



棉子糖对刺参幼参生长、生理指标及糖代谢的影响

郭鹏^{1,2}, 王际英^{1*}, 李宝山^{1*}, 王美琪^{1,2}, 孙永智¹,
黄炳山¹, 王世信¹

(1. 山东省海洋资源与环境研究院, 山东省海洋生态修复重点实验室, 山东烟台 264006;
2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心,
水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306)

摘要: 为研究饲料中添加棉子糖对刺参生长、消化与糖代谢的影响, 实验以初始体质量为 (11.46±0.06) g 的刺参幼参为对象, 在基础饲料中添加包膜棉子糖, 配制成棉子糖含量分别为 0.00% (D1)、0.02% (D2)、0.03% (D3)、0.06% (D4)、0.08% (D5) 和 0.11% (D6) 的 6 组实验饲料, 进行为期 67 d 的生长实验。结果显示: ①随着棉子糖含量的增加, 刺参的增重率及特定生长率均先升后降, D2~D5 组显著高于 D1 组, D4 组达最大值, 体壁基本营养成分不受棉子糖含量的影响。②肠道蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶和超氧化物歧化酶活性均先升后降, D3、D4 组显著高于 D1 组; 丙二醛含量先降后升, D4 组达最低值; D3~D5 组肠道皱襞高度显著高于 D1 组, D5、D6 组出现炎症细胞浸润。③葡萄糖激酶、果糖磷酸激酶和丙酮酸激酶活性先升后降, 葡萄糖激酶和果糖磷酸激酶活性在 D4 组达最大值, 丙酮酸激酶活性在 D3 组达最大值; 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶活性先上升后平稳, D4~D6 组显著高于其他组。④葡萄糖激酶、果糖磷酸激酶和丙酮酸激酶基因表达量均先升后降, D2~D6 组均显著高于 D1 组, 葡萄糖激酶和果糖磷酸激酶基因表达量在 D4 组达最大值, D4、D5 组果糖磷酸激酶基因表达量显著高于其他组。研究表明, 以增重率为评价标准, 初始体质量为 (11.46±0.03) g 的刺参幼参饲料中棉子糖的最适添加量为 0.063%。饲料中添加适量的棉子糖提高了刺参糖代谢效率, 改善了机体消化生理和抗氧化能力, 促进了刺参的生长。

关键词: 刺参; 棉子糖; 生长; 消化; 免疫; 糖代谢

中图分类号: S 963.7

文献标志码: A

棉子糖 (RAF) 是一种功能性低聚糖, 是由 1 分子半乳糖、1 分子葡萄糖和 1 分子果糖通过 α -1, 6 糖苷键、 β -1, 2 糖苷键连接而成的三糖, 分子式为 $C_{18}H_{32}O_{16}$ ^[1]。棉子糖能促进肠道双歧杆菌及乳酸杆菌等有益菌的增殖, 并能够增加肠道短链脂肪酸, 降低肠道 pH^[2]。研究表明, 棉子糖能促进杂交鲟 [*Acipenser baeri* (♀) × *A. schrenckii* (♂)]^[3]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[4]、草鱼 (*Cteno-*

pharyngodon idella)^[1] 等水产动物的生长性能、抗氧化和免疫能力, 并调整肠道微生物分布, 改善肠道结构。

刺参 (*Apostichopus japonicus*) 属于棘皮动物门 (Echinodermata) 海参纲 (Holothuroidea) 仿刺参属 (*Apostichopus*), 是极具营养价值的水产养殖品种。目前, 同为功能性低聚糖的壳寡糖^[5]、低聚果糖^[6]等已被证实对刺参生长与免疫有一定作用,

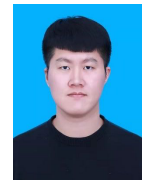
收稿日期: 2022-06-23 修回日期: 2022-07-25

资助项目: 山东省现代农业产业技术体系-刺参创新团队专项 (SDAIT-22-06); 烟台市科技计划 (2021XDHZ056)

第一作者: 郭鹏 (照片), 从事水产动物营养与饲料研究, E-mail: 403868037@qq.com

通信作者: 王际英, 从事水产动物营养与饲料研究, E-mail: ytwjy@126.com;

李宝山, 从事水产动物健康养殖研究, E-mail: bsleeyt@126.com



但棉子糖对刺参影响的研究尚未见报道。本研究通过在基础饲料中添加不同梯度的棉子糖饲喂刺参幼参, 以研究棉子糖对刺参幼参生长、生理指标及糖代谢相关基因表达的影响, 旨在为棉子糖在刺参养殖中的应用提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验饲料

以鱼粉、藻粉和小麦粉为蛋白源, 鱼油为脂肪源, 设计粗蛋白含量为 14.00%、粗脂肪含量为 1.80% 的基础饲料配方^[7]。基础饲料中分别添加 0.00% (D1)、0.04% (D2)、0.08% (D3)、0.12% (D4)、0.16% (D5) 和 0.20% (D6) 的包膜棉子糖 (济南中棉生物科技有限公司, 纯度≥99%) 制作 6 组实验饲料, 饲料中棉子糖实际含量分别为 0.00%、0.02%、0.03%、0.06%、0.08% 和 0.11%。包膜棉子糖的制作方法: 将棉子糖与卡拉胶 1:1 混合, 加入适量

的水调至稠状, 90 °C 加热搅拌 15 min, 冷却后用冻干机干燥成胶状, 75 °C 烘干后, 磨成粉状, 制成包膜棉子糖待用。

实验饲料配方及营养组成见表 1。固体原料超微粉碎后经 200 目, 按照饲料配方配比进行称重, 加入鱼油及适量的蒸馏水, 充分混匀, 用小型颗粒饲料挤压机制成直径为 0.3 cm 的条状饲料, 60 °C 烘干, 密封保存。

1.2 饲养管理

养殖实验在山东省海洋资源与环境研究院东营实验基地的循环水养殖系统中进行, 共计 67 d。实验用刺参购自山东安源种业科技有限公司。实验开始前, 刺参在养殖系统中暂养 2 周, 期间投喂基础饲料。暂养结束后控食 36 h, 挑选个体健壮, 体质量相近 (11.46±0.06) g 的刺参幼参 540 头, 随机分配到 18 个养殖桶 (直径 60 cm, 高 80 cm) 中, 每桶 30 只刺参。每组饲料随机投喂 3 桶刺参,

表 1 饲料配方及营养组成 (风干物质)

Tab. 1 Composition and nutrient level of the experimental diets (DM)

项目 items	组别 groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
原料/% ingredient						
鱼粉 fish meal	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
小麦粉 wheat flour	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
藻粉 algae powder	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
鱼油 fish oil	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
抗氧化剂 antioxidants	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
维生素预混料 ¹⁾ vitamin premix	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
矿物质预混料 ²⁾ mineral premix	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
卡拉胶 carrageenan	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
包膜棉子糖 coated RAF	0.00	0.04	0.08	0.12	0.16	0.20
海泥 sea mud	46.60	46.56	46.52	46.48	46.44	46.40
合计 total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养成分 nutrient composition						
粗蛋白/% crude protein	15.73	16.11	16.10	16.18	15.79	16.01
粗脂肪/% crude lipid	1.89	1.93	1.86	1.91	1.96	1.84
粗灰分/% crude ash	56.25	56.16	56.08	56.19	56.11	56.07
能量/(kJ/g) energy	7.72	8.02	7.93	7.96	8.02	7.96
棉子糖/% raffinose	0.00	0.02	0.03	0.06	0.08	0.11

注: 1) 维生素预混料(mg/kg 或 IU/kg 饲料), 维生素A 7 500.00 IU, 维生素D 1 500.00 IU, 维生素E 60.00 mg, 维生素K₃ 18.00 mg, 维生素B₁ 12.00 mg, 维生素B₂ 12.00 mg, 维生素B₁₂ 0.10 mg, 泛酸 48.00 mg, 烟酰胺 90.00 mg, 叶酸 3.70 mg, D-生物素 0.20 mg, 吡哆醇 60.00 mg, 维生素C 310.00 mg。2) 矿物质预混料(mg/kg 饲料), 锌 35.00 mg, 锰 21.00 mg, 铜 8.30 mg, 铁 23.00 mg, 钴 1.20 mg, 碘 1.00 mg, 硒 0.30 mg。Notes: 1) vitamin premix (mg/kg or IU/kg diet), vitamin A 7 500.00 IU, vitamin D 1 500.00 IU, vitamin E 60.00 mg, vitamin K₃ 18.00 mg, vitamin B₁ 12.00 mg, vitamin B₂ 12.00 mg, vitamin B₁₂ 0.10 mg, pantothenate acid 48.00 mg, niacin 90.00 mg, folic acid 3.70 mg, D-biotin 0.20 mg, pyridoxine 60.00 mg, vitamin C 310.00 mg. 2) mineral premix (mg/kg diet), Zn 35.00 mg, Mn 21.00 mg, Cu 8.30 mg, Fe 23.00 mg, Co 1.20 mg, I 1.00 mg, Se 0.30 mg

每天投喂 1 次 (16:00), 初始投喂量为刺参体质量的 3%, 根据每日摄食情况调整次日投喂量, 每 3 天清理 1 次残饵和粪便并换水, 换水量为 1/3 水体, 养殖 1 个月时更换海参养殖筐。实验在弱光环境中进行, 期间控制水温为 16~18 °C, pH 7.6~8.3, 溶解氧含量大于 6 mg/L, 氨氮与亚硝酸盐含量低于 0.05 mg/L。

1.3 样品采集与分析

养殖实验结束后, 控食 48 h, 统计各桶刺参数量并称重, 计算成活率、增重率和特定生长率。每桶随机选取 8 头刺参置于干净托盘中, 轻轻擦干表面水分, 称量体质量。之后进行解剖, 清理体腔液和肠道内容物, 收集体壁及肠道并称重, 计算肠壁比, 样品保存于 -20 °C。

成活率 (survival rate, SR, %) = $(N_t/N_0) \times 100\%$;

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

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

肠壁比 (ratio of intestine weight to body wall weight, IBR, %) = $W_i / W_w \times 100\%$ 。

式中, N_t 为终末尾数, N_0 为初始尾数, W_t 为刺参终末体质量 (g), W_0 为刺参初始体质量 (g), t 为养殖天数 (d), W_i 为养殖终末刺参肠道质量 (g), W_w 为养殖终末刺参体壁质量 (g)。

选取刺参中前肠部位 0.4 cm, 置于 Bouin 氏液中固定 24 h 后, 转入 70% 的乙醇中长期保存。将固定后的肠道组织经脱水、透明、透蜡包埋后, 切成 6 μm 厚的切片用苏木精-伊红染色, 用中性树脂封片。每个样品选取 10 个非连续的切片, 在 40×物镜下观察, 采用 Leica DM500 图像采集系统测量肌层厚度 (thickness of muscularis, tM) 及皱襞高度 (height of fold, hF)。

水分采用 105 °C 恒重法 (GB/T 6435—2014) 测定; 粗灰分采用 550 °C 马弗炉灼烧法 (GB/T 6435—2014) 测定; 粗蛋白采用凯氏定氮法 (GB/T 6432—2006) 测定; 粗脂肪采用索氏抽提法 (GB/T 6433—2006) 测定; 能量采用燃烧法 (IKA, C6000, 德国) 测定; 棉子糖含量采用高效液相色谱法 (QB/T 4260—2018) 测定。

肠道蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、超氧化物歧化酶 (SOD)、碱性磷酸酶 (AKP)、酸性磷酸酶 (ACP)、葡萄糖激酶 (GCK)、果糖磷酸激酶 (PFK)、丙酮酸激酶 (PK)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶

(PEPCK) 活性及丙二醛 (MDA) 含量使用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定, 方法参照试剂盒说明书。

使用 Trizol 法提取刺参肠道总 RNA, 并用核酸蛋白仪 (Nanoprop, 2000, 中国) 检测 RNA 浓度, 将 RNA 浓度稀释为 500~1 000 ng/nL, 并用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。使用 Evo M-MLV 反转录试剂盒去除 gDNA, 并反转录, 于 -80 °C 保存待用。通过本实验室已有的刺参转录组数据, 筛选出 *GCK*、*PFK* 和 *PK* 基因序列, 并在 NCBI Nucleotide BLAST 上进行同源性比对, 确定同源性较高的序列, 基因序列相似物种及比例分别为 *GCK* (海胆, 91.8%)、*PFK* (海胆, 93.6%) 和 *PK* (海胆, 92.5%), 选用肌动蛋白 *actin* 基因 (登录号: AB510191) 作为内参基因。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, 引物序列如表 2 所示。实时荧光定量 PCR 试剂盒为 TaKaRa 的 TB Green™ Premix ExTaq™ II。PCR 程序: 94 °C 预变性 30 s, 1 个循环; 60 °C 延伸 30 s, 30 个循环后增长至 72 °C 1 min。通过荧光定量 PCR 仪 (Roche Light-Cycler 480, 德国) 得到各基因 C_t 值, 按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因的相对表达量。本实验中 *GCK*、*PFK*、*PK* 和 *actin* 基因的扩增效率分别为 1.966、1.983、2.023 和 2.005。

表 2 基因表达的引物序列

Tab. 2 Primer sequences for gene expression

引物名称 primers	序列(5'-3') sequence (5'-3')
肌动蛋白 <i>actin</i> -F	TTATGCTCTTCTCAGCTATCC
肌动蛋白 <i>actin</i> -R	TTGTGGTAAAGGTGTAGCCTCTCTC
葡萄糖激酶 <i>GCK</i> -F	TGTCGGTCAAGTCCACTCCTTAGG
葡萄糖激酶 <i>GCK</i> -R	GATCGTCGGCCAATCCTGTAACC
果糖磷酸激酶 <i>PFK</i> -F	TCTACCACAGCACAAAGTACCAAAG
果糖磷酸激酶 <i>PFK</i> -R	GAAGAGCCAATCAGCACACAGG
丙酮酸激酶 <i>PK</i> -F	TGATGTTGACCTTCCAGCGTTATCC
丙酮酸激酶 <i>PK</i> -R	TTTGCTTGTCTCCCAACTCCTTC

1.4 数据分析

实验数据采用 SPSS Statistics 17.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 若各组间差异显著 ($P < 0.05$), 则用 Duncan 氏检验进行多重比较分析。统计结果以平均值±标准差 (mean±SD) 表示。采用一元二次回归分析, 确定刺参幼参饲料中棉子糖的最适添加量。

2 结果

2.1 棉子糖对刺参生长性能及体成分的影响

饲料中不同含量的棉子糖对刺参 SR 无显著影响 ($P>0.05$)。随着棉子糖含量的增加, 刺参的 WG 和 SGR 均呈先上升后下降的趋势, D2~D5 组

显著高于 D1 组 ($P<0.05$), D4 组达到最大值。IBR 各组间无显著差异 ($P>0.05$) (表 3)。

以 WG 为评价指标, 经一元二次回归分析得出, 初始体质量为 (11.46±0.06) g 的刺参幼参饲料中棉子糖的最适添加量为 0.063% (图 1)。

表 3 棉子糖对刺参幼参生长性能的影响

Tab. 3 Effects of dietary raffinose on growth performance of juvenile *A. japonicus*

项目 items	组别 groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
初始体质量/g IBW	11.48±0.02	11.47±0.06	11.45±0.03	11.43±0.06	11.49±0.03	11.45±0.03
终末体质量/g FBW	18.73±0.82 ^a	19.28±0.79 ^a	19.77±0.61 ^{ab}	21.08±0.41 ^c	20.70±0.83 ^{bc}	18.62±0.35 ^a
增重率/% WG	63.22±6.90 ^a	68.11±6.31 ^a	72.66±4.90 ^{ab}	84.41±3.35 ^e	80.20±7.13 ^{bc}	62.59±2.70 ^a
特定生长率(%/d) SGR	0.73±0.07 ^{ab}	0.77±0.06 ^{ab}	0.82±0.04 ^{bc}	0.91±0.03 ^d	0.88±0.06 ^{cd}	0.72±0.03 ^a
肠壁比/% IBR	7.98±1.44	8.09±1.79	7.87±0.97	7.49±0.98	7.75±1.44	9.24±0.67
成活率/% SR	98.89±1.92	95.56±5.09	96.67±3.33	94.44±1.93	97.78±1.92	100.00±0.00

注: 同行数据上标不同字母表示差异显著 ($P<0.05$), 下同
Notes: in the same row, different superscript letters represent significant differences ($P<0.05$), the same below

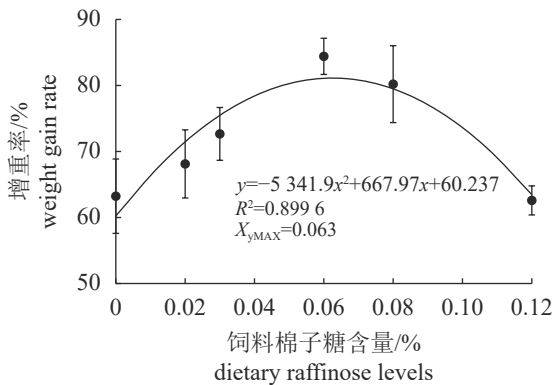


图 1 刺参幼参增重率与饲料棉子糖含量的回归分析

Fig. 1 Regression analysis between dietary raffinose level and weight gain rate (WG) of juvenile *A. japonicus*

饲料中不同含量的棉子糖对刺参幼参体壁的水分、粗蛋白、粗脂肪和粗灰分无显著影响 ($P>$

0.05) (表 4)。

2.2 棉子糖对刺参肠道消化生理及免疫酶的影响

随着饲料中棉子糖含量的增加, 刺参肠道蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活性均呈先上升后下降的趋势。D3、D4 组蛋白酶活性显著高于 D1、D5 和 D6 组 ($P<0.05$); D2、D3 组脂肪酶显著高于其他组 ($P<0.05$); D3~D5 组淀粉酶活性显著高于 D1 组 ($P<0.05$) (表 5)。

随着饲料中棉子糖含量的增加, 刺参肠道 SOD 活性先上升后下降, 在 D4 组达最大值。MDA 含量先下降后上升, 且 D3、D4 组显著低于其他组 ($P<0.05$)。棉子糖含量对刺参肠道 ACP、AKP 活性无显著影响 ($P>0.05$) (表 6)。

表 4 棉子糖对刺参幼参体壁基本成分的影响

Tab. 4 Effects of dietary raffinose on approximate composition of body wall of juvenile *A. japonicus*

项目 items	组别 groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
水分 moisture	91.33±0.06	91.19±0.12	91.17±0.28	91.27±0.48	91.27±0.05	91.21±0.02
粗蛋白 crude protein	46.86±0.13	47.11±0.25	46.86±0.09	46.48±0.16	47.20±0.17	47.24±0.25
粗脂肪 crude lipid	4.00±0.36	4.13±0.19	4.02±0.06	3.98±0.17	4.02±0.13	4.03±0.14
粗灰分 crude ash	32.92±0.12	32.87±0.77	32.48±0.06	33.08±0.14	32.49±0.10	32.44±0.08

注: 粗蛋白、粗脂肪和粗灰分含量为干基含量
Notes: the crude protein, crude lipid and crude ash contents of body wall are based on dry matter basis

表 5 棉子糖对刺参幼参肠道消化酶活性的影响

项目 items	组别 groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
蛋白酶 protease	1 267.90±30.61 ^{bc}	1 330.53±96.76 ^{cd}	1 372.33±17.62 ^{de}	1 443.67±37.53 ^e	1 231.33±45.61 ^b	1 094.67±32.04 ^a
脂肪酶 lipase	4.22±0.72 ^a	5.44±0.11 ^b	5.72±0.11 ^b	5.81±0.41 ^b	4.72±0.07 ^a	4.40±0.07 ^a
淀粉酶 amylase	1.28±0.41 ^a	1.51±0.06 ^{ab}	1.62±0.03 ^{bc}	1.78±0.04 ^{bc}	1.86±0.02 ^c	1.30±0.03 ^a

表 6 棉子糖对刺参肠道免疫指标的影响

项目 items	组别 groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
ACP/(U/mg prot)	147.14±6.96 ^c	136.31±7.13 ^{bc}	131.09±5.15 ^{ab}	126.69±6.40 ^{ab}	130.84±8.72 ^{ab}	119.03±10.00 ^a
AKP/(U/mg prot)	633.64±34.74 ^c	602.18±18.25 ^{bc}	579.35±17.21 ^b	686.67±8.08 ^b	504.21±11.37 ^a	497.90±20.51 ^a
SOD/(U/mg prot)	7 644.36±226.89 ^a	8 032.12±56.16 ^{ab}	7 698.55±47.00 ^a	8 381.33±191.68 ^b	8 084.76±450.60 ^{ab}	7 867.15±249.06 ^a
MDA/(nmol/mg prot)	4.42±0.01 ^c	3.86±0.35 ^b	3.45±0.08 ^a	3.27±0.19 ^a	3.58±0.13 ^{ab}	4.96±0.23 ^d

刺参肠道皱襞高度随棉子糖含量的增加呈先上升后下降的趋势, D3、D4 组显著高于 D1、D6 组 ($P<0.05$)。肌层厚度无显著差异 ($P>0.05$) (表 7)。D2、D3 组细胞核排列较整齐, D5、D6 组肠道皱襞出现空泡和炎症细胞浸润 (图 2)。

2.3 棉子糖对刺参肠道糖代谢酶活性及相关基因相对表达的影响

随着饲料中棉子糖含量的增加, 刺参肠道中 GK 含量、PFK 和 PK 活性均呈先上升后下降的趋势, 其中 GK、PFK 活性在 D4 组达最大值, PK 活性在 D3 组达最大值。PEPCK 活性呈先上升后平稳的趋势, D4~D6 组显著高于其他组 ($P<0.05$) (表 8)。

刺参肠道中 GCK、PFK 和 PK 基因表达量均随着棉子糖含量的增加呈先上升后下降的趋势。D4 和 D5 组 GCK 表达量显著高于其他组 ($P<0.05$), D1、D2 和 D6 组无显著差异 ($P>0.05$)。各组 PFK 表达量均显著高于 D1 组 ($P<0.05$), 且 D3、D4 组显

著高于其他各组 ($P<0.05$)。各组 PK 表达量均显著高于 D1 组 ($P<0.05$), D4 组达最大值 (图 3~图 5)。

3 讨论

3.1 棉子糖对刺参生长性能的影响

已有研究表明, 饲料中添加低聚糖能提高畜禽动物肠道双歧杆菌和乳酸杆菌的数量^[8-10], 改善黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 肠道结构, 调节肠道菌群平衡^[11]。本实验中, 饲料中添加适量棉子糖时, 刺参肠道结构显著优于不添加组, 且生长性能显著提高, 这与在草鱼^[1]和尼罗罗非鱼^[4]中的结果一致。肠道黏膜褶皱数量众多, 微绒毛密度丰富, 增加了肠上皮细胞吸收面积, 从而提高了生长性能^[12]。刺参蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活性的增加, 也表明棉子糖通过改变肠道形态, 提高了对食物的消化吸收, 并促进了机体生长, 这与在杂交鲟上的研究结果一致^[3]。已有的研究表明, 棉子糖与肠道的双歧杆菌等有益菌作用产

表 7 棉子糖对刺参幼参肠道结构的影响

项目 items	组别 groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
tM	6.96±0.63	6.50±0.96	7.25±0.50	7.32±0.50	7.14±0.66	8.34±0.46
hF	176.93±20.34 ^a	203.02±8.54 ^{ab}	233.36±10.39 ^c	262.59±18.70 ^d	219.93±16.04 ^{bc}	194.39±8.09 ^{ab}

注: tM. 肌层厚度, hF. 皱襞高度, 下同
Notes: tM. thickness of muscularis, hF. height of fold, the same below

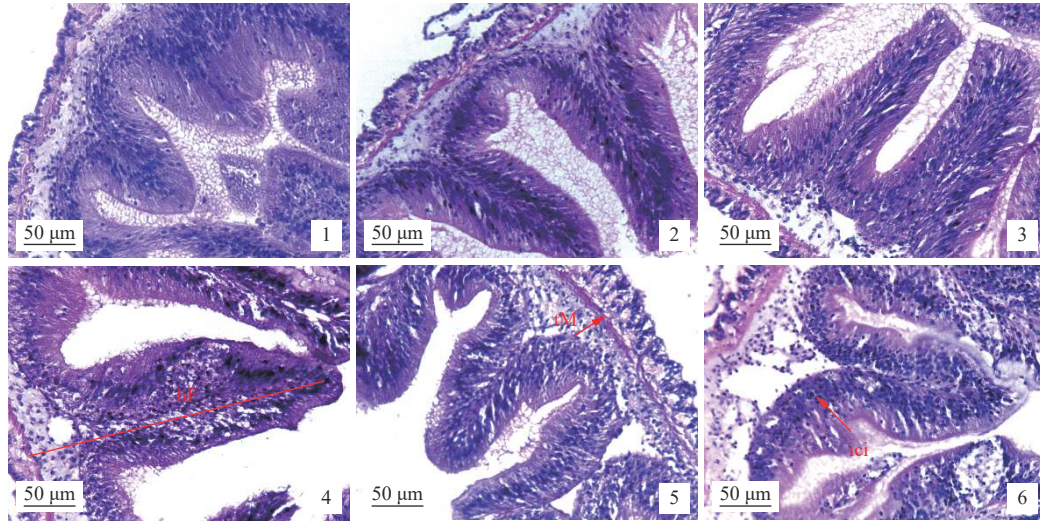


图 2 棉子糖对刺参幼参肠道组织形态的影响(×40)

1-6 分别表示刺参肠道在 0.00%、0.02%、0.03%、0.06%、0.08% 和 0.11% 棉子糖影响下的组织形态, ici.炎症细胞浸润

Fig. 2 Effects of dietary raffinose on intestinal morphology of juvenile *A. japonicus*

1-6 show the intestinal morphology of *Apostiopus japonicus* under the influence of 0.00%, 0.02%, 0.03%, 0.06%, 0.08% and 0.11% raffinose, respectively, ici. inflammatory cell infiltration

表 8 棉子糖对刺参幼参肠道代谢酶活性的影响

Tab. 8 Effects of dietary raffinose on intestinal metabolic enzymes of juvenile *A. japonicus*

项目 items	组别 groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
GK/(ng/mL)	3.22±0.09 ^a	3.41±0.17 ^a	3.96±0.05 ^b	4.65±0.13 ^c	3.23±0.48 ^a	3.22±0.21 ^a
PFK/(U/mg prot)	24.80±1.43 ^a	26.84±0.53 ^{bc}	27.25±0.47 ^c	28.71±1.18 ^c	25.22±0.96 ^{ab}	25.04±1.38 ^{ab}
PK/(U/g prot)	170.23±2.56 ^a	210.03±3.84 ^b	222.28±6.02 ^b	221.86±8.00 ^b	221.26±10.54 ^b	180.59±5.58 ^a
PEPCK/(U/mg prot)	40.91±2.96 ^a	44.47±0.65 ^b	47.81±0.93 ^c	55.73±1.49 ^d	53.77±1.70 ^d	56.38±1.12 ^d

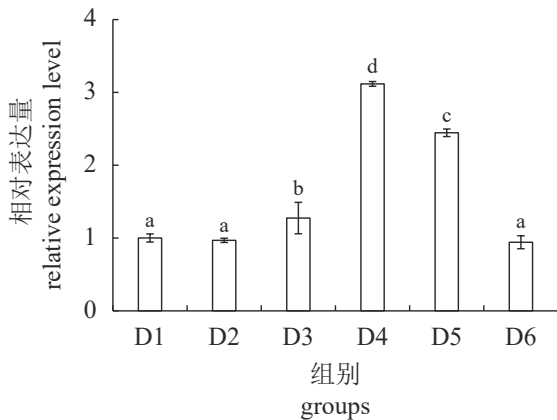


图 3 肠道中 GCK 相对表达量

上标不同字母表示差异显著 (P<0.05), 下同

Fig. 3 Relative expression level of GCK in intestine

Different superscript letters represent significant differences (P<0.05), the same below

生短链脂肪酸, 可为肠黏膜生长提供能量^[13]。肠道皱襞高度及肠上皮细胞数量显著升高, 能提高

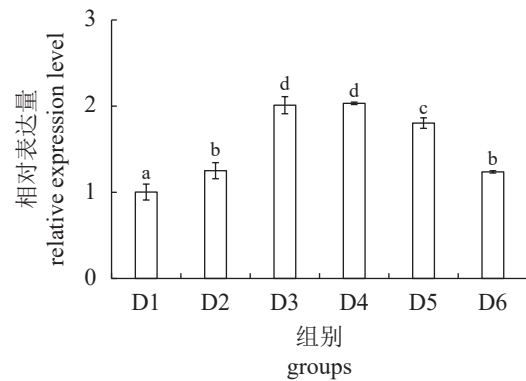


图 4 肠道中 PFK 相对表达量

Fig. 4 Relative expression level of PFK in intestine

对营养物质的消化吸收能力^[14]。肠道皱襞高度的增加, 可为更多的消化酶提供附着之地, 促进糖类和蛋白质的消化分解^[15], 这可能是添加适量的棉子糖促进刺参生长的主要原因。以 WG 为评价指标, 采用一元二次回归分析得出, 刺参幼参棉

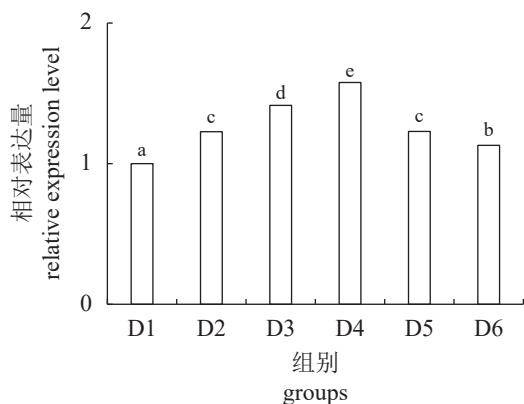


图5 肠道中PK相对表达量

Fig. 5 Relative expression level of PK in intestine

子糖的最适添加量为0.063%。各组刺参幼参存活率无显著差异，且棉子糖对体壁水分、粗蛋白、粗脂肪和粗灰分影响不显著。

3.2 棉子糖对刺参消化生理及免疫的影响

本实验中，棉子糖对刺参肠道ACP和AKP活性无显著影响，ACP作为溶菌酶的标志酶，反映了刺参非特异性免疫中对病原体的水解能力并未提高^[16]。而在体外培养中性粒细胞上的研究却表明，适量的棉子糖能显著提高其细胞活性，并能提高大肠杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的吞噬能力^[17]，这可能与动物的种属及结构差异有关。SOD作为重要的抗氧化酶，可保护在过氧化和噬菌过程中受到损伤的组织，反映了机体抗应激水平^[18]，MDA则反映机体自由基氧化水平。在本实验中，添加适量的棉子糖显著提高了刺参幼参肠道SOD活性，降低了MDA含量，这可能是因为棉子糖和双歧杆菌及乳酸杆菌的代谢产物氧化还原电势较低，可提供质子并与体内自由基结合，以减少自由基对机体造成的损伤有关^[1]。已有的研究也证明，寡糖能提高机体阳离子多肽、补体和活性氧含量，并提高免疫球蛋白水平和溶菌酶活性，以此提高鱼类对病原体的抗菌能力^[19-21]，这也可能是棉子糖提高机体抗氧化能力和免疫能力的原因之一。

3.3 棉子糖对刺参糖代谢的影响

GK、PFK和PK均属于糖酵解中的关键酶^[22-23]，PEPCK则是糖异生中的关键限速酶^[24]，糖酵解和糖异生在糖代谢过程中调节葡萄糖稳态，提供能量^[25]。GK具有感应葡萄糖的功能，当葡萄糖含量较高时，其活性增强，同时能储存和利用葡萄糖，

并磷酸化葡萄糖形成葡萄糖-6-磷酸，为合成糖原或生成丙酮酸提供底物^[26]，PFK和PK则能控制该过程的方向与速率^[25]。本实验中，随着棉子糖含量的增加，刺参肠道GK、PFK和PK活性均呈先上升后下降的趋势，刺参肠道中与之相关的GCK、PFK和PK呈相同的趋势，GCK在D4、D5组表达量显著提高，各实验组PFK和PK表达量均高于不添加组。在低浓度下，PEPCK活性呈上升趋势，当继续提高棉子糖含量，其活性趋于稳定。目前，关于棉子糖对水生动物肠道微生物影响的研究表明，棉子糖对肠道双歧杆菌和乳酸杆菌的增殖是有促进作用的^[3]。棉子糖含有 α -半乳糖苷键，能被肠道双歧杆菌中的 α -半乳糖苷酶分解产生短链脂肪酸和葡萄糖^[27-28]，葡萄糖含量升高时，GCK、PFK及PK活性也会增强。添加棉子糖显著提高了刺参的糖酵解和糖异生能力，但当棉子糖含量超过0.06%时，刺参糖代谢平衡被打破，过高的糖异生反应使体内的丙酮酸和糖原分解为葡萄糖，超出了刺参生理所需而排除体外，并产生过量能量^[29]，产物过量也会减缓糖酵解反应，过量的产物也会通过糖异生途径而还原成葡萄糖。由于糖代谢过程中过量的能量并未作用在生理代谢上，这也会导致肠道内细胞活性降低，从而影响生长性能。综上所述，棉子糖对调节刺参糖代谢有一定作用，适量添加棉子糖能通过糖代谢为机体生理活动提供能量，并提高生长性能。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 邱燕. 三种微生态制剂对草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 生长性能、生理机能及肠道黏膜的影响 [D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
Qiu Y. Effects of three microecological agents on growth performance, physiological function and intestinal mucosa of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [D]. Suzhou: Soochow University, 2010 (in Chinese).
- [2] Tortuero F, Fernández E, Rupérez P, et al. Raffinose and lactic acid bacteria influence caecal fermentation and serum cholesterol in rats [J]. *Nutrition Research*, 1997, 17(1): 41-49.
- [3] Xu G L, Xing W, Li T L, et al. Effects of dietary raffinose on growth, non-specific immunity, intestinal mor-

- phology and microbiome of juvenile hybrid sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt ♀ × *A. schrenckii* Brandt ♂)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 72: 237-246.
- [4] Abdel-Latif H M R, Soliman A A, Sewilam H, *et al.* The influence of raffinose on the growth performance, oxidative status, and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 18: 100457.
- [5] 司滨. 壳寡糖对仿刺参养殖的应用效果研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2017.
- Si B. Study on application effects of dietary chitosan oligosaccharide in breeding in sea cucumber *Apostichopus japonicus*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2017 (in Chinese).
- [6] 赵丽丽, 包焕玲, 姜永新, 等. 低聚果糖对仿刺参生长及生长免疫因子的影响[J]. *水产科学*, 2019, 38(2): 145-151.
- Zhao L L, Bao H L, Jiang Y X, *et al.* Effects of dietary fructo-oligosaccharides on growth performance and immunological competence of sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Fisheries Science*, 2019, 38(2): 145-151 (in Chinese).
- [7] Liao M L, Ren T J, Chen W, *et al.* Effects of dietary lipid level on growth performance, body composition and digestive enzymes activity of juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus*[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(1): 92-101.
- [8] Flickinger E A, Schreijen E M W C, Patil A R, *et al.* Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets[J]. *Journal of Animal Science*, 2003, 81(8): 2008-2018.
- [9] Min Y N, Yang H L, Xu Y X, *et al.* Effects of dietary supplementation of synbiotics on growth performance, intestinal morphology, sIgA content and antioxidant capacities of broilers[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2016, 100(6): 1073-1080.
- [10] Giannenas I, Doukas D, Karamoutsios A, *et al.* Effects of *Enterococcus faecium*, mannan oligosaccharide, benzoic acid and their mixture on growth performance, intestinal microbiota, intestinal morphology and blood lymphocyte subpopulations of fattening pigs[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2016, 220: 159-167.
- [11] Wu Z X, Yu Y M, Chen X, *et al.* Effect of prebiotic konjac mannanoligosaccharide on growth performances, intestinal microflora, and digestive enzyme activities in yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40(3): 763-771.
- [12] Sørensen M, Penn M, El-Mowafi A, *et al.* Effect of stachyose, raffinose and soya-saponins supplementation on nutrient digestibility, digestive enzymes, gut morphology and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L)[J]. *Aquaculture*, 2011, 314(1-4): 145-152.
- [13] Archer S Y, Meng S F, Shei A, *et al.* p21^{WAF1} is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(12): 6791-6796.
- [14] 张彩霞, 陈文, 黄艳群, 等. 限饲对哈巴德肉鸡肠道结构的影响[J]. *江西农业大学学报*, 2010, 32(4): 677-682.
- Zhang C X, Chen W, Huang Y Q, *et al.* Effect of feed restriction on Harbord Broilers' intestinal structure[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2010, 32(4): 677-682 (in Chinese).
- [15] Refstie S, Storebakken T, Roem A J. Feed consumption and conversion in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with fish meal, extracted soybean meal or soybean meal with reduced content of oligosaccharides, trypsin inhibitors, lectins and soya antigens[J]. *Aquaculture*, 1998, 162(3-4): 301-312.
- [16] 高晓莉, 岳淑芹, 王丽敏, 等. 重金属对鲢鱼肝组织 SOD和CAT活性影响研究简报[J]. *河北农业大学学报*, 2003, 26(4): 130.
- Gao X L, Yue S Q, Wang L M, *et al.* Primary report on effects of heavy metals on activities of SOD and CAT in the liver tissue of silver carp[J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2003, 26(4): 130 (in Chinese).
- [17] 窦江丽, 谭成玉, 白雪芳, 等. 棉子糖及水苏糖对兔外周血中性粒细胞功能的影响[J]. *精细与专用化学品*, 2008, 16(3-4): 26-27.
- Dou J L, Tan C Y, Bai X F, *et al.* Effects of raffinose and stachyose on rabbit neutrophils isolated from its peripheral blood[J]. *Fine and Specialty Chemicals*, 2008, 16(3-4): 26-27 (in Chinese).
- [18] 刘存歧, 王伟伟, 张亚娟. 水生生物超氧化物歧化酶的酶学研究进展[J]. *水产科学*, 2005, 24(11): 49-52.
- Liu C Q, Wang W W, Zhang Y J. Advance on superoxide dismutase in aquatic organisms[J]. *Fisheries Science*, 2005, 24(11): 49-52 (in Chinese).

- [19] Meng X, Wang J T, Wan W J, *et al.* Influence of low molecular weight chitooligosaccharides on growth performance and non-specific immune response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. *Aquaculture International*, 2017, 25(3): 1265-1277.
- [20] Das B K, Pradhan J, Sahu S. The effect of *Euglena viridis* on immune response of rohu, *Labeo rohita* (Ham.) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(6): 871-876.
- [21] Maqsood S, Singh P, Samoon M H, *et al.* Effect of dietary chitosan on non-specific immune response and growth of *Cyprinus carpio* challenged with *Aeromonas hydrophila*[J]. *International Aquatic Research*, 2010, 2: 77-85.
- [22] Brouwers M C G J, Jacobs C, Bast A, *et al.* Modulation of glucokinase regulatory protein: a double-edged sword?[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2015, 21(10): 583-594.
- [23] Pilkis S J, Claus T H. Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes[J]. *Annual Review of Nutrition*, 1991, 11(1): 465-515.
- [24] 孙永欣. 黄芪多糖促进刺参免疫力和生长性能的研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2008.
- Sun Y X. Improving effects of astragalus polysaccharides (APS) on non-specific immune responses and productive performance of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2008 (in Chinese).
- [25] 张傲. 东北林蛙油中糖和脂类及其代谢相关因子表达的研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2020.
- Zhang A. Study on the expression of carbohydrate and lipid and their metabolic related factors in rana oil [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2020 (in Chinese).
- [26] 吕永智. 葡萄糖感应机制与肠道内分泌调控的研究进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2018(1): 80-82.
- Lv Y Z. Research progress of glucose sensing mechanism and intestinal endocrine regulation [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2018(1): 80-82 (in Chinese).
- [27] Hu H B, Zhang Y J, Mai K S, *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.
- [28] Louis P, Hold G L, Flint H J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(10): 661-672.
- [29] 李平凡, 钟彩霞. 淀粉糖与糖醇加工技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2012: 152.
- Li P F, Zhong C X. Starch saccharide and sugar alcohol production technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2012: 152 (in Chinese).

Effects of dietary raffinose on growth performance, physiological indices and glycometabolism of juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)

GUO Peng^{1,2}, WANG Jiyong^{1*}, LI Baoshan^{1*}, WANG Meiqi^{1,2}, SUN Yongzhi¹,
HUANG Bingshan¹, WANG Shixin¹

(1. Key Laboratory of Marine Ecological Restoration,

Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China;

2. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding,

Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,

National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) is one of most valuable cultured marine species in northeast and southeast China. With the rapid development of *A. japonicus* breeding industry, high efficiency and environmental protection formula diet has become one of bottleneck problems which hinder the development of the industry. Raffinose is a functional oligosaccharide, which is utilized by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* in the intestines, and plays an important role in the digestive physiology and antioxidant properties of the body. This study investigated the effects of dietary raffinose on growth performances, physiological indices and genes related to glycometabolism of juvenile *A. japonicus*. Six isonitrogen and isoenergetic experimental diets were formulated to contain graded levels of raffinose, namely 0.00% (D1), 0.02% (D2), 0.03% (D3), 0.06% (D4), 0.08% (D5) and 0.11% (D6) dry diets. Each diet was randomly assigned to triplicate tanks of juvenile *A. japonicus* with initial body weight (11.46±0.06) g for 67 days. There were no differences in survival rate between all groups. Both weight gain rate (WG) and the specific growth rate were increased first and then decreased afterwards with the increase of dietary raffinose. All of the activities of intestinal protease, lipase, amylase and superoxide dismutase were increased first and then decreased, and were significantly higher in D3 and D4 groups than other groups. The content of malondialdehyde was first decreased and then increased, and reached the lowest value in D4 group. The heights of intestinal folds in D3-D5 groups were significantly higher than those in the D1 group, and meanwhile, inflammatory cell infiltration appeared in D5 and D6 groups. With the increase of dietary raffinose content, all of the activities of glucokinase, fructosophosphate phosphokinase and pyruvate kinase were increased first and then decreased. The activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase were increased first and then kept stable, and D4-D6 had significantly higher figures than D1 group. The expression levels of glucokinase (*GCK*), fructosophosphate phosphokinase (*PFK*) and pyruvate kinase (*PK*) genes increased first and then decreased, and were significantly higher in D2-D6 groups than D1 group. Both *GCK* and *PK* genes expression reached the maximum in D4 group, and *PFK* gene expression levels in D4 and D5 groups were significantly higher than those in other groups. With WG as an evaluation indicator, quadratic regression analysis showed that the optimum dietary raffinose for juvenile *A. japonicus* was 0.063% diet. Dietary raffinose increased the glucose metabolism efficiency, improved the digestive physiology and antioxidant capacity of the body, and promoted the growth of juvenile *A. japonicus*.

Key words: *Apostichopus japonicus*; raffinose; growth; digestive; immunity; glycometabolism

Corresponding authors: WANG Jiyong. E-mail: ytwjy@126.com;

LI Baoshan. E-mail: bsleeyt@126.com

Funding projects: Shandong Modern Agriculture Industry Technology System-Sea Cucumber Industry Technology System (SDAIT-22-06); Science and Technology Development Project of Yantai (2021XDHZ056)