

## 皇竹草对草鱼脂肪蓄积及肠道菌群组成的影响

李玉萍, 田晶晶, 张凯, 夏耘, 王广军, 郁二蒙, 李志斐, 龚望宝, 谢骏

### Effects of *Pennisetum sinense* Roxb meal on fat accumulation and intestinal microbiota composition of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

LI Yuping, TIAN Jingjing, ZHANG Kai, XIA Yun, WANG Guangjun, YU Ermeng, LI Zhifei, GONG Wangbao, XIE Jun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210403371>

#### 您可能感兴趣的其他文章

##### Articles you may be interested in

#### 投喂蚕豆对草鱼肝脏脂肪蓄积及脂肪代谢的影响

Effects of feeding broad bean on fat accumulation and metabolism in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) liver

上海海洋大学学报. 2020, 29(1): 45 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190302546>

#### 高脂饲料中添加含硫氨基酸对大菱鲆脂肪代谢的影响

Effects of supplementation of sulfur-containing amino acids in high-lipid diets on lipid metabolism of turbot (*Scophthalmus maximus*)

上海海洋大学学报. 2022, 31(4): 893 <https://doi.org/10.12024/jsou.20211203660>

#### 饲料中胆汁酸对红鳍东方脂肪酸组成及抗氧化能力的影响

Effect of dietary bile acid supplementation on fatty acid composition and anti-oxidative capacity of tiger puffer *Takifugu rubripes*

上海海洋大学学报. 2020, 29(6): 829 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191002833>

#### 棉子糖对锦鲤肠道健康、非特异性免疫、生长性能及观赏品质的影响

Effects of dietary raffinose on intestinal morphology and microbiome, non-specific immunity, growth and ornamental value of koi carp *Cyprinus carpio* var. koi

上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 822 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-300>

#### 低温胁迫对军曹鱼幼鱼脂代谢相关生理生化的影响

Effects of Low Temperature Stress on Physiology and Biochemistry of Lipid Metabolism of Juvenile Cobia, *Rachycentron canadum*

上海海洋大学学报. 2021, 41(3): 123 <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-9159.2021.03.016>

文章编号: 1674-5566(2022)04-0915-14

DOI:10.12024/jsou.20210403371

## 皇竹草对草鱼脂肪蓄积及肠道菌群组成的影响

李玉萍<sup>1,2</sup>, 田晶晶<sup>1</sup>, 张 凯<sup>1</sup>, 夏 耘<sup>1</sup>, 王广军<sup>1</sup>, 郁二蒙<sup>1</sup>, 李志斐<sup>1</sup>, 龚望宝<sup>1</sup>, 谢 骏<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

**摘 要:** 为探讨皇竹草(*Pennisetum sinense* Roxb)对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)脂肪蓄积和肠道菌群组成的影响, 配制 3 组分别含 0(对照组)、10% 和 20% 皇竹草粉的等氮等能纯化饲料(蛋白质水平 33%, 脂肪水平 8%), 饲喂草鱼稚鱼[(28.51 ± 0.04)g] 8 周, 每组饲料饲喂 3 个重复。结果显示, 饲料中添加 10% 和 20% 皇竹草粉能显著降低腹腔脂肪指数。相比对照组, 皇竹草粉组的草鱼肝脏脂滴数量均明显减少, 脂肪细胞大小明显变小。血清中的甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)和游离脂肪酸(NEFA)的含量随着皇竹草粉水平的升高呈下降趋势, 其中 20% 添加水平相比对照组草鱼显著降低。皇竹草粉组肝脏中的 TG、TC 和 NEFA 的含量均显著下降。肝脏和腹腔脂肪组织中过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (*ppary*)等脂肪生成相关 5 个基因在摄食皇竹草粉后显著下调, *ppar $\alpha$*  等 4 个脂肪分解相关基因在摄食皇竹草粉后显著上调, 肝脏组织中法尼酯 X 受体(*fxr*)基因在摄食皇竹草粉后显著上调。微生物宏基因组学结果显示, 10% 和 20% 皇竹草粉组草鱼肠道内容物中肠道微生物的 Ace、chao1、Shannon 和 Simpson 指数均与对照组差异显著, 表明皇竹草粉提高了草鱼肠道内菌群种类的丰度和多样性。从门分类来看, 与脂肪蓄积相关菌群厚壁菌门(Firmicutes)的比例在皇竹草组中显著降低, 拟杆菌门(Bacteroidetes)比例呈上升趋势。饲料中添加一定量的皇竹草粉可降低草鱼体脂蓄积, 推测肠道菌群的改善是这一过程中的重要环节。

**关键词:** 草鱼; 皇竹草; 脂肪蓄积; 肠道菌群

中图分类号: S 963 文献标志码: A

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国重要的淡水经济鱼类, 据 2020 年中国渔业统计年鉴统计, 2019 年, 我国草鱼的总产量为 553.30 万 t, 是养殖产量最大的淡水鱼类。随着社会的发展进步, 草鱼营养需求及饲料配方技术的研究广泛开展, 饲料工业产业蓬勃发展, 以投喂饲料为核心的草鱼精养模式已成为养殖产业的必由之路。在产业一线, 养殖草鱼往往出现腹腔脂肪过度蓄积和脂肪肝等营养代谢性疾病, 增加了死亡率, 降低了饲料效率和肉质品质, 是降低养殖效益的重要因子<sup>[1]</sup>。因此, 有效调控草鱼脂肪蓄积是解决当前养殖产业困扰的重要途径, 已成为研究的重要方向和热点领域。

在哺乳动物中, 肠道菌群的丰度及组成是影响肥胖的重要因素, 如无菌小鼠(*Mus musculus*)摄食多于正常小鼠 30%, 但体内的脂肪含量反而降低 42%, 对这类小鼠进行肠道菌群的移植后, 能够恢复脂肪的沉积<sup>[2]</sup>。类似地, 在鱼类中, 通过抗生素改变肠道菌群组成后, 也会发生肠道和肝脏内脂肪含量的改变<sup>[3-4]</sup>。有研究<sup>[5]</sup>表明, 肥胖的小鼠和人肠道内厚壁菌门(Firmicutes)细菌的含量增加, 而拟杆菌门(Bacteroidetes)细菌的含量降低。机制上认为, 肠道微生物产生代谢的物质, 如短链脂肪酸、内毒素、二级胆汁酸等, 是影响宿主脂肪蓄积的重要因子<sup>[6-9]</sup>。在哺乳动物上, 通过饲料干预的方式调控肠道菌群的组成能

收稿日期: 2021-04-02 修回日期: 2021-06-24

基金项目: 中国水产科学研究院珠江水产研究所基本科研项目(2018SJ-YB02); 大宗淡水鱼产业技术体系专项(CARS-45-21)

作者简介: 李玉萍(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料学。E-mail: yupingli666@163.com

通信作者: 田晶晶, E-mail: tianjj@prfri.ac.cn

够改善宿主体内脂肪的过度蓄积,其中一个主要的方式是增加膳食纤维的含量<sup>[10]</sup>,如在小鼠的饲料中增加竹笋类纤维含量比较高的食物,可显著增加拟杆菌门和降低疣微菌门(*Verrucomicrobia*)的含量,进而预防肥胖的产生<sup>[11]</sup>。在传统草鱼养殖生产中,养殖户尝试配合饲料与牧草结合投喂的方式,如美国矮象草(*Pennisetum purpureum*)<sup>[12]</sup>、杂交狼尾草(*Pennisetum americanum* × *P. purpure*)<sup>[13]</sup>、黑麦草(*Lolium perenne*)<sup>[14]</sup>和苏丹草(*Sorghum sudanense*)<sup>[15]</sup>等,可达到较好的降脂效果。类似地,在饲料中添加不同水平的苜蓿草(*Medicago sativa* L.)粉饲喂黄河鲤(*Cyprinus carpio-haematopterus*),其血清、肝脏脏和肌肉中总胆固醇和甘油三酯含量均随苜蓿草粉添加量的增加依次降低<sup>[16]</sup>。同时,饲料中苜蓿草粉的添加也降低了团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)肌肉粗脂肪的含量<sup>[17]</sup>。可见,在养殖鱼类饲料中添加青草类饲料原料也是减脂的一个重要途径,然而这其中内在的机制尚不明确,肠道菌群的变化是否是其中的一个重要的途径需要进一步探索。另外,不同类别的纤维影响肠道菌群的组成及功能也存在差异<sup>[11]</sup>。因此,针对不同的饲料原料验证和评估亟待展开。

皇竹草(*Pennisetum sinense* Roxb)为多年生禾本科植物,由象草和美洲狼尾草杂交选育而成,属四碳植物<sup>[18]</sup>。皇竹草营养丰富,含有较高的蛋白(17.96%, DM)、脂肪(2.74%, DM)和纤维(23.26%, DM)<sup>[19]</sup>。此外,有研究<sup>[20-21]</sup>指出,皇竹草含19种氨基酸,且赖氨酸、矿物质和维生素等含量较高,可以满足鱼类生长发育的需要且具有用于鱼饲料的潜力。本研究室前期发现饲料中添加皇竹草粉后显著降低了草鱼腹腔内脂肪的含量,同时肠道菌群也发生了变化,包括拟杆菌门和厚壁菌门的比例下调<sup>[22-23]</sup>,但该研究中草粉饲料的能量低于配合饲料,鱼体中肠道菌群和脂肪蓄积的变化是皇竹草粉本身的作用还是饲料能量的差异造成的并不清楚。本研究以纯化饲料为基础,深入探讨在等氮等能饲料的前提下添加皇竹草粉对草鱼肠道菌群和脂肪蓄积的影响及作用机制,明确皇竹草粉的营养作用,以期为该饲料原料在产业一线的应用提供参考资料和理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验饲料

试验用草粉(皇竹草)购自广东省江门市鹤山广佛饲料厂。参考 LOVELL<sup>[24]</sup>中的饲料配方,以酪蛋白和明胶为蛋白源,鱼油和大豆油为脂肪源,设置3组蛋白质水平为33%,脂肪水平为8%的等氮等能纯化饲料。对照组(C)不做处理,处理组分别添加10%和20%皇竹草粉(PSR1和PSR2),每组添加0.1%二丁基羟基甲苯作为抗氧化剂(表1)。饲料制备前先将饲料原料粉碎,过60目筛。按比例准确称取饲料原料,按照含量从小到大的原则逐级混合,然后再将油和水分别混入,搓匀。将混合均匀的原料用饲料制粒机挤压出2.0 mm粒径的颗粒饲料,在阴凉处风干后放在-20℃储存备用。

### 1.2 饲养与管理

试验用草鱼购自佛山市南海通威水产科技有限公司,养殖试验在中国水产科学研究院珠江水产研究所绿色养殖基地进行。试验鱼先放于4.5 m × 4.5 m × 1.1 m的水泥池中暂养2周,以对照组饲料对草鱼驯食。暂养结束后,挑选规格均一、体格健壮的198尾草鱼[(28.51 ± 0.04) g]分配到9个养殖缸(1.2 m × 0.6 m × 0.5 m)中,每个缸放鱼22尾。每组饲料随机投喂3个养殖缸,试验周期为8周,每天08:30和16:30各投喂1次,采用饱食投喂方式。每天记录进食量、水温、天气和死亡情况,其间水体pH为6.5~7.8,溶氧量为5.7~7.6 mg/L,氨氮浓度≤0.20 mg/L,水温为28.0~33.0℃。

### 1.3 采样与处理

养殖结束后停食24 h,对所有鱼进行采样。采样前先用MS-222(0.06 g/L)进行麻醉,测量体质量和体长。从每个鱼缸中随机选取6尾草鱼,在无菌超净台内,用1 mL无菌注射器从尾静脉取血,装于1.5 mL无菌离心管中,4℃静置过夜后3 500 r/min离心10 min,吸取上清液,分装于1.5 mL无菌离心管中,并保存在-80℃冰箱中,用于血清指标的测定。另随机取9尾草鱼进行解剖,分别对其内脏团、肝脏、腹腔脂肪等组织进行称重。将中肠道内容物、肝脏、腹腔脂肪迅速置于液氮中冻存,再转移到-80℃超低温冰箱保存。随机挑选3尾鱼采集0.5~1.0 g的肝脏组

织、脂肪组织,固定于4%多聚甲醛溶液中,用于组织切片。肠道内容物用于提取肠道菌群DNA。试验鱼的肥满度(condition factor, CF)、脏体比(viscerosomatic index, VSI)、肝体比(hepatosomatic index, HSI)、肠脂比(mesenteric fat index, MFI)等计算公式:

$$F_{CF}(\%) = 100 \times (W_2/L^3) \quad (1)$$

$$I_{VSI}(\%) = 100 \times (V/W_2) \quad (2)$$

$$I_{HSI}(\%) = 100 \times (H/W_2) \quad (3)$$

$$I_{MFI}(\%) = 100 \times (M/W_2) \quad (4)$$

式中: $F_{CF}$ 为肥满度; $I_{VSI}$ 为脏体比; $I_{HSI}$ 为肝体比; $I_{MFI}$ 为肠脂比; $W_2$ 为实验结束时鱼体质量,g; $L$ 为实验结束时鱼体长,cm; $V$ 为鱼体内脏质量,g; $H$ 为鱼体肝脏质量,g; $M$ 为鱼体肠系膜脂肪质量,g。

表1 试验饲料组成及成分

Tab.1 Formulation and chemical composition of the experimental diets

g/kg 干质量

饲料组成 Feed composition	对照组 C	10% 皇竹草粉 PSR1	20% 皇竹草粉 PSR2
酪蛋白 Casein	320	308	300
明胶 Gelatin	80	77	75
糊精 Dextrin	280	280	280
纤维素 Cellulose	189	106	18
皇竹草粉 Grass meal	0	100	200
鱼油 Fish oil	40	40	40
大豆油 Soybean oil	40	38	36
羧甲基纤维素钠 Carboxymethylcellulose	30	30	30
二丁基羟基甲苯 Butylated hydroxytoluene	1	1	1
混合维生素无机物 Mixed vitamin inorganics	20	20	20
总计 Total	1 000	1 000	1 000
常规组分 Conventional components			
水分 Moisture /%	9.1	9.3	9.7
粗蛋白 Crude protein/%	33.09	33.50	33.98
粗脂肪 Crude fat /%	9.4	9.4	9.2
粗灰分 Ash/%	1.9	2.8	3.7

注:混合维生素无机物含硫酸铝钾 1.59 g/kg, 碳酸钙 181.01 g/kg, 磷酸二氢钙 116.01 g/kg, 氯化钴 0.7 g/kg, 硫酸镁 52.16 g/kg, 硫酸锰 0.07 g/kg, 氯化钾 165.53 g/kg, 碘化钾 0.14 g/kg, 碳酸锌 1.92 g/kg, 磷酸二氢钠 136.05 g/kg, 硒酸钠 0.06 g/kg, 硫酸铜 0.75 g/kg, 柠檬酸铁 13.38 g/kg, 硫胺素 50 mg/kg, 核黄素 50 mg/kg, 维生素 A 25 000 IU/kg, 维生素 E 400 IU/kg, 维生素 D<sub>3</sub> 24 000 IU/kg, 甲萘醌 40 mg/kg, 盐酸吡哆醇 40 mg/kg, 氰钴胺 0.1 mg/kg, 生物素 6 mg/kg, 泛酸钙 100 mg/kg, 叶酸 15 mg/kg, 烟酸 200 mg/kg, 肌醇 2 000 mg/kg。  
Notes: Mixed vitamin inorganics includes potassium potassium sulfate 1.59 g/kg, calcium carbonate 181.01 g/kg, calcium dihydrogen phosphate 116.01 g/kg, cobalt chloride 0.7 g/kg, magnesium sulfate 52.16 g/kg, manganese sulfate 0.07 g/kg, potassium chloride 165.53 g/kg, potassium iodide 0.14 g/kg, zinc carbonate 1.92 g/kg, sodium dihydrogen phosphate 136.05 g/kg, sodium selenate 0.06 g/kg, copper sulfate 0.75 g/kg, citric acid Iron 13.38 g/kg, thiamine 50 mg/kg, riboflavin 50 mg/kg, vitamin A 25 000 IU/kg, vitamin E 400 IU/kg, vitamin D<sub>3</sub> 24 000 IU/kg, menadione 40 mg/kg, hydrochloric acid Pyridoxine 40 mg/kg, cyanocobalamin 0.1 mg/kg, biotin 6 mg/kg, calcium pantothenate 100 mg/kg, folic acid 15 mg/kg, nicotinic acid 200 mg/kg, and inositol 2 000 mg/kg.

#### 1.4 血清与肝脏生化指标和酶活性的测定

血清甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)和游离脂肪酸(non-esterified fatty acid, NEFA)等指标使用试剂盒检测(南京建成生物科技有限公司,南京,中国),操作步骤均按照试剂盒说明书进行,每缸选取3尾鱼的样品进行检测。

肝脏TG、TC、NEFA的测定使用试剂盒进行,并参照说明书进行具体操作。其中,TC和NEFA试剂盒由南京建成生物科技有限公司(南京,中国)生产,TG试剂盒由北京普利莱基因技术有限

公司(北京,中国)生产。每缸选取3尾鱼的样品进行检测。

#### 1.5 组织切片

肝脏组织采用油红O染色(oil red O staining),脂肪组织采用H.E染色。肝脏组织固定在4%多聚甲醛中过夜(4℃),然后在4℃下与30%蔗糖孵育3d。将肝脏组织包埋在最佳切割温度(optimal cutting temperature, OCT)化合物(Leica,德国)中,切片为6~10 μm,用蒸馏水冲洗。将玻片在60%异丙醇中漂洗20~30s后,用油红O(Sigma,美国)染色10min。随后立即将玻

片在 60% 异丙醇中脱色 3 min,并用蒸馏水清洗。然后用苏木精复染切片 1 min,并用蒸馏水洗 10 min。最后,用甘油明胶封盖玻片。使用光学显微镜(Olympus BX41,日本)拍摄载玻片。将固定的脂肪组织样品在自来水中洗涤 12 h,然后在一系列梯度乙醇(体积分数)中进行脱水(30%、50%、70%、80%、90%、95%和 100% 2 次)。根据先前描述的标准组织学技术,将样品在二甲苯中平衡并包埋在石蜡中<sup>[25]</sup>。用旋转切片器(RM2235,莱卡,德国)切割 5  $\mu\text{m}$  的切片,安装在载玻片上并用 H. E 染色。使用立式显微镜(Leica biosystems, Wetzlar, 德国)观察组织学样品并拍照。

## 1.6 组织总 RNA 提取、反转录及相关基因表达量检测

### 1.6.1 总 RNA 的提取

肝脏和脂肪组织总 RNA 采用 TRIZOL 试剂盒(TaKaRa,日本)提取,并用 1% 琼脂糖变性胶来检测总 RNA 的提取质量和完整性。除去总 RNA 中的 DNA 后,以 1  $\mu\text{g}$  总 RNA 为模板,利用 PrimeScript<sup>TM</sup> 反转录试剂盒(TaKaRa,日本)进行

cDNA 的合成,反应程序为 37  $^{\circ}\text{C}$  15 min,85  $^{\circ}\text{C}$  反应 5 s,4  $^{\circ}\text{C}$  结束。cDNA 保存在 -20  $^{\circ}\text{C}$  用于基因检测。

### 1.6.2 实时定量 PCR

检测的基因引物是根据已经发表的草鱼  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin),载脂蛋白 E(apoe),二酰基甘油 O 酰基转移酶(dgat),硬脂酰 CoA 去饱和酶(scd),乙酰 CoA 羧化酶(acc),脂肪组织甘油三酯脂肪酶(atgl),肉毒碱棕榈酰转移酶 1(cpt-1),脂肪酸合酶(fas),激素敏感性脂肪酶(hsl),过氧化物酶体增殖物激活受体  $\alpha$ (ppara),过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (ppary),法尼酯 X 受体(fxr),胆固醇 7 $\alpha$  羟化酶(cyp7a1)序列基础上设计的,由生工生物工程(上海)有限公司合成。参照 TIAN 等<sup>[26]</sup>的方法,以  $\beta$ -actin 作为内参基因,用 LightCycler<sup>®</sup> 96—TimePCR Detection System (Roche,瑞士)检测各基因的相对表达水平。通过先前研究中描述的比较 CT 方法( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ )计算基因表达值<sup>[27]</sup>。所有的 RNA 样品都以 3 个重复进行检测。所分析的 12 个基因引物序列见表 2。

表 2 实时定量引物信息

Tab. 2 Primers used in real-time quantitative PCR

目标基因 Target genes	登录号 Accession No.	上游 Forward (5'-3')	下游 Reverse (5'-3')
<i>apoe</i>	KY800896	CTTAAGAGCTCCACGCTTATC	GTGTAGTAGGACGCACATTTAT
<i>dgat</i>	KY800895	CACCTTCCAAGTACCTTCTG	AGATCCCCTCGCCTATT
<i>scd</i>	AJ243835	GCCTTCCAGAATGACATCTAC	GCCGATGTGAGCAAAGAA
<i>acc</i>	HM142590	TGGAGGTGGCCTTCAACAATACCA	AAGGTCATGATGACAGTTGGGA
<i>atgl</i>	HQ845211	TCGTGCAAGCGTGTATATG	GCTCCTACTGAGGCAAATTA
<i>cpt-1</i>	JF728839	GCATCCATGACACGTTTATTC	GAAGTTTCTCTCTCTCGTCTC
<i>fas</i>	GQ466046	CCTCAGCTTACAGCAGAATC	CTCTTCAGCAAGGAGTTTAC
<i>hsl</i>	HQ446238	TGGAACGTTACTGAGTCTG	GAAGCGCACGTTGACTGG
<i>ppara</i>	FJ623265	CGCTGAGGTTCCGATATTT	ACGTCACCTGGTCATTTAAG
<i>ppary</i>	EU847421	CGCTCATCTCCTACGGTCAG	ATGTCGCTGTCTGCCAACTC
<i>fxr</i>	MT335828	CGTCCAGGTGTTGTTGAGT	CGAACCTAGGAACATCGCCT
<i>cyp7a1</i>	KT781906.1	TCTATGACAATCTCTGGCATACAA	CAAAGAAACGCCCGGACA
$\beta$ -actin	DQ211096	TCCACCTTCCAGCAGATGTGGATT	AGTTTGACTCGGCGTGAAGTGTA

### 1.7 细菌基因组 DNA 提取

将肠道样品放在无菌培养皿内,用无菌解剖剪纵向剖开肠壁,刮取内壁黏液,置于 2.0 mL 离心管中,即为肠道内容物样品。为降低个体间差异,将每缸中 3 条鱼的肠道内容物合并,以进行微生物群分析。采集的肠道内容物样品使用细菌 DNA 提取试剂盒(NucleoSpin Microbial DNA,

MN,德国)提取细菌 DNA。肠内容物样本约 250 mg,使用混合研磨珠振荡混合,并用 1% 琼脂糖凝胶检测每个 DNA 样品的质量和完整性。所有 DNA 均在 -20  $^{\circ}\text{C}$  下保存直至使用。

### 1.8 微生物 16S rRNA 高通量测序

应用高通量测序技术对草鱼肠道内容物进行 16S rRNA V3 + V4 区测序(百迈客生物科技有限

公司,北京)。16S rRNA 基因 V3 + V4 可变区特异性引物扩增序列 338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3', 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。PCR 体系 10  $\mu$ L: KOD FX Neo Buffer 5  $\mu$ L, dNTP (2 mmol/L) 2  $\mu$ L, 基因组 DNA 50 ng, 338F 上下游引物 (10  $\mu$ mmol/L) 各 0.3  $\mu$ L, KOD FX Neo 0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补至 10  $\mu$ L。PCR 扩增程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 25 个循环, 72  $^{\circ}$ C 7 min, 4  $^{\circ}$ C  $\infty$ 。1.8% 的琼脂糖凝胶, 电压 120 V, 40 min 检测电泳产物。之后对原始数据进行拼接 (FLASH, version 1.2.11), 将拼接得到的序列进行质量过滤 (Trimmomatic, version 0.33), 并去除嵌合体 (UCHIME, version 8.1), 得到高质量的 Tags 序列, 最终得到的序列用于聚成操作分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTUs) 分析。在相似性 97% 的水平上对序列进行聚类 (USEARCH, version 10.0), 以测序所有序列数的 0.005% 作为阈值过滤 OUT, 比对的 16S rRNA 参考数据库是 Silva (Release132, <http://www.arb-silva.de>)。然后用 RDP classifier (version 2.2, <http://sourceforge.net/projects/rdpclassifier/>) 贝叶斯算法对 OTU 的代表性序列进行物种分类学分析, 并在不同物种分类水平下统计每个样本的群落组成以及组间物种差异。基于 OTU 的分析结果, 采用对样本序列进行随机抽样的方法, 分别计算 Ace、Chao1、香农 (Shannon) 及辛普森 (Simpson) 等 Alpha 多样性指数。

### 1.9 数据计算与分析

数据以平均值  $\pm$  标准差表示, 采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差 (One-way ANOVA) 分析, 差异显著时, 采用 Duncan's 进行多重比较,  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 饲料添加皇竹草粉对草鱼稚鱼形体指标的影响

养殖过程中草鱼摄食积极, 生长良好。表 3 显示, PSR1 组和 PSR2 组的肠脂比显著低于 C 组, 分别降低了 19.93% 和 24.35% ( $P < 0.05$ )。各组间的肥满度、脏体比、肝体比没有显著性差

异 ( $P > 0.05$ )。

表 3 饲料中添加皇竹草粉对草鱼稚鱼形体指标的影响  
Tab.3 Effects of dietary supplemented with *Pennisetum sinense* Roxb meal on physical indicators of juvenile grass carp  $n = 3, \%$

项目 Items	组别 Groups		
	C	PSR1	PSR2
肥满度 CF	2.09 $\pm$ 0.18	2.04 $\pm$ 0.23	1.92 $\pm$ 0.09
脏体比 VSI	10.10 $\pm$ 0.80	9.44 $\pm$ 1.92	9.33 $\pm$ 0.79
肝体比 HSI	1.91 $\pm$ 0.25	1.98 $\pm$ 0.12	1.99 $\pm$ 0.09
肠脂比 MFI	2.71 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	2.17 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	2.05 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>

注: 同行肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 标有相同字母或无字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

Notes: In the same line, values with different small letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), while with same small letter or no superscripts mean no significant difference ( $P > 0.05$ ).

### 2.2 饲料添加皇竹草粉对草鱼稚鱼血脂的影响

如表 4 所示, 饲料中添加皇竹草粉明显降低草鱼血清中的 TG、TC 和 NEFA 的含量, 其中, 添加 20% 皇竹草粉能够达到显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 分别降低了 26.67%、19.23% 和 59.49%。

表 4 饲料中添加皇竹草粉对草鱼稚鱼血清 TG、TC 和 NEFA 的影响

Tab.4 Effects of the dietary *Pennisetum sinense* Roxb meal on serum TG, TC and NEFA levels of juvenile grass carp  $n = 3, \text{mmol/L}$

项目 Items	组别 Groups		
	C	PSR1	PSR2
甘油三酯 TG	2.85 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	2.28 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup>	2.09 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>
总胆固醇 TC	6.24 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	5.31 $\pm$ 0.55 <sup>ab</sup>	5.04 $\pm$ 0.72 <sup>b</sup>
游离脂肪酸 NEFA	0.79 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.49 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.32 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>

注: 同行肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 标有相同字母或无字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

Notes: In the same line, values with different small letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), while with same small letter or no superscripts mean no significant difference ( $P > 0.05$ ).

### 2.3 饲料添加皇竹草粉对草鱼稚鱼肝脏脂肪蓄积相关指标的影响

由表 5 可知, 饲料中添加 10% 和 20% 皇竹草粉均显著降低肝脏中的 TG、TC 和 NEFA 的含量, 分别降低了 19.32% 和 26.14%、64.00% 和 72.55%, 以及 49.84% 和 57.21% ( $P < 0.05$ )。

表 5 饲料中皇竹草粉对草鱼肝脏  
TG、TC 和 NEFA 的影响

Tab. 5 Effects of the dietary *Pennisetum sinense* Roxb meal on the hepatic TG, TC and NEFA levels of juvenile grass carp  $n = 3, \mu\text{mol}/\text{mg prot}$

项目 Items	组别 Groups		
	C	PSR1	PSR2
甘油三酯 TG	0.09 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.06 ± 0.00 <sup>b</sup>
总胆固醇 TC	3.26 ± 0.38 <sup>a</sup>	1.18 ± 0.36 <sup>b</sup>	0.90 ± 0.31 <sup>b</sup>
游离脂肪酸 NEFA	1.90 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.81 ± 0.09 <sup>b</sup>

注:同行肩标不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),标有相同字母或无字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )。

Notes: In the same line, values with different small letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), while with same small letter or no superscripts mean no significant difference ( $P > 0.05$ ).

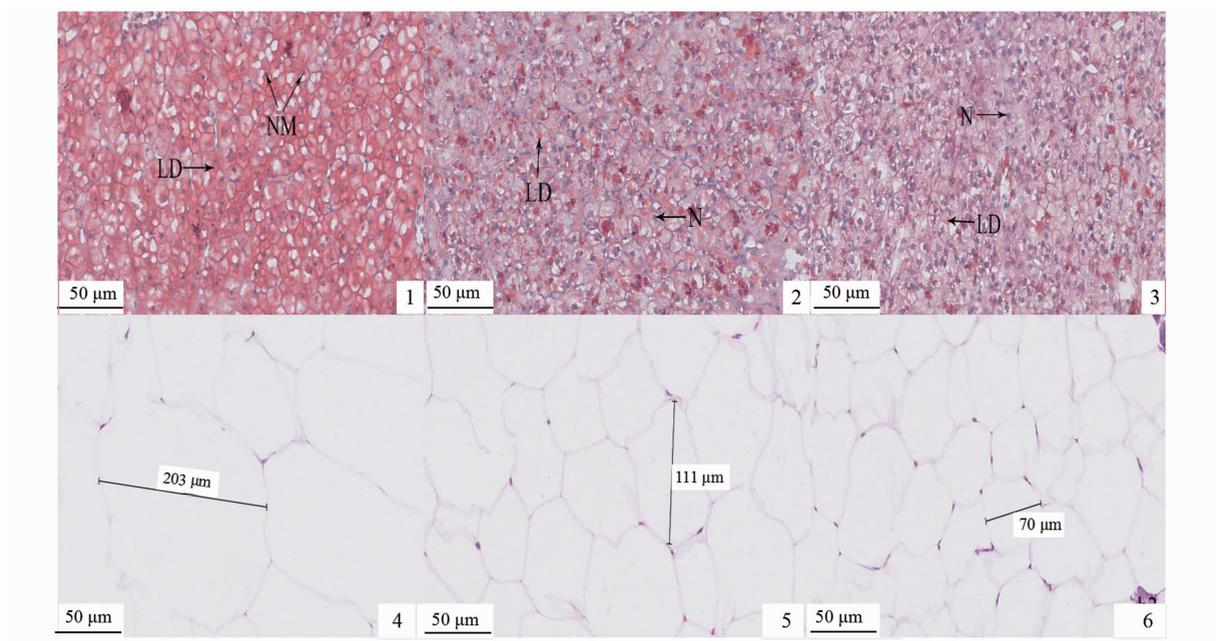
#### 2.4 饲料添加皇竹草粉对草鱼稚鱼肝脏和脂肪的组织学观察

在相同倍数下的肝脏显微结构示意图(图版 I-1~3)中可以看出,采用油红 O 染色脂肪后,与

C 组相比,PSR1 组和 PSR2 组的脂滴数量明显减少,其较小的脂滴(红色)与细胞核(紫色)均匀分布在组织。脂肪组织的显微结构如图版 I-4~6 所示,PSR1 组和 PSR2 组的脂肪细胞直径明显比 C 组小,且相同比例视野内的细胞数目明显增多。

#### 2.5 基因表达定量分析

饲料中添加皇竹草粉对草鱼肝脏组织脂代谢相关基因表达的影响:脂肪生成基因中 *ppary*、*fas*、*scd*、*acc* 和 *dgat* 的 mRNA 水平随着皇竹草粉添加水平的增加呈现显著下降的趋势( $P < 0.05$ ),而脂肪分解基因中 *ppar $\alpha$* 、*hsl*、*atgl*、*cpt-1* 和 *apoe* 的 mRNA 水平则呈现显著升高的趋势( $P < 0.05$ );胆汁酸合成基因中 *fxr* 的 mRNA 水平在饲喂皇竹草粉后显著提高( $P < 0.05$ ),而 *cyp7a1* 的 mRNA 水平则显著降低( $P < 0.05$ )。见图 1。



1, 2, 3 为草鱼肝脏油红 O 染色切片的显微结构图;4, 5, 6 为草鱼脂肪 H.E 染色切片的显微结构图;1 和 4 为对照组;2 和 5 为 10% 皇竹草粉组;3 和 6 为 20% 皇竹草粉组;N. 细胞核;NM. 核偏移;LD. 脂肪滴。

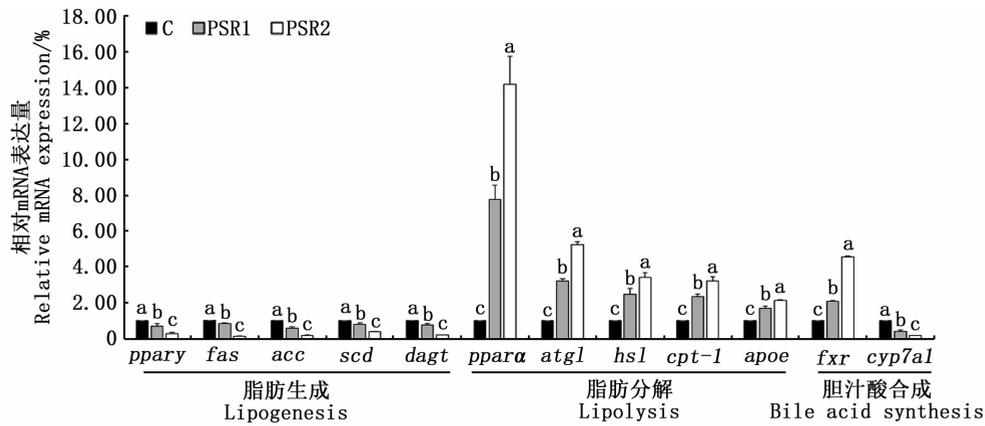
1, 2 and 3 for the microstructures of grass carp liver oil red O stained sections, respectively. 4, 5 and 6 for the microstructures of H.E stained slices of grass carp fat, respectively. 1 and 4 for Control; 2 and 5 for 10% *Pennisetum sinense* Roxb meal group; 3 and 6 for 20% *Pennisetum sinense* Roxb meal group. N. nucleus; NM. nucleus migration; LD. lipid droplet.

图版 I 饲料中皇竹草粉对草鱼肝脏和脂肪组织的影响( $\times 400$ )

Plate I Effects of the dietary *Pennisetum sinense* Roxb meal on the microstructure of liver and adipose tissue in juvenile grass carp ( $\times 400$ )

脂肪组织的脂质代谢的基因表达结果如图 2 所示。与肝脏组织类似,脂肪生成基因中 *ppary*、*fas*、*scd*、*acc* 和 *dgat* 的 mRNA 水平随着皇竹草粉

浓度的增加而增加,且差异显著( $P < 0.05$ )。脂肪分解基因中 *ppar $\alpha$* 、*hsl*、*atgl* 和 *cpt-1* 的 mRNA 水平显著提高( $P < 0.05$ )。

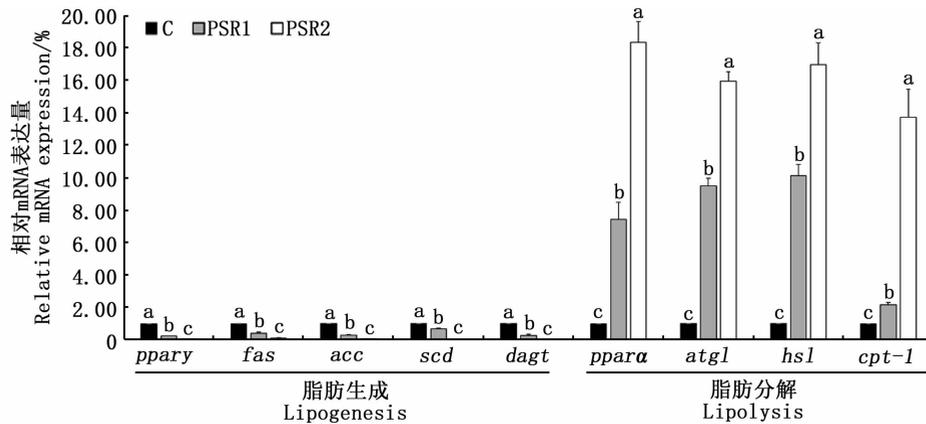


C. 对照组; PSR1. 10% 皇竹草粉组; PSR2. 20% 皇竹草粉组。不同的小写字母表示数据间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

C. control; PSR1. 10% *Pennisetum sinense* Roxb meal group; PSR2. 20% *Pennisetum sinense* Roxb meal group. Different lowercase letters indicate statistically significant differences between the data ( $P < 0.05$ ).

图 1 饲料添加皇竹草粉对草鱼肝脏组织脂代谢基因相对表达量的影响 ( $n = 3$ )

Fig. 1 Effects of diets supplemented with *Pennisetum sinense* Roxb meal on the relative mRNA expression of the liver in grass carp ( $n = 3$ )



C. 对照组; PSR1. 10% 皇竹草粉组; PSR2. 20% 皇竹草粉组。不同的小写字母表示数据间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

C. control; PSR1. 10% *Pennisetum sinense* Roxb meal group; PSR2. 20% *Pennisetum sinense* Roxb meal group. Different lowercase letters indicate statistically significant differences between the data ( $P < 0.05$ ).

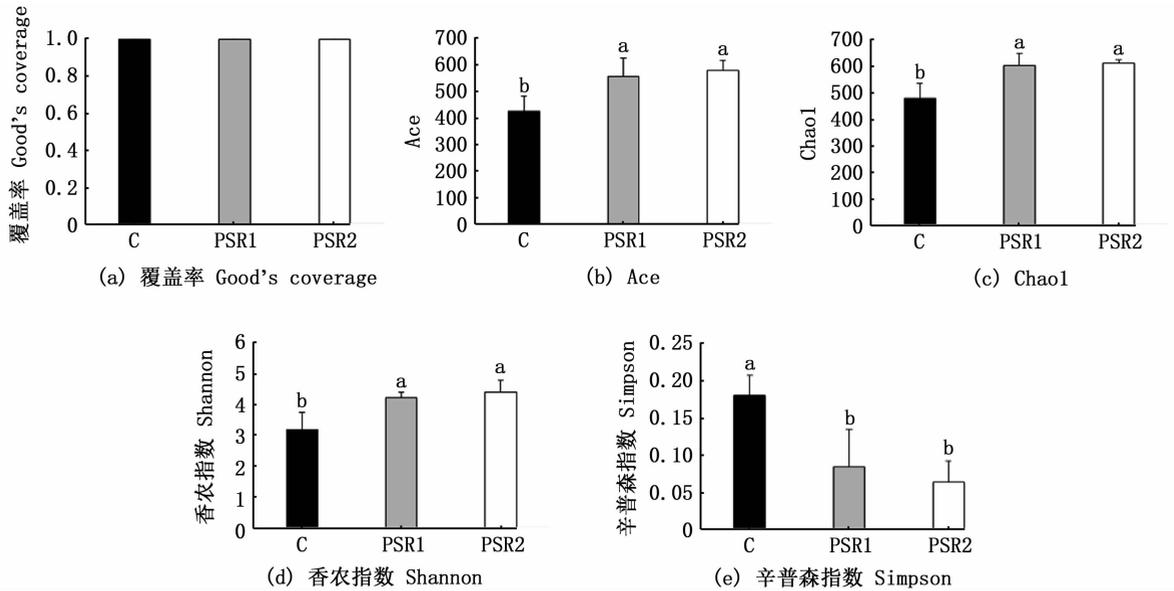
图 2 饲料添加皇竹草粉对草鱼脂肪组织脂代谢基因相对表达量的影响 ( $n = 3$ )

Fig. 2 Effects of diets supplemented with *Pennisetum sinense* Roxb meal on the relative mRNA expression of the adipose tissue in grass carp ( $n = 3$ )

## 2.6 肠道菌群多样性分析

测序共获得 1 884 512 对序列, 鉴定出 715 个 OTU。基于 OTU 系统发育多样性进行样本关系的评估, 结果显示所有样本测序覆盖率 ( $>0.90$ ) 均已达标, 表明样本 OTU 具有代表性。见图 3(a)。

根据 OTU 比例对细菌多样性和丰富度指数进行分析, 以计算每组的细菌多样性。结果显示, PSR1 组和 PSR2 组的 Ace、Chao1 和 Shannon 指数均显著高于 C 组 [ $P < 0.05$ , 见图 3(b) ~ (d)], Simpson 指数显著低于 C 组 [ $P < 0.05$ , 图 3(e)]。



C. 对照组; PSR1. 10% 皇竹草粉组; PSR2. 20% 皇竹草粉组。不同的小写字母表示数据间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

C. control; PSR1. 10% *Pennisetum sinense* Roxb meal group; PSR2. 20% *Pennisetum sinense* Roxb meal group. Different lowercase letters indicate statistically significant differences between the data ( $P < 0.05$ ).

图3 饲料添加皇竹草粉对草鱼肠道细菌的多样性指数的影响

Fig. 3 Effects of diets supplemented with *Pennisetum sinense* Roxb meal on the diversity indices of bacterial community in the gut

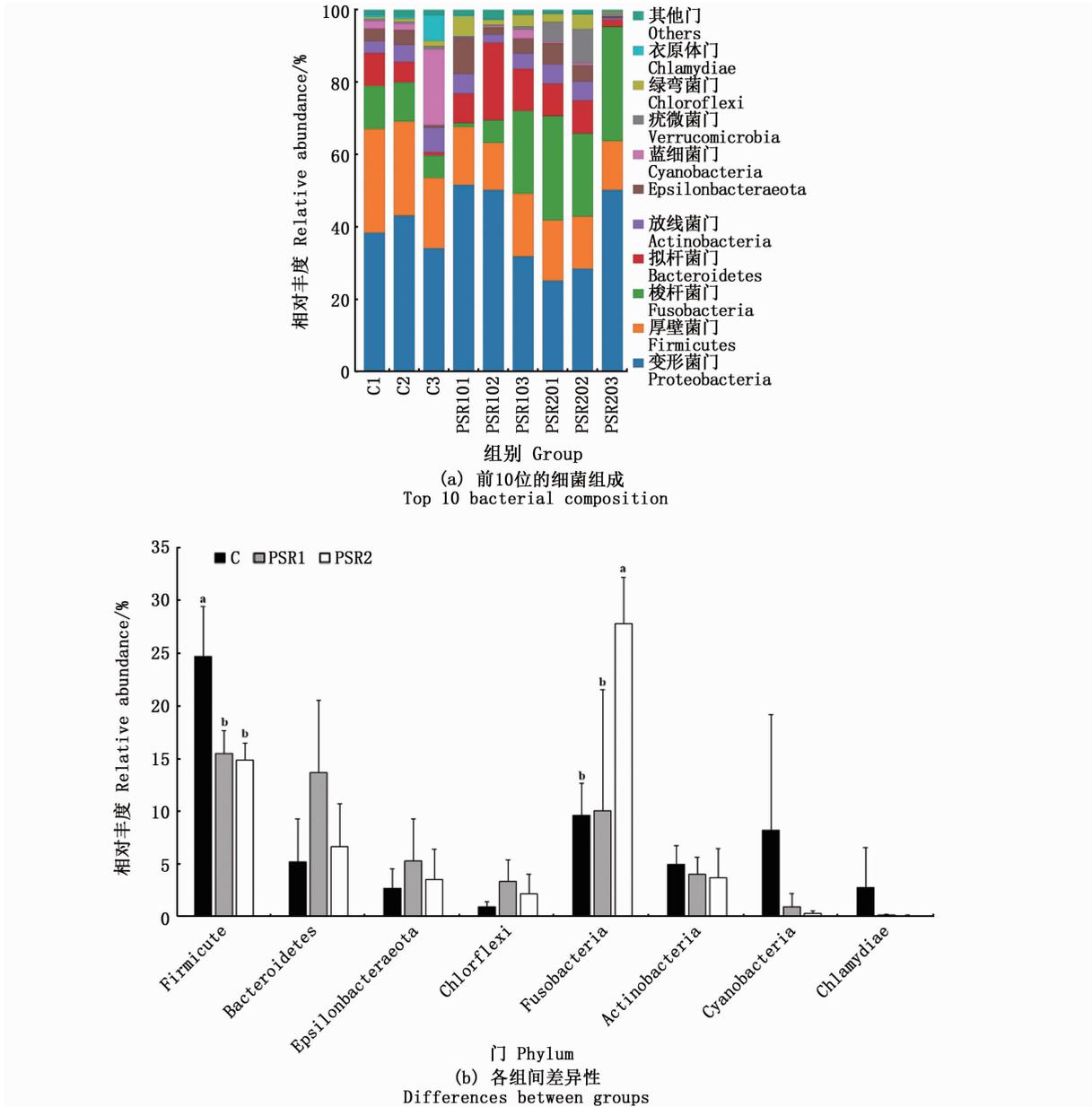
## 2.7 基于门水平肠道菌群分析

基于门水平对样品进行物种注释分析,共获得 20 个菌门。位于前 10 位的细菌组成如图 4(a)所示,其他物种合并为 Others。在所有样品中,变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)的丰度最高,分别为 39.25%、18.36%、15.84% 和 8.52%。各组间在门水平下的差异性如图 4(b)所示,PSR1 组和 PSR2 组中厚壁菌门的丰度显著低于 C 组 ( $P < 0.05$ ),拟杆菌门、Epsilonbacteraeota 和绿弯菌门(Chloroflexi)的丰度高于 C 组但无显著差异 ( $P > 0.05$ ),PSR2 组中梭杆菌门的丰度显著高于 C 组 ( $P < 0.05$ )。PSR1 和 PSR2 组相比于 C 组,放线菌门(Actinobacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、衣原体门(Chlamydiae)的丰度呈下降趋势,但差异都不显著 ( $P > 0.05$ )。

## 2.8 基于属水平肠道菌群分析

基于属水平对样品进行物种注释分析,共获

得 367 个菌属。位于前 10 位的细菌组成如图 5(a)所示,分别是鲸杆菌属(*Cetobacterium*, 16.65%),红杆菌属(*Rhodobacter*, 7.26%)、气单胞菌属(*Aeromonas*, 6.50%)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*, 5.57%)、uncultured\_bacterium\_f\_Muribaculaceae(4.02%)、乳杆菌属(*Lactobacillus*, 3.00%)、弓形杆菌属(*Arcobacter*, 2.83%)、玫瑰单胞菌属(*Roseomonas*, 2.60%)、艾克曼菌属(*Akkermansia*, 2.58%)和根瘤菌属(Uncultured\_Bacterium\_f\_Rhizobiales\_Incertae\_Sedis, 2.11%),其他物种合并为 Others。整体上看,各组中以鲸杆菌属,气单胞菌属为主,其中鲸杆菌属比例最高。各组间差异性如图 5(b)所示,PSR1 组和 PSR2 组中的鲸杆菌属、红杆菌属、艾克曼菌属的丰度高于 C 组,但差异并不显著 ( $P > 0.05$ ),PSR2 组中的根瘤菌属的丰度显著高于 C 组。PSR1 组和 PSR2 组中的乳杆菌属、玫瑰单胞菌属的丰度在数值上低于 C 组 ( $P > 0.05$ ),气单胞菌属的丰度显著低于 C 组 ( $P < 0.05$ )。

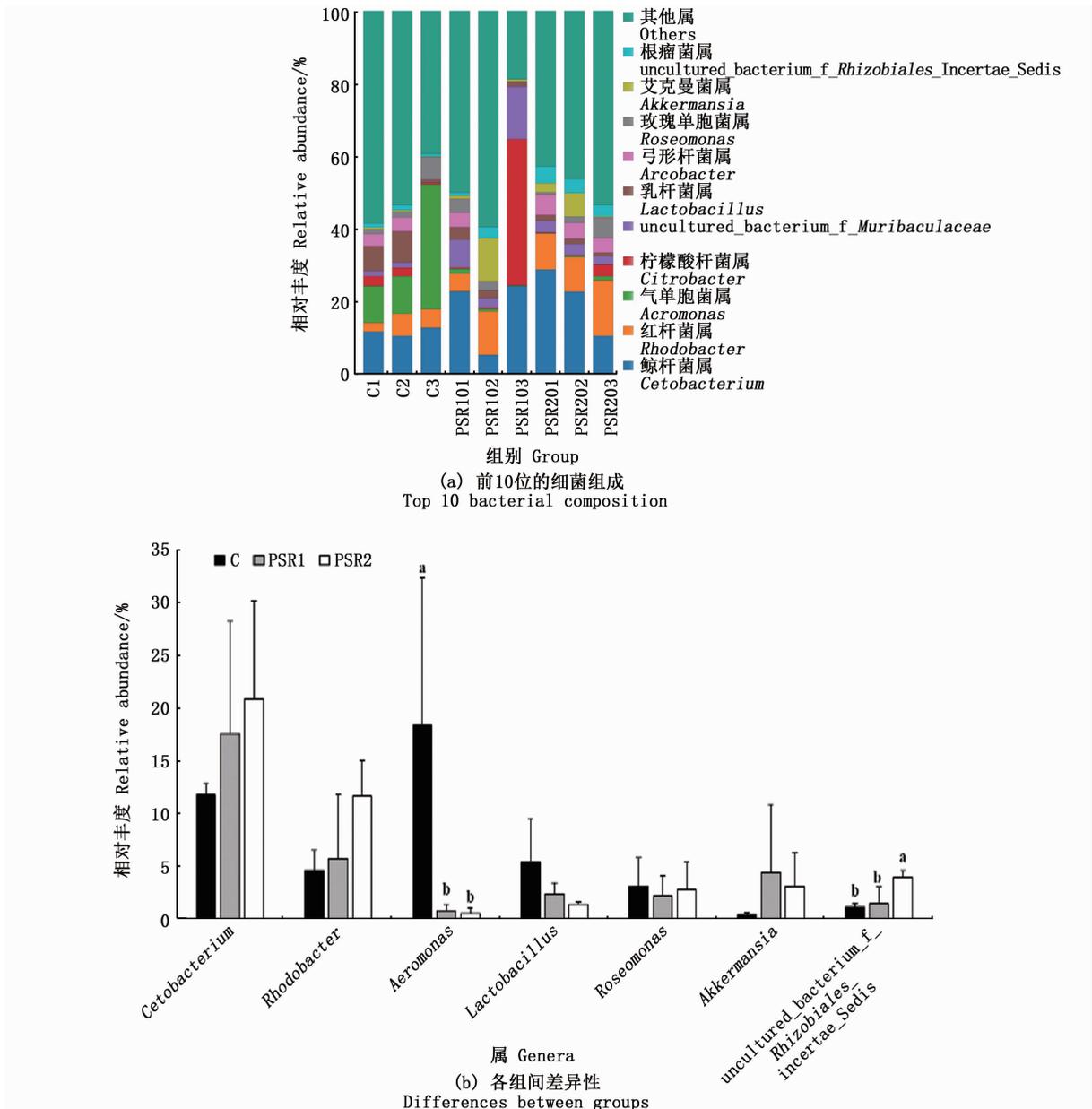


C. 对照组; PSR1. 10% 皇竹草粉组; PSR2. 20% 皇竹草粉组。不同的小写字母表示数据间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

C. control; PSR1. 10% *Pennisetum sinense* Roxb meal group; PSR2. 20% *Pennisetum sinense* Roxb meal group. Different lowercase letters indicate statistically significant differences between the data ( $P < 0.05$ ).

图4 饲料添加皇竹草粉对草鱼肠道菌群在门水平的分布情况

Fig.4 Effects of diets supplemented with *Pennisetum sinense* Roxb meal on the distribution of intestinal microflora at the phylum level in grass carp



C. 对照组; PSR1. 10% 皇竹草粉组; PSR2. 20% 皇竹草粉组。不同的小写字母表示数据间差异显著 ( $P < 0.05$ )。  
C. control; PSR1. 10% *Pennisetum sinense* Roxb meal group; PSR2. 20% *Pennisetum sinense* Roxb meal group. Different lowercase letters indicate statistically significant differences between the data ( $P < 0.05$ ).

图5 饲料添加皇竹草粉对草鱼肠道菌群在属水平的分布情况  
Fig.5 Effects of diets supplemented with *Pennisetum sinense* Roxb meal on the distribution of grass carp intestinal microflora at the genus levels

### 3 讨论

研究发现在等氮等能的基础上,添加 10% 和 20% 皇竹草粉的饲料饲喂草鱼均表现出了脂肪蓄积降低的结果:(1)腹腔脂肪组织系数降低,脂肪细胞直径减小;(2)肝脏内 TG、TC、NEFA 减少,脂滴含量明显降低;(3)血清中 TG、TC、NEFA

显著降低。该结果与单纯饲喂皇竹草降低草鱼体脂蓄积和苜蓿草粉降低黄河鲤的脂肪含量的结果一致<sup>[22,28-29]</sup>。

从分子层面来看,肝脏和腹腔脂肪组织内脂肪生成基因 *ppary*、*fas*、*scd*、*acc* 和 *dgat* 均显著下降,而脂肪分解相关的基因如 *pparα*、*hsl*、*atgl* 和 *cpt-1* 均显著升高,这些结果提示皇竹草粉通过降

低了脂肪自身生成能力,促进了脂肪分解能力,达到脂肪蓄积减少的表观性状。哺乳动物上,*ppar $\alpha$*  以及下游脂肪酸吸收和  $\beta$  氧化基因的表达,以及脂肪自身合成的能力基因的表达,是影响体脂蓄积的重要途径<sup>[30]</sup>。

值得注意的是,本研究发现 *fxr* 基因显著上调,其为一类核受体家族,受到微生物代谢产物的调控,近期有研究指出 FXR 在影响草鱼脂肪蓄积过程中担当负调控的作用<sup>[4]</sup>。为此,皇竹草粉可能通过影响微生物的群落及其代谢产物,进而影响 FXR 信号通路以及脂肪蓄积。

哺乳动物中肠道菌群的丰度及组成越来越被认可为能够影响机体脂肪蓄积及代谢疾病的重要因素<sup>[31-32]</sup>,而食物的组成是能够影响肠道菌群的一个关键因子<sup>[33-34]</sup>。研究<sup>[35]</sup>表明肥胖患者的肠道微生物群落的多样性要低于偏瘦的人群。本研究中,草鱼在摄食皇竹草饲料后  $\alpha$ -多样性指标均显著升高,表明这类饲料增加了草鱼肠道内肠道菌群的丰度和多样性,与脂肪蓄积的结果相关联。肠道菌群具有将初级胆汁酸转化为二级胆汁酸的能力,而不同类型的胆汁酸对于激活 FXR 的活性存在差异<sup>[36]</sup>,从这个角度分析,可能皇竹草粉通过改变肠道菌群,影响了胆汁酸的组分,进而影响脂肪沉积的状况。研究<sup>[37]</sup>发现,小鼠肠道微生物的改变,影响肠道菌群中胆汁酸的变化,进而显著降低小鼠的脂肪蓄积。

本研究的草鱼肠道内主要菌门有变形菌门、厚壁菌门、梭杆菌门和拟杆菌门,与牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[38]</sup>、栉孔扇贝 (*Azumapecten farreri*)<sup>[39]</sup>、海参 (*Stichopus japonicus*)<sup>[40]</sup>、鲫 (*Carassius auratus*)、鳊 (*Aristichthys nobilis*)<sup>[41]</sup>等肠道内的优势菌门及含量相似。研究<sup>[42-43]</sup>发现,肠道菌群的组成与机体糖代谢和脂质代谢密切相关,其中拟杆菌门和厚壁菌门可能是影响机体能量代谢的主要菌门。如肥胖型小鼠肠道中厚壁菌门的比例较正常小鼠高,而拟杆菌门的数量则偏低<sup>[44]</sup>,可能是由于拟杆菌门里脂代谢和糖代谢相关的酶要低于厚壁菌门<sup>[45]</sup>,对于食物内热量吸收的差异导致。也有其他研究发现,肥胖患者在经过 1 年的减肥措施体质量明显下降以后,肠道菌群紊乱现象得到了一定程度的改善,拟杆菌门数量逐渐增加,而厚壁菌门数量下降<sup>[46-47]</sup>。因此,本研究中,摄食

皇竹草粉后,草鱼肠道内厚壁菌门降低,拟杆菌门增加,可能是机体脂肪含量降低的原因之一。从属水平上看,本研究发现摄食皇竹草粉后草鱼肠道菌群内气单胞菌属显著下调。有研究<sup>[48]</sup>指出,气单胞菌属是一类条件致病菌,往往造成草鱼的肠道炎症,本课题组发现肠道的炎症往往和脂肪蓄积呈现正相关关系<sup>[49-50]</sup>,结果表明皇竹草粉可能通过降低气单胞菌属菌群而减缓肠道炎症,进而降低草鱼的脂肪蓄积,但具体机制有待进一步探讨。

## 参考文献:

- [1] 吉红,李杰. 草鱼脂质营养与饲料科学研究进展[J]. 饲料工业, 2010(s1): 50-54.
- [2] JI H, LI J. Research progress in lipid nutrition and feed of Grass carp[J]. Feed Industry, 2010(s1): 50-54.
- [3] BÄCKHED F, DING H, WANG T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(44): 15718-15723.
- [4] SHENG Y, REN H, LIMBU S M, et al. The presence or absence of intestinal microbiota affects lipid deposition and related genes expression in Zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1124.
- [5] TIAN J J, JIN Y Q, YU E M, et al. Farnesoid X receptor is an effective target for modulating lipid accumulation in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* [J]. Aquaculture, 2021, 534: 736248.
- [6] KALLUS S J, BRANDT L J. The intestinal microbiota and obesity[J]. Journal of Clinical Gastroenterology, 2012, 46(1): 16-24.
- [7] SAMUEL B S, SHAITO A, MOTOIKE T, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(43): 16767-16772.
- [8] KIMURA I, OZAWA K, INOUE D, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43 [J]. Nature Communications, 2013, 4: 1829.
- [9] DEN BESTEN G, VAN EUNEN K, GROEN A K, et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism [J]. Journal of Lipid Research, 2013, 54(9): 2325-2340.
- [10] CAO S Y, ZHAO C N, XU X Y, et al. Dietary plants, gut microbiota, and obesity: effects and mechanisms [J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 92: 194-204.
- [11] RIVERA-PIZA A, LEE S J. Effects of dietary fibers and

- prebiotics in adiposity regulation via modulation of gut microbiota [J]. Applied Biological Chemistry, 2020, 63(1): 2.
- [11] LI X F, GUO J, JI K L, et al. Bamboo shoot fiber prevents obesity in mice by modulating the gut microbiota [J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 32953.
- [12] 陈丽婷. 3种优质青饲料对草鱼饲养效果及投喂技术研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.  
CHEN L T. The effects of 3 qualified forage on feeding value and feeding technology in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2013.
- [13] 冯德庆. 南方山区鱼用优质牧草筛选和饲喂草鱼效果研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2009.  
FENG D Q. Screening and Research qualified forage as fish fodder to grass carp in mountainous area of south China [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2009.
- [14] 程辉辉, 谢从新, 李大鹏, 等. 种青养鱼模式下的草鱼肌肉营养成分和品质特性[J]. 水产学报, 2016, 40(7): 1050-1059.  
CHENG H H, XIE C X, LI D P, et al. The study of muscular nutritional components and fish quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) in ecological model of cultivating grass carp with grass [J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(7): 1050-1059.
- [15] 赵慧星. 苏丹草施肥效果及对草鱼生长和品质的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.  
ZHAO H X. Effect of fertilization on the sudangrass and the growth and quality of grass carp [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007.
- [16] 王成章, 何云, 史莹华, 等. 饲料中添加苜蓿草粉对黄河鲤鱼抗氧化性能及脂质代谢的影响[J]. 草业学报, 2008, 17(4): 141-148.  
WANG C Z, HE Y, SHI Y H, et al. Effect of adding alfalfa meal in diet on antioxidant function and lipid metabolism of *Cyprinus carpio-haematopterus* [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2008, 17(4): 141-148.
- [17] 胡喜峰, 王成章, 张春梅, 等. 不同水平苜蓿草粉对团头鲂生长性能及肉品质的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(11): 49-56.  
HU X F, WANG C Z, ZHANG C M, et al. Study on effect of alfalfa meal on growth performance and quality of fish of bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition), 2005, 33(11): 49-56.
- [18] 夏先玖. 优质高产牧草皇竹草综述[J]. 四川草原, 1999(3): 15-17.  
XIA X J. Comprehensive report on hybrid giant Napier [J]. Journal of Sichuan Grassland, 1999(3): 15-17.
- [19] 姜琼, 谢好, 赵友华. 宜春引种皇竹草的营养成分和无机元素的实验测定与评价[J]. 宜春学院学报, 2014, 36(6): 112-114.  
JIANG Q, XIE Y, ZHAO Y H. Experimental determination and evaluation of nutrients and inorganic elements of pennisetum introduced to Yichun [J]. Journal of Yichun University, 2014, 36(6): 112-114.
- [20] 丁翠华. 皇竹草特性及综合开发利用[J]. 现代化农业, 2008(12): 33-34.  
DING C H. Characteristics and comprehensive utilization of *Pennisetum hybridum* [J]. Modernizing Agriculture, 2008(12): 33-34.
- [21] 吴斌, 贺刚, 王庆萍, 等. “皇竹草+草鱼+微流水”模式的关键技术及典型案例[J]. 渔业致富指南, 2018(11): 31-34.  
WU B, HE G, WANG Q P, et al. The key technologies and typical cases of the "Pennisetum sinense Roxb + grass carp + micro-flowing water" model [J]. Fishery Guide to be Rich, 2018(11): 31-34.
- [22] 毛东东, 张凯, 欧红霞, 等. 2种饲料投喂下草鱼肌肉品质的比较分析[J]. 动物营养学报, 2018, 30(6): 2226-2234.  
MAO D D, ZHANG K, OU H X, et al. Comparative analysis on flesh quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed with two kinds of feeds [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(6): 2226-2234.
- [23] 靳雅琦, 郁二蒙, 张凯, 等. 三种饲料对草鱼血清酶活性和肠道组织结构及细菌菌群的影响[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(9): 1652-1663.  
JIN Y Q, YU E M, ZHANG K, et al. Effects of three feeds on serum enzyme activity, intestinal structure and bacterial flora of *Ctenopharyngodon idella* [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(9): 1652-1663.
- [24] LOVELL T. Nutrition and feeding of fish [M]. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989.
- [25] YU E M, ZHANG H F, LI Z F, et al. Proteomic signature of muscle fibre hyperplasia in response to faba bean intake in grass carp [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 45950.
- [26] TIAN J J, FU B, YU E M, et al. Feeding faba beans (*Vicia faba* L.) reduces myocyte metabolic activity in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Frontiers in Physiology, 2020, 11: 391.
- [27] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [28] 毛东东, 张凯, 欧红霞, 等. 投喂皇竹草和配合饲料对草鱼生长及肌肉营养成分的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2018, 33(1): 7-13.  
MAO D D, ZHANG K, OU H X, et al. Effects of hybrid giant napier *Pennisetum sinense roxb* and formulated feed on growth and nutrient compositions in muscle of grass carp *Ctenopharyngodon idella* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2018, 33(1): 7-13.
- [29] 张亮, 郑爱荣, 王彦华. 苜蓿草粉对黄河鲤鱼肌肉营养成分及其肥满度的影响[J]. 现代牧业, 2017, 1(4): 14-17.  
ZHANG L, ZHENG A R, WANG Y H. Effect of alfalfa meal

- on nutritive composition in muscle and relative fatness of *Cyprinus carpio haematopterus* [J]. *Modern Animal Husbandry*, 2017, 1(4): 14-17.
- [30] RIVERA-PIZA A, CHOI L, SEO J, et al. Effects of high-fiber rice *Dodamssal (Oryza sativa L.)* on glucose and lipid metabolism in mice fed a high-fat diet [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(6): e13231.
- [31] TURNBAUGH P J, LEY R E, MAHOWALD M A, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest [J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027-1031.
- [32] CLEMENTE J C, URSELL L K, PARFREY L W, et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view [J]. *Cell*, 2012, 148(6): 1258-1270.
- [33] O'CONNOR E M, O'HERLIHY E A, O'TOOLE P W. Gut microbiota in older subjects: variation, health consequences and dietary intervention prospects [J]. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2014, 73(4): 441-451.
- [34] 董学兴, 吕林兰, 赵卫红, 等. 不同养殖模式下罗氏沼虾肠道菌群结构特征及其与环境因子的关系 [J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(4): 501-510.
- DONG X X, LYU L L, ZHAO W H, et al. Effects of different cultural patterns on microbial communities in the intestine of *Macrobrachium rosenbergii* and interactions with environment factors [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(4): 501-510.
- [35] TURNBAUGH P J, HAMADY M, YATSUNENKO T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins [J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 480-484.
- [36] WAHLSTRÖM A, KOVATCHEVA-DATCHARY P, STÅHLMAN M, et al. Crosstalk between bile acids and gut microbiota and its impact on farnesoid X receptor signalling [J]. *Digestive Diseases*, 2017, 35(3): 246-250.
- [37] 苏含, 张枫琳, 宋敏, 等. 饮水添加氯化钙对高脂日粮饲喂小鼠脂肪沉积和肠道菌群的影响 [J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40(3): 1-5.
- SU H, ZHANG F L, SONG M, et al. Effects of calcium chloride supplementation in drinking water on fat deposition and intestinal flora in mice fed with high-fat diet [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2019, 40(3): 1-5.
- [38] 李存玉, 徐永江, 柳学周, 等. 池塘和工厂化养殖牙鲆肠道菌群结构的比较分析 [J]. *水产学报*, 2015, 39(2): 245-255.
- LI C Y, XU Y J, LIU X Z, et al. Comparative analysis of composition, diversity and origin of intestinal bacterial community in pond - and indoor tank-culture Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(2): 245-255.
- [39] 杨彩霞. 两个养殖海区及栉孔扇贝消化盲囊细菌群落多样性分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- YANG C X. Seasonal changes of bacterial community composition in two culture area and digestive diverticula of scallops, *Chlamys farreri* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011.
- [40] 窦妍, 丁君, 王轶南, 等. 黄、渤海春季刺参肠道及养殖池塘细菌菌群的多样性 [J]. *大连海洋大学学报*, 2014, 29(6): 572-576.
- DOU Y, DING J, WANG Y N, et al. Flora diversity in intestine and culture ponds in sea cucumber *Apostichopus japonicus* in Yellow Sea and Bohai in spring [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2014, 29(6): 572-576.
- [41] 李彤彤. 池塘养殖鱼类共附生细菌群落结构的研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2015.
- LI T T. Study on the community structure of symbiotic bacteria in pond cultured fish [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2015.
- [42] 李竞. 姜黄通过肠道菌群改善机体脂质代谢作用的实验研究 [J]. *新中医*, 2018, 50(11): 15-18.
- LI J. Curcuma has effect on the improvement of lipid metabolism of body through intestinal flora [J]. *Journal of New Chinese Medicine*, 2018, 50(11): 15-18.
- [43] THERIOT C M, KOENIGSKNECHT M J, CARLSON JR P E, et al. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection [J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3114.
- [44] 宋晨. 乳杆菌对高脂膳食诱导小鼠肥胖形成抑制作用及机制研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016.
- SONG C. The inhibition effect and mechanism of *Lactobacillus* on high fat diet-induced obesity in mice [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2016.
- [45] STEPHENS R W, ARHIRE L, COVASA M. Gut microbiota: from microorganisms to metabolic organ influencing obesity [J]. *Obesity*, 2018, 26(5): 801-809.
- [46] LEY R E, TURNBAUGH P J, KLEIN S, et al. Human gut microbes associated with obesity [J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1022-1023.
- [47] TAGLIABUE A, ELLI M. The role of gut microbiota in human obesity: recent findings and future perspectives [J]. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2013, 23(3): 160-168.
- [48] ZHOU L, WEI J F, LIN K T, et al. Intestinal microbial profiling of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) challenged with *Aeromonas hydrophila* [J]. *Aquaculture*, 2020, 524: 735292.
- [49] LI Z F, YU E M, WANG G J, et al. Broad bean (*Vicia faba L.*) induces intestinal inflammation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella* C. et V) by increasing relative abundances of intestinal gram-negative and flagellated bacteria [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1913.
- [50] TIAN J J, JI H, WANG Y F, et al. Lipid accumulation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed faba beans (*Vicia faba L.*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(2): 631-642.

## Effects of *Pennisetum sinense* Roxb meal on fat accumulation and intestinal microbiota composition of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

LI Yuping<sup>1,2</sup>, TIAN Jingjing<sup>1</sup>, ZHANG Kai<sup>1</sup>, XIA Yun<sup>1</sup>, WANG Guangjun<sup>1</sup>, YU Ermeng<sup>1</sup>, LI Zhifei<sup>1</sup>, GONG Wangbao<sup>1</sup>, XIE Jun<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application and Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, Guangdong, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to evaluate the effects of dietary *Pennisetum sinense* Roxb meal on the fat accumulation and intestinal microbiota composition of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), three isonitrogenous and isoenergetic purified diets containing 0% (control group), 10% and 20% *Pennisetum sinense* Roxb meal were designed (protein level 33%, fat level 8%), and fed juveniles grass carp [(28.51 ± 0.04) g] for 8 weeks. Each diet was randomly assigned into triplicate tanks. The results showed that fish fed 10% and 20% *pennisetum sinense* Roxb meal significantly reduced their abdominal fat index. The microstructure of the tissue section showed the hepatic lipid droplets number and the adipocyte size in the *Pennisetum sinense* Roxb meal group were reduced compared with the control group. Serum levels of triglycerides (TG), total cholesterol (TC) and non-esterified fatty acids (NEFA) showed a downward trend with the *Pennisetum sinense* Roxb meal content increasing, and the 20% group had significantly lower values than the control group. The hepatic content of TG, TC, and NEFA were significantly decreased in the *Pennisetum sinense* Roxb meal supplemented groups. Five lipogenic genes including peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (*ppary*) in the liver and abdominal adipose tissue were significantly down-regulated after the fish consuming *Pennisetum sinense* Roxb meal. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (*ppara*) and other three lipid catabolic genes were significantly up-regulated after the fish fed on the *Pennisetum sinense* Roxb meal-supplemented diets. The expression of farnesoid X receptor (*fxr*) gene in the liver was significantly up-regulated in fish feeding *Pennisetum sinense* Roxb meal. The metagenomics results of the intestinal flora showed the Ace, *chao1*, Shannon, and Simpson indexes of the intestinal microbiota of grass carp in the 10% and 20% *Pennisetum sinense* Roxb meal groups were significantly different from those in the control group, indicating dietary *Pennisetum sinense* Roxb meal increased the abundance and diversity of the intestinal flora of grass carp. From the perspective of phylum classification, the proportion of Firmicutes was significantly lowered in the *Pennisetum sinense* Roxb meal groups, whereas the proportion of Bacteroides showed an upward trend, and these two bacteria are reported to be associated with fat accumulation in mammals. The results demonstrate that *Pennisetum sinense* Roxb meal could reduce body fat accumulation, possibly via the improvement of intestinal flora composition in juvenile grass carp.

**Key words:** grass carp; *Pennisetum sinense* Roxb; fat accumulation; intestinal flora