

Liu Z S, Qian X Y, Wei L Y, *et al.* Dietary riboflavin levels on the mitochondrial biogenesis and function of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2025, 49(9): 092512. [刘子上, 钱香钰, 魏路瑶, 等. 不同日粮核黄素水平对日本沼虾线粒体生物合成与功能的影响 [J]. 水生生物学报, 2025, 49(9): 092512.]

不同日粮核黄素水平对日本沼虾线粒体生物合成与功能的影响

刘子上¹ 钱香钰¹ 魏路瑶¹ 刘波² 孙存鑫² 李向飞¹

(1. 南京农业大学动物科技学院, 江苏省水产营养重点实验室, 南京 210095; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

摘要: 为探究日粮中不同含量核黄素对日本沼虾线粒体生物合成及功能的影响, 选用初重为(0.67±0.01) g的日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)作为实验对象, 设置不同核黄素含量的3组半纯合饲料, 其核黄素实际含量分别为3.91、169.61和326.66 mg/kg (分别为缺乏组、适宜剂量组与高剂量组), 在室内循环系统中养殖10周。结果表明: 169.61 mg/kg组的饲料效率、肝胰腺核黄素组Na⁺-K⁺-ATP酶、线粒体复合物Ⅲ活性及细胞色素C含量和细胞色素C氧化酶Ⅱ(*cox-Ⅱ*)基因表达量均显著高于3.91和326.66 mg/kg组($P<0.05$), 其肝胰腺ATP含量及*cox-Ⅰ*和ATP合成酶的基因表达量均显著高于3.91 mg/kg组($P<0.05$), 而与326.66 mg/kg组无显著差异($P>0.05$); 169.61 mg/kg核黄素组日增重系数以及肝胰腺琥珀酸脱氢酶活性显著高于326.66 mg/kg组($P<0.05$), 而与3.91 mg/kg组之间无显著差异($P>0.05$); 此外, 326.66 mg/kg组的柠檬酸合酶活性显著高于另外两组($P<0.05$), 线粒体复合物V活性显著高于3.91 mg/kg组($P<0.05$), 而3.91 mg/kg组的腺苷一磷酸/腺苷三磷酸比值显著高于另外两组($P<0.05$)。由此可得, 当饲料中核黄素含量为169.61 mg/kg时, 能够提高日本沼虾的生长性能和饲料利用率, 改善其线粒体生物合成与功能。

关键词: 核黄素; 线粒体生物合成; 线粒体功能; 日本沼虾

中图分类号: S966.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2025)09-092512-09

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2024.0452 CSTR: 32229.14.SSSWXB.2024.0452



维生素B₂又称核黄素(Riboflavin), 是动物机体代谢调控^[1-3]、生长发育^[4]、抗氧化^[5]及免疫^[6]等生理活动中不可或缺的一种水溶性维生素。在线粒体中, 核黄素作为黄素单核苷酸(FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)的前体物质^[1,2], 对水产动物的代谢调控起到重要的作用: (1)作为电子载体在呼吸链中起到电子传递的桥梁作用^[7]; (2)参与能量代谢, 驱动三磷酸腺苷(ATP)的产生^[3]; (3) FMN和FAD的氧化和还原反应过程参与了三羧酸(TCA)循环^[8]和脂肪酸的 β 氧化过程^[9], 进而调控水产动物的糖脂代谢^[10]。然而, 水产动物自身并不能合成核黄素, 主要通过摄取食物来满足自身需求, 因此明确水产动物对维生素B₂的最适需求量至关重要。目前, 水产

动物适宜核黄素需求量已有部分报道。例如, 根据生长性能、蛋白质效率与肝脏D-氨基酸氧化酶活性等得出斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)幼鱼^[11]、阳光鲈(*Morone chrysops*♀ × *Morone saxatilis*♂)幼鱼^[12]与翠鲢(*Channa punctatus*, Bloch)幼鱼^[13]的最适核黄素需求量为6、4.1—5.0与5.7—6.1 mg/kg。此外, 基于生长性能与组织核黄素沉积量等, 得出斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[14]、南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[15]与日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)^[16]的最适核黄素需求量分别为22.3、40.9与165.25—180.31 mg/kg。然而, 已有研究主要集中在核黄素对水产动物生长性能与饲料利用率等的影响方面, 对代谢机能的考察尚较缺乏。近期

收稿日期: 2024-11-21; 修订日期: 2025-01-02

基金项目: 江苏现代农业(青虾)产业技术体系[JATS(2023)470]; 国家虾蟹产业技术体系(CARS-48)资助 [Supported by the Jiangsu Agriculture Industry Technology System (JATS (2023)470); China Shrimp and Crab Industry Technology System (CARS-48)]

作者简介: 刘子上(1998—), 男, 博士; 主要从事水产动物营养与饲料科学研究。E-mail: 2024205050@stu.njau.edu.cn

通信作者: 李向飞, 主要从事水产动物营养与饲料科学研究。E-mail: xfli@njau.edu.cn

的一项研究表明,饲料中适宜的核黄素水平可上调日本沼虾肝胰腺中糖酵解、脂肪酸 β 氧化和蛋白质合成相关基因表达,进而改善机体代谢机能^[16],但潜在的分子机制尚不明确。

线粒体是动物细胞有氧呼吸的主要场所,其能通过氧化磷酸化将营养物质转化为ATP,为机体的生理和生命活动提供大约90%的能量^[17],在水产动物的能量代谢中起到至关重要的作用。同时,线粒体的生物合成在维持细胞正常功能及促进损伤细胞的功能恢复中扮演着重要角色,线粒体的生物合成及其功能发生障碍会导致许多线粒体疾病^[18],进而危害动物健康。研究发现,B族维生素对线粒体功能具有重要的调控作用^[19–21]。例如,在缺乏核黄素时,小鼠^[19]和北京鸭^[20]发生线粒体功能障碍,而补充核黄素后线粒体功能恢复。此外,添加1.425 mg/kg的苯磷硫胺(维生素B₁类似物)可激活饲料团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)肝胰腺中的腺苷酸活化蛋白激酶/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子1 β /核呼吸因子1 (AMPK/PGC-1 β /NRF-1)轴,并上调线粒体复合物活性和线粒体融合相关基因表达,进而改善鱼体线粒体生物合成与氧化磷酸化功能^[21]。综上所述,B族维生素特别是核黄素在促进动物机体线粒体的生物合成和功能方面具有重要作用。然而,甲壳类动物维生素营养生理功能研究仍较为落后,目前有关核黄素调节甲壳动物线粒体合成和功能的研究尚未见报道。

日本沼虾又叫青虾,因其生长速度快、对环境适应能力强、饲养周期短、营养价值高、味道鲜美等特点,在中国、日本及东南亚等地区被广泛养殖,2023年我国青虾淡水养殖量达到了22.6万吨^[22]。然而,目前青虾维生素营养生理学相关研究相对薄弱,给其优质专用配合饲料研发带来了较大困难^[16]。因此,本实验以日本沼虾作为实验对象,通过检测相关分子指标和酶活性,考察饲料中不同剂量核黄素对其线粒体生物合成及功能的影响。相关结果可为日本沼虾营养需求数据库构建和配合饲料的研发提供基础参数,进而促进相关养殖业的健康、快速发展。

1 材料与方法

1.1 实验设计

本研究采用半纯合日粮,基础日粮中主要糖源为玉米淀粉,主要蛋白源为无维酪蛋白、鱼粉和明胶,主要脂肪源为鱼油和豆油(2:1)。实验原料先经过粉碎机粉碎后,按比例称重混匀,预混料及核黄素(Adamas,上海)等微量成分采用逐级扩大法混

合。再按照相应的配比添加鱼油、豆油和15%左右的水分,所有原料搅拌均匀且无明显结块后,用双螺杆挤条机将饲料制成直径为1.00 mm的长条状,晾干破碎后保存于-20℃冰箱备用。3组日粮中的核黄素添加量分别为0、160与320 mg/kg,使用高效液相色谱法(HPLC)测得其实际含量分别为3.91、169.61和326.66 mg/kg。基于已有研究,日本沼虾最适核黄素需求量为165.25—180.31 mg/kg^[16]。因此,上述3个核黄素水平分别为核黄素缺乏组、适宜剂量组和过量组。饲料配方及其概略养分组成见表1,饲料概略养分测定方法参加AOAC^[23]。

1.2 实验虾与饲养管理

选用“太湖一号”日本沼虾,将其置于室内循环养殖系统中驯化1周。在正式养殖前,随机挑选健康状态良好的600尾虾苗(0.68±0.01) g,随机分为3组(每组设置4个重复,每个重复50尾),在(28±2)℃的室内循环系统中养殖10周。循环系统中养殖桶为圆柱形,容积300 L,水深0.8 m;在养殖期间,桶内放置仿真水草和PVC管提供遮蔽场所,桶上选用透光网盖防止青虾逃脱。每天饱食投喂3次(8:00、12:30和17:00投喂),在每次采食结束后,吸出粪污和残饵,每2天换水1次,每次更换1/3桶,以保证适宜水质。养殖期间,水体溶解氧 ≥ 6 mg/L,氨氮浓度 ≤ 0.02 mg/L, pH保持在7.0—7.2,光照为自然光照。

1.3 样品采集

在养殖结束后,将日本沼虾空腹24 h。每桶随机选取12尾虾采样(每组共采48尾),4尾/管混样。在冰盒上采集虾的肝胰腺放入冻存管,并迅速放入在液氮中,收集的肝胰腺在-80℃冰箱保存备用,以便测定后续指标。

1.4 指标测定

线粒体生物合成相关酶活的测定 参考Chatterjee等^[24]的方法提取肝胰腺中线粒体。首先,精确称取组织100 mg,用预冷的PBS溶液冲洗,使用滤纸将液体吸干。然后,加入体积为所取样本10倍的线粒体分离缓冲溶液,在冰浴条件下,使用玻璃匀浆器对待测组织进行充分研磨。随后,在4℃、1000×g条件下将匀浆液离心5 min。在重复操作两次后,用移液枪垂直吸取出上清液放入离心管,并在4℃、12000×g条件下离心10 min。将得到的线粒体沉淀物倒入缓冲溶液进行两次洗涤,再加入线粒体保存液,使其重新悬浮,并储存于-80℃冰箱备用。

取用日本沼虾线粒体,采用Fischer等^[25]描述的方法检测琥珀酸脱氢酶(SDH)活性;根据Srere等^[26]介绍的方法检测柠檬酸合酶(CS)活性;参考Tsakiris和Delicostantinos^[27]的方法对Na⁺-K⁺-ATP酶的活

性进行测定; 通过Lu等^[28]描述的方法检测细胞色素C (CYT-C)含量; 采用ELISA法测定肝胰腺ATP含量(索莱宝, 北京)及腺嘌呤核苷一磷酸(AMP)含量(索莱宝, 北京): 向已经事先包被了ATP抗体、AMP抗体的各个微孔中, 按照一定顺序依次加进样品、标准品和酶标指示剂。随后, 将其进行温育并且充分洗涤后, 再往孔中加入显色剂显色。最后加入终止液结束反应, 将酶标仪的波长设置为450 nm, 检测出待测各个样品的OD值, 最后计算出ATP与AMP含量^[29]。

线粒体功能相关酶活及基因表达量的测定

参照Jeejeebhoy等^[31]介绍的方法测定线粒体复合物 I、II 和 III 的活性, 参考Kirby等^[32]描述的方法测定线粒体复合物IV和V的活性。

采用TRIzol法提取肝胰腺中的总RNA, 并使RNA浓度保持统一(500 ng/mL)。然后, 将RNA反转录成稳定的cDNA以利于保存。在GenBank数据库中查找序列, 设计所需基因及内参 β -actin的引物序列, 并交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成, 相关引物序列详见表2。研究表明, β -actin在虾类各组织中的表达量较为稳定, 故选用其作为内参基因^[33]。

采用Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒(艾科瑞, 湖南), 进行荧光实时定量PCR。在96孔板中加入cDNA模板2 μ L, 正、反引物各0.4 μ L, 双蒸水7.2 μ L, SYBR[®] premix Ex Taq[™] (艾科瑞, 湖南)10 μ L, 即反应总体积为20 μ L。设定程序: 95℃

表 1 日粮配方及其概略养分含量

Tab. 1 Formulation and proximate composition of the experimental diets

原料Ingredient	核黄素添加水平Supplemented riboflavin level (mg/kg)		
	0	160	320
无维酪蛋白Vitamin-free casein ¹	24	24	24
鱼粉Fish meal ²	22	22	22
明胶Gelatin ¹	6	6	6
鱼油Fish oil ²	4	4	4
豆油Soybean oil ²	2	2	2
玉米淀粉Corn starch ²	25	25	25
羧甲基纤维Carboxymethyl cellulose	3.15	3.15	3.15
磷酸二氢钙Monocalcium phosphate	2	2	2
胆固醇Cholesterol	0.3	0.3	0.3
微晶纤维Microcrystalline cellulose	9.54	9.54	9.54
复合预混料Compound-premix ³	1	1	1
卵磷脂Lecithin	0.5	0.5	0.5
诱食剂Attractant	0.01	0.01	0.01
乙氧基喹啉Ethoxyquin	0.5	0.5	0.5
核黄素Riboflavin (mg/kg)	0	160	320
营养成分含量(风干基础) Proximate composition (air-dry basis)			
粗蛋白Crude protein (%)	38.74	39.17	39.39
粗灰分Crude ash (%)	7.49	7.08	7.41
粗脂肪Crude lipid	8.29	8.15	8.34
总能Gross energy (MJ/kg)	20.19	20.59	20.68
水分Moisture (%)	6.55	6.71	6.99
核黄素Riboflavin (mg/kg)	3.91	169.61	326.66

注: ¹无维酪蛋白和明胶均购自山东齐鲁生物科技集团, 前者是乳制品加工过程中的副产物, 后者由动物加工过程中的下脚料提炼而成; ²鱼粉、玉米淀粉和鱼油均购自江苏海普瑞饲料有限公司, 鱼粉为全脂鱼粉, 玉米淀粉为纯淀粉; ³每千克预混料中包含下列矿物质(g/kg)和维生素(IU或mg/kg), CuSO₄·5H₂O 2 g, FeSO₄·7H₂O 25 g, ZnSO₄·7H₂O 22 g, MnSO₄·4H₂O 7 g, Na₂SeO₃ 0.04 g, KI 0.026 g, CoCl₂·6H₂O 0.1 g, VK₃ 220 mg, 吡哆醇 500 mg, 钴胺素 1.6 mg, 维生素C 10000 mg, 泛酸 1000 mg, 硫胺素 320 mg, 维生素B₉ 165 mg, 胆碱 60000 mg, VA 900000 IU, 维生素H 100 mg, VD 200000 IU, 肌醇 15000 mg, VE 4500 mg, VB₅ 2000 mg

Note: ¹Vitamin-free casein and gelatin are both purchased from Shandong Qilu Biotechnology Group; vitamin-free casein is derived from the milk processing process, while gelatin is manufactured from animal byproducts; ²Fish meal, corn starch, and fish oil are all purchased from Jiangsu Haipurui Feed Co., Ltd., fish meal is the full fat one, while corn starch is 100% pure. ³Premix supplied the following minerals (g/kg) and vitamins (IU or mg/kg), CuSO₄·5H₂O 2 g, FeSO₄·7H₂O 25 g, ZnSO₄·7H₂O 22 g, MnSO₄·4H₂O 7 g, Na₂SeO₃ 0.04 g, KI 0.026 g, CoCl₂·6H₂O 0.1 g, VK₃ 220 mg, pyridoxine 500 mg, cobalamin 1.6 mg, VC 10000 mg, pantothenate 1000 mg, thiamine 320 mg, VB₉ 165 mg, choline 60000 mg, VA 900000 IU, VH 100 mg, VD 200000 IU, myoinositol 15000 mg; VE 4500 mg, VB₅ 2000 mg

表 2 荧光定量PCR引物序列

Tab. 2 Nucleotide sequences of the primers used by Real-time PCR

目的基因 Target gene	引物序列 Primer sequence (5'—3')	序列号或参考文献 Accession number or reference
<i>cyt-b</i>	TCGCGTATGCGATTCTAC GG TCGGGCACCAATTCATGT CA	NC015073.1
<i>cox- I</i>	GCGATCACCAGGAATGA CCA CTCCGGCTGGGTCAAAGA AT	NC015073.1
<i>ampk-α1</i>	TCACAGGGACAAAGGTA GCG TCTGCGAGCTTCCGATTC TT	[30]
<i>cox- II</i>	TCGAGCCTTAATCAGAGC GG CCCTGGAAGTGCCTCTAC TT	NC015073.1
<i>atp-6</i>	GGAAACACTGGCCCTAGC C ATAGTGTCTGAGAGCGG CAA	NC015073.1
<i>β-actin</i>	GTGCCCCTCTACGAGGGT TA CGTCAGGGAGCTCGTAAG AC	FL589653.1

注: *cyt-b*, 细胞色素 C; *cox- I*, 细胞色素C氧化酶 I; *ampk- α 1*, 腺苷酸活化蛋白激酶 α 1; *cox- II*, 细胞色素C氧化酶 II; *atp-6*, ATP合成酶

Note: *cyt-b*, Cytochrome-B; *cox- I*, Cytochrome C oxidase-I; *ampk- α 1*, AMP-activated protein kinase α 1; *cox- II*, Cytochrome C oxidase- II; *atp-6*, ATP synthase-6

预变性30s; 随后进行40次循环: 95℃ 5s, 60℃ 30s; 溶解曲线: 95℃ 15s, 60℃ 1min, 95℃ 15s。样品扩增完成后, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法, 对目的基因的表达量进行计算, 最终得出相对表达量。

1.5 生长性能及饲料利用率计算公式

死亡率(Mortality, %)= $N_D/N_0 \times 100$

日增重系数(Average daily gain, ADG)=($W_F - W_0$)/ T

饲料效率(Feed efficiency, FE, %)=($W_F - W_0$)/ $F \times 100$

式中, N_D 为实验结束时虾死亡尾数, N_0 为实验开始时虾尾数; W_F 为实验结束时虾总重, W_0 为实验开始时虾总重, T 为养殖天数; F 为总采食量。

1.6 数据分析

采用SPSS 26.0软件中的单因素方差分析功能对实验数据进行分析, 并使用Turkey's法进行多重对比, 结果以(平均值 $\pm$ 标准误)表示。

2 结果

2.1 日粮中不同核黄素水平对日本沼虾生长性能及饲料利用率的影响

如表 3所示, 169.61 mg/kg核黄素组的死亡率

显著高于3.91 mg/kg组($P < 0.05$), 与326.66 mg/kg组间无显著差异($P > 0.05$); 169.61 mg/kg核黄素组ADG显著高于326.66 mg/kg组($P < 0.05$), 而与3.91 mg/kg组之间无显著差异($P > 0.05$); 此外, 169.61 mg/kg核黄素组FE显著高于另外两组($P < 0.05$)。

2.2 日粮中不同核黄素水平对日本沼虾肝胰腺线粒体生物合成相关指标的影响

3.91 mg/kg核黄素组的肝胰腺ATP含量显著低于其他两组($P < 0.05$), 而腺苷一磷酸(AMP)与ATP比值(AMP/ATP)则与此相反($P < 0.05$; 图 1)。此外, 169.61和326.66 mg/kg核黄素组之间肝胰腺ATP含量与AMP/ATP比值及3组间的AMP含量和*ampk-a*基因表达量均无显著差异($P > 0.05$)。

2.3 日粮中不同核黄素水平对日本沼虾肝胰腺线粒体相关酶活性的影响

如图 2所示, 169.61 mg/kg核黄素组的肝胰腺SDH活性显著高于326.66 mg/kg组($P < 0.05$), 但与3.91 mg/kg组之间无显著差异($P > 0.05$); 169.61 mg/kg组的肝胰腺 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性和CYT-C含量均显著高于其他两组($P < 0.05$), 而326 mg/kg组CS活性显著高于其他两组($P < 0.05$)。

2.4 日粮中不同核黄素水平对日本沼虾肝胰腺线粒体复合物活性的影响

如图 3所示, 169.61 mg/kg核黄素组的肝胰腺线粒体复合物Ⅲ的酶活性显著高于其他两组($P < 0.05$); 169.61 mg/kg组的肝胰腺线粒体复合物Ⅰ、Ⅱ和Ⅳ活性高于另外两组, 但差异不显著($P > 0.05$)。然而, 326.66 mg/kg组肝胰腺线粒体复合物Ⅴ活性显著高于3.91 mg/kg组($P < 0.05$), 但与169.61 mg/kg组之间无显著差异($P > 0.05$)。

2.5 日粮中不同核黄素水平对日本沼虾肝胰腺线粒体功能相关基因表达的影响

如图 4所示, 169.61 mg/kg核黄素组的肝胰腺*cox- I*和*atp-6*基因表达均显著高于3.91 mg/kg组($P < 0.05$), 但与326.66 mg/kg组之间无显著差异($P > 0.05$),

表 3 日粮核黄素水平对日本沼虾生长性能及饲料利用率的影响
Tab. 3 Effects of dietary riboflavin levels on growth performance and feed utilization of *Macrobrachium nipponense*

饲料核黄素水平 Dietary riboflavin level(mg/kg)	死亡率 Mortality (%)	日增重系数 ADG	饲料效率 FE (%)
3.91	59.50 $\pm$ 1.89 ^b	0.50 $\pm$ 0.01 ^{ab}	30.32 $\pm$ 0.37 ^b
169.61	66.00 $\pm$ 1.15 ^a	0.55 $\pm$ 0.01 ^a	37.91 $\pm$ 0.42 ^a
326.66	62.00 $\pm$ 1.41 ^{ab}	0.48 $\pm$ 0.02 ^b	30.58 $\pm$ 0.68 ^b

注: 同列数据不同上标字母表明各组间存在显著差异($P < 0.05$)

Note: Different superscript letters indicat significant differences in groups ($P < 0.05$)

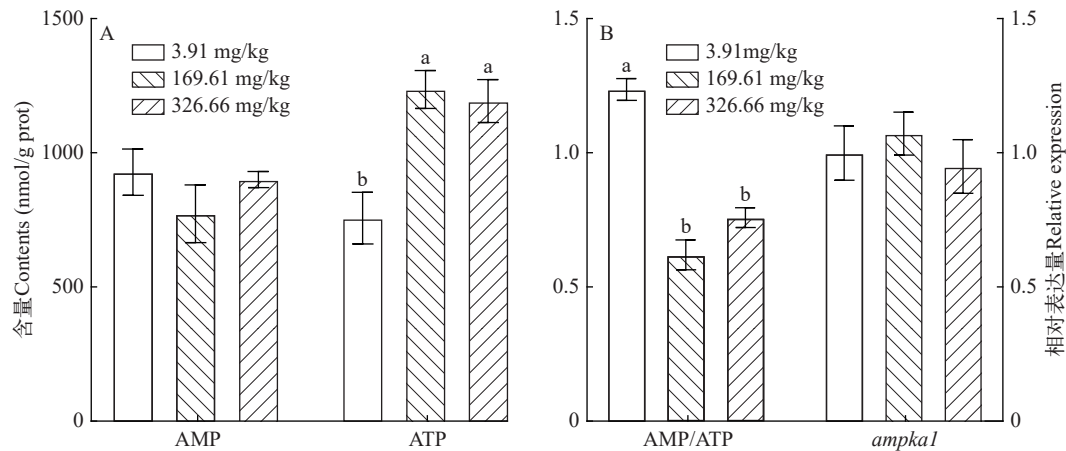


图1 日粮中不同核黄素剂量对日本沼虾肝胰腺AMP与ATP含量、AMP/ATP比值及 $ampk-\alpha 1$ mRNA表达量的影响

Fig. 1 Effects of different dietary riboflavin levels on the AMP and ATP contents, the AMP/ATP ratio, and the transcription of $ampk-\alpha 1$ in the hepatopancreas of *Macrobrachium nipponense*

AMP, 腺苷一磷酸; ATP, 腺苷三磷酸; $ampk-\alpha 1$, AMP依赖的蛋白激酶 $\alpha 1$; 图中不同小写字母代表各组之间差异显著($P < 0.05$); 下同

Different lowercase letters in the graphs represent significant differences among groups ($P < 0.05$); the same applies below

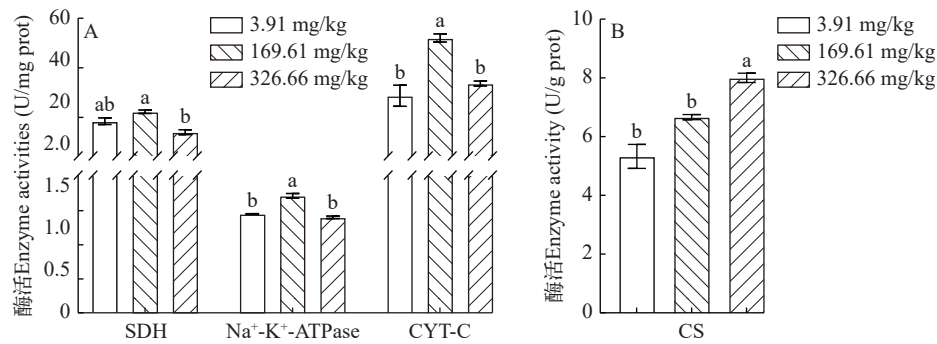


图2 日粮中不同核黄素剂量对日本沼虾肝胰腺线粒体功能相关指标的影响

Fig. 2 Effects of different dietary riboflavin levels on the mitochondrial function-related indexes in the hepatopancreas of *Macrobrachium nipponense*

SDH; 琥珀酸脱氢酶; CS; 柠檬酸合酶; Na⁺-K⁺-ATPase; 钠钾ATP酶; CYT-C; 细胞色素C

而其 $cox- II$ 基因表达显著高于另外两组($P < 0.05$)。此外, 各组间肝胰腺 $cyt-b$ 基因表达无显著差异($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 日粮中不同核黄素水平对日本沼虾生长性能及饲料利用率的影响

本研究中, 日本沼虾的死亡率较高且生长率偏低。究其原因在于: (1)养殖实验是在室内循环水族箱中进行的, 其水体环境和条件均与日本沼虾的自然生长环境存在较大差别; (2)日本沼虾的放养密度偏高, 导致其出现了应激反应与同类相残等现象^[16]; (3)在养殖过程中, 采用半纯合饲料作为实验日粮, 其诱食性和利用率均相对较低。已有研究表明, 室内循环水养殖条件下, 日本沼虾的存活率介于20%—50%^[34, 35], 与本实验中的死亡率数据相吻合。此外, 3组间的死亡率差距相对较低(仅为6.5%), 对生长性能和线粒体生物合成与功能的影响较为有限。然

而, 尚需进一步研究以论证上述推测。在本研究中, 169.61 mg/kg核黄素组的ADG和FE相较于其他两组最高, 表明日粮中适宜的核黄素水平能提高日本沼虾的生长性能和饲料利用率。究其原因, 可能是因为核黄素在机体内以FAD和FMN的形式参与多种的代谢过程, 进而改善了动物的生长发育及代谢机能^[4]。然而, 过量的核黄素却抑制了青虾的生长性能和饲料利用率, 究其原因, 过量核黄素会干扰水产动物的正常代谢, 影响其他维生素和营养物质的吸收与利用, 导致代谢紊乱, 进而抑制生长^[11, 15]。

3.2 日粮中不同核黄素水平对日本沼虾肝胰腺线粒体生物合成相关指标的影响

在本研究中, 3.91 mg/kg核黄素组的肝胰腺ATP含量显著低于169.61和326.66 mg/kg核黄素组, 表明日粮中长期缺乏核黄素会使细胞内能量供应不足。研究表明, ATP作为细胞内的能量货币, 参与细胞能量代谢、合成代谢及信号传递等生物过程^[36]。

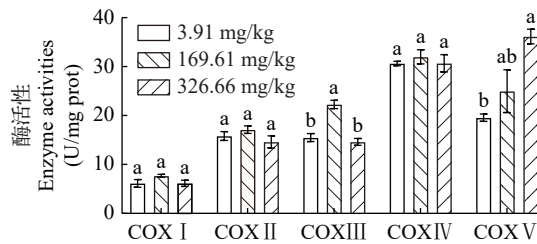


图3 日粮中不同核黄素剂量对日本沼虾肝胰腺线粒体复合物酶活性的影响

Fig. 3 Effects of different dietary riboflavin levels on the mitochondrial complex enzyme activities in the hepatopancreas of *Macrobrachium nipponense*

COX I / II / III / IV / V, 线粒体复合物 I / II / III / IV / V

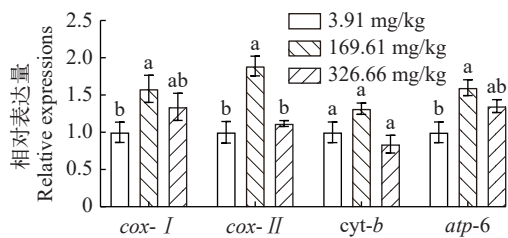


图4 日粮中不同核黄素剂量对日本沼虾肝胰腺线粒体功能相关mRNA表达量的影响

Fig. 4 Effects of different dietary riboflavin levels on the mRNA expressions of mitochondrial function related-genes in the hepatopancreas of *Macrobrachium nipponense*

cox- I / II, 线粒体复合物 I / II; cyt-b, 细胞色素b; atp-6, ATP合成酶。

核黄素的活性形式FAD是线粒体呼吸链中重要的递电子体之一,参与线粒体氧化磷酸化过程,进而促进ATP产生^[37]。日粮中缺乏核黄素时,会导致FAD不足进而降低ATP的合成^[38]。此外,3.91 mg/kg核黄素组肝胰腺AMP/ATP比值显著高于另外两组,表明日粮中缺乏核黄素时会影响细胞的能量感知功能。研究表明,细胞内能量缺乏时,AMP水平会上升,AMP/ATP比值升高,进而激活AMPK并通过AMPK-PGC1-NRF1轴促进线粒体生物合成^[39,40]。然而本研究中各组间AMP含量及ampk-a基因表达均无显著差异。究其原因在于,3.91 mg/kg核黄素组的ATP含量显著低于另外两组,而AMP含量3组间并无显著差异,进而导致其AMP/ATP比值升高。此外,AMPK主要在磷酸化修饰后发挥活性^[21]。由于无合适抗体,本研究仅考察了其转录水平,后续条件成熟时需要在蛋白水平对相关结果进行进一步验证。

3.3 日粮中不同核黄素水平对日本沼虾肝胰腺线粒体相关酶活性的影响

在本研究中,169.61 mg/kg核黄素组的肝胰腺

SDH与 Na^+/K^+ -ATP酶活性及CYT-C含量均高于其他两组,表明日粮中适宜核黄素水平能增强日本沼虾的线粒体功能。研究表明,SDH与 Na^+/K^+ -ATP酶活性以及CYT-C含量是衡量线粒体健康状况和功能效率的重要指标:(1)SDH作为TCA循环的关键酶直接影响ATP的产生效率^[41];(2) Na^+/K^+ -ATP酶可以利用ATP来维持细胞内环境的电解质平衡,使线粒体处于适宜的离子环境,从而发挥正常功能^[42];(3)CYT-C是线粒体电子传递链的重要组成部分,其含量可以反映线粒体进行氧化磷酸化的能力^[43]。此外,FAD是TCA循环中SDH的辅因子,作为FAD的前体物质,核黄素含量不足时会使线粒体缺少FAD而影响SDH的活性及ATP的产生,进而影响 Na^+/K^+ -ATP酶活性^[42-44]。过量核黄素(326.66 mg/kg)会与其他辅因子竞争而影响上述酶的活性,引起肝脏代谢负担,进而间接影响线粒体功能^[45]。然而,在本研究中,326.66 mg/kg核黄素组CS活性显著高于另外两组。究其原因在于,随着核黄素添加量的升高,细胞内FAD含量升高,加快了丙酮酸氧化脱羧产生乙酰CoA的速度,从而使进入TCA循环的乙酰CoA数量增多,进而使CS活性增强^[46,47]。在小鼠中的研究表明,与适宜维生素B₁剂量组相比,缺乏组的CS活性显著下降^[46],表明B族维生素的含量对CS活性有显著影响。

3.4 日粮中不同核黄素水平对日本沼虾肝胰腺线粒体复合物活性的影响

研究表明,线粒体复合物在细胞能量代谢中起到关键作用^[21]。在本研究中,169.61 mg/kg核黄素组的线粒体复合物III活性显著高于另外两组,且其线粒体复合物I、II和IV活性同样最高(差异不显著),表明日粮中适宜的核黄素水平能增强日本沼虾的线粒体功能。这一结果与Grad等^[48]在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)上的研究结果相似。究其原因在于,核黄素可以改善线虫NUO-1[还原型辅酶I:泛醌氧化还原酶核心亚基V1(NDU FV1)线虫直系同源物]蛋白稳态,从而提高了线粒体复合物的活性。然而,日本沼虾上是否存在类似机制尚待进一步考证。

3.5 日粮中不同核黄素水平对日本沼虾肝胰腺线粒体功能相关基因表达的影响

为了进一步探究日粮中核黄素水平对日本沼虾线粒体功能的影响,本研究进一步考察了线粒体功能相关基因的表达。结果显示,169.61 mg/kg核黄素组的cox-I、cox-II、cyt-b及atp6基因表达水平均高于另外两组,表明日粮中适宜核黄素含量能促进日本沼虾线粒体功能相关基因的表达。研究

表明, *cox-I* 和 *cox-II* 编码的 COX-I 和 II 蛋白一起构成了细胞线粒体细胞色素 C 氧化酶复合体, 进而参与 ATP 的产生, 并调控细胞的能量代谢^[49]; 而 *cyt-b* 编码的 Cyt-b 蛋白是呼吸链复合物 III 的组成部分, 能够在呼吸链中传递电子推动 ATP 的合成^[50]。本研究表明, 适宜核黄素水平能够提高线粒体复合物 III 活性, 可能与 *cyt-b* 的基因表达量上调有关。此外, *atp-6* 编码的 ATP-6 蛋白是 ATP 合酶的 1 个亚基, 同样具有驱动 ATP 合成的作用^[21]。已有研究表明, 饲料中补充维生素 B₁ 脂溶性衍生物——苯磷硫胺能够通过上调 *cyt-b*、*cox-2* 和 *atp-6* 的基因表达改善团头鲂肝脏线粒体功能^[21], 这与本研究的结果一致。究其原因在于, 当线粒体中的 FMN 和 FAD 水平升高时, 细胞能量代谢增强, 间接上调了与线粒体功能相关基因的表达, 进而促进了 ATP 的产生。但随着日粮中核黄素水平的进一步升高 (326.66 mg/kg), 日本沼虾肝胰腺线粒体功能并未进一步增强。究其原因在于, 核黄素转化为 FAD 和 FMN 的生物反应存在饱和作用, 当动物体内的核黄素水平能满足生理需求时, 额外补充核黄素并不会进一步提高线粒体功能^[37, 51]。

综上所述, 饲料中添加 169.61 mg/kg 的核黄素能够提高日本沼虾的日增重系数和饲料效率, 增强肝胰腺中 SDH、Na⁺-K⁺-ATP 与线粒体复合物酶活性及 CYT-C 含量, 并上调 *cox-I*、*cox-II*、*cyt-b* 及 *atp-6* 等的基因表达, 进而改善线粒体生物合成和氧化磷酸化功能。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Poulsen N A, Rybicka I, Larsen L B, *et al.* Short communication: Genetic variation of riboflavin content in bovine milk [J]. *Journal of Dairy Science*, 2015, **98**(5): 3496-3501.
- [2] Pan F, Chen Y, He J Z, *et al.* Dietary riboflavin deficiency promotes N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats by inducing chronic inflammation [J]. *American Journal of Cancer Research*, 2019, **9**(11): 2469-2481.
- [3] Pallotta M L. Evidence for the presence of a FAD pyrophosphatase and a FMN phosphohydrolase in yeast mitochondria: a possible role in flavin homeostasis [J]. *Yeast*, 2011, **28**(10): 693-705.
- [4] Sharifzade S A, Khara H, Ghobadi S. Effects of vitamin E and riboflavin (B2) and their combination on growth and survival of common carp, *Cyprinus carpio* fingerlings [J]. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 2014, **10**(1): 63-68.
- [5] Huang J, Tian L, Wu X, *et al.* Effects of dietary riboflavin levels on antioxidant defense of the juvenile grouper *Epinephelus coioides* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2010, **36**(1): 55-62.
- [6] Kumar N. Dietary riboflavin enhances immunity and antioxidative status against arsenic and high temperature in *Pangasianodon hypophthalmus* [J]. *Aquaculture*, 2021 (533): 736209.
- [7] Liu J, Ames B N. Reducing mitochondrial decay with mitochondrial nutrients to delay and treat cognitive dysfunction, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease [J]. *Nutritional Neuroscience*, 2005, **8**(2): 67-89.
- [8] Robinson K M, Lemire B D. Covalent attachment of FAD to the yeast succinate dehydrogenase flavoprotein requires import into mitochondria, presequence removal, and folding [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**(8): 4055-4060.
- [9] Sakurai T, Miyazawa S, Furuta S, *et al.* Riboflavin deficiency and β -oxidation systems in rat liver [J]. *Lipids*, 1982, **17**(9): 598-604.
- [10] Liang Y D. Effect of vitamin B2 deficiency on reproductive performance of female mice [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2020. [梁耀娣. 维生素 B2 缺乏对雌性小鼠繁殖性能的影响 [D]. 广州: 华南农业大学, 2020.]
- [11] Serrini G, Zhang Z, Wilson R P. Dietary riboflavin requirement of fingerling channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Aquaculture*, 1996, **139**(3/4): 285-290.
- [12] Deng D F, Wilson R P. Dietary riboflavin requirement of juvenile sunshine bass (*Morone chrysops* ♀ × *Morone saxatilis* ♂) [J]. *Aquaculture*, 2003, **218**(1/2/3/4): 695-701.
- [13] Zehra S, Khan M A. Dietary riboflavin requirement of fingerling *Channa punctatus* (Bloch) based on growth, conversion efficiencies, protein retention, liver riboflavin storage, RNA/DNA ratio and carcass composition [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2018, **24**(1): 269-276.
- [14] Chen H Y, Hwang G. Estimation of the dietary riboflavin required to maximize tissue riboflavin concentration in juvenile shrimp (*Penaeus monodon*) 1 [J]. *The Journal of Nutrition*, 1992, **122**(12): 2474-2478.
- [15] Sanjeewani K, Lee K J. Dietary riboflavin requirement of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2023(2023): 6685592.
- [16] Qian X Y, Li X F, Zhang L, *et al.* Effects of dietary riboflavin levels on the growth performance and metabolic function of *Macrobrachium nipponense* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2023, **47**(10): 197-209. [钱香钰, 李向飞, 张玲, 等. 日粮中不同核黄素水平对日本沼虾生长性能和代谢机能的影响 [J]. 水产学报, 2023, **47**(10): 197-209.]
- [17] Eya J C, Ashame M F, Pomeroy C F. Association of mitochondrial function with feed efficiency in rainbow trout: Diets and family effects [J]. *Aquaculture*, 2011,

- 321(1/2): 71-84.
- [18] Miwa S, Kashyap S, Chini E, *et al.* Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2022, **132**(13): e158447.
- [19] Hoppel C L, Tandler B. Riboflavin and mouse hepatic cell structure and function. mitochondrial oxidative metabolism in severe deficiency states [J]. *The Journal of Nutrition*, 1975, **105**(5): 562-570.
- [20] Tang J. Effects of riboflavin on growth and fat metabolism of Beijing ducks and its regulation mechanism [D]. Beijing: China Agricultural University, 2017. [唐静. 核黄素对北京鸭生长发育和脂肪代谢的影响及其调控机制 [D]. 北京: 中国农业大学, 2017.]
- [21] Xu C, Liu W B, Zhang D D, *et al.* Benfotiamine, a lipid-soluble analog of vitamin B(1), improves the mitochondrial biogenesis and function in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fed high-carbohydrate diets by promoting the AMPK/PGC-1 β /NRF-1 axis [J]. *Frontiers in Physiology*, 2018(9): 1079.
- [22] Bureau of Fishenres, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, China; National Fisheries Technology Extension Center; China Society of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2024. [农业农村部渔业渔政管理局; 全国水产技术推广总站; 中国水产学会制编. 中国渔业统计年鉴-2024 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2024.]
- [23] AOAC official method 1298. Association of Official Analytical Chemists [S].
- [24] Chatterjee S R, Srivastava T S, Kamat J P, *et al.* Lipid peroxidation induced by a novel porphyrin plus light in isolated mitochondria: Possible implications in photodynamic therapy [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1997, **166**(1): 25-33.
- [25] Fischer J C, Ruitenbeek W, Berden J A, *et al.* Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle [J]. *Clinica Chimica Acta*, 1985, **153**(1): 23-36.
- [26] Srere P A, Brazil H, Gonen L, *et al.* The citrate condensing enzyme of pigeon breast muscle and moth flight muscle [J]. *Acta Chemica Scandinavica*, 1963, **17**(supl.): 129-134.
- [27] Tsakiris S, Deliconstantinos G. Influence of phosphatidylserine on (Na⁺+K⁺)-stimulated ATPase and acetylcholinesterase activities of dog brain synaptosomal plasma membranes [J]. *Biochemical Journal*, 1984, **220**(1): 301-307.
- [28] Lu K L, Xu W N, Liu W B, *et al.* Association of mitochondrial dysfunction with oxidative stress and immune suppression in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed a high-fat diet [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2014, **26**(2): 100-112.
- [29] Jin M, Luo J, Zhu T, *et al.* Examination of role of the AMP-activated protein kinase (Ampk) signaling pathway during low salinity adaptation in the mud crab, *Scylla paramamosain*, with reference to glucolipid metabolism [J]. *Aquaculture*, 2024(593): 741329.
- [30] Sun S, Xuan F, Fu H, *et al.* Transcriptomic and histological analysis of hepatopancreas, muscle and gill tissues of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in response to chronic hypoxia [J]. *BMC Genomics*, 2015, **16**(1): 491.
- [31] Jeejeebhoy M 2 K. Nutritional assessment by measuring mitochondrial complex activity: US6455243 [P]. 2002-09-24.
- [32] Kirby D M, Thorburn D R, Turnbull D M, *et al.* Biochemical assays of respiratory chain complex activity [J]. *Methods in Cell Biology*, 2007(80): 93-119.
- [33] Liang J P, Wang Y, Ge Q Q, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of the β -actin gene from the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2016, **15**(2): gmr6872.
- [34] Yang Y, Xie S, Lei W, *et al.* Effect of replacement of fish meal by meat and bone meal and poultry by-product meal in diets on the growth and immune response of *Macrobrachium nipponense* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, **17**(2): 105-114.
- [35] Xiong Y, Li Q, Ding Z, *et al.* Dietary α -lipoic acid requirement and its effects on antioxidant status, carbohydrate metabolism, and intestinal microflora in oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* (De Haan) [J]. *Aquaculture*, 2022(547): 737531.
- [36] Pinna S, Kunz C, Halpern A, *et al.* A prebiotic basis for ATP as the universal energy currency [J]. *PLoS Biology*, 2022, **20**(10): e3001437.
- [37] Henriques B J, Olsen R K, Bross P, *et al.* Emerging roles for riboflavin in functional rescue of mitochondrial β -oxidation flavoenzymes [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2010, **17**(32): 3842-3854.
- [38] Beyer R E, Lamberg S L, Neyman M A. The effect of riboflavin deficiency and galactoflavin feeding on oxidative phosphorylation and related reactions in rat liver mitochondria [J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1961, **39**(1): 73-88.
- [39] Ke R, Xu Q, Li C, *et al.* Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism [J]. *Cell Biology International*, 2018, **42**(4): 384-392.
- [40] Ran C, Xie M, Li J, *et al.* Dietary nucleotides alleviate hepatic lipid deposition via exogenous AMP-mediated AMPK activation in zebrafish [J]. *The Journal of Nutrition*, 2021, **151**(10): 2986-2996.
- [41] Han W, Zhang B, Zhao W, *et al.* Ketogenic β -hydroxybutyrate regulates β -hydroxybutyrylation of TCA cycle-associated enzymes and attenuates disease-associated pathologies in Alzheimer's mice [J]. *Aging Cell*, 2024: e14368.
- [42] Chen W, Wang L, Liang P, *et al.* Reducing ischemic

- kidney injury through application of a synchronization modulation electric field to maintain Na⁺/K⁺-ATPase functions [J]. *Science Translational Medicine*, 2022, **14**(635): eabj4906.
- [43] Yu H, Lee I, Salomon A R, *et al.* Mammalian liver cytochrome C is tyrosine-48 phosphorylated *in vivo*, inhibiting mitochondrial respiration [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2008, **1777**(7/8): 1066-1071.
- [44] Moosavi B, Berry E A, Zhu X L, *et al.* The assembly of succinate dehydrogenase: a key enzyme in bioenergetics [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, **76**(20): 4023-4042.
- [45] Lee T Y, Farah N, Chin V K, *et al.* Medicinal benefits, biological, and nanoencapsulation functions of riboflavin with its toxicity profile: a narrative review [J]. *Nutrition Research*, 2023(119): 1-20.
- [46] de Meirleir L, Garcia-Cazorla A, Brivet M. Disorders of Pyruvate Metabolism and the Tricarboxylic Acid Cycle [M]. Inborn Metabolic Diseases. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016: 187-199.
- [47] Bubber P, Ke Z J, Gibson G E. Tricarboxylic acid cycle enzymes following thiamine deficiency [J]. *Neurochemistry International*, 2004, **45**(7): 1021-1028.
- [48] Grad L I, Lemire B D. Riboflavin enhances the assembly of mitochondrial cytochrome c oxidase in *C. elegans* NADH-ubiquinone oxidoreductase mutants [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2006, **1757**(2): 115-122.
- [49] Khalfaoui-Hassani B, Verissimo A F, Shroff N P, *et al.* Biogenesis of Cytochrome C Complexes: from Insertion of Redox Cofactors to Assembly of Different Subunits [M]. Cytochrome Complexes: Evolution, Structures, Energy Transduction, and Signaling. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016: 527-554.
- [50] Anugolu R K, Gunda S, Kakarla R. Homology modeling and ligand interaction of Cytochrome b protein [J]. *Journal of Medical & Allied Sciences*, 2011, **1**(2): 79-83.
- [51] Mosegaard S, Dipace G, Bross P, *et al.* Riboflavin deficiency-implications for general human health and inborn errors of metabolism [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, **21**(11): 3847.

DIETARY RIBOFLAVIN LEVELS ON THE MITOCHONDRIAL BIOGENESIS AND FUNCTION OF ORIENTAL RIVER PRAWN (*MACROBRACHIUM NIPPONENSE*)

LIU Zi-Shang¹, QIAN Xiang-Yu¹, WEI Lu-Yao¹, LIU Bo², SUN Cun-Xin² and LI Xiang-Fei¹

(1. Key Laboratory of Aquatic Nutrition and Feed Science of Jiangsu Province, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Science, Wuxi 214081, China)

Abstract: This study investigates the effects of different dietary riboflavin levels on the mitochondrial biogenesis and function of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) [average initial weight: (0.67±0.01) g]. Three semi-purified diets with different riboflavin concentrations (3.91, 169.61, and 326.66 mg/kg) were tested on prawns kept in an indoor recirculating water system for 10 weeks. The three treatments were designated as the deficient, optimal, and over-dosed groups, respectively. The results showed that in the 169.61 mg/kg riboflavin group, feed efficiency, hepatopancreatic Na⁺-K⁺-ATPase and mitochondrial complex III activities, cytochrome C content, and Cytochrome C oxidase- II (*cox- II*) transcription were all significantly higher ($P<0.05$) than those in the 3.91 and 326.66 mg/kg groups. The hepatopancreatic ATP content and transcriptions of *cox- I* and ATP synthase in the 169.61 mg/kg riboflavin group were all significantly higher than those of the 3.91 mg/kg group ($P<0.05$), but showed no significant difference with the 326.66 mg/kg group ($P>0.05$). However, the average daily gain, hepatopancreatic succinate dehydrogenase activity in the 169.61 mg/kg riboflavin group was significantly higher than that in the 326.66 mg/kg group ($P<0.05$), with no significant difference compared to the 3.91 mg/kg group ($P>0.05$). Additionally, the 326.66 mg/kg group showed significantly higher citrate synthase activity ($P<0.05$) than the other groups and a higher mitochondrial complex V activity than the 3.91 mg/kg group ($P<0.05$). Furthermore, the AMP/ATP ratio in the 3.91 mg/kg group was significantly higher compared with the other groups ($P<0.05$). These findings suggest that dietary inclusion of 169.61 mg/kg riboflavin can promote mitochondrial biogenesis and function in *M. nipponense*.

Key words: Riboflavin; Mitochondrial biogenesis; Mitochondrial function; *Macrobrachium nipponense*