



卫云, 张颖昕, 王贝贝, 等. spexin 通过增强胰岛素介导的 PI3K/Akt 信号通路调控草鱼糖代谢 [J]. 水产学报, 2026, 50(5): 059108.

Wei Y, Zhang Y X, Wang B B, *et al.* Spexin regulates glucose metabolism by enhancing the insulin-mediated PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2026, 50(5): 059108 (in Chinese).

spexin 通过增强胰岛素介导的 PI3K/Akt 信号通路 调控草鱼糖代谢

卫云¹, 张颖昕¹, 王贝贝¹, 闫潇¹, 王俊丽², 秦超彬^{1*}, 聂国兴^{1*}

(1. 河南师范大学水产学院, 河南新乡 453007;

2. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要: 【目的】spexin (SPX) 是由 14 个氨基酸组成的多肽类激素, 在鱼类中存在 SPX1 和 SPX2 两种亚型。为了探究 spexin 是否能够通过增强胰岛素介导的 PI3K/Akt 信号通路, 从而调控草鱼肝细胞糖代谢。【方法】实验以草鱼为研究对象, 使用原代肝细胞, 通过 Western blot 实验, 探究 SPX1 和 SPX2 对原代肝细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响; 并分别使用 PI3K 和 Akt 的抑制剂阻断该信号通路, 利用荧光定量 PCR 技术, 比较阻断上述信号通路前后, SPX1、SPX2 对胰岛素介导的糖代谢作用的变化。【结果】胰岛素可激活 PI3K/Akt 信号通路, 胰岛素与 100 nmol/L SPX1 或 SPX2 共同处理原代肝细胞 15 min 时 Akt 蛋白磷酸化水平最高。SPX1 或 SPX2 均可增强胰岛素对 PI3K/Akt 信号通路的激活作用, 进一步提高糖酵解关键酶基因 (*gk*、*pk* 和 *pfkla*)、葡萄糖转运蛋白 2 (*glut2*) 和糖原合成酶基因 (*gys*) mRNA 的表达水平, 抑制糖异生关键酶基因 (*g6pase*、*pepck*) 及糖原分解酶基因 (*pygl*) mRNA 的表达。【结论】SPX1 和 SPX2 增强了胰岛素对 PI3K/Akt 信号通路的激活作用, 进一步促进了肝细胞的糖酵解和糖原合成, 抑制了糖异生和糖原分解途径, 表明其可在肝细胞中增强胰岛素的糖代谢调控作用。

关键词: 草鱼; spexin; 胰岛素; 原代肝细胞; 糖代谢

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

碳水化合物是大多数脊椎动物可利用的廉价能源物质^[1]。在饲料中添加适当水平的糖类可以有效节约蛋白质和降低饲料成本^[2]。鱼类对糖类的利用能力较低, 摄入高糖类饲料后, 鱼体内肝糖原含量增加, 从而破坏肝脏正常代谢功能, 导

致鱼类脂肪肝等病理现象^[3-4]。因此探究不同鱼类对碳水化合物的利用及能量代谢机理已经成为鱼类营养学领域的热点之一^[5]。鱼类体内糖代谢与内分泌系统之间存在复杂且高度协调的调控网络, 涉及多个激素和信号通路^[6]。鱼类摄入糖类后,

收稿日期: 2025-12-10 修回日期: 2026-01-21

资助项目: 国家重点研发计划 (2023YFD2400601); 河南省现代农业产业技术体系建设专项 (HARS-22-16-G2)

第一作者: 卫云, 从事鱼类营养代谢与品质研究, E-mail: 15238906698@163.com

通信作者: 秦超彬, 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: qinchao88639501@163.com;

聂国兴, 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: niegx@htu.cn



血糖水平升高, 刺激胰岛 β 细胞分泌胰岛素^[7], 胰岛素通过激活糖原合成酶、抑制糖原磷酸化酶从而促进糖原合成^[8], 增强组织对葡萄糖的利用^[7], 降低血糖水平。此外, 胰高血糖素样肽-1(GLP-1)^[9]、脂联素 (adiponectin)^[10]、鸢尾素 (irisin)^[11] 等内分泌因子也可以通过影响糖酵解、糖异生和糖原合成等过程调节鱼类糖代谢。现有研究已揭示了多种内分泌因子在鱼类糖代谢调控中的作用, 由于糖代谢内分泌调控网络的复杂性, 其内在的调控机制尚未被完全阐明^[12-14]。近年来, 在哺乳动物中陆续发现了新型的内分泌因子, 它们在能量稳态和糖代谢中扮演着重要角色。将这些因子引入鱼类研究, 有望揭示其糖代谢调控的独特性与进化保守性, 为鱼类精准营养调控提供新的靶点。

spexin(SPX) 是 2007 年通过生物信息学方法在人类基因组中发现的一种新型多肽类激素^[15]。2014 年, 在非哺乳动物中发现了 spexin 的另一种基因亚型 *spx2*, 之前发现的基因亚型被重新命名为 *spx1*^[16]。研究发现, spexin 前体包括信号肽序列、含有 14 个氨基酸的成熟肽片段及其两侧的二元切割位点^[17]。四足类 SPX1 成熟肽的氨基酸序列与鱼类 SPX1 成熟肽的氨基酸序列之间仅有 1 个氨基酸位点存在差异^[18]。在小鼠 (*Mus musculus*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、金鱼 (*Carassius auratus*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) 中均发现了人类 *spx1* 基因的直系同源序列^[16]。在半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)^[19]、青鳉 (*Oryzias latipes*)^[20]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[21] 和斑马鱼^[18] 等鱼类中均报道了 *spx2* 基因。通过多序列比对发现, 草鱼 SPX2 成熟肽与其他物种高度保守, 与斑马鱼有较高的同源性^[21]。SPX1 和 SPX2 成熟肽在脊椎动物中高度保守且结构稳定, 仅在少数位点存在氨基酸差异, 这表明 spexin 在生物体内可能发挥重要的生理作用。

在猪胰腺中, spexin 与胰岛素在胰岛 β 细胞中共定位^[22], 表明 spexin 与胰岛素之间存在一定的内在联系和相互作用。在肥胖大鼠 (*Rattus norvegicus*) 模型中, 注射 SPX 可导致胰岛素的分泌减少, 提示 SPX 可能通过抑制胰岛素分泌改善胰岛素敏感性^[23]。在鱼类中, 敲除 *spx1* 基因导致斑马鱼血清葡萄糖水平升高^[24], 敲除 *spx2* 基因则导致胰岛素抵抗^[25]。金鱼腹腔注射胰岛素后, 血

浆和肝胰脏中 *spexin* mRNA 的表达增加^[26]。前期研究发现, SPX1 和 SPX2 能够降低草鱼血糖水平, 它们既可靶向肝细胞实现对糖代谢的直接调控作用, 又可增强胰岛素对糖代谢的调控, 发挥间接作用^[21]。研究表明 spexin 在调节胰岛素分泌和机体糖代谢等方面发挥重要作用^[27]。

胰岛素通过与肝脏、骨骼肌和脂肪等靶器官或组织表面的胰岛素受体结合, 激活下游信号通路发挥生物功能^[28]。因靶细胞部位和功能的差异, 胰岛素信号传导有多种途径, 是一种多位点、多层次的“信号网络”^[29]。其中 PI3K/Akt 是响应胰岛素的经典信号通路^[30], 在促进葡萄糖摄取与代谢、细胞生存等过程中发挥重要作用^[31]。胰岛素激活 PI3K/Akt 信号通路后, 可通过促进葡萄糖摄取、糖原合成以及抑制糖异生等途径降低血糖^[32]。

肝脏是调节葡萄糖代谢的关键器官, 其主要代谢功能是在餐后将葡萄糖以糖原形式储存, 并在需要维持血糖浓度相对稳定时, 通过糖原分解和糖异生将其释放到血液中。在鱼类中, Ma 等^[26] 使用 PI3K 和 Akt 抑制剂处理肝胰脏和脑细胞后发现, 胰岛素介导的 *spx1* mRNA 表达量显著降低, 表明 spexin 与 PI3K/Akt 信号通路密切相关。前期研究发现, SPX1 和 SPX2 可增强胰岛素在肝细胞中的作用效果, 提高肝细胞对胰岛素的敏感性, 但其具体作用机制尚不明确^[21]。因此推测, spexin 可能通过增强胰岛素介导的 PI3K/Akt 信号通路实现对糖代谢的间接调控。为了验证上述科学假设, 并进一步探究 spexin 调节草鱼糖代谢的具体作用途径, 实验在离体条件下分别使用 PI3K 和 Akt 的抑制剂阻断该信号通路, 利用 Western blot 和荧光定量 PCR 等技术, 比较阻断上述信号通路前后, SPX1、SPX2 对胰岛素介导的糖代谢调控作用的变化, 为完善鱼类糖代谢的调控网络奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验草鱼 (40.0±2.0 g) 购自河南省新乡市漯河众康水产养殖基地, 饲养于河南师范大学水产学院室内淡水养殖桶 (1 100 L, 每箱 300 尾) 中。草鱼用商品饲料 (无氮浸出物 38%、粗蛋白质 30%、粗脂肪 5%) 进行饱食投喂, 每天投喂 3 次 (8:00、12:00、17:30)。水质条件: 溶解氧 > 6 mg/L, 氨

氮 < 0.01 mg/L, 平均水温 (25±1)℃。

1.2 草鱼原代肝细胞的分离与培养

迅速取出草鱼肝胰脏, 放入预冷的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS (含 100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素) 中, 将肝胰脏切碎, 转移至 50 mL 无菌无酶离心管, 用 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS 清洗组织; 向 30 mL 的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS 中加入 0.5 mol/L 的 EDTA (60 μL) 清洗肝脏组织, 直至组织碎片变得疏松; 用 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS 再次清洗肝脏组织; 加入 0.5 mg/mL 胶原酶 IV (C5138, Sigma) 和 100 U/mL DNase II (B002425, Sangon Biotech) 在水浴摇床中消化 (27℃、150 r/min, 30 min); 消化结束后分别用 50 和 200 μm 灭菌后的尼龙网依次过滤细胞悬液, 收集细胞, 在 4℃ 条件下分别以 70 和 50×g 连续离心 5 min, 弃上清液, 重悬于含 10% 胎牛血清 (F8687, Sigma)、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 DMEM/F-12 培养基 (D6570, 北京索莱宝科技有限公司); 取 10 μL 细胞悬液加入等体积台盼蓝溶液染色, 混匀后取 10 μL 点于细胞计数板上, 放置于倒置显微镜下观察并统计原代肝细胞的数量, 细胞存活率在 95% 以上。用培养基将细胞密度调整为 1×10^6 个/mL 后, 将细胞接种于 24 孔板中 (1×10^6 个/孔), 在 25℃、5% CO_2 的细胞培养箱 (Thermo, 美国) 中稳定培养 12 h, 稳定后弃上层培养基, 加入 500 μL 无血清培养基, 使细胞适应 1 h 后进行后续处理。

1.3 胰岛素孵育草鱼原代肝细胞

为了明确胰岛素在草鱼原代肝细胞中能否激活 PI3K/Akt 信号通路, 为后续 SPX1/SPX2 与胰岛素共同孵育实验奠定研究基础, 开展了胰岛素孵育草鱼原代肝细胞实验。细胞培养过夜后, 用 200 nmol/L 胰岛素 (I8040, 北京索莱宝科技有限公司)^[26] 处理 0、5、15、30、60 min, 每个时间

点 4 个重复。实验结束后, 缓慢吸出上层培养基, 每孔加入 100 μL 高效 RIPA 裂解液 (R0010, 北京索莱宝科技有限公司); 将裂解的细胞样品转移至 1.5 mL 无菌无酶离心管中, 12 000×g、4℃ 离心 10 min, 收集上清液。利用 BCA 蛋白试剂盒 (PC0020, 北京索莱宝科技有限公司) 测定样品蛋白浓度并将浓度统一调整为 20 $\mu\text{g}/12 \mu\text{L}$, 随后加入 5×Loading buffer (P1040, 北京索莱宝科技有限公司), 沸水浴 10 min 后分装并保存于 -80℃ 冰箱中, 待后续进行 WB 实验, 检测 PI3K/Akt 信号通路激活情况。

1.4 spexin 与胰岛素共孵育草鱼原代肝细胞

分离的原代肝细胞培养过夜后, 进行分组处理。胰岛素组: 200 nmol/L 胰岛素; 胰岛素和 spexin 共孵育组: 200 nmol/L 胰岛素 + 不同浓度 (10、100、1 000 nmol/L) 的 SPX1 或 SPX2^[23]; 对照组: 等量的 PBS; 各组 ($n=4$) 处理时间均为 15 min。具体分组及处理情况见表 1。实验结束后, 样品后续处理方式同“胰岛素孵育草鱼原代肝细胞”。SPX1 (NWTPQAMLYLKGTQ) 和 SPX2 (NWG-PQSMYLYLKGGK) 由强耀生物科技有限公司合成。SPX1、SPX2 和胰岛素均使用 PBS 作为溶剂。

1.5 草鱼原代肝细胞 PI3K/Akt 信号通路阻断实验

SPX1、SPX2 和胰岛素均使用 PBS 作为溶剂, PI3K 抑制剂 (Ly294002, IL0270, 北京索莱宝科技有限公司) 和 Akt 抑制剂 (Triciribine, IT1270, 北京索莱宝科技有限公司) 均使用 DMSO (D8371, 北京索莱宝科技有限公司) 作为溶剂。

SPX1 对草鱼原代肝细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响实验 PI3K 抑制实验: 分别使用 200 nmol/L 胰岛素、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Ly294002^[26]、200 nmol/L 胰岛素 + 100 nmol/L SPX1、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Ly294002 +

表 1 spexin 与胰岛素共孵育草鱼原代肝细胞实验

Tab. 1 Experimental study on the co-incubation of spexin and insulin in primary hepatocytes of *C. idella*

组别 groups	胰岛素+SPX1 处理浓度 insulin+SPX1 treatment concentration	胰岛素+SPX2 处理浓度 insulin+SPX2 treatment concentration
1	PBS	PBS
2	200 nmol/L 胰岛素	200 nmol/L Insulin
3	200 nmol/L 胰岛素、10 nmol/L SPX1	200 nmol/L 胰岛素、10 nmol/L SPX2
4	200 nmol/L 胰岛素、100 nmol/L SPX1	200 nmol/L 胰岛素、100 nmol/L SPX2
5	200 nmol/L 胰岛素、1 000 nmol/L SPX1	200 nmol/L 胰岛素、1 000 nmol/L SPX2

200 nmol/L 胰岛素 + 100 nmol/L SPX1 处理原代肝细胞 3 h 和 6 h, 用等量的 PBS、DMSO 处理原代肝细胞相同时间作为对照组。Akt 抑制实验: 分别使用 200 nmol/L 胰岛素、100 nmol/L Triciribine^[26]、200 nmol/L 胰岛素 + 100 nmol/L SPX1、100 nmol/L Triciribine + 200 nmol/L 胰岛素 + 100 nmol/L SPX1 处理原代肝细胞 3 h 和 6 h, 用等量的 PBS、DMSO 处理原代肝细胞相同时间作为对照组。具体分组情况见表 2。实验结束后, 缓慢吸出上层培养基, 每孔加入 500 μ L RNAiso Plus (9019, TaKaRa) 收集细胞, 随后提取总 RNA。

SPX2 对草鱼原代肝细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响实验 PI3K 抑制实验: 分别使用 200 nmol/L 胰岛素、10 μ mol/L Ly294002^[26]、200 nmol/L 胰岛素 + 100 nmol/L SPX2、10 μ mol/L Ly294002 + 200 nmol/L 胰岛素 + 100 nmol/L SPX2 处理原代肝细胞 3 h 和 6 h, 用等量的 PBS、DMSO 处理原代

肝细胞相同时间作为对照组。Akt 抑制实验: 分别使用 200 nmol/L 胰岛素、100 nmol/L Triciribine^[26]、200 nmol/L 胰岛素 + 100 nmol/L SPX2、100 nmol/L Triciribine + 200 nmol/L 胰岛素 + 100 nmol/L SPX2 处理原代肝细胞 3 h 和 6 h, 用等量的 PBS、DMSO 处理原代肝细胞相同时间作为对照组。具体分组情况见表 3。实验结束后, 缓慢吸出上层培养基, 每孔加入 500 μ L RNAiso Plus(9019, TaKaRa) 收集细胞, 随后提取总 RNA。

1.6 免疫印迹

使用蛋白免疫印迹法检测样品中 Akt (10176-2-AP, 武汉三鹰生物技术有限公司)、P-Akt (4060, Cell Signaling Technology) 蛋白表达。等量蛋白经 SDS-PAGE 分离, 200 mA 恒流条件下转移到 PVDF 膜上; 使用脱脂奶粉封闭 1 h, 用 TBST 洗膜 3 次后放入用一抗稀释液 (G2025-100ML, 武汉塞维尔生物科技有限公司) 稀释的一抗 (1 : 2 000)

表 2 SPX1 对草鱼原代肝细胞 PI3K/Akt 信号通路影响实验

Tab. 2 Experimental investigation into the effects of SPX1 on the PI3K/Akt signaling pathway in primary hepatocytes of *C. idella*

组别 groups	处理浓度 treatment concentration	组别 groups	处理浓度 treatment concentration
对照组 control	PBS	对照组 control	PBS
DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
胰岛素 insulin	200 nmol/L 胰岛素	胰岛素 insulin	200 nmol/L 胰岛素
Ly249002	10 μ mol/L Ly249002	Triciribine	100 nmol/L Triciribine
胰岛素+SPX1 insulin+SPX1	200 nmol/L 胰岛素、100 nmol/L SPX1	胰岛素+SPX1 insulin+SPX1	200 nmol/L 胰岛素、100 nmol/L SPX1
胰岛素+SPX1+Ly249002 insulin+SPX1+Ly249002	200 nmol/L 胰岛素、100 nmol/L SPX1、 10 μ mol/L Ly249002	胰岛素+SPX1+Triciribine insulin+SPX1+Triciribine	200 nmol/L 胰岛素、100 nmol/L SPX1、 100 nmol/L Triciribine

注: Ly249002.PI3K抑制剂; Triciribine. Akt抑制剂, 下同。

Notes: Ly249002. PI3K inhibitor; Triciribine. Akt inhibitor; the same below.

表 3 SPX2 对草鱼原代肝细胞 PI3K/Akt 信号通路影响实验

Tab. 3 Experimental investigation into the effects of SPX2 on the PI3K/Akt signaling pathway in primary hepatocytes of *C. idella*

组别 groups	处理浓度 treatment concentration	组别 groups	处理浓度 treatment concentration
Control	PBS	Control	PBS
DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
胰岛素 insulin	200 nmol/L 胰岛素	胰岛素 insulin	200 nmol/L 胰岛素
Ly249002	10 μ mol/L Ly249002	Triciribine	100 nmol/L Triciribine
胰岛素+SPX2 insulin+SPX2	200 nmol/L 胰岛素、100 nmol/L SPX2	胰岛素+SPX2 insulin+SPX2	200 nmol/L 胰岛素、100 nmol/L SPX2
胰岛素+SPX2+Ly249002 insulin+SPX2+Ly249002	200 nmol/L 胰岛素、100 nmol/L SPX2、 10 μ mol/L Ly249002	胰岛素+SPX2+Triciribine insulin+SPX2+Triciribine	200 nmol/L 胰岛素、100 nmol/L SPX2、 100 nmol/L Triciribine

中室温孵育 2 h, 随后 4℃ 过夜孵育; TBST 洗膜 3 次后将 PVDF 膜置于二抗 (1 : 1 000, SE134, 北京索莱宝科技有限公司) 中, 室温孵育 2 h; 使用 TBST 洗膜 3 次, 用 ECL Plus 超敏发光液 (PE0010, 北京索莱宝科技有限公司) 在 C400 成像仪显色。使用 Image J 软件对目标条带进行量化统计。

1.7 RNA 的提取及 cDNA 的合成

使用 RNAiso Plus 提取样品总 RNA, 并用超微量分光光度计 (Nanodrop 2000) 和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度及质量。按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (RR047B, TaKaRa) 说明书合成 cDNA。

1.8 实时荧光定量 PCR

根据 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Q711, Vazyme) 说明书, 使用实时荧光定量 PCR 仪 (LightCycler 480 II, Roche, 瑞士) 进行荧光定量 PCR 实验, 糖酵解、糖异生、糖原分解、糖原合成以及葡萄糖转运相关基因的定量引物序列见表 4, 扩增程序: 94℃, 3 min; 94℃, 30 s, 55℃, 10 s, 72℃, 20 s, 35 个循环; 72℃, 5 min。选用 18S rRNA 为内参基因。

1.9 数据分析

实验数据以平均值±SE 表示, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量, 使用 SPSS 20.0 软件 (IBM, USA) 进行统计分析。WB 实验结果采用 Image J 软件进行分析。使用 Shapiro-Wilk 法和 Levene 法对数据进行正态分布和方差齐性检验, 采用单因素方差分析显著性差异, 事后检验采用 Waller-

Duncan 氏法。所有柱状图均由 Graphpad 8.02 软件 (LLC, USA) 制作。

2 结果

2.1 胰岛素对草鱼原代肝细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响

为了确定胰岛素对草鱼原代肝细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响, 使用 200 nmol/L 胰岛素孵育肝细胞 0、5、15、30、60 min 后, 检测 Akt 磷酸化水平, 结果如图 1 所示。Akt 蛋白的磷酸化水平呈先上升后下降的趋势, 在处理 15 min 时 Akt 蛋白的磷酸化程度最高 ($P < 0.05$), 表明胰岛素能够显著激活 PI3K/Akt 信号通路。

2.2 草鱼原代肝细胞中 spexin 对胰岛素诱导的 PI3K/Akt 信号通路的影响

为了探究 SPX1 和 SPX2 是否影响胰岛素诱导的 PI3K/Akt 信号通路及其最适作用浓度, 用不同浓度的 SPX1 或 SPX2 与胰岛素共同处理原代肝细胞, 结果如图 2 所示。与胰岛素单处理组相比, 不同浓度的 SPX1 或 SPX2 与胰岛素共同处理后, 草鱼原代肝细胞 Akt 磷酸化水平均显著升高 ($P < 0.05$), 且均在 100 nmol/L 时达到最高 ($P < 0.05$)。

2.3 SPX1 通过增强胰岛素介导的 PI3K/Akt 通路调控糖代谢

使用抑制剂 Ly294002、Triciribine, 在草鱼原代肝细胞中分别阻断 PI3K、Akt, 探究 SPX1 对胰岛素介导的糖代谢关键酶基因表达的影响, 结果如图 3 和图 4 所示。与 DMSO 组相比, PI3K 抑制

表 4 实时荧光定量 PCR 引物

Tab. 4 Primers used in quantitative Real-time PCR

基因 gene	正向引物(5'→3') forward primer (5'→3')	反向引物(5'→3') reverse primer (5'→3')	序列号 accession no.
18S 核糖体 RNA 18S rRNA	ATTTCCGACACGGAGAGG	CATGGGTTTAGGATACGCTC	EU047719.1
葡萄糖激酶 <i>gk</i>	GAAGAGCGAGGCTGGAAGG	CAGAATGCCCTTATCCAAATCC	GU065314
肝型磷酸果糖激酶-1 <i>pfkfa</i>	GGAGCGGTGAATGAAGTGTC	TTGTTGCTGATGGTGGA	XM_051906025
丙酮酸激酶 <i>pk</i>	GCCGAGAAAGTTCATCGCACAG	CGTCCAGAACCGCATTAGCCAC	JQ951928
葡萄糖-6-磷酸酶 <i>g6pase</i>	AAAGACAGCAGGTAGAAGAGG	ACGAAAAACAAGAAGAGCAG	KY742725.1
磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 <i>pepck</i>	ATCGTCACGGAGAACCAA	CCTGAACACCAAACCTTAGCA	JQ898294.1
糖原合酶 <i>gys</i>	CCTCCAGTAACAACCTACAACA	CAGATAGATTGGTGGTTACGC	JQ792167.1
肝型糖原磷酸化酶 <i>pygl</i>	GGTAGAGCGCTCCAGAACA	TCAACTGCCAGCCATCTTT	JQ782458.1
葡萄糖转运蛋白2 <i>glut2</i>	GTCCAGCAGCCATAGCATTAGC	GCACCATCTCAGCCTCTCTTTG	KY763986.1

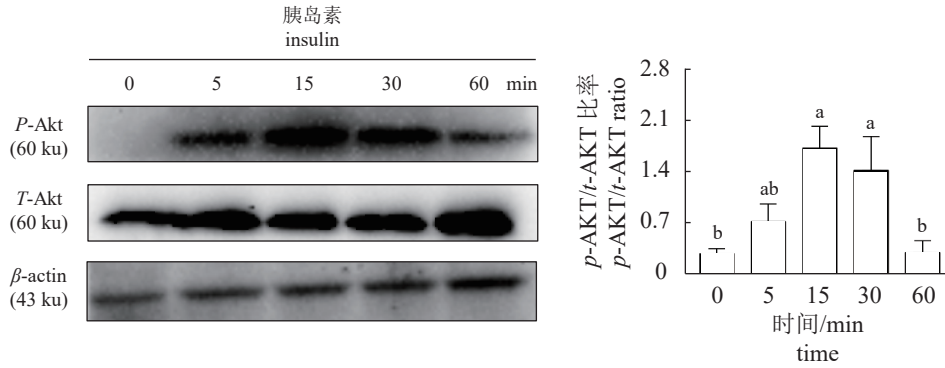


图 1 胰岛素对草鱼原代肝细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响

不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 1 Effects of insulin on the PI3K/Akt signal pathway in the primary hepatocytes of *C. idella*

Different letters indicate significant differences among groups ($P < 0.05$), the same below.

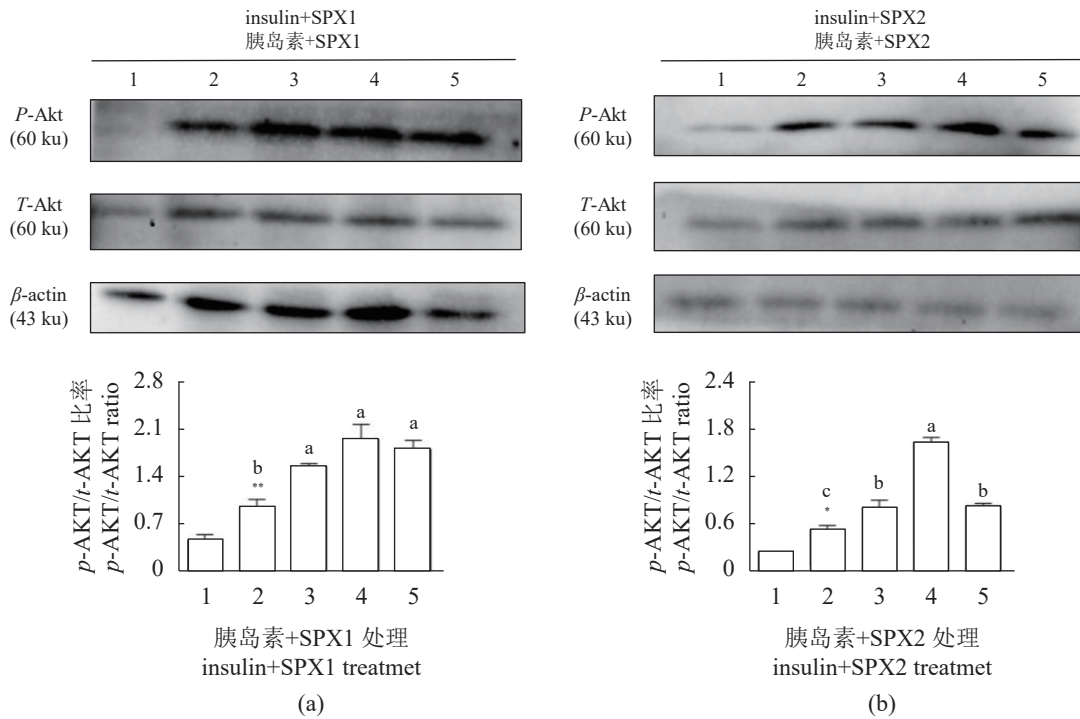


图 2 spexin 对草鱼原代肝细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响

1.对照组, 2.胰岛素处理组, 3.胰岛素+10 nmol/L, 4. 胰岛素+100 nmol/L, 5. 胰岛素+1 000 nmol/L。“*”表示胰岛素处理组与对照组之间的显著性差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 2 Effects of spexin on insulin-induced PI3K/Akt signal pathway in the primary hepatocytes of *C. idella*

1. control group, 2. insulin-treated group, 3. insulin+10 nmol/L, 4. insulin+100 nmol/L, 5. insulin+1 000 nmol/L.“*” indicates a significant difference between the insulin-treated group and the control group ($P < 0.05$).

剂 (Ly294002) 单独处理肝细胞 3 h 和 6 h 后, 糖酵解、糖异生、糖原合成及分解相关基因表达无显著性变化 ($P > 0.05$)(图 3); Triciribine 单独处理肝细胞 3 h 和 6 h 后, 糖酵解关键基因 (*pk*、*pfkla*)、糖异生关键基因 (*g6pase*)、糖原分解基因 (*pygl*) mRNA 表达水平无显著性变化 ($P > 0.05$)(图 4)。胰

岛素单独处理肝细胞 3 h 后, 糖酵解关键基因 (*gk* 和 *pfkla*)、糖原合成基因 (*gys*) mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 糖异生关键基因 (*g6pase*)、糖原分解基因 (*pygl*)mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.05$)。胰岛素+SPX1 共同处理肝细胞 3 h 后, SPX1 显著增强了胰岛素对 *gk*、*pk* 和 *pfkla* mRNA 表达

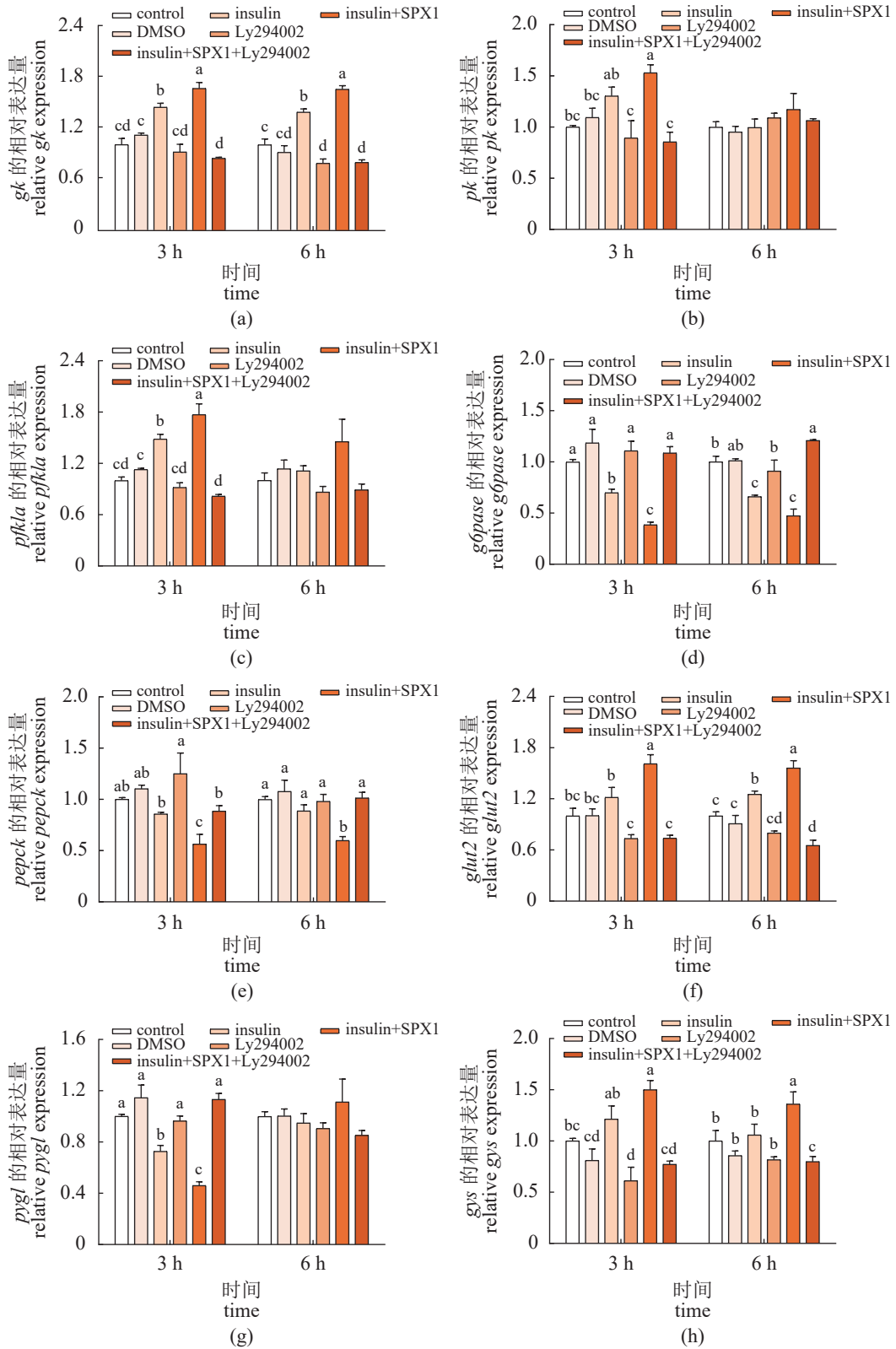


图 3 草鱼原代肝细胞中, 抑制 PI3K 后, SPX1 对胰岛素介导的糖代谢的调控作用变化

Fig. 3 Changes in the effect of SPX1 on insulin-mediated glucose metabolism regulation following inhibition of PI3K in the primary hepatocytes of *C. idella*

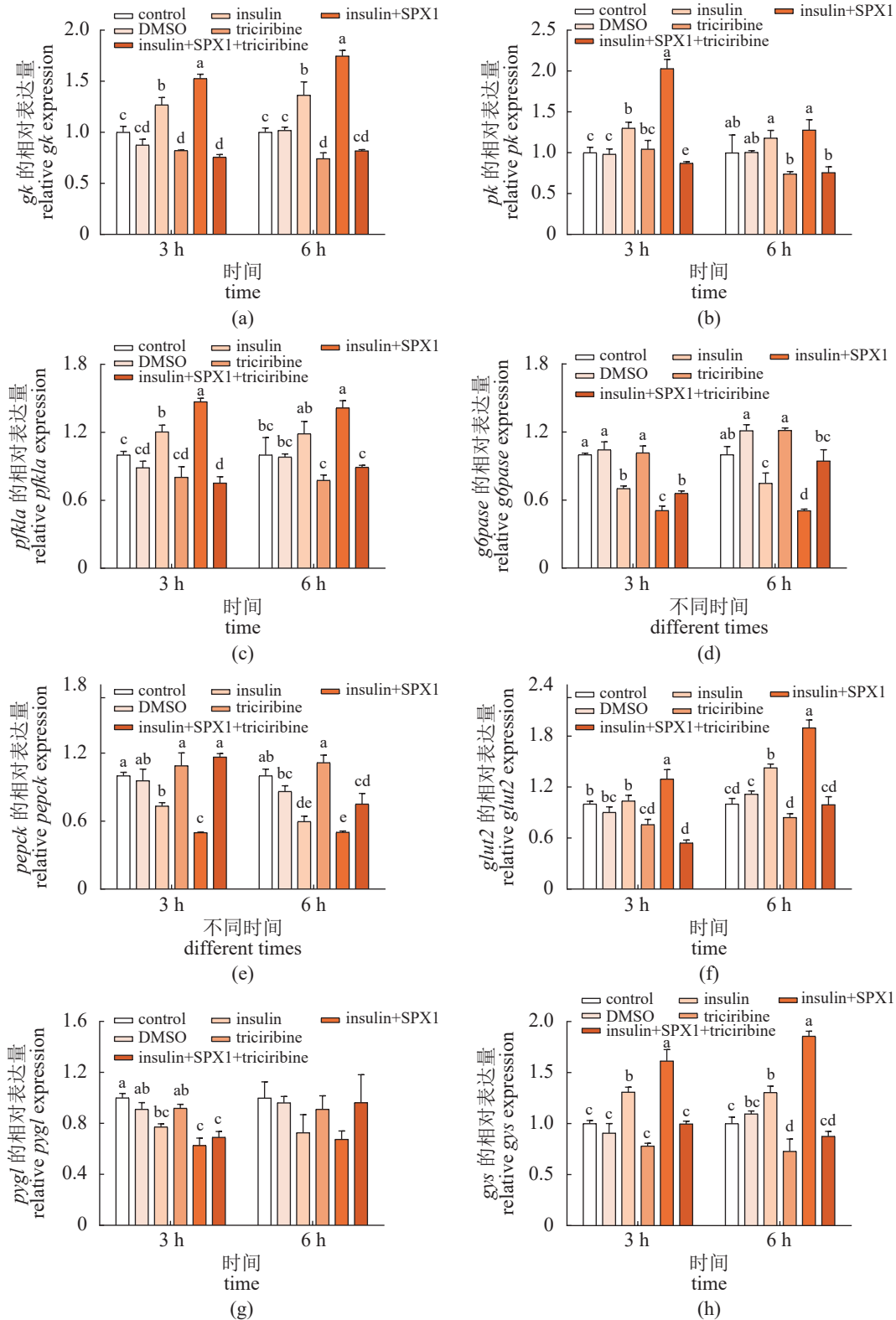


图 4 草鱼原代肝细胞中，抑制 Akt 后，SPX1 对胰岛素介导的糖代谢的调控作用变化

Fig. 4 Changes in the effect of SPX1 on insulin-mediated glucose metabolism regulation following inhibition of Akt in the primary hepatocytes of *C. idella*

的促进作用 ($P < 0.05$), 以及对 *g6pase*、*pepck* 和 *pygl* mRNA 表达的抑制作用 ($P < 0.05$)。处理肝细

胞 6 h 后, SPX1 显著增强了胰岛素对 *gk* 和 *glut2* mRNA 表达的促进作用 ($P < 0.05$); 增强了胰岛素

对 *pepck* mRNA 表达的抑制作用。无论处理 3 h 还是 6 h, 阻断 PI3K 或 Akt 均可逆转 SPX1 对胰岛素诱导的糖酵解 (*gk*、*pk*、*pfkla*)、糖异生 (*g6pase*、*pepck*)、葡萄糖转运蛋白 2(*glut2*) 相关基因表达的影响。

2.4 SPX2 通过增强胰岛素介导的 PI3K/Akt 通路调控糖代谢

为探究 SPX2 是否通过 PI3K/Akt 通路增强胰岛素对草鱼肝细胞糖代谢的调控作用, 使用抑制剂 Ly294002、Triciribine 分别阻断 PI3K、Akt, 并用胰岛素和 SPX2 共同孵育肝细胞后, 检测糖代谢关键酶基因表达变化, 结果如图 5 和图 6 所示。与 DMSO 组相比, PI3K 抑制剂 (Ly294002) 单独处理肝细胞 3 h 和 6 h 后, 糖酵解、糖异生、糖原合成及分解相关基因的表达无显著性变化 ($P > 0.05$) (图 5)。Triciribine 单独处理肝细胞 3 h 和 6 h 后, 糖酵解关键基因 (*gk*、*pk*、*pfkla*)、糖异生关键基因 (*g6pase*)、糖原分解基因 (*pygl*) mRNA 表达水平无显著性变化 ($P > 0.05$) (图 6)。胰岛素单独处理肝细胞 3 h 后, 糖酵解关键基因 (*gk* 和 *pfkla*)、糖原合成基因 (*gys*) mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 糖异生关键基因 (*g6pase*)、糖原分解基因 (*pygl*) mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.05$)。胰岛素+SPX2 共同处理肝细胞 3 h 后, SPX2 显著增强了胰岛素对 *gk*、*pk* 和 *pfkla* mRNA 表达的促进作用 ($P < 0.05$); 增强了胰岛素对 *g6pase*、*pepck* 和 *pygl* mRNA 表达的抑制作用 ($P < 0.05$)。处理肝细胞 6 h 后, SPX2 显著增强了胰岛素对 *gk* 和 *glut2* mRNA 表达的促进作用 ($P < 0.05$); 增强了胰岛素对 *pepck* mRNA 表达的抑制作用。无论处理 3 h 还是 6 h, 阻断 PI3K 或 Akt 均可逆转 SPX2 对胰岛素诱导的糖酵解 (*gk*、*pk*、*pfkla*)、糖异生 (*g6pase*、*pepck*)、葡萄糖转运蛋白 2(*glut2*) 相关基因表达的影响。

3 讨论

胰岛素作为一种关键的降糖激素, 主要通过糖酵解、糖异生、糖原合成与分解等途径发挥作用^[33-34]。在鲤 (*Cyprinus carpio*) 中的研究发现, 胰岛素可促进原代肝细胞 *gk* mRNA 表达, 下调 *g6pase* mRNA 表达^[35]。在团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 中, 腹腔注射胰岛素 (0.052 mg/kg)

能够促进葡萄糖转运和糖原合成, 抑制糖异生, 降低血糖^[8]。在褐点石斑鱼 (*Epinephelus fuscoguttatus*) 中, 腹腔注射胰岛素后, 糖酵解关键基因 *gk* 和 *pfklb* mRNA 表达水平显著升高^[36]。在本研究中, 胰岛素单独处理草鱼肝细胞 3 h 时, 可显著上调糖酵解关键酶基因 (*gk* 和 *pfkla*)、糖原合成酶基因 (*gys*) mRNA 表达, 下调糖异生关键酶基因 (*g6pase*)、糖原分解酶基因 (*pygl*) mRNA 表达; 胰岛素单独处理草鱼肝细胞 6 h 时, 可显著促进糖酵解关键酶基因 *gk* mRNA 表达, 抑制了 *pepck* mRNA 表达。这些结果表明, 胰岛素在草鱼中可通过促进糖酵解和糖原合成, 抑制糖异生和糖原分解等途径发挥降糖作用, 这与其在哺乳动物中的结果一致。

PI3K/Akt 信号通路是机体内响应胰岛素的重要通路之一, 为了确定胰岛素对草鱼原代肝细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响, 使用 200 nmol/L 胰岛素处理草鱼原代肝细胞后, Akt 蛋白磷酸化水平显著提高, 并且在处理 15 min 时其磷酸化程度最高。研究发现, 在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 脂肪细胞中, 胰岛素处理组 Akt 蛋白的磷酸化水平是对照组的 16 倍^[37]。同样, 使用胰岛素处理金鱼脑细胞或肝细胞后, PI3K 和 Akt 蛋白的磷酸化水平均显著提高^[26]。以上结果表明, 胰岛素在鱼类中均可通过激活 PI3K/Akt 信号通路发挥生理功能。

研究发现, 多种激素可通过作用于胰岛素信号通路, 发挥糖代谢的间接调控作用。例如, 脑室注射瘦素显著增强了胰岛素对大鼠骨骼肌 Akt 磷酸化的激活作用, 提高了骨骼肌对葡萄糖的耐受性^[38]。在草鱼肝细胞中发现, 生长激素可显著提高胰岛素 Akt 蛋白磷酸化的激活作用^[39]。此外, 顾丽萍^[40]发现, spexin 能够以时间和剂量依赖的方式抑制 Hep G2-IR 细胞的糖异生作用。为了探究 SPX1、SPX2 的作用及最佳作用浓度, 使用不同浓度 SPX1、SPX2 (10、100、1 000 nmol/L) 与胰岛素共同处理肝细胞。结果发现, 与胰岛素单独处理组相比, SPX1、SPX2 与胰岛素共同处理组的 Akt 磷酸化水平均显著升高, 并且均在 100 nmol/L 时 Akt 蛋白的磷酸化程度最高, 表明 SPX1、SPX2 最佳作用浓度为 100 nmol/L。将胰岛素和 spexin 共同处理草鱼原代肝细胞 3 h 和 6 h 后, 发现 SPX1 和 SPX2 增强了胰岛素介导的糖酵解和糖原合成途径, 抑制了胰岛素介导的糖异生和糖原

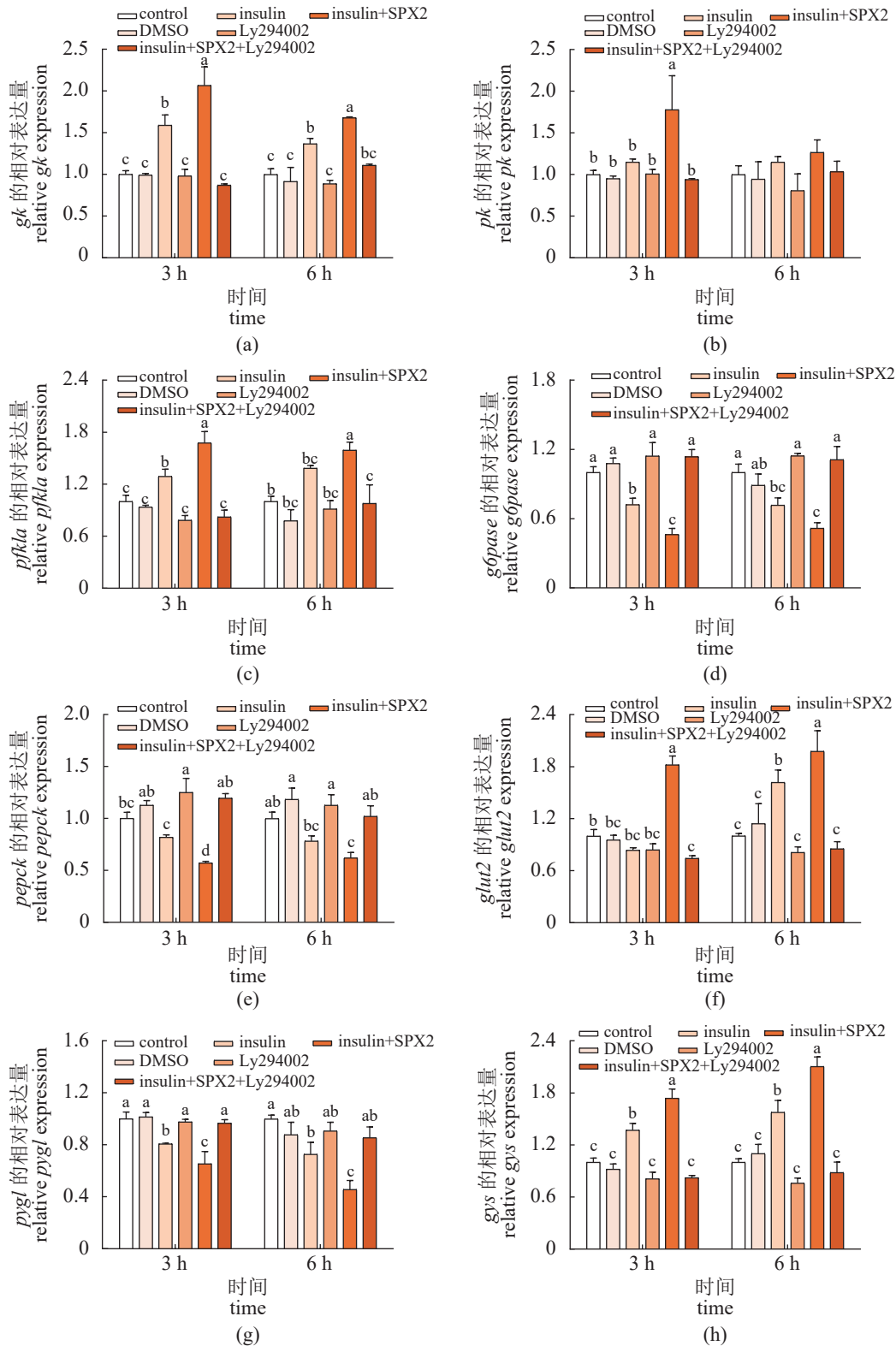


图 5 草鱼原代肝细胞中，抑制 PI3K 后，SPX2 对胰岛素介导的糖代谢的调控作用变化。

Fig. 5 Changes in the effect of SPX2 on insulin-mediated glucose metabolism regulation following inhibition of PI3K in the primary hepatocytes of *C. idella*

分解途径，提高了肝细胞对胰岛素的敏感性，但其作用效果随着处理时间的增加而降低。推测

spexin 的这种作用可能是通过影响胰岛素信号通路关键蛋白磷酸化水平而实现的。

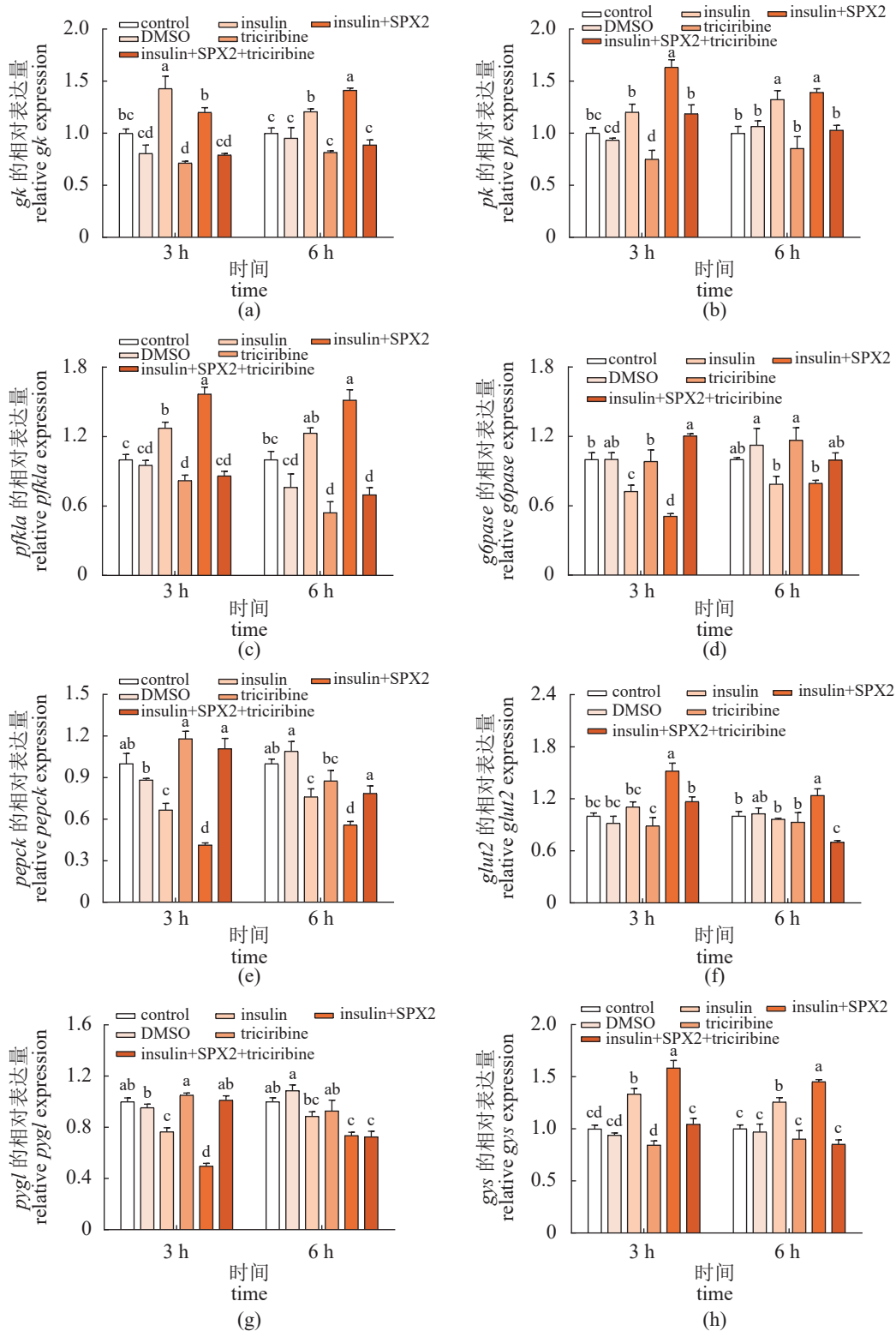


图 6 草鱼原代肝细胞中, 抑制 Akt 后, SPX2 对胰岛素介导的糖代谢的调控作用变化。

Fig. 6 Changes in the effect of SPX2 on insulin-mediated glucose metabolism regulation following inhibition of Akt in the primary hepatocytes of *C. idella*

因此, 实验在草鱼原代肝细胞实验中分别添加了 PI3K 和 Akt 的抑制剂, 阻断 PI3K/Akt 信号

通路, 比较阻断上述信号通路前后, SPX1、SPX2 对胰岛素介导的糖代谢作用的变化, 探究

spexin 调节草鱼糖代谢的具体作用途径。其中, Ly294002 可特异性作用于 PI3K 的催化亚基 p110, 抑制 Akt 的磷酸化, 但不影响 MAPK、PKA 和 PKC 等磷酸酶活性^[41]; Triciribine 是 Akt 选择性抑制剂, 在 $\leq 10 \mu\text{mol/L}$ 浓度下, 它仅抑制 Akt 的磷酸化与激酶活性, 对上游 PI3K、PDK1、PKA 和 PKC 等酶无明显影响^[26]。胰岛素与 SPX1(或 SPX2) 共同处理草鱼肝细胞后发现, SPX1 和 SPX2 均促进了胰岛素诱导的糖酵解途径相关基因 (*gk* 和 *pfkla*) mRNA 表达, 增强了胰岛素对糖异生 (*g6pase*) 和糖原分解 (*pygl*) 途径相关基因 mRNA 表达的抑制作用。PI3K 和 Akt 的抑制剂分别于胰岛素、SPX1 (或 SPX2) 共同孵育草鱼肝细胞后, 逆转了 SPX1、SPX2 对胰岛素诱导的糖酵解 (*gk*、*pk*、*pfkla*)、糖异生 (*g6pase*、*pepck*)、葡萄糖转运蛋白 2(*glut2*)、糖原分解 (*pygl*) 相关基因表达的影响。这些结果表明, SPX1 和 SPX2 均可增强胰岛素对 PI3K/Akt 信号通路的激活作用, 进一步促进肝细胞的糖酵解和糖原合成, 抑制糖异生和糖原分解途径。本研究明确了 spexin 对草鱼肝细胞糖代谢的间接调控作用机制, 在体条件下 spexin 对胰岛素介导的草鱼糖代谢的影响还有待进一步研究。

(作者声明本文无利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 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.
- [2] Hemre G I, Mommsen T P, Kroghdahl A. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2002, 8(3): 175-194.
- [3] Cao X F, Huang Y Y, Chu X Y, *et al.* Differential pathways to hepatic steatosis in fish: divergent molecular mechanisms underlying high-carbohydrate versus high-lipid diet-induced lipid accumulation[J]. *Aquaculture Reports*, 2025, 45: 103090.
- [4] Zhu W L, Zhang H L, Pan H T, *et al.* Sodium alginate ameliorates health in freshwater fish through gut-liver axis modulation under high carbohydrate diets[J]. *Aquaculture Reports*, 2025, 40: 102538.
- [5] Lv M, Yang K, Wang X, *et al.* The modulation of mTOR signaling on dietary carbohydrate utilization in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2025, 145: 110008.
- [6] Straub R H. Interaction of the endocrine system with inflammation: a function of energy and volume regulation[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2014, 16(1): 203.
- [7] Röder P V, Wu B B, Liu Y X, *et al.* Pancreatic regulation of glucose homeostasis[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2016, 48(3): e219.
- [8] Shi H J, Liu W B, Xu C, *et al.* Transcriptional regulation of the AMP-activated protein kinase and glycolipid metabolism-related genes by insulin and glucagon in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*): a comparative study[J]. *Aquaculture*, 2020, 515: 734553.
- [9] Xie Y T, Cheng D H, Wang L H, *et al.* GLP-1 responds to postprandial hyperglycemia by reducing transcription level in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2022, 23: 101045.
- [10] Xu X, Tang X, Ji R L, *et al.* Adiponectin receptor agonist AdipoRon regulates glucose and lipid metabolism via PPAR γ signaling pathway in hepatocytes of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2025, 1870(5): 159632.
- [11] Zhi S Y, Yang L P, Yang G K, *et al.* Irisin regulates hepatic glucose metabolism via AMPK and PI3K/Akt activation[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2022, 2022: 1946960.
- [12] Polakof S, Panserat S, Soengas J L, *et al.* Glucose metabolism in fish: a review[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2012, 182(8): 1015-1045.
- [13] Sheridan M A. Coordinate regulation of feeding, metabolism, and growth: perspectives from studies in fish[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2021, 312: 113873.
- [14] Yang B Y, Ai Q H, Mai K S. Unraveling the disparity of carbohydrate utilization in farmed fish: perspectives from comparative pancreatic islet biology[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2025, 17(3): e70022.
- [15] Mirabeau O, Perlas E, Severini C, *et al.* Identification of novel peptide hormones in the human proteome by hidden Markov model screening[J]. *Genome Research*, 2007, 17(3): 320-327.
- [16] Kim D K, Yun S, Son G H, *et al.* Coevolution of the spexin/galanin/kisspeptin family: spexin activates galanin receptor type II and III[J]. *Endocrinology*, 2014, 155(5): 1864-1873.
- [17] Ma A N, Bai J, He M L, *et al.* Spexin as a neuroendocrine signal with emerging functions[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2018, 265: 90-96.
- [18] 田振方, 王滨, 崔爱君, 等. 鱼类 spexin 系统鉴定及其生理功能研究 [J]. *海洋科学*, 2023, 47(2): 100-108.
- [19] Tian Z F, Wang B, Cui A J, *et al.* Identification of the spexin system and its physiological functions in fish[J]. *Marine Sciences*, 2023, 47(2): 100-108 (in Chinese).
- [19] Wang B, Wang K J, Tian Z F, *et al.* New evidence for SPX2 in regulating the brain-pituitary reproductive axis of half-smooth

- tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2022, 13: 984797.
- [20] Lim C H, Lee M Y M, Soga T, *et al.* Evolution of structural and functional diversity of spexin in mammalian and non-mammalian vertebrate species[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2019, 10: 379.
- [21] Zhang Y X, Wang J L, Yang L P, *et al.* Spexin acts as a novel glucose-lowering factor in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2024, 708: 149810.
- [22] Sassek M, Kolodziejcki P A, Szczepankiewicz D, *et al.* Spexin in the physiology of pancreatic islets—mutual interactions with insulin[J]. *Endocrine*, 2019, 63(3): 513-519.
- [23] Sassek M, Kolodziejcki P A, Strowski M Z, *et al.* Spexin modulates functions of rat endocrine pancreatic cells[J]. *Pancreas*, 2018, 47(7): 904-909.
- [24] Zheng B B, Li S S, Liu Y, *et al.* Spexin suppress food intake in zebrafish: evidence from gene knockout study[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 14643.
- [25] Zhao T T, Ye Z F, Liu Y, *et al.* Mutation of *spexin2* promotes feeding, somatic growth, adiposity, and insulin resistance in zebrafish[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2022, 322(5): R454-R465.
- [26] Ma A, He M L, Bai J, *et al.* Dual role of insulin in spexin regulation: functional link between food intake and spexin expression in a fish model[J]. *Endocrinology*, 2017, 158(3): 560-577.
- [27] Dai J R, Ni Y Z, Wu D, *et al.* Circulating spexin levels are influenced by the glycemic status and correlated with pancreatic β -cell function in Chinese subjects[J]. *Acta Diabetologica*, 2023, 60(2): 305-313.
- [28] Le T K C, Dao X D, Nguyen D V, *et al.* Insulin signaling and its application[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2023, 14: 1226655.
- [29] Saltiel A R. Insulin signaling in health and disease[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2021, 131(1): e142241.
- [30] Huang R R, Lu Y B, Xie Z F, *et al.* A bovine milk-derived peptide ameliorates alloxan-injured pancreatic β cells through IRS2/PI3K/Akt signaling[J]. *Life Sciences*, 2022, 308: 120907.
- [31] Burchfield J G, Diaz-Vegas A, James D E. The insulin signalling network[J]. *Nature Metabolism*, 2025, 7(9): 1745-1764.
- [32] Deng N, Guo R X, Zheng B S, *et al.* IRS-1/PI3K/Akt pathway and miRNAs are involved in whole grain highland barley (*Hordeum vulgare* L.) ameliorating hyperglycemia of db/db mice[J]. *Food & Function*, 2020, 11(11): 9535-9546.
- [33] Rahman M S, Hossain K S, Das S, *et al.* Role of insulin in health and disease: an update[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(12): 6403.
- [34] Norton L, Shannon C, Gastaldelli A, *et al.* Insulin: the master regulator of glucose metabolism[J]. *Metabolism*, 2022, 129: 155142.
- [35] Yan X, Qin C B, Deng D P, *et al.* Regulation of glucose and lipid metabolism by insulin and glucagon *in vivo* and *in vitro* in common carp *Cyprinus carpio* L.[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 18: 100427.
- [36] Li S L, Li Z Q, Sang C Y, *et al.* The variation of serum glucose, hepatic glycogen content and expression of glucose metabolism-related genes in hybrid grouper (female *Epinephelus fuscoguttatus* \times male *Epinephelus lanceolatus*) in response to intraperitoneal insulin infusion[J]. *Fisheries Science*, 2018, 84(4): 641-647.
- [37] Bou M, Todorčević M, Rodríguez J, *et al.* Interplay of adiponectin, TNF α and insulin on gene expression, glucose uptake and PPAR γ , AKT and TOR pathways in rainbow trout cultured adipocytes[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2014, 205: 218-225.
- [38] Roman E A F R, Reis D, Romanatto T, *et al.* Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, and PGC1 α activation by hypothalamic PI3K-dependent mechanism[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, 314(1): 62-69.
- [39] Jiang Q, Bai J, He M L, *et al.* Mechanisms underlying the synergistic action of insulin and growth hormone on IGF-I and -II expression in grass carp hepatocytes[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2018, 9: 336.
- [40] 顾丽萍. Spexin 在人体组织中的表达及其在胰岛素抵抗中的作用及机制研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2016.
- Gu L P. Expression of Spexin in human tissues and its role and mechanism in insulin resistance[D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2016 (in Chinese).
- [41] 王晓芳, 李纯团, 黄远玲, 等. PI3K 抑制剂 LY294002 对套细胞淋巴瘤增殖及药物敏感性的影响 [J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(4A): 20-23.
- Wang X F, Li C T, Huang Y L, *et al.* Effect of PI3K inhibitor LY294002 on cell proliferation and chemotherapy in mantle cell lymphoma[J]. *Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use*, 2018, 11(4A): 20-23 (in Chinese).

Spexin regulates glucose metabolism by enhancing the insulin-mediated PI3K/Akt signaling pathway

WEI Yun¹, ZHANG Yingxin¹, WANG Beibei¹, YAN Xiao¹, WANG Junli²,
QIN Chaobin^{1*}, NIE Guoxing^{1*}

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

2. College of Life Sciences, Henan Normal University, Henan, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Fish exhibit a relatively low capacity for carbohydrate utilization. When fed a high-carbohydrate diet, fish exhibit increased hepatic glycogen content, which can disrupt normal liver metabolic functions. In recent years, investigating carbohydrate utilization and energy metabolism mechanisms across different fish species has become an active area of fish nutrition research. Under physiological conditions, blood glucose homeostasis is primarily maintained through the antagonistic actions of insulin and glucagon, with insulin being the most important hypoglycemic hormone in the body. Studies have found that endocrine mediators can influence the secretion and antagonistic balance between insulin and glucagon, ultimately regulating blood glucose levels by modulating glucose uptake, glycolysis, gluconeogenesis, as well as glycogen synthesis and breakdown. In mammals, spexin has been demonstrated to play significant roles in regulating glucose and lipid metabolism and alleviating insulin resistance. Spexin (SPX) is a polypeptide hormone composed of 14 amino acids, and two isoforms, SPX1 and SPX2, exist in fish. Our previous research has indicated that both SPX1 and SPX2 enhance insulin action in hepatocytes, thereby increasing hepatic insulin sensitivity. Furthermore, studies in fish have shown an association between spexin and the PI3K/Akt signaling pathway. Inhibition of PI3K or Akt attenuated insulin-mediated spx1 mRNA expression. Given that the PI3K/Akt pathway is a classical insulin signaling cascade, we hypothesized that spexin exerts its regulatory functions via this signaling axis. Using in vitro approaches, this study investigates the roles of SPX1 and SPX2 in regulating glucose metabolism via enhanced insulin-mediated PI3K/Akt signaling in the hepatocytes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Western blot analysis was used to examine the effects of spexin on the PI3K/Akt signaling pathway in the primary hepatocytes. Additionally, specific inhibitors of PI3K and Akt were employed to block this pathway, followed by quantitative real-time PCR to assess changes in insulin-mediated SPX1/SPX2 effects on glucose metabolism. Our results showed that insulin activated the PI3K/Akt signaling pathway, and the phosphorylation level of Akt protein peaked at 15 minutes after co-treatment of primary hepatocytes with insulin and 100 nmol/L spexin ($P < 0.05$). SPX1 or SPX2 enhanced the activating effect of insulin on the PI3K/Akt signaling pathway, further elevating the mRNA expression levels of key glycolytic enzyme genes (*gk*, *pk*, and *pfkla*), glucose transporter 2 (*glut2*), and glycogen synthase gene (*gys*) ($P < 0.05$), and inhibiting the mRNA expression of key gluconeogenic enzyme genes (*g6pase*, *pepck*) and glycogen phosphorylase gene (*pygl*) ($P < 0.05$). These results indicated that SPX1 and SPX2 enhanced the activation of the PI3K/Akt signaling pathway activated by insulin, further promoting glycolysis and glycogen synthesis in the hepatocytes, and inhibiting gluconeogenesis and glycogenolysis pathways, which demonstrates that spexin enhance insulin-mediated regulation of glucose metabolism in the hepatocytes. This study clarified the indirect regulatory roles and mechanisms of spexin on glucose metabolism in the hepatocytes of *C. idella*, which provides a foundation for further in-depth understanding of the molecular mechanisms underlying the endocrine network regulating glucose metabolism in fish.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; spexin; insulin; primary hepatocytes; glucose metabolism

Corresponding authors: QIN Chaobin. E-mail: qinchao88639501@163.com;

NIE Guoxing. E-mail: niegx@htu.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2023YFD2400601); Special Fund for Henan Agriculture Research System, China (HARS-22-16-G2)