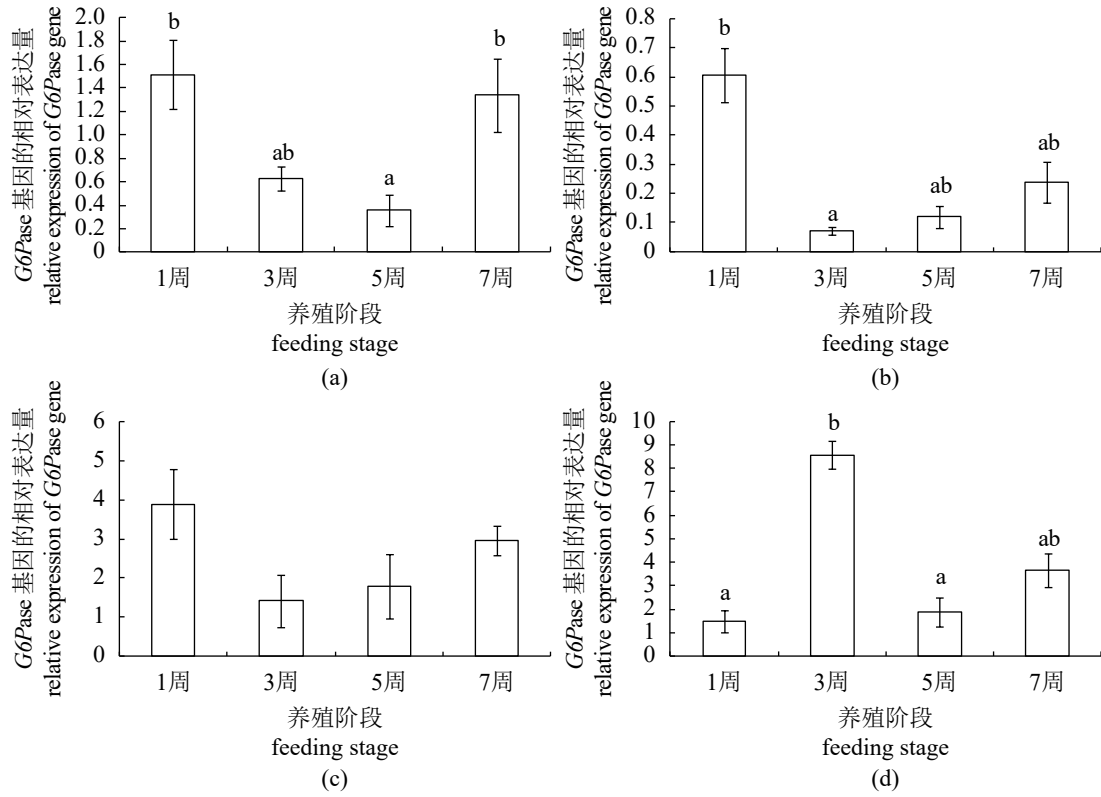


图 4 不同实验组中 G6Pase 基因在不同养殖阶段的变化趋势

Fig. 4 The change trend of G6Pase gene in different culture stages in groups

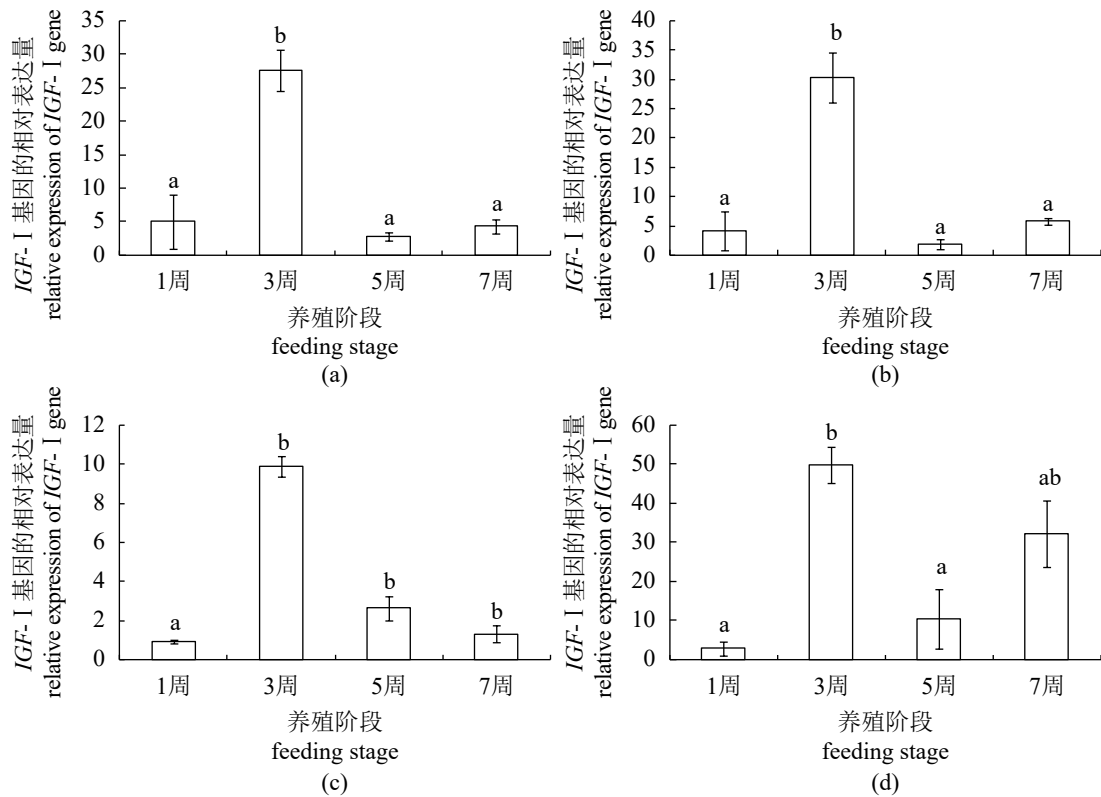


图 5 不同实验组中 IGF-1 基因在不同养殖阶段的变化趋势

Fig. 5 The change trend of IGF-1 gene in different culture stages in groups

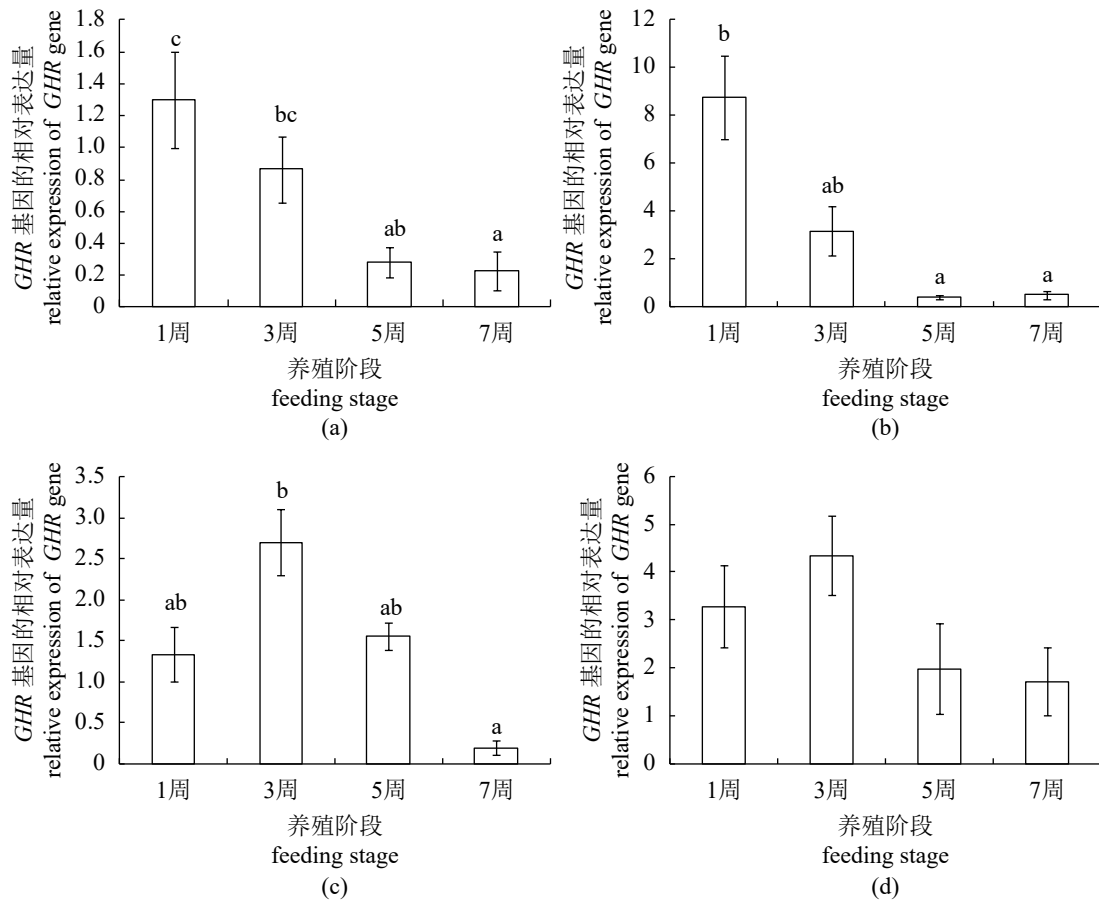


图6 不同实验组中GHR基因在不同养殖阶段的变化趋势

Fig. 6 The change trend of GHR gene in different culture stages in groups

### 3 讨论

HK和GK是糖代谢中糖酵解的关键酶，HK是起始酶，研究者曾认为HK的缺乏及GK的活性低，是鱼类对糖代谢利用能力低的原因<sup>[15]</sup>。在饲料碳水化合物含量对HK的调控方面，Furuichi等<sup>[16]</sup>认为鱼类在服用葡萄糖后HK活性升高，但后来一些研究者指出不管是改变喂食节律或者饲料组成，HK的活性都不发生变化<sup>[13, 17-18]</sup>。一些结果显示，饲料碳水化合物含量与GK活性密切相关<sup>[13, 19-20]</sup>。在一些鱼类中，日粮中高碳水化合物对GK活性以及GK基因的表达也表现出一定的调控作用。研究结果显示，高碳水化合物饲料诱导了金头鲷(*Sparus aurata*)<sup>[19]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、鲤<sup>[13, 20]</sup>、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)<sup>[21]</sup>、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)<sup>[22]</sup>体内GK活性的增加和肝胰脏中GK的表达，且在摄食后6 h GK的表达量开始提高，24~30 h明显提高。本实验的结果显示，不同糖及糖

水平对HK基因表达量调控的趋势基本一致，同时显示在喂食糖后HK基因表达量有显著升高，且其表达量在养殖初期随糖水平的升高而升高，这个结果与Furuichi等<sup>[16]</sup>的研究结果类似，但之后HK基因便不受糖及糖水平诱导。相反，GK基因在不同糖及糖水平的诱导下，表现了不一样的表达趋势，之前的研究结果显示，养殖8周后，GK基因在高淀粉组的表达量显著高于其他各组<sup>[13]</sup>，结合这一结果说明高淀粉在养殖初期便显著诱导了GK基因的表达，并且在养殖阶段始终保持高水平表达。这可能是鲤利用淀粉能力好于葡萄糖，且能耐受饲料中高水平淀粉的根本原因。

G6Pase和PEPCK是糖异生的关键酶，在鱼类中的研究结果显示，鱼类体内和体外的各种条件，甚至分子机制方面的调控，都可能对G6Pase活性和表达造成不同程度的影响<sup>[17]</sup>。本实验结果显示，高葡萄糖组在养殖初期抑制了G6Pase的表达量，而高淀粉组在整个养殖阶段

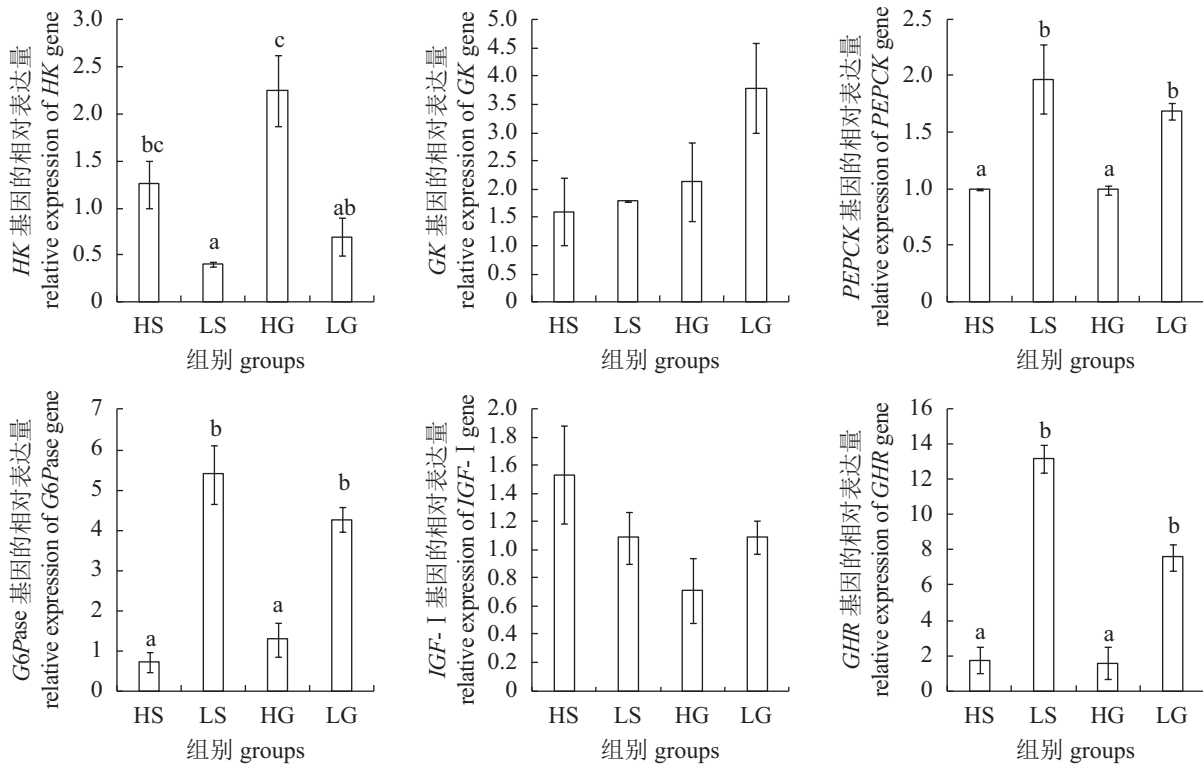


图7 不同糖及糖水平在养殖1周时对不同基因的表达量影响

Fig. 7 The effect of different dietary carbohydrates and carbohydrate levels on different genes expression in 1 week culture stage

均抑制了*G6Pase*的表达量, 低糖组在养殖3周时*G6Pase*表达量开始受到抑制, 之后在7周后又上升的趋势, 这说明鱼类糖代谢中不同糖及糖水平对*G6Pase*基因的抑制程度不同, 这可能是鱼类对不同糖利用效率不同的原因之一。*PEPCK*在细胞内存在细胞质型和线粒体型, 线粒体型为组织型表达, 不受营养素的调节, 相对活性比较稳定, 而细胞质型主要在肝脏、肾脏和脂肪组织中表达, 其转录受各种营养素和激素的调节<sup>[23]</sup>。对于不同糖及糖水平对*PEPCK*基因表达量的影响, 目前有两方面的结论, 一是碳水化合物不能影响*PEPCK*基因的表达, 对虹鳟的研究表明, 其肝脏中的*PEPCK*活性不受饥饿、再投喂, 以及饲料中糖含量等条件的影响<sup>[24]</sup>; 另一种是碳水化合物降低了*PEPCK*基因的表达量, 对鲤的研究表明, 摄食20%糖饲料组的*PEPCK* mRNA的表达量低于无糖饲料<sup>[14]</sup>。本实验的结果显示, 糖水平对*PEPCK*的影响不同, 高糖组整个养殖阶段*PEPCK*基因表达量差异不显著, 原因是在养殖初期高糖水平就抑制了*PEPCK*的表达量, 而低糖组则在养殖后期, *PEP-*

*CK*的表达量才开始受到抑制, 说明饲料中的不同糖及糖水平对*PEPCK*基因的抑制程度是不同的。综上, 糖异生酶*G6Pase*和*PEPCK*基因mRNA的抑制程度是与饲料糖种类和糖水平相关的, 其可能是鱼类对不同糖耐受程度不同的原因之一, 还需要更深入的研究。

*GH*、*GHR*、*IGF-I*是调控鱼类生长、能量代谢、繁殖、摄食和免疫等重要因子。已经有研究证明, *GH*对哺乳动物和鱼类具有促进生长的作用<sup>[25]</sup>。*GH*在肝脏中的主要功能之一是与受体*GHR*结合后激活*IGF-I*的合成与分泌, 从而促进一系列的生理功能。*IGF-I*是一类多功能细胞增殖调控因子, 在动物体内几乎所有器官的生长和功能都与它有关。后来经过研究发现, 其具有与胰岛素类似的功能, 如降血糖、降血脂的作用, 因此被称为胰岛素样生长因子。*IGF-I*能够促进组织摄取葡萄糖, 刺激糖原合成和抑制糖原分解, 还能够促进蛋白质和脂肪合成<sup>[26]</sup>。本实验的结果显示, 4个实验组, *IGF-I*基因的表达量在不同养殖阶段均表现了同样的趋势, 而*GHR*基因却因不同糖水平表现了不同的表达趋



势,说明不同糖及糖水平对IGF- I 基因的调控机制没有显著差异,而GHR基因的表达受糖及糖水平的影响,GHR基因表达量在养殖初期便受高糖抑制,但高淀粉组在养殖3周时表达量最高,而高葡萄糖组则整个养殖阶段GHR基因均被抑制,这可能是不同糖及糖水平影响鱼类生长性能的原因之一。其次,在养殖3周时,IGF- I 基因均有表达量上升的趋势,说明其可能是机体经过一段时间的糖饲料的喂养的反馈作用。

#### 参考文献:

- [1] 缪凌鸿,刘波,戈贤平,等.高碳水化合物水平日粮对异育银鲫生长、生理、免疫和肝脏超微结构的影响[J].水产学报,2011,35(2):221-230.  
Miao L H, Liu B, Ge X P, et al. Effect of high carbohydrate levels in the dietary on growth performance, immunity and transmission electron microscopy (TEM) on hepatic cell of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(2): 221-230(in Chinese).
- [2] 杨丽萍,郑文佳,秦超彬,等.饲料糖脂比对吉富罗非鱼生长、血液指标和肝脏糖代谢关键酶活性及基因表达的影响[J].水产学报,2016,40(9):1376-1386.  
Yang L P,Zheng W J,Qin C B, et al. Effects of kind and level of dietary carbohydrate on growth performance and physiological indices of juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus* Richardson)[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(9): 1376-1386(in Chinese).
- [3] Asaduzzaman M, Wahab M A, Verdegem M C J, et al. Effects of addition of tilapia *Oreochromis niloticus* and substrates for periphyton developments on pond ecology and production in C/N-controlled freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* farming systems[J]. Aquaculture, 2009, 287(3-4): 371-380.
- [4] Asaduzzaman M, Wahab M A, Verdegem M C J, et al. Effects of carbohydrate source for maintaining a high C : N ratio and fish driven re-suspension on pond ecology and production in periphyton-based freshwater prawn culture systems[J]. Aquaculture, 2010, 301(1-4): 37-46.
- [5] Lee S M, Kim K D. Effects of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth and body composition of juvenile and grower rockfish, *Sebastes schlegelii*[J]. Aquaculture Research, 2009, 40(16): 1830-1837.
- [6] Hu Y H, Liu Y J, Tian L X, et al. Optimal dietary carbohydrate to lipid ratio for juvenile yellowfin seabream (*Sparus latus*)[J]. Aquaculture Nutrition, 2007, 13(4): 291-297.
- [7] Moreira I S, Peres H, Couto A, et al. Temperature and dietary carbohydrate level effects on performance and metabolic utilisation of diets in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles[J]. Aquaculture, 2008, 274(1): 153-160.
- [8] Wilson R P. Utilization of dietary carbohydrate by fish[J]. Aquaculture, 1994, 124(1-4): 67-80.
- [9] Jones J I, Clemmons D R. Insulin-like growth factors and their binding protein: Biological actions[J]. Endocrine Reviews, 1995, 16(1): 3-34.
- [10] Enes P, Sanchez-Gurmaches J, Navarro I, et al. Role of insulin and IGF- I on the regulation of glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed with different dietary carbohydrate levels[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2010, 157(4): 346-353.
- [11] 李晋南,徐奇友,王常安,等.不同糖及糖水平对松浦镜鲤GH/IGF- I 基因表达和鱼体组成的影响[J].上海海洋大学学报,2015,24(4):489-495.  
Li J N, Xu Q Y, Wang C A, et al. Effects of different dietary carbohydrates and carbohydrate levels on GH/IGF- I mRNA expression and the fish body composition of juvenile mirror carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(4): 489-495(in Chinese).
- [12] 戈贤平,刘波,谢骏,等.饲料中不同碳水化合物水平对翘嘴红鲌生长及血液指标和糖代谢酶的影响[J].南京农业大学学报,2007,30(3):88-93.  
Ge X P, Liu B, Xie J, et al. Effect of different carbohydrate levels of dietary on growth, plasma biochemical indices and hepaticpancreas carbohydrate metabolic enzymes in topmouth culter (*Erythroculter ilishaeformis* Bleeker)[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2007, 30(3): 88-93(in Chinese).
- [13] Li J N, Xu Q Y, Wang C A, et al. Effects of dietary glucose and starch levels on the growth, haematological indices and hepatic hexokinase and glucokinase mRNA expression of juvenile mirror carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Aquaculture Nutrition, 2016, 22(3): 550-558.
- [14] Panserat S, Plagnes-Juan E, Kaushik S. Gluconeogenic

- enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilt-head seabream (*Sparus aurata*)[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 2002, 1579(1): 35-42.
- [15] 谭肖英, 罗智, 刘永坚. 鱼类对饲料中糖的利用研究进展[J]. *中国饲料*, 2007(6): 19-23.
- Tan X Y, Luo Z, Liu Y J. Review of carbohydrate utilization in fish feed[J]. *China Feed*, 2007(6): 19-23(in Chinese).
- [16] Furuichi M, Yone Y. Changes in activities of hepatic enzymes related to carbohydrate metabolism of fishes in glucose and insulin-glucose tolerance tests[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1982, 48(3): 463-466.
- [17] Panserat S, Médale F, Blin C, *et al.* Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilt-head seabream, and common carp[J]. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2000, 278(5): R1164-R1170.
- [18] Tranulis M A, Dregni O, Christophersen B, *et al.* A glucokinase-like enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, 114(1): 35-39.
- [19] Caseras A, Metón I, Vives C, *et al.* Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilt-head sea bream (*Sparus aurata*)[J]. *British Journal of Nutrition*, 2002, 88(6): 607-614.
- [20] Panserat S, Blin C, Médale F, *et al.* Molecular cloning, tissue distribution and sequence analysis of complete glucokinase cDNAs from gilt-head seabream (*Sparus aurata*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2000, 1474(1): 61-69.
- [21] Gao W, Liu Y J, Tian L X, *et al.* Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth performance, body composition, nutrient utilization and hepatic enzymes activities of herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2010, 16(3): 327-333.
- [22] Li X F, Wang Y, Liu W B, *et al.* Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on growth performance, body composition and glucose metabolism of fingerling blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2013, 19(5): 701-708.
- [23] Hanson R W, Reshef L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1997, 66: 581-611.
- [24] Panserat S, Plagnes-Juan E, Brèque J, *et al.* Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2001, 204(2): 359-365.
- [25] Forsyth I A, Wallis M. Growth hormone and prolactin-molecular and functional evolution[J]. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2002, 7(3): 291-312.
- [26] 刘丽丽. 胰岛素样生长因子I的研究进展[J]. *中国草食动物科学*, 2013, 33(6): 57-59.
- Liu L L. Progress in insulin like growth factor I[J]. *China Herbivore Science*, 2013, 33(6): 57-59(in Chinese).

## Effects of different carbohydrates and different carbohydrate levels on mRNA expression of glucose metabolism related genes in different feeding stages of Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio*)

LI Jinnan, WANG Chang'an, WANG Liansheng, ZHAO Zhigang, LUO Liang, XU Qiyou\*  
(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

**Abstract:** This experiment was aimed to study the effect of different carbohydrates and different carbohydrate levels on mRNA expression of glycolytic enzyme (glucose kinase, *GK*; hexokinase, *HK*), gluconeogenesis enzyme (Glucose -6- phosphatase, *G6Pase*; phosphoenolpyruvate carboxykinase, *PEPCK*), glucose metabolism related genes (Insulin-like Growth Factor- I, *IGF- I*; Growth Hormone Receptor, *GHR*) in different feeding stages of Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio*). Four experimental diets were formulated to contain two carbohydrates (starch and glucose) diets with two levels (250 g/kg and 500 g/kg) (Low level starch group: LS; High level starch group: HS; Low level glucose group: LG; High level glucose group: HG) two carbohydrates (glucose and starch) and two carbohydrate levels (25% and 50%) (LS/HS/LG/HG) using 2×2 double factor experimental design, 420 Songpu mirror carp (mean weight=[8.30±0.15] g) were randomly divided into 4 dietary treatments with 3 triplicates and 35 fish per triplicate and were reared for 7 weeks. The results showed that in different feeding stages, the mRNA expression levels of *HK* gene and *IGF- I* gene in different experimental groups were basically in the same trend. The mRNA expression levels of *HK* gene at feeding 1W was significantly increased and then decreased. The mRNA expression level of *IGF- I* gene was significantly increased at feeding 3W. *IGF- I* gene expression increased significantly at feeding 3W. In different feeding stages, the mRNA expression levels of *GK*, *PEPCK*, *G6Pase* and *GHR* genes were affected by carbohydrate levels and carbohydrate types. At low carbohydrate level (LS group and LG group), the mRNA expression levels of these genes showed the same trend. The mRNA expression levels of *GK* and *GHR* genes were significantly higher at feeding 1W and then began to decline. The mRNA expression level of *PEPCK* gene was the highest at feeding 3W. The mRNA expression level of *G6Pase* genes were significantly higher at feeding 1W, then began to decline and showed a rising trend at feeding 7W. At high carbohydrate levels, the mRNA expression level of *GK* gene in HS group was not significantly different at different feeding stages. But the mRNA expression level of *GK* gene in HG group was increased significantly at feeding 1W. The mRNA expression level of *PEPCK* gene in HS group and HG group had no significant difference at different feeding stages. The mRNA expression level of *G6Pase* gene in HS group had no significant difference at different feeding stages. But the mRNA expression level of *G6Pase* gene in HG group was increased significantly at feeding 3W. The mRNA expression level of *GHR* gene in HG group had no significant difference at different feeding stages, while the mRNA expression level of *GHR* gene in HS group was increased significantly at feeding 3W. In the early feeding stage (1W), the mRNA expression level of *HK* gene was significantly promoted by high carbohydrate diet. While, the mRNA expression levels of *PEPCK*, *G6Pase* and *GHR* genes were suppressed by high carbohydrate diet. In conclusion, this study investigated the effects of different carbohydrates and carbohydrate levels on the expression trend of enzymes and genes involved in glucose metabolism at different feeding stages. It provides a theoretical basis for the application of carbohydrate in feed.

**Key words:** Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio*); glucose; starch; glycolytic enzyme; gluconeogenesis enzyme; gene expression

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

**Funding projects:** Central-level Non-profit Science Research Institutes Special Funds (HSY201605); National Natural Science Foundation of China (31702353); China Agriculture Research System (CARS-45)