

程镇燕, 范 泽, 张植元, 等. 注射葡萄糖对鲤鱼糖代谢关键酶和相关激素的影响[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(4): 163–167.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.04.041

注射葡萄糖对鲤鱼糖代谢关键酶和相关激素的影响

程镇燕, 范 泽, 张植元, 曲 木, 刘宏超, 乔秀亭, 白东清

(天津农学院水产学院/天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384)

摘要:为研究注射葡萄糖后鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 糖代谢调节机制和相关激素变化情况, 选取体质量 (36.12 ± 1.18) g 的鲤鱼 120 尾, 随机分为高剂量组和低剂量组 2 个试验组, 分别按照 1 670、417 mg/kg 的剂量腹腔注射葡萄糖。结果表明: 高剂量组血糖含量在 3 h 时达到峰值, 而低剂量组在 1 h 达到峰值。在注射后 1、3 h 时, 高剂量组血糖含量显著高于低剂量组 ($P < 0.05$)。高剂量组胰岛素含量峰值出现在注射后 6 h, 滞后于血糖反应; 而低剂量组胰岛素峰值出现在注射后 1 h, 但峰值处于较低水平。高剂量组肝糖原含量呈先上升后下降再上升的变化趋势, 并在 12 h 恢复注射前水平, 而低剂量组肝糖原含量在注射后 6 h 出现峰值, 其他时点均低于注射前水平。糖酵解关键限速酶己糖激酶的活性在注射后呈上升趋势但未发生显著变化 ($P > 0.05$), 丙酮酸激酶的活性在注射后 3 h 出现峰值 ($P < 0.05$)。葡萄糖负荷后鲤鱼胰岛素及其受体的响应时间滞后于血糖反应是鲤鱼糖耐量降低的一个十分重要的原因, 但同时发现鲤鱼糖酵解关键酶活性与血糖含量同时达到峰值, 糖原的合成与分解灵活且有效地调节着血糖浓度的平衡, 表明葡萄糖负荷后鲤鱼通过糖代谢途径调节血糖处于动态平衡的能力较强。

关键词: 鲤鱼; 葡萄糖; 胰岛素; 糖耐量; 糖代谢; 己糖激酶; 丙酮酸激酶

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)04-0163-04

糖类或脂肪对蛋白质的节约效应是非蛋白能量源影响鱼类蛋白需求的关键因素。研究表明, 鱼类对脂肪的高利用性, 使得脂肪能够充分发挥节约蛋白质的作用, 90% 以上的脂肪均可利用于鱼体增质量和分解供能^[1]。但相对更为廉价的能源—糖类在节约养殖鱼类饲料蛋白过程中所产生的效果并不如脂肪那么显著。大量研究表明, 相对于陆生动物, 鱼类尤其是肉食性鱼类对糖的利用能力低下^[2], 并拥有自身独特的体质, 这种体质有 2 个特点: “低血糖耐受性”——指鱼类对低血糖的耐受能力强^[3]; “高血糖不耐受性”——指增加糖负荷后, 鱼类血糖水平升高, 并且高血糖状态持续的时间长, 即临床上所指的葡萄糖不耐症^[4], 也正因为此鱼类被冠以“先天的糖尿病患者”。

随着近些年研究的深入, 发现造成鱼类糖利用能力低下的传统主流观点, 如鱼类血液中胰岛素水平较低、鱼类外周组织对葡萄糖利用能力较弱、能更为有效地刺激鱼类胰岛素分泌的因素是氨基酸而非糖类等。但在一些草食性、杂食性鱼类, 甚至一些肉食性鱼类中并非如此^[3], 如随着胰岛素放射免疫测定方法的发展, 很多研究发现鱼类胰岛素水平相似于

甚至高于哺乳动物, 鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 即使在空腹时胰岛素水平也高于哺乳动物^[5], 说明内生胰岛素绝对量的不足并非造成鱼类对糖的低利用性的关键因素^[6]。糖负荷增加后, 鱼类胰岛素响应时间通常慢于哺乳动物^[7], 也就是说在摄食糖类一段时间后, 胰岛素调节作用才会充分发挥, 与之相关的调节因素包括机体内在的胰岛素受体数量、受体与胰岛素的亲和力等。在各种鱼类中进行葡萄糖耐受试验的结果不尽相同, 但有些差异是值得重视的, 如血糖峰值出现的时间点因鱼种不同而有差异; 对不同葡萄糖剂量的应答反应亦不相同; 杂食性鱼类的基础血糖水平比肉食性鱼类低^[3]等等。可见, 为了实现糖类对养殖鱼类饲料蛋白节约作用的这一设计, 真正勾勒和展现鱼类糖代谢调控机制的清晰蓝图, 还有一些空白和存在不一致或矛盾的地方需要未来进一步探索。

本试验选择鲤鱼为研究对象, 采用葡萄糖耐受试验法, 探讨和比较了 2 个葡萄糖注射剂量对鲤鱼血糖、血浆胰岛素、胰高血糖素、肝糖原及糖酵解与糖异生关键酶的影响, 旨在了解鲤鱼餐后糖代谢应答反应特点, 为探索和改善典型杂食性鱼类——鲤鱼的糖利用能力奠定理论基础和实践依据。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼及饲养管理

试验鱼由天津天祥水产养殖有限公司所提供, 在相同条件下饲养的健康鲤鱼幼鱼, 运至天津农学院循环水养殖实验室后, 饲养于 5 个 78 cm × 58 cm × 46 cm (约 200 L) 水族箱中, 每天投喂商品饲料 (粗蛋白 32%、粗脂肪 6.8%) 2 次, 日投饲率 4% 左右, 基本达到饱食状态。

暂养 1 周后, 选取体质健壮、规格相近、无伤无病的鱼随机分配到 12 个 78 cm × 58 cm × 46 cm (约 200 L) 的水族箱中, 每箱放 10 尾。鲤鱼先用市售饲料饲喂 2 周, 然后禁食 2

收稿日期: 2016-10-16

基金项目: 天津市科技支撑计划 (编号: 13ZCZDNC00900); 天津市应用基础与前沿技术研究计划 (编号: 14JCQNJC15100); 天津市高等学校中青年骨干创新人才培养计划。

作者简介: 程镇燕 (1981—), 女, 山东烟台人, 博士, 副教授, 主要从事鱼类营养生理与免疫研究。E-mail: chengzhenyan2005@126.com。共同第一作者: 范 泽 (1992—), 男, 内蒙古扎兰屯人, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: dankey1534417945@163.com。

通信作者: 白东清, 教授, 硕士生导师, 主要从事水产动物营养与饲料学研究。E-mail: baidongqing@tjau.edu.cn。

周(充分耗尽试验鱼肝糖原),再用于葡萄糖耐受试验。试验时鲤鱼平均体质量为 (36.12 ± 1.18) g。

1.2 试验设计

1.2.1 葡萄糖注射 试验鱼在实验室适应性饲养后,禁食 24 h,然后注射葡萄糖溶液,一组剂量为常用糖耐量试验剂量,为 1 670 mg/kg 体质量,记为高剂量组(H 组);另一组为 417 mg/kg 体质量,记为低剂量组(L 组)。与直接投喂含糖饲料不同,采用注射方式,葡萄糖吸收入血的过程较快,血糖升高幅度也较大。因此,在本试验中设定了低剂量组,以期观察到类似于进食饲料糖后的代谢反应。

从水族箱中逐尾捞取试验鱼,H 组和 L 组 2 个处理组分别依照 1 670、417 mg/kg 的剂量进行腹腔葡萄糖注射。注射前随机捞取 9 尾试验鱼,并依次注射相应体积的蒸馏水,作为 0 h 处理。

1.2.2 采样 在注射后的 1、3、6、9、12 h 对 2 个剂量组试验鱼采样,每个水族箱代表一个采样时间点。采样时,在每个时间点逐尾捞取对应水族箱试验鱼,麻醉后用经过 7% 肝素钠溶液润湿的 2 mL 注射器进行静脉抽血,全血样本以 4 000 r/min 离心 10 min,收集血浆。每箱共取 9 尾鱼,每 3 尾鱼的血浆合并为一个样本。血浆保存于 -80°C 冰箱中待测。

1.2.3 指标测定 血糖采用葡萄糖氧化酶—过氧化物酶法进行测定,试剂盒由南京建成生物工程研究所生产。血浆胰岛素、胰高血糖素均采用购自南京建成生物工程研究所的酶联免疫试剂盒测定。血浆中丙酮酸激酶(PK)和己糖激酶(HK)的活性均使用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行测定。肝糖原用碱消化法测定。

1.3 数据统计分析

试验所得数据均以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并采用单因素方差(One-way ANOVA)对单一因素内的差异显著性进行分析。若存在显著性差异时,采用 Duncan's 多重比较。 $P < 0.05$ 时被认为差异显著。试验数据处理采用 SPSS 16.0 统计软件在 Windows 7 操作系统中完成。

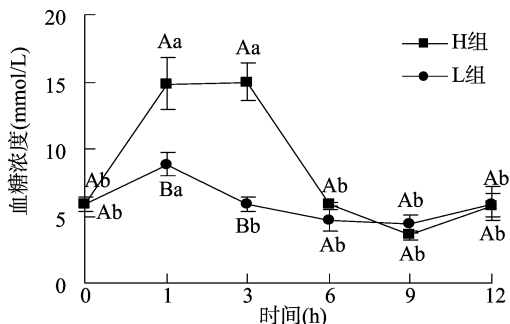
2 结果与分析

2.1 注射不同剂量葡萄糖后鲤鱼血浆葡萄糖含量随时间的变化

2 个剂量组鲤鱼在注射葡萄糖后的 12 h 内血糖含量的总体趋势相似。注射葡萄糖后 1 h 血糖值迅速升高,随后迅速下降,并在 6 h 时降至空腹水平,随后继续下降,但在 12 h 时又恢复至空腹水平。但两者血糖含量达到峰值的时间不同,H 组在 3 h 时达到峰值,而 L 组在 1 h 达到峰值。2 个剂量组血糖含量的变化幅度不同,在 6 h 前 H 组鲤鱼血糖值在注射葡萄糖后的每个时间点均高于 L 组,且在注射后的 1、3 h 时,H 组血糖值显著高于 L 组($P < 0.05$) (图 1)。

2.2 注射不同剂量葡萄糖后鲤鱼血浆胰岛素含量随时间的变化

由图 2 可知,2 个剂量组鲤鱼血浆胰岛素含量在注射前和注射后的每个时间点均无显著差异($P > 0.05$)。注射葡萄糖后,H 组鲤鱼血浆胰岛素含量从注射前的 6.76 mIU/L 上升至约 10.54 mIU/L,然后呈下降趋势,但均高于注射前水平。L 组血浆胰岛素含量变化幅度较小,注射葡萄糖后 1 h 血浆胰岛素含量上升至约 7.33 mIU/L,在之后的 3~12 h 内几乎没有变化,均接近于注射前水平。



不同大写字母表示同一时间内 2 个剂量组之间独立样本 t 检验差异显著 ($P < 0.05$),不同小写字母表示同一剂量组不同时间差异显著 ($P < 0.05$)。下同

图1 注射不同剂量葡萄糖对鲤鱼血浆葡萄糖含量的影响

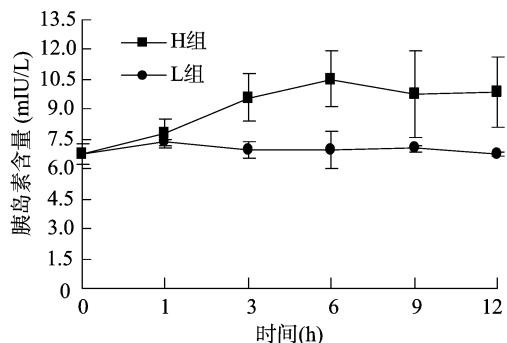


图2 注射不同剂量葡萄糖后鲤鱼血浆胰岛素含量随时间的变化

2.3 注射不同剂量葡萄糖后鲤鱼血浆胰高血糖素含量随时间的变化

在注射前和注射后的每个时间点 2 个剂量组鲤鱼血浆胰高血糖素含量差异并不显著($P > 0.05$)。注射葡萄糖后 6 h 内,2 个剂量组鲤鱼血浆胰高血糖素变化相似,均呈先下降后上升再下降的趋势。而在注射 6 h 后,2 个剂量组血浆胰高血糖素含量呈不同的变化趋势,H 组含量先上升后恢复至注射前水平,L 组则是先下降后恢复至注射前水平(图 3)。

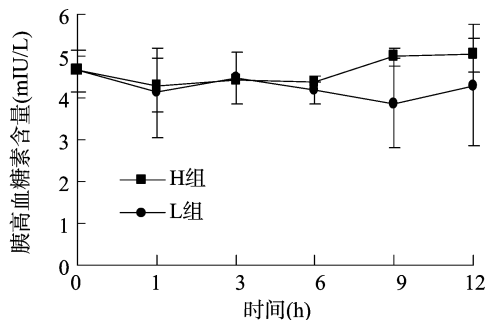


图3 注射不同剂量葡萄糖后鲤鱼血浆胰高血糖素含量随时间的变化

2.4 注射不同剂量葡萄糖后鲤鱼血浆肝糖原含量随时间的变化

由图 4 可见,在注射葡萄糖后的不同时间点 H 组鲤鱼肝糖原含量大体上高于注射前的水平(8.19 mg/g),但与注射前水平相比差异不显著($P > 0.05$)。L 组鲤鱼肝糖原含量在注射葡萄糖后的不同时间点则总体低于注射前的水平。在注射葡萄糖后 6 h 时,H 组和 L 组均恢复至注射前水平,但之后两组呈现不同的变化,H 组肝糖原含量先上升,在 12 h 时接近于空腹水平,而 L 组在 6 h 后呈下降趋势。

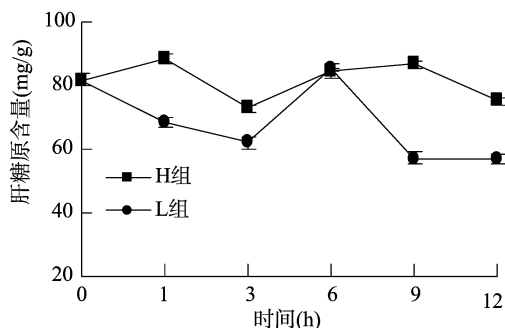


图4 注射不同剂量葡萄糖后血浆肝糖原含量的变化

2.5 注射不同剂量葡萄糖后鲤鱼血糖糖酵解关键酶活性随时间的变化

由图 5、图 6 可知,在注射葡萄糖后 H 组和 L 组鲤血糖酵解关键酶活性的变化趋势相似。丙酮酸激酶的活性均在注射葡萄糖后 3 h 时达到最高水平,且显著高于其他各时间点 ($P < 0.05$)。而 2 个剂量组鲤鱼在注射葡萄糖后 12 h 内血浆己糖激酶活性均未发生显著变化 ($P > 0.05$)。

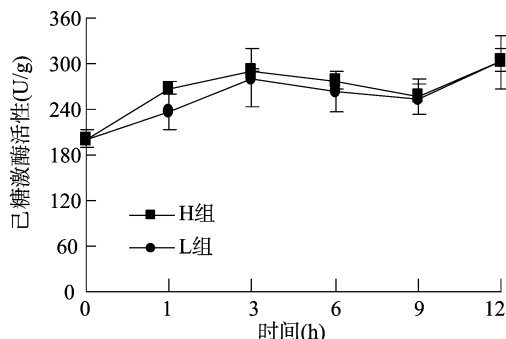


图5 注射不同剂量葡萄糖后血浆己糖激酶活性的变化

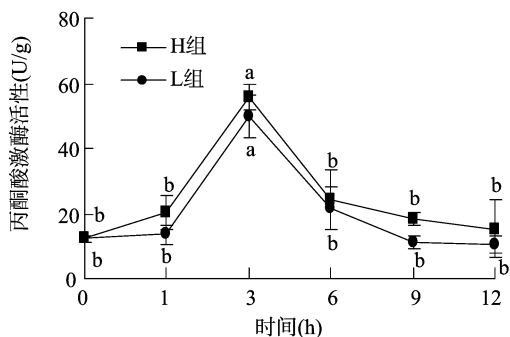


图6 注射不同剂量葡萄糖后血浆丙酮酸激酶活性的变化

3 讨论

3.1 注射不同剂量葡萄糖对鲤鱼血糖葡萄糖含量的影响

“葡萄糖耐量”是指经口摄入或注射葡萄糖使血糖水平升高后,由机体细胞从血液中带走的糖使得血糖浓度降到原来正常水平的速度,用曲线来表示这一变化叫做耐糖曲线。在本研究中,注射葡萄糖后高、低 2 个剂量组鲤鱼的耐糖曲线存在一定差异,2 组血糖含量峰值、达到峰值的时间及血浆葡萄糖含量恢复至注射葡萄糖前水平的时间均不同。H 组在 3 h 时达到峰值,峰值约为 14.98 mmol/L,血糖恢复时间为 6 h,而 L 组在 1 h 达到峰值,峰值约为 8.86 mmol/L,血糖恢

复时间为 3 h。

耐糖曲线的意义在于通过曲线中的“两值两时”,即空腹血糖值、口摄入或注射葡萄糖后血浆葡萄糖含量的峰值、达到峰值的时间及血糖恢复时间,可以直观地看出机体血糖变化情况从而推断出机体对血糖浓度的调节能力。空腹血糖 < 6.1 mmol/L,30 ~ 60 min 血浆葡萄糖含量达高峰,峰值 < 11.1 mmol/L,2 h 恢复到正常水平,即 < 7.8 mmol/L,上述为人类正常糖耐量水平,依据上述标准发现低剂量组鲤鱼的耐糖曲线与上述描述吻合,说明本试验中,注射葡萄糖剂量为 417 mg/kg 时,鲤鱼表现出较强的降低血糖负荷能力,这与同为杂食性鱼类的罗非鱼耐糖耐受试验结果^[8]一致。而注射葡萄糖剂量为 1 670 mg/kg 时,鲤鱼表现出耐糖降低症状,但相对于其他鱼类仍表现出较强的降低血糖负荷能力。在蔡春芳等对异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 进行的葡萄糖耐量试验中,禁食时血糖含量为 6.06 mmol/L,在灌喂 1 670 mg/kg 葡萄糖后,1 h 血糖显著升高,达 16.53 mmol/L,3 h 升至 21.27 mmol/L,3 h 后血糖开始缓慢下降,但 18 h 时血糖仍显著高于禁食水平^[9]。同采用腹腔注射方式,大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 在注射 1 000 mg/kg 葡萄糖时血糖恢复时间约需 24 h^[10],虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 在注射 3 000 mg/kg 葡萄糖时血糖恢复时间约需 18 h^[11]。由此可以看出,杂食性鱼类由高血糖状态恢复到空腹水平的速度通常要快于肉食性鱼类^[12-13]。上述分析表明,葡萄糖负荷后鲤鱼降低高血糖能力相对强于其他鱼类,而灌喂或注射后鱼类葡萄糖的应答反应也因鱼种和剂量而异。

3.2 注射不同剂量葡萄糖后鲤鱼的激素调节机制

在哺乳动物中,胰岛素/胰高血糖素是一对拮抗调节血糖变化的激素,可进行降血糖或升血糖调节。胰岛素是一种降低血糖的激素,是促进合成的激素,主要作用是促进葡萄糖的转化和糖原的生成,抑制糖原增生,从而维持血糖的动态平衡,而胰高血糖素的作用正好与之相反。因为胰岛素在哺乳动物调节和维持血糖动态平衡中的关键作用和地位,所以在进行口服耐糖量试验的同时,通常也会进行胰岛素释放试验,来了解胰岛 B 细胞的储备功能,从而有助于糖尿病的早期诊断、分型和指导治疗^[14-15]。在本研究中也对注射不同剂量葡萄糖后鲤鱼胰岛素的变化情况进行了检测,将耐糖曲线和胰岛素释放曲线结合分析,发现虽然高低剂量组的 2 种曲线存在一定差异,但均能证明鲤鱼为糖尿病体质,首先空腹胰岛素含量约为 6.75 mIU/L,略低于正常水平,在高剂量组中,血糖在注射后 3 h 达到最高水平,而在高血糖的刺激下胰岛素却在 6 h 时达到最高,刺激后呈迟缓反应,且峰值低于正常应到达的水平,表现为“胰岛素释放障碍型”;而在低剂量组中,虽然血糖和胰岛素峰值均出现在注射后 1 h,但因为未检测注射后 2 h 血浆胰岛素浓度,无法确定峰值出现时间,需要在今后的研究中进一步确定,但从总体趋势来看,所表现类型亦属于“胰岛素释放障碍型”。这种类型在人类临床医学中属于 2 型糖尿病,原名叫成人发病型糖尿病。2 型糖尿病患者体内产生胰岛素的能力并非完全丧失,而是因胰岛素受体数量少,且与胰岛素亲和力弱,导致胰岛素的作用效果较差^[16]。这种情况也在鱼类的糖耐量试验中得到证实,如吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[17]。上述分析表明,胰岛素及其受体

的响应时间滞后于血糖反应的特点是鱼类对糖不耐受的一个十分重要的原因。

血糖稳态的一个重要特征是胰岛 A 细胞有效地释放胰高血糖素,但是近年随着研究的深入,发现胰高血糖素分泌调节受损可能是诱发糖尿病的另一独立因素^[16,18-19],特别是 2 型糖尿病体质的患者。在本研究中,在低剂量组中,胰高血糖素含量随血糖含量变化较为正常。但在高剂量组中,由于机体长时间处于高血糖状态,胰岛 A 细胞对血糖的敏感性下降,导致血糖对胰高血糖素分泌的抑制作用减弱。此外,还发现胰岛素水平的升高并不能抑制胰高血糖素的分泌,提示胰岛 A 细胞存在胰岛素抵抗。

3.3 注射不同剂量葡萄糖后鲤鱼的糖代谢调节机制

糖代谢包含了很多途径,虽看似杂乱无章、毫无关联,但实际上每个途径之间都有一个非常关键的纽带将它们联系在一起,使得糖代谢能够高效有序地进行。因此,在分析糖代谢过程时,应该用联系的观点分析各个途径,找出相互影响、相互制约和相互作用的部分,有利于真正了解鱼类的糖代谢调节机制。鱼类的糖代谢途径主要通过肝脏的糖酵解、糖异生、柠檬酸循环、磷酸戊糖、糖原合成和降解等过程。在本研究中,在注射葡萄糖后,对糖酵解的关键限速酶及肝糖原含量进行了检测,结合耐糖曲线和胰岛素释放曲线综合分析发现:注射高剂量葡萄糖时血浆血糖含量呈上升趋势且在 3 h 出现峰值,在 6 h 时含量迅速降低至接近注射前水平,而糖酵解关键酶己糖激酶和丙酮酸激酶活性注射后也呈上升趋势且峰值也出现在 3 h,后因血糖含量下降二者的活性也逐渐下降。在分析肝糖原含量变化时应考虑其变化是一个合成与分解同时存在的动态平衡过程,注射后 1 h 因糖酵解酶活性不强,所以参与糖原合成的血糖较多,肝糖原含量呈上升趋势,随着时间的推进,糖酵解关键酶活性逐渐增强,参与糖原合成的血糖减少,在注射后 3 h,糖酵解关键酶活性出现峰值,糖酵解强度最大,而肝糖原此时分解大于合成,所以 3 h 时其含量出现了低峰,之后随血糖含量下降肝糖原却在 3~9 h 呈上升趋势,是因为血浆胰岛素的含量在不断上升,并在 6 h 出现峰值,促进了肝糖原的合成。在 9 h 后的下降趋势是因为体内血糖水平已低于注射前水平,需要通过肝糖原的分解来调节体内血糖浓度恢复至正常水平。注射低剂量葡萄糖时,血浆血糖含量呈上升趋势且在 1 h 出现峰值,而糖酵解关键酶的变化情况相同,所以血糖含量在 1 h 后呈现下降趋势。血糖含量虽在 1 h 出现峰值,但明显低于正常峰值水平,且其中一部分还参与糖酵解,所以需要肝糖原分解来维持血糖平衡,因此肝糖原含量呈下降趋势,之后肝糖原的变化趋势及原因与注射高剂量葡萄糖时相同。鲤鱼的这种糖代谢机制在其他鱼类的糖耐量试验中并未出现过,如同食性的吉富罗非鱼表现出糖酵解关键酶活性和糖原含量出现峰值的时间依然滞后于鱼类对糖类的吸收^[8],以及肉食性的斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)表现出高葡萄糖负荷下肝糖原合成代谢增强,而低葡萄糖负荷下肝糖原分解代谢增强^[20]。上述分析表明,葡萄糖负荷后鲤鱼通过糖代谢途径调节血糖处于动态平衡的能力相对强于其他鱼类,但上述分析仅是从宏观水平去解释了糖代谢关键酶活性及糖原含量在葡萄糖负荷后如何发生变化,并未从微观水平阐述糖代谢调节机制和找出其中影响糖代谢的关键因

子,如鲤鱼胰岛素受体数量及其作用于胰岛素的响应时间和葡萄糖转运载体家族转运能力在葡萄糖负荷后会发生怎样的变化,这些可以在今后的研究中进行深入的研究。

4 结论

通过对鲤鱼注射葡萄糖后的耐糖曲线和胰岛素释放曲线分析发现,血糖水平显著提高,且维持时间较长,激素调节相对滞后,属于 2 型糖尿病体质。但同时发现鲤鱼自身的糖代谢调节对于这种体质有很好的适应,糖酵解关键酶活性与血糖含量同时达到峰值,糖原的合成与分解灵活且有效地调节着血糖浓度的平衡。因此,胰岛素及其受体的响应时间滞后于血糖反应的特点是鲤鱼的糖耐量降低的一个十分重要的原因。目前,关于鲤鱼胰岛素受体数量及其作用于胰岛素的响应时间和葡萄糖转运载体家族转运能力在葡萄糖负荷后如何变化的研究相对较少,尚待进一步思考和探索。

参考文献:

- [1] 李爱杰. 水产动物营养与饲料学[M]. 北京:中国农业出版社, 1996:18-19.
- [2] 蔡春芳,陈立侨. 鱼类对糖的利用评述[J]. 水生生物学报, 2006,30(5):608-613.
- [3] Polakof S, Mommsen T P, Soengas J L. Glucosensing and glucose homeostasis: from fish to mammals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 160(4):123-149.
- [4] Legate N J, Bonen A, Moon T W. Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American eel (*Anguilla rostrata*), and black bullhead catfish (*Ameiurus melos*) [J]. General and Comparative Endocrinology, 2001,122(1):48-59.
- [5] Hertz Y, Epstein N, Abraham M, et al. Effects of metformin on plasma insulin, glucose metabolism, and protein synthesis in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Aquaculture, 1989,80(1/2):175-187.
- [6] Mommsen T P, Plisetskaya E M. Insulin in fishes and agnathans: history, structure and metabolic regulation[J]. Reviews in Aquatic Sciences, 1991,4(2/3):225-259.
- [7] Peres H, Gongalves P, Oliva - Teles A. Glucose tolerance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. Aquaculture, 1999,179(1/2/3/4):415-423.
- [8] 刘含亮,孙敏敏,王红卫,等. 注射葡萄糖对吉富罗非鱼血浆生化指标、胰岛素和糖酵解关键酶的影响[J]. 中国水产科学, 2012, 19(5):813-820.
- [9] 蔡春芳,陈立侨,宋学宏,等. 异育银鲫口服葡萄糖后血糖、血脂和肝糖原的变化[J]. 水产学报, 2002,26(3):237-241.
- [10] Garcia - Riera M P. Hemre G - I. Glucose tolerance in turbot, *Scophthalmus maximus* L. [J]. Aquaculture Nutrition, 1996,2(2):117-120.
- [11] Harmon J S, Eilertson C D, Sheridan M A, et al. Insulin suppression is associated with hypersomatostatinemia and hyperglucagonemia in glucose - injected rainbow trout [J]. The American Journal of Physiology, 1991,261(3 Pt 2):R609-R613.
- [12] 黄鹤忠,丁磊,宋学宏,等. 青鱼和草鱼葡萄糖耐量的比较研究[J]. 中国水产科学, 2005(4):496-500.

冯飞斐,王一丁. 应用 Illumina 高通量测序技术分析中华真地鳖肠道微生物多样性[J]. 江苏农业科学,2018,46(4):167-170.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.04.042

应用 Illumina 高通量测序技术分析 中华真地鳖肠道微生物多样性

冯飞斐, 王一丁

(四川师范大学生命科学学院, 四川成都 610100)

摘要:为了调查中华真地鳖肠道微生物多样性,应用 Illumina 高通量测序技术测定 3 个中华真地鳖肠道样本中微生物的 16S rDNA-V4 变异区序列,采用 UPARSE 等软件分析和统计样品中的操作分类单元(OTU)数量,并进行聚类分析,计算肠道微生物物种丰度。物种多样性分析显示,OTU 数量为 1 602~1 852 个。3 个样本中共检测到 31 个菌门,其中优势菌门是拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门;共检测到 309 个菌属,优势菌属是 *Parabacteroides*、*Alistipes*、沙雷氏菌属、*Christensenellaceae R-7 group*、乳酸杆菌属、*Candidatus Symbiothrix*、*Clostridium sensu stricto 1*。

关键词:中华真地鳖;肠道微生物;多样性;高通量测序

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)04-0167-04

中华真地鳖(*Eupolyphage sinensis* Walker), 中药名土鳖虫,别称土元、地鳖虫、地乌龟、簸箕虫等,为蜚蠊目鳖蠊科地鳖亚科地鳖属昆虫。中华真地鳖雌虫干燥体是一种传统中药,是《中华人民共和国药典》中记载的正品药材。中华真地鳖的药用历史悠久,成书于汉代我国第一部药物著作《神农本草经》、东汉著名医学家张仲景的《金匮要略》以及明代李时珍的《本草纲目》等几乎所有著名药典都对其有明确的记载^[1]。中华真地鳖具有破血逐瘀、续筋接骨的功能,被广泛应用于中药处方中。现代药理学研究表明,中华真地鳖对心脑血管系统有保健作用,能降脂调脂、抗凝血、抗血栓等,还具有抗肿瘤、抗氧化作用,此外还具有促进骨折愈合、镇痛、增强人体免疫等功效^[2]。还有研究发现,中华真地鳖营养丰富,部分地区已把它加工成食品^[3]。

最初,中华真地鳖主要靠野生药源满足市场,近年来,由于化肥、农药的大量使用,使其自然生存环境遭到破坏,野生药源日益枯竭,远远满足不了国内市场和出口创汇的需

要^[4],而人工饲养地鳖虫,不需要特殊设备,可因陋就简,投资少^[5]。因此,人工饲养中华真地鳖很快成为各地开展经营的项目。到目前为止,我国中华真地鳖规模化养殖已有三十多年历史^[6]。在影响中华真地鳖生命活动的各种不同因素中,人们对温度、湿度、光照度、食物等外界因素的关注较多,但对中华真地鳖肠道微生物的研究与阐述较少。昆虫肠道系统是随着取食、消化、排泄等活动而多变的环境,其中寄居的微生物与昆虫的营养生理活动有着密切的关系,一方面其群落结构、代谢活动受到昆虫肠道微环境的影响,另一方面它们也影响着昆虫的生命活动^[7]。近年来,对一些重要昆虫的肠道微生物的研究日渐活跃。同为蜚蠊目的美洲大蠊、德国小蠊作为对人类危害较大的害虫,其肠道微生物也受到了研究人员的关注^[8-9]。目前,中华真地鳖产业开发正在不断深入。为了深入研究中华真地鳖的营养生理状况,人为控制或改良中华真地鳖肠道微生态环境,开发中华真地鳖肠道微生物资源,研制微生态制剂,降低中华真地鳖人工繁育生产成本,笔者对中华真地鳖的肠道细菌进行了初步研究。

本研究采用基于 Illumina Hiseq 2500 平台的第二代测序技术对中华真地鳖肠道微生物种类组成进行分析,该方法相较于传统分析技术能够产生覆盖深度更大的数据量,检测到纯培养和传统非培养技术未能发现的低丰度肠道微生物种类。

收稿日期:2016-09-05

基金项目:四川省高校重点实验室开放项目(编号:SCYZ201408)。

作者简介:冯飞斐(1988—),男,湖北浠水人,硕士研究生,研究方向为微生物多样性。E-mail:namodo380@sina.com。

通信作者:王一丁,博士,教授,硕士生导师,研究方向为应用与环境微生物。E-mail:wangyiding@sicnu.edu.cn。

[13]毛义波,刘泓宇,谭北平,等. 饲料碳水化合物水平及饥饿处理对斜带石斑鱼生长及葡萄糖耐受能力的影响[J]. 水产学报, 2014,38(4):549-558.

[14]陈伟训,金珍成. OGTT 和胰岛素释放试验在肝源性糖尿病的诊断价值[J]. 浙江预防医学,2007,19(1):9-11.

[15]王纯敬,罗玉珍. 肝源性糖尿病患者 OGTT 和胰岛素释放试验的临床价值[J]. 北京中医药大学,2014,12(14):88-89.

[16]赵灵燕. 2 型糖尿病中医证候要素诊断量表的研制及初步应用研究[D]. 北京:北京中医药大学,2014.

[17]刘含亮. 注射葡萄糖对罗非鱼糖代谢,胰岛素受体和 GLUT4 基因表达的影响[D]. 泰安:山东农业大学,2012.

[18]徐涛,石梅,邱云霞,等. 胰高血糖素与 2 型糖尿病及糖调节异常的相关性研究[J]. 中国中药杂志,2014(12):2356-2363.

[19]贺宏波. 胰高血糖素与 2 型糖尿病相关研究述评[C]//中华中医药学会糖尿病分会. 第十四次全国中医糖尿病大会论文集. 北京:中华中医药学会糖尿病分会,2012.

[20]杨伟,叶继丹,王琨,等. 斜带石斑鱼经葡萄糖灌喂后的代谢反应[J]. 水生生物学报,2012,36(3):563-568.