

DOI: 10.12264/JFSC2024-0290

杂交鲟(达氏鲟♀×施氏鲟♂)不同繁殖力群体间卵巢代谢组分析

李禹韬¹, 王若愚^{1,2}, 马波¹, 曹顶臣¹, 孙志鹏¹, 王念民¹, 许式见², 张颖¹

1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江省冷水性鱼类种质资源及增养殖重点开放实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076;

2. 杭州千岛湖鲟龙科技股份有限公司, 浙江 杭州 311700

摘要: 本研究旨在通过鉴定高/低繁殖力雌性杂交鲟成年个体性腺组织间差异代谢物并对其进行信号通路富集分析, 以确定影响鲟繁殖力的关键代谢物种类及生理代谢途径。测量了 90 尾处于性成熟期的雌性杂交鲟个体[达氏鲟(*Huso dauricus*)♀×施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)♂]体重及卵重, 计算相对卵重系数(卵重/体重), 定义相对卵重系数小于 0.15 为低繁殖力个体, 大于 0.20 则为高繁殖力个体。从上述 90 尾杂交鲟群体中各筛选到 8 尾满足以上阈值标准的高/低繁殖力个体, 采集卵巢组织进行非靶向代谢组学分析。结果表明, 与低繁殖力组相比, 高繁殖力组杂交鲟个体相对卵重系数提高 76.92%, 两组间差异显著($P<0.05$), 说明本研究设定的分组标准合理。另外, 在高/低繁殖力组杂交鲟卵巢组织中共计鉴定到 14 大类小分子代谢物, 其中主要代谢物类别为脂质/类脂质分子、有机酸及衍生物以及有机杂环化合物。基于差异代谢物筛选阈值, 本研究在高/低繁殖力组之间共计鉴定到 11 种差异代谢物, 分别隶属于五大类别。与低繁殖力组相比, 高繁殖力组个体卵巢中(-)维生素 B₂、维生素 B₂、亚精胺、腺苷以及溶血磷脂酰肌醇 22:6 等 8 种差异代谢物显著下调($P<0.05$)。随后对差异表达代谢物进行通路富集分析, 发现氨基酸代谢相关通路(精氨酸和脯氨酸代谢、 β -丙氨酸代谢)和维生素代谢相关通路(维生素 B₂ 代谢、维生素消化与吸收)被显著富集($P<0.05$)。另外发现, 差异代谢物腺苷可参与 14 条代谢途径, 推测其可能对于杂交鲟繁殖力具有核心调控作用。本研究初步阐明了影响雌性杂交鲟产卵量性状的关键分子信号通路并筛选了高繁殖力表型的候选生物标志物, 这将为早期选育高繁殖力杂交鲟群体提供理论基础。

关键词: 杂交鲟; 代谢组学; 繁殖力; 生物标志物

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)02-0139-11

鲟通常指包括鲟科(Acipenseridae)和匙吻鲟科(Polyodontidae)在内的亚冷水性硬骨鱼类。目前共计发现并命名 27 种鲟, 分别隶属于 7 属^[1]。其中鲟属(*Acipenser*)为鲟类群中优势属, 占比鲟类群总数的 62.96%。现生近代鲟生活于 1.45 亿年前的白垩纪地质时代至今^[2], 历经漫长的演化进程已具备适应生境的生理形态结构。目前我国养殖鲟年产量可高达 14.9 万 t, 其中以西伯利

亚鲟(*A. baerii*)以及杂交鲟为主。雌性鲟个体性成熟时期产生的未受精卵细胞, 即备受青睐的“鱼子酱”, 因其高营养和药用价值以及鲜美口感而被赞誉为“水中黑黄金”^[3]。目前中国已成为世界最大的鲟鱼子酱生产国。由此可见, 探究高繁殖力鲟的性腺代谢模式对于优良性状的早期选育以及阐明鲟繁殖生理的生物学机制具有重要意义^[4]。

收稿日期: 2024-10-08; **修订日期:** 2024-12-17.

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项资助项目(CARS-46); 东北地区重点水域渔业资源与环境常态化监测专项(CZ20246707DB); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项资金项目(2023TD59, 2023TD07); 中央级公益性科研院所基本科研业务专项(HSY202302YB).

作者简介: 李禹韬(1997-), 男, 硕士, 研究实习生, 研究方向为鲟鳇繁殖生理学及人工繁育技术推广. E-mail: liyutao@neau.edu.cn

通信作者: 张颖, 研究员, 研究方向为鲟鳇健康养殖技术开发. E-mail: zhangyinghrfri@163.com

目前在实际养殖过程中发现,即使亲本杂交组合、环境营养状况均一致条件下,不同雌性杂交鲟个体间繁殖潜力仍有明显差异^[5]。Song 等^[3]应用基因组重测序筛选了繁殖力决定基因中关键单核苷酸多态性位点来预测俄罗斯鲟(*A. gueldenstaedtii*)产卵量高低。由于基因组序列的稳定性^[6],使得分子标记用于鉴定动物经济性状表型更为可靠,但在开发过程中具有一定的困难,且在实际应用中通常需要结合测序手段,因此分子遗传标记的实际应用较为繁琐。随着基因组技术的革新,有研究利用二代转录组测序技术解析影响水生经济动物繁殖力性状的潜在差异基因。但由于基因表达调控过程复杂且表型性状与基因表达水平间的关联性具有不确定性,因而通过调控特定靶基因表达水平以实现精准分子育种存在技术难题。机体内代谢物集合位于“性状-基因-蛋白质”互作网络的下游位置,可直接反映生物体在不同表型背景下的新陈代谢状态,其组成及相对丰度通常与动物体的特定性状密切相关^[7],因此利用非靶向代谢组学技术对具有差异繁殖力表型的大样本量群体进行代谢物丰度鉴定可以初步筛选影响动物繁殖性能的潜在生物标记物(biomarker),并解析其繁殖性状差异的分子机制^[8]。目前非靶向代谢组学已广泛用于畜禽繁殖潜力决定机制的相关研究中。有报道基于非靶向代谢组学手段发现,嘌呤以及 α -亚麻酸代谢途径中下游代谢物水平的改变将显著影响西门塔尔牛(*Bos taurus*)雄性个体精子活力^[9]。Jia 等^[10]也发现精液中果糖含量的降低可能是导致公山羊繁殖潜力衰退的直接原因。卵巢是雌性动物卵泡生成和成熟的主要场所并负责生殖激素的分泌^[11]。因而,解析卵巢代谢模式对于探究雌性个体高繁殖力的生理学机制具有重要意义。有研究通过多组学联合分析发现 *BMPRII* 基因突变将引起卵巢类固醇合成/卵母细胞减数分裂相关代谢物水平的变化,从而揭示了雌性藏羚羊(*Pantholops hodgsonii*)多胎产仔性状的分子机制^[12]。目前尚未有相关报道比较高/低繁殖力雌性杂交鲟群体间性腺代谢谱表达模式。本研究筛选得到高/低繁殖力杂交鲟个体

后,利用非靶向代谢组学技术比较了二者之间卵巢差异代谢物,旨在筛选高繁殖力性状的决定靶点并为进一步探究其基因调控机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与样品采集

本实验所使用的“鲟龙一号”杂交鲟个体购自浙江省杭州千岛湖鲟龙科技股份有限公司苗种养殖场(衢州,中国)。于 2023 年 12 月选取个体健康,无明显皮肤破损及疾病特征且遗传背景相似的 12 龄雌性杂交鲟成年个体[达氏鳇(*Huso dauricus*)♀×施氏鲟(*A. schrenckii*)♂] 90 尾,体重(38.72 ± 9.54) kg,全部实验个体饲养条件完全一致。经 B 超鉴定及体外穿刺确认所有个体卵巢内卵成熟度已达到Ⅲ期。使用 55 mg/L MS-222 溶液对实验动物进行麻醉后,称取体重,随后对其进行安乐死并准确称量卵巢内全部鲟鱼卵重量[(6663.63 ± 1944.97) g]。待计算卵重(g)/体重(g)比值 θ 后,定义相对卵重系数 $\theta>20\%$ 的个体为高繁殖力组(ZG), $\theta<15\%$ 的杂交鲟个体为低繁殖力组(ZD)。在本实验中共筛选得到高/低繁殖力群体各 8 尾。采集上述 16 尾个体新鲜卵巢组织置于 RNase-free 冻存管中,随后迅速储存于液氮中用于后续实验。本研究得到黑龙江水产研究所动物实验伦理审查委员会的批准开展(20230925-001),本实验各步骤均符合国际实验动物福利指南的要求(2010-63-EU)。

1.2 非靶向代谢组学检测

1.2.1 样品代谢物提取 准确称量 65 mg 冻存卵巢样品于无菌 EP 管中,加入 500 μ L 事先预冷的 80% 甲醇溶液后置于高通量低温研磨仪(E6618,碧云天,中国)中充分研磨,研磨液于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下静置 3.5 h 以沉淀样品中蛋白质。经高速离心后吸取 500 μ L 上清液,冷冻抽干并加入乙腈溶液复溶后将上清液转移至进样瓶中。同时从各样品中抽取 10 μ L 上清液,充分混合后制备 6 个质控(quality control)样本用于后续实验。以上过程均在冰浴条件下完成。

1.2.2 代谢物色谱分离 本实验采用 1.8 μ m 反相层析色谱柱 ACQUITY UPLC T3 (沃特世,美国)和 Vanquish Flex UPLC 液相色谱仪(赛默飞世尔,美国)进行卵巢组织中代谢物的色谱分离。层析柱温

度设置为(40±0.5) ℃, 层析流速设置为 0.3 mL/min。5 mmol/L 乙酸铵-乙酸混合溶液作为流动相 A, 乙腈作为流动相 B。液相梯度洗脱参数根据高效液相色谱仪使用说明书进行。

1.2.3 质谱信号采集 本实验使用赛默飞世尔 Q-Exactive 质谱检测平台对 16 个待检样品分别在 +4000 V 正离子、-4500 V 负离子模式下各采集 1 次质谱信号。源温度设置为 350 ℃。基于“数据依赖性采集”模式收集质谱数据信号, 一级分辨率为 70000; 质荷比采集范围为 70~1050 Da; 目标自动增益控制值设定为 3×10^6 ; 最大注入时间 100 ms。随后从一级质谱图中筛选累计信号强度大于 100000 的前 3 个信号离子进行二级扫描, 具体参数如下: 分辨率为 17500; 最大注入时间 60 ms; 目标自动增益控制值设定为 1×10^5 ; 动态排除时间 6 s。质谱信号采集过程中每间隔 3 个样品采集一次质控样品的质谱信号以确保仪器检测状态的稳定性。本实验所产生的原始-.raw 质谱文件及代谢物注释文件已存储至代谢组学共享数据库(No. MTBLS10787)。

1.2.4 原始下机数据分析 首先将原始下机数据转化为 mzXML 文件, 随后基于 XCMS 软件对质谱图进行峰提取, 剔除测试样品中缺失率 $\geq 80\%$ 的代谢物离子以及质控样品中变异系数 ≥ 0.4 的异常波动离子峰后, 利用 metaX 工具鉴定一级和二级代谢物并将各离子质荷比与 HMDB 数据库已有数据集进行比对, 若观测值与数据库值之间的质荷比差值不高于 10 ppm, 则对该代谢物分子进行注释。对离子原始强度值进行中值归一化处理后使用 ropls 程序包进行偏最小二乘法判别分析并进行 200 次交叉验证以确认模型拟合情况, 随后计算各代谢物变量投影重要度(VIP)。差异代谢物定义如下: 差异倍数大于 1.2 或小于 0.8; VIP 值不小于 1; P 值小于 0.05。另外基于 R 包对代谢物丰度矩阵进行主成分分析以及皮尔逊相关性检验。随后基于京都基因与基因组百科全书(KEGG)公共数据库对所有差异代谢物进行信号通路富集分析, 并利用基因集富集分析判别各通路的具体调控情况。

1.3 数据处理与统计分析

本实验中全部数据均表达为平均值±标准差

($\bar{x}\pm SD$)。数据统计分析过程使用 SAS 9.4 软件完成。经 Shapiro-Wilk 检验证实原始实验数据符合正态分布后进行 Levene's 方差齐性检验。当实验数据方差具有齐性时, 基于独立样本 t 检验分析高繁殖力组与低繁殖力组之间体重、 θ 值以及代谢物相对丰度的差异显著性。显著性水平阈值 α 选取为 0.05。使用 Microsoft Office 2021 软件绘制柱形图, 同时利用 R 工具包对代谢组数据进行统计分析以及图形可视化。具体程序运行代码及脚本信息由联川生物科技公司(杭州, 中国)提供技术支持。

2 结果与分析

2.1 高/低繁殖力杂交鲟群体生长指标及产卵量差异

如表 1 所示, 不同繁殖力杂交鲟群体间体重无统计学差异($P>0.05$)。相反, 与 ZD 组相比, ZG 组个体相对卵重系数显著提高 76.92% ($P<0.05$), 说明本实验对于高/低繁殖力个体的定义标准合理。

表 1 高/低繁殖力杂交鲟群体生长性能及产卵量
Tab. 1 Growth performance and egg production amount of hybrid sturgeon with high/low fertility

n=8; $\bar{x}\pm SD$			
组别 group	体重/kg body weight	卵重量/g egg weight	θ 值 θ value
ZD	43.20±7.16 ^a	5583.00±1182.40	0.13±0.02 ^b
ZG	34.23±9.88 ^a	7744.25±2009.73	0.23±0.02 ^a

注: 同列数据右上角不同小写字母表示两组间存在显著差异 ($P<0.05$). ZD: 低繁殖力组; ZG: 高繁殖力组。

Notes: Different lowercase letters in the upper right corner of data in the same column mean there was significant difference between two groups ($P<0.05$). ZD: low fertility group; ZG: high fertility group.

2.2 杂交鲟卵巢代谢物原始丰度数据统计

本实验在正、负离子扫描模式下分别采集到 9706、4980 个代谢物原始质谱信号, 经剔除缺失值、偏离数据等异常数据后对原始数据进行偏最小二乘法判别分析(图 1)。由图 1a 可见, ZG 组与 ZD 组之间完全分离, 且各组内 8 个个体彼此聚集, 说明 ZD 组与 ZG 组之间卵巢组织代谢物组成结构存在明显差异, 且各组内样品代谢物表达模式波动较小。主成分 1、主成分 2 分别占数据集总方差的 12.98%、10.29%。对以上模型进行置换检

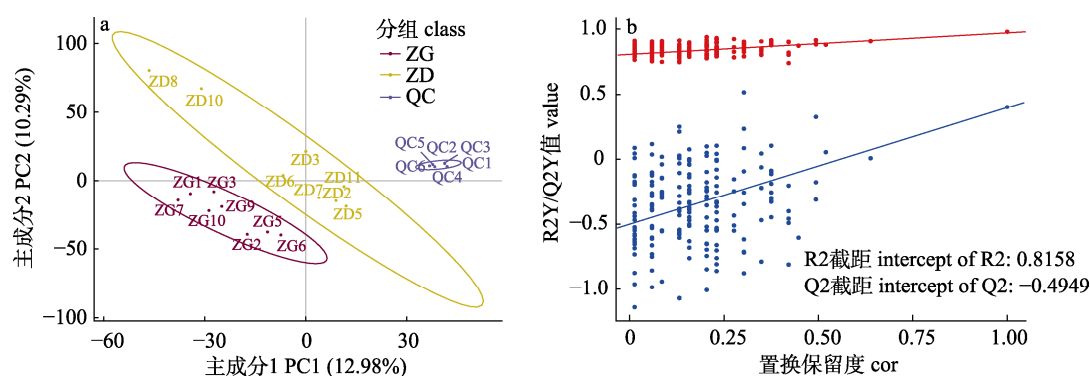


图 1 高/低繁殖力杂交鲟卵巢代谢物偏最小二乘法判别分析

a. 模型得分图。ZD: 低繁殖力组(红); ZG: 高繁殖力组(黄); QC: 质控样品(紫); ZG/ZD 组: $n=8$; QC 组: $n=6$ 。b. 置换检验图。红色: R^2 回归线; 蓝色: Q^2 回归线。

Fig. 1 Partial least squares discriminant analysis for the ovarian metabolites in hybrid sturgeon with high/low fertility

a. Score diagram for model. ZD: low fertility group (red); ZG: high fertility group (yellow); QC: samples used for quality control test (purple). ZG/ZD group: $n=8$; QC group: $n=6$. b. Diagram for permutation test.

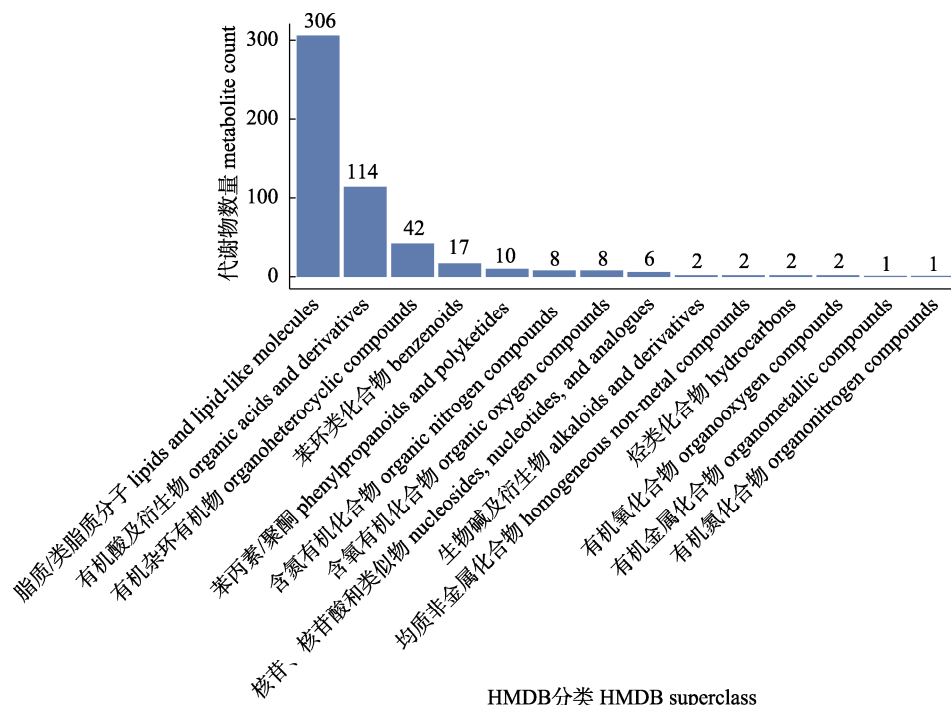
Red: regression line for R^2 ; blue: regression line for Q^2 .

验发现(图 1b), Q^2 回归方程斜率大于 0, 且所有 R^2 检验点均位于 Q^2 上方, 说明模型无过拟合现象且训练集、测试集具有稳健性。另外模型 $P_{(Q^2)}$ 值为 0.005, 说明此模型对于两组间代谢物结构的分离趋势具有可靠的解释度。

2.3 杂交鲟卵巢代谢物类别鉴定

对原始数据质控和归一化后, 将代谢物离子

的质荷比及质谱图与在线公共数据库进行比对。结果发现, 在 ZD 和 ZG 组杂交鲟个体卵巢组织中共计鉴定到一级代谢物 8889 种, 二级代谢物 571 种。基于 HMDB 数据库对所有二级代谢物归类后发现(图 2), 两组杂交鲟卵巢中主要代谢物类别为脂质/类脂质分子、有机酸及衍生物、有机杂环化合物。



HMDB分类 HMDB superclass

图 2 杂交鲟卵巢组织二级代谢物注释

HMDB: 人类代谢组数据库。

Fig. 2 Annotation for secondary metabolites in the ovary tissue of hybrid sturgeon

HMDB: Human metabolome database.

2.4 高/低繁殖力杂交鲟群体卵巢差异代谢物鉴定

基于 1.2.4 所述差异代谢物阈值设定标准, 在 ZD 组与 ZG 组卵巢组织间共计筛选出 11 种差异代谢物(图 3a), 其中 3 种上调, 8 种下调。以上 11 种差异代谢物隶属于有机杂环化合物、有机氮化合物、有机酸及衍生物、脂质/类脂分子以及核苷、核苷酸及类似物这五大类别。图 3b 展示了 11 种卵巢差异代谢物相对丰度的具体调控情况。其中

与 ZD 组相比, ZG 组杂交鲟个体卵巢内 15-O-(11Z, 13E)-二十碳二烯酸、前列腺素 H1、乙酸环己基乙酯均显著上调($P<0.05$), 而(-)维生素 B2、维生素 B2、亚精胺、腺苷、L-亮氨酰-L-亮氨酸甲酯、2,2,6,10,14-五甲基十五烷酸、溶血磷脂酰肌醇 22 : 6、L-丙氨酰-L-正亮氨酸则明显下调($P<0.05$)。基于所有代谢物的显著性水平, 筛选 P 值最小的 5 种代谢物进行接收者操作特征分析, 结果发现

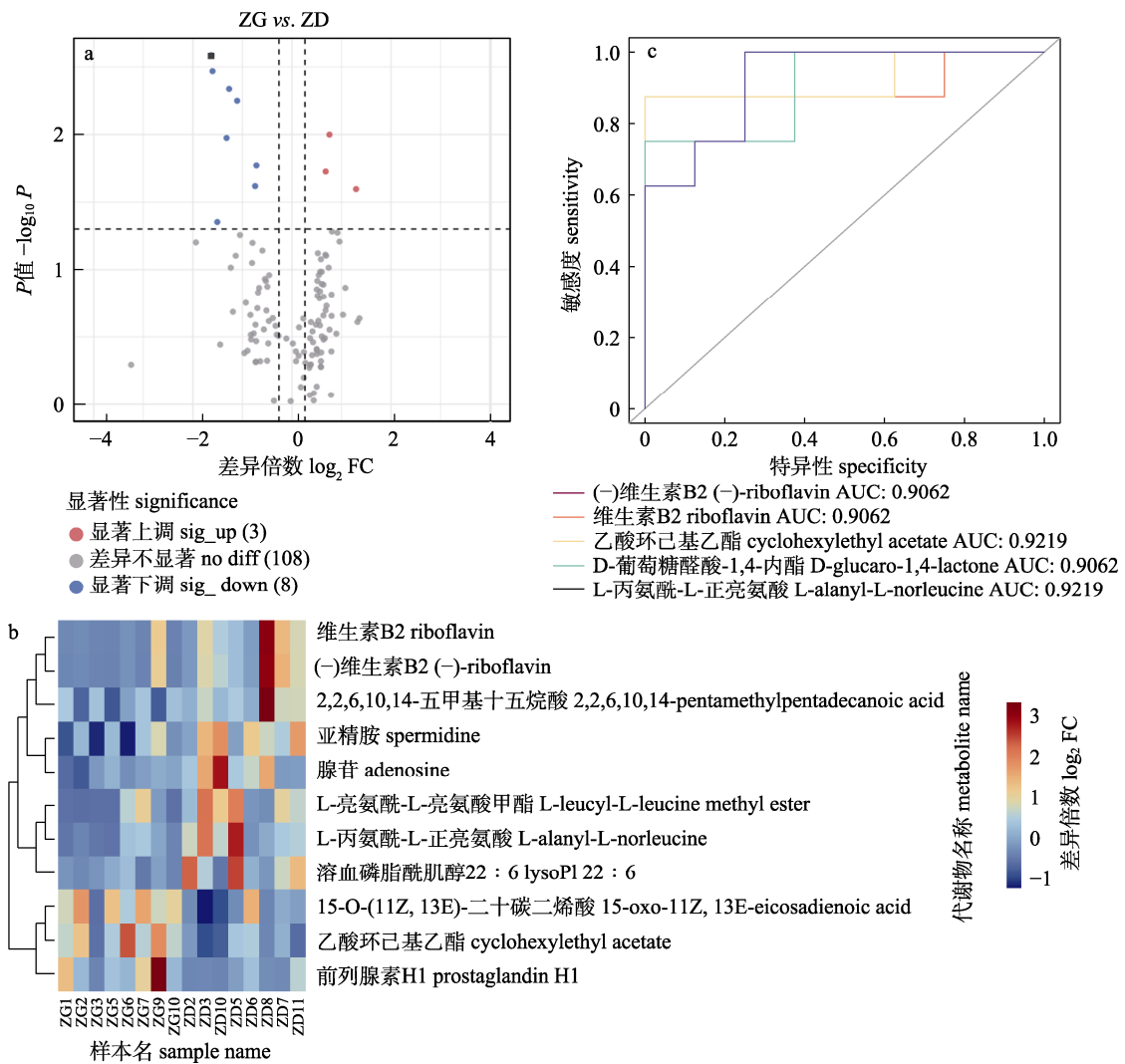


图 3 高/低繁殖力杂交鲟卵巢差异代谢物鉴定

a. 差异代谢物火山图; 红色: 显著上调差异代谢物; 蓝色: 显著下调差异代谢物. FC: 差异倍数. ZD: 低繁殖力组; ZG: 高繁殖力组. b. 差异代谢物热图; 热图颜色代表各差异代谢物相对丰度. 颜色从红到蓝表示相对丰度降低($n=8$). FC: 差异倍数. c. 接收者操作特征分析. AUC: 接收者操作特征曲线下面积.

Fig. 3 Identification for differential metabolites in the ovary tissue of hybrid sturgeon with high/low fertility
a. Volcano for differential metabolites. Red: significantly up-regulated differential metabolites; blue: significantly down-regulated differential metabolites. FC: fold change. ZD: low fertility group; ZG: high fertility group. b. Heatmap for differential metabolites. Colors for heatmap represent the relative abundance of each differential metabolites. Color from red to blue means the relative abundance is decreased ($n=8$). FC: fold change. c. Receiver operating characteristic analysis. AUC: area under receiver operating characteristic curve.

(-)维生素 B2、维生素 B2、乙酸环己基乙酯、L-丙氨酰-L-正亮氨酸的 ROC 曲线下面积均大于 0.9, 说明以上 4 种差异代谢物均具有良好的作为生物标志物的潜力(图 3c)。

2.5 卵巢组织差异代谢物通路富集分析

基于 KEGG 公共数据库对卵巢组织中 11 种差异代谢物进行信号通路富集分析。所有差异表达代谢物可富集到 25 条 KEGG 通路中, 其中 20 条通路的组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。如

图 4a 所示,“ABC 转运体”具有最多的差异代谢物数量以及最明显的差异显著性($P = 1.0 \times 10^{-6}$)。与结果 2.4 相似, 前 20 条 KEGG 通路中“维生素 B2 代谢”、“维生素消化与吸收”显著富集($P < 0.05$)。另外发现氨基酸代谢相关信号通路(β -丙氨酸代谢)被显著富集。因此, 基于基因集富集分析探究卵巢内微量氨基酸类代谢物对于雌性杂交鲟繁殖力的信号调控作用(图 4b)。结果发现,“精氨酸和脯氨酸代谢”以及“ β -丙氨酸代谢”这两条氨基酸代

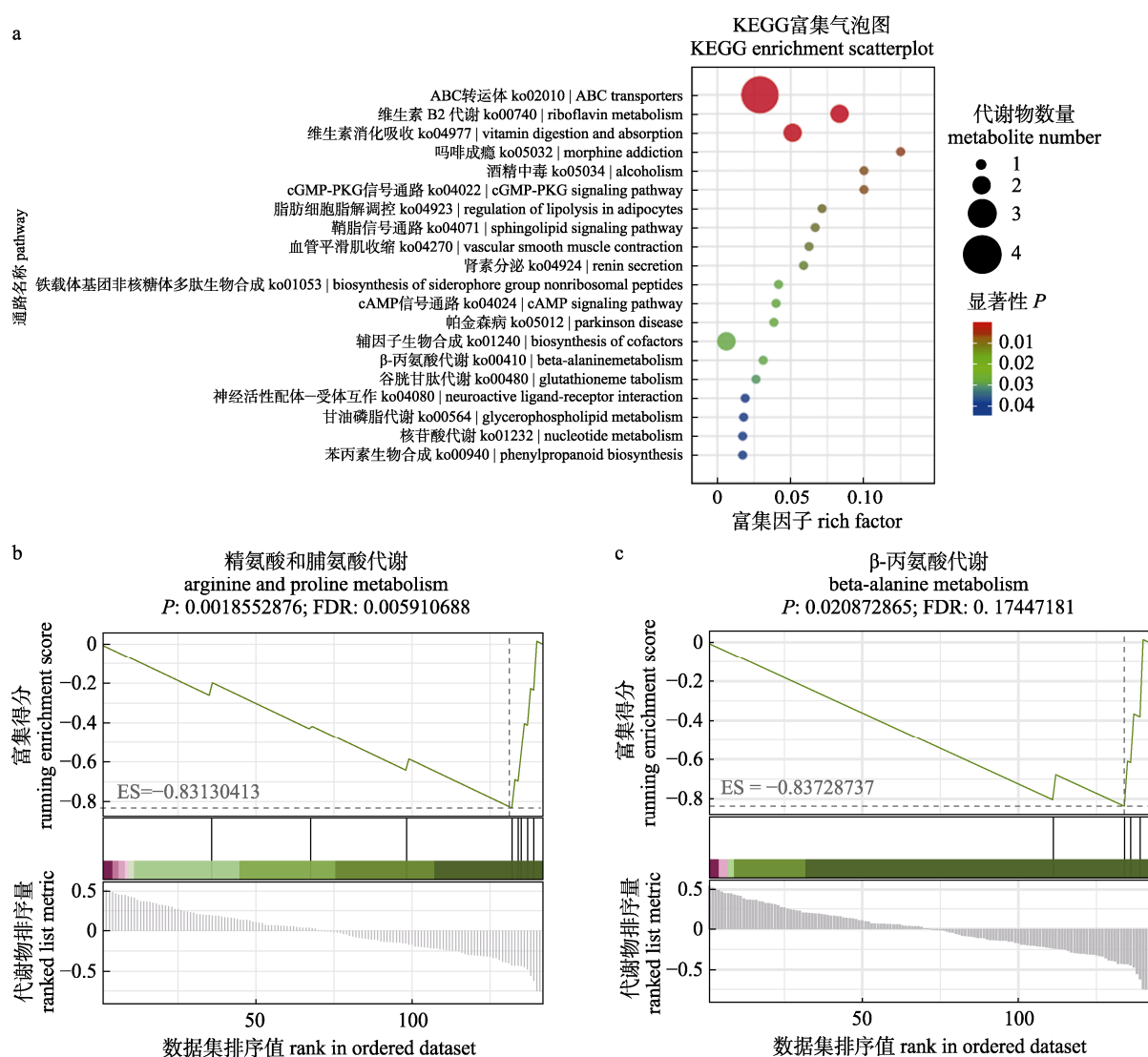


图 4 KEGG 通路富集分析

a. KEGG 富集分析气泡图。圆圈大小代表富集到该通路的显著差异代谢物数量。颜色从蓝到红代表 P 值降低, 即显著性水平增加。b-c. 基因集富集分析。粉色: 上调代谢物; 绿色: 下调代谢物。ES: 代谢物集富集得分。

Fig. 4 Enrichment analysis for KEGG pathway

a. Scatter plot for KEGG enrichment analysis. Size of circle represents the count of significantly differential metabolite that mapped to each pathway. Color from blue to red represents the declined P value (significance level is elevated). b-c. GSEA analysis. Pink: up-regulated metabolite; green: down-regulated metabolite. ES: enrichment score for the metabolite cluster.

谢相关通路亦被显著富集($P<0.05$, 富集得分 $ES<0$)。此外发现腺苷、亚精胺、维生素 B2 和溶血磷脂酰肌醇 22:6 分别参与 14、8、6、1 条信号通路,说明腺苷可能对于雌性杂交鲟个体的产卵量性状具有较为重要的调控作用,可通过多种代谢途径影响鲟鱼性成熟期产卵量。

2.6 卵巢组织差异代谢物相关性分析

基于 Pearson 算法,计算 11 种卵巢差异代谢物两两之间相关系数。筛选相关系数大于 0.7 的代谢物对绘制相关性网络(图 5)。由图可知,2,2,6,10,14-五甲基十五烷酸、维生素 B2 以及(-)维生素 B2 之间均存在显著正相关关系($P<0.05$),且 L-亮氨酰-L-亮氨酸甲酯与 L-丙氨酰-L-正亮氨酸之间的相关性关系最强烈($r=0.9202$)。

3 讨论

3.1 精氨酸/脯氨酸代谢对于杂交鲟繁殖力性状的影响

基于细胞信号通路富集分析发现,在本研究

中多条氨基酸代谢相关通路(“精氨酸和脯氨酸代谢”和“ β -丙氨酸代谢”)被显著富集。氨基酸代谢参与鱼类多项生理活动的靶向调控作用^[13-14],主要负责生物活性物质及蛋白质合成、早期胚胎供能以及细胞信号传递等^[15]。目前多项研究已经证实氨基酸代谢与动物繁殖生理密切相关^[9],例如范子玲等^[16]基于代谢组学技术发现处于卵巢休止期的奶牛,其血浆中差异代谢物参与多项氨基酸代谢过程。 β -丙氨酸代谢过程对于动物体多项生理活动均具有重要作用^[17]。 β -丙氨酸是雌性脊椎动物卵泡液的重要组分^[18],可通过卵巢颗粒细胞摄取,随后转运至卵母细胞内,主要参与分泌蛋白/核苷酸合成、生物膜渗透压调节以及细胞解毒等过程^[19]。另外,通过体外实验还证实了 β -丙氨酸代谢与卵泡的成熟诱导有关^[20]。与本实验结果相同,处于卵巢休止期的初产荷斯坦奶牛(Holstein-Friesian cattle)与正常发情个体相比,其差异代谢物亦显著富集到“ β -丙氨酸代谢”通路^[6]。以上结果表明,杂交鲟卵巢颗粒细胞中 β -丙氨酸代谢产物

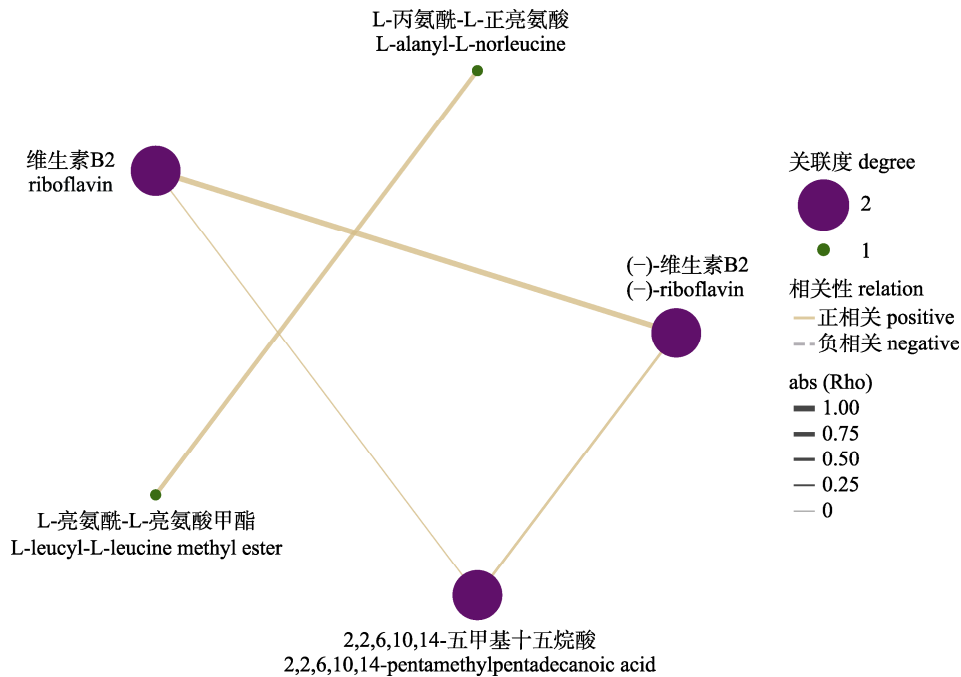


图 5 差异代谢物相关性网络

圆圈大小: 各代谢物关联度; 线型: 相关性. 实线代表正相关; 虚线代表负相关.

线条粗细: 相关系数. abs (Rho): 绝对相关系数.

Fig. 5 Correlation interaction network between differential metabolites

Circle size: association degree for each metabolite. Line type: correlation type. Solid line: positive correlation relationship. Dotted line: negative correlation relationship. Line thickness: correlation coefficient. abs (Rho): absolute correlation coefficient.

可能影响初级卵母细胞生成和成熟,从而调控雌性杂交鲟的繁殖潜力。据此可以推测,高产卵量杂交鲟个体卵巢颗粒细胞可能通过提高 β -丙氨酸代谢转运效率并促进卵巢内原始生殖细胞的蛋白质/核酸合成,从而诱导卵原细胞加速成熟。Menezes 等^[21]也利用代谢组学技术证实荷斯坦公牛精子活力高低与“ β -丙氨酸代谢”调控有关。除此之外,本研究结果基于基因集富集分析发现精氨酸和脯氨酸代谢过程也影响着杂交鲟产卵量性状。精氨酸作为机体主要的供氮氨基酸,主要通过尿素循环参与胞内蛋白合成、载体通道转运以及细胞分裂等生理功能^[22]。目前已证实精氨酸代谢对于中华鲟(*Acipenser sinensis*)雌性个体的卵巢发育具有关键调控作用^[23]。精氨酸代谢通路中的某些关键代谢物,如精氨酸和脯氨酸的水平在雌性鲟鱼由性成熟 II 期向 III 期转变过程中不断增加,说明精氨酸/脯氨酸可作为鲟鱼卵巢发育成熟的预测标志物。此外精氨酸和脯氨酸可通过鸟氨酸循环最终生成腐胺和亚精胺,这些小分子物质负责调控雌性个体性腺发育早期的细胞增殖分化过程并参与细胞凋亡诱导的卵泡闭锁^[24]。在本研究中,高繁殖力杂交鲟个体卵巢中亚精胺水平明显下调,说明卵细胞的大量形成需要消耗更多亚精胺以持续诱导卵巢发育和卵泡成熟。最近一项研究发现,精氨酸的次级代谢产物磷酸肌酸可在性腺发育过程中持续产生 ATP,从而满足中华鲟(*Acipenser sinensis*)次级卵母细胞形成和成熟时期对于能量物质的高代偿性需求^[25]。另外精氨酸和脯氨酸通过酶促反应生成的一氧化氮与雌激素合成以及受精作用有关^[26]。由此推测精氨酸和脯氨酸代谢对于动物卵泡发育和卵细胞的成熟诱导具有重要作用^[27]。本研究结果发现,高/低产量杂交鲟群体间卵巢微量代谢物显著富集到“精氨酸和脯氨酸代谢”通路。这说明高繁殖力杂交鲟个体可通过精氨酸次级代谢产物调控卵巢发育进程并为卵巢内原始卵泡和卵母细胞的增殖分化提供能量储备,从而促进成熟卵细胞的形成。与本研究结果相似,有报道发现奶牛卵巢处于休止期前后,其血浆中差异代谢物丁二胺被显著富集到“精氨酸和脯氨酸代谢”通路中^[16]。由此可见,精氨酸和脯氨酸代谢调控可能与

卵巢生理状态有关,从而直接影响雌性杂交鲟卵母细胞的发育和成熟过程。

3.2 腺苷对于杂交鲟繁殖力性状的影响

本研究基于 KEGG 数据库将各差异代谢物富集到不同信号通路中。结果发现,腺苷共参与 14 条代谢途径,明显多于其他差异代谢物。这表明腺苷在调控雌性杂交鲟个体繁殖力方面可能发挥核心作用,其变化动态直接决定着雌性杂交鲟群体产卵量表型。腺苷由腺嘌呤 N-9 与核糖 C-1 通过 β -糖苷键连接形成。作为嘌呤类化合物的降解产物,目前发现腺苷与细胞程序性死亡的诱导具有关联性^[28]并可通过细胞内负反馈调节机制参与抗应激应答^[29]。例如有研究发现慢性微塑料摄入可诱导动物体肝脏中腺苷水平升高并提高抗氧化酶活性^[30]。此外,腺苷水平还与动物体繁殖潜力密切相关。腺苷是原始生殖细胞形成过程中能量物质 ATP 合成的中间体并为生殖细胞中腺嘌呤的合成提供原料^[31]。另外,腺苷与雄性哺乳动物精巢中次级精母细胞的生成及精子获能状态密切相关^[32]。有研究证实绵羊精液冷冻后腺苷含量显著下降,推测可能与冷冻损伤导致的线粒体氧化应激有关,这将降低精子活力并影响其繁殖潜力^[31]。与之前的研究结果一致,本研究也发现高繁殖力杂交鲟卵巢中腺苷水平明显下降,说明在性成熟时期,卵巢抗氧化应激能力减弱以减少 ATP 过度消耗,从而为后期卵细胞生成过程代偿性补充能量。另外性成熟期腺苷水平的下降还可抑制杂交鲟卵巢内卵母细胞凋亡,从而有利于成熟卵细胞的形成。

3.3 维生素 B2/溶血磷脂酰肌醇对于杂交鲟繁殖力性状的影响

本研究也发现高繁殖力杂交鲟卵巢中维生素 B2、(-)维生素 B2 以及溶血磷脂酰肌醇 22:6 水平均显著下调。维生素 B2 是脊椎动物线粒体中黄素单核苷酸等辅酶的合成前体^[33],可间接参与呼吸链的组成和脂肪酸氧化从而与细胞内 ATP 合成有关。在本实验中,高繁殖力组卵巢维生素 B2/(-)维生素 B2 水平的下降提示在高产卵量杂交鲟性成熟期卵巢需要消耗更多的维生素 B2 类物质以加速辅酶合成,从而促进有氧呼吸并产生 ATP 以供卵细胞合成营养物质。此外卵巢细胞表

面广泛分布维生素 B2 载体蛋白^[34], 目前发现维生素 B2 参与卵母细胞营养供给以及腔前卵泡转化过程。维生素 B2 缺乏会明显造成卵巢生理周期及卵泡发育停滞, 并影响雌激素分泌^[35]。由此可知, 杂交鲟卵巢中维生素 B2 水平直接参与卵细胞的成熟诱导以及卵巢生理状态调控, 从而影响性成熟期的产卵量。此外, KEGG 信号通路分析也发现“维生素 B2 代谢”以及“维生素消化与吸收”被显著富集, 说明维生素 B2 代谢与杂交鲟产卵量表型密切相关。本实验结果发现, 在高/低繁殖力杂交鲟卵巢组织间差异代谢物溶血磷脂酰肌醇 22:6 被显著富集到“甘油磷脂”信号通路中。溶血磷脂酰肌醇 22:6 属于甘油磷脂中的重要成员, 发挥多重生理效应。目前发现溶血磷脂酰肌醇是生殖细胞生物膜系统的主要组分, 其中富含对活性氧敏感的多不饱和脂肪酸^[31]。与之前报道一致^[31], 本研究发现高繁殖力杂交鲟群体卵巢中溶血磷脂酰肌醇 22:6 含量显著下调, 推测可能因为高产卵量杂交鲟个体卵巢代谢活动旺盛且抗氧化能力减弱, 从而产生了更多的氧自由基以激活脂质过氧化反应, 造成细胞膜应激以及溶血磷脂酰肌醇的降解^[30]。然而, 关于溶血磷脂酰肌醇调控杂交鲟繁殖性能的具体分子机制仍需进一步阐明。

3.4 本研究的局限性及未来展望

本研究选取高/低繁殖力杂交鲟个体各 8 尾初步筛选了影响鲟鱼繁殖力的 11 种潜在代谢物。由于动物体繁殖性能的生理调控过程较为复杂, 通常涉及多条代谢途径的协同参与且不同个体间代谢物水平波动程度较大, 因此在未来的研究中应选取更多的繁殖力差异杂交鲟个体以准确筛选决定其繁殖力性状的关键代谢物。另外本研究仅采集了雌性个体的卵巢组织进行非靶向代谢组学分析。众所周知, 血清中性激素水平对于卵细胞生成亦具有重要作用。在进一步研究中, 将整合性腺及血清代谢组学结果综合筛选杂交鲟高繁殖力表型的候选生物标记物, 从而实现优良性状的早期选育。

4 结论

本研究基于非靶向代谢组学技术综合比较高/低繁殖力杂交鲟群体卵巢代谢谱特征, 筛选了

影响雌性杂交鲟产卵量的潜在生物标志物。 β -丙氨酸、精氨酸和脯氨酸代谢途径可能直接影响杂交鲟卵巢生理状态从而决定性成熟期产卵量高低。此外, 腺苷为原始卵泡的成熟提供了物质保障并在产卵量性状决定中起到核心调控作用。本研究初步阐明了雌性杂交鲟群体产卵量差异的潜在分子机制并为后续精准选育高产卵量个体提供了理论基础。

参考文献:

- [1] Song H L, Dong T, Wong W, et al. Whole-genome resequencing of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) reveals selection signatures associated with caviar color[J]. Aquaculture, 2024, 582: 740545.
- [2] Wang R Y, Sun B, Cao D C, et al. Gut microbiota of *Huso dauricus* and *Acipenser schrenckii* populations with different growth rates[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2023, 30(9): 1093-1101. [王若愚, 孙博, 曹顶臣, 等. 达氏鲟和施氏鲟生长差异群体肠道菌群特征[J]. 中国水产科学, 2023, 30(9): 1093-1101.]
- [3] Song H, Zhu B, Dong T, et al. Whole-genome resequencing reveals selection signatures for caviar yield in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*)[J]. Aquaculture, 2023, 568: 739312.
- [4] Gille D A, Van Eenennaam J P, Famula T R, et al. Finishing diet, genetics, and other culture conditions affect ovarian adiposity and caviar yield in cultured white sturgeon (*Acipenser transmontanus*)[J]. Aquaculture, 2017, 474: 121-129.
- [5] Sicuro B. The future of caviar production on the light of social changes: A new dawn for caviar?[J]. Reviews in Aquaculture, 2019, 11(1): 204-219.
- [6] Bai Y L, Song Y X, Zhang J, et al. GC/MS and LC/MS based serum metabolomic analysis of dairy cows with ovarian inactivity[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 8: 678388.
- [7] Cheng S S, Shah S H, Corwin E J, et al. Potential impact and study considerations of metabolomics in cardiovascular health and disease: A scientific statement from the American heart association[J]. Circulation: Cardiovascular Genetics, 2017, 10(2): e000032.
- [8] Velho A L C, Menezes E, Dinh T, et al. Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma[J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0195279.
- [9] Luo X M. Metabolomic and proteomic differences of bovine semen with different sperm motility[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2022. [罗鑫茂. 不同精子活力的牛精液代谢组学及蛋白组学差异研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2022.]
- [10] Jia B, Liang J, Lyu C, et al. The characteristics of proteome

- and metabolome associated with contrasting sperm motility in goat seminal plasma[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 15562.
- [11] McGee E A, Hsueh A J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles[J]. Endocrine Reviews, 2000, 21(2): 200-214.
- [12] Han B Y, Tian D H, Li X, et al. Multiomics analyses provide new insight into genetic variation of reproductive adaptability in Tibetan sheep[J]. Molecular Biology and Evolution, 2024, 41(3): msae058.
- [13] Zhang J C, Kong J, Cao J W, et al. Reproductive ability disparity in the Pacific whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*): Insights from ovarian cellular and molecular levels[J]. Biology, 2024, 13(4): 218.
- [14] Hou Y Q, YIN Y L, Wu G Y. Dietary essentiality of “nutritionally non-essential amino acids” for animals and humans[J]. Experimental Biology and Medicine, 2015, 240(8): 997-1007.
- [15] Finn R N, Fyhn H J. Requirement for amino acids in ontogeny of fish[J]. Aquaculture Research, 2010, 41(5): 684-716.
- [16] Fan Z L, Xu C C, Shu S, et al. Plasma metabolic profiling of postpartum dairy cows with inactive ovaries based on GC/MS technique[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(15): 3042-3051. [范子玲, 许楚楚, 舒适, 等. 基于 GC/MS 技术的产后卵巢静止奶牛血浆代谢谱分析[J]. 中国农业科学, 2017, 50(15): 3042-3051.]
- [17] Xie J P, Kalwar Q, Yan P, et al. Effect of concentrate supplementation on the expression profile of miRNA in the ovaries of yak during non-breeding season[J]. Animals, 2020, 10(9): 1640.
- [18] Sinclair K D, Lunn L A, Kwong W Y, et al. Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in-vitro embryo development[J]. Reproductive BioMedicine Online, 2008, 16(6): 859-868.
- [19] Humpherson P G, Leese H J, Sturmey R G. Amino acid metabolism of the porcine blastocyst[J]. Theriogenology, 2005, 64(8): 1852-1866.
- [20] Matoba S, Bender K, Fahey A G, et al. Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential[J]. Reproduction, Fertility, and Development, 2014, 26(2): 337-345.
- [21] Menezes E B, Velho A L C, Santos F, et al. Uncovering sperm metabolome to discover biomarkers for bull fertility[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): Article No.714.
- [22] Agostinelli E, Marques M P M, Calheiros R, et al. Polyamines: Fundamental characters in chemistry and biology[J]. Amino Acids, 2010, 38(2): 393-403.
- [23] Zhu Y H. Study on nutrient deposition, metabolic response of the body and related mechanism during ovary development stages II-IV in Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020. [朱艳红. 中华鲟卵巢发育 II-IV 期养分沉积、机体代谢响应及相关机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.]
- [24] Kawano K, Masuda H, Yano M, et al. Altered nitric oxide synthase, arginase and ornithine decarboxylase activities, and polyamine synthesis in response to ischemia of the rabbit detrusor[J]. The Journal of Urology, 2006, 176(1): 387-393.
- [25] Kolpakova M E, Veselkina O S, Vlasov T D. Creatine in cell metabolism and its protective action in cerebral ischemia[J]. Neuroscience and Behavioral Physiology, 2015, 45(4): 476-482.
- [26] Pires P R L, Santos N P, Adona P R, et al. Endothelial and inducible nitric oxide synthases in oocytes of cattle[J]. Animal Reproduction Science, 2009, 116(3-4): 233-243.
- [27] Liu L L. Transcriptome analysis of Arginine metabolism pathway in pre-hierarchical follicles of Zi geese[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016. [刘璐璐. 籽鹅等级前卵泡中精氨酸代谢通路的转录组学分析[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.]
- [28] Lawton K A, Berger A, Mitchell M, et al. Analysis of the adult human plasma metabolome[J]. Pharmacogenomics, 2008, 9(4): 383-397.
- [29] Pasquini S, Contri C, Borea P A, et al. Adenosine and inflammation: Here, there and everywhere[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(14): 7685.
- [30] Xie P F, Li P C, Zhu X S, et al. Hepatotoxic of polystyrene microplastics in aged mice: Focus on the role of gastrointestinal transformation and AMPK/FoxO pathway[J]. Science of the Total Environment, 2024, 917: 170471.
- [31] Jiang L Y, Zhang Y R, Jia S T, et al. Comparative analysis of metabonomics of semen before and after freezing in East Friesian dairy sheep[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56(8): 7-14. [姜璐瑶, 张迎锐, 贾思潼, 等. 东弗里生奶绵羊精液冷冻前后代谢组学比较分析[J]. 畜牧与兽医, 2024, 56(8): 7-14.]
- [32] Bellezza I, Minelli A. Adenosine in sperm physiology[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2017, 55: 102-109.
- [33] 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.
- [34] Bhat K G, Malhotra P, Karande A A, et al. Immunohistochemical localization of riboflavin carrier protein in testicular cells of mammals[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 1995, 33(1): 12-16.
- [35] Kim K, Mills J L, Michels K A, et al. Dietary intakes of vitamin B-2 (riboflavin), vitamin B-6, and vitamin B-12 and ovarian cycle function among premenopausal women[J]. Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics, 2020, 120(5): 885-892.

Comparing ovarian metabolome between hybrid sturgeon population (*Huso dauricus*♀×*Acipenser schrenckii*♂) with differential fertility

LI Yutao¹, WANG Ruoyu^{1,2}, MA Bo¹, CAO Dingchen¹, SUN Zhipeng¹, WANG Nianmin¹, XU Shijian², ZHANG Ying¹

1. Key Open Laboratory of Cold Water Fish Germplasm Resources and Breeding of Heilongjiang Province; Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150076, China;

2. Hangzhou Qiandaohu Xunlong Sci-Tech Co., Ltd., Hangzhou 311700, China

Abstract: Hybrid sturgeon is regarded as a critical aquatic economic species, whose high/low fertility (spawning yield) is associated with the economic development of the caviar industry. However, in the aquaculture production process, female hybrid sturgeon have a great differential spawning yield in the sexual maturity period. Meanwhile, there are a series of technical barriers to early breeding in hybrid sturgeon populations with high egg yields. Therefore, it is essential to explore the potential metabolism pathways that affect the fertility of hybrid sturgeon and filter the biomarkers for the high spawning yield phenotype in the female hybrid sturgeon populations. This can benefit the understanding of the biological mechanisms of fertility differences in hybrid sturgeon and accelerate the sustainable development of the sturgeon breeding industry in China. However, relatively few reports have clarified the expression pattern of ovarian metabolic profile between the sturgeon populations with high/low fertility. In the sexual maturity period, 90 hybrid sturgeon individuals (*Huso dauricus*♀ × *Acipenser schrenckii*♂) had their egg weight measured using a minimally invasive laparotomy method. Based on the real egg weight of each hybrid sturgeon, the present study defined the high/low fertility standard as follows: the ratio of egg weight/body weight (θ) less than 0.15 was classified into the low fertility group while θ more than 0.20 was classified into the high fertility group. In the formal experiment, a total of sixteen hybrid sturgeon with high (eight) and low (eight) fertility phenotypes were selected from the above population. Subsequently, fresh ovary tissues were collected to perform untargeted metabonomics analysis after recording the body weight and egg weight of each hybrid sturgeon. Bioinformatics methods and public metabolite database were applied to identify the metabolite category and corresponding relative abundances. The dominant metabolite categories in the hybrid sturgeon ovaries were lipids and lipid-like molecules, organic acids and derivatives, and organoheterocyclic compounds. Based on the threshold value levels reported in the previous studies, a total of eleven differential metabolites were identified between high (low) fertility groups. According to the blast results provided by the public metabolite deposition database, these eleven differentially expressed metabolites belonged to five categories including organoheterocyclic compounds, organic nitrogen compounds, nucleosides, nucleotides, and analogs, lipids and lipid-like molecules, and organic acids and derivatives. Compared to the low fertility group, a series of metabolites such as (–)-riboflavin, riboflavin, spermidine, adenosine, and lysoPI 22 : 6 were down-regulated in the ovary tissues of the high fertility group. Additionally, the receiver operating characteristic curve also determined that (–)-riboflavin, riboflavin, cyclohexylethyl acetate, and L-alanyl-L-norleucine could be regarded as candidate biomarkers for the high fertility phenotype of female hybrid sturgeon. Subsequently, Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was performed based on the differentially expressed metabolites. Our results showed that amino acid metabolism-related pathways (arginine and proline metabolism and beta-alanine metabolism) and vitamin metabolism-related pathways (vitamin digestion and absorption and riboflavin metabolism) were significantly enriched and the *P* values of these four pathways above were 0.0019, 0.0247, 0.0001, 0.0004, respectively. Meanwhile, it was found that adenosine is involved in fourteen metabolism pathways in the ovary tissues of hybrid sturgeon, inferring that it may have critical regulatory effects on the fate decision process of fertility phenotype of female hybrid sturgeon. The present investigation has preliminarily clarified the molecular signaling that affects the spawning yield trait of hybrid sturgeon and filtered the candidate biomarker for high fertility phenotype. This could provide a theoretical basis for breeding the hybrid sturgeon population with a high spawning yield. Taken together, our investigation not only characterized the metabolite profiling difference between the hybrid sturgeon populations with high (low) fertility phenotypes but can also shed light on directions for further research on the reproductive physiology of hybrid sturgeon and biomarker-assisted selection breeding for freshwater economic fish.

Key words: hybrid sturgeon; metabonomics; fertility; biomarker

Corresponding author: ZHANG Ying. E-mail: zhangyinghrfri@163.com