



饲料中维生素A对青鱼幼鱼生长、血清生化指标和肝脏糖脂代谢酶活性及基因表达的影响

陈书健^{1,2}, 吴成龙², 叶金云^{2*}, 李荣华¹

(1. 宁波大学海洋学院, 宁波大学应用海洋生物学教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 湖州师范学院生命科学学院, 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)

摘要: 为研究饲料中维生素A(VA)对青鱼幼鱼生长、血清生化指标和肝脏糖脂代谢相关酶活性及基因表达的影响, 实验选取360尾初始体质量为(6.10±0.10)g的青鱼幼鱼, 随机分配至3个实验组中, 每个实验组设置3个平行。采用单因素实验设计, 以无维酪蛋白和明胶为蛋白源、菜籽油为脂肪源、糊精为糖源, 同时添加矿物质混合物和维生素混合物(无VA添加)配制成3组实验饲料, 分别以饲料1(Diet1)、饲料2(Diet2)和饲料3(Diet3)表示。在饲料1、饲料2和饲料3中分别添加0、2 200和20 000 IU/kg VA醋酸酯(500 000 IU/g), 经高效液相色谱法(Agilent-1100, Agilent, 美国)检测后实验饲料中VA的实际含量分别为178.2、2 058.9和18 436.2 IU/kg, 养殖周期为8周。结果显示: 饲料中VA缺乏会显著降低青鱼幼鱼的增重率(WGR)和特定生长率(SGR); VA缺乏会显著降低血清血糖(GLU)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白(LDL)浓度, 增加总胆固醇(TCH)浓度。饲料中添加2 058.9 IU/kg VA能显著提高肝脏己糖激酶(HK)、磷酸果糖激酶(PFK)、丙酮酸激酶(PK)活性, 促进葡萄糖转运蛋白-2 (GLUT-2)、HK、葡萄糖激酶(GK)、PFK和葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)基因表达。当饲料中VA含量为2 058.9 IU/kg时, 对肝脏脂肪酸转运蛋白-1 (FATP-1)基因表达无显著影响, 但显著影响肉碱棕榈酰转移酶-1 (CPT-1)和肉碱棕榈酰转移酶-2 (CPT-2)基因表达。当饲料中VA缺乏时, CPT-1和CPT-2基因表达受到显著性抑制; 当饲料中添加过量VA时, 乙酰辅酶A羧化酶-2 (ACC-2)和脂蛋白酯酶(LPL)基因表达受到抑制; 同时, VA过量组中肝脏过氧化物酶体增殖物激活受体-γ (PPAR-γ)基因表达显著下降。研究表明, 在饲料中添加2 058.9 IU/kg VA可以促进青鱼幼鱼生长, 提高肝脏对葡萄糖的转运能力, 促进糖酵解和糖异生代谢平衡, 同时促进脂肪酸合成和转运。

关键词: 青鱼; 维生素A; 生化指标; 糖脂代谢; 基因表达

中图分类号: S 963.73

文献标志码: A

维生素A(VA)是鱼类生长所必需的脂溶性维生素之一。在自然界中VA以视黄醇、视黄醛和视黄酸3种形式存在, 它参与了生物体的多个生理过程, 在细胞分化和胚胎发育过程中具有重要的作用^[1]。VA缺乏会造成动物生长抑制、视力低下以及繁殖能力下降等诸多生理问题。因此

VA是所有脊椎动物所必需的营养素。在青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)^[2]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[3]、建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)^[4]和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[5]等水产动物中有关VA的研究大多集中在生长性能和免疫能力等方面。

收稿日期: 2019-05-13 修回日期: 2019-05-28

资助项目: 国家大宗淡水鱼产业技术体系岗位科学家任务(CARS-45-11); 国家自然科学基金面上项目(31672669)

通信作者: 叶金云, E-mail: ziff2006@163.com

近年来, VA与动物糖脂代谢的相关性引起了人们的关注。Bonet等^[6]发现, VA及其衍生物能够对哺乳动物脂肪生成、脂肪分解和脂肪酸的氧化产生影响。Jeyakumar等^[7]发现, 长期摄食富含VA食物的大鼠, 可以通过调节肌肉和肝脏中的糖原合成途径来改善高血糖症和葡萄糖耐受等不良症状。而Yosaec等^[8]报道VA及其衍生物可以通过诱导机体的免疫耐受, 进而抑制I型糖尿病的发展, 是抑制I型糖尿病发展的有效方法之一。同时相关研究发现, 类视黄醇类物质与肥胖和糖尿病等糖脂代谢紊乱相关的慢性代谢性疾病存在关联^[9]。在水产动物中, Mohamed等^[1]研究发现, 巨石斑鱼(*Epinephelus tauvina*)幼鱼全鱼粗脂肪随着饲料中VA含量的上升出现下降的趋势, 这说明VA与石斑鱼脂肪沉积具有一定的相关性。

青鱼隶属于脊索动物门(Chordata)、硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、青鱼属(*Mylopharyngodon*), 是中国传统四大家鱼之一。青鱼在我国南方淡水水域分布广泛, 是重要的淡水渔业资源以及人工养殖品种。近年来, 由于市场需求量增大, 青鱼养殖面积有逐年增加的趋势。本研究基于实验室前期的研究基础^[2], 配制饲料1(Diet1)、饲料2(Diet2)和饲料3(Diet3)分别投喂VA缺乏组(178.2 IU/kg)、VA适量组(2 058.9 IU/kg)和VA过量组(18 436.2 IU/kg) 3个实验组青鱼幼鱼。本实验旨在探究饲料中不同VA含量对青鱼幼鱼生长、血清生化指标和肝脏糖脂代谢酶活性及其相关基因表达的影响, 为VA对青鱼糖脂代谢精准调控提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验设计

本实验采用单因素实验设计, 以无维酪蛋白、明胶为蛋白源, 菜籽油为脂肪源, 糊精为糖源, 同时添加矿物质混合物和维生素混合物(无VA添加)配制成3组实验饲料, 分别以饲料1(Diet1)、饲料2(Diet2)和饲料3(Diet3)表示。在饲料1、饲料2和饲料3中分别添加0、2 200和20 000 IU/kg VA醋酸酯(500 000 IU/g), 经高效液相色谱法(Agilent-1100, Agilent, 美国)检测后实验饲料中VA的实际含量分别为178.2、2 058.9和18 436.2 IU/kg。实验饲料配方及营养组成如表1所示。原

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)

项目 items	Diet1	Diet2	Diet3
原料 ingredients			
无维酪蛋白/% casein ¹	36.00	36.00	36.00
明胶/% gelatin ²	5.00	5.00	5.00
糊精/% dextrin ²	25.00	25.00	25.00
菜籽油/% rapeseed oil ³	5.70	5.70	5.70
微晶纤维素/% microcrystalline cellulose ⁴	22.50	22.50	22.50
无机盐混合物/% mineral premix ⁵	2.00	2.00	2.00
维生素混合物/% vitamin premix (vitamin A free) ⁶	1.00	1.00	1.00
诱食剂/% attractant ⁷	2.00	2.00	2.00
羧甲基纤维素钠/% microcrystalline ²	0.50	0.50	0.50
氯化胆碱/% choline chloride ²	0.30	0.30	0.30
维生素A醋酸酯/(IU/kg) vitamin A acetate ⁸	0	2 200	20 000
总计 total	100.00	100.00	100.00
营养水平 nutrient levels			
水份/% moisture	7.98	10.04	9.10
粗灰分/% crude ash	2.37	2.43	2.45
粗脂肪/% crude lipid	4.51	4.54	4.60
粗蛋白/% crude protein	37.12	36.98	37.23
维生素A/(IU/kg) vitamin A	178.2	2 058.9	18 436.2

注: 1. 美国西格玛化工, 美国; 2. 国药集团化学试剂有限公司; 3. 中粮集团有限公司; 4. 湖州市菱湖新望化学有限公司; 5. 矿物质预混料为每千克饲料提供: NaCl 100 mg, MgSO₄·7H₂O 1 200 mg, Ca(H₂PO₄)₂·H₂O 3 g, FeSO₄·H₂O 80 mg, ZnSO₄·H₂O 50 mg, MnSO₄·H₂O 65 mg, CuSO₄·5H₂O 10 mg, CoCl₂·6H₂O 50 mg, KI 0.8 mg, Na₂SeO₃ 0.8 mg, 沸石粉 6.45 g; 6. 维生素预混料为每千克饲料提供: 硫胺素 25 mg, 核黄素 45 mg, 吡哆醇 20 mg, VB₁₂ 0.2 mg, VK₃ 10 mg, 肌醇 800 mg, 泛酸 60 mg, 烟酸 100 mg, 叶酸 20 mg, 生物素 10 mg, VD₃ 3 mg, α -生育酚 300 mg, 抗坏血酸 1 g, 微晶纤维素 2.45g; 7. 诱食剂组成: 牛磺酸: 甜菜碱-盐酸: 甘氨酸 = 1 : 3 : 3; 8. 浙江一星饲料集团有限公司, VA为饲料级VA醋酸酯, 500 000 IU/g

Notes: 1. Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; 2. Sinopharm Chemical Reagent Co., Shanghai, China; 3. COFCO Corporation; 4. Xinwang Chemical Co., St. Huzhou, Zhejiang, China; 5. mineral premix (mg or g/ kg diet): NaCl 100 mg, MgSO₄·7H₂O 1 200 mg, Ca(H₂PO₄)₂·H₂O 3 g, FeSO₄·H₂O 80 mg, ZnSO₄·H₂O 50 mg, MnSO₄·H₂O 65 mg, CuSO₄·5H₂O 10 mg, CoCl₂·6H₂O 50 mg, KI 0.8 mg, Na₂SeO₃ 0.8 mg, Zoelite 6.45 g; 6. vitamin premix (mg or g/ kg diet): thiamin 25 mg, riboflavin 45 mg, pyridoxine HCl 20 mg, vitamin B₁₂ 0.2 mg, vitamin K₃ 10 mg, inositol 800 mg, pantothenic acid 60 mg, niacin acid 100 mg, folic acid 20 mg, biotin 10 mg, cholecalciferol 3 mg, α -tocopherol 300 mg, ascorbic acid 1 g, microcrystalline cellulose 2.45 g; 7. attractant composition: taurine : betain-HCl : glycine = 1 : 3 : 3; 8. Zhejiang Yixing Feed Group Co. Ltd., China, VA is feed grade VA acetate, 500 000 IU/g

料经万能粉碎机粉碎过60目筛后,按饲料配方准确称取各种原料并充分混匀,用双螺杆挤条机(F-26双螺杆挤条机,华南理工大学科技实业有限公司)加工制成直径为1.5 mm的条状,于40℃热空气烘箱中干燥烘干,制成颗粒后存于双层塑料袋中,置于-20℃冰箱中保存。

1.2 实验鱼饲养与管理

本实验于浙江省水生生物资源养护与开发技术研究重点实验室鱼类养殖实验中心进行。在正式实验开展之前,实验用青鱼幼鱼暂养于室内500 L循环水养殖系统中,暂养周期为2周。之后选取个体规格一致、体质健壮的青鱼幼鱼360尾,初始体质量为(6.10±0.10) g。将360尾鱼随机分到3个实验组,每个实验组3个平行,每个平行放养青鱼幼鱼40尾,实验周期为8周。实验期间每天投喂实验饲料2次(08:00和17:00),日投喂量为鱼体总质量的3%。养殖实验期间每两天进行1次换水、吸污,每次换水量小于1/3,水源为充分曝气后的自来水。养殖期间水温为(27.5±1.0)℃,光照与自然光照同步,溶氧含量不低于5.8 mg/L。

1.3 实验样品采集

待养殖实验结束后,禁食24 h以排空肠道内容物。用浓度为50 mg/L的MS-222麻醉,统计尾数并称重。随机选取其中6尾,测量体长并称重。采用尾部静脉采血法采集血液样本,将采集到的血液样本放于4℃冰箱中静置24 h,经2 500 r/min离心15 min,取上层血清保存于-80℃超低温冰箱以备后续实验。将静脉采血完的青鱼幼鱼快速解剖取其肝脏准确称重并存于冻存管中,液氮速冻后转移至-80℃超低温冰箱保存。

1.4 饲料营养成分分析

实验饲料粗蛋白采用凯氏定氮法(kjeltec-2200, FOSS)(丹麦)测定;饲料水分采用105℃烘干恒重法测定;饲料粗脂肪采用索氏抽提法测定,饲料灰分采用马弗炉550℃灼烧法测定。

1.5 生长性能指标计算公式

增重率(weight gain rate, WGR, %)=($W_t - W_0$)/ $W_0 \times 100\%$

特定生长率(specific growth rate, SGR, %/d)=($\ln W_t - \ln W_0$)/ $t \times 100\%$

饲料系数(feed conversion ratio, FCR)= $W_f/(W_t -$

$W_0)$

肝体比(hepatosomatic index, HSI, %)= $W_h/W \times 100\%$

肥满度(condition factor, CF, g/cm³)= $W/L^3 \times 100$

式中, W_t 为终末体质量(g), W_0 为初始体质量(g), t 为实验天数(d), W_f 为摄入饲料量(g), W_h 为鱼肝脏重(g), W_v 为鱼内脏重(g), W 为鱼体质量(g), L 为鱼体长(cm)。

1.6 血清生化指标检测

采集到的血清样本用于检测血糖(GLU)、甘油三脂(TG)、总胆固醇(TCH)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)。以上指标均采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒进行检测。

1.7 肝脏糖脂代谢相关酶活性的检测

肝脏中磷酸果糖激酶(PFK)、磷酸烯醇式丙酮酸激酶(PEPCK)、己糖激酶(HK)和丙酮酸激酶(PK)的活性采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行检测。肝脏中激素敏感性脂肪酶(HSL)和脂肪酸合成酶(FAS)的活性采用南京建成生物工程研究所生产的ELISA试剂盒进行检测。

1.8 组织总RNA提取及cDNA反转

将实验鱼肝脏组织放入盛有液氮的研钵内,在液氮中迅速研磨成粉末状,取约50~100 mg组织粉末放入加有1 mL Trizol的1.5 mL无RNA酶EP管中,根据TRIZOL说明书(TaKaRa, 大连)提取组织总RNA。用1%琼脂糖凝胶电泳对RNA进行完整性检测,用超微量分光光度计(Thermo, NanoDrop 2000)对RNA进行浓度和纯度检测。

利用PrimeScript™反转录试剂盒(Takara, 日本),反转合成cDNA。反应条件:30℃反应10 min,42℃反应60 min,70℃反应15 min后置冰上冷却。反应均在Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf, AG, 22331, Hamburg, German) PCR仪中进行,cDNA合成后存于-20℃冰箱中。

1.9 引物设计及荧光定量PCR

采用Primer 5.0软件设计肝脏糖脂代谢相关基因引物,如表2所示。所有引物均由上海博尚生物科技有限公司合成,以 β -ACTIN为参照基因。

荧光定量PCR反应在荧光定量PCR仪(Bio-rad cfx96, bio-rad, 美国)上进行,25 μ L体系包含1 μ L的cDNA溶液,12.5 μ L 2 \times SYBR Green I Real

表2 荧光定量检测基因引物序列

Tab. 2 Primer sequences for Real-time quantitative PCR

基因 genes	正向引物 (5'-3') forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') reverse primer (5'-3')
β -肌动蛋白 <i>β-actin</i>	CCTTCTTGGGTATGGAGTC	GTCAGCAATGCCAGGGTA
己糖激酶 <i>HK</i>	GGAGTCTGATGTTTCGCTTCT	TCGGCAATTTGACGTGTCT
葡萄糖转运蛋白-2 <i>GLUT-2</i>	CAAACAGGGCAAAGTGGGA	GAGAAGCCGCAAGATGGA
葡萄糖激酶 <i>GK</i>	TATGTTTCGCTCCACTCTG	TCGCTCTTCATCTCCACCC
磷酸果糖激酶 <i>PFK</i>	CAAGCCCATAACCACAGACC	CCCATACGACTCGCCAAA
丙酮酸激酶 <i>PK</i>	ATTATCCCAGCCTAACCCACG	CGACTTCCCAGAATCCCACC
葡萄糖-6-磷酸酶 <i>G6Pase</i>	CTTGAGAAAGCCCAGAGGT	AGTGAAGGCCGAGTCCC
磷酸烯醇式丙酮酸激酶 <i>PEPCK</i>	GGAGCGGAGTTTGTGCG	AACCACTGCCGAAGGATAAG
丙酮酸羧化酶 <i>PEPC</i>	TTGATGTGGCATTGCGTTTC	GGCATTGTCCAGGGTAGTTGGT
果糖1,6-二磷酸酶 <i>FBP</i>	CAGGGAGTCAACTGCTTCA	GATATTCTGTGACATCTGGGTAA
脂肪酸转运蛋白-1 <i>FATP-1</i>	GAACGCTCTTCCCTCTTACGC	CGGTCGGTGGTTTGTCTGG
脂蛋白酯酶 <i>LPL</i>	CAGCCCTGTATGAACGAGA	CAAGCTCAGCCTGTAACCA
激素敏感性脂肪酶 <i>HSL</i>	CTAACATCAGACGCCTCACC	GACAACCCGCACCAGCAT
脂肪酸合成酶 <i>FAS</i>	TGGACGGGTAACCTGGGTGA	CAGAACGGATGCGAGTGGG
乙酰辅酶A羧化酶-2 <i>ACC-2</i>	CCCTCTACACCAACCTTTCC	TGTCGCTGTCCGTCTTTATT
过氧化物酶体增殖物激活受体- α <i>PPAR-α</i>	CCGAGAAGAACTACTTACCCA	ACTGACAGAACAGGAAGAGCC
过氧化物酶体增殖物激活受体- γ <i>PPAR-γ</i>	GCCTCGGGCTTCCATTAC	CACTTGTTGCGACTCTTCTGT
肉碱棕榈酰转移酶-1 <i>CPT-1</i>	ACCGTTACGCTAAATCGC	ATTAAGGCCCATAGTTCCAT
肉碱棕榈酰转移酶-2 <i>CPT-2</i>	ATGCCGCCATAAACCCAC	ACGCCATAGCCCACTCC

time PCR Master Mix(Takara, 日本), 正向引物0.2 $\mu\text{mol/L}$ 和反向引物0.2 $\mu\text{mol/L}$, 加水至25 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 共35个循环。对于任意一个样品, 定量扩增目标基因和内参基因时要加入等量的模板, 计算目标基因和内参基因的 ΔC_t 值进而计算 $\Delta\Delta C_t$, 实验结果采用相对荧光定量法($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法)分析。

1.10 数据统计及分析

实验数据以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 采用SPSS20.0软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 差异显著时, 采用Turkey's进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 维生素A对青鱼幼鱼生长性能的影响

饲养8周后, 各实验组青鱼幼鱼无生病情况。当饲料中VA缺乏时, 青鱼幼鱼WGR和SGR

显著降低($P < 0.05$), 饲料中添加过量的VA对青鱼幼鱼WGR和SGR无显著性影响($P > 0.05$), 但添加过量VA组的FCR为1.87, 显著高于VA适量组($P < 0.05$)。VA缺乏组与VA过量组的HSI和CF与VA适量组相比无显著影响($P > 0.05$)(表3)。

2.2 维生素A对青鱼幼鱼血清生化指标的影响

VA对血清GLU和HDL浓度影响趋势相似, 饲料中VA缺乏或过量均会显著降低血清中GLU和HDL的浓度($P < 0.05$)。当饲料中VA缺乏时, 血清中TG浓度显著降低($P < 0.05$), 但TCH浓度显著升高($P < 0.05$)。此外本实验还发现, 饲料中添加过量的VA会显著降低血清LDL浓度($P < 0.05$), 但VA缺乏对血清LDL浓度无显著性影响($P > 0.05$)(表4)。

2.3 维生素A对青鱼幼鱼肝脏糖代谢酶活性及基因表达的影响

饲料中VA缺乏或过量对肝脏中HK活性均有显著性抑制作用($P < 0.05$)。其中过量组肝脏HK活

表 3 饲料中维生素A含量对青鱼幼鱼生长性能的影响
Tab. 3 Effect of dietary vitamin A content on the growth parameters of juvenile *M. piceus*

项目 items	维生素A含量/(IU/kg) vitamin A content		
	178.2	2 058.9	18 436.2
增重率/% WGR	165.75±16.05 ^a	223.79±12.19 ^b	229.17±16.82 ^b
特定生长率/(%/d) SGR	1.48±0.07 ^a	1.84±0.06 ^b	1.86±0.08 ^b
饲料系数 FCR	1.79±0.08 ^{ab}	1.57±0.21 ^a	1.87±0.07 ^b
肝体比/% HSI	1.45±0.01	1.35±0.16	1.45±0.07
肥满度/(g/cm ³) CF	1.85±0.06	1.79±0.07	1.74±0.06

注: 表中数据均为3组数据的平均值±标准差($n=3$), 且同行数据上标无字母或相同字母表示差异不显著($P>0.05$), 不同字母则表示差异显著($P<0.05$)。下同

Notes: Data represented as mean±SD of three replicates($n=3$). Values in the same row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$). the same below

表 4 饲料中维生素A含量对青鱼幼鱼血清生化指标的影响

Tab. 4 Effect of vitamin A content on blood biochemistic indexes of juvenile *M. piceus*

项目 items	维生素A含量/(IU/kg) vitamin A content		
	178.2	2 058.9	18 436.2
血糖/(mmol/L) GLU	6.70±1.37 ^a	11.30±0.55 ^b	8.58±0.52 ^a
甘油三酯/(mmol/L) TG	1.22±0.07 ^a	2.64±0.34 ^b	3.25±0.72 ^b
总胆固醇/(mmol/L) TCH	3.61±0.37 ^b	2.13±0.19 ^a	2.92±0.76 ^{ab}
低密度脂蛋白/(mmol/L) LDL	2.92±0.60 ^b	3.22±0.81 ^b	2.01±0.52 ^a
高密度脂蛋白/(mmol/L) HDL	2.26±0.21 ^a	3.42±0.24 ^b	2.33±0.22 ^a

性显著低于其余2组($P<0.05$), 为18.92 U/g prot。饲料中VA缺乏会显著抑制肝脏PFK活性($P<0.05$), 但过量组肝脏PFK活性与适量组间无显著性差异($P>0.05$)。饲料中VA缺乏或过量均会抑制肝脏PK活性($P<0.05$)。此外, 与VA适量组相比, VA缺乏组和VA过量组肝脏PEPCK活性无显著性差异($P>0.05$), 但VA缺乏组肝脏PEPCK活性显著低于VA过量组($P<0.05$)(表5)。

饲料中添加过量的VA会显著降低肝脏GLUT-2基因表达($P<0.05$), 饲料中VA缺乏则对GLUT-2基因表达无显著性影响($P>0.05$)。随饲料中VA含量的上升, 青鱼幼鱼肝脏HK、GK、PFK和PEPC基因表达变化趋势一致, 当饲料中VA含量为2 058.9 IU/kg时达到最大。此外, 饲料中VA缺乏会显著降低肝脏PK基因表达($P<0.05$)(图1)。

表 5 饲料中维生素A含量对青鱼幼鱼肝脏糖代谢关键酶活性的影响

Tab. 5 Effects of dietary vitamin A content on the activities of key enzyme of glucose metabolism in liver of juvenile *M. piceus*

项目 items	维生素A含量/(IU/kg) vitamin A content		
	178.2	2 058.9	18 436.2
己糖激酶/(U/g prot) HK	28.75±2.06 ^b	34.99±1.76 ^c	18.92±1.88 ^a
磷酸果糖激酶/(U/g prot) PFK	3.11±0.82 ^a	8.72±1.37 ^b	7.99±1.33 ^b
丙酮酸激酶/(U/g prot) PK	2.48±0.19 ^a	5.15±0.76 ^b	3.25±0.57 ^a
磷酸烯醇式丙酮酸激酶/(U/g prot) PEPCK	22.82±6.38 ^a	29.05±6.41 ^{ab}	36.14±3.59 ^b

VA缺乏或过量对PEPCK和FBP基因表达无显著性影响($P>0.05$)。与VA适量组相比, 饲料中VA缺乏对青鱼幼鱼肝脏G6Pase基因表达无显著性影响($P>0.05$), 但当饲料中添加18 436.2 IU/kg VA时, 青鱼幼鱼肝脏G6Pase基因表达显著下降($P<0.05$)(图2)。

2.4 维生素A对青鱼幼鱼肝脏脂代谢酶活性及基因表达的影响

饲料中VA缺乏显著降低肝脏HSL和FAS活性($P<0.05$), 过量组肝脏HSL和FAS活性与适量组相比无显著差异($P>0.05$)(表6)。

VA缺乏或过量对肝脏FATP-1基因表达无显著影响($P>0.05$)。VA缺乏组肝脏CPT-1和CPT-2基因表达显著降低($P<0.05$), 过量的VA对肝脏CPT-1和CPT-2基因表达无显著性影响($P>0.05$)(图3)。

VA缺乏或过量对肝脏HSL和PPAR- α 基因表达无显著影响($P>0.05$)。在饲料中添加过量VA组中, 肝脏LPL基因表达显著降低($P<0.05$), 同时饲料中VA含量的提高有助于ACC-2基因表达水平提高。此外, 饲料中添加18 436.2 IU/kg VA青鱼幼鱼肝脏PPAR- γ 基因表达显著降低($P<0.05$), 饲料中VA缺乏则对PPAR- γ 基因表达无显著性影响($P>0.05$)(图4)。

3 讨论

VA是动物生长的必需营养素之一。本研究表明, 饲料中VA缺乏会显著降低青鱼幼鱼的WGR和SGR, 这与在日本牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[10-11]和草鱼^[12]上的研究结果一致。此外, 在团头鲂^[5]、巨石斑鱼^[1]和日本牙鲆^[11]的研

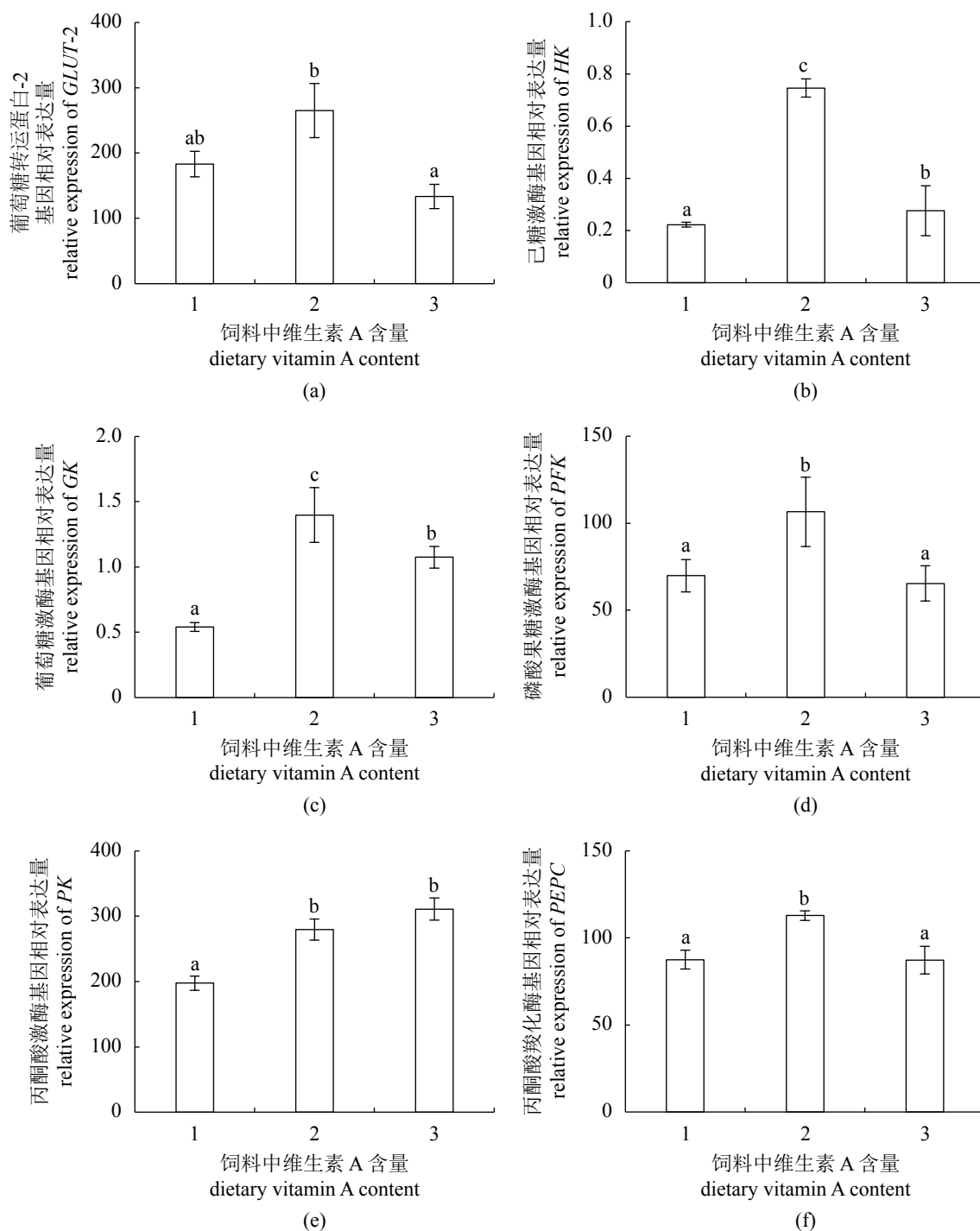


图 1 饲料中VA对青鱼幼鱼肝脏葡萄糖转运蛋白-2和糖酵解关键酶基因表达的影响

1. 178.2 IU/kg, 2. 2 058.9 IU/kg, 3. 18 436.2 IU/kg, 字母不同表示差异显著($P<0.05$), 下同。(a) 饲料中VA含量对肝脏GLUT-2基因相对表达量的影响; (b) 饲料中VA含量对肝脏HK基因相对表达量的影响; (c) 饲料中VA含量对肝脏GK基因相对表达量的影响; (d) 饲料中VA含量对肝脏PFK基因相对表达量的影响; (e) 饲料中VA含量对肝脏PK基因相对表达量的影响; (f) 饲料中VA含量对肝脏PEPC基因相对表达量的影响

Fig. 1 Effects of dietary vitamin A on the gene expression of GLUT-2 and the key enzyme of glycolysis in liver of juvenile *M. piceus*

1. 178.2 IU/kg, 2. 2 058.9 IU/kg, 3. 18 436.2 IU/kg, labels with different letters indicate significant differences ($P<0.05$), the same below. (a) effect of dietary vitamin A on the gene expression of GLUT-2; (b) effect of dietary vitamin A on the gene expression of HK, (c) effect of dietary vitamin A on the gene expression of GK, (d) effect of dietary vitamin A on the gene expression of PFK, (e) effect of dietary vitamin A on the gene expression of PK, (f) effect of dietary vitamin A on the gene expression of PEPC

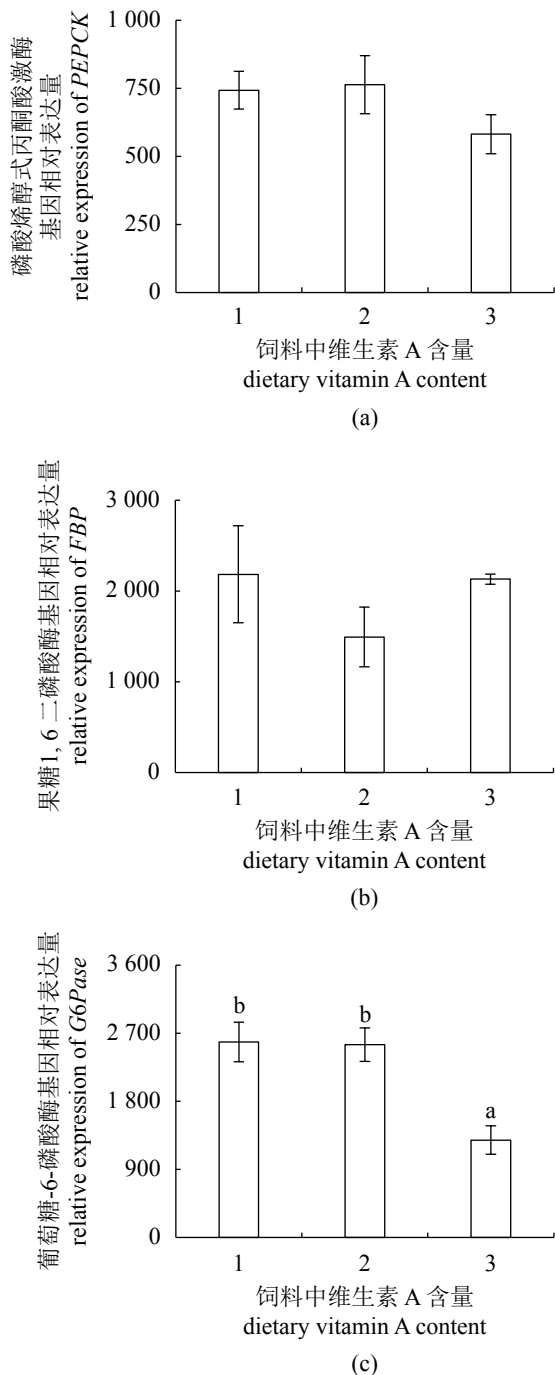


图2 饲料中维生素A对青鱼幼鱼肝脏糖异生关键酶基因表达的影响

(a) 饲料中VA含量对肝脏PEPCK基因相对表达量的影响; (b) 饲料中VA含量对肝脏FBP基因相对表达量的影响; (c) 饲料中VA含量对肝脏G6Pase基因相对表达量的影响

Fig. 2 Effects of dietary vitamin A on the gene expression of the key enzyme of gluconeogenesis in liver of juvenile *M. piceus*

(a) effect of dietary vitamin A on the gene expression of PEPCK; (b) effect of dietary vitamin A on the gene expression of FBP; (c) effect of dietary vitamin A on the gene expression of G6Pase

表6 饲料中维生素A对青鱼幼鱼肝脏脂代谢相关酶活性的影响

Tab. 6 Effects of dietary vitamin A on the activities of key enzyme of lipid metabolism in liver of juvenile *M. piceus*

项目 items	维生素A含量/(IU/kg) vitamin A content		
	178.2	2 058.9	18 436.2
激素敏感性脂肪酶/ (U/mg prot) HSL	211.34±60.66 ^a	301.40±26.17 ^b	277.07±15.73 ^{ab}
脂肪合成酶/ (U/mg prot) FAS	17.27±5.21 ^a	25.52±7.21 ^b	26.81±2.92 ^b

究中发现, 饲料中添加过量VA对FCR有显著性影响, 这与本实验结果一致。

动物血清生化指标的变化很大程度上与机体营养状况相关^[13]。本研究中青鱼幼鱼血清GLU水平受饲料VA含量影响显著, 饲料中VA缺乏或过量均会显著降低青鱼幼鱼GLU水平。机体血糖水平一般处于一种动态平衡状态, 极易受到外界的刺激而发生变化^[14]。有报道指出, VA缺乏会导致肾上腺萎缩及糖异生作用减弱^[15], 这可能是导致摄食VA缺乏饲料的青鱼幼鱼血清GLU水平低下的原因之一。此外有研究发现, 类维甲酸类物质可以增强糖尿病模型小鼠胰岛素敏感性, 从而降低糖尿病模型小鼠的血糖水平^[16]。本实验结果发现, 饲料中添加过量VA能使青鱼幼鱼血糖浓度显著降低, 说明VA在降低鱼类血糖浓度方面有一定的可行性。有研究表明, 饲料中VA含量为4 000 IU/kg时能够显著降低斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)血清TCH浓度^[17]。本研究发现, 饲料中添加适量的VA能够显著降低青鱼幼鱼血清TCH浓度, 这与上述结果一致。同时有研究报道, 添加过量的VA会导致花鲈(*Lateolabrax japonicus*)肝脏损伤, 进而导致TCH和TG合成减少^[18]。本研究发现, 饲料中VA缺乏能显著降低青鱼幼鱼血清TG浓度, 但过量组与适量组间无显著性差异。作为机体内胆固醇的主要运输者, HDL通过胆固醇的逆向转运把外周组织中衰老细胞膜上的胆固醇以及血浆中的胆固醇运回肝脏代谢, 而LDL是向组织转运肝脏合成的内源性胆固醇。本实验中, 过量的VA能够显著降低青鱼幼鱼血清LDL和HDL浓度, 这可能是由于饲料中VA缺乏或过量限制了LDL和HDL的合成。目前有关VA与水生动物的糖脂代谢相关的研究较为有限, 有关VA与动物血糖、血清总胆固醇等相互关系及其作用机理还有待进一步做分子机制的研究。

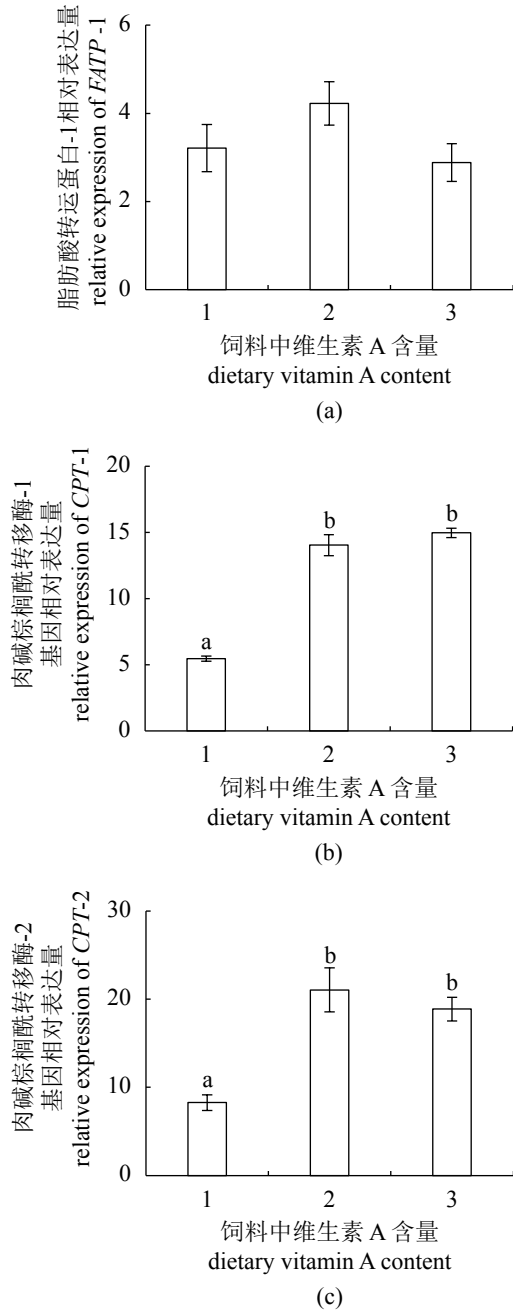


图3 饲料中VA含量对青鱼幼鱼肝脏脂肪酸转运相关基因表达的影响

(a) 饲料中VA含量对肝脏FATP-1基因相对表达量的影响; (b) 饲料中VA含量对肝脏CPT-1基因相对表达量的影响; (c) 饲料中VA含量对肝脏CPT-2基因相对表达量的影响

Fig. 3 Effects of dietary vitamin A content on the expression of genes related to lipid transporter in liver of juvenile *M. piceus*

(a) effect of dietary vitamin A on the gene expression of FATP-1; (b) effect of dietary vitamin A on the gene expression of CPT-1; (c) effect of dietary vitamin A on the gene expression of CPT-2

肝脏是动物机体重要的代谢器官, 是糖脂代谢的主要场所, 在鱼类代谢中发挥重要作用^[19]。

鱼类糖代谢包括糖转运、糖酵解、糖异生、三羧酸循环、磷酸戊糖途径和糖原的合成及降解等途径^[20]。动物利用糖类物质的能力取决于对葡萄糖的摄取能力、氧化利用能力和将多余葡萄糖转化为脂肪及糖原进行储存的能力^[21]。VA是脊椎动物所必需的脂溶性维生素, 在动物体内除参与细胞分化、细胞增殖、胚胎发育以及促进动物生长等多个重要的生理过程以外, 也参与到动物的糖代谢过程中, 对维持动物健康具有重要作用^[22]。有研究表明, PEPCK和ACC等糖代谢相关基因在mRNA和蛋白质水平上受到VA的调控^[23]。

糖酵解是包括鱼类在内的所有生物体内葡萄糖分解代谢的关键途径。有报道指出, 在动物糖酵解的一系列酶促反应中, 其酶活性受VA水平的影响^[24]。本实验结果显示, 饲料中添加适量的VA能显著增强肝脏HK和PK活性。Saumet等^[25]研究发现, 维甲酸(RA)参与乳腺癌细胞的糖酵解调节, RA缺乏会显著抑制细胞乳酸的产生。乳酸是葡萄糖经糖酵解作用产生的丙酮酸在缺氧条件下还原生成的产物, 因此该研究能够在一定程度上说明VA及其衍生物的缺乏对糖酵解途径的抑制作用。PEPCK是糖异生途径的关键限速酶, 其活性可影响机体对糖代谢的调节。在本实验中发现, 饲料中VA缺乏或过量对肝脏PEPCK活性无显著性影响。Scribner等^[26]报道, VA缺乏会导致小鼠肝脏PEPCK基因表达下调, 且PEPCK基因表达的抑制现象可以通过补充VA得到恢复, 证实了VA在促进PEPCK基因表达过程中的作用。与本实验的结果有所不同, 这可能是由于物种差异导致的。

在动物糖代谢过程中, 机体将葡萄糖从血液转运至细胞和组织的过程是糖类物质在经消化、吸收后最为重要的一步, 这一步的实现依赖于葡萄糖转运蛋白(GLUT)的转运^[27]。GLUT-2是肝细胞、胰岛β细胞和上皮细胞中主要的葡萄糖转运蛋白亚型。本研究通过荧光定量PCR检测发现, 饲料中添加过量VA会抑制青鱼幼鱼肝脏GLUT-2基因表达。这一结果与Blumentrath等^[28]通过细胞培养所获得的结果较为相似, 高剂量的全反式维甲酸会抑制细胞GLUT-2基因的表达。由此可推测饲料中过量的VA会降低细胞或组织对葡萄糖的转运能力。但在本实验中发现, 饲料中添加过量VA对青鱼幼鱼血糖浓度有一定的

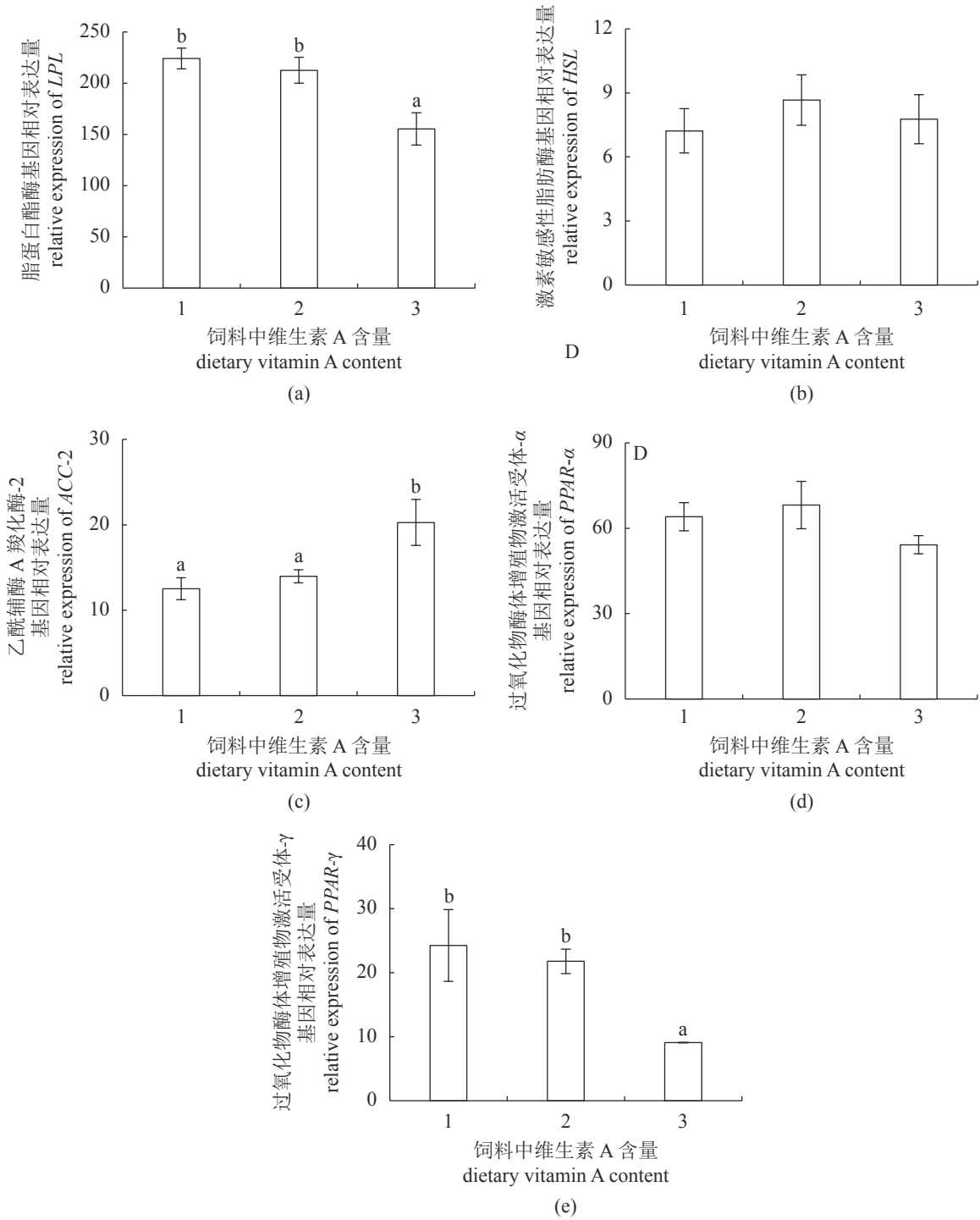


图 4 饲料中维生素A含量对青鱼幼鱼肝脏脂代谢基因表达的影响

(a) 饲料中VA含量对肝脏LPL基因相对表达量的影响; (b) 饲料中VA含量对肝脏HSL基因相对表达量的影响; (c) 饲料中VA含量对肝脏ACC-2基因相对表达量的影响; (d) 饲料中VA含量对肝脏PPAR-α基因相对表达量的影响; (e) 饲料中VA含量对肝脏PPAR-γ基因相对表达量的影响

Fig. 4 Effects of dietary vitamin A content on the expression of genes related to lipid metabolism in liver of juvenile *M. piceus*

(a) effect of dietary vitamin A on the gene expression of LPL; (b) effect of dietary vitamin A on the gene expression of HSL; (c) effect of dietary vitamin A on the gene expression of ACC-2; (d) effect of dietary vitamin A on the gene expression of PPAR-α; (e) effect of dietary vitamin A on the gene expression of PPAR-γ

降低作用,推测饲料中过量的VA致使青鱼幼鱼对葡萄糖转运能力的下降也是导致VA过量组青鱼幼鱼血糖水平降低的原因之一。同时,饲料中添加过量的VA是否影响肠道对葡萄糖的吸收进而影响血糖浓度也有待进一步研究。

对糖酵解途径关键酶基因检测发现,饲料中VA缺乏或过量均会导致肝脏HK、GK和PFK基因表达下降。Cabrera-Valladares等^[29]研究发现,维甲酸能够刺激成熟全分化肝细胞和新生儿肝细胞中GK基因的表达水平提高,同时维甲酸的处理能够诱导胰岛素缺乏大鼠GK基因的转录,并指出GK活性的调节是通过对GK基因转录水平长期调节的结果。饲料中VA缺乏对肝脏PK基因表达有显著性抑制作用,但饲料中添加过量的VA对PK基因表达无显著性影响,这与酶活水平的变化趋势有所不同。在酶促反应中,酶活性受到酶浓度、底物浓度和温度等综合因素影响,本实验结果显示,饲料中高水平VA对糖酵解反应中GK、HK和PFK等酶活性及基因表达水平有显著性抑制作用,这可能会导致糖酵解产物丙酮酸含量的降低,进而致使PK活性的降低,这可能是导致PK活性与其基因表达趋势不符的原因之一。实验结果显示,饲料中添加适量的VA有助于促进糖酵解途径关键酶活性及基因表达,但对其内在的分子机制还有待进一步研究。

饲料中VA缺乏或过量均会使PEPC基因表达量显著下调,抑制丙酮酸形成草酰乙酸进入三羧酸循环,这一研究结果与啮齿类中的研究报告一致,VA过多或缺乏均会影响肝脏的糖代谢^[30]。此外本实验还发现,饲料中VA对糖异生关键酶PEPCK和FBP基因表达无显著性影响。同时,与适量组相比,VA缺乏组和过量组肝脏PEPCK活性无显著性差异。这说明饲料中VA缺乏或过量在降低糖酵解酶活性及基因表达水平的同时,PEPCK和FBP活性及基因表达保持一个相对稳定的状态。有报道指出在大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中糖异生途径关键酶活性不受饲料中营养水平的影响,其活性处于一种相对稳定状态^[19]。说明糖异生酶活性较为稳定,VA缺乏对糖酵解有抑制作用,对糖异生无显著性影响,在一定程度上能够反映糖异生作用占主导。饲料中VA缺乏对糖异生作用无显著性影响。但在小鼠

的研究中发现,饲料中VA缺乏将显著抑制小鼠肝脏PEPCK基因的表达,但对FBP基因表达无显著性影响^[31],这与本实验结果有所差异,这可能是由于物种差异等原因导致。G6Pase是糖异生和糖原分解最后一步反应的限速酶,本实验发现VA过量组肝脏G6Pase基因表达受到显著性抑制,但对VA缺乏组肝脏G6Pase基因表达无显著性影响。由此可见,饲料中过量的VA会抑制青鱼幼鱼肝脏糖异生作用。同时VA过量对糖酵解和糖异生作用均有抑制现象,则推测由于过量的VA具有毒性作用,从而导致了肝脏糖代谢紊乱。此外Chertow等^[32]报道指出,VA缺乏或过量会影响大鼠胰腺 α 细胞胰高血糖素的分泌,同时对胰岛素分泌也具有一定影响,并指出视黄醇对胰岛素正常分泌的重要性。因此,VA缺乏或过量对动物糖代谢产生影响可能是由于VA过多或缺乏导致的激素分泌异常,从而对糖代谢产生影响。糖酵解和糖异生是2个相互调节的过程。本实验结果显示,饲料中VA缺乏会显著降低糖酵解相关酶活性及其基因表达,从而降低糖酵解作用,但VA缺乏对青鱼幼鱼肝脏糖异生作用无显著性影响,则可说明VA缺乏会降低糖酵解作用但糖异生作用保持相对稳定。饲料中添加适量的VA有助于维持肝脏糖酵解和糖异生作用的代谢平衡。但过量的VA对糖酵解和糖异生相关酶活性及基因有显著抑制作用,可能是由于过量的VA具有毒性作用,从而导致了肝脏糖代谢紊乱。因此,与VA缺乏组或过量组相比饲料中添加适量的VA会促进肝脏糖酵解和糖异生作用的代谢平衡,但其具体机理还有待进一步深入研究。

碳水化合物经糖酵解途径生成丙酮酸,丙酮酸经氧化脱羧后形成乙酰辅酶A,乙酰辅酶A作为脂肪酸从头合成的原料参与脂肪酸合成。糖酵解过程中产生的磷酸二羟丙酮可以还原为甘油,甘油与脂肪酸合成脂肪完成能量的储存过程。当鱼类面临食物短缺或饥饿状态时,脂肪酸的分解代谢是能量的主要来源。脂肪酸在多种酶的催化作用下通过 β 氧化的方式释放乙酰辅酶A和还原型辅酶I(NADH),分别进入三羧酸循环以及通过氧化磷酸化作用形成ATP。因此,糖代谢和脂代谢是相互联系的一个代谢过程。

哺乳动物中的研究发现,饲料营养水平的

变化会影响HSL的活性或其基因表达^[33]。本实验发现,饲料中适量的VA对青鱼幼鱼肝脏HSL活性有一定程度的提高,饲料中VA缺乏时肝脏HSL活性显著下降。有关饲料中VA对肝脏HSL活性的影响未见相关报道,但杨奇慧等^[41]研究发现,饲料中VA缺乏会导致斜带石斑鱼肝脏肝脂酶(HL)活性显著降低。HL和HSL在功能上同属脂肪分解相关酶,该结果与本实验结果相似。

FAS是参与动物脂肪酸从头合成的关键酶,其活性及基因表达水平受饲料营养成分及多种激素的调控。McClintick等^[34]研究发现,视黄醇的缺乏会降低大鼠肝脏FAS基因的表达。在本实验中,饲料中VA对青鱼幼鱼肝脏FAS活性影响显著,饲料中VA缺乏会显著抑制肝脏FAS的活性,但添加过量VA对肝脏FAS活性无显著性影响。这一研究结果与建鲤^[4]的研究结果相一致。

近年来的研究发现,维甲酸在机体内能够影响脂肪细胞的分化,并且体内VA水平会影响动物脂肪组织的功能及其发育^[35]。鱼类由于缺乏皮下脂肪层,脂肪的储存部位主要在肠系膜脂肪组织、肝脏和肌肉,肝脏是鱼类进行脂肪 β 氧化的主要场所^[36]。乙酰辅酶A羧化酶(ACC)是体内脂肪酸合成酶的关键酶,脂蛋白酯酶(LPL)和激素敏感性脂肪酶(HSL)是动物脂肪分解的关键酶,可将甘油三酯分解为甘油和脂肪酸^[37-38]。本研究结果显示,当饲料中含18 436.2 IU/kg VA时,肝脏LPL基因表达受到抑制,表明VA过量对肝脏脂肪分解有抑制作用,这一结果与Yang等^[17]研究结果一致。当饲料中添加过量的VA时,肝脏中ACC-2基因表达显著上升,推测可能会导致脂肪合成的增加。在牙鲆中的研究发现,随着饲料中VA含量的上升,牙鲆体脂含量随之上升^[11],这可能是由于饲料中高水平VA导致脂肪酸合成增加的结果。肉碱棕榈酰转移酶是催化长链脂肪酸转运至线粒体基质进行 β 氧化的限速酶,在能量代谢中起关键作用^[39-40]。本研究发现,VA缺乏组青鱼幼鱼肝脏CPT-1和CPT-2基因表达显著下降,从而导致脂肪酸 β 氧化能力下降,但随着VA含量的上升,CPT-1和CPT-2基因表达量上升。由此可推测,VA有助于促进脂肪酸从头合成基因的表达,并提高长链脂肪酸往线粒体内膜中转运,增加肝脏甘油三酯分解酶基因的表达,这与斜带石斑鱼的研究结果相似^[17]。

此外,饲料中VA含量对肝脏过氧化物酶体

增殖物激活受体- α (PPAR- α)基因表达无显著性影响。但添加过量VA对肝脏PPAR- γ 基因表达有显著性抑制作用。PPARs是由配体激活的核转录因子,属于类固醇、维甲酸和甲状腺受体超家族,参与了如肥胖形成、炎症以及糖脂代谢等多个生物学过程,调控细胞内外脂代谢基因的表达,同时也参与脂肪细胞的分化^[41]。视黄醇X受体 (retinoid X receptors, RXRs)属于配体依赖性核受体家族成员,能与PPARs结合形成异源二聚体,参与调控脂肪细胞分化。VA在体内代谢产生的RA可以激活维甲酸受体(RAR),竞争性地结合RXRs,抑制PPARs与RXRs的结合,最终抑制脂肪细胞分化^[42]。这可能是VA过量组中PPAR- γ 基因表达显著下调的原因之一。

本研究发现,饲料中添加适量的VA能够促进糖酵解和糖异生代谢平衡,同时对维持脂肪酸的转运、分解及合成具有重要意义,为促进青鱼幼鱼生长和糖脂代谢稳定提供参考。

4 结论

本实验发现饲料中添加2 058.9 IU/kg VA能提高青鱼幼鱼生长性能,提高肝脏对葡萄糖的转运能力,促进糖酵解和糖异生代谢平衡,同时促进脂肪酸合成和转运。

参考文献:

- [1] Mohamed J S, Sivaram V, Roy T S C, *et al.* Dietary vitamin A requirement of juvenile greasy grouper (*Epinephelus tauvina*)[J]. *Aquaculture*, 2003, 219(1-4): 693-701.
- [2] 陈炼,吴成龙,张易祥,等.维生素A对青鱼幼鱼生长、代谢、抗氧化能力和免疫能力的影响[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(7): 2594-2605.
Chen L, Wu C L, Zhang Y X, *et al.* Effects of vitamin A on growth, metabolism, antioxidant capacity and immunity of juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(7): 2594-2605(in Chinese).
- [3] 蒋明.草鱼幼鱼对维生素A、D和K需要量的研究[D].武汉:华中农业大学,2007.
Jiang M. Studies on requirements of dietary vitamin A, D and K for grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fingerling[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007(in Chinese).
- [4] 杨奇慧,周小秋.维生素A缺乏对建鲤生长性能及免疫

- 功能的影响[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(1): 62-67.
- Yang Q H, Zhou X Q. Effects of dietary vitamin A deficiency on growth performance and immune responses of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(1): 62-67(in Chinese).
- [5] Liu B, Zhao Z X, Brown P B, *et al.* Dietary vitamin A requirement of juvenile Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) determined by growth and disease resistance[J]. *Aquaculture*, 2016, 450: 23-30.
- [6] Bonet M L, Ribot J, Palou A. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2012, 1821(1): 177-189.
- [7] Jeyakumar S M, Sheril A, Vajreswari A. Vitamin A improves hyperglycemia and glucose-intolerance through regulation of intracellular signaling pathways and glycogen synthesis in WNIN/GR-Ob obese rat model[J]. *Preventive Nutrition and Food Science*, 2017, 22(3): 172-183.
- [8] Yosae S, Fakhrebadi M A, Shidfar F. Positive evidence for vitamin A role in prevention of type 1 diabetes[J]. *World Journal of Diabetes*, 2016, 7(9): 177-188.
- [9] Howell M L, Chen G X. Is there a role of vitamin A in hepatic glucose and fatty acid metabolism?[J]. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 2012, 2(6): 111.
- [10] Hernandez L H H, Teshima S I, Koshio S, *et al.* Effects of vitamin A on growth, serum anti-bacterial activity and transaminase activities in the juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Aquaculture*, 2007, 262(2): 444-450.
- [11] Hernandez L H H, Teshima S I, Ishikawa M, *et al.* Dietary vitamin A requirements of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2005, 11(1): 3-9.
- [12] Köprücü K. Effects of dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and body composition of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of Fisheries Sciences*, 2012, 6(3): 243-251.
- [13] Abdel-Tawwab M, Ahmad M H, Khattab Y A E, *et al.* Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)[J]. *Aquaculture*, 2010, 298(3-4): 267-274.
- [14] 王猛强, 黄文文, 周飘苹, 等. 不同蛋白质和小麦淀粉水平对大黄鱼生长性能、糖酵解和糖异生关键酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2015, 39(11): 1690-1701.
- Wang M Q, Huang W W, Zhou P P, *et al.* Effects of dietary protein and wheat starch levels on growth performance, hepatic glycolysis and gluconeogenic key enzymes activities in large yellow croaker (*Larimichthys crocea* Richardson)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(11): 1690-1701(in Chinese).
- [15] 杨凤. 动物营养学[M]. 第2版. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- Yang F. *Animal Nutrition*[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2002(in Chinese).
- [16] Deng T, Shan S, Li Z B, *et al.* A new retinoid-like compound that activates peroxisome proliferator-activated receptors and lowers blood glucose in diabetic mice[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 28(7): 1192-1196.
- [17] Yang Q H, Ding M Y, Tan B P, *et al.* Effects of dietary vitamin A on growth, feed utilization, lipid metabolism enzyme activities, and fatty acid synthase and hepatic lipase mRNA expression levels in the liver of juvenile orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Aquaculture*, 2017, 479: 501-507.
- [18] 张璐, 李静, 谭芳芳, 等. 饲料中不同维生素A含量对花鲈生长和血清生化指标的影响[J]. *水产学报*, 2015, 39(1): 88-96.
- Zhang L, Li J, Tan F F, *et al.* Effects of different dietary vitamin A levels on growth and serum biochemical parameters for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(1): 88-96(in Chinese).
- [19] Zhou C P, Ge X P, Niu J, *et al.* Effect of dietary carbohydrate levels on growth performance, body composition, intestinal and hepatic enzyme activities, and growth hormone gene expression of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*[J]. *Aquaculture*, 2015, 437: 390-397.
- [20] 陆游, 周飘苹, 袁野, 等. 不同小麦淀粉和脂肪水平对大黄鱼的生长性能、饲料利用及糖代谢关键酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2017, 41(2): 297-310.
- Lu Y, Zhou P P, Yuan Y, *et al.* Effects of different wheat starch and lipid levels on growth performance, feed utilization and hepatic carbohydrate metabolism key enzymes activities in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(2): 297-310(in Chinese).
- [21] Guo R, Liu Y J, Tian L X, *et al.* Effect of dietary cornstarch levels on growth performance, digestibility and microscopic structure in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Quoy and Gmelin)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(2): 297-310(in Chinese).

- Litopenaeus vannamei* reared in brackish water[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2006, 12(1): 83-88.
- [22] Maden M. The role of retinoic acid in embryonic and post-embryonic development[J]. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2000, 59(1): 65-73.
- [23] Li Y, Li R, Chen G X. Vitamin A's role in the regulation of hepatic glucose and lipid metabolism during the transition from fasting to refeeding[M]//Preedy V, Patel V B. Handbook of Famine, Starvation, and Nutrient Deprivation. Cham: Springer, 2018: 1-17.
- [24] Chen W, Chen G X. The roles of vitamin A in the regulation of carbohydrate, lipid, and protein metabolism[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2014, 3(2): 453-479.
- [25] Saumet A, Vetter G, Bouttier M, *et al.* Estrogen and retinoic acid antagonistically regulate several microRNA genes to control aerobic glycolysis in breast cancer cells[J]. *Molecular BioSystems*, 2012, 8(12): 3242-3253.
- [26] Scribner K B, Odom D P, McGrane M M. Nuclear receptor binding to the retinoic acid response elements of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in vivo: effects of vitamin A deficiency[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2007, 18(3): 206-214.
- [27] Kamalam B S, Medale F, Panserat S. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: new insights on influencing factors, biological limitations and future strategies[J]. *Aquaculture*, 2017, 467: 3-27.
- [28] Blumentrath J, Neye H, Verspohl E J. Effects of retinoids and thiazolidinediones on proliferation, insulin release, insulin mRNA, GLUT 2 transporter protein and mRNA of INS - 1 cells[J]. *Cell Biochemistry & Function*, 2001, 19(3): 159-169.
- [29] Cabrera-Valladares G, Matschinsky F M, Wang J H, *et al.* Effect of retinoic acid on glucokinase activity and gene expression in neonatal and adult cultured hepatocytes[J]. *Life Sciences*, 2001, 68(25): 2813-2824.
- [30] Zhao S, Li R, Li Y, *et al.* Roles of vitamin A status and retinoids in glucose and fatty acid metabolism[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2012, 90(2): 142-152.
- [31] Shin D J, McGrane M M. Vitamin A regulates genes involved in hepatic gluconeogenesis in mice: Phosphoenolpyruvate carboxykinase, fructose-1, 6-bisphosphatase and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase[J]. *The Journal of Nutrition*, 1997, 127(7): 1274-1278.
- [32] Chertow B S, Driscoll H K, Blaner W S, *et al.* Effects of vitamin A deficiency and repletion on rat glucagon secretion[J]. *Pancreas*, 1994, 9(4): 475-484.
- [33] Gaidhu M P, Anthony N M, Patel P, *et al.* Dysregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: role of ATGL, HSL, and AMPK[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2010, 298(4): C961-C971.
- [34] McClintick J N, Crabb D W, Tian H J, *et al.* Global effects of vitamin A deficiency on gene expression in rat liver: Evidence for hypoandrogenism[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2006, 17(5): 345-355.
- [35] Bonet M L, Ribot J, Felipe F, *et al.* Vitamin A and the regulation of fat reserves[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003, 60(7): 1311-1321.
- [36] 汪福保, 罗莉, 李云, 等. 镁对草鱼生长和脂肪代谢的影响[J]. *动物营养学报*, 2010, 22(1): 93-99.
- Wang F B, Luo L, Li Y, *et al.* Effects of magnesium on growth and lipid metabolism of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(1): 93-99(in Chinese).
- [37] Kittilson J D, Reindl K M, Sheridan M A. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess two hormone-sensitive lipase-encoding mRNAs that are differentially expressed and independently regulated by nutritional state[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2011, 158(1): 52-60.
- [38] Albalat A, Sánchez-Gurmaches J, Gutiérrez J, *et al.* Regulation of lipoprotein lipase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 146(3): 226-235.
- [39] Obici S, Feng Z H, Arduini A, *et al.* Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production[J]. *Nature Medicine*, 2003, 9(6): 756-761.
- [40] Shi X C, Sun J, Yang Z, *et al.* Molecular characterization and nutritional regulation of carnitine palmitoyltransferase (CPT) family in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 203: 11-19.
- [41] Gross B, Pawlak M, Lefebvre P, *et al.* PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2017, 13(1): 36-49.
- [42] Amengual J, Gouranton E, Helden Y G J, *et al.* Beta-carotene reduces body adiposity of mice via BCMO1[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20644.

Effect of dietary vitamin A on growth, serum biochemical index, digestive enzyme activities and glucose and lipid metabolism in juvenile *Mylopharyngodon piceus*

CHEN Shujian^{1,2}, WU Chenglong², YE Jinyun^{2*}, LI Ronghua¹

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Key Laboratory of Aquatic Resources Conservation and Development Technology Research, College of Life Science, Huzhou Normal University, Huzhou 313000, China)

Abstract: An 8-week feeding trial was carried out to investigate the effect of dietary vitamin A (178.2, 2 058.9, 18 436.2 IU/kg) on growth performance, serum biochemical index and hepatic glucose and lipid metabolism key enzyme activities and gene expression levels of juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus*). Using a one-factor experiment design, three isonitrogenous and isoenergetic purified experimental diets (diet 1, diet 2 and diet 3) containing 0, 2 200 and 20 000 IU/kg VA were formulated. Total vitamin A contents in the diets were measured by HPLC (Agilent-1100, Agilent, USA), actual content of vitamin A in each diet were 178.2, 2 058.9 and 18 436.2 IU/kg, respectively. Casein (vitamin free) and gelatin were used as protein sources, rapeseed oil was used as lipid source, dextrin was used as carbohydrate source. Total 360 juvenile black carp with initial weight (6.10 ± 0.10) g were randomly divided into 3 groups with 3 replicates per group and 40 black carp per replicate. The results showed as follows: weight gain rate (WGR) and specific growth rate (SGR) were significantly reduced for fish fed diet with 178.2 IU/kg VA. When VA is deficient, concentrations of serum glucose (GLU), triglycerides and low-density lipoprotein (LDL) were decreased, but total cholesterol (TCH) concentration was increased. The activities of hexokinase (HK), phosphofructokinase (PFK) and pyruvate (PK) increased for fish fed diet with 2 058.9 IU/kg VA. Gene expression of liver glucose transporter-2 (*GLUT-2*), *HK*, *GK*, *PFK* and *G6Pase* were increased in fish fed diet with 2 058.9 IU/kg VA. However, there were no significant differences in the gene expression of fatty acid transporter protein-1 (*FATP-1*) for fish fed diet with 2 058.9 IU/kg VA. But the gene expression of Carnitine O-palmitoyltransferase-1 (*CPT-1*) and Carnitine O-palmitoyltransferase-2 (*CPT-2*) were significantly influenced. The gene expression of *CPT-1* and *CPT-2* were inhibited for fish fed VA deficient diet. When fish fed diet with 18 436.2 IU/kg VA, the expression of acetyl-CoA carboxylase-2 (*ACC-2*) and lipoprotein lipase (*LPL*) genes were inhibited. Besides, the gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (*PPAR-\gamma*) decreased when the VA content was 18 436.2 IU/kg in feed. Overall, fish fed diet with 2 058.9 IU/kg VA could improve growth performance and ability of liver cells to transport glucose of juvenile black carps. Diet with 2 058.9 IU/kg VA could keep a balance between glycolysis and gluconeogenesis, and it also could promote fatty acids synthesis and transport.

Key words: *Mylopharyngodon piceus*; vitamin A; biochemical index; glucose and lipid metabolism; gene expression

Corresponding author: YE Jinyun. E-mail: ziff2006@163.com

Funding projects: Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-45-11); National Natural Science Foundation of China (31672669)