



饲料中添加脱氧胆酸钠对大口黑鲈生长、糖代谢及肠道菌群的影响

周楠楠, 丁斐斐, 张 乐, 乔 芳, 杜震宇, 张美玲*

(华东师范大学生命科学学院, 水生动物营养与环境健康实验室, 上海 200241)

摘要: 为了评估脱氧胆酸钠作为大口黑鲈饲料添加剂的作用效果, 实验配制了脱氧胆酸钠添加量分别为 0 (对照组) 和 300 mg/kg 的 2 种实验饲料, 饲养初始体质量为 (10.80 ± 0.12) g 的大口黑鲈 8 周后, 分析了脱氧胆酸钠对大口黑鲈生长、代谢以及肠道菌群的影响。结果显示, 脱氧胆酸钠显著增加了大口黑鲈的终末体质量、体长和肥满度 (CF), 而对脏体比 (VSI)、肝体比 (HSI)、全鱼的总脂肪和粗蛋白含量无显著影响; 脱氧胆酸钠显著增加了肝脏和肌肉中糖异生相关基因的表达, 同时脱氧胆酸钠通过增加肌肉中糖原合成酶 (GCS) 的活性显著增加了肌肉中糖原的含量, 而对肝脏中的糖原含量则无显著影响。此外, 脱氧胆酸钠显著增加了胆囊中胆汁酸的含量, 结果发现, 脱氧胆酸钠主要通过下调肝脏中胆汁酸受体基因 (*fxr*) 的表达, 以及上调胆固醇合成酶 7 α -羟化酶基因 (*cyp7a1*) 的表达, 促进胆汁酸的合成。大口黑鲈摄食含脱氧胆酸钠的饲料后, 肠道中厚壁菌门和拟杆菌门的微生物丰度下降, 放线菌门的丰度升高。研究表明, 脱氧胆酸钠作为饲料添加剂可以促进大口黑鲈的生长、肌糖原的积累以及胆汁酸合成的增加, 并会对肠道菌群组成产生影响。因此, 脱氧胆酸钠可以作为大口黑鲈的一种饲料添加剂, 研究成果将为进一步扩展胆汁酸盐在水产养殖中的应用提供重要的理论基础。

关键词: 大口黑鲈; 脱氧胆酸钠; 肌糖原; 胆汁酸; 肠道菌群

中图分类号: S 963.73

文献标志码: A

胆汁酸作为胆汁的主要成分, 在动物的葡萄糖代谢^[1]、脂肪代谢^[2]、肝肠健康^[1]和肠道内环境稳态的维持^[3]等方面发挥着重要作用。近年来, 胆汁酸作为一种新型添加剂广泛应用到水产饲料中。有研究表明, 在饲料中添加 600 mg/kg 的胆汁酸复合物 [主要含有 58.3% 猪脱氧胆酸 (hyodeoxycholic acid, HDCA)、17.4% 的鹅脱氧胆酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA)、10.0% 的甘氨酸熊去氧胆酸 (glycoursodeoxycholic acid, GUDCA)],

可以提高异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 的生长性能和抗氧化能力^[4]; 在饲料中添加 450 mg/kg 的胆汁酸可以显著提高军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 的生长性能和饲料利用率^[5]; 在饲料中添加 300 mg/kg 的胆汁酸复合物 [含有 8% 的猪胆酸 (hyocholic acid, HCA)、70.9% 的 HDCA 和 20.2% 的熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA)] 不仅可以增加大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 的增重率和特定生长率, 还可以缓解高糖饲料所诱导的

收稿日期: 2021-03-03 修回日期: 2021-04-10

资助项目: 国家自然科学基金 (31972798)

第一作者: 周楠楠 (照片), 从事肠道微生物与水生动物营养调控研究, E-mail: 2407030629@qq.com

通信作者: 张美玲, E-mail: mlzhang@bio.ecnu.edu.cn



肝脏纤维化^[6]; 在饲料中添加 900 mg/kg 的胆汁酸可以显著提高大菱鲃 (*Scophthalmus maximus*) 的增重率、饲料系数以及肠道消化酶活性^[7]。但是到目前为止, 这些研究主要关注混合型胆汁酸对水产动物生长的影响, 而且在不同研究中所使用的胆汁酸复合物组成差异较大, 不同种类胆汁酸对鱼类生长及代谢的影响尚不清楚。

动物体内胆汁酸的种类很多, 按照其来源可以分为初级胆汁酸和次级胆汁酸。其中初级胆汁酸在肝脏中合成, 之后随着胆汁流入肠道, 经肠道菌群的脱羟基作用转化为次级胆汁酸^[8]。在不同物种之间, 胆汁酸的组成大不相同。如人的初级胆汁酸以胆酸 (cholic acid, CA) 和 CDCA 为主^[9], CA 相对应的次级胆汁酸为脱氧胆酸 (deoxycholic acid, DCA), 与 CDCA 对应的次级胆汁酸为石胆酸 (lithocholic acid, LCA) 和 UDCA, 其中 UDCA 在小鼠 (*Mus musculus*) 中是初级胆汁酸^[10-11]。在小鼠中, 初级胆汁酸以 CA、 β -鼠李酸 (β -muricholic acid, β MCA) 为主, 其中 β MCA 在其他动物体内的含量很低, 在肠道菌群的作用下转化为 ω MCA^[12]。在猪 (*Sus scrofa*) 体内, CDCA 和 HCA 是主要的初级胆汁酸, HCA 可在肠道菌群的作用下转化为 HDCA^[13]。在草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 体内, 胆汁中主要的初级胆汁酸为 CA 和 CDCA, 次级胆汁酸为 DCA; 肠道中的初级胆汁酸主要为 CA, 次级胆汁酸则为 DCA 和 UDCA^[14]。在大菱鲃体内, 胆汁中主要的初级胆汁酸为牛磺胆酸 (taurocholic acid, TCA) 和牛磺鹅去氧胆酸 (taurochenodeoxycholic acid, TCDCA), 次级胆汁酸为牛磺 β -鼠胆酸 (tauro-beta-muricholic acid, T β MCA) 和牛磺 ω -鼠胆酸 (tauro-omega-muricholic acid, T ω MCA)^[15]。在高等动物中的研究表明, 不同种类胆汁酸的功能存在较大差异^[16-18], 但是在水产动物上仍缺乏相关的研究。

目前混合型胆汁酸在水产饲料中广泛使用, 由于组成复杂多样, 混合型胆汁酸中发挥功效的具体成分难以确定, 此外, 有关单一胆汁酸对鱼类影响方面的研究也鲜有报道。因此, 评估不同种胆汁酸对鱼体生长及代谢的影响, 对于选用合适的胆汁酸类型以实现精准营养调控具有重要帮助。有研究表明, 在饲料中添加 300 mg/kg 的胆汁酸复合物 (含有 8% 的 HCA, 70.9% 的 HDCA 和 20.2% 的 UDCA) 可以使大口黑鲈获

得最佳生长性能^[19]。因为胆汁酸通常以胆汁酸盐的形式存在, 所以本研究主要评估饲料中添加 300 mg/kg 的脱氧胆酸钠 (sodium deoxycholate, SD) 对大口黑鲈生长、代谢以及肠道菌群的影响, 研究成果将为进一步扩展胆汁酸盐在水产养殖中的应用提供重要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

以进口鱼粉、鸡肉粉、豆粕为蛋白源, 以豆油为脂肪源, 面粉和木薯淀粉为主要糖源配制基础饲料 (表 1)。分别在基础饲料中添加 0 和 300 mg/kg 的脱氧胆酸钠, 配制成对照组 (CON) 和脱氧胆酸钠添加组 (SD) 饲料。饲料原料经研磨粉碎后过 60 目筛网, 按照逐级放大法将各种原料充分混合, 之后加入豆油和水混匀。使用水产饲料专用膨化机将混匀的饲料挤压成条, 在 50 °C 下将饲料水分烘干至 10% 以下, 用饲料粉碎机将饲料制备成直径约 3 mm 的颗粒饲料, 用自封袋包装后置于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.2 实验设计及饲养管理

实验所用的大口黑鲈购自广州市添发鱼苗发展有限公司, 鱼苗运至华东师范大学生命科学学院实验基地暂养 1 个月, 暂养期间投喂商品饲料。挑选状态良好, 初始体质量为 (10.80 $\pm$ 0.12) g 的鱼随机分到 6 个 250 L 的养殖桶中, 每个桶 30 尾鱼, 分成 2 个处理 (对照组和脱氧胆酸钠组), 每个处理 3 个重复。

养殖实验历时 8 周, 在自然光周期和环境温度下进行, 采用经过充分曝气的自来水, 在室内进行养殖。饲料投喂量为体质量的 3.5%, 每 2 周称 1 次体质量以调整投喂量。养殖期间, 水温为 26 °C~29 °C, 溶解氧为 5.0~7.5 mg/L。每天用虹吸管清除粪便和污水, 日换水量为 100%, 养殖期间定期清洗养殖桶。

1.3 样品采集

8 周实验结束后, 将实验鱼饥饿 8 h, 从每个桶中取 4 尾实验鱼, 共计 12 尾。用丁香酚麻醉后, 逐一称重并测量体长。利用 1 mL 无菌注射器从尾椎静脉取血, 4 °C 静置 12 h, 之后进行低温离心 (3 000 r/min, 4 °C, 10 min), 取上层血

表 1 实验饲料配方
Tab. 1 Formulation of experimental diets %

成分 ingredients		对照组饲料 control diet	脱氧胆酸钠组饲料 sodium deoxycholate diet
进口鱼粉	imported fish meal	45	45
鸡肉粉	chicken powder	9	9
豆粕	soybean meal	12	12
面粉	flour	11	11
谷朊粉	gluten	2	2
木薯淀粉	cassava starch	8	8
豆油	soybean oil	6	6
乌贼膏	squid ointment	4	4
磷酸二氢钙	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.5	1.5
预混料	premix	1.5	1.5
脱氧胆酸钠	sodium deoxycholate	0	0.03
营养成分 proximate			
水分/%	moisture	7.66	7.49
灰分/%	crude ash	10.82	11.04
粗蛋白质/%	crude protein	50.45	50.04
粗脂肪/%	crude lipid	13.24	13.38

注：维生素预混料(mg/kg)含维生素A 500 000 IU，维生素D₃ 50 000 IU，维生素E 2 500 mg，维生素K₃ 1 000 mg，维生素B₁ 5 000 mg，维生素B₂ 5 000 mg，维生素B₆ 5 000 mg，维生素B₁₂ 5 000 μg，肌醇 25 000 mg，泛酸10 000 mg，胆碱100 000 mg，烟酸25 000 mg，叶酸1 000 mg，生物素250 mg，维生素C 10 000 mg；矿物质预混料(g/kg)含碳酸钙314.0 g，磷酸二氢钾469.3 g，硫酸镁147.4 g，氯化钠49.8 g，葡萄糖酸铁10.9 g，硫酸锰3.12 g，硫酸锌4.67 g，硫酸铜0.62 g，碘化钾0.16 g，氯化钴0.08 g，钼酸铵0.06 g，亚硒酸钠0.02 g

Notes: vitamin premix (mg/kg) [vitamin A 500 000 IU, vitamin D₃ 50 000 IU, vitamin E 2 500 mg, vitamin K₃ 1 000 mg, vitamin B₁ 5 000 mg, vitamin B₂ 5 000 mg, vitamin B₆ 5 000 mg, vitamin B₁₂ 5 000 μg, inositol 25 000 mg, pantothenic acid 10 000 mg, choline 100 000 mg, niacin 25 000 mg, folic acid 1 000 mg, biotin 250 mg, vitamin C 10 000 mg; mixed minerals (g/kg) contain CaCO₃ 314.0 g, KH₂PO₄ 469.3 g, MgSO₄·7H₂O 147.4 g, NaCl 49.8 g, Fe(II)gluconate 10.9 g, MnSO₄·H₂O 3.12 g, ZnSO₄·7H₂O 4.67 g, CuSO₄·5H₂O 0.62 g, KI 0.16 g, CoCl₂·6H₂O 0.08 g, NH₄ molybdate 0.06 g, NaSeO₃ 0.02 g

清，于-80℃保存。随后解剖取内脏团、肝脏称重，用于形体指标测定，在大致相同的位置切取小块肝脏组织固定在4%多聚甲醛中，用于制备PAS（Periodic Acid-Schiff stain）染色切片，剩下的肝脏冻于-80℃。取胆囊、肠道、肠道内容物以及背部一侧的肌肉立即置于-80℃中保存。取另一侧肌肉样品固定在环保型GD固定液(主

要成分为甲醛溶液、冰醋酸和无水乙醇)中，用于制备PAS染色切片。

1.4 指标的测定

生长及形体指标 根据实验测定的数据计算大口黑鲈的肥满度、脏体比、肝体比。

肥满度 (condition factor, CF, g/cm³)=(W_B/L_B³)×100;

脏体比 (viscerosomatic index, VSI, %)=(W_V/W_B)×100%;

肝体比 (hepatosomatic index, HIS, %)=(W_I/W_B)×100%;

式中，W_B为体质量(g); L_B为体长(cm)，W_V为内脏团质量(g)，W_I为肝脏质量(g)。

基本营养成分 每个处理组取6尾实验鱼，使用丁香酚麻醉后置于-20℃冰箱以供全鱼体成分分析。水分采用105℃烘干法，灰分采用550℃灼烧法至恒重，采用凯氏定氮法(FOSS kjeltec 8200)测定粗蛋白，采用氯仿-甲醇法测定总脂肪。

生化指标 肌肉和肝脏中的糖原采用南京建成生物工程研究所有限公司生产的相关试剂盒测定，糖原合成酶(GCS)以及糖原磷酸化酶a(GPa)均采用北京百奥莱博科技有限公司生产的相关试剂盒测定。肝脏、胆囊、肠道和血清中的总胆汁酸也采用相应的试剂盒测定。

肝脏、肌肉组织形态 将固定在4%的多聚甲醛中的肝脏组织和环保型GD固定液中的肌肉组织送往武汉塞维尔生物技术有限公司制作切片，PAS染色，采用尼康显微镜进行拍照观察糖原染色情况。

实时荧光定量PCR(RT-qPCR) 使用北京艾德莱生物科技有限公司的TRIpure试剂提取组织总RNA，使用FastQuant RT Kit with gDNA试剂盒将RNA反转录成cDNA。根据Zhang等^[20]、Yu等^[6]的研究设计了相关基因的特异性定量PCR引物(表2)。内参基因选取β-actin和ef1α(二者Ct值取算术平方根作为内参)。采用10倍梯度稀释法确定引物的扩增效率为95%~105%。PCR程序：95℃10 min; 95℃5 s, 60℃15 s, 40个循环；绘制熔解曲线以确定引物的特异性。mRNA的相对表达量采用2^{-ΔΔC_t}法计算。

肠道菌群 16S rRNA 测序分析 将每个处

表 2 引物序列

Tab. 2 Sequences of the primers used in this study

引物 primers	引物序列5'-3' primers sequence 5'-3'	产物长度/bp product length
<i>pepck</i> -2-F	ATTCCCTTCAGTATGGGTCCT	142
<i>pepck</i> -2-R	CTTTGACCGACTTCCTCACC	
<i>fbpase</i> -1b-F	CTTCACCTCCTGTGTGCTTG	182
<i>fbpase</i> -1b-R	CAGCTGGCTCACCATCTGTA	
<i>g6pase</i> -like-F	GGGAGTCCAGGTGTGTGTCT	182
<i>g6pase</i> -like-R	CAGCGAAGGAGGTCAAGAAG	
<i>hk-4</i> -like-F	CATCACCTTCCTCGTCTCGG	107
<i>hk-4</i> -like-R	ACCTCTGTCGCTATCACTCC	
<i>Pfkpa</i> -F	ACAACACACCAACTGACACCT	175
<i>Pfkpa</i> -R	GCAGCATCGAGCAGAACATGA	
<i>cyp7a1</i> -F	TTCAGTGTGGGGTCGTTGGG	153
<i>cyp7a1</i> -R	CTGGGCTTCACAGGCTAACACC	
<i>fxr</i> -F	AGCCGAAAGATGCCCAACG	118
<i>fxr</i> -R	GGAGTTCACCGATGCTTTTG	
<i>β-actin</i> -F	TGCTGAGCGTGAGATTGTG	193
<i>β-actin</i> -R	GAAGGTCGGAAGGAAGGGA	
<i>ef1a</i> -F	TGCTGCTGGTGTGGTGAGTT	147
<i>ef1a</i> -R	TTCTGGCTGTAAGGGGGCTC	

理取 6 个肠道内容物样品送至上海派森诺生物科技有限公司进行 DNA 提取和测序分析。提取 DNA 之后用细菌 16S *rRNA* 的 V3~V4 区特异性引物进行扩增, 引物序列为 F: 5'-ACTCCTACGGGAG GCAGCA-3', R: 5'-GGACTACHVGGGTWTC TAAT-3'。利用 Illumina 平台对菌群 DNA 片段进行双端 (Paired-End) 测序。采用 DADA2 法对测序数据进行过滤、去噪、拼接和去嵌合体等。对原始数据的 ASV 进行聚类分析, 基于 ASVs 和注释结果进行样品物种复杂度分析、组间物种差异分析等。所有样本的原始数据已经提交 GenBank 数据库中 (PRJNA705114)。

1.5 数据分析

数据经 Excel 2019 软件处理后, 用 Graph-Pad Prism 7.0 软件进行分析, 采用 *t* 检验进行对照组和脱氧胆酸钠组组间差异显著性分析, $P<0.05$ 表示差异显著。实验数据均以平均值±标准误 (mean±SE) 来表示。

2 结果

2.1 脱氧胆酸钠对大口黑鲈生长的影响

饲料中添加脱氧胆酸钠显著增加了大口黑鲈的终末体质量、体长以及肥满度 (CF)($P<0.05$), 但是对脏体比和肝体比没有显著影响。大口黑鲈的粗蛋白含量和总脂肪含量在 2 组之间没有显著差异。与对照组相比, 脱氧胆酸钠组肝糖原含量没有显著变化, 但肌糖原含量显著增加 ($P<0.05$)(图 1)。

2.2 脱氧胆酸钠对大口黑鲈肌肉糖代谢的影响

为了进一步验证脱氧胆酸钠对肌糖原的影响, 将大口黑鲈的肌肉进行石蜡切片、PAS 染色观察。相比于对照组, 脱氧胆酸钠组的大口黑鲈肌糖原含量明显增多 (图 2-a)。脱氧胆酸钠组肌肉中与糖原合成相关的 GCS 活性显著高于对照组 ($P<0.05$)(图 2-b), 而与糖原分解相关的 GP_a 的活性在 2 组之间没有显著差异 (图 2-c)。此外, 本研究还检测了肌肉中与糖酵解相关的己糖激酶基因 (*hk-4*-like)、磷酸果糖激酶基因 (*pfkpa*) 的表达以及与糖异生相关的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因 (*pepck*-2)、葡萄糖-6-磷酸酶基因 (*g6pase*-like)、果糖-1,6-二磷酸酶基因 (*fbpase*-1b) 等基因的表达。结果发现, 脱氧胆酸钠组 *g6pase*-like 的表达显著高于对照组 ($P<0.05$), *hk-4*-like、*pfkpa*、*pepck*-2 和 *fbpase*-1b 的表达则无显著差异 (图 2-d), 说明饲料中添加脱氧胆酸钠可以促进肌肉糖异生并增加糖原合成酶的活性, 促进肌肉中糖原的积累。

2.3 脱氧胆酸钠对大口黑鲈肝脏糖代谢的影响

为进一步确认脱氧胆酸钠对肝脏糖代谢的影响, 将大口黑鲈肝脏进行石蜡切片、PAS 染色观察, 并测定了 GCS 和 GP_a 的活力以及糖酵解、糖异生关键酶基因的表达情况。结果发现, 脱氧胆酸钠组和对照组肝脏中糖原的含量没有明显差异 (图 3-a)。肝脏中 GCS 和 GP_a 的活性在 2 组之间也无显著的变化 (图 3-b, c)。饲料中添加脱氧胆酸钠显著上调了 *fbpase*-1b 的表达 ($P<0.05$) (图 3-d)。上述结果表明, 在饲料中添加脱氧胆酸钠虽然可以调节肝脏中的糖异生, 但由于糖原合成与分解相关的酶活并未受到显著的影响, 因此肝脏中糖原含量在 2 组间并没有显著差异。

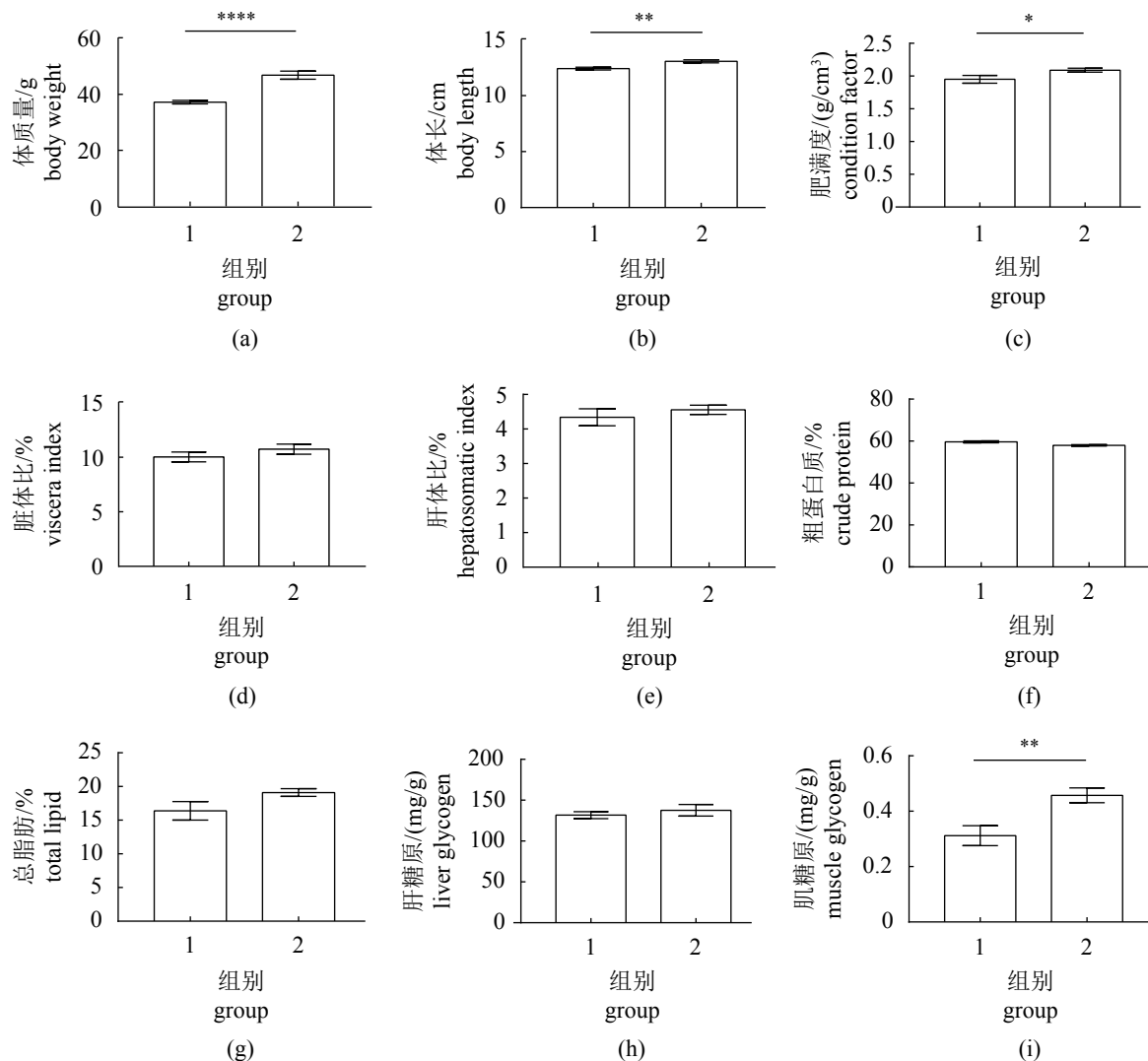


图 1 脱氧胆酸钠对大口黑鲈生长、体成分和糖原的影响

(a) 体质量, (b) 体长, (c) 肥满度, (d) 脏体比, (e) 肝体比, (f) 粗蛋白, (g) 总脂肪, (h) 肝糖原, (i) 肌糖原; 1. 对照组, 2. 脱氧胆酸钠组; *, **, ****, 分别表示 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.0001$; 下同

Fig. 1 Effects of sodium deoxycholate on growth performance, body composition and glycogen of *M. salmoides*

(a) body weight, (b) body length, (c) condition factor, (d) viscera index, (e) hepatosomatic index, (f) crude protein, (g) total lipid, (h) liver glycogen, (i) muscle glycogen; 1. control group, 2. sodium deoxycholate group; *, **, ****, represent significant difference at $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.0001$ level, respectively; the same below

2.4 脱氧胆酸钠对大口黑鲈胆汁酸代谢的影响

为了探究脱氧胆酸钠是否会影响大口黑鲈的胆汁酸代谢, 本实验测定了不同组织中胆汁酸的含量。结果发现, 脱氧胆酸钠组的胆囊中的总胆汁酸含量显著高于对照组 ($P < 0.05$)。在肝脏、肠道内容物、血清中 2 组之间的总胆汁酸含量没有显著的差异, 但相比于对照组, 脱氧胆酸钠组中肠道和血清中总胆汁酸含量均有上升的趋势 (图 4)。

胆汁酸经典合成途径限速酶基因 (*cyp7a1*)

的表达结果显示, 脱氧胆酸钠组 *cyp7a1* 的表达显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 4-e)。同时, 脱氧胆酸钠组胆汁酸受体基因 (*fxr*) 的表达显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 4-f)。说明大口黑鲈摄食添加脱氧胆酸钠的饲料会造成肝脏中 *fxr* 的表达下调以及 *cyp7a1* 的表达上调, 进而促进胆汁酸的合成并造成胆囊中胆汁酸的积累。

2.5 脱氧胆酸钠对大口黑鲈肠道菌群的影响

考虑到肠道菌群与胆汁酸代谢密切相关^[18], 我们利用 16S *rRNA* 测序技术分析了 2 组大口黑

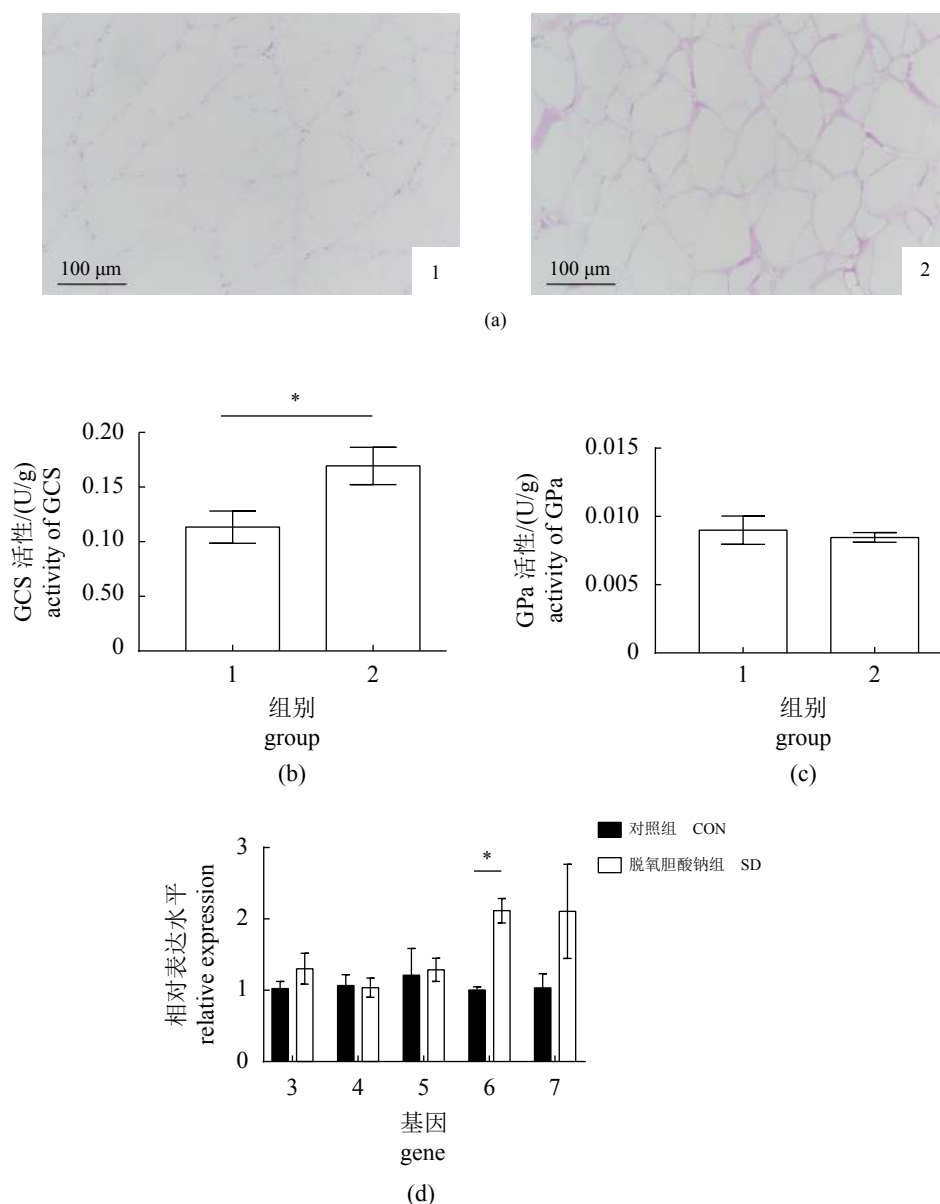


图 2 脱氧胆酸钠对大口黑鲈肌肉糖代谢的影响

(a) PAS 染色 ($\times 400$), (b) GCS 活性, (c) GPa 活性, (d) 糖酵解和糖异生相关基因的表达水平; 1. 对照组, 2. 脱氧胆酸钠组, 3. *hk-4-like*, 4. *pfkpa*, 5. *pepck-2*, 6. *g6pase-like*, 7. *fbpase-1b*; 下同

Fig. 2 Effects of sodium deoxycholate on glucose metabolism of *M. salmoides* muscle

(a) glycogen with Periodic Acid-Schiff stain ($\times 400$), (b) activity of glycogen synthase, (c) activity of glycogen phosphorylase, (d) the expression level of glycolysis-related and gluconeogenesis-related genes; 1. control group, 2. sodium deoxycholate group, 3. *hk-4-like*, 4. *pfkpa*, 5. *pepck-2*, 6. *g6pase-like*, 7. *fbpase-1b*; the same below

鲈肠道菌群的组成。通过分析各类群在门水平上的相对丰度发现, 对照组的优势菌为软壁菌门(Tenericutes, 35.78%)、变形菌门(Proteobacteria, 17.68%)、放线菌门(Actinobacteria, 7.10%)和拟杆菌门(Bacteroidetes, 13.07%), 脱氧胆酸钠组的优势菌为放线菌门(51.65%)、软壁菌门(17.07%)和变形菌门(15.52%)。与对照组相比, 脱氧胆酸

钠组的厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门的丰度显著降低, 放线菌门的丰度显著增加 ($P < 0.05$) (图 5-a)。通过主坐标分析(图 5-b)发现, 对照组和脱氧胆酸钠组的菌群组成存在明显的差异。46 个 ASV 的热图分析显示, 在对照组和脱氧胆酸钠组间有 17 个 ASV 发生了显著的变化, 其中与脱氧胆酸钠组相比, 拟杆菌门的 7 个 ASV 和

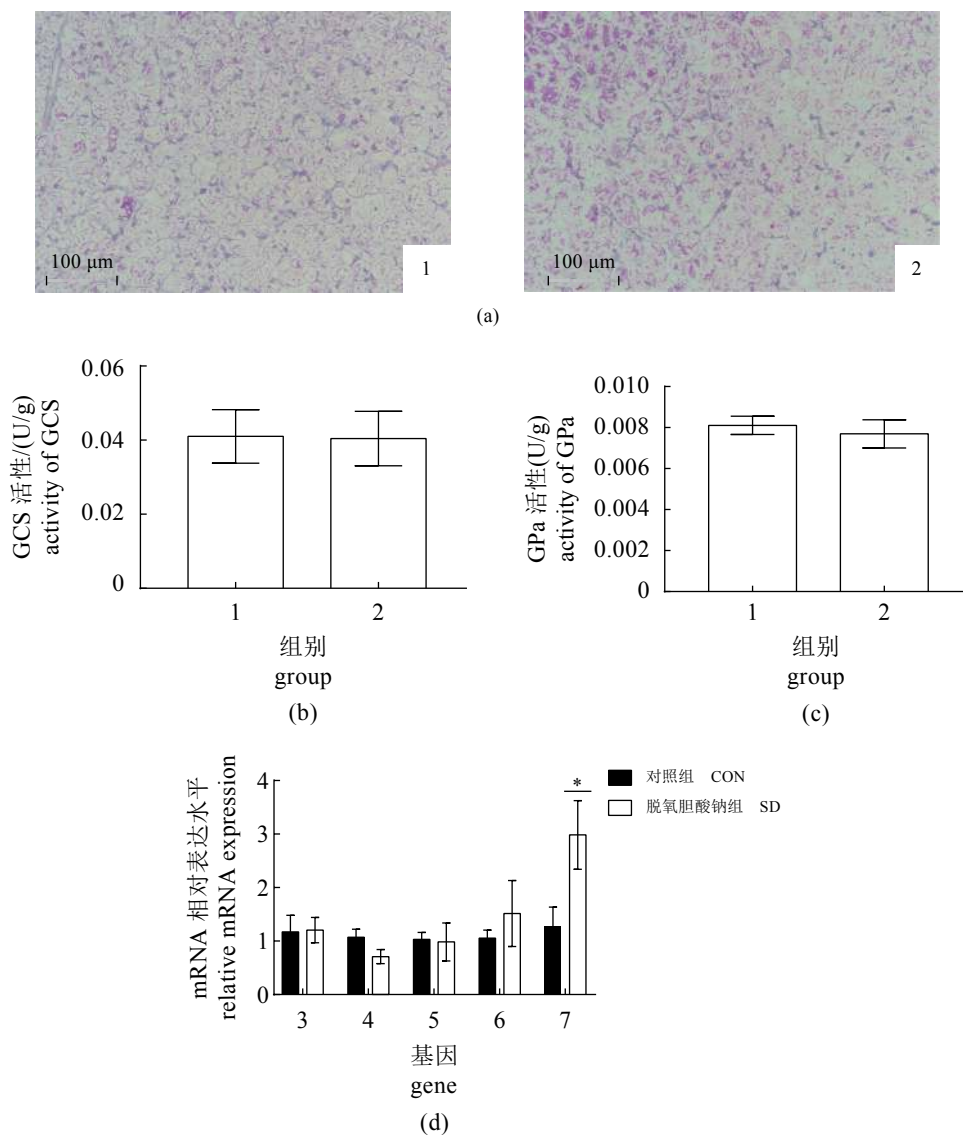


图3 脱氧胆酸钠对大口黑鲈肝脏糖代谢的影响

Fig. 3 Influence of sodium deoxycholate on glucose metabolism of *M. salmoides* liver

厚壁菌门的6个ASV显著降低,放线菌门的1个ASV和变形菌门的3个ASV显著增加 ($P < 0.05$) (图5-c)。

3 讨论

胆汁酸是胆固醇的代谢产物,在肝脏中合成并存储于胆囊中,对机体的脂肪代谢起着重要的调控作用^[18]。本实验在饲料中添加脱氧胆酸钠可以显著提高大口黑鲈终末体质量,这与在饲料中添加一定量的混合型胆汁酸对军曹鱼^[5]、大口黑鲈^[6]、大菱鲆^[7]、吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus* GIFT) 幼鱼^[21]生长的影响是一致的。肥满度是反应鱼体生长情况的指标,在本研究中,

脱氧胆酸钠的添加显著增加了大口黑鲈的肥满度,说明脱氧胆酸钠的添加可以改善大口黑鲈的生长状况,这与在齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*) 幼鱼^[22]上的研究结果基本一致。有研究发现,在饲料中添加一定浓度的胆汁酸复合物可以显著提高草鱼肝胰脏以及肠道各段的蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的活性^[23],进而促进草鱼对饲料中营养物质的吸收利用,促进草鱼的生长。向泉等^[24]的研究表明,在高脂饲料中添加胆汁酸复合物可以显著提高齐口裂腹鱼幼鱼肝脏以及肠道的蛋白酶和脂肪酶的活性。但在本研究中,饲料中脱氧胆酸钠的添加对大口黑鲈消化酶活性并没有显著影响,这可能与脱氧胆酸钠的添

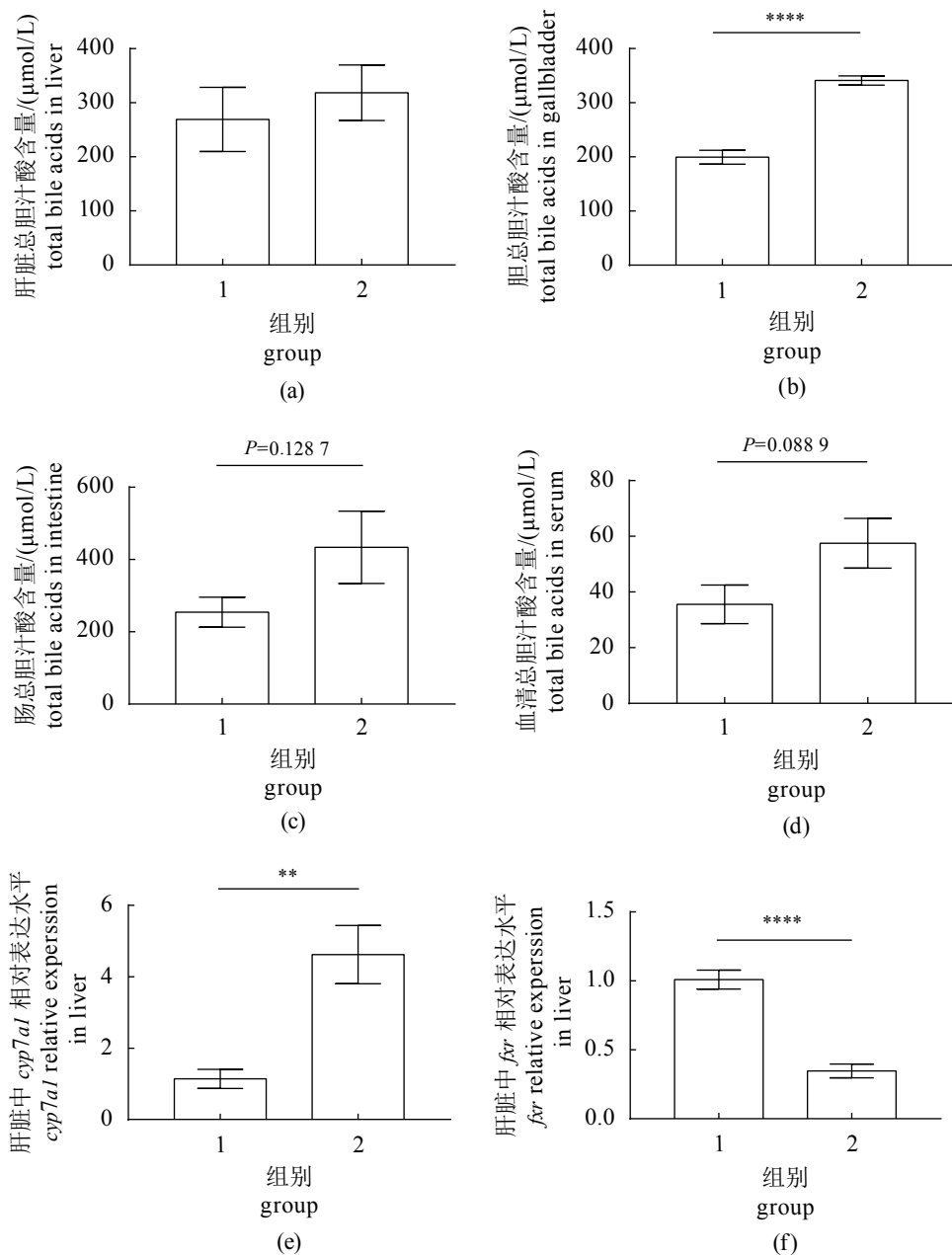


图 4 脱氧胆酸钠对大口黑鲈胆汁酸代谢的影响

(a) 肝脏总胆汁酸, (b) 胆总胆汁酸, (c) 肠总胆汁酸, (d) 血清总胆汁酸, (e) 脱氧胆酸钠对大口黑鲈肝脏中 *cyp7a1* 表达的影响, (f) 脱氧胆酸钠对大口黑鲈肝脏中 *fxr* 表达的影响; ***表示 $P<0.001$

Fig. 4 Effects of sodium deoxycholate on the bile acid metabolism of *M. salmoides*

(a) total bile acid in liver, (b) total bile acid in gallbladder, (c) total bile acid in intestine, (d) total bile acid in serum, (e) influence of sodium deoxycholate on the relative mRNA expression of *cyp7a1* in *M. salmoides* liver, (f) influence of sodium deoxycholate on the relative mRNA expression of *fxr* in *M. salmoides* liver; *** represents significant difference at $P<0.001$

加剂量有关。因此在今后的实验中, 还需检测多个剂量梯度的脱氧胆酸钠添加对鱼体代谢的系统性影响。

本研究发现, 在饲料中添加脱氧胆酸钠可以显著增加肌肉中糖原的积累, 有文献报道, 胆汁酸可以通过 FXR 介导的信号通路来调控宿

主的糖代谢^[1], FXR 与糖异生密切相关, 如胆酸可以激活小鼠的 FXR 并通过诱导小异二聚体伴侣 (small heterodimer partner, SHP)。抑制糖异生基因的表达同时降低血糖水平^[25]。在本实验同样发现, 脱氧胆酸钠显著降低了大口黑鲈肝脏中 *fxr* 的表达量, 促进肝脏中 *fbpase-1b* 和肌肉中 *g6pase-*

like 的表达显著上调。脱氧胆酸钠引起的糖异生基因表达的上调并没有造成血糖的变化, 但增加了肌糖原的含量, 通过检测发现脱氧胆酸钠显著增加了肌肉中 GCS 的活性。由此可见, 脱氧胆酸钠可能促进糖异生并通过增强 GCS 的活性, 提高肌肉对血糖的储存利用。

FXR 是调节胆汁酸稳态的重要受体^[26-28], 可以通过抑制 *cyp7a1* 活性来负反馈调控胆汁酸合成^[29]。本研究中, 在饲料中添加脱氧胆酸钠显著下调了 *fxr* 的表达, 使其对 CYP7A1 酶的抑制作用减弱, 增加了胆汁酸的合成, 促进了胆囊中胆汁酸的积累。但也有研究表明, 在饲料中添加胆汁酸复合物对大口黑鲈 *fxr* 的表达没有影响^[30]。在高等动物中的研究发现 FXR 受体对不同胆汁酸的响应存在一定差异^[1,18], 在鱼类中是否有类似的规律, 还需要深入的研究。

在进食时, 胆汁酸会从胆囊分泌到肠道中, 并且在肠道菌群的作用下被进一步代谢^[18], 而肠道菌群的组成与胆汁酸稳态密切相关^[31]。有研究发现, 在饲料中添加 LCA 增加了草鱼肠道中的变形菌门和厚壁菌门的相对丰度, 减少了梭杆菌门的相对丰度^[32]; 也有研究发现, 饲料中添加胆汁酸复合物减少了草鱼肠道中厚壁菌门和放线菌门的丰度, 提高了拟杆菌门丰度^[33]。赵盼月^[34]研究发现, 低剂量的胆汁酸复合物会增加欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*) 肠道中厚壁菌门和拟杆菌门的相对丰度, 高剂量的胆汁酸复合物会降低厚壁菌门和拟杆菌门的相对丰度。在本研究中, 饲料中添加脱氧胆酸钠显著改变了肠道菌群的组成并显著降低了大口黑鲈肠道中厚壁菌门和拟杆菌门的相对丰度, 增加了放线菌门的相对丰度。这说明不同种类、不同添加剂量的胆汁酸对鱼类肠道菌群的影响差异较大。肠道菌群在宿主应对外界环境变化过程中发挥着重要调节作用^[35], 同时会影响宿主的生长^[36]与代谢^[37]。但由于鱼类的固有菌群与高等生物不同, 并且在鱼类中肠道微生物功能的研究尚处于起步阶段, 因此, 脱氧胆酸钠添加以后大口黑鲈肠道中微生物组成的变化是否与脱氧胆酸钠促进大口黑鲈生长相关目前尚不清楚, 后续可以通过菌群转接等实验来对肠道微生物的功能进行进一步确认。

4 结论

本研究探讨了饲料中添加单一的脱氧胆酸钠对大口黑鲈生长、糖代谢、胆汁酸代谢和肠道菌群的影响。结果表明, 在饲料中添加 300 mg/kg 的脱氧胆酸钠可以促进大口黑鲈的生长、促进肌糖原的积累、增加胆汁酸的合成及影响肠道菌群组成结构。在水产养殖中, 饲料中添加一定量的胆汁酸有一定的促生长作用, 但胆汁酸的组成复杂, 不同胆汁酸种类对鱼类生长的影响并不是一致的。胆汁酸的种类、添加剂量、鱼的种类、发育阶段以及饲料组成都可能影响胆汁酸对鱼类的作用效果, 因此, 不同种类的胆汁酸对不同鱼种生长的影响需要深入系统的研究。

参考文献 (References):

- [1] Ahmad T R, Haeusler R A. Bile acids in glucose metabolism and insulin signalling—mechanisms and research needs[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2019, 15(12): 701-712.
- [2] Hori S, Abe T, Lee D G, *et al.* Association between 12 α -hydroxylated bile acids and hepatic steatosis in rats fed a high-fat diet[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2020, 83: 108412.
- [3] Best N V, Rolle-Kampczyk U, Schaap F G, *et al.* Bile acids drive the newborn's gut microbiota maturation[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 3692.
- [4] 何杰. 饲料添加胆汁酸对异育银鲫生长、氧化损伤修复、内源胆汁酸代谢以及 CyHV-2 免疫保护作用的影响 [D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
He J. The effects of bile acids supplementation on the growth, oxidative damage, repair, endogenous bile acid metabolism, and cyhv-2 immune protection of allogynogenetics silver crucian carp *Carassius auratus gibelio*[D]. Suzhou: Soochow University, 2018 (in Chinese).
- [5] 周书耘, 刘永坚, 梁海鸥, 等. 饲料中添加胆汁酸对军曹鱼生长及体组成的影响[J]. *南方水产*, 2010, 6(4): 20-25.
Zhou S Y, Liu Y J, Liang H O, *et al.* Effect of bile acids on growth and body composition of cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *South China Fisheries Science*,

- 2010, 6(4): 20-25(in Chinese).
- [6] Yu H H, Zhang L L, Chen P, *et al.* Dietary bile acids enhance growth, and alleviate hepatic fibrosis induced by a high starch diet via AKT/FOXO1 and cAMP/AMPK/SREBP1 pathway in *Micropterus salmoides*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 1430.
- [7] 毕铮铮, 吴立新, 李晓美, 等. 不同脂肪水平饲料中添加胆汁酸对大菱鲂生长和肌肉脂肪酸组成的影响[J]. *现代农业科技*, 2019(7): 190-191, 195.
- Bi Z Z, Wu L X, Li X M, *et al.* Effect of dietary lipid level mixed with bile acid on growth performance and body fatty acid compositions of *Scophthalmus maximus*[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2019(7): 190-191, 195(in Chinese).
- [8] Ridlon J M, Kang D J, Hylemon P B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria[J]. *Journal of Lipid Research*, 2006, 47(2): 241-259.
- [9] Russell D W. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2003, 72: 137-174.
- [10] Wahlström A, Sayin S I, Marschall H U, *et al.* Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism[J]. *Cell Metabolism*, 2016, 24(1): 41-50.
- [11] Ridlon J M, Bajaj J S. The human gut sterolbiome: bile acid-microbiome endocrine aspects and therapeutics[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2015, 5(2): 99-105.
- [12] Minato K, Suzuki M, Nagao H, *et al.* Development of analytical method for simultaneous determination of five rodent unique bile acids in rat plasma using ultra-performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2015, 1002: 399-410.
- [13] Spinelli V, Lalloyer F, Baud G, *et al.* Influence of Roux-en-Y gastric bypass on plasma bile acid profiles: a comparative study between rats, pigs and humans[J]. *International Journal of Obesity*, 2016, 40(8): 1260-1267.
- [14] 张晶, 李文祥, 邹红, 等. 草鱼不同组织胆汁酸组成成分分析[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(2): 479-482.
- Zhang J, Li W X, Zou H, *et al.* An analysis of bile acid composition in different tissues of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(2): 479-482(in Chinese).
- [15] 姚婷, 韦娴, 薛敏, 等. 大菱鲂胆汁和血浆中的胆汁酸轮廓分析[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(12): 5816-5826.
- Yao T, Wei X, Xue M, *et al.* Contour identification and analysis of bile acids in bile and plasma of *Scophthalmus maximus* L.[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(12): 5816-5826(in Chinese).
- [16] Sousa T, Castro R E, Pinto S N, *et al.* Deoxycholic acid modulates cell death signaling through changes in mitochondrial membrane properties[J]. *Journal of Lipid Research*, 2015, 56(11): 2158-2171.
- [17] Xie Q, Khaoustov V I, Chung C C, *et al.* Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation[J]. *Hepatology*, 2002, 36(3): 592-601.
- [18] De Aguiar Vallim T Q, Tarling E J, Edwards P A. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism[J]. *Cell Metabolism*, 2013, 17(5): 657-669.
- [19] 张露露. 胆汁酸在大口黑鲈饲料中有效性及耐受性评价[D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
- Zhang L L. Efficacy and tolerance assessment of bile acid in *Micropterus salmoides*[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [20] Zhang W, Liu K, Tan B P, *et al.* Transcriptome, enzyme activity and histopathology analysis reveal the effects of dietary carbohydrate on glycometabolism in juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*[J]. *Aquaculture*, 2019, 504: 39-51.
- [21] 朱传忠, 孙陆宇, 解文丽, 等. 3种饲料添加剂对吉富罗非鱼幼鱼生长性能、消化酶活性和肝、肠组织结构的影响[J]. *淡水渔业*, 2018, 48(2): 94-99.
- Zhu C Z, Sun L Y, Xie W L, *et al.* Effects of 3 feed additives on the growth performance, digestive enzyme activity, liver and intestine histological structure for the juvenile genetically improved farmed tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(2): 94-99(in Chinese).
- [22] 郑宗林, 曾本和, 向梈, 等. 饲料中胆汁酸添加水平对齐口裂腹鱼幼鱼生长性能、形体指标及体成分的影响[J]. *动物营养学报*, 2016, 28(8): 2423-2430.
- Zheng Z L, Zeng B H, Xiang X, *et al.* Effects of bile acid supplemental level on growth performance, physical indices and body composition of juvenile *Schizothorax prenanti*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016,

- 28(8): 2423-2430(in Chinese).
- [23] 曾本和, 廖增艳, 向泉, 等. 胆汁酸对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的生长性能、肌肉营养成分及消化酶活性的影响[J]. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 99-106.
- Zeng B H, Liao Z Y, Xiang X, *et al.* Effects of bile acids on growth performance, muscle composition and digestive enzyme activities of *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 99-106(in Chinese).
- [24] 向泉, 曾本和, 杨理想, 等. 高脂饲料中添加胆汁酸对齐口裂腹鱼幼鱼生长性能、肌肉营养成分含量、消化酶活性及血清生化指标的影响[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(11): 5089-5099.
- Xiang X, Zeng B H, Yang L X, *et al.* Effects of high-lipid diet supplemented with bile acid on growth performance, muscle nutritional component contents, digestive enzyme activities and serum biochemical indices of Juvenile *Schizothorax prenanti*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(11): 5089-5099(in Chinese).
- [25] Ma K, Saha P K, Chan L, *et al.* Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116(4): 1102-1109.
- [26] Parks D J, Blanchard S G, Bledsoe R K, *et al.* Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1365-1368.
- [27] Makishima M, Okamoto A Y, Repa J J, *et al.* Identification of a nuclear receptor for bile acids[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1362-1365.
- [28] Wang H B, Chen J, Hollistie K, *et al.* Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR[J]. *Molecular Cell*, 1999, 3(5): 543-553.
- [29] Goodwin B, Jones S A, Price R R, *et al.* A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1 and LRH-1 represses bile acid biosynthesis[J]. *Molecular Cell*, 2000, 6(3): 517-526.
- [30] 郁欢欢. 高糖饲料诱导大口黑鲈代谢性肝病及胆汁酸靶向干预机制研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- Yu H H. Metabolic liver disease induced by a high carbohydrate diet in largemouth bass (*Micropterus salmoides*), and the alleviating mechanism of bile acid supplementation[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese).
- [31] Wei M L, Huang F J, Zhao L, *et al.* A dysregulated bile acid-gut microbiota axis contributes to obesity susceptibility[J]. *EBioMedicine*, 2020, 55: 102766.
- [32] Xiong F, Wu S G, Qin L, *et al.* Transcriptome analysis of grass carp provides insights into disease-related genes and novel regulation pattern of bile acid feedback in response to lithocholic acid[J]. *Aquaculture*, 2019, 500: 613-621.
- [33] 陈昊杰. 胆汁酸对草鱼生长、脂质代谢及肠道微生物区系的影响 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2016.
- Chen H J. Influence of bile acids on the growth performance, lipid metabolism and the intestinal microbiota in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*[D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2016 (in Chinese).
- [34] 赵盼月. 饲料中添加胆汁酸对欧洲鳗鲡幼鱼生长、血清生化指标、肠道菌群及肝脏代谢的影响 [D]. 厦门: 集美大学, 2019.
- Zhao P Y. Effects of dietary bile acid supplementation on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal flora and liver metabolism of juvenile european eel (*Anguilla anguilla*)[D]. Xiamen: JiMei University, 2019 (in Chinese).
- [35] Moore A M, Munck C, Sommer M O A, *et al.* Functional metagenomic investigations of the human intestinal microbiota[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 188.
- [36] Mohammadian T, Nasirpour M, Tabandeh M R, *et al.* Administrations of autochthonous probiotics altered juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* health status, growth performance and resistance to *Lactococcus garvieae*, an experimental infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 269-279.
- [37] Zhang M L, Li M, Sheng Y, *et al.* *Citrobacter* species increase energy harvest by modulating intestinal microbiota in fish: nondominant species play important functions[J]. *mSystems*, 2020, 5(3): e00303-e00320.

Effects of dietary sodium deoxycholate on the growth, glucose metabolism and intestinal microbiota of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

ZHOU Nannan, DING Feifei, ZHANG Le, QIAO Fang, DU Zhenyu, ZHANG Meiling*

(Lab of Aquaculture Nutrition and Environment Health, College of Life Sciences,
East China Normal University, Shanghai 200241, China)

Abstract: Bile acids play an important role in glucose metabolism, lipid metabolism, and they can also help to maintain the liver health and intestinal homeostasis in animals. In recent years, bile acids have been widely used as new additives in aquatic feeds. However, so far, most of the bile acid products used in aquaculture are mixed bile acids. There are many different kinds of bile acids, and different bile acids have different effects on the growth and metabolism of fish. Therefore, it is necessary to evaluate the effects of different bile acids on fish growth and metabolism to select the appropriate type of bile acids for precise nutritional regulation. This experiment was conducted to evaluate the effect of sodium deoxycholate as a feed additive on *Micropterus salmoides*. Two experimental diets were formulated to contain different sodium deoxycholate levels of 0, and 300 mg/kg referred to as CON and SD, respectively. The effects of sodium deoxycholate on the growth condition, metabolic characteristics and intestinal microbiota were analyzed. *M. salmoides* (10.80 ± 0.12) g were cultured for 8 weeks. The results showed that sodium deoxycholate significantly increased the final body weight [(37.24 ± 0.64) g in the control group and (46.87 ± 1.44) g in the sodium deoxycholate group]. The body length was (12.42 ± 0.12) cm in the control group and (13.07 ± 0.14) cm in sodium deoxycholate group. The condition factor (CF) was (1.95 ± 0.06) g/cm³ in the control group and (2.09 ± 0.03) g/cm³ in the sodium deoxycholate group, but there was no significant difference in viscera index (VSI) or hepatosomatic index (HSI). Sodium deoxycholate had no effect on the total lipid and crude protein of whole fish. Sodium deoxycholate significant increased the expression level of gluconeogenesis-related and glycolysis-related genes in liver and muscle, and the sodium deoxycholate promoted the glycogen accumulation in muscle [(0.31 ± 0.03) mg/g in control group and (0.46 ± 0.03) mg/g in sodium deoxycholate group] by increasing the activity of glycogen synthase, but there was no significant difference in the liver glycogen content between these two groups. In addition, sodium deoxycholate significantly increased bile acids content in gallbladder [(199.4 ± 12.72) μ mol/L in control group, (341.1 ± 8.52) μ mol/L in sodium deoxycholate group]. Our results indicated that sodium deoxycholate can promote the bile acid synthesis mainly by down-regulating the expression level of *fxr* gene and up-regulating the expression level of *cyp7a1* gene in the liver. The abundance of Firmicutes and Bacteroidetes decreased while Actinobacteria increased in *M. salmoides* fed with sodium deoxycholate at the phylum level. All these results suggested that sodium deoxycholate can be used as a feed additive for *M. salmoides* to promote the growth condition, and increase muscle glycogen accumulation and bile acid synthesis.

Key words: *Micropterus salmoides*; sodium deoxycholate; muscle glycogen; bile acid; intestinal microflora

Corresponding author: ZHANG Meiling. E-mail: mlzhang@bio.ecnu.edu.cn

Funding project: National Natural Science Foundation of China (31972798)