

DOI: 10.12264/JFSC2020-0344

## 苯磷硫胺对饲喂高糖饲料团头鲂血浆生化指标及肝糖脂代谢的影响

徐超<sup>1</sup>, 刘文斌<sup>2</sup>, 李远友<sup>1</sup>, 谢帝芝<sup>1</sup>, 丁志荣<sup>1</sup>, 李向飞<sup>2</sup>

1. 华南农业大学海洋学院, 广东 广州 510642;

2. 南京农业大学动物科技学院, 江苏省水产动物营养重点实验室, 江苏 南京 210095

**摘要:** 为了探究苯磷硫胺对饲喂高糖饲料团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)的血清生化指标及肝糖脂代谢的影响, 随机选取 360 尾体重(45.25±0.34) g 的团头鲂幼鱼, 进行 12 周的养殖实验, 期间分别投喂 6 种饲料[对照组 C: 30% 糖水平; 高糖组 HC: 43%糖水平; 高糖组+不同苯磷硫胺添加量: 43%糖水平+0.7125 mg/kg (HCB1)、43%糖水平+1.425 mg/kg (HCB2)、43%糖水平+2.85 mg/kg (HCB3)和 43%糖水平+5.7 mg/kg (HCB4)]。结果表明, 高糖饲料的摄入显著增加了血浆甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL)水平, 提高了肝葡萄糖激酶(GK)、丙酮酸激酶(PK)、糖原合成酶(GS)、固醇调节元件结合蛋白 1 (SREBP1)、脂肪酸合成酶(FAS)和乙酰辅酶 a 羧化酶 α (ACCα)的表达量, 但肝蛋白激酶 B (PKB)、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)、果糖-1, 6-二磷酸酶(FBPase)、葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)、过氧化物增氧剂激活受体 α (PPARα)、肉碱棕榈酰转移酶 1A (CPT 1A)和乙酰辅酶 a 氧化酶(ACO)的表达量与之相反呈下降趋势。高糖组中, HCB2 饲料显著增加了血脂水平, 提高了肝 PKB、GK、PK、GS、SREBP1、FAS、PPARα 和 CPT 1A 的表达量, 但 FoxO1、GSK 3β 和糖异生相关基因的表达量与之相反。综上所述, 1.425 mg/kg 苯磷硫胺添加量能显著增加饲喂高糖饲料团头鲂血脂水平、肝 PKB 的表达量和肝糖酵解、糖原合成、脂质合成及分解相关基因的表达水平, 抑制肝糖异相关基因表达。

**关键词:** 团头鲂; 糖脂代谢; 苯磷硫胺; 基因表达

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)02-0186-09

糖类是生物有机体重要的能源和碳源, 其能分解产生能量, 供给机体生命活动需要; 同时, 它的代谢中间产物又可转变为其他含碳化合物, 如氨基酸、脂肪等, 为动物提供营养物质。然而, 相比人和哺乳动物, 鱼类的糖利用率相对低下<sup>[1]</sup>。饲料中过高的糖水平不仅会抑制鱼类生长, 还会导致组织代谢功能损伤, 进而降低成活率<sup>[1-3]</sup>。近期的研究显示, 鱼类对糖类利用较低的原因可能是由于机体糖酵解和糖异生调节的失衡<sup>[4]</sup>, 因为鱼类在摄食高糖饲料后会出现肝糖酵解酶活性下降, 血糖偏高, 糖异生作用持续增强等高糖不耐受现象<sup>[1,5]</sup>。鉴于此, 对鱼体糖酵解和糖异生调控机理的研究可以在一定程度上揭示鱼类糖代谢障

碍的分子机制, 并为其营养干预措施的制定提供依据。

苯磷硫胺(benfortiamine)是维生素 B<sub>1</sub> 的脂溶性衍生物, 具有更好的生物利用度<sup>[6]</sup>。苯磷硫胺能同时阻断引起糖尿病严重并发症的三条主要生化通路<sup>[6]</sup>, 因此, 常被用于预防和治疗人类的 II 型糖尿病。对哺乳动物的研究表明, 苯磷硫胺能够通过增强机体糖酵解和糖原合成能力、增加线粒体的葡萄糖氧化功能、上调葡萄糖转运蛋白 2 (glucose transporter 2, GLUT 2)的活性等, 从而增强外周组织对葡萄糖的摄取能力<sup>[7-8]</sup>。然而, 苯磷硫胺在水产动物中的研究尚较缺乏。前期, 关于苯磷硫胺对饲喂高糖(43%糖水平)饲料团头鲂

收稿日期: 2020-10-16; 修订日期: 2020-11-26.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32002361, 31872576); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系(CARS-45-14).

作者简介: 徐超(1989-), 男, 讲师, 博士, 主要从事水产动物营养研究. E-mail: xuc1213@scau.edu.cn

通信作者: 李向飞, 男, 副教授, 博士生导师, 主要从事水产动物营养与生理研究. E-mail: xfli@njau.edu.cn

(*Megalobrama amblycephala*) 幼鱼生长性能和肝线粒体生物合成及功能影响的研究中发现, 饲料中添加苯磷硫胺能够显著提高饲喂高糖饲料鱼的增重率、特定生长率、蛋白质效率、氮和能量保留效率及饲料利用率<sup>[9-10]</sup>。与此同时, 研究发现苯磷硫胺添加量为 1.425 mg/kg 时还会显著增加饲喂高糖饲料鱼体肝糖原及脂肪含量, 并显著降低血糖水平, 但其作用机制尚不明确<sup>[11]</sup>。因此, 本研究以团头鲂为研究对象, 分析不同苯磷硫胺添加量对其血液生化指标和肝糖脂代谢相关基因表达量的影响, 以期揭示苯磷硫胺影响鱼体糖脂代谢的机制。研究结果将为高糖饲料的研发和应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼和采样流程

挑选体质健壮、规格整齐的团头鲂幼鱼 (45.25±0.34) g 360 尾, 随机分成 6 组, 每组 4 个重复, 每个重复 15 尾。实验在 24 个室内循环养殖缸 (容量 300 L) 中进行, 分别投喂 6 种饲料, 对照组 C: 30%糖水平; 高糖组 HC: 43%糖水平; 高糖+4 个不同梯度的苯磷硫胺水平: 43%糖水平+0.7125 mg/kg (HCB1)、1.425 mg/kg (HCB2)、2.85 mg/kg (HCB3) 和 7.5 mg/kg (HCB4)。所用饲料原料及概略养分组成如表 1 所示。其中, 苯磷硫胺添加量是根据李鹏飞等<sup>[11]</sup>对团头鲂最适硫胺

表 1 实验饲料配方及营养组成

Tab. 1 Formulation and proximate composition of different experimental diets

项目 item	组别 group						%
	C	HC	HCB1	HCB2	HCB3	HCB4	
成分 formulation							
鱼粉 fish meal	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	
豆粕 soybean meal	26.00	26.00	26.00	26.00	26.00	26.00	
菜粕 rapeseed meal	17.00	17.00	17.00	17.00	17.00	17.00	
棉粕 cottonseed meal	17.00	17.00	17.00	17.00	17.00	17.00	
鱼油 fish oil	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	
豆油 soybean oil	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	
玉米淀粉 corn starch	12.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	
苯磷硫胺 benfotiamine	0	0	0.7125	1.425	2.85	5.7	
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	13.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
磷酸二氢钙 calcium biphosphate	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80	
预混料 <sup>a</sup> premix <sup>a</sup>	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	
营养成分 proximate composition (dry matter basis)							
水分 moisture	6.96	6.85	6.92	6.95	6.90	6.87	
乙醚提取物 ether extract	5.93	5.71	5.78	5.66	5.77	5.87	
粗灰分 crude ash	8.46	8.28	8.12	8.23	8.34	8.20	
粗蛋白 crude protein	29.82	30.12	30.31	30.03	30.02	30.11	
粗纤维 crude fiber	16.97	6.18	6.29	6.30	6.23	6.28	
可消化性糖 digestible carbohydrate <sup>b</sup>	31.86	42.75	42.58	42.83	42.74	42.67	
总能 (MJ/kg) total energy	19.09	19.24	19.38	19.31	19.23	19.30	

注: <sup>a</sup> 预混料为每千克饲料提供以下矿物质(g/kg)和维生素(IU or mg/kg): CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.02 g; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.25 g; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.22 g; MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.07 g; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 0.0004 g; KI, 0.00026 g; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.001 g; 维生素 A, 9000IU; 维生素 D, 2000IU; 维生素 E, 45 mg; 维生素 K<sub>3</sub>, 2.20 mg; 维生素 B<sub>1</sub>, 3.20 mg; 维生素 B<sub>2</sub>, 10.90 mg; 烟酸, 28 mg; 维生素 B<sub>5</sub>, 20 mg; 维生素 B<sub>6</sub>, 5 mg; 维生素 B<sub>12</sub>, 0.016 mg; 维生素 C, 50 mg; 泛酸, 10 mg; 叶酸, 1.65 mg。

<sup>b</sup> 可消化性糖含量=100-(水分+粗蛋白+乙醚提取物+粗灰分+粗纤维)。

Note: <sup>a</sup> Premix provide the following mineral (g/kg) and vitamin (IU or mg/kg): CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.02 g; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.25 g; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.22 g; MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.07 g; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 0.0004 g; KI, 0.00026 g; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.001 g; vitamin A, 9000IU; vitamin D, 2000IU; vitamin E, 45 mg; vitamin K<sub>3</sub>, 2.20 mg; vitamin B<sub>1</sub>, 3.20 mg; vitamin B<sub>2</sub>, 10.90 mg; nicotinic acid 28 mg; vitamin B<sub>5</sub>, 20 mg; vitamin B<sub>6</sub>, 5 mg; vitamin B<sub>12</sub>, 0.016 mg; vitamin C, 50 mg; acid regurgitation, 10 mg; folic acid, 1.65 mg。

<sup>b</sup> Digestible carbohydrate=100-(moisture+crude protein+ether extract+crude ash+crude fiber)。

素添加量的研究结果等量换算所得。每日投喂 3 次(7:00、12:00、17:00), 养殖期为 12 周。实验期间, 水温为(27.4±0.6) °C, 溶解氧大于 5.0 mg/L, pH 为 7.4~7.5。

养殖实验结束以后, 停喂 24 h。随后, 以浓度为 100 mg/L 的 MS-222 麻醉剂将实验鱼进行麻醉处理, 每缸取 4 尾鱼从尾静脉采血, 血液采集后置于预先制好的肝素抗凝管中, 3000 r/min 离心 10 min (4 °C), 制得血浆放置于-80 °C 待测。此外, 将鱼解剖后分离出肝样品, 放置于-80 °C 待测。

### 1.2 饲料营养成分及血浆生化指标测定

根据 AOCO (Association of Official Analytical Chemists)<sup>[12]</sup> 的相关方法对饲料营养成分进行测定, 具体如下: (1)将实验饲料样品称重后置于 105 °C 的烘箱中烘至恒重, 通过计算得到水分含量; (2)采用凯氏定氮仪(FOSS KT260, 瑞士)测定样品中的总氮含量, 然后将其乘以 6.25 换算出粗蛋白含量; (3)将称好的样品放入索氏抽提管中, 倒入乙醚, 使其在 65~70 °C 条件下冷凝回流 12 h, 称取包重后计算得出脂肪含量; (4)将样品置于坩埚中放在电炉上进行炭化, 然后将其转移至马弗炉中于 550 °C 下灼烧 6 h, 计算灰分含量; (5)将样品进行酸碱处理后, 采用粗纤维分析仪(ANKOM A2000i, 美国)进行分析; (6)使用氧弹测热仪(PARR 1281, 美国)测定饲料的总能。

血浆甘油三酯(triglyceride, TG)含量采用甘油氧化酶法进行测定。血浆总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL)和低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL)含量均采用胆固醇氧化酶法进行测定。具体测定方法参照南京建成生物工程研究所提供的相关试剂盒说明书。

### 1.3 组织 PCR 分析

团头鲂肝组织 RNA 提取及其目的基因 PCR 分析, 参照先前实验操作流程<sup>[9]</sup>。具体流程如下: 组织 RNA 的提取过程严格参照 Takara®Plus RNA Purification (Invitrogen 货号: 12183-555)试剂盒说明书进行。同时, 使用 Prime Script®RT reagent Kit 反转录试剂盒并按照说明书要求进行 cDNA 反转。随后, 根据 TaKaRa TB Green Premix Ex Taq™ 试

剂盒要求对目的基因进行荧光定量 PCR 检测, 其 20 μL 反应体系分别包含 cDNA 稀释液 2 μL, SYBR® Premix Ex Taq™ II 10 μL, ROX Reference Dye II 0.6 μL, 上游引物 0.2 μL, 下游引物 0.2 μL 和 ddH<sub>2</sub>O 7 μL。最后, 使用 ABI Quantstudio™ DX 实时定量 PCR 仪(Life Technologies 公司)进行荧光定量检测。期间, 选择团头鲂内参引物 EF1α (序列号: X77689.1)对目的基因(表 2)的 C<sub>t</sub> 值进行均一化处理, 使用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法计算组织样品中 mRNA 的相对表达量。

### 1.4 数据统计分析

数据用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 并用 Tukey 氏 HSD 多重比较法分析实验结果的差异显著性, 差异显著水平为 P<0.05。所有实验结果以平均值±标准误( $\bar{x} \pm SE$ )表示, 每组 4 个重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 苯磷硫胺对团头鲂血浆生化指标的影响

由表 3 所示, HC 组血浆 TG、TC、HDL 和 LDL 含量显著性(P<0.05)高于 C 组。高糖各组中, 苯磷硫胺的补充显著性(P<0.05)增加了血浆 TG、TC 和 HDL 含量, 并且最大值在 HCB2 组获得。

### 2.2 苯磷硫胺对团头鲂肝糖代谢相关基因表达的影响

由图 1 所示, HC 组肝 PKB、PEPCK、FBPase 和 G6Pase 的表达量显著低于 C 组(P<0.05), 但肝 GK、PK 和 GS 的表达量趋势与之相反。高糖各组中, 苯磷硫胺显著增加了肝 PKB、GK、PK 和 GS 的表达量(P<0.05), 且最大值均在 HCB2 组获得。此外, 苯磷硫胺的补充显著降低了肝 FoxO 1、GSK 3β、PEPCK、FBPase 和 G6Pase 的表达量(P<0.05)。HCB2 组肝 PEPCK 表达量的最小。

### 2.3 苯磷硫胺对团头鲂肝脂代谢相关基因表达的影响

由图 2 所示, HC 组肝 SREBP 1、FAS 和 ACCα 的表达量均显著高于 C 组(P<0.05), 但 PPARα、CPT 1A 和 ACO 的表达量与之相反。高糖各组中, 苯磷硫胺的补充均显著性增加了它们的表达量(P<0.05), 且 SREBP 1、FAS、PPARα 和 CPT 1A 表达量的最大值在 HCB2 组处获得。

表 2 实验所需引物序列  
Tab. 2 Primers used in this experiment

基因 gene	正义链序列(5'-3') forward sequence (5'-3')	反义链序列(5'-3') reverse sequence (5'-3')	序列号或参考文献 accession number or reference
蛋白激酶 B <i>PKB</i>	GCTGGGTAAGGCACGTTTG	CTCTCGGTGACCGTATGAGC	[13]
叉形头转录因子 1 <i>FoxO 1</i>	TACCCCGACCAGAAGCC	GACAAGGTGAGCCGTTT	[13]
糖原合成酶激酶 3 $\beta$ <i>GSK 3<math>\beta</math></i>	TTCCTTTGGGATCTGC	GGCTCTGTAGTACCGTGA	[13]
磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 <i>PEPCK</i>	TGGCCCCGTGTGGAGAGTAAAA	ATGTGTTCTGCCAGCCAG	[13]
果糖-1,6-二磷酸酶 <i>FBPase</i>	TACCCAGATGTCACAGAAT	CACTCATACAACAGCCTCA	KJ743995.1
葡萄糖-6-磷酸酶 <i>G6Pase</i>	TGAGACCCGGTTTTATGGAG	CATGCAGACCACCAGCTCTA	[13]
葡糖激酶 <i>GK</i>	AAAATGCTGCCCACTTAT	AATGCCCTTATCCAAATC	KJ141202.1
丙酮酸激酶 <i>PK</i>	GCCGAGAAAGTCTTCATCGCACAG	CGTCCAGAACCGCATTAGCCAC	[13]
糖原合成酶 <i>GS</i>	CCTCCAGTAACAACCTCAACA	CAGATAGATTGGTGGTTACGC	[13]
脂肪酸合成酶 <i>FAS</i>	AGCGAGTACGGTGATGGT	GGATGATGCCTGAGATGG	KF918747.1
乙酰辅酶 a 羧化酶 $\alpha$ <i>ACC<math>\alpha</math></i>	TCTGCCCTCTATCTGTCT	ATGCCAATCTCATTTCTT	[14]
固醇调节元件结合蛋白 1 <i>SREBP 1</i>	GCTGGCGTGTGCGTATCT	TGTTGGCAGTCGTGGAGG	[14]
过氧化物增氧剂激活受体 $\alpha$ <i>PPAR<math>\alpha</math></i>	GTGCCAATACTGTCGCTTTCAG	CCGCCTTAAACCTCAGCTTCT	HM140628
肉碱棕榈酰转移酶 1A <i>CPT 1A</i>	TACTTCCAAAGCGGTGAG	AGAGGTATTGTCCGAGCC	[15]
乙酰辅酶 a 氧化酶 <i>ACO</i>	GCTCAACCCTGGCATACT	CTGGCTCAGCTTTACACG	[16]
延长因子 1 $\alpha$ <i>EF 1<math>\alpha</math></i>	CTTCTCAGGCTGACTGTGC	CCGCTAGCATTACCCTCC	X77689.1

Note: PKB, protein kinases B; FoxO 1, forkhead transcription factor 1; GSK 3 $\beta$ , glucogen synthase kinase 3 $\beta$ ; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; FBPase, fructose-1,6-biphosphatase; G6Pase, glucose-6-phosphatase; GK, glucokinase; PK, pyruvate kinase; GS, glycogen synthase; FAS, fatty acid synthetase; ACC $\alpha$ , acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$ ; SREBP1, sterol regulatory element-binding protein-1; PPAR $\alpha$ , peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$ ; CPT 1A, carnitine palmitoyl transferase 1A; ACO, acyl-CoA oxidase; EF 1 $\alpha$ , elongation factor 1 $\alpha$ .

表 3 苯磷硫胺对团头鲂幼鱼血浆生化指标的影响  
Tab. 3 Effects of benfotiamine on plasma biochemical indicators of juvenile *Megalobrama amblycephala*

项目 item	组别 group					
	C	HC	HCB1	HCB2	HCB3	HCB4
甘油三酯/(mmol/L) TG	1.47 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	2.31 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	2.12 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	3.35 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	3.31 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	3.33 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>
总胆固醇/(mmol/L) TC	4.38 $\pm$ 0.07 <sup>e</sup>	6.41 $\pm$ 0.12 <sup>d</sup>	7.31 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	9.53 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	9.41 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	8.02 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>
高密度脂蛋白/(mmol/L) HDL	1.42 $\pm$ 0.10 <sup>e</sup>	3.41 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	3.59 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	4.12 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	3.63 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	3.46 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>
低密度脂蛋白/(mmol/L) LDL	0.56 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.98 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.91 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.11 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.96 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.85 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>

注: 同行数据上标不同表示组间存在显著差异( $P < 0.05$ ).

Note: Values in each line with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

#### 3.1 苯磷硫胺对团头鲂血浆生化指标的影响

血液是机体内运输营养物质与代谢废物的载体, 因此血液生化指标的变化可在一定程度上反映机体内营养物质的代谢情况。本研究中, 高糖饲料显著增加了团头鲂血浆中 TG、TC、HDL 和 LDL 含量, 该结果与前期观察到的血糖水平变化趋势相同<sup>[9]</sup>。通常, 摄食高碳水化合物饲料会增加

鱼体的血糖水平, 从而刺激脂质的合成<sup>[1]</sup>。这可能相应地增加血浆中 TG 和 TC 含量。随后, 血液中增加的 TC 水平会进一步刺激 HDL 和 LDL 的合成, 以便降低血液和组织中 TC 的含量, 进而维持正常的代谢稳态。HDL 和 LDL 是将 TC 由外周组织转运至肝及周围组织进行代谢转变的重要载体<sup>[17-18]</sup>。此外, 苯磷硫胺的补充显著性增加了血浆中 TG、TC 和 HDL 含量, 该结果与前期观察到的血糖水平变化趋势相反<sup>[10]</sup>, 说明高糖饲料中添

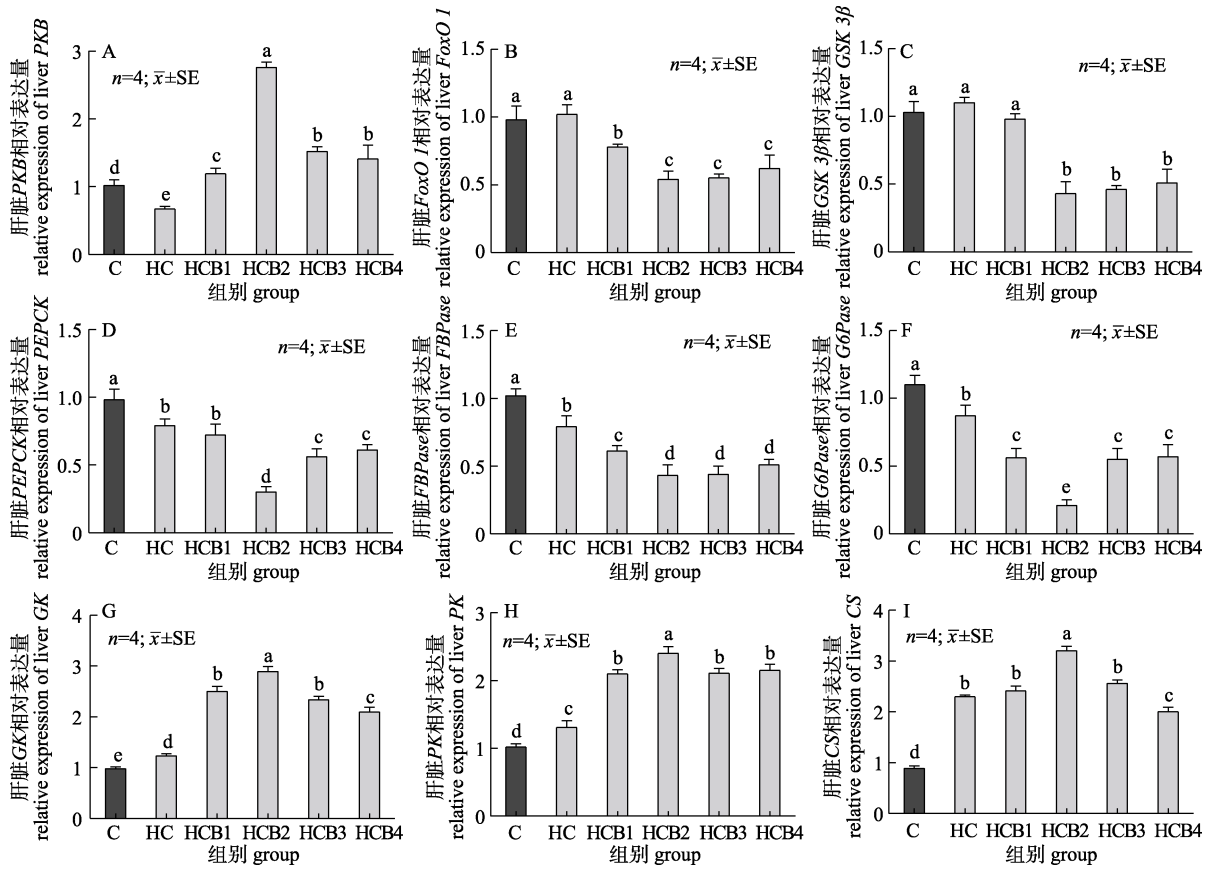


图 1 团头鲂肝糖代谢相关基因的相对表达量

图中不同小写英文字母表示两者之间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 1 Relative mRNA expressions of glucose metabolism-related genes in the liver of *Megalobrama amblycephala*. Means with different lowercase letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

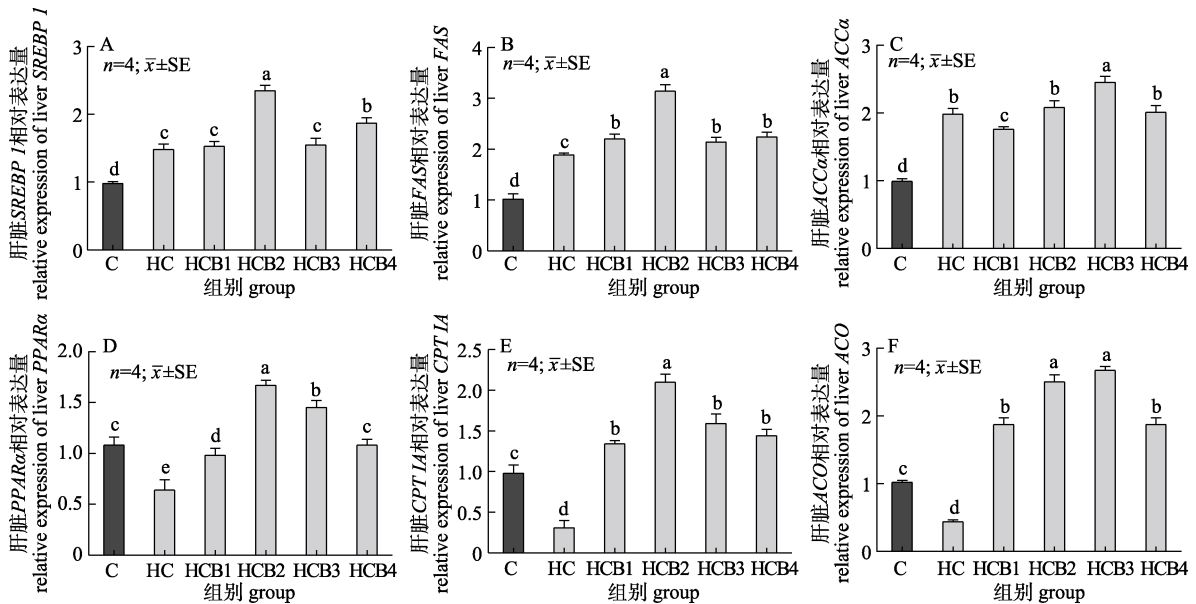


图 2 团头鲂肝脂代谢相关基因的相对表达量

图中不同小写英文字母表示两者之间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 2 Relative expressions of lipid metabolism-related genes in the liver of *Megalobrama amblycephala*. Means with different lowercase letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

加苯磷硫胺会促进鱼体脂质的合成。这可能是由于苯磷硫胺能够增强肝转酮醇酶和丙酮酸脱氢酶等的活性,促进糖酵解产物转移至磷酸戊糖途径,进而为TG和TC的生物合成提供了原料<sup>[6]</sup>。与此同时,血浆中增多的TG和TC水平被视为鱼体糖代谢增强的积极信号,因为血液中过多的葡萄糖被转化为脂质,将会降低血糖水平,进而有助于增强鱼体的葡萄糖稳态。另外,HCB2组鱼体血清中TG、TC、HDL和LDL含量均高于其他实验组,但血糖水平显著降低<sup>[9]</sup>。该结果表明,高糖饲料中添加适宜水平的苯磷硫胺(1.425 mg/kg)会显著增强鱼体脂质的合成。

### 3.2 苯磷硫胺对团头鲂肝糖代谢相关基因表达的影响

血糖稳态的调控需要机体各个组织相互协调,而肝已证明在调控葡萄糖稳态的过程中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。因此,测定鱼类肝中糖代谢相关基因的表达量可以有效地反映鱼体糖代谢的情况。本实验中,高糖饲料的摄入显著增加了肝GK、PK和GS的表达量,但PKB、PEPCK、FBPase和G6Pase的表达量与之相反,说明高糖饲料的摄入可能促进团头鲂肝糖酵解和糖原合成功能,但抑制糖异生作用<sup>[1-3]</sup>。GK是糖酵解的第一个限速酶,催化糖酵解的第一步反应<sup>[19-20]</sup>;GS是糖原合成过程中的关键限速酶<sup>[1]</sup>;PEPCK、FBPase和G6Pase可决定自肝释放出来的自由葡萄糖的有效性<sup>[1-3]</sup>。因此,在高糖各组中,苯磷硫胺的添加显著增加了肝PKB、GK、PK和GS的表达量,但FoxO1、GSK3 $\beta$ 、PEPCK、FBPase和G6Pase的表达量与之相反。这些结果表明,苯磷硫胺的添加会显著增强摄食高糖饲料团头鲂肝的糖酵解和糖原合成功能,但抑制糖异生作用。先前的研究表明,苯磷硫胺能通过“硫胺素+ATP $\rightarrow$ 焦磷酸硫胺素(ThDP)+AMP”反应,增加AMP/ATP比率,从而激活PKB信号通路<sup>[21-22]</sup>。这可能相应地增加了鱼体肝PKB的表达量。PKB的激活会通过抑制GSK3的活性,增加GS的表达,进而促进肝细胞摄取葡萄糖并合成糖原<sup>[23]</sup>。此外,激活后的PKB会通过磷酸化抑制FoxO1的活性,降低PEPCK、FBPase和

G6Pase等的转录水平,进而抑制肝糖异生功能<sup>[23]</sup>。同时,PKB还会磷酸化抑制cAMP-反应元件结合蛋白(CREB)-调节的转录共激活因子2和CREB结合蛋白的活性,进一步下调糖异生相关基因的表达量,进而抑制肝葡萄糖的生成<sup>[24-25]</sup>。HCB2组鱼体肝PKB、GK、PK和GS的表达量显著高于其他实验组,而其余糖代谢相关基因表达量变化趋势与之相反,表明1.425 mg/kg苯磷硫胺添加量能显著增强饲喂高糖饲料团头鲂肝的糖代谢功能。

### 3.3 苯磷硫胺对团头鲂肝脂代谢相关基因表达的影响

对于肝脂代谢而言,高碳水化合物饲料显著性增加了SREBP1、FAS和ACC $\alpha$ 的表达量,但降低了PPAR $\alpha$ 、CPT1A和ACO的表达量。该结果表明,饲喂高碳水化合物饲料能显著增强鱼体肝的脂肪合成能力,但抑制脂肪分解作用。由于以下两方面原因:(1)FAS和ACC $\alpha$ 是脂质合成过程中的关键限速酶<sup>[2]</sup>;(2)CPT1A和ACO与线粒体的脂肪酸 $\beta$ 氧化密切相关<sup>[2]</sup>。先前的研究表明,高日粮碳水化合物通常会增加血浆葡萄糖和胰岛素水平,并激活雷帕霉素靶点(mTOR)信号通路,进而促进SREBP1、FAS和ACC $\alpha$ 的表达<sup>[26]</sup>。此外,高日粮碳水化合物的摄入还会抑制沉默信息调节因子1(SIRT1)的活性,下调PPAR $\alpha$ 以及下游靶基因(CPT1A和ACO)的转录水平,从而抑制脂肪酸的氧化<sup>[27]</sup>。高糖各组中,苯磷硫胺的添加显著增加了肝SREBP1、FAS、ACC $\alpha$ 、PPAR $\alpha$ 、CPT1A和ACO的表达量。该研究结果表明,苯磷硫胺能显著增强饲喂高糖饲料鱼体肝的脂质合成及分解能力。由于苯磷硫胺能够促进磷酸戊糖途径中的脱氢酶活性,从而增强机体的脂质合成能力<sup>[6,28]</sup>。这可能相应地上调SREBP1、FAS和ACC $\alpha$ 的表达量。此外,哺乳动物中的研究证实,激活的PKB会上调PPAR $\alpha$ 的活性,从而增加肝的脂肪酸氧化功能<sup>[29]</sup>。HCB2组鱼体肝SREBP1、FAS、PPAR $\alpha$ 和CPT1A的表达量均显著高于其他实验组,表明1.425 mg/kg苯磷硫胺添加量能显著增强饲喂高糖饲料团头鲂肝的脂质合成及分解能力。

#### 4 结论

综上所述, 苯磷硫胺的添加会显著影响团头鲂幼鱼的血脂水平及与肝糖脂代谢相关基因的表达量。此外, 1.425 mg/kg 苯磷硫胺能够显著增加饲喂高糖饲料团头鲂血脂水平与肝糖酵解、糖原合成、脂质合成及分解相关基因的表达水平, 抑制肝糖异生相关基因表达。以上结果将有助于了解鱼类糖脂代谢的分子机制, 并为水产动物高糖饲料的研发和应用提供参考。

#### 参考文献:

- [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, Krogdahl Å. Carbohydrates in fish nutrition: Effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2002, 8(3): 175-194.
- [3] Enes P, Panserat S, Kaushik S, et al. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2009, 35(3): 519-539.
- [4] 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.
- [5] Paneni F, Costantino S, Cosentino F. Insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk[J]. *Current Atherosclerosis Reports*, 2014, 16(7): 419.
- [6] Beltramo E, Berrone E, Tarallo S, et al. Effects of thiamine and benfotiamine on intracellular glucose metabolism and relevance in the prevention of diabetic complications[J]. *Acta Diabetologica*, 2008, 45(3): 131-141.
- [7] Fraser D A, Hessvik N P, Nikolić N, et al. Benfotiamine increases glucose oxidation and downregulates NADPH oxidase 4 expression in cultured human myotubes exposed to both normal and high glucose concentrations[J]. *Genes & Nutrition*, 2012, 7(3): 459-469.
- [8] Shoeb M, Ramana K V. Anti-inflammatory effects of benfotiamine are mediated through the regulation of the arachidonic acid pathway in macrophages[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, 52(1): 182-190.
- [9] Xu C, Liu W B, Zhang D D, et al. Benfotiamine, a lipid-soluble analog of vitamin B<sub>1</sub>, improves the mitochondrial biogenesis and function in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fed high-carbohydrate diets by promoting the AMPK/PGC-1 $\beta$ /NRF-1 axis[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1079.
- [10] Xu C, Liu W B, Dai Y J, et al. Long-term administration of benfotiamine benefits the glucose homeostasis of juvenile blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed a high-carbohydrate diet[J]. *Aquaculture*, 2017, 470: 74-83.
- [11] Li P F, Wang Y, Jiang G Z, et al. Effects of dietary thiamin levels on growth, hepatic thiamin contents and plasma biochemical indexes of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(1): 108-113. [李鹏飞, 王莹, 蒋广震, 等. 硫胺素水平对团头鲂幼鱼生长、肝组织沉积量及血液生化指标的影响[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(1): 108-113.]
- [12] Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis[R]. AOAC, Arlington 1990: 1298.
- [13] Gao Z X, Luo W, Liu H, et al. Transcriptome analysis and SSR/SNP markers information of the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(8): e42637.
- [14] Qian Y, Li X F, Zhang D D, et al. Effects of dietary pantothenic acid on growth, intestinal function, anti-oxidative status and fatty acids synthesis of juvenile blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*[J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(3): e0119518.
- [15] Lu K L, Xu W N, Wang L N, et al. Hepatic  $\beta$ -oxidation and regulation of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed a high fat diet [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(3): e93135.
- [16] Lu K L, Zhang D D, Wang L N, et al. Molecular characterization of carnitine palmitoyltransferase 1A in *Megalobrama amblycephala* and effects on its expression of feeding status and dietary lipid and berberine[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 191: 20-25.
- [17] Beijing Medical College. Biochemistry[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1981: 145. [北京医学院. 生物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1981: 145.]
- [18] Gjøen T, Berg T. Hepatic uptake and intracellular processing of LDL in rainbow trout[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1993, 1169(3): 225-230.
- [19] Irwin D M, Tan H R. Molecular evolution of the vertebrate hexokinase gene family: Identification of a conserved fifth vertebrate hexokinase gene[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics & Proteomics*, 2008, 3(1): 96-107.
- [20] Kirchner S, Seixas P, Kaushik S, et al. Effects of low protein intake on extra-hepatic gluconeogenic enzyme expression

- and peripheral glucose phosphorylation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 140(2): 333-340.
- [21] Makarchikov A F. Vitamin B<sub>1</sub>: Metabolism and functions[J]. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 2009, 55(3): 278-297.
- [22] Gadau S, Emanuelli C, Van Linthout S, et al. Benfotiamine accelerates the healing of ischaemic diabetic limbs in mice through protein kinase B/Akt-mediated potentiation of angiogenesis and inhibition of apoptosis[J]. *Diabetologia*, 2006, 49(2): 405-420.
- [23] Vardatsikos G, Mehdi M Z, Srivastava A K. Bis(maltolato)-oxovanadium (IV)-induced phosphorylation of PKB, GSK-3 and FOXO1 contributes to its glucoregulatory responses (Review)[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2009, 24(3): 303-309.
- [24] Li X Y, Zhan X R, Liu X M, et al. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB in the differentiation of pancreatic ductal cells into islet  $\beta$ -cells mediated by hepatocyte growth factor[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 404(2): 711-716.
- [25] Imai E, Miner J N, Mitchell J A, et al. Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(8): 5353-5356.
- [26] Seiliez I, Panserat S, Lansard M, et al. Dietary carbohydrate-to-protein ratio affects TOR signaling and metabolism-related gene expression in the liver and muscle of rainbow trout after a single meal[J]. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2011, 300(3): R733-R743.
- [27] Rodgers J T, Lerin C, Haas W, et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1[J]. *Nature*, 2005, 434(7029): 113-118.
- [28] Aziz N H, Abdel-Aal S S. Regulation of rubratoxin-B biosynthesis: Assessment of role of gamma-irradiation, pH and carbohydrates[J]. *Microbios*, 1997, 89(358): 47-54.
- [29] Zhang D Q, Tong X, Nelson B B, et al. The hepatic BMAL1/AKT/lipogenesis axis protects against alcoholic liver disease in mice via promoting PPAR $\alpha$  pathway[J]. *Hepatology*, 2018, 68(3): 883-896.



## Effects of benfotiamine on serum biochemical indicators and glycolipid metabolism of blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed high-carbohydrate diets

XU Chao<sup>1</sup>, LIU Wenbin<sup>2</sup>, LI Yuanyou<sup>1</sup>, XIE Dizhi<sup>1</sup>, DING Zhirong<sup>1</sup>, LI Xiangfei<sup>2</sup>

1. College of Marine Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Key Laboratory of Aquatic Nutrition and Feed Science of Jiangsu Province, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

**Abstract:** As the most economical energy source, carbohydrates are now commonly incorporated into aquafeeds to improve the physical quality of the feed and reduce the catabolism of proteins and lipids by aquatic animals. However, it is generally acknowledged that fish show a poorer capability in utilizing carbohydrates for energy purposes than terrestrial animals. Furthermore, most species (especially carnivorous ones) often exhibit prolonged hyperglycemia after an intake of carbohydrate-enriched diets or a glucose load, which is similar to the symptoms of type 2 diabetes mellitus observed in mammals. Benfotiamine (pro-vitamin B<sub>1</sub>) is a lipid-soluble thiamine derivative with better absorption and bioavailability than thiamine in humans. It is commonly used for the treatment of type II diabetes to improve glucose homeostasis through the enhancement of glycolysis and also to remove excessive glycolytic metabolites and reduce hyperglycemic damage. Previously, our study demonstrated that the long-term administration of benfotiamine at 1.425 mg/kg improved the growth performance and liver mitochondrial biogenesis and function of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) (a commercially important freshwater fish in China) fed high-carbohydrate (HC) diets. In addition, 1.425 mg/kg benfotiamine also remarkably increased liver glycogen and lipid contents, but decreased plasma glucose levels of this fish fed HC diets. However, the underlying mechanisms are still poorly understood. Thus, a 12-week feeding trial was performed to evaluate the effects of benfotiamine on the serum biochemical indicators and glycolipid metabolism of *M. amblycephala* fed HC diets. A total of 360 fish [average body weight: (45.25±0.34) g] were randomly distributed into 24 tanks and fed six diets: the control diet (30% carbohydrate, C), the HC diet (43% carbohydrate), and the HC diet supplemented with different benfotiamine levels [0.7125 mg/kg (HCB1), 1.425 mg/kg (HCB2), 2.85 mg/kg (HCB3), and 5.7 mg/kg (HCB4)]. High-carbohydrate levels markedly increased serum levels of triglycerides, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol, as well as hepatic transcriptions of glucokinase (*GK*), pyruvate kinase (*PK*), glycogen synthase (*GS*), sterol regulatory element-binding protein-1 (*SREBP1*), fatty acid synthetase (*FAS*), and acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$ , whereas the opposite was true for protein kinases B (*PKB*), phosphoenolpyruvate carboxykinase, fructose-1,6-biphosphatase, glucose-6-phosphatase, peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  (*PPAR $\alpha$ ), carnitine palmitoyl transferase IA (*CPT IA*), and Acyl-CoA oxidase transcriptions. As with benfotiamine supplementation, the HCB2 diet markedly increased serum lipid levels, and hepatic transcriptions of genes *PKB*, *GK*, *PK*, *GS*, *SREBP 1*, *FAS*, *PPAR $\alpha$  and *CPT IA*, whereas the opposite was true for *FoxO1*, *GSK 3 $\beta$*  and gluconeogenesis-related gene expression. Overall, 1.425 mg/kg benfotiamine supplementation remarkably improved serum lipid levels, hepatic *PKB* mRNA levels, glycolysis, glycogenesis, lipogenesis, and fatty acid oxidation, but inhibited gluconeogenesis.**

**Key words:** *Megalobrama amblycephala*; glycolipid metabolism; benfotiamine; gene expressions

**Corresponding author:** LI Xiangfei. E-mail: xfli@njau.edu.cn