

DOI: 10.12264/JFSC2021-0254

NaHCO₃ 生境胁迫下方正银鲫鳃靶器官代谢组学研究

姚明珠^{1,2}, 刘英杰^{1,2}, 李姍蔚^{1,2}, 陈中祥², 王鹏², 孙言春^{1,2}

1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 水产品质量安全风险评估实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070

摘要: 为探究方正银鲫(*Carassius auratus gibelio*)鳃靶器官在细胞层面应对盐碱生境胁迫时的代谢响应机制, 实验设置了淡水对照组(Con)和 3 个碱胁迫组: 20 mmol/L NaHCO₃ (CA20)、40 mmol/L NaHCO₃ (CA40)和 60 mmol/L NaHCO₃ (CA60), 通过非靶向代谢组学方法, 解析暴露于不同浓度盐碱环境中 30 d 后的方正银鲫鳃靶器官中的差异显著代谢物及代谢通路。结果显示, 鳃组织在 ESI 正、负离子数据采集模式下共筛选出 89 个差异显著代谢物, 其中 50 个上调, 39 个下调, 其主要富集于甘油磷脂代谢、鞘脂代谢、花生四烯酸代谢、苯丙氨酸代谢以及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成等 12 条代谢通路。本研究结果表明, 盐碱生境胁迫后, 方正银鲫体内甘油磷脂调控了细胞膜内外物质转运, 导致合成鞘磷脂、鞘氨醇的途径被抑制。而随着前列腺素、白三烯和 L-苯丙氨酸等代谢物的浓度上升, 鲫鳃的解毒功能增加, 炎症创伤获得逐渐修复, 该代谢机制可能是方正银鲫应对盐碱胁迫耐受策略的重要原因之一。本研究所探究的方正银鲫对盐碱生境胁迫的耐受策略及代谢调控机制, 为后期的耐盐碱优良鱼种培育及增殖养殖研究提供了科学理论依据。

关键词: 方正银鲫; 碱胁迫; 鳃; 靶器官; 代谢组学; 代谢通路

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)06-0792-11

中国约有 0.46 亿 hm² 内陆盐碱水域, 约占全国湖泊总面积的 55%以上^[1]。这些盐碱水资源主要分布在我国东北、华北和西北内陆地区, 按照水体中离子组成比例可分为碳酸盐型、硫酸盐型、氯化物型和复合型等不同类型盐碱水, 其中东北地区以碳酸盐型为主。由于盐碱水具有高 pH、高盐、高碱等特点^[2-3], 人畜无法饮用, 不能灌溉农田, 也不能直接用于水产养殖, 故绝大多数属于长期荒置状态。因此培育适盐碱鱼类良种并建立适养殖模式, 是盐碱水域高效利用的关键途径, 也是实现我国现有国土面积“扩容、提质、增效”战略目标的必要手段。

当水体的盐度达到 7, 碱度达到 10 mmol/L 时, 会使淡水鱼类体内代谢所产生的氮废物不能有效

排泄, 从而导致蛋白质和核苷酸的代谢产物累积产生毒性, 严重影响鱼类的生长、生存和繁殖^[4-5]。目前仅有面积不足 2% 的低碱度盐碱水域, 通过移植驯化淡水和海水经济鱼类被开发利用^[6-7]。在这一背景下, 解析鱼类氮废物的排泄机制, 是培育耐盐碱鱼类优良品种、进一步提升我国盐碱水域资源利用率的关键科学问题, 也是鱼类生理学研究的重点问题之一。

除了软骨鱼类和少部分特殊硬骨鱼类以尿素形式排泄氮代谢产物外, 绝大部分硬骨鱼类直接将氮废物以氨的形式排泄到水环境中^[8]。以氨形式排泄氮废物是硬骨鱼类最快、最易实现的排泄形式^[9-10], 现有研究表明, 海水和淡水硬骨鱼类在水环境中以氨形式排泄的氮废物占总氮废物排

收稿日期: 2021-06-10; 修订日期: 2021-11-10.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(HSY202006M); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD49); 中国博士后科学基金面上项目(2020M681124); 黑龙江省博士后面上基金项目(LBH-Z20099).

作者简介: 姚明珠(1995-), 女, 硕士, 研究方向为水生生物抗逆生长代谢组学. E-mail: yaomingzhu18@163.com

通信作者: 孙言春, 副研究员, 研究方向为水生生物抗逆生长代谢组学及整合生理学. E-mail: sunyc2004@163.com

泄量的 60%~95%^[11]。就氨排泄机制而言,早期研究认为,氨主要依靠分压和浓度梯度驱动,并经组织上皮排泄到体外。近十年来,研究人员发现,鳃是鱼类氨排泄的最主要的靶器官^[12-13],进而对其氨排泄机制和离子调节作用进行了大量的研究^[14]。其中最重要的发现是氨在鳃上皮细胞的运动是由特定的通道,即 Rhesus (Rh)糖蛋白所促进的^[15]。Chang 等^[16]通过对雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)鳃、肾、肝等组织的转录组高通量测序和表达谱差异性分析发现, Rh 蛋白家族(Rhag, Rhbg, Rhcg1 和 Rhcg2)全部富集上调表达,揭示了雅罗鱼的盐碱适应能力与 Rh 基因调控的 Rh 糖蛋白表达直接相关,阐明了鱼类耐盐碱的分子机制。具有氨转运功能的 Rh 糖蛋白的发现为研究鱼类鳃中氨排泄机制打开了新局面,而进一步探讨 Rh 糖蛋白在鳃细胞表面上参与氨转运过程的物质基础,解析关键代谢通路与调控机制,是这一领域所面临的新课题。

为了更好地解析代谢产物参与鱼类鳃中氨转运的调控机制,需要寻找更为全面的检测技术,便于从“系统生物学”的视角审视面临的科学问题。在细胞层面上小分子物质的产生和代谢,能更准确地反映生物体系的状态,而代谢组学是通过对小分子代谢产物的观察,来判断机体“系统”发生的变化。采用代谢组学手段揭示环境胁迫下鱼类的代谢特征和对调控途径的影响,有助于全面解析靶器官在细胞层面上代谢物的调控机制和代谢机理。因此,代谢组学成为环境胁迫下生物应激反应的研究热点^[17-18],也为明确耐盐碱鱼类的离子交换和渗透压平衡的物质基础提供了新的研究思路。鲫作为大宗淡水养殖的重要经济鱼类,由于生长速度快、抗逆性好、耐盐碱能力强的特点,其适盐碱增养殖潜力巨大^[19]。鲫耐盐碱胁迫对鱼类系统生物学研究可提供直接的借鉴意义,但目前对其开展的研究较少,对其盐碱耐受适应性进化策略解析得仍不全面,制约了耐盐碱鱼类育种的良性发展。

本课题组前期围绕鲫在 NaHCO_3 胁迫下血浆非靶向代谢组学开展了探索性研究,发现碱性暴露会导致血浆中代谢谱的广泛变化^[20-21]。在此基础上,本研究以方正银鲫(*Carassius auratus*

gibelio)为研究对象,基于超高效液相色谱串联飞行时间质谱(Ultra-performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF/MS)技术的非靶向代谢组学研究,结合多变量数据统计分析方法,探讨方正银鲫在 NaHCO_3 浓度为 20、40、60 mmol/L 生境下暴露 30 d,其鳃组织中内源性代谢物的变化,从“代谢组”角度解析 NaHCO_3 胁迫下鲫鳃适应性防御策略的物质基础,为更全面解析鱼类离子调节机制提供理论依据,为耐盐碱鱼类优良品种培育提供科学理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物购自方正县方正银鲫国家良种场,体长(21.0±0.5) cm、体重(120.00±5.64) g,健康无外伤,经流式细胞仪测定,均为三倍体,且遗传背景一致。将其暂养于室内控温循环养殖设备中 7 d,水温 24~25 °C,每天保持 12~14 h 的光照条件,遵照三定三巡的(定时定点定量投喂、早中晚巡查)水产养殖管理模式。

碳酸氢钠(NaHCO_3 , 分析纯,天津市化工三厂公司); 间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(MS-222, 美国 Sigma Aldrich 公司); 生理盐水(四川科伦药业公司); 液氮(哈尔滨市黎明气体公司); 甲醇、乙腈(质谱纯,德国 Merck 公司); 甲醇、甲酸、0.22 μm 有机相滤膜(色谱纯,上海安谱公司)。

XS205DY 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Milli-Q A10 超纯水机(美国 Millipore 公司); 组织研磨机(上海净信公司); 涡旋混匀器(德国 IKA 公司); KQ 300DB 型数控超声仪(昆山市超声仪器公司); Allegra X-30R 高速离心机(美国 Beckman 公司); Acquity UPLC 系统(美国 Waters 公司); SCIEX Triple TOF 5600+高分辨质谱仪(美国 AB SCIEX 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 碱胁迫实验 本实验设置 1 个淡水对照组(Con), 3 个碱胁迫组: 20 mmol/L (CA20)、40 mmol/L (CA40)、60 mmol/L (CA60), 每组 3 个平行, 每个平行 20 尾。为了使方正银鲫不产生急性应激反应,

采用 NaHCO_3 配制相应的浓度, 以每天 10 mmol/L 的速度升至实验用浓度后暴露 30 d。实验期间每天换水 1/2, 保持水质干净清洁, 并用酸碱滴定法标定 NaHCO_3 浓度。

1.2.2 样品采集 暴露实验结束后, 各组随机抽取 15 尾鱼(共计 60 尾)至含有 40 mg/L 麻醉剂(MS-222)的溶液中, 深度麻醉后置于冰上, 快速取出鳃组织(鳃丝), 用 4 °C 预冷的生理盐水润洗, 吸水纸擦干后立即用液氮速冻, 再转移至 -80 °C 冰箱保存待测。

1.2.3 代谢物提取 取 -80 °C 保存的鳃组织样品于 4 °C 下解冻, 准确称重 30 mg 样品, 加入 480 μL 经 4 °C 预冷的 80% 甲醇水溶液和 5 个钢珠(直径为 2.38 mm), 用组织研磨机 60 Hz 研磨 30 s, 冰水浴超声处理 10 min 后, -20 °C 下静置 30 min, 最后于 4 °C、13000 r/min 离心 15 min, 取 300 μL 上层溶液, 过 0.22 μm 有机相滤膜至进样瓶待测。同时, 将各组鳃组织等量混合成质量控制(quality control, QC)样品, 按照上述鳃组织处理方法制备。QC 样品是检验质谱数据重复性和结果准确性的必要步骤, 在样品序列中等间隔重复插入同一 QC 样品, 对信号漂移进行评估和校正, 使批次之间的实验数据质量得到提高。

1.2.4 LC-MS 检测 色谱条件: 色谱柱为 BEH C_{18} 柱(50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm ; Waters, USA); 正离子扫描: 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液(V/V), B 为乙腈; 负离子扫描: 流动相 A 为水, B 为乙腈; 流速为 0.3 mL/min, 进样量为 10 μL , 柱温为 40 °C。洗脱梯度: 0~4 min, 95%~30% A; 4~11 min, 30%~15% A; 11~12 min, 15%~0% A; 12~13 min, 0% A; 13~13.2 min, 0%~95% A; 13.2~15 min, 95% A。

质谱条件: 在正负离子模式下扫描数据, 正负离子源电压为 5500 V/-4500 V, 离子源温度为 550 °C, 裂解电压为 80 V/-80 V, 碰撞能量为 35 eV/-35 eV, 碰撞能量扩展为 15 eV。氮气用作雾化气体和辅助气体, Gas1 和 Gas2 的压力为 55 PSI, 气帘气压力为 35 PSI。开启动态背景扣除(DBS), 并设置触发式扫描(IDA)响应值超过 100 cps 的 8 个峰用于二次质谱扫描。一级质谱离子扫描范围为 100~1500 Da, 二级质谱离子扫描范围为 50~

1500 Da。

1.3 数据处理

将采集到的数据导入 Progenesis Q1, 对色谱峰进行峰提取、峰对齐、峰识别以及归一化处理, 得到的数据再导入 Simca 14.0 软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 选取变量权重重要性排序值(variable importance in projection, VIP)>1、T 检验分析($P<0.05$)为筛选条件, 并与人类代谢组数据库(HMDB)匹配, 筛选差异表达代谢物(differential expressed metabolites, DEMs), 将筛选得到的 DEMs 英文名称导入 MetaboAnalyst 5.0 进行分析, 得到 DEMs 的相关通路, 绘制相应代谢通路示意图, 查阅相关文献, 阐述 DEMs 对方正银鲫耐盐碱的影响。

2 结果与分析

2.1 PCA 分析

按照上述色谱条件和质谱条件进样分析, 各组样品在正、负离子模式下均获得良好的分离效果及离子化效率。PCA 统计原理分析正、负离子模式下样品的代谢轮廓差异, 可以观察到数据中所有样品的聚类情况, 如图 1 所示, 不同组别间具有明显的分组趋势, CA20 远离 Con, 说明 NaHCO_3 碱度胁迫对方正银鲫鳃组织代谢产生了影响。另外, CA40、CA20 介于 Con 与 CA60 之间, 有向高浓度组偏移的趋势, 从一定程度上也可以说明 NaHCO_3 碱度胁迫对于方正银鲫鳃组织代谢影响存在浓度依赖。另外, 正离子模式下 R^2 为 0.75, Q^2 为 0.65; 负离子模式下 R^2 为 0.64, Q^2 为 0.83。其中 R^2 表示模型拟合结果的方差, 代表拟合质量, Q^2 表示数据方差, 代表模型的可预测性, R^2 和 Q^2 值越接近 1 越好, 通常大于 0.4, 且差值不应过大。根据上述结果可以看出本数据模型拟合度较高, NaHCO_3 碱度胁迫影响了方正银鲫鳃组织的代谢。

2.2 OPLS-DA 分析

为了消除样品的非特异性影响, 使用有监督的 OPLS-DA 分析比较了 Con 与各胁迫组。图 2

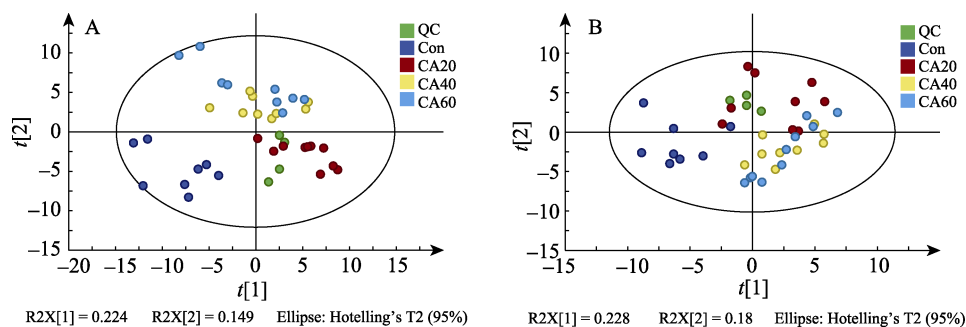
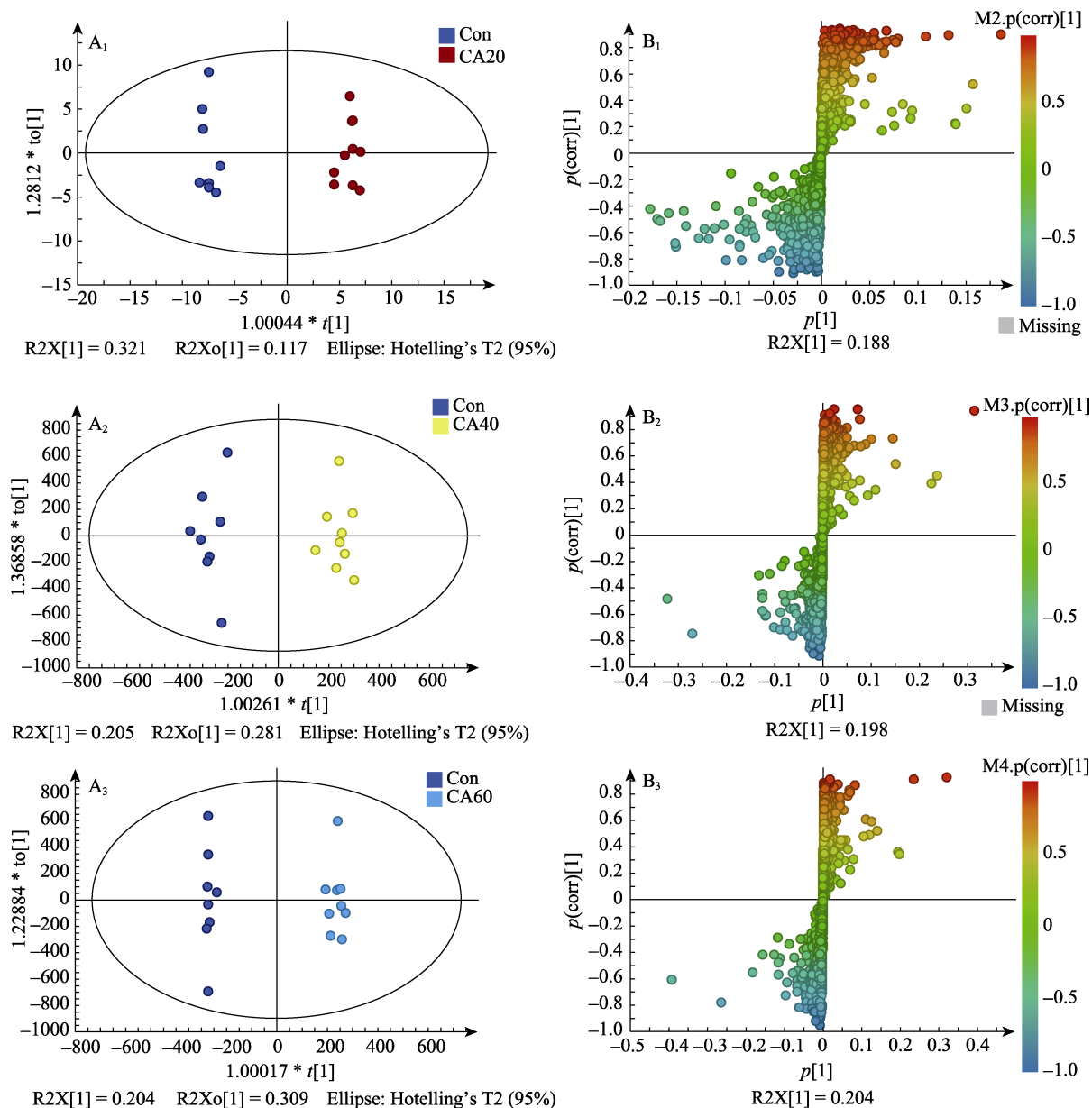


图 1 正(A)、负(B)离子模式下 PCA 得分图

Fig. 1 PCA score in positive (A) and negative (B) ion modes

图 2 正离子模式下空白组和 NaHCO_3 各浓度组 OPLS-DA 得分图(A₁: CA20; A₂: CA40; A₃: CA60)及 S-Plot 图(B₁: CA20; B₂: CA40; B₃: CA60)Fig. 2 OPLS-DA score plot (A₁: CA20; A₂: CA40; A₃: CA60) and S-Plot (B₁: CA20; B₂: CA40; B₃: CA60) of the blank group and three NaHCO_3 concentration groups in positive ion mode

和图 3 分别为正离子模式和负离子模式下方正银鲫 LC-MS 数据的 OPLS-DA 得分图和 S-Plot 图。OPLS-DA 得分显示 Con 与不同浓度 NaHCO_3 胁迫组之间有明显的区别, S-Plot 图中距离原点越远的离子对两组比较差异性贡献越大。

2.3 差异代谢物筛选

以 $\text{VIP} > 1$ 、T 检验为参考指标, 筛选具有显著性 ($P < 0.05$) 的生物标记物。选择 HMDB 数据库对代谢物进行鉴定, 在 Progenesis Q1 软件中按 1.3

数据处理项下内容设定质量误差、二级碎片得分及同位素相似度等相关参数, 确定各物质名称、HMDB 号。本方法分别鉴定出 Con 和 CA20 之间有 176 个 DEMs; Con 和 CA40 之间有 153 个 DEMs; Con 和 CA60 之间有 163 个 DEMs。这 3 组对比共同筛选出 89 个 DEMs, 其中 50 个上调, 39 个下调, 这 89 个 DEMs 在对照组和处理组中含量也有所不同(图 4)。按照代谢物类型可分为: 脂质和类脂质分子、有机氮化合物、有机杂环化合物、有机酸

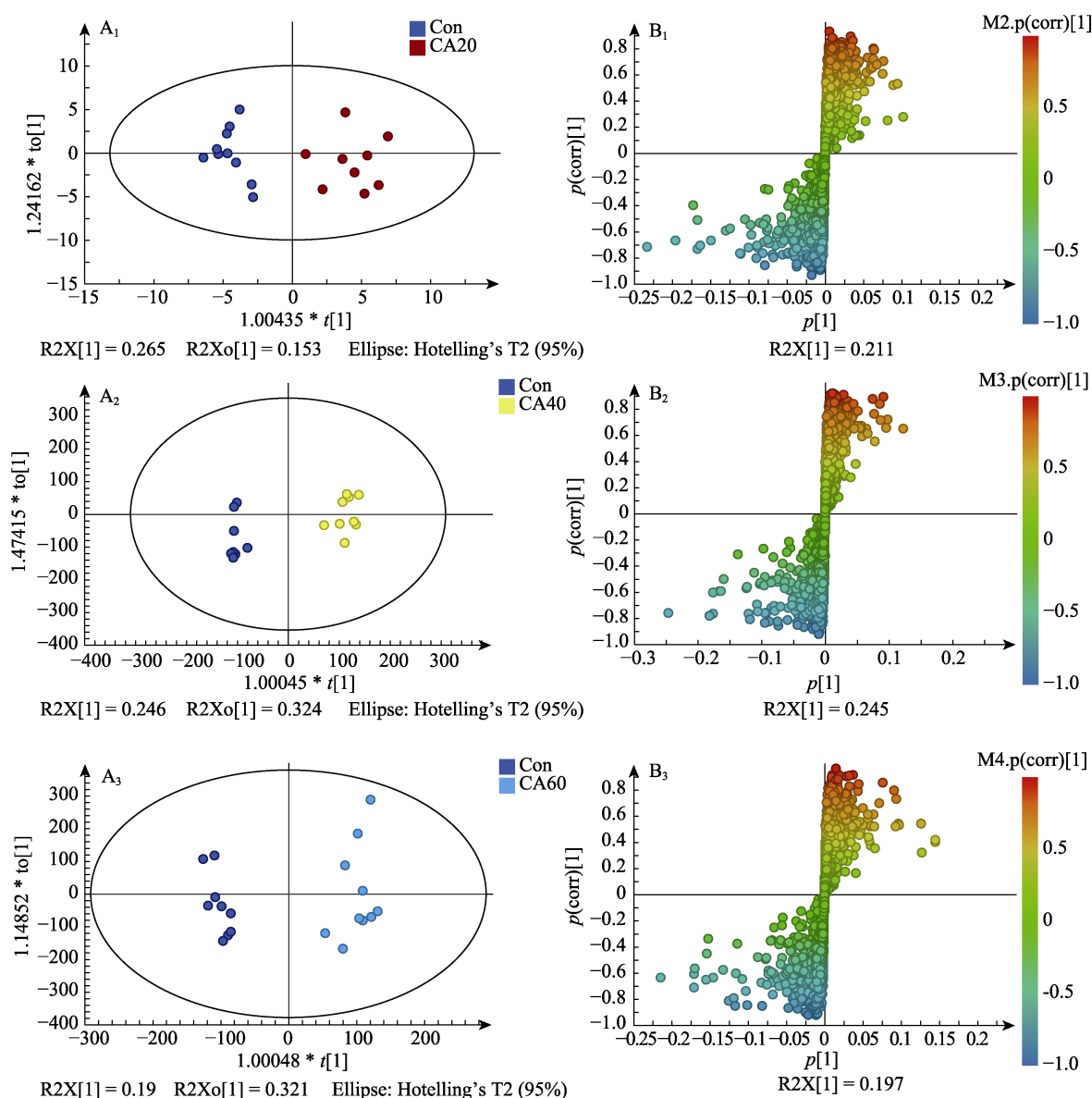


图 3 负离子模式下空白组和 NaHCO_3 各浓度组 OPLS-DA 得分图(A₁: CA20; A₂: CA40; A₃: CA60) 及 S-Plot 图(B₁: CA20; B₂: CA40; B₃: CA60)

Fig. 3 OPLS-DA score plot (A₁: CA20; A₂: CA40; A₃: CA60) and S-Plot (B₁: CA20; B₂: CA40; B₃: CA60) of the blank group and three NaHCO_3 concentration groups in negative ion mode

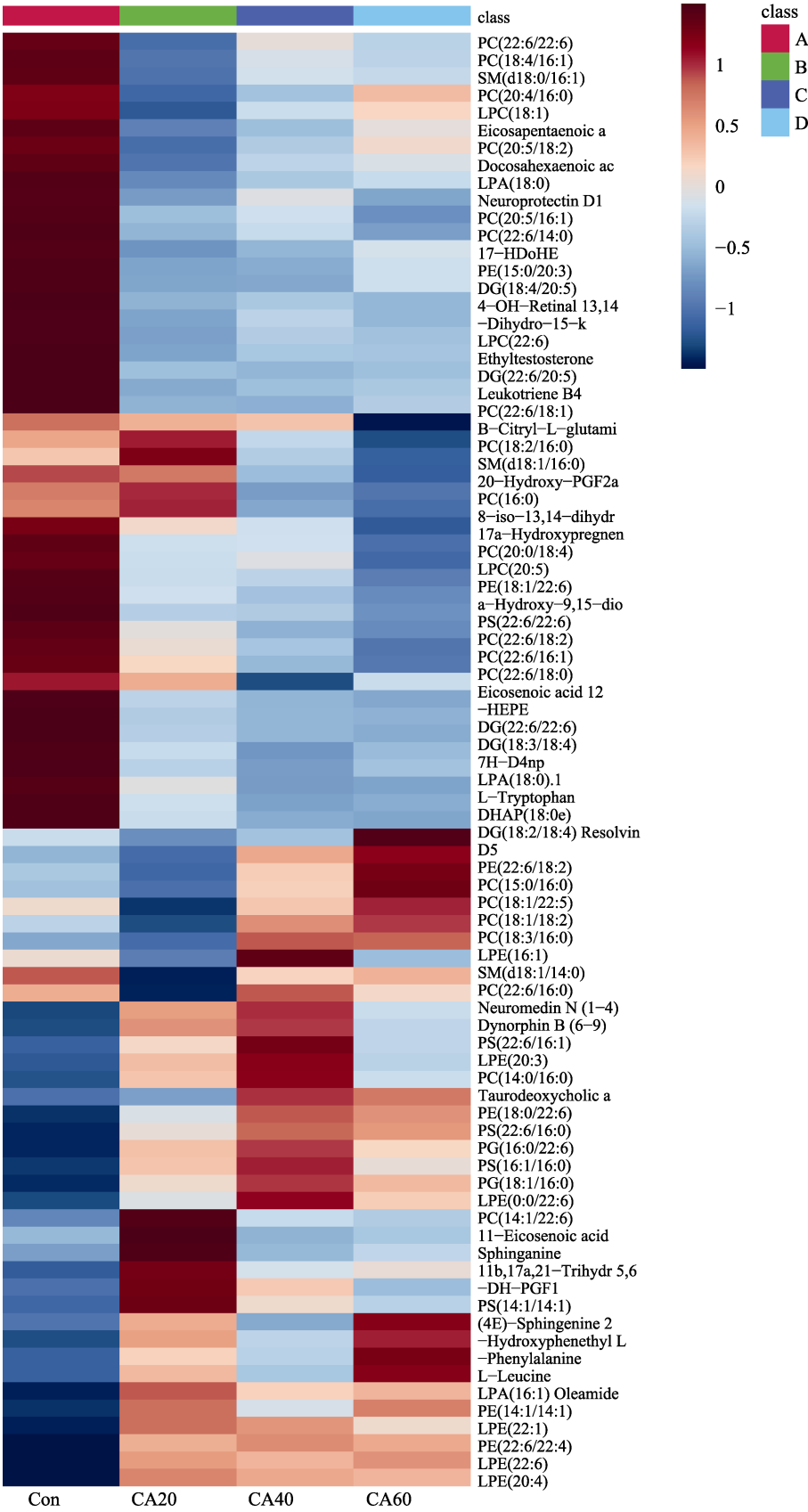


图 4 89 种代谢物聚类热图

Fig. 4 Clustered heatmap of 89 metabolites

及其衍生物、核苷、核苷酸和类似物,在处理组中,碱度胁迫引起的鳃组织中脂质和类脂质分子变化数量最多,为 78 种,包括:脂肪酰基、嘌呤核苷、鞘脂、类固醇和类固醇衍生物、甘油酯、甘油磷脂、烯醇脂、有机氧化合物。

2.4 差异代谢通路分析

MetaboAnalyst 是基于网络的生物体代谢路径分析的重要工具,有着操作简便、快速准确的特点^[22]。根据上述筛选的 89 个 DEMs 在空白组和处理之间的浓度变化趋势有显著性差异,将其具体信息导入 MetaboAnalyst 5.0,得到方正银鲫耐盐碱代谢影响结果,以影响因子(impact)大于 0 为标准,发现 12 条代谢通路受到影响,其中甘油磷脂代谢($P=0.0041$)、鞘脂代谢($P=0.0056$)较为显著,花生四烯酸代谢(impact 值为 0.0279)、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成(impact 值为 0.5000)苯丙氨酸代谢(impact 值为 0.3571)影响因

子较大。对应的代谢通路分析如图 5 所示,详细信息如表 1 所示,上述结果都说明 NaHCO_3 对方正银鲫正常代谢过程产生了严重干扰。

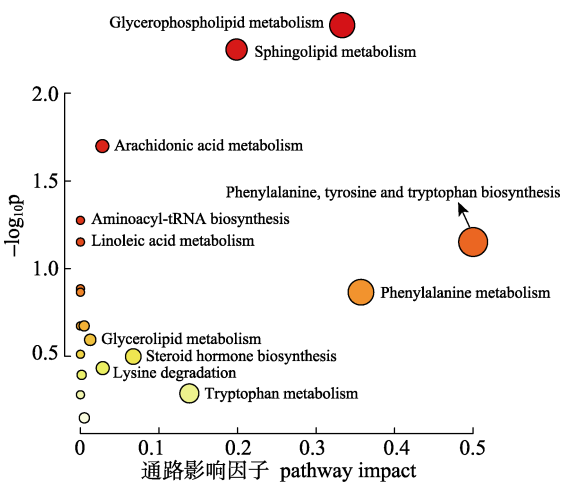


图 5 代谢通路分析结果
Fig. 5 Metabolic pathway analysis results

表 1 代谢通路分析结果
Tab. 1 Metabolic pathway analysis results

编号 no.	代谢通路 metabolic pathway	对应物质数 hits	P	影响因子 impact
1	甘油磷脂代谢 glycerophospholipid metabolism	4	0.0041	0.3333
2	鞘脂代谢 sphingolipid metabolism	3	0.0056	0.1988
3	花生四烯酸代谢 arachidonic acid metabolism	3	0.0200	0.0279
4	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成 phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	1	0.0705	0.5000
5	苯丙氨酸代谢 phenylalanine metabolism	1	0.1362	0.3571
6	糖基磷脂酰肌醇(gpi)-锚定生物合成 glycosylphosphatidylinositol (gpi)-anchor biosynthesis	1	0.2121	0.0048
7	甘油脂代谢 glycerolipid metabolism	1	0.2545	0.0125
8	类固醇激素生物合成 steroid hormone biosynthesis	2	0.3170	0.0673
9	赖氨酸降解 lysine degradation	1	0.3690	0.0284
10	磷脂酰肌醇信号系统 phosphatidylinositol signaling system	1	0.4032	0.0015
11	色氨酸代谢 tryptophan metabolism	1	0.5141	0.1387
12	嘌呤代谢 purine metabolism	1	0.7087	0.0050

3 讨论

本研究中利用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对方正银鲫鳃代谢物进行组学测试、分析,筛选出了包括脂类、氨基酸等在内的多种 DEMs,为进一步了解方正银鲫在 NaHCO_3 胁迫下机体代谢物质的变化规律提供了依据。代谢组学的研究结果发现,与 Con 组相比,不同浓度 NaHCO_3 暴露下的方正

银鲫鳃的 DEMs 类别较为接近,数量相近,CA60 组筛选出的差异代谢物最多。利用代谢组学可以了解方正银鲫的代谢受碳酸氢盐碱胁迫的扰动情况,更有助于全面解析靶器官在细胞层面上代谢物的调控机制和代谢机理。

甘油磷脂代谢是生物体内最主要的磷脂成分之一,是胆汁和细胞膜表面活性物质,它还可以形成生物膜,并参与细胞膜对蛋白质的识别和信

号转导。在 NaHCO_3 碱胁迫下, 方正银鲫的脂质代谢通路受到了影响, 其中显著影响了甘油磷脂代谢($P < 0.05$, Impact: 0.3333)。通路分析结果显示, NaHCO_3 处理组中鳃组织的 DEMs 包含大量磷脂酰乙醇胺(PE)和磷脂酰胆碱(PC)^[23]。PE 存在于细胞膜中的膜磷脂, 在生物体中具有能量储备、细胞膜稳定剂的功能, 细胞膜是界定细胞的屏障, 将特定的细胞功能分隔成不同但相互联系的隔室^[24]。除了形成不同细胞和细胞器形态的能力之外, 作为多功能平台, 细胞膜参与信号传递、溶质、代谢物和蛋白质转运的调节, 介导各种生物过程^[25]。PE 也是 PC 的重要前体, 可用于修饰某些蛋白质。甘油磷酰胆碱作为肾髓质细胞中的渗透液, 可以抵消尿素对酶和其他大分子的影响, 有效缓解方正银鲫因碳酸盐碱胁迫时无法正常排出体外的氮代谢废物, 从而达到解毒的作用。

在细胞膜的结构中, 鞘脂是第二大类膜脂, 由一个极性头基团和两个非极性尾组成, 能调节细胞膜脂质双层的流动性和子域结构。代谢通路分析结果表明, 在碱胁迫下, 鞘脂代谢通路($P < 0.05$, Impact 值 0.1988)的鞘磷脂、鞘氨醇含量随着 NaHCO_3 浓度升高而下降, 说明方正银鲫体内合成鞘磷脂、鞘氨醇的途径被减弱。鞘磷脂在生物体内主要有两种合成方式: 第一种方式, 细胞通过神经氨酸转运蛋白将神经酰胺转运至高尔基体, 鞘磷脂合成酶合成鞘磷脂^[26]; 第二种是补救合成途径, 细胞内鞘脂代谢通路下神经酰胺酶大量催化生成鞘氨醇, 鞘氨醇经溶菌酶重新进入鞘脂代谢, 又生成神经酰胺和鞘磷脂等^[27]。本研究处理组中碱度越高, 鞘磷脂、鞘氨醇含量越低, 可能是鞘氨醇向神经酰胺转变的过程加强, 神经酰胺可以抑制蛋白激酶的表达, 干扰细胞正常的周期, 即碱浓度越高, 方正银鲫机体慢性损伤越严重。

花生四烯酸(AA)是一种 ω -6 多不饱和脂肪酸(PFA), 主要以磷脂的形式存在于细胞膜中^[28]。当细胞处于应激状态时, 细胞膜的磷脂酶 A2 (PLA2) 和磷脂酶 C (PLC) 从磷脂中释放出游离 AA, AA 可提高生物体的抗应激能力, 并增强其生命力。AA 代谢基于三种酶代谢: 环氧化酶(COX)、脂氧合酶(LOX)和细胞色素 P450 (CYP450)酶。通过 COX

途径, AA 可以代谢成前列腺素(PGs)和血栓素(TXs); AA 也可以通过 LOX 途径转化为白三烯(LTs)和脂氧素(LxS); 此外, 氨基酸还通过 CYP450 途径产生环氧二十碳三烯酸或羟基二十碳四烯酸, 这些氨基酸代谢物统称为类花生酸, 是有效的自分泌和旁分泌生物活性介质, 广泛参与多种生理和病理过程^[29]。在本实验中, 与 Con 相比, 在碱度胁迫下, AA 产生的差异代谢物 7-羟基-D4-神经前列腺素(7H-D4np)和 12-氧-20-羟基白三烯 B4 (Ox20hLTB4)水平显著上调。一定浓度的 AA 通过抑制脂肪细胞增殖、分化和凋亡, 促进水解, 降低炎症相关化学因子^[30], 也有研究表明, AA 可以转化为引发不同炎症反应的各种代谢产物^[31]。目前, 鱼类中关于花生四烯酸的研究很少。AA 的代谢产物如磷脂酰甘油(PG 类)和白三烯类(LT 类)可对鱼类一系列的免疫功能产生影响, 尤其是巨噬细胞和单核细胞中的 AA 代谢产物前列腺素 E2 (PGE_2), 直接与免疫细胞的功能调控有关。有研究表明^[32], 鱼体肾脏中的 PGs 和 LTs 水平升高会导致肾脏炎症损伤。由此推测, 在碱度胁迫下, 方正银鲫的肾脏出现一定程度的炎症。

L-苯丙氨酸属于苯丙氨酸及其衍生物的有机化合物的一类, 苯丙氨酸是 8 种必需氨基酸之一, 也是氨基酸、酪氨酸的前体。在本研究中, 涉及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成以及苯丙氨酸的代谢。与 Con 相比, L-苯丙氨酸含量在不同浓度 NaHCO_3 处理组中均显著升高, 其中在 CA60 组含量最高。苯丙氨酸和酪氨酸是儿茶酚胺(一种神经递质)的前体, 研究发现苯丙氨酸浓度较高会充当神经毒素和代谢型, 破坏机体神经细胞^[33]。实验结果表明, NaHCO_3 处理组的方正银鲫鳃中苯丙氨酸含量升高, 推测在碳酸氢盐碱胁迫下, 鲫受到了神经损伤和代谢损伤。血浆中苯丙氨酸浓度升高, 导致生物体内的神经毒素蓄积, 会抑制其他大型中性氨基酸的合成, 此时的高浓度苯丙氨酸会进一步进入大脑, 干扰不同的脑酶系统, 严重时会引起癫痫发作^[34]。同时, 苯丙氨酸也有一些潜在的好处, 可作为有效的止痛剂, 由此推测苯丙氨酸的合成也可能是方正银鲫耐受碳酸盐碱时缓解身体损伤的一种调控手段。

综上所述,本研究采用 UPLC-ESI-Q-TOF/MS 技术分析了碳酸盐碱胁迫下方正银鲫鳃靶器官的代谢物变化,利用多变量数据统计并筛选出 89 个差异显著的内源性代谢物,包括脂肪酰基、嘌呤核苷、鞘脂、类固醇和类固醇衍生物、甘油磷脂等化合物。进一步的统计分析表明,这些差异显著代谢产物主要与甘油磷脂代谢、鞘脂代谢、花生四烯酸代谢以及苯丙氨酸代谢等 12 条代谢途径有关。其中,花生四烯酸代谢、鞘脂代谢及苯丙氨酸代谢通路的紊乱显示鲫鳃受到碳酸盐生境的毒性作用,造成炎症和神经损伤;而甘油磷脂代谢、苯丙氨酸的合成通路等途径则会缓解盐碱生境所造成的机体损伤,促进氨排泄,使鲫逐渐适应外界盐碱生境的胁迫,缓解其造成的氨排泄抑制。本研究在细胞层面上初步解析了方正银鲫适应碳酸盐型盐碱生境的生长存活策略,从代谢组学的角度为揭示方正银鲫耐盐碱调控机制提供了依据。后续可重点针对本研究发现的一些代谢通路开展靶向代谢组学研究,从系统生物学的视角出发,结合转录组学进一步阐释碳酸盐碱胁迫对方正银鲫的生物学影响,为我国耐盐碱优良鱼种培育及盐碱水域增养殖提供科学理论基础。

参考文献:

- [1] Yi X F, Lai Q F, Shi J Q, et al. Nitrogenous waste excretion and gene expression of nitrogen transporter in *Gymnocypris przewalskii* in high alkaline environment[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(4): 681-689. [衣晓飞, 来琦芳, 史建全, 等. 高碱环境下青海湖裸鲤氮废物排泄及相关基因的表达规律[J]. 中国水产科学, 2017, 24(4): 681-689.]
- [2] Wu D, Sun P, Chen G L, et al. Water purification effect and saline-alkali tolerance improvement mechanism of *Suaeda salsa* in the estuary area[J]. Environmental Science, 2019, 40(12): 5384-5393.
- [3] Yan B, Wang Z H, Zhao J L. Mechanism of osmoregulatory adaptation in tilapia[J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40(2): 925-931.
- [4] Chandrasekar S, Nich T, Tripathi G, et al. Acclimation of brackish water pearl spot (*Etroplus suratensis*) to various salinities: Relative changes in abundance of branchial Na⁺/K⁺ (+)-ATPase and Na⁺/K⁺ (+)/2Cl⁻ (-) co-transporter in relation to osmoregulatory parameters[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2014, 40(3): 983-996.
- [5] Wood C M, Gonzalez R J, Ferreira M S, et al. The physiology of the tambaqui (*Colossoma macropomum*) at pH 8.0[J]. Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, 2018, 188(3): 393-408.
- [6] Kultz D. Physiological mechanisms used by fish to cope with salinity stress[J]. The Journal of Experimental Biology, 2015, 218(Pt 12): 1907-1914.
- [7] Wood C M, Du J Z, Rogers J, et al. Przewalski's naked carp (*Gymnocypris przewalskii*): An endangered species taking a metabolic holiday in Lake Qinghai, China[J]. Physiological and Biochemical Zoology, 2007, 80(1): 59-77.
- [8] El-Sabaawi R W, Warbanski M L, Rudman S M, et al. Investment in boney defensive traits alters organismal stoichiometry and excretion in fish[J]. Oecologia, 2016, 181(4): 1209-1220.
- [9] Souza-Bastos L R, Páscoa M I, Freire C A, et al. Ammonia excretion and expression of transport proteins in the gills and skin of the intertidal fish *Lipophrys pholis*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2014, 167: 15-24.
- [10] Zimmer A M, Perry S F. The Rhesus glycoprotein Rhcgb is expendable for ammonia excretion and Na⁺ uptake in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2020, 247: 110722.
- [11] Edwards S L, Arnold J, Blair S D, et al. Ammonia excretion in the Atlantic hagfish (*Myxine glutinosa*) and responses of an Rhc glycoprotein[J]. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2015, 308(9): R769-R778.
- [12] Bucking C. A broader look at ammonia production, excretion, and transport in fish: A review of impacts of feeding and the environment[J]. Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, 2017, 187(1): 1-18.
- [13] Zimmer A M, Wright P A, Wood C M. Ammonia and urea handling by early life stages of fishes[J]. The Journal of Experimental Biology, 2017, 220(Pt 21): 3843-3855.
- [14] Sinha A K, Kapotwe M, Dabi S B, et al. Differential modulation of ammonia excretion, Rhesus glycoproteins and ion-regulation in common carp (*Cyprinus carpio*) following individual and combined exposure to waterborne copper and ammonia[J]. Aquatic Toxicology, 2016, 170: 129-141.
- [15] Si L, Pan L, Wang H, et al. Identification of the role of Rh protein in ammonia excretion of the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Experimental Biology, 2018,

- 221(20).
- [16] Chang Y M, Tang R, Dou X J, et al. Transcriptome and expression profiling analysis of *Leuciscus waleckii*: An exploration of the alkali-adapted mechanisms of a freshwater teleost[J]. *Molecular BioSystems*, 2014, 10(3): 491-504.
- [17] Xue L J, Han J Q, Zhou Y C, et al. Untargeted metabolomics characteristics of nonobese nonalcoholic fatty liver disease induced by high-temperature-processed feed in Sprague-Dawley rats[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2020, 26(46): 7299-7311.
- [18] Egamberdieva D, Li L, Lindström K, et al. A synergistic interaction between salt-tolerant *Pseudomonas* and *Mesorhizobium* strains improves growth and symbiotic performance of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.) under salt stress[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(6): 2829-2841.
- [19] Yang J, Xu W, Geng L W, et al. Effect of NaHCO_3 on survival and gill, kidney tissues in juveniles of 5 species[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2014, 36(5): 1115-1121. [杨建, 徐伟, 耿龙武, 等. NaHCO_3 碱度对 5 种幼鱼的生存及鳃、肾组织的影响[J]. *江西农业大学学报*, 2014, 36(5): 1115-1121.]
- [20] Sun Y C, Wu S, Du N N, et al. High-throughput metabolomics enables metabolite biomarkers and metabolic mechanism discovery of fish in response to alkalinity stress[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(27): 14983-14990.
- [21] Sun Y C, Han S C, Yao M Z, et al. Exploring the metabolic biomarkers and pathway changes in crucian under carbonate alkalinity exposure using high-throughput metabolomics analysis based on UPLC-ESI-QTOF-MS[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(3): 1552-1571.
- [22] Chong J, Xia J G. Using MetaboAnalyst 4.0 for metabolomics data analysis, interpretation, and integration with other omics data[J]. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N J), 2020, 2104: 337-360.
- [23] Calzada E, Onguka O, Claypool S M. Phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease[J]. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2016, 321: 29-88.
- [24] Powers M J, Trent M S. Intermembrane transport: Glycerophospholipid homeostasis of the Gram-negative cell envelope[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(35): 17147-17155.
- [25] Gibellini F, Smith T K. The Kennedy pathway—De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine[J]. *IUBMB Life*, 2010, 62(6): 414-428.
- [26] Wang S Y, Zhang J L, Zhang D, et al. Recent advances in study of sphingolipids on liver diseases[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2015, 50(12): 1551-1558. [王少媛, 张金兰, 张丹, 等. 鞘脂在肝脏疾病中的研究进展[J]. *药学报*, 2015, 50(12): 1551-1558.]
- [27] Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun Y A. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling[J]. *Cellular Signalling*, 2008, 20(6): 1010-1018.
- [28] Wang T Q, Fu X J, Chen Q F, et al. Arachidonic acid metabolism and kidney inflammation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(15): 3683.
- [29] Kuwata H, Hara S. Role of acyl-CoA synthetase ACSL4 in arachidonic acid metabolism[J]. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2019, 144: 106363.
- [30] Tian J J. Effects and mechanism analysis of arachidonic acid (ARA) on lipid metabolism of grass carp (*Ctenopharygodon idellus*)[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2017. [田晶晶. 花生四烯酸(ARA)对草鱼脂质代谢的影响及其机制分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.]
- [31] Harizi H, Corcuff J B, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: Roles in biology and immunopathology[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2008, 14(10): 461-469.
- [32] Burns J L, Nakamura M T, Ma D W L. Differentiating the biological effects of linoleic acid from arachidonic acid in health and disease[J]. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2018, 135: 1-4.
- [33] Strasser B, Sperner-Unterwieser B, Fuchs D, et al. Mechanisms of inflammation-associated depression: Immune influences on tryptophan and phenylalanine metabolisms[J]. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 2017, 31: 95-115.
- [34] Fernstrom J D, Fernstrom M H. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain[J]. *The Journal of Nutrition*, 2007, 137(6): 1539S-1547S.

Metabolomics study on gill tissues of *Carassius auratus gibelio* under NaHCO_3 habitat stress

YAO Mingzhu^{1,2}, LIU Yingjie^{1,2}, LI Shanwei^{1,2}, CHEN Zhongxiang², WANG Peng², SUN Yanchun^{1,2}

1. College of Food Sciences & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Aquatic Product Quality and Safety Risk Assessment Laboratory, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China

Abstract: China contains vast areas of saline-alkali waters. Therefore, fish farming in such waters is crucial to ensuring domestic food supply and safety in the future and is also necessary for achieving the strategic goal of “expanding capacity, improving quality, and increasing efficiency” of China’s existing land area. The breeding of saline-tolerant fish species and the establishment of suitable breeding patterns are the key approaches to the efficient utilization of saline-alkali waters. The stability of key metabolic pathways in target organs is necessary for fish to adapt to changes in the external habitat. Gills are the salt-tolerant target organs of fish, and the effect of Rh glycoprotein on the ammonium transporter has been confirmed. However, uncertainty remains around the material basis and mechanism of regulation at the cellular level. This lack of understanding restricts the targeted breeding of salt-tolerant fish, which has become a key bottleneck requiring an urgent solution for the sustainable development of the saline-alkali fish industry. In this study, the saline-alkali tolerant *Carassius auratus gibelio* variety in China was used as the research object. Specimens were exposed to fresh water in the control group (Con), and three different concentrations of alkali in the stress groups: 20 mmol/L NaHCO_3 (CA20), 40 mmol/L NaHCO_3 (CA40), and 60 mmol/L NaHCO_3 (CA60). Metabolomics were used to screen for endogenous differential metabolites. Statistical analysis of metabolic pathways and multivariate data was used to explore the response mechanism of *C. a. gibelio* to alkali stress. The results showed that the gill tissue metabolites screened out 89 differential metabolites in the positive and negative ion mode, of which 50 were up-regulated and 39 were down-regulated, mainly enriched in glycerophospholipid metabolism, sphingolipid metabolism, arachidonic acid metabolism, and benzene Alanine metabolism, while the biosynthesis of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan was represented by 12 metabolic pathways. This study shows that, after alkali stress, the glycerophospholipid in *C. a. gibelio* regulates the transport of substances inside and outside the cell membrane, and the pathway to synthesize sphingomyelin and sphingosine is inhibited. As the concentrations of prostaglandins, leukotrienes, and L-phenylalanine in the metabolites increase, the detoxification function increases and inflammatory response decreases. This metabolic mechanism may be a key reason for the tolerance of *C. a. gibelio* carp to alkali stress. This study explored the toxic effect and physiological regulation mechanism of alkali stress on crucian carp and provided a theoretical basis for further research into the breeding of excellent salt-tolerant fish species.

Key words: *Carassius auratus gibelio*; alkali stress; gill; target organ; metabolomics; metabolic pathways

Corresponding author: SUN Yanchun. E-mail: sunyc2004@163.com