

张静, 戴佳玥, 来新昊, 等. 卵形鲳鲹应对流速胁迫的代谢组学分析[J]. 海洋学报, 2023, 45(5): 53–63, doi:10.12284/hyxb2023060
Zhang Jing, Dai Jiayue, Lai Xinhao, et al. Metabolomic analysis of *Trachinotus ovatus* under flow velocity stress[J]. Haiyang Xuebao, 2023, 45(5): 53–63, doi:10.12284/hyxb2023060

卵形鲳鲹应对流速胁迫的代谢组学分析

张静^{1,2†}, 戴佳玥^{1†}, 来新昊¹, 刘旭祥¹, 张浩¹, 王学锋^{1,2}, 汤保贵^{1,2,3*}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088; 2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江), 广东 湛江 524025; 3. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要: 流速是深远海养殖的关键环境因子之一。为了深入解析卵形鲳鲹在流速胁迫下的分子调控机制, 分别以静水环境、中等流速 (54 cm/s) 和高流速 (90 cm/s) 水流对卵形鲳鲹进行胁迫, 利用 LC/MS 的代谢组学技术探究肝脏内源性代谢物的变化, 寻找差异代谢物以及相关的代谢通路。结果表明, 与静水组相比, 中流速组有 51 种代谢产物的含量发生显著变化, 富集在 40 条通路中, 主要包括半乳糖代谢 (galactose metabolism)、糖异生 (gluconeogenesis)、不饱和脂肪酸的合成 (biosynthesis of unsaturated fatty acids)、花生四烯酸代谢 (arachidonic acid metabolism) 等; 高流速组有 40 种代谢产物的含量发生显著变化, 富集在 22 条通路中, 主要包括饱和脂肪酸的合成 (biosynthesis of saturated fatty acids)、泛酸和辅酶 A 的生物合成 (pantothenate and CoA biosynthesis)、赖氨酸降解 (lysine degradation)、花生四烯酸代谢 (arachidonic acid metabolism)、亚油酸代谢 (linoleic acid metabolism) 等。与中流速组相比, 高流速组有 31 种代谢产物含量发生显著变化, 富集在 12 条通路中, 主要包括花生四烯酸代谢 (arachidonic acid metabolism)、脂肪细胞因子信号通路 (adipocytokine signaling pathway)、半胱氨酸和蛋氨酸代谢 (cysteine and methionine metabolism) 等。通路分析表明中、高流速胁迫均促进了不饱和脂肪酸代谢、花生四烯酸代谢和泛酸的合成, 鱼体通过加强代谢来提高游泳能力, 中流速组主要显著影响了半乳糖代谢、半胱氨酸和蛋氨酸的代谢, 卵形鲳鲹此时产生了更多能量用于运动; 高流速组则显著影响了 L-赖氨酸、维甲酸的代谢, 揭示了在面对高流速胁迫时, 鱼体的游泳能力在下降, 部分免疫机能触发。

关键词: 卵形鲳鲹; 流速胁迫; 代谢组分析

中图分类号: P735; S917.4

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2023)05-0053-11

1 引言

农业农村部等十部委于 2019 年 2 月联合印发了《关于加快推进水产养殖业绿色发展的若干意见》^[1], 提出“在加强科学布局方面, 积极拓展养殖空间, 支持发展深远海绿色养殖, 鼓励深远海大型智能化养殖渔场建设等”。为此, 发展深远海养殖势在必行。

卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 又称金鲳、黄腊鲳、黄腊鲹等, 隶属于硬骨鱼纲 (Osteichthyes)、鲈形目 (Perciformes)、鲳科 (Carangidae)、鲳鲹属 (*Trachinotus*), 是一种广盐暖水性中上层鱼类^[2], 其养殖周期短、抗病力强、存活率高、可全程使用配合饲料, 肉质鲜美、营养价值高, 适合在网箱和池塘中养殖, 已成为亚太地区最重要的海水养殖品种之一。多

收稿日期: 2022-09-03; 修订日期: 2022-11-17。

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202210566002); 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江)项目 (ZJW-2019-06)。

†作者简介: 张静 (1977—), 辽宁省大连市人, 博士, 副教授, 主要研究方向为渔业生态与环境。E-mail: zjouzj@126.com; 戴佳玥 (1998—), 江苏省南通市人, 主要研究方向为渔业生态与环境。E-mail: daijiayue1998@163.com

*通信作者: 汤保贵, 博士, 副教授, 主要研究方向为鱼类养殖与遗传育种。E-mail: zjtbq@163.com

年来,已经积累了大量的养殖经验,具备较好的深远海养殖基础,是深远海养殖适养鱼种的讨论鱼种之一,但该鱼种是否适合在深远海养殖、养殖技术如何适应深远海的特点仍需不断地探索^[3-5]。流速是深远海养殖的关键环境因子之一,水流可以刺激鱼类的各种感觉,产生相应的反应机制^[6-10],决定了网箱选址、布设以及养殖鱼类的环境适应性进而影响养殖鱼类的生长、发育和养殖效果。鱼类的趋流性决定了游泳是鱼类重要的生命活动之一,研究鱼类在不同流速下的游泳行为,对鱼类的生长、捕食、繁殖、捕捞和鱼道建设等均有十分重要的意义。Ogata 和 Oku^[11]曾开展了流速对日本牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)幼鱼生长的影响实验,结果表明,流速能够改变日本牙鲆体脂肪含量。胡佳等^[12]探究了不同流速对西杂鲟(*Acipenser baerii*♀×*Amur schrenckii*♂)稚鱼生长的影响,结果表明,不同流速对西杂鲟稚鱼的生长效率和饵料转化率存在一定影响。

目前,关于卵形鲳鲹游泳行为的研究鲜见报道,为了深入解析卵形鲳鲹在流速胁迫下的分子调控机制,在本实验室前期关于卵形鲳鲹流速行为学研究的基础上,分别以静水环境、中等流速(54 cm/s)和高流速(90 cm/s)水流对卵形鲳鲹进行胁迫,利用代谢组学分析流速胁迫对卵形鲳鲹代谢的影响,了解卵形鲳鲹在不同流速胁迫下的代谢物和代谢通路的变化及其小分子代谢物调节机制,以期对卵形鲳鲹的深远海规模养殖提供参考数据。

2 材料与方法

2.1 实验动物与装置

实验团队于2021年5-6月,在广东省湛江市麻章区海思特水产科技有限公司养殖场进行实验,实验用鱼为公司提供的共100尾人工繁育的健康卵形鲳鲹,体长为(11.06±0.70) cm,体重为(56.09±9.99) g,在暂养池中暂养7 d后进行实验。在暂养期每天早、晚各喂食一次,水温控制在(27.0±0.7) °C,溶解氧保持在7.0 mg/L以上,实验前禁食48 h。实验采用丹麦 Loli-go Systems 公司生产的大型游泳水槽 SY28060 进行测定,该水槽的流速调节范围为0~120 cm/s。水槽测试段体积为10 L。

2.2 流速胁迫

通过流速实验(另文发表)获得的该规格卵形鲳鲹的临界游泳速度,按照临界游泳速度的0%、60%和100%设置静水组0 cm/s(A)、中流速组54 cm/s(D)和高流速组90 cm/s(F),每次测试1尾鱼,每组测试

6尾鱼,共测试18尾鱼。实验中各组在静水条件下适应1 h以消除转运影响后,分别在静水、中流速、和高流速水流下胁迫20 min^[13],胁迫过程全程用摄像机摄像实时监控对实验鱼的游泳时间准确计时,实验过程中保证周围安静,避免走动,保证光线不变以减少人为因素干扰。每次实验结束后立即将实验鱼取出,转入含有丁香酚麻醉液(100 mg/L)的水桶中进行麻醉,随后立即抽取血液,剪取尾部白肌和肝组织,置于液氮中保存。

2.3 代谢物提取

取100 mg液氮研磨的肝脏样本,置于EP管中,加入500 μL的80%甲醇水溶液,接着涡旋震荡,冰浴静置5 min,15 000 g、4 °C离心20 min。然后,取一定量的上清加入水稀释至甲醇含量为53%,再15 000 g、4 °C离心20 min,收集上清,进样LC-MS进行分析。

2.4 色谱条件

色谱仪采用Vanquish UHPLC系统(Thermo Fisher,德国),色谱柱为Hypesil Gold Column C₁₈(100×2.1 mm, 1.9 μm)。此时设置柱温40 °C,流速0.2 mL/min。在正模式下,流动相A:0.1%甲酸,流动相B:甲醇;在负模式下,流动相A:5 mmol醋酸铵、pH 9.0,流动相B:甲醇。洗脱程序为0~1.5 min,98%A、2%B;1.5~12 min,98%~0%A、2%~100%B;12~14 min,100%B;14~14.1 min,0%~98%A、100%~2%B;14.1~17 min,98%A、2%B。

2.5 质谱条件

使用Orbitrap Q Exactive™ HF-X质谱仪(Thermo Fisher,德国)进行UHPLC-MS/MS分析。质谱仪在正负极性两种模式下运行,喷雾电压为3.2 kV,毛细管温度为320 °C,鞘气40 arb,辅助气10 arb。

2.6 数据处理

将下机数据文件导入CD搜库软件中,进行保留时间、质荷比等参数的简单筛选,然后对不同样品根据保留时间偏差0.2 min和质量偏差5 mg/kg行峰对齐,使鉴定更准确,随后根据设置的质量偏差5 mg/kg、信号强度偏差30%、信噪比3、最小信号强度100 000、加和离子等信息进行峰提取,同时对峰面积进行定量,再整合目标离子,然后通过分子离子峰和碎片离子进行分子式的预测并与mzCloud(<https://www.mzcloud.org/>)、mzVault和Masslist数据库进行比对,用空白对照样本去除背景离子,并对定量结果进行归一化。接着进行数据的质量控制和质量保证,筛选高质量数据。对获得的高质量数据进行降维和归类分析,使用的多元统计方法包括主成分分析

(PCA)和正交偏最小二乘(OPLS-DA)判别分析。

2.7 差异代谢物筛选及鉴定

为得到差异代谢物,筛选条件为VIP>1.0且 $p<0.05$ 。其中,VIP表示OPLS-DA模型第一主成分变量重要性值投影; p 是判断单变量统计分析假设检验结果的一个参数。代谢物结构解析参考了MassBank(<http://www.massbank.jp/>)、HMDB(<http://www.Hmdb.ca/>)、Metlin(<http://www.metlin.scripps.edu/>)等已有的质谱公共数据库。

2.8 差异代谢物聚类及代谢通路富集

在找到代谢物之后,为了更直观展示差异代谢物在比较组间的差异,将各组的差异代谢物进行归一化后,进行聚类分析并用R包pheatmap制作出热图。同时,基于KEGG数据库对差异代谢物进行代谢物通路富集分析。

3 结果与分析

3.1 样本质量分析

取D、F、A的肝脏代谢物进行LC-MS质谱检测。在正离子模式下检测到837个峰,在负离子模式下检测到736个峰(表1)。在检测过程中,使用QC(quality control)样品进行质量控制。结果如图1所

示,在正负两种模式下,QC样本分布紧密,重复性良好,这意味着得到的数据是可靠的。

3.2 多元统计分析

由图2的PCA主成分可以得出,负离子模式A与D组的样品点有明显分离,其余组均无法完全分离。因此,利用OPLS-DA模型进一步分析。OPLS-DA可以在不降低模型预测能力的前提下,最大程度查看组间差异。在OPLS-DA模型中,正离子模式下在D、F和A均有明显分组(图3),负离子下也有不相交部分,同时D、F之间也有不相交部分。表明高速胁迫和中流速胁迫对卵形鲳鲹代谢都可造成显著影响。

3.3 差异代谢物鉴定及分析

利用VIP>1.0和 $p<0.05$ 为条件筛选差异代谢物,并进行鉴定(图4)。与A相比,D在正离子模式下有10个代谢物上调,19个代谢物下调;负离子模式下,有22种代谢物上调,但没有代谢物下调。而F与A相比,在正离子模式下有10个代谢物上调,10个代谢物下调;负离子模式下,有20个代谢物上调,未见代谢物下调。F与D相比,在正离子模式下有11个代谢物上调,9个代谢物下调;负离子模式下有7个代谢物上调,4个代谢物下调。

将D、F与A得出的差异代谢物进行比较,发现

表1 代谢物鉴定结果

Table 1 Metabolite identification results

类型	共得到的峰的数目	二级图谱匹配到物质名称	一级图谱匹配到的物质名称	利用一级图谱和二级图谱鉴定到的物质总数目	无法鉴定的物质数目
POS正离子模式	837	736	101	837	0
NEG负离子模式	736	637	99	736	0

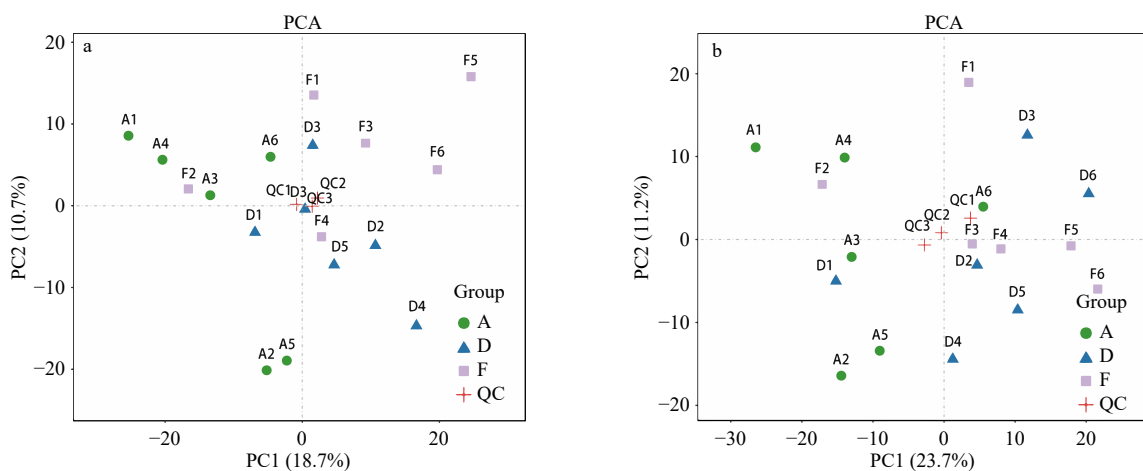


图1 QC样品的PCA模型

Fig. 1 PCA model of QC samples

a. 正离子模式; b. 负离子模式

a. Positive ion mode; b. negative ion mode

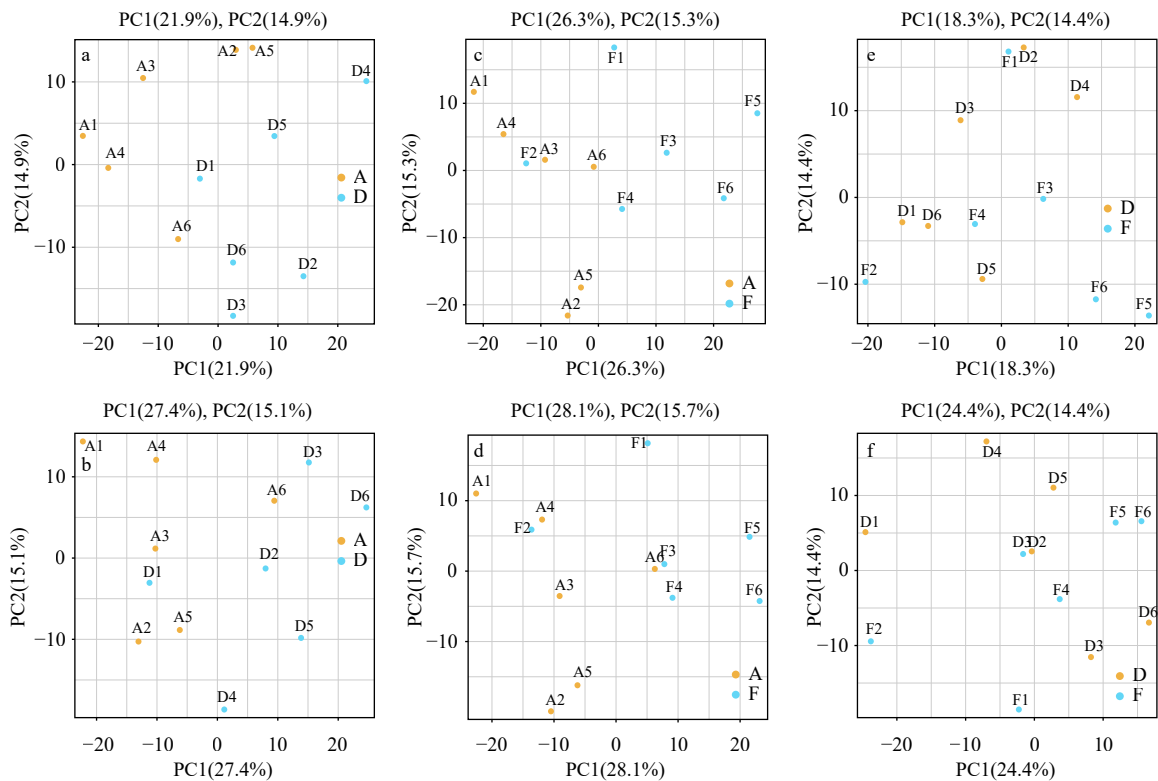


图2 QC 样本 PCA 分析

Fig. 2 Sample QC PCA analysis

a. 正离子模式下 A 与 D; b. 负离子模式 A 与 D; c. 正离子模式下 A 与 F; d. 负离子模式 A 与 F; e. 正离子模式下 D 与 F; f. 负离子模式 D 与 F
 a. A and D in positive ion mode; b. A and D in negative ion mode; c. A and F in positive ion mode; d. A and F in negative ion mode; e. D and F in positive ion mode; f. D and F in negative ion mode

在正离子模式下共有 9 个相同差异代谢物,而在负离子模式下,共有 7 个相同差异代谢物(图 5)。其中,脯氨酸、赖氨酸等差异代谢物参与到体内能量代谢,主要对卵形鲳鲹的生长、蛋白质的合成、蛋白质和脂肪代谢等产生影响。为了更直观展示各组差异代谢物的变化,对各组的差异代谢物进行聚类分析(图 6)。

3.4 代谢通路分析

对所有差异代谢物进行通路富集分析,筛选出涉及一种及以上注释代谢产物的通路。结果显示,以 A 为参照, D 共富集了 40 条, F 共富集了 22 条;以 D 为参照, F 则富集了 12 条。

以 A 为参照,此时 D 中,主要富集的代谢途径有半乳糖代谢(galactose metabolism)、糖异生(gluconeogenesis)、不饱和脂肪酸的合成(biosynthesis of unsaturated fatty acids)、花生四烯酸代谢(arachidonic acid metabolism)、半胱氨酸和蛋氨酸代谢(cysteine and methionine metabolism)、泛酸和辅酶 A 的生物合成(pantothenate and CoA biosynthesis)(图 7a)。其中,变化较大且差异明显的代谢物有葡萄糖 1-磷酸(glucose 1-

phosphate)、N-乙酰-D-半乳糖胺(N-acetyl-D-galactosamine)、花生四烯酸(arachidonic acid)、棕榈酸(palmitic acid)、泛酸(pantothenic acid)、5'-甲基硫腺苷(5'-methylthioadenosine)、麦芽酚(maltol)(表 2)。

以 A 为参照,此时 F 中,主要富集的代谢途径有饱和脂肪酸的合成(biosynthesis of saturated fatty acids)、泛酸和辅酶 A 的生物合成(pantothenate and CoA biosynthesis)、赖氨酸降解(lysine degradation)、脂肪酸生物合成(fatty acid biosynthesis)、花生四烯酸代谢、亚油酸代谢(linoleic acid metabolism)(图 7b)。其中,变化较大且差异明显的代谢物有泛酸、硬脂酸(stearic acid)、二十二碳二烯酸酯(13Z,16Z-docosadienoic acid)、L-赖氨酸(L-lysine)、5-氧代-二十碳四烯酸(5-Oxo-EETE)、麦芽酚(表 2)。

以 D 为参照,此时 F 主要富集的代谢途径有花生四烯酸代谢、脂肪细胞因子信号通路(adipocytokine signaling pathway)、半胱氨酸和蛋氨酸代谢(图 7c)。其中,变化较大且差异明显的代谢物有 5'-S-甲基-5'-硫代腺苷(5'-S-methyl-5'-thioadenosine)、维甲酸(tretinoin)、5-氧代-二十碳四烯酸(表 2)。

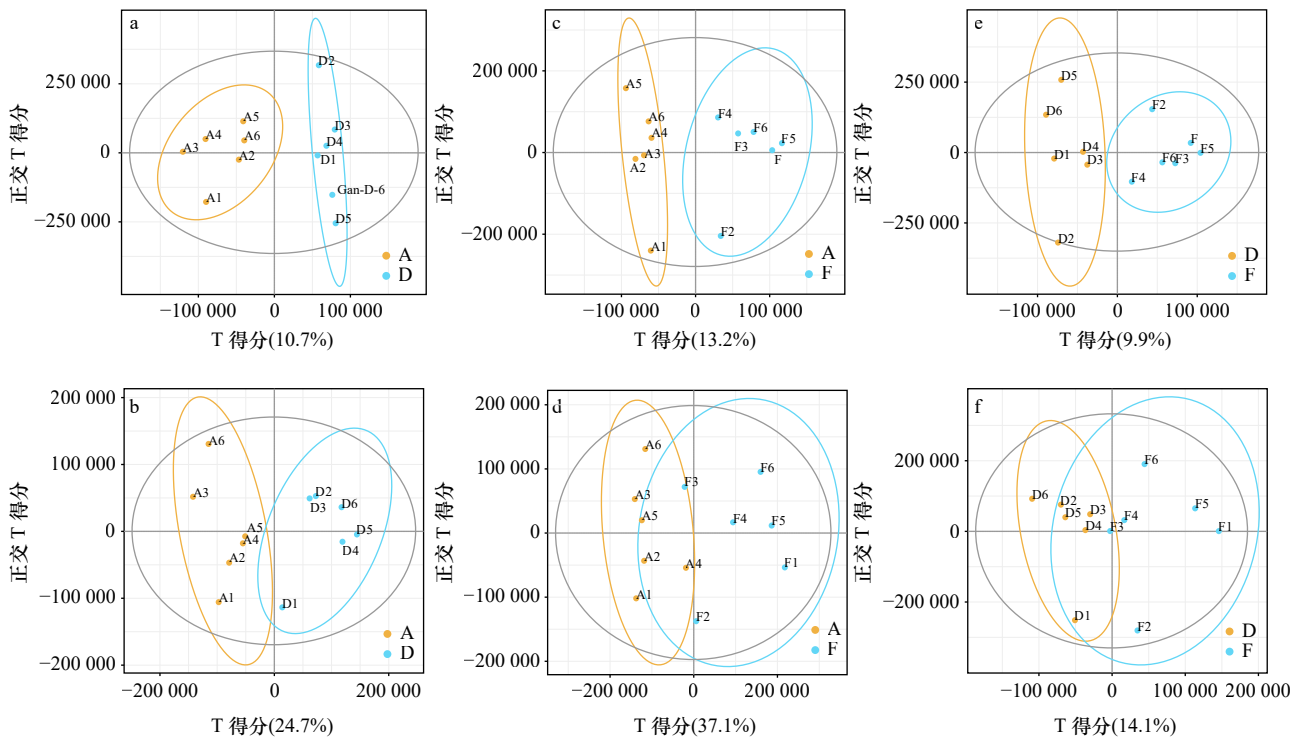


图3 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 OPLS-DA model

a. 正离子模式下 A 与 D; b. 负离子模式 A 与 D; c. 正离子模式下 A 与 F; d. 负离子模式 A 与 F; e. 正离子模式下 D 与 F; f. 负离子模式 D 与 F
 a. A and D in positive ion mode; b. A and D in negative ion mode; c. A and F in positive ion mode; d. A and F in negative ion mode; e. D and F in positive ion mode; f. D and F in negative ion mode

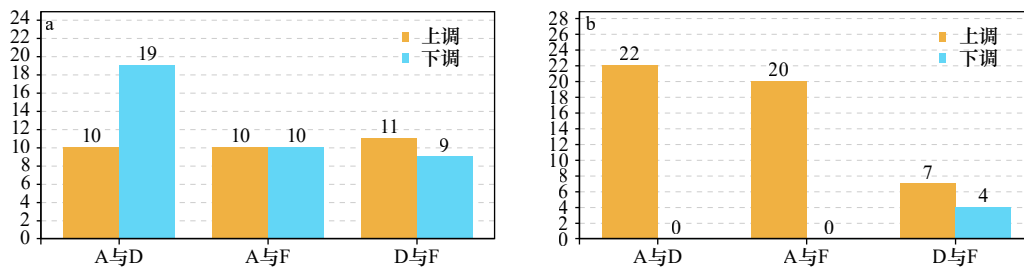


图4 差异代谢物数量统计图

Fig. 4 Statistical diagram of the number of differential metabolites

a. 正离子模式; b. 负离子模式

a. Positive ion mode; b. negative ion mode

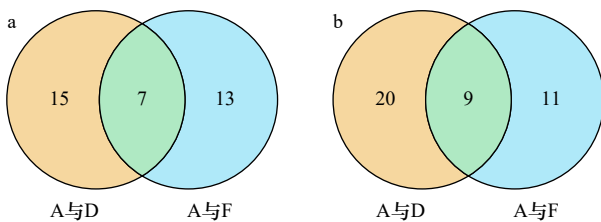


图5 D, F 分别与 A 比较下差异代谢物差异韦恩图

Fig. 5 Venn diagram of different metabolites in D and F compared with A, respectively

a. 正离子模式; b. 负离子模式

a. Positive ion mode; b. negative ion mode

4 讨论

以卵形鲳鲹作为实验动物, 通过代谢组学技术研究了流速胁迫对其肝脏代谢的影响。与静水组相比, 实验中共筛选出 91 个差异表达的代谢产物, 主要有泛酸、L-赖氨酸、花生四烯酸等。对这些差异代谢物进行 KEGG 通路分析, 共富集了 62 条显著的通路。分析发现, 流速胁迫主要影响了卵形鲳鲹体内的能量代谢过程, 包括脂质代谢、糖代谢和蛋白质代谢三部分, 同时对鱼体的部分维生素和维生素衍生物的含量造成了影响。

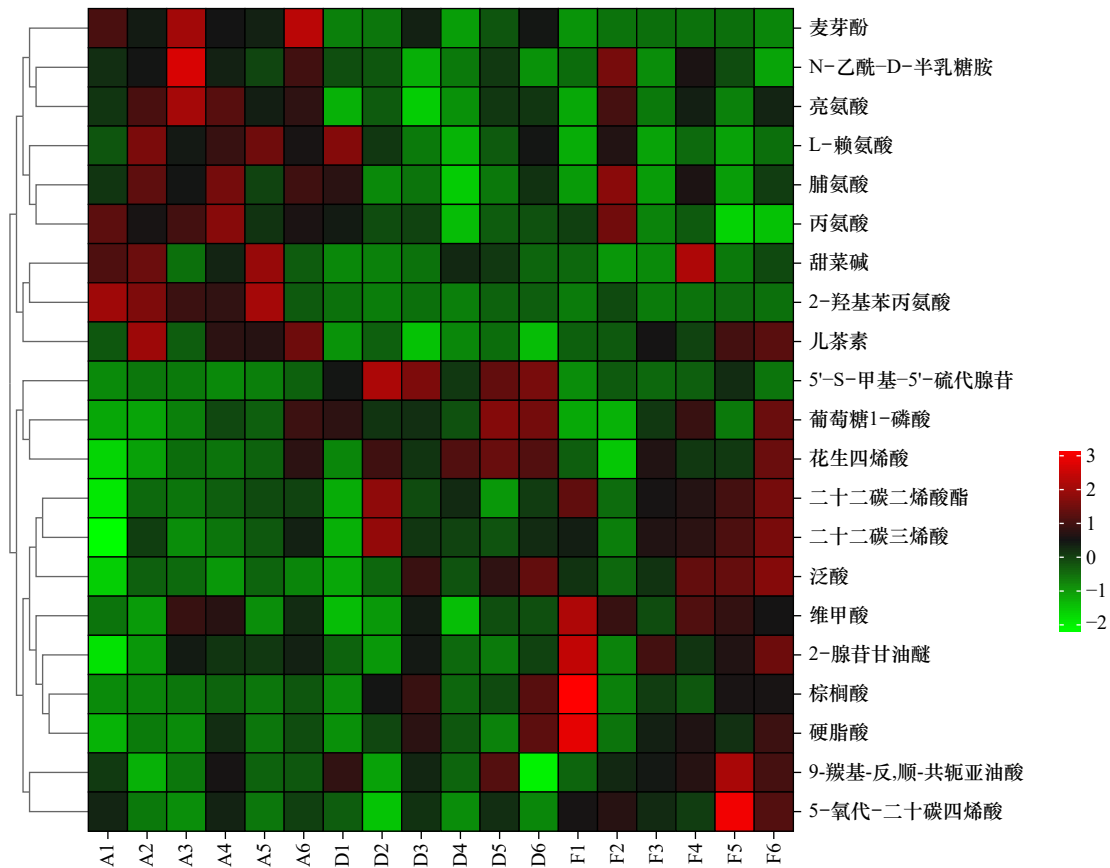


图 6 3 组流速间差异代谢物聚类热图分析

Fig. 6 Clustered heatmaps of different metabolites among three groups

4.1 流速胁迫对脂质代谢的影响

不饱和脂肪酸通过插入到细胞膜脂质双分子层,在机体内发挥着维持细胞膜的相对流动性和稳定性的作用^[14]。研究发现,与静水组相比,中流速组、高流速组差异代谢通路中不饱和脂肪酸的生物合成占有很大比重。其中,中流速组的花生四烯酸、棕榈酸和高流速组的硬脂酸、二十二碳二烯酸酯均表达上调。对大鼠的肌肉细胞研究表明,力竭性运动可以引起肌纤维膜通透性增高、线粒体肿大等结构的改变^[15]。不饱和脂肪酸合成的不断进行,表明面对流速胁迫卵形鲳鲹不断进行游泳运动直至力竭,期间可能需要通过不饱和脂肪酸的合成来维持细胞膜的稳定,卵形鲳鲹自身有较强的应对不同流速的适应能力。

花生四烯酸不仅是膜磷脂的重要组成部分^[16],同时还在花生四烯酸代谢中发挥着作用。两种流速胁迫下均富集了花生四烯酸代谢这条途径。花生四烯酸在体内可以发挥第二信使的作用,或促进其他第二信使系统的合成^[17]。而第二信使在细胞信号转导中发挥着重要的作用,它可以调节酶活性,从而控制代谢活动如葡萄糖的摄取和利用、脂肪的储存和移动等。对比静水组,在中流速下,花生四烯酸表达了上

调,可能是加强了对葡萄糖的代谢利用和脂肪合成。而高流速下,5-氧代-二十碳四烯酸(5-oxo-EETE)作为花生四烯酸的代谢物,也表达了上调。5-oxo-EETE能激活受体 γ (PPAR γ)活性从而间接地抑制 κ B(NF- κ B)活性^[18]。而核因子NF- κ B是一个转录因子,被激活以应对各种炎症刺激如细胞因子、生长因子、激素、脂肪酸和药物等,NF- κ B被证明在多种细胞中有抗凋亡作用^[19]。所以在面对流速持续胁迫时,卵形鲳鲹可能会通过花生四烯酸的代谢产生更多5-oxo-EETE来抑制NF- κ B的活性,其抗凋亡相关作用受到影响,可能致使实验鱼的正常细胞凋亡紊乱,而凋亡过程的紊乱可能与许多疾病的发生有直接或间接的关系^[20]。因此,从脂质代谢方面来看,两种流速下卵形鲳鲹的脂质代谢活动皆有所加强,但高流速胁迫下实验鱼的细胞凋亡可能会受到影响,产生疾病隐患。

4.2 速胁迫对糖代谢的影响

不同于静水环境,中流速胁迫还显著影响了半乳糖代谢。在半乳糖代谢中葡萄糖-1-磷酸(G-1-P)含量显著上升。G-1-P主要参与半乳糖代谢中糖酵解和糖异生的环节。糖酵解作用是指生物体内葡萄糖或糖原分解产生ATP的过程。糖异生作用是指从乳酸、

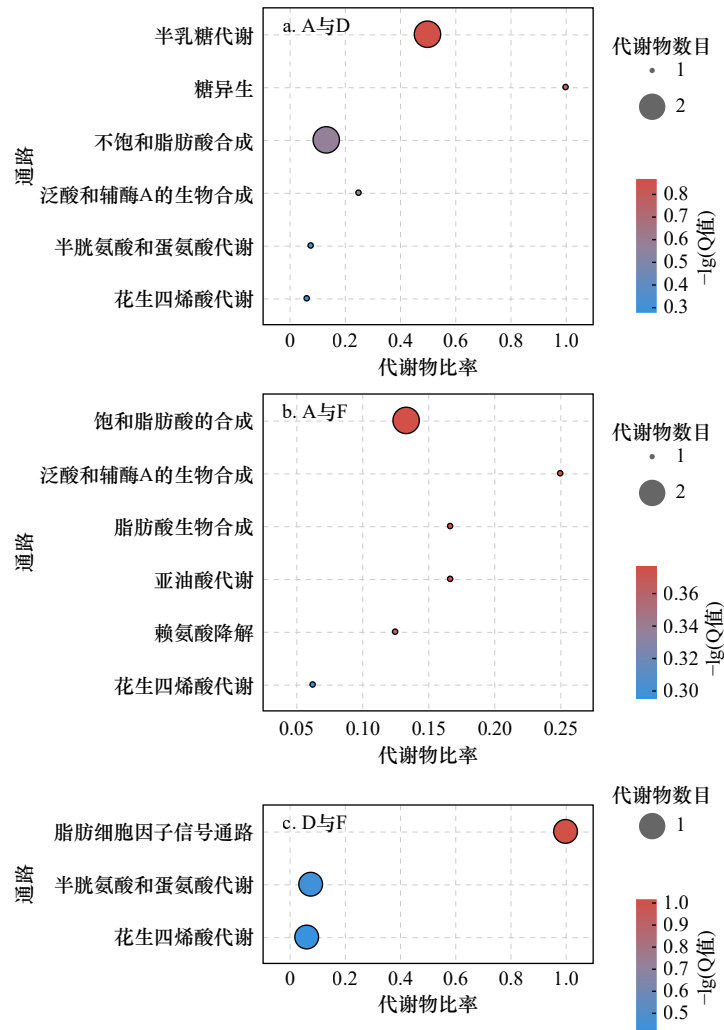


图7 KEGG部分通路显著性气泡图

Fig. 7 KEGG partial pathway significance Bubble Diagram

甘油、丙酮酸、生糖氨基酸等非糖物质生成葡萄糖或糖原。二者的生理功能是相逆的,在糖酵解途径中,G-1-P是糖原磷酸解的产物,它在磷酸葡萄糖变位酶(PGM)的催化下转变为6-磷酸葡萄糖(G-6-P)进入糖酵解途径为细胞供能^[21]。在糖异生途径中,G-6-P通过磷酸葡萄糖变位酶(PGM)先转化为G-1-P,再转为糖原储存起来^[22]。随着流速的增加,卵形鲳鲹运动加强,需要更多的能量维持高强度的消耗,因此体内产生了更多的G-1-P,糖酵解活动得到了促进,更多的糖类被分解产生能量,同时糖原储存活动降低;同时G-1-P还参与到了乳酸转变为葡萄糖的柯立氏循环中。因此,G-1-P含量的上升可能暗示着卵形鲳鲹正在发生糖酵解并为运动提供所需能量,也可能是由于乳酸的堆积,加快通过柯立氏循环将其转变为葡萄糖。

半乳糖代谢中,N-乙酰-D-半乳糖胺含量则显著下降。而在代谢过程中,N-乙酰-D-半乳糖胺参与了D-半乳糖胺(D-galactosamine)的相关成分D-半乳糖

胺-6-磷酸(D-galactosamine-6P)的合成。D-半乳糖胺是一种肝细胞磷酸尿嘧啶核苷干扰剂,对小鼠的研究表明D-半乳糖胺可造成肝弥漫性坏死和炎症^[23]。因此,N-乙酰-D-半乳糖胺含量显著下降则可能间接导致D-半乳糖胺的合成减少,实验鱼肝脏损伤的可能性降低。表明中流速胁迫对实验鱼的影响较小,机体可以调节适应。

4.3 流速胁迫对蛋白质代谢的影响

对比静水组,中流速组和高流速组中半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路都受到了显著影响。其中,5'-S-甲基-5'-硫代腺苷在中流速胁迫下显著上调。5'-S-甲基-5'-硫代腺苷是S-腺苷蛋氨酸(Ado-Met)代谢的主要产物之一^[24]。S-腺苷蛋氨酸在鸟氨酸脱羧酶(Ornithine Decarboxylase, ODC)作用下可以脱羧形成多胺的主要成分——腐胺、亚精胺和精胺^[25]。而多胺是一种低分子量的简单脂肪胺,几乎存在于所有生物体中,其特有的分子结构决定了其在促进肠道黏膜的生长、

表 2 部分关键代谢物
Table 2 Some key metabolites

组别	代谢物名称	变化趋势	VIP	p值
D与A	花生四烯酸(Arachidonic acid)	↑	10.26	0.024 9
	棕榈酸(Palmitic acid)	↑	3.16	0.045 8
	泛酸(Pantothenic acid)	↑	2.28	0.049 9
	葡萄糖1-磷酸(Glucose 1-phosphate)	↑	1.55	0.035 1
	5'-S-甲基-5'-硫代腺苷(5'-S-Methyl-5'-thioadenosine)	↑	2.93	0.000 2
	麦芽酚(Maltol)	↓	2.13	0.008 5
	N-乙酰-D-半乳糖胺(N-Acetyl-D-galactosamine)	↓	1.08	0.017 3
F与A	5-氧代-二十碳四烯酸(5-OxoETE)	↑	3.31	0.033 9
	麦芽酚(Maltol)	↓	2.41	0.000 7
	L-赖氨酸(L-Lysine)	↓	1.04	0.005 7
	硬脂酸(Stearic acid)	↑	2.17	0.033 6
	泛酸(Pantothenic acid)	↑	2.12	0.004 6
F与D	二十二碳二烯酸酯(13Z,16Z-Docosadienoic Acid)	↑	2.10	0.008 0
	5-氧代-二十碳四烯酸(5-OxoETE)	↑	3.72	0.016 9
	5'-S-甲基-5'-硫代腺苷(5'-S-Methyl-5'-thioadenosine)	↓	2.66	0.001 1
	维甲酸(Tretinoin)	↑	2.08	0.006 0

发育、成熟、适应内环境以及修复损伤等方面具有重要作用。研究表明,动物体内多胺可通过促进肠道发育、维持肠道黏膜屏障功能、提高肠道抗氧化和调整肠道代谢等实现其对肠道稳态的维持作用^[26]。因此卵形鲳鲹在面对流速的升高会增加 S-腺苷蛋氨酸的产生,可能以此产生更多的多胺来维持剧烈运动下肠道环境的稳定。

中流速组与高流速组相比较为显著的差异代谢物是 L-赖氨酸,主要参与赖氨酸的合成和降解,其含量显著下降。赖氨酸在所有必需氨基酸中,在体内的贮存最多^[27],有 L 型和 D 型两种结构,但只有 L 型可以被动物体所吸收^[28]。大量实验证明,赖氨酸能降低自由基含量,使肌肉组织维持正常的生理功能,同时为组织损伤的修复提供了必需的氨基酸和能量来源,从而可以延缓运动疲劳的发生和加快运动疲劳的恢复^[29]。在体内,赖氨酸还参与肉毒碱的合成。而肉毒碱是脂肪酸 β -氧化前几种酶的辅酶,还可以作为载体,从而激活脂肪代谢。因此, L-赖氨酸含量降低说明脂肪代谢即将减少和运动能力的下降,暗示着卵形鲳鲹在高流速胁迫下可能疲劳,即将达到游泳能力的极限。

4.4 流速胁迫对维生素变化的影响

卵形鲳鲹在受到不同的流速胁迫后,肝脏中的泛酸均表达上调。泛酸主要参与泛酸和辅酶 A(CoA)生物合成这条代谢通路。泛酸也称为维生素 B5,是维持生命所需的水溶性维生素^[30],它在体内主要转变为 CoA。CoA 是生物体内 70 多种酶反应通路的辅助因子,包括糖类的分解,脂肪酸的氧化,氨基酸的分解,丙酮酸的降解,从而激发三羧酸循环,提供机体生命所需 90% 的能量^[31]。与静水组相比,中流速组、高流速组泛酸的含量均升高,说明流速胁迫促进了卵形鲳鲹体内的三羧酸循环,即可以认为有氧呼吸的加强,为其运动提供了能量。此外,泛酸还参与了 β -丙氨酸代谢。 β -丙氨酸是一种非蛋白氨基酸,是由尿嘧啶和胸腺嘧啶在肝脏中合成的产物,在体内主要作用是参与 L-组氨酸合成肌肽,提高运动能力^[32]。由此推测卵形鲳鲹可能通过升高泛酸含量,以提高了运动的能力来应对流速胁迫。

维甲酸的含量在高流速组显著上调。维甲酸是维生素 A 的衍生物^[33],在体内它调节着细胞的生长分化和机体的稳态^[34]。研究表明,维甲酸在人体内还有免疫调节的作用,它可以促进 Th2(辅助型 T 细胞 2)

反应^[35]。暗示着高流速已经影响到了卵形鲳鲹的机体稳态,甚至影响到了免疫调节。

5 结论

研究探索了静水、中、高流速胁迫对卵形鲳鲹代谢的影响。结果表明,相较于静水组,中、高流速均促进了不饱和脂肪酸代谢、花生四烯酸代谢和泛酸的合成,鱼体通过加强代谢来提高游泳能力,维持细胞膜稳态和肠道稳定等来适应流速。其中,在中流速时显著影响了卵形鲳鲹的半乳糖代谢和多种氨基酸的代谢,此时产生了更多的能量用于运动,影响了其

包括摄食在内的部分行为;在高流速时则显著影响了卵形鲳鲹体内的L-赖氨酸、维甲酸含量,揭示了随着流速的持续增加和胁迫,鱼体的游泳能力在下降,部分免疫机能触发。

总体表明,卵形鲳鲹在流速的胁迫下,能量代谢活动有所加强。在面对静水和中流速胁迫时,鱼体可以通过自我调节来维持各功能的稳定。而面对高流速胁迫时,鱼体面临游泳能力的极限,同时可能产生不适甚至炎症,部分免疫机能触发。本研究扩展了我们对海洋鱼类应对流速胁迫反应机制的理解,并促进了耐流速的选择性养殖。

参考文献:

- [1] 农业农村部,生态环境部,自然资源部,等. 关于加快推进水产养殖业绿色发展的若干意见[Z/OL]. (2019-01-11) [2022-08-07]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/YYJ/201902/t20190215_6171447.htm.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China, Ministry of Natural Resources of the People's Republic of China, et al. Some opinions on accelerating the green development of aquaculture[Z/OL]. (2019-01-11) [2022-08-07]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/YYJ/201902/t20190215_6171447.htm.
- [2] 许晓娟,李加儿,区又君. 盐度对卵形鲳鲹胚胎发育和早期仔鱼的影响[J]. 南方水产, 2009, 5(6): 31-35.
Xu Xiaojuan, Li Jiaer, Ou Youjun. Effects of salinity on embryonic development and early larvae in ovate pompano *Trachinotus ovatus*[J]. South China Fisheries Science, 2009, 5(6): 31-35.
- [3] 孙莘溢,黄小林,黄忠,等. 卵形鲳鲹摄食、耗氧节律和胃肠排空时间的研究[J]. 南方水产科学, 2019, 15(5): 77-83.
Sun Xinyi, Huang Xiaolin, Huang Zhong, et al. Diet feeding, oxygen consumption rhythm and gastrointestinal evacuation time of *Trachinotus ovatus*[J]. South China Fisheries Science, 2019, 15(5): 77-83.
- [4] 黄倩倩,林黑着,周传朋,等. 卵形鲳鲹幼鱼对维生素B₂的需要量[J]. 南方水产科学, 2019, 15(1): 69-76.
Huang Qianqian, Lin Heizhao, Zhou Chuanpeng, et al. Vitamin B₂ requirement of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. South China Fisheries Science, 2019, 15(1): 69-76.
- [5] 刘锡强,马学坤,刘康,等. 华南地区金鲳鱼养殖报告[J]. 当代水产, 2014, 39(2): 26-29.
Liu Xiqiang, Ma Xuekun, Liu Kang, et al. Report on the culture of golden pompano in south China[J]. Current Fisheries, 2014, 39(2): 26-29.
- [6] 李丹,林小涛,李想,等. 水流对杂交鲟幼鱼游泳行为的影响[J]. 淡水渔业, 2008, 38(6): 46-51.
Li Dan, Lin Xiaotao, Li Xiang, et al. Effects of water current on swimming performance of juvenile hybrid sturgeon (*Huso duricus* Georgi ♂ × *Acipenser schrencki* Brandt ♀)[J]. Freshwater Fisheries, 2008, 38(6): 46-51.
- [7] 殷名称. 鱼类生态学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
Yin Mingcheng. Fish Ecology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995.
- [8] Merino G E, Piedrahita R H, Conklin D E. The effect of fish stocking density on the growth of California halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles[J]. Aquaculture, 2007, 265(1/4): 176-186.
- [9] 黄宁宇,程起群,高露娇,等. 流速、温度对西伯利亚鲟幼鱼生长的影响[J]. 水产学报, 2007, 31(1): 31-37.
Huang Ningyu, Cheng Qiqun, Gao Lujiao, et al. Effect of water current and temperature on growth of juvenile *Acipenser baeri*[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(1): 31-37.
- [10] 宋波澜,林小涛,王伟军,等. 不同流速下红鳍银鲫趋流行为与耗氧率的变化[J]. 动物学报, 2008, 54(4): 686-694.
Song Bolan, Lin Xiaotao, Wang Weijun, et al. Effects of water velocities on rheotaxis behaviour and oxygen consumption rate of tinfoil barb *Barbodes schwanenfeldi*[J]. Current Zoology, 2008, 54(4): 686-694.
- [11] Ogata H Y, Oku H. Effects of water velocity on growth performance of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2000, 31(2): 225-231.
- [12] 胡佳,李艳华,王鲁,等. 不同流速下西杂鲟稚鱼生长对比研究[J]. 水产科学, 2022, 41(6): 1023-1028.
Hu Jia, Li Yanhua, Wang Lu, et al. Comparative growth of juvenile sturgeon hybrid *Acipenser baerii* ♀ × *A. schrenckii* ♂ under different water velocity[J]. Fisheries Science, 2022, 41(6): 1023-1028.
- [13] 朱晏苹,曹振东,付世建. 不同游泳速度条件下瓦氏黄颡幼鱼的有氧和无氧代谢反应[J]. 水生生物学报, 2010, 34(5): 905-912.
Zhu Yanping, Cao Zhendong, Fu Shijian, et al. Aerobic and anaerobic metabolism in response to different swimming speed of juvenile darkbarbel catfish (*Pelteobagrus Vachelli richardson*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(5): 905-912.
- [14] Pelley J W. Fatty acid and triglyceride metabolism[M]//Pelley J W. Elsevier's Integrated Review Biochemistry. 2nd ed. Amsterdam: El-

- sevier, 2012: 81–88.
- [15] 徐冬青, 陈家琦, 李静先. 力竭运动对大鼠骨骼肌自由基代谢及肌细胞膜通透性的影响[J]. *天津体育学院学报*, 1999, 14(3): 27–29, 33.
Xu Dongqing, Chen Jiaqi, Li Jingxian, et al. Effects of exhaustive exercise on free radical metabolism and cell membrane permeability in rat skeletal muscle[J]. *Journal of Tianjin University of Sport*, 1999, 14(3): 27–29, 33.
- [16] Litalien C, Beaulieu P. Molecular mechanisms of drug actions: from receptors to effectors[M]//Fuhrman B P, Zimmerman J J. *Pediatric Critical Care*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011: 1553–1568.
- [17] 袁成凌, 姚建铭, 余增亮. 花生四烯酸及其代谢物的生物学作用[J]. *中国药物化学杂志*, 2000, 10(1): 78–81.
Yuan Chengling, Yao Jianming, Yu Zengliang. Synthesis of cetirizine hydrochloride[J]. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, 10(1): 78–81.
- [18] O'Flaherty J T, Rogers L C, Paumi C M, et al. 5-Oxo-ETE analogs and the proliferation of cancer cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) —Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2005, 1736(3): 228–236.
- [19] Aggarwal B B, Sethi G, Nair A, et al. Nuclear factor- κ b: a holy grail in cancer prevention and therapy[J]. *Current Signal Transduction Therapy*, 2006, 1(1): 25–52.
- [20] 杨春, 李恒, 李海, 等. 5-烷基间苯二酚诱导人结肠癌细胞凋亡的机制探讨[J]. *世界华人消化杂志*, 2017, 25(29): 2621–2630.
Yang Chun, Li Heng, Li Hai, et al. Mechanism study of 5-alkylresorcinols-induced colon cancer cell apoptosis *in vitro*[J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2017, 25(29): 2621–2630.
- [21] Fujinaka H, Nakamura J, Kobayashi H, et al. Glucose 1-phosphate increases active transport of calcium in intestine[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 460(2): 152–160.
- [22] Aiello D P, Fu L W, Miseta A, et al. Intracellular Glucose 1-Phosphate and glucose 6-phosphate levels modulate Ca^{2+} homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(48): 45751–45758.
- [23] 张金良, 任懂平. D-半乳糖胺/脂多糖诱导急性肝衰竭机制的研究进展[J]. *武警医学院学报*, 2011, 20(9): 761–763, 767.
Zhang Jinliang, Ren Dongping. The recent research and development of mechanisms of D-galactosamine combined with Lipopolysaccharide induced acute liver failure[J]. *Acta Academiae Medicinae CPAF*, 2011, 20(9): 761–763, 767.
- [24] Zappia V, Carteni-Farina M, Cacciapuoti G, et al. Recent studies on the metabolism of 5'-methylthioadenosine[M]//Cavallini D, Gaull G E, Zappia V. *Natural Sulfur Compounds: Novel Biochemical and Structural Aspects*. New York: Springer, 1980: 133–148.
- [25] 张可, 王小玉, 黄淑莹, 等. 斑马鱼腺苷甲硫氨酸脱羧酶基因短片段缺失突变体的构建与鉴定[J]. *成都医学院学报*, 2022, 17(4): 416–420.
Zhang Ke, Wang Xiaoyu, Huang Shuying, et al. Construction and identification of zebrafish adenosylmethionine decarboxylase 1 short segment deletion mutant[J]. *Journal of Chengdu Medical College*, 2022, 17(4): 416–420.
- [26] 方婷婷, 刘光芒, 贾刚, 等. 多胺对动物肠道稳态的调控作用及可能机制[J]. *动物营养学报*, 2016, 28(11): 3400–3407.
Fang Ting, Liu Guangmang, Jia Gang, et al. Polyamines: regulation on intestinal homeostasis and possible mechanisms[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(11): 3400–3407.
- [27] 田颖, 时明慧. 赖氨酸生理功能的研究进展[J]. *美食研究*, 2014, 31(3): 60–64.
Tian Ying, Shi Minghui. The research progress of the physiologic functions of lysine[J]. *Journal of Researches on Dietetic Science and Culture*, 2014, 31(3): 60–64.
- [28] 罗敏蓉, 熊正英. 赖氨酸与运动能力的关系[J]. *四川体育科学*, 2006(3): 43–46.
Luo Minrong, Xiong Zhengying. The relationship between lysine and exercise capacity[J]. *Sichuan Sports Science*, 2006(3): 43–46.
- [29] 陆志范, 周全保. 赖氨酸的药用功能[J]. *药学实践杂志*, 1996(4): 255–256.
Lu Zhifan, Zhou Quanbao. Medicinal function of lysine[J]. *Journal of Pharmaceutical Practice*, 1996(4): 255–256.
- [30] Combs Jr Gerald F, Mcclung J P. Chapter 15—Pantothenic acid[M]//Combs Jr Gerald F, Mcclung J P. *The Vitamins*. 6th ed. London, England: Academic Press, 2022: 435–452.
- [31] 杨延辉, 肖春玲. 泛酸的功能和生物合成[J]. *生命的化学*, 2008, 28(4): 448–452.
Yang Yanhui, Xiao Chunling. The functions and biosynthesis of pantothenate[J]. *Chemistry of Life*, 2008, 28(4): 448–452.
- [32] 于长青, 李丽娜. 花生四烯酸研究进展[J]. *农产品加工·学刊*, 2007(4): 10–12.
Yu Changqing, Li Lina. Research advancement on arachidonic acid[J]. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2007(4): 10–12.
- [33] 方年富, 李弼民, 冷芳. 维甲酸的免疫调节与炎症性肠病[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(27): 2857–2862.
Fang Nianfu, Li Bimin, Leng Fang. Role of retinoic acid in immune regulation: implications in the treatment of inflammatory bowel disease[J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2011, 19(27): 2857–2862.
- [34] Evans T R J, Kaye S B. Retinoids: present role and future potential[J]. *British Journal of Cancer*, 1999, 80(1/2): 1–8.
- [35] Wauben-Penris P, Den Brok J, Cemeus D. Immunomodulatory effects of tretinoin: promotion of Th2 responses[J]. *Immunology Letters*, 1997, 56: 170–171.

Metabolomic analysis of *Trachinotus ovatus* under flow velocity stress

Zhang Jing^{1,2}, Dai Jiayue¹, Lai Xinhao¹, Liu Xuxiang¹, Zhang Hao¹, Wang Xuefeng^{1,2}, Tang Baogui^{1,2,3}

(1. Fishery College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang), Zhanjiang 524025, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Flow velocity is one of the key environmental factors for deep sea aquaculture. In order to further understand the molecular regulation mechanism of golden pompano (*T. ovatus*) under flow velocity stress, the fishes were stressed under the static water, medium flow velocity (54 cm/s) and high flow velocity (90 cm/s), and the LC/MS metabolomics technology was used to explore the changes of endogenous metabolites in the liver to look for differential metabolites and related metabolic pathways. The results show that 51 metabolites in the medium flow velocity group have significant difference with which in the static water and are enriched in 40 pathways, mainly including galactose metabolism, gluconeogenesis, biosynthesis of unsaturated fatty acids, arachidonic acid metabolism, etc. Forty metabolites in the high flow velocity group have significant difference with which in the static water and are enriched in 22 pathways, mainly including biosynthesis of unsaturated fatty acids, pantothenate and CoA biosynthesis, lysine degradation, arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism, etc. Compared with the medium flow velocity group, 31 metabolites in the high flow velocity group have significant difference and are enriched in 12 pathways, mainly including arachidonic acid metabolism, adipocytokine signaling pathway, cysteine and methionine metabolism, etc. Pathway analysis shows that both medium and high flow velocity stress promoted unsaturated fatty acid metabolism, arachidonic acid metabolism and pantothenic acid synthesis. The ability of swimming is improved to against the stress of flow velocity by strengthening metabolism. The medium flow velocity group mainly significantly affected the metabolism of galactose, cysteine and methionine. At this time, more and more energy produced by fish is used for exercise. The high flow velocity group mainly significantly affect the metabolism of L-lysine and retinoic acid, which reveals that the swimming ability of fish may be decreased and some immune functions may be triggered under the high flow velocity stress.

Key words: *Trachinotus ovatus*; velocity stress; metabolome analysis