

DOI: 10.12264/JFSC2024-0395

碳酸盐碱暴露对鲫生长性能、生化指标和肝脏代谢的影响机制

袁芳英^{1,2}, 韩琳^{2,3}, 刘文质^{2,3}, 王晶¹, 李东平¹, 王鹏², 孙言春^{1,2,3*}

1. 哈尔滨理工大学材料科学与化学工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150081;
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;
3. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

摘要: 为探索碳酸盐碱环境暴露对鲫(*Carassius auratus*)生长性能及生理代谢的影响机制, 本研究设置了淡水对照组(Con)、20 mmol/L NaHCO₃ 暴露组(T)和 40 mmol/L NaHCO₃ 暴露组(F), 并在(24±1) °C 下进行为期 56 d 的实验。结果表明, 碳酸盐碱暴露显著抑制了鲫的增重率、特定生长率以及饲料转化率, 同时提高了超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性, 以及血氨、尿素氮(BUN)、总胆固醇(TC)及甘油三酯(TG)等的含量。代谢组学分析显示, 与 Con 组相比, T 组和 F 组共筛选出 117 种差异代谢物(DEMs), 并显著富集于精氨酸生物合成、不饱和脂肪酸代谢、嘌呤代谢、甘油磷脂代谢及谷胱甘肽代谢等多条代谢通路。综合分析表明, 碳酸盐碱暴露会诱导鲫发生氧化应激, 导致肝组织氧化损伤, 并引发与生长发育、免疫防御及脂肪酸代谢相关的多条关键代谢通路发生紊乱, 从而严重阻碍鲫的正常生长。本研究基于代谢组学技术, 结合生长指标及生化分析, 系统揭示了碳酸盐碱环境对鲫生长性能及肝脏代谢的不利影响机制, 为盐碱水域中淡水硬骨鱼类的增养殖提供了科学依据。

关键词: 鲫; 碳酸盐碱暴露; 生长性能; 生化分析; 肝脏代谢组学

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)05-0635-12

水产养殖是全球农业领域增长速度最快的行业之一, 中国作为世界上最大的水产养殖国, 其养殖产量近年来一直稳居世界首位^[1]。随着社会经济的不断发展, 对水产品的需求也日益增加, 因此, 除了利用淡水和海水资源满足水产养殖的需求以外, 开发目前尚处于荒芜闲置状态的盐碱水域来开展水产养殖, 也逐渐成为我国渔业发展的重要途径之一^[2]。据统计, 我国低洼盐碱水域约有 4.6×10^{11} m², 遍及 19 个省市和自治区^[3], 其中碳酸盐型所占面积比例最大^[4], 其中, 碳酸盐浓度超过 10 mmol/L 的水域属于高盐碱类型, 具有高 pH、高碳酸盐碱度和主要离子成分(Ca²⁺、Mg²⁺、Na⁺、K⁺、SO₄²⁻、HCO₃⁻、OH⁻、Cl⁻等)比例失衡^[5]等特点, 这些水资源既不能为人

畜所饮用, 又无法直接用于农业生产。目前, 对于高碳酸盐碱水域的有效利用面积不足 2%^[6], 严重浪费我国国土资源。

生物体内的代谢变化是其应对环境胁迫的第一反应^[7]。代谢物是所有活细胞维持正常生理过程的关键物质, 解析其变化特征有利于深入了解生物体的生理状况^[8]。代谢组学技术是探索外部环境变化对机体影响的重要研究手段之一^[9], 它结合了生物化学、生物信息学分析, 质谱(MS)、核磁共振(NMR)等诸多前沿技术, 是继基因组学和蛋白质组学之后, 在生命科学领域中逐渐获得科学家重视的研究工具^[10]。Peng^[11]等利用 UPLC-QTOF/MS 非靶向代谢组学技术, 探讨了武昌鱼(*Megalobrama amblycephala*)在活

收稿日期: 2025-03-03; 修订日期: 2025-03-10。

基金项目: 黑龙江省自然科学基金杰出青年学者项目(JQ2023C007); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2023TD60); 中国博士后科学基金特别资助项目(2023T160720); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(HSY202304M)

作者简介: 袁芳英(1999-), 女, 硕士, 研究方向为小分子化合物的代谢调控。E-mail: yuanfy8013@163.com。

通信作者: 孙言春, 研究员, 研究方向为水生动物抗逆生长代谢组学及代谢生理学。E-mail: sunyc2004@163.com

体运输过程中肌肉纹理变化的代谢机制, Xie^[12]等解析氧化鱼油对水生生物健康的影响, 采用 UPLC-QTOF/MS 非靶向代谢组学技术探讨了投喂日粮氧化鱼油后, 大口黑鲈(*Micropterus salmoides*) 体内脂肪酸代谢与炎症反应之间的潜在关系。此外, 非靶向代谢组学技术也常被广泛用于分析生物体内小分子代谢物的含量变化, 以探讨环境胁迫对鱼类生理代谢的影响^[13-14]。由此可见, 代谢组学技术逐渐成为研究水生生物环境适应性的主要研究手段之一。

鲫(*Carassius auratus*)是我国重要的经济淡水鱼类之一, 具有环境适应性强、生长速度快和繁殖周期短等优点^[15], 已有研究将其作为探讨邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯^[16]、3, 6-二氯吡啶^[17]以及全氟己酸^[18]等多种环境胁迫因子毒理学机制的可靠生物模型。肝脏是鱼类代谢过程中不可或缺的重要靶器官, 在免疫防御、能量储存与供应、新陈代谢以及毒素分解等多种生理过程中发挥重要作用^[19-20]。因此, 肝脏的健康状况与鱼类的生长发育息息相关。目前虽已有部分研究开展了有关盐碱胁迫对水生生物生长性能的探讨, 但仅限于低浓度的盐碱环境^[21-22], 而对于高浓度下水生生物的生长性能以及相关代谢物的变化特征目前尚不清晰。

本研究以鲫肝脏为研究靶器官, 采用生长参数测定和生化指标分析, 结合 UPLC-QTOF/MS 非靶向代谢组学技术, 解析碳酸盐碱胁迫对鲫生长性能和生理代谢过程造成的影响机制。在当下淡水资源可利用空间受限的大背景下, 本研究旨在为盐碱水域中淡水硬骨鱼类的增殖殖活动提供科学理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验饲料

饲料选用山东通威饲料有限公司市售商品化鲫配合饲料, 饲料具体成分参照前人实验方案^[23]。

1.2 饲养与管理

松浦银鲫购自中国水产科学院黑龙江水产研究所呼兰试验站(中国, 哈尔滨)。所有实验用鱼在盛有自来水的室内循环池(200 L, 100 cm × 50 cm × 40 cm)中驯养 2 周后, 选用大小规格一致, 健康无外伤, 体型壮硕的个体, 随机分为 3 个处理组, 每个处理组 3 个重复, 每个重复 15 尾鱼, 分别为对照组(淡水, Con)和两个 NaHCO₃ 暴露组(20 mmol/L

NaHCO₃, T; 40 mmol/L NaHCO₃, F)。暴露实验开始当天, 准确测量初始体重和初始体长。为避免在暴露实验过程中鲫发生应激反应, 碳酸盐碱度每天以 5 mmol/L 的速度升至实验所需浓度^[23]。本实验所设置的 NaHCO₃ 浓度是基于我们之前对水生生态系统高盐碱性水域数据的实验所确定^[24-25]。

碳酸盐碱环境暴露期间, 保持水温在(24±1.0) °C, 溶解氧>7.5 mg/L, 氨氮<1.0 mg/L, Con 组 pH 约为 7.2, T 组 pH 约为 8.4, F 组 pH 约为 9.1, 每周换水 1/3, 同时使用酸碱滴定法测定 NaHCO₃ 浓度, 并补充至实验所设浓度。每天投喂两次(8:30、17:30), 日投喂量约为鱼体重的 3%, 遵循三定三巡的饲养原则(定时定点定量投喂、早中晚巡查), 投喂 30 min 后, 及时清理残留饵料和鱼类粪便, 避免水质受到残饵污染。样品采集前禁食 24 h。暴露 8 周后, 统计鲫死亡尾数。在每个处理组中随机选取 20 尾鱼, 测量各组鲫终末体重和终末体长。使用 100 mg/L 间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐溶液(MS-222)将鲫麻醉后, 用 2 mL 无菌注射器从尾静脉处采集全血并转移至离心管中, 于 4 °C 静置沉淀 2 h 后, 离心机 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液即为血清, 保存于-80 °C 冰箱备用。接着在冰上迅速解剖出肝脏, 对应称重并记录后, 转移至冻存管内, 立即置于液氮中冷冻, 并在采样结束后 24 h 内将样品转移至-80 °C 冰箱中保存备用。其中 15 份肝脏样本用于代谢组学分析, 8 份肝脏和 8 份血清样本用于生化分析。

1.3 生化指标测定

每个处理组随机取 8 份血清样本, 测量血清中血氨(blood ammonia)、尿素氮(BUN)、总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)的含量; 随机选取 8 份肝脏样本用于测定抗氧化指标, 超氧化物歧化酶(SOD); 过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性和丙二醛(MDA)含量, 以上检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, 所有生化指标检测均按照试剂盒说明进行。

1.4 UPLC-QTOF/MS 分析

1.4.1 样品前处理 每个处理组在-80 °C 冰箱随机取出 15 份肝组织样本在-4 °C 条件下解冻。准确称取 100 mg 样品于 1.5 mL 离心管中, 每个样品管中分别加入 3 颗钢珠和 600 μL 预冷的 80%甲醇水溶液(甲醇: 水=4: 1, v/v), 在-20 °C 条件下 60 Hz 速度均

质 3 min。冰水浴超声 15 min 后, 在-20 ℃下静置沉淀 1 h, 最后在 4 ℃, 13000 r/min 条件下离心 15 min。使用 1.0 mL 无菌注射器取上清液, 经 0.22 μm 有机相针式过滤膜过滤至自动进样瓶中待测。从各组中取等量肝脏样品均匀混合后, 按照上述样本所述的前处理方法制备质量控制(QC)样品, 用于评估高分辨仪器的灵敏度和稳定性。

1.4.2 UPLC-QTOF/MS 检测 UPLC-QTOF/MS 检测详细参数, 参照前人实验方案^[26]。

1.5 生长性能指标计算公式:

参考鱼类生态学方法^[27], 测定鲫的体重和体长, 并计算其增重率、特性生长率、饲料系数、肝体比和肥满度。计算公式如下:

增重率(weight gain rate, WGR, %) = 100% × (末均重-初均重) / 初均重;

特定生长率(specific growth rate, SGR, %/d) = 100% × (ln 末均重-ln 初均重) / 饲养天数;

存活率(survival rate, SR, %) = 100% × 终末尾数 / 初始尾数;

饲料系数(feed conversion ratio, FCR) = 摄食饲料干重 / (终末体重-初始体重);

肝体比(hepatosomatic index, HIS, %) = 100% × 每尾肝脏体重 / 每尾最终体重;

肥满度(condition factor, CF, g/cm³) = 100% × 末体重 / 体长³;

1.6 数据处理与分析

采用 GraphPad Prism 9.5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)软件和 SPSS 27 对生化指

标和生长数据进行单因素方差分析(ANOVA), 确定各组之间的差异显著性。结果用平均数±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。

将在正负离子模式下采集的原始数据, 导入 Progenesis QI 软件(美国 Waters 公司), 对色谱峰进行识别、提取和对齐等预处理操作。使用人类代谢组数据库(HMDB)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)等公共数据库对代谢物进行注释, 生成含有保留时间、样本名称、质荷比和峰面积的数据矩阵。将数据矩阵导入分析软件 SIMCA 14.1(瑞典 Umetrics 公司)进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 以确定各组间的整体代谢变化。将在 Student's *t* 检验中以 VIP>1 和 *P*<0.05 为筛选条件筛选所得到的代谢物视为差异代谢物(DEMs), MetaboAnalyst 5.0 数据库对 DEMs 进行代谢通路富集分析。

2 结果与分析

2.1 碳酸盐碱胁迫对鲫生长性状的影响

如表 1 所示, Con、T 和 F 组的增重率、饲料系数和特定生长率均发生显著变化(*P*<0.05)。随着碳酸盐碱浓度的升高, 两个暴露组中鲫的增重率和特定生长率逐渐下降。其中, 与 Con 组相比, T 组和 F 组的增重率分别下降了 14.48%和 39.83%, 特定生长率分别下降 0.12%/d 和 0.35%/d, 均在 F 组中显著低于 Con 组(*P*<0.05)。饲料系数与碳酸盐碱浓度成正相关, 其中, T 组和 F 组分别比 Con 组升高 0.15 和

表 1 不同浓度的碳酸盐碱胁迫对鲫生长性能的影响
Tab. 1 Effects of different concentrations of carbonate alkaline exposure on the growth performance of *Carassius auratus*

组别 group	NaHCO ₃ 浓度 /mmol/L NaHCO ₃ concentration		
	0 mmol/L	20 mmol/L	40 mmol/L
初始体重/g initial body weight	62.42±1.49 ^a	62.32±1.59 ^a	61.72±2.02 ^a
终末体重/g final body weight	138.93±3.31 ^a	129.69±3.31 ^b	112.83±3.70 ^c
增重率/% weight gain rate	122.56±1.14 ^a	108.08±0.08 ^b	82.73±0.12 ^c
特定生长率/(%/d) specific growth rate	1.43±0.01 ^a	1.31±0.001 ^b	1.08±0.001 ^c
存活率/% survival rate	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a
饲料系数 feed conversion ratio	1.11±0.03 ^c	1.26±0.03 ^b	1.67±0.06 ^a
肝体比/% hepatosomatic index	2.16±0.14 ^a	2.03±0.03 ^b	2.01±0.02 ^b
肥满度/(g/cm ³) condition factor	2.55±0.65 ^a	2.69±0.40 ^a	2.62±0.52 ^a

注: 同行数据上标小写字母不同表示组间有显著差异(*P*<0.05).
Note: Different lowercase letters indicate significant differences between groups (*P*<0.05).

0.55, 且 F 组的饲料系数显著高于 Con 组和 T 组($P < 0.05$), 这说明高碳酸盐碱胁迫下, 鲫的饲料转化率有所降低。与 Con 组相比, 鲫的肝体比在碳酸盐碱暴露组中显著降低, 而在两个暴露组间并无显著差异($P < 0.05$)。此外, 鲫的肥满度在碳酸盐碱胁迫下也未表现出显著性差异($P < 0.05$)。

2.2 碳酸盐碱暴露对鲫生化参数的影响

碳酸盐碱胁迫 56 d 后, T 组和 F 组的血氨含量

增加(图 1a)。F 组中 BUN 含量显著高于 Con 组($P < 0.05$), 而在 T 组与 Con 组之间并无明显差异(图 1b)。如图 1c~e 所示, SOD、CAT 活性和 MDA 含量变化均与碳酸盐碱浓度呈正相关趋势, 且 T 组和 F 组均与 Con 组存在显著性差异($P < 0.05$)。如图 1f 所示, 与 Con 和 T 组相比, GSH-Px 活力在 F 组中显著提高($P < 0.05$)。如图 1g~h 所示, F 组中 TC 和 TG 含量均显著高于 Con 组($P < 0.05$)。

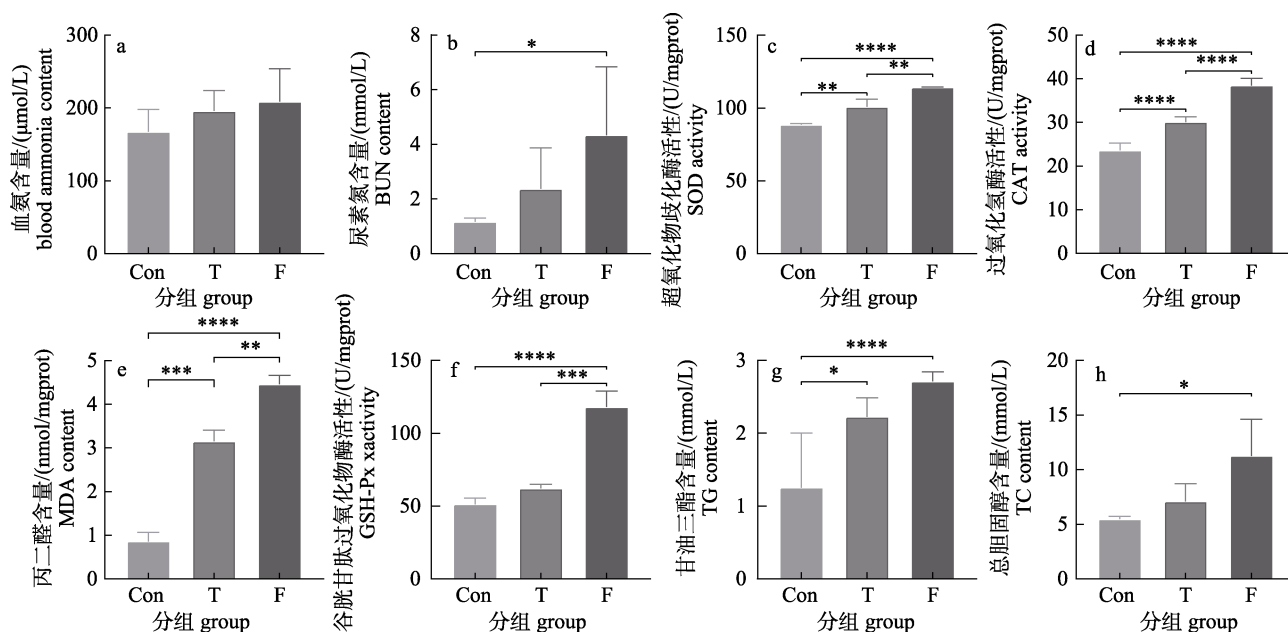


图 1 不同浓度的碳酸盐碱暴露对鲫肝生化指标的影响

a. 血氨; b. BUN; c. SOD; d. CAT; e. MDA; f. GSH-Px; g. TG; h. TC.

Con 为淡水对照组, T 为 20 mmol/L NaHCO_3 盐碱暴露组, F 为 40 mmol/L NaHCO_3 盐碱暴露组,

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Fig. 1 Effects of different concentrations of carbonate saline-alkaline exposure on liver biochemical indices of *Carassius auratus*

a. Blood ammonia; b. BUN; c. SOD; d. CAT; e. MDA; f. GSH-Px; g. TG; h. TC.

Con is freshwater control group, T is 20 mmol/L NaHCO_3 saline-alkaline exposure group, F is 40 mmol/L NaHCO_3 saline-alkaline exposure group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

2.3 碳酸盐碱暴露后代谢组学的变化

2.3.1 PCA、OPLS-DA 分析 PCA 得分图显示, QC 样本在较小的区域内表现出强烈的聚集, 表明仪器具有较高的稳定性和实验数据具有可靠性。3 个处理组内的样品点在正负离子模式下出现显著分离, 而组间样品点虽然分布在不同的区域, 但仍有小部分重叠, 表明在不同浓度的碳酸盐碱暴露下, 鲫肝脏代谢存在较大差异(图 2a~b)。为了进一步分析不同处理组间肝脏代谢物的差异, 采用有监督的 OPLS-DA 分析模型, 它比 PCA 分析方法具有更有效的分类能力, 能够通过降低系统噪声准确提取变

量信息。如图 2c~d 所示, 正负离子模式下, Con 组、T 组和 F 组的代谢物之间出现明显的分离, 各组样本均匀分布在不同的区域内。经过对 OPLS-DA 模型进行 200 次置换检验后(图 2e~f), 正离子模式下 R^2Y 和 Q^2 的值分别为 0.949 和 0.920, 负离子模式下 R^2Y 和 Q^2 的值分别为 0.963 和 0.863, 数据表明 OPLS-DA 模型在正负离子模式下没有过度拟合, 具有很高的可预测性, 适用于后续实验分析。

2.3.2 差异代谢物筛选 为了更好地了解在不同浓度的碳酸盐碱暴露下, 鲫肝脏代谢物的整体差异情况, 以 $\text{VIP} > 1$, $P < 0.05$ 作为筛选条件, 筛选得到 DEMs。

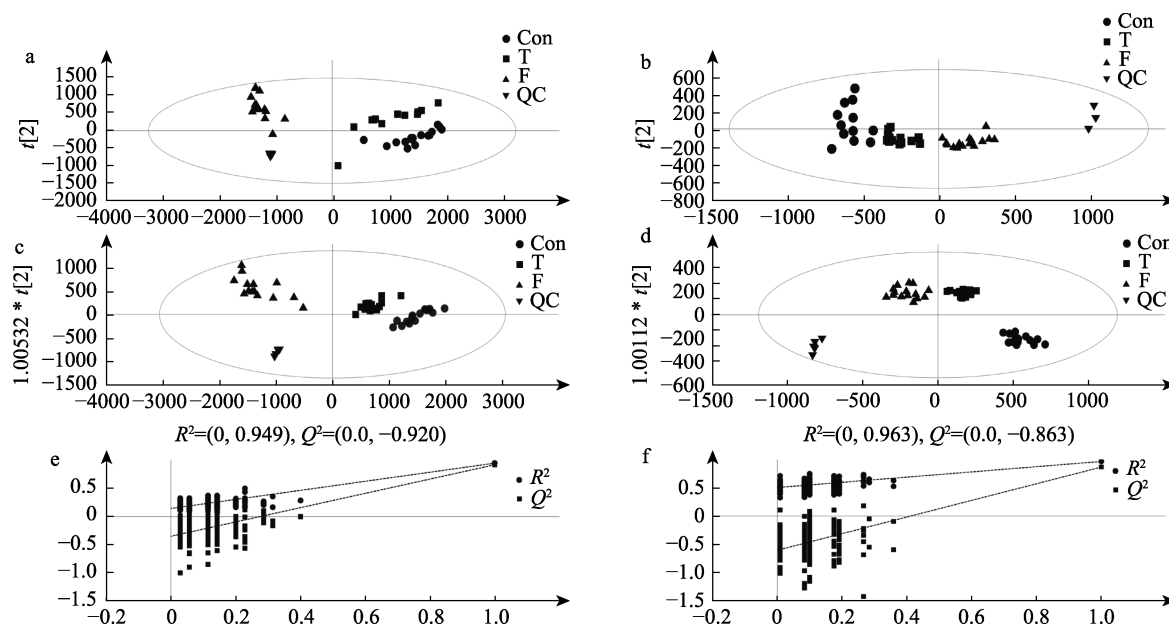


图 2 鲫肝脏代谢组学 PCA 和 OPLS-DA 分析

a-b. 正、负离子模式下 PCA 得分图; c-d. 正、负离子模式下 OPLS-DA 得分图;

e-f. 正、负离子模式下 OPLS-DA 模型置换验证图。

Con 为淡水对照组, T 为 20 mmol/L NaHCO_3 盐碱暴露组, F 为 40 mmol/L NaHCO_3 盐碱暴露组,

R^2 表示 OPLS-DA 模型的解释方差, Q^2 表示 OPLS-DA 模型的预测能力。

Fig. 2 Metabolomic PCA and OPLS-DA analysis of *Carassius auratus* liver

a-b. The PCA score plots in positive and negative ion modes; c-d. The OPLS-DA score plots in positive and negative ion modes;

e-f. The OPLS-DA permutation test in positive and negative ion modes.

Con is freshwater control, T is 20 mmol/L NaHCO_3 saline-alkaline exposure group, F is 40 mmol/L NaHCO_3 saline-alkaline exposure group, R^2 is the explained variance of the OPLS-DA model, and Q^2 is the predictive ability of the OPLS-DA model.

如图 3a~c 所示, 在 Con vs. T 组中共筛选到 17 种具有统计学意义的 DEMs, 包括 12 个上调, 5 个下调, 在 Con vs. F 组中共筛选到 100 种具有统计学意义的 DEMs, 包括 35 个上调, 65 个下调。可视化的维恩图直观的展示了 DEMs 之间的覆盖性和特异性(图 3d), 其中在 Con vs. T、Con vs. F 两个对比组中筛选到 12 种相同的 DEMs。层次聚类分析显示, 各组 DEMs 之间的相对含量存在显著差异(图 4a)。随后, 采用 MetaboAnalyst 5.0 对 DEMs 进行代谢通路富集分析, 结果显示, 在 Con vs. T 组中, 共富集到 27 条代谢通路, 其中不饱和脂肪酸的生物合成、嘌呤代谢、甘油磷脂代谢和谷胱甘肽代谢等代谢通路受到显著影响(图 4b)。随着 NaHCO_3 浓度不断升高, 受影响的代谢通路数量显著增加。在 Con vs. F 组中, 共富集到 35 条代谢通路, 其中不饱和脂肪酸的生物合成、嘌呤代谢、甘油磷脂代谢、谷胱甘肽代谢、精氨酸生物合成、淀粉和蔗糖代谢、乙醛酸酯和二羧酸酯代谢、花生四烯酸代谢和鞘脂代谢等多条代谢通路受影响最为显著(图 4c)。

3 讨论

3.1 碳酸盐碱暴露对鲫生长性能的影响

在鱼类生长代谢过程中, 蛋白质是其最重要的营养物质之一, 而氨基酸作为蛋白质合成的前提物质能够直接为鱼类的正常生命活动提供能量基础^[28]。其中, 在机体生长所需的必需氨基酸中, 精氨酸是机体内的一种多功能性氨基酸, 它不仅参与免疫反应, 还能刺激鱼体释放生长激素, 在维持鱼类良好的生长性能和健康方面发挥重要生理作用^[29]。目前, 精氨酸的促生长作用已经在鱼类研究中被广泛报道, 如斑点鲈(*Lateolabrax maculatus*)^[30]、幼黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[31]、翘嘴鲇(*Culter alburnus*)^[32]等。当生物体面临外界环境胁迫时, 精氨酸通常会被降解为尿素、鸟氨酸、肌酸、瓜氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺等物质。其中, 肌酸又称 N-甲基胍乙酸或毒草碱酸, 属于一种氨基酸衍生物, 是动物体内有机合成的天然营养物质, 其可以通过氧化磷酸化过程有效促进肝组织中三磷酸腺苷(ATP)与二磷酸腺

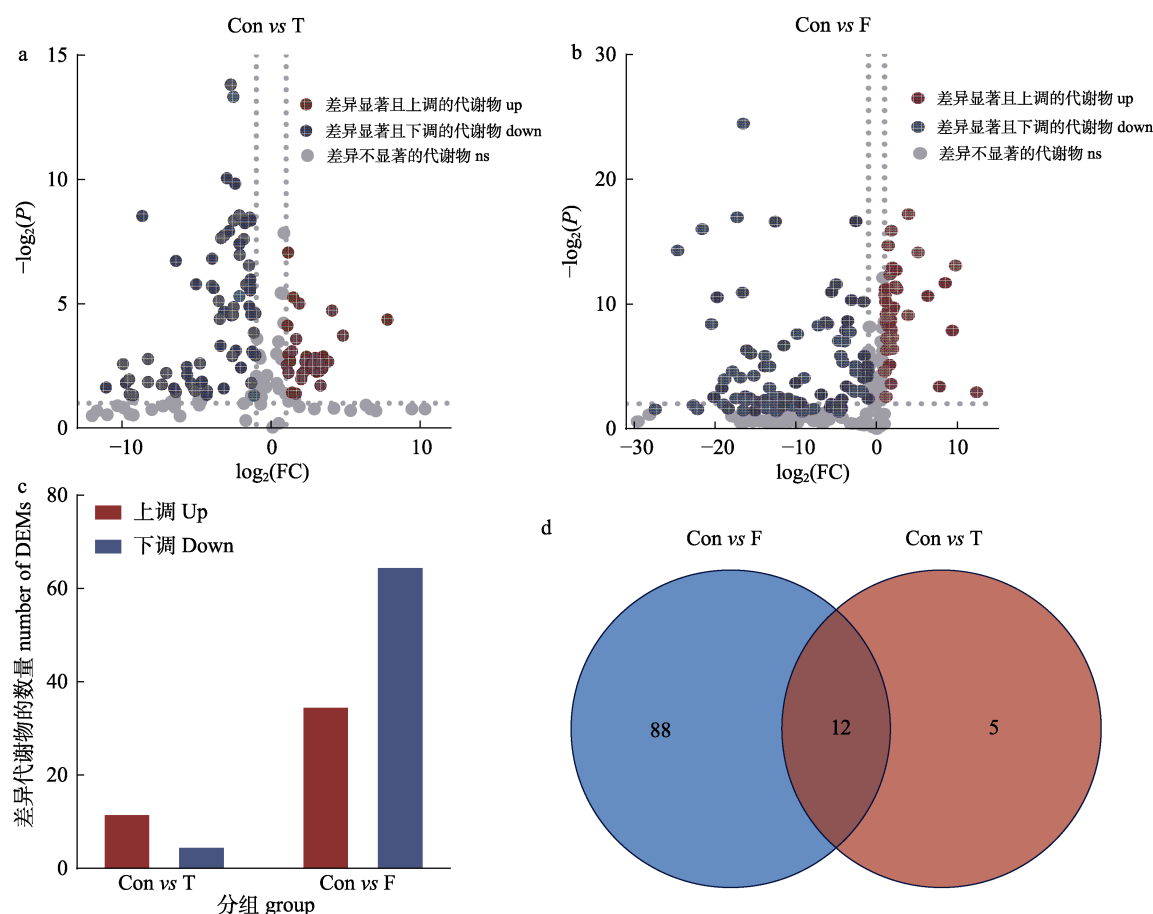


图 3 鲫肝脏差异代谢物鉴定

a, b. 差异代谢物火山图; c. 差异代谢物数量; d. 差异代谢物维恩图.

Con 为淡水对照组, T 为 20 mmol/L NaHCO_3 盐碱暴露组, F 为 40 mmol/L NaHCO_3 盐碱暴露组, FC 为差异倍数, DEMs 为代谢差异物.

Fig. 3 Identification of liver differential metabolites in *Carassius auratus*

a-b. Volcano plot of differential metabolites; c. Number of differential metabolites; d. Venn diagram of differential metabolites. Con is freshwater control group, T is 20 mmol/L NaHCO_3 saline-alkaline exposure group, F is 40 mmol/L NaHCO_3 saline-alkaline exposure group, FC means fold change, DEMs means differential metabolites.

苷(ADP)的相互转化。目前,有研究发现肌酸在提高鱼类免疫防御和生长性能方面发挥着关键作用^[33]。本研究的代谢组学结果显示,随着碳酸盐碱浓度的升高,鲫肝靶器官中肌酸和 ATP 的含量显著增加。Sun^[34]等发现,鱼类体内大量合成的肌酸会通过特定的质膜 Na/Cl^{++} 被输送到能量需求大的组织中,通过改善组织内线粒体的氧化磷酸化能力提高 ATP 的合成过程,促进机体的能量代谢,进而增强其生长性能。Burns^[35]等在探讨肌酸对低盐度环境下杂交条纹鲈鱼(HBS)生长性能的影响时发现,高含量的肌酸对杂交条纹鲈鱼应对环境胁迫具有积极影响。结合上述研究结果,我们发现随着碳酸盐碱浓度的升高,鲫通过产生更多的肌酸来调节自身的能量生

成过程,用于满足碳酸盐碱暴露下鲫肝脏的高耗能需求。生长数据显示,碳酸盐碱环境暴露下,鲫的增重率、生长率和饲料转化率均显著降低,然而其存活率却无显著差异,这说明鲫对碳酸盐碱环境具有较强的适应性。但鲫为了适应高浓度的碳酸盐碱暴露,机体需要消耗大量的能量物质,造成其无法满足自身生长发育的能量需求,从而导致生长速度减缓。另有研究表明,外部环境变化导致鱼体内渗透调节失衡,从而减少了用于生长的能量物质供应^[36],这与我们的研究结论一致。

3.2 碳酸盐碱环境诱发鲫氧化应激造成肝脏损伤

除了生长性能以外,鱼类的生理状态也是目前鱼类研究中的焦点问题之一,而抗氧化能力是反应

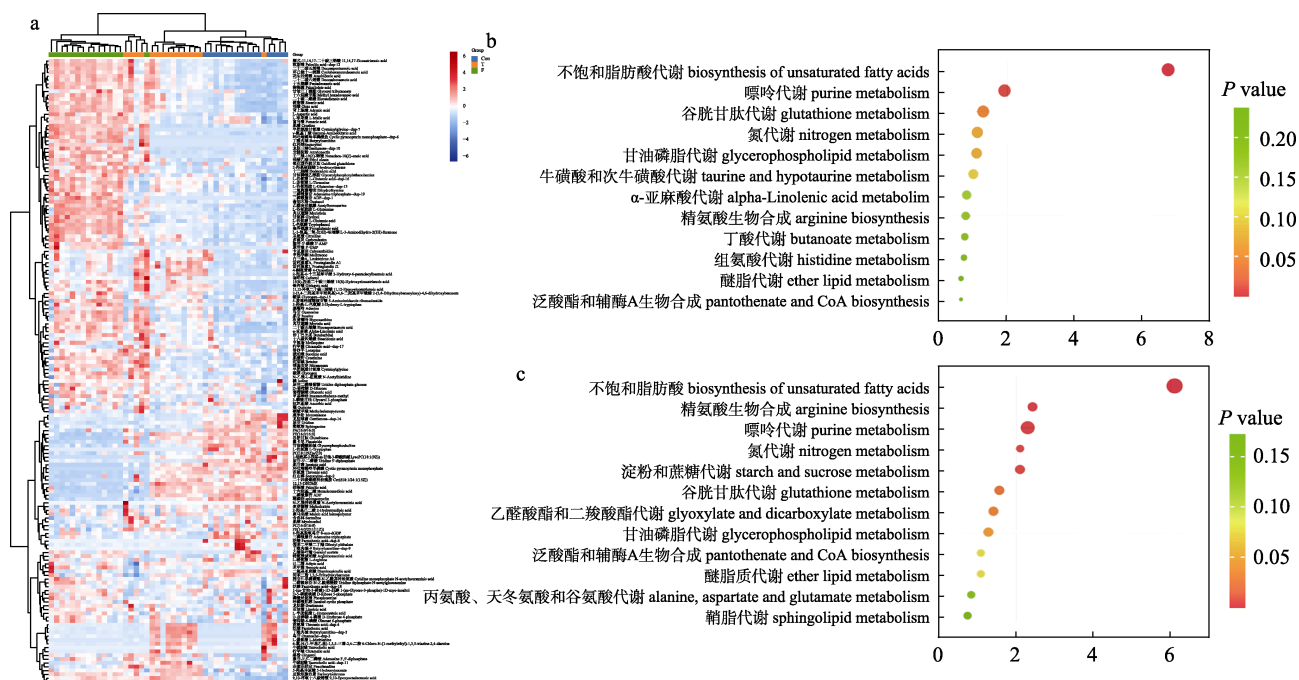


图 4 不同浓度碳酸盐碱暴露下鲫肝脏代谢物及代谢途径富集分析

a. 差异代谢物层次聚类热图; b. Con vs T 组代谢途径变化; c. Con vs F 组代谢途径变化.

Con 为淡水对照组, T 为 20 mmol/L NaHCO_3 盐碱暴露组, F 为 40 mmol/L NaHCO_3 盐碱暴露组.

Fig. 4 Analysis of liver metabolites and metabolic pathways enrichment analysis in *Carassius auratus* under different concentrations of carbonate saline-alkaline exposure

a. Cluster heatmap of differential metabolites; b. Con vs. T group metabolic pathway enrichment analysis;

c. Con vs. F group metabolic pathway enrichment analysis.

Con is freshwater control, T is 20 mmol/L NaHCO_3 saline-alkaline exposure group,

F is 40 mmol/L NaHCO_3 saline-alkaline exposure group.

生理状态的重要指标。水生生物在应对环境胁迫时, 往往会造成体内活性氧(ROS)过度积累而诱发氧化应激反应^[37], 导致多种疾病的产生, 进而影响机体正常的生长发育。鱼类拥有完整的抗氧化防御系统, 包括 SOD、CAT 和 GSH-Px 等主要抗氧化酶。其中, SOD 和 CAT 在有效消减 ROS 的同时还能激活抗氧化酶的分子调控系统。SOD 首先将有害的超氧阴离子(O_2^-)转化为过氧化氢(H_2O_2), 减小环境胁迫对生物体造成的氧化损伤, 随后体内产生 CAT, 而 CAT 会将 SOD 产生的 H_2O_2 进一步转化成水(H_2O)和氧气(O_2), 并阻止 H_2O_2 与 O_2 继续反应生成羟基自由基($\cdot\text{OH}$), 从而进一步减轻氧化应激对组织造成的损伤。在本研究中, SOD 和 CAT 的水平随着碳酸盐碱浓度的升高而增加, 同样, Ding 等^[38]对鲫肾脏的研究发现, NaHCO_3 浓度为 20 和 40 mmol/L 时, 肾脏中 SOD 和 CAT 的活性显著升高。Wei 等^[39]在研究鲫肝脏对碳酸盐碱胁迫的耐受机制时发现, F 组相

较于 T 组, 其 SOD 和 CAT 活性均出现显著升高现象。这些研究结果表明, 碳酸盐碱环境暴露激活了鲫体内的抗氧化防御系统。此外, GSH-Px 和 CAT 的功能相似, 都具有清除 H_2O_2 的能力。当体内 H_2O_2 含量先期升高时, GSH-Px 率先参与机体的保护反应, 而当 H_2O_2 过量产生对机体造成的伤害加剧时, CAT 开始启动并参与保护反应。这两种氧化酶协同作用, 共同保护靶器官细胞组织免受氧化应激损伤^[40]。本研究的 GSH-Px 酶活性测定结果显示, 随着碳酸盐碱浓度的增加, 肝脏中 GSH-Px 的酶活力显著升高。此外, 结合代谢数据分析发现, 还原型谷胱甘肽(GSH)含量在两个碳酸盐碱暴露组中均显著低于 Con 组, 但同时氧化型谷胱甘肽(GSSG)的水平在两个暴露组中却显著升高。有相关研究发现, 在碳酸盐碱环境中, GSH 和 H_2O_2 能在 GSH-Px 的催化作用下产生 GSSG 和 H_2O , 以保护细胞结构和功能免受碳酸盐碱暴露引起的氧化损伤^[16]。在本项研究中,

鲫的氧化应激表现与上述研究发现呈现相似结果,这说明碳酸盐碱暴露导致 ROS 的生成与清除过程出现失衡状态,而为了保护肝组织免受碳酸盐碱暴露造成的氧化应激损伤,鲫激活了体内氧化防御系统应对该生理困境。此外,氧化应激还会引起脂质过氧化反应,这一后果不仅会破坏细胞膜的完整性,还会导致细胞功能的紊乱,进而影响机体的健康状态。MDA 作为脂质过氧化的重要标志性产物之一,常被用作评估氧化应激对生物体损伤程度的重要指标^[41]。本研究 MDA 测定结果显示,随着碳酸盐碱浓度的增加,肝脏中 MDA 的含量呈剂量依赖性增加的趋势,这与先前碳酸盐碱暴露会降低鱼类肠道抗氧化能力的研究发现相一致^[42]。同时,本研究结合代谢组学分析数据发现,多不饱和脂肪酸类物质如二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)、 α -亚麻酸(Alpha-Linolenic acid, ALA)和二十二碳五烯酸(docosapentaenoic acid, DPA)等含量的变化表现出与 MDA 含量变化相似的趋势,而研究表明这类物质能够参与超氧化物的清除反应,在细胞中通常扮演抗氧化剂的角色^[43]。上述结果表明,碳酸盐碱暴露诱发了鲫的氧化应激反应,造成了肝脏损伤,而鲫为了维持机体的生理稳态和健康,激活了自身防御系统的抗氧化酶活性以应对环境对机体造成的不利影响。

3.3 碳酸盐碱胁迫导致脂肪酸代谢紊乱

脂质是鱼类生长发育所必需的重要能量物质之一,同时也是体内必需脂肪酸、磷脂和脂溶性维生素等营养物质的主要来源,在维持鱼类细胞膜生物功能和促进生长性能等方面发挥着重要生理作用^[44]。TG 和 TC 是细胞主要的能量来源之一,它们在血清中的含量变化不仅可以反映鱼类肝脏的健康状况,还与体内脂质代谢密切相关^[45-46]。TG 和 TC 分别参与体内脂质的分解和运输,其含量的增加不仅会干扰内源性脂质的正常转运,还会导致体内脂质的异常积累,而过量的脂质累积容易引起脂肪酸代谢紊乱,进而导致组织损伤^[47]。本研究结果发现, TG 和 TC 的含量随碳酸盐碱浓度的升高而呈现增加的趋势,且均在 F 组中极显著高于 Con 组,这表明碳酸盐碱暴露引起了鲫肝脏中脂质的过度积累,导致肝组织严重受损,且伤害程度出现剂量依赖性趋势。

此外,结合代谢组学分析数据我们发现,随着碳酸盐碱浓度的增加,鲫体内与脂肪酸代谢相关的多条代谢途径发生了显著变化,包括甘油磷脂代谢、鞘脂代谢、花生四烯酸代谢和 α -亚麻酸代谢等代谢通路。其中甘油磷脂和鞘脂是细胞膜的重要组成部分,而细胞膜的流动性与机体免疫能力密切相关^[12]。甘油磷脂代谢物如磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酸(PA)等,不仅在维持细胞膜的完整性和流动性中占据重要生理地位,它们还能参与调节鱼类疾病的信号传导和能量转化,在一定程度上起到缓解组织损伤的保护作用^[48]。在正常生存环境下,这些甘油磷脂代谢物能够在体内被磷脂酶水解生成脂肪酸(fatty acid, FA)和溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholines, LPL)等物质,来参与 DNA、RNA、蛋白质以及类花生酸的生物合成,以促进机体的快速生长和繁殖^[49]。在本研究中,与 Con 组相比, PC、PE 和 PA 的水平在 T 组中变化不显著,而在 F 组中却显著降低。这表明在 T 组中,鲫通过体内信号传导作用,调节相关脂肪酸代谢产物,自身足以缓解此浓度下碳酸盐碱暴露造成的肝损伤和生理紊乱,而高浓度碳酸盐碱暴露可能由于严重破坏了细胞膜的稳定性,甘油磷脂代谢紊乱,进而造成了肝组织严重受损。在鞘脂代谢过程中所涉及到的代谢物如鞘磷脂(sphingomyelin, SM)、神经酰胺(ceramide, Cer)和鞘氨醇(sphingosine, Sph)等物质具有较高的生物活性,可以直接参与细胞的增殖活动和炎症反应^[50-51]。本研究的代谢组学数据分析结果显示,随着碳酸盐碱浓度的增加, Cer、SM 和 Sph 的含量均有不同程度的下降。这表明碳酸盐碱胁迫可能造成了鲫肝脏中鞘脂代谢的紊乱,并且随着碳酸盐碱浓度的增加,机体需要消耗更多的鞘脂类代谢物来促进细胞增殖和参与炎症反应,这一结果与碳酸盐碱暴露下鲫组织的生理变化结果类似^[52]。结合上述研究结果,我们推测碳酸盐碱暴露可能会破坏鲫肝脏细胞膜的结构和功能,并且随着碳酸盐碱浓度的升高,鲫肝脏中的脂质代谢紊乱加重,严重影响了鲫的生长发育和免疫防护作用。

4 结论

本研究采用生长指标和生化分析方法,结合 UPLC-QTOF/MS 非靶向代谢组学技术,探讨了碳酸

盐碱环境暴露对鲫的生长性能、生化反应和肝脏代谢的影响机制。结果表明, 碳酸盐碱暴露显著抑制了鲫的生长速度, 扰乱了其体内 ROS 与抗氧化系统之间的平衡, 导致多种抗氧化酶的活性异常, 进而造成了肝组织的氧化应激损伤。此外, 随着碳酸盐碱浓度的升高, 鲫体内的免疫防御系统遭到了严重破坏, 诱发了鲫肝脏中与生长发育和免疫防护相关的精氨酸生物合成和脂肪酸代谢等多条关键代谢通路发生紊乱, 从而抑制了细胞的增殖活动, 严重阻碍了鲫的正常生长发育。本研究从生长指标、生化分析和代谢组学的角度, 阐明了碳酸盐碱暴露对鲫生长性能和生理代谢过程的自身调控机理, 为淡水硬骨鱼类在盐碱水域中的增殖活动提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Liang H, Luo Z Q, Ren W L. Healthy eco-aquaculture modes and cases[J]. Journal of Aquaculture, 2024, 45(6): 17-23. [梁华, 骆志强, 任文玲. 水产生态健康养殖模式和案例[J]. 水产养殖, 2024, 45(6): 17-23.]
- [2] Zhu R T, Tao H, Lai Q F, et al. Preparation of biochar from solid waste of saline-alkaline aquaculture and its effect on sulfate saline-alkaline soil amendment[J]. Marine Fisheries, 2024, 46(2): 195-205. [朱润唐, 陶红, 来琦芳, 等. 盐碱水养殖固体废物生物炭对硫酸盐型盐碱土的改良效果评价[J]. 海洋渔业, 2024, 46(2): 195-205.]
- [3] Li Y L, He Y Y, Wang Q, et al. Analysis of expression patterns of *PcABCG5* gene in *Penaeus chinensis* under saline-alkali stress[J]. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(5): 165-173. [李亚伦, 何玉英, 王琼, 等. 中国对虾 *PcABCG5* 基因在高碳酸盐碱度胁迫下的表达模式分析[J]. 渔业科学进展, 2024, 45(5): 165-173.]
- [4] Lu G Z, Yao Z L, Lai Q F, et al. Growth performance, blood parameters, and texture characteristics of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to highly saline-alkaline water[J]. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 1-11. [逯冠政, 么宗利, 来琦芳, 等. 高盐碱环境下大口黑鲈幼鱼生长性能、血液生理指标与质构特征研究[J]. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 1-11.]
- [5] Peng M X, Li Z J, Liu X, et al. Tolerance, growth, and physiological responses of the juvenile razor clam (*Sinonovacula constricta*) to environmental Ca^{2+} and Mg^{2+} concentrations[J]. Frontiers in Physiology, 2019, 10: Article No.911.
- [6] Yao M Z, Liu Y J, Li S W, et al. Metabolomics study on gill tissues of *Carassius auratus* gibelio under NaHCO_3 habitat stress[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(6): 792-802. [姚明珠, 刘英杰, 李娜蔚, 等. NaHCO_3 生境胁迫下方正银鲫鳃靶器官代谢组学研究[J]. 中国水产科学, 2022, 29(6): 792-802.]
- [7] Li Y Z, Kim S, Lee S, et al. Metabolic effects of diclofenac on the aquatic food chain - ^1H -NMR study of water flea-zebrafish system[J]. Toxicological Research, 2023, 39(2): 307-315.
- [8] Ozcelikay G, Kaya S I, Ozkan E, et al. Sensor-based MIP technologies for targeted metabolomics analysis[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2022, 146: 116487.
- [9] Gao J Y, Xiao Y. Metabolomics and its applications in assisted reproductive technology[J]. IET Nanobiotechnology, 2023, 17(5): 399-405.
- [10] Wang X Y, Peng R Y, Zhao L. Multiscale metabolomics techniques: Insights into neuroscience research[J]. Neurobiology of Disease, 2024, 198: 106541.
- [11] Peng L, You J, Wang L, et al. Insight into the mechanism on texture change of Wuchang bream muscle during live transportation using a UPLC-QTOF-MS based metabolomics method[J]. Food Chemistry, 2023, 398: 133796.
- [12] Xie S W, Yin P, Tian L X, et al. Lipid metabolism and plasma metabolomics of juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides* were affected by dietary oxidized fish oil[J]. Aquaculture, 2020, 522: 735158.
- [13] Luo M K, Feng B B, Zhu W B, et al. Proteomics and metabolomics analysis of American shad (*Alosa sapidissima*) liver responses to heat stress[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2024, 296: 111686.
- [14] Yang E J, Amenyogbe E, Zhang J D, et al. Integrated transcriptomics and metabolomics analysis of the intestine of cobia (*Rachycentron canadum*) under hypoxia stress[J]. Aquaculture Reports, 2022, 25: 101261.
- [15] Liu J, Zhang P J, Wang B, et al. Evaluation of the effects of Astragalus polysaccharides as immunostimulants on the immune response of crucian carp and against SVCV *in vitro* and *in vivo*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2022, 253: 109249.
- [16] Liu Y J, Chen Z X, Li S W, et al. Multi-omics profiling and biochemical assays reveal the acute toxicity of environmental related concentrations of Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the gill of crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. Chemosphere, 2022, 307(2): 135814.
- [17] Bai Y, Zhang J, Meng H R, et al. Enrichment and distribution of 3,6-dichlorocarbazole in red crucian carp (*Carassius auratus*) and its hepatotoxicity[J]. Science of the Total Environment, 2024, 911: 168732.
- [18] Jiao X, Guo Z Y, Liu B L, et al. Toxic effects of perfluorocaproic acid (PFHxA) on crucian carp (*Carassius auratus*) and the response of the intestinal microbial community[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2023, 271: 109683.
- [19] Hu J M, Zuo J E, Li J B, et al. Effects of secondary

- polyethylene microplastic exposure on crucian (*Carassius carassius*) growth, liver damage, and gut microbiome composition[J]. Science of the Total Environment, 2022, 802: 149736.
- [20] Wang F, Zhong Z R, Xie Q, et al. Multiomics analyses explore the immunometabolic interplay in the liver of white crucian carp (*Carassius cuvieri*) after *Aeromonas veronii* challenge[J]. Marine Biotechnology, 2024, 26(4): 790-809.
- [21] Zhou H S, Yao T H, Zhang T X, et al. Effects of chronic saline-alkaline stress on gill, liver and intestinal histology, biochemical, and immune indexes in Amur minnow (*Phoxinus lagowskii*)[J]. Aquaculture, 2024, 579: 740153.
- [22] Li Y, Gao P C, Zhou K, et al. Effects of saline and alkaline stresses on the survival, growth, and physiological responses in juvenile mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. Aquaculture, 2024, 591: 741143.
- [23] Ding L, Liu Y J, Wei X F, et al. Effects of α -ketoglutarate supplementation on serum metabolism of crucian carp under carbonate alkaline stress based on UPLC-Q-TOF/MS metabolomics[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2023, 30(2): 138-149. [丁璐, 刘英杰, 魏晓凤, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 代谢组学技术探究 α -酮戊二酸对碳酸盐胁迫下鲫血清代谢的影响[J]. 中国水产科学, 2023, 30(2): 138-149.]
- [24] 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.
- [25] Zheng W G, Zhang Z Q, Zhang M Z, et al. Toxicity of salinity and alkalinity to *C. auratus gibelio* fingerlings[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2001, 31(4): 513-517. [郑伟刚, 张兆琪, 张美昭, 等. 盐碱水 NaCl 浓度和碱度对银鲫(*Carassius auratus gibelio*)幼鱼毒性的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2001, 31(4): 513-517.]
- [26] Liu Y J, Yao M Z, Li S W, et al. Research on metabolomics analysis method for fish gills target organs based on UPLC-QTOF MS[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2022, 41(8): 1193-1199. [刘英杰, 姚明珠, 李姗姗, 等. 基于 UPLC-QTOF MS 的鱼类鳃靶器官代谢组学分析方法研究[J]. 分析测试学报, 2022, 41(8): 1193-1199.]
- [27] Yin M C. Fish ecology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995: 34-55. [殷名称. 鱼类生态学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 34-55.]
- [28] Cui Y N, Wang X, Zhou H H, et al. Effect of temperature on protein requirement, growth and metabolism of juvenile turbot[J]. Periodical of Ocean University of China, 2024, 54(7): 139-148. [崔业楠, 王旋, 周慧慧, 等. 温度对大菱鲆幼鱼蛋白质需求、生长和代谢的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2024, 54(7): 139-148.]
- [29] Clark T C, Tinsley J, Sigholt T, et al. Supplementation of arginine, ornithine and citrulline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on growth, amino acid levels in plasma and gene expression responses in liver tissue[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2020, 241: 110632.
- [30] Cheng Y W, Li X S, Wang L, et al. Effects of dietary arginine levels on growth, immune function of physical barriers and serum parameters of spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*) reared at different water temperatures[J]. Aquaculture, 2021, 541: 736812.
- [31] Wang B, Liu Y, Feng L, et al. Effects of dietary arginine supplementation on growth performance, flesh quality, muscle antioxidant capacity and antioxidant-related signalling molecule expression in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Food Chemistry, 2015, 167: 91-99.
- [32] Mao X Y, Wang Y, Zhang T, et al. Dietary arginine regulates the growth performance, antioxidant capacity, and immune response in *Culter alburnus*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2024, 50(3): 1251-1264.
- [33] Adeshina I, Abdel - Tawwab M. Dietary creatine enhanced the performance, antioxidant and immunity biomarkers of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.), fed high plant-based diets[J]. Aquaculture Research, 2021, 52(12): 6751-6759.
- [34] Sun Y J, Zheng Z, Guo D Q, et al. Creatine in giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*): Insights into biosynthesis and transporter genes molecular characterization, regulation and impact on muscle metabolism[J]. Aquaculture, 2025, 595: 741468.
- [35] Burns A F, Gatlin D M. Effects of dietary creatine on juvenile hybrid striped bass in low - salinity and brackish waters[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2022, 53(1): 122-132.
- [36] Dawood M A O, Noreldin A E, Sewilam H. Long term salinity disrupts the hepatic function, intestinal health, and gills antioxidative status in Nile tilapia stressed with hypoxia[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 220: 112412.
- [37] Refaey M M, Mehri A I, El-Komy M M, et al. Chronic cold-stress induced histopathological changes, oxidative stress, and alterations in liver functions and nutrient composition of hybrid red tilapia and the potential protection of unsaturated fatty acids[J]. Frontiers in Marine Science, 2023, 10: 1148978.
- [38] Ding L, Liu Y J, Wei X F, et al. Effects of saline-alkaline stress on metabolome, biochemical parameters, and histopathology in the kidney of crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. Metabolites, 2023, 13(2): 159.
- [39] Wei X F, Liu Y J, Li S W, et al. Stress response and tolerance mechanisms of NaHCO_3 exposure based on biochemical assays and multi-omics approach in the liver of

- crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2023, 253: 114633.
- [40] Wang C, Yuan Z X, Li J J, et al. Acute effects of antimony exposure on adult zebrafish (*Danio rerio*): From an oxidative stress and intestinal microbiota perspective[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 123: 1-9.
- [41] Sun J L, Zhao L L, Liao L, et al. Interactive effect of thermal and hypoxia on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) gill and liver: Aggravation of oxidative stress, inhibition of immunity and promotion of cell apoptosis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 923-936.
- [42] Fan Z, Wu D, Zhang Y Y, et al. Carbonate alkalinity and dietary protein levels affected growth performance, intestinal immune responses and intestinal microflora in Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio Songpu*)[J]. *Aquaculture*, 2021, 545: 737135.
- [43] Richard D, Kefi K, Barbe U, et al. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants[J]. *Pharmacological Research*, 2008, 57(6): 451-455.
- [44] Xun P W, Lin H Z, Wang R X, et al. Effects of dietary lipid levels on growth performance, plasma biochemistry, lipid metabolism and intestinal microbiota of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2021, 27(5): 1683-1698.
- [45] Li Y, Liang S S, Shao Y R, et al. Impacts of dietary konjac glucomannan supplementation on growth, antioxidant capacity, hepatic lipid metabolism and inflammatory response in golden pompano (*Trachinotus ovatus*) fed a high fat diet[J]. *Aquaculture*, 2021, 545: 737113.
- [46] Xia Y, Wang Y H, Xie J, et al. Effects of BBR on growth performance, serum and hepatic biochemistry parameters, hepatic morphology and gene expression levels related to glucose metabolism in largemouth bass, *Micropterus salmoides* [J]. *Aquaculture Research*, 2022, 53(10): 3807-3817.
- [47] Suo X X, Yan X B, Tan B P, et al. Lipid metabolism disorders of hybrid grouper (♀*Epinephelus fuscointestines-tatus* × ♂*E. lanceolatu*) induced by high-lipid diet[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 990193.
- [48] Zhao T T, Ma A J, Yang S S, et al. Integrated metabolome and transcriptome analyses revealing the effects of thermal stress on lipid metabolism in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2021, 99: 102937.
- [49] Wang J, Wang X S, Yang W, et al. Comprehensive insights into the mechanism of flavor formation driven via inoculation with mixed starter cultures in dry-fermented tilapia sausages: Integration of macrogenomics, volatilomics, and lipidomics [J]. *Food Chemistry*, 2024, 455: 139950.
- [50] Li Q Q, Xiang Q Q, Lian L H, et al. Metabolic profiling of nanosilver toxicity in the gills of common carp[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 222: 112548.
- [51] Li S W, Liu Y J, Li B L, et al. Physiological responses to heat stress in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) revealed by UPLC-QTOF-MS metabolomics and biochemical assays[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 242: 113949.
- [52] Liu Y J, Yao M Z, Li S W, et al. Integrated application of multi-omics approach and biochemical assays provides insights into physiological responses to saline-alkaline stress in the gills of crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 822: 153622.

The mechanism of carbonate alkaline exposure on growth performance, biochemical indices and liver metabolism of crucian carp (*Carassius auratus*)

YUAN Fangying^{1,2}, HAN Lin^{2,3}, LIU Wenzhi^{2,3}, WANG Jing¹, LI Dongping¹, WANG Peng², SUN Yanchun^{1,2,3*}

1. School of Materials Science and Chemical Engineering, Harbin University of Science and Technology, Harbin 150081, China;

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

3. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Saline-alkaline water resources are widely distributed in China. However, their imbalanced ionic composition, high pH, and elevated carbonate alkalinity significantly impair normal growth and reproduction of

fish. Although previous studies have explored the effects of saline-alkaline stress on the growth performance of aquatic organisms, these investigations have largely focused on low-concentration environments, leaving the impacts of high-concentration conditions on growth performance and associated metabolic changes insufficiently understood.

This study aimed to elucidate the mechanisms by which carbonate-alkaline environments affect the growth performance and physiological metabolism of crucian carp (*Carassius auratus*). Experimental fish were randomly assigned to three groups: a freshwater control group (Con), a 20 mmol/L NaHCO₃ exposure group (T), and a 40 mmol/L NaHCO₃ exposure group (F), subjected to carbonate-alkaline exposure for 56 days. Through the application of growth indices, biochemical assays, and non-targeted metabolomics analysis using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) coupled with multivariate techniques such as principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), and pathway enrichment tools like MetaboAnalyst 5.0 and KEGG database, the study systematically examined the effects of carbonate-alkaline exposure on the growth, oxidative defense, and metabolomics profile of crucian carp.

The results revealed that carbonate-alkaline exposure significantly suppressed growth indices, including weight gain rate, specific growth rate, and feed conversion efficiency. Moreover, with increasing carbonate-alkaline concentrations, antioxidant enzyme activities in the liver—such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px)—and blood biochemical parameters, including blood ammonia, blood urea nitrogen (BUN), total cholesterol (TC), and triglycerides (TG), underwent notable alterations. Pathway enrichment analysis identified 17 statistically significant differential metabolites (DEMs) in the Con vs. T group, enriched in 27 metabolic pathways, including unsaturated fatty acid biosynthesis, purine metabolism, glycerophospholipid metabolism, and glutathione metabolism. In contrast, the Con vs. F group identified 100 DEMs enriched in 35 pathways, encompassing additional processes such as arginine biosynthesis, starch and sucrose metabolism, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, arachidonic acid metabolism, and sphingolipid metabolism.

The findings indicate that carbonate-alkaline exposure imposes a substantial energetic burden on crucian carp, undermining the energy availability for growth and thereby significantly inhibiting growth rates. This condition induces oxidative stress by disrupting the balance between reactive oxygen species (ROS) and the oxidative defense system, leading to severe hepatic tissue damage. As carbonate-alkaline concentration increases, critical metabolic pathways associated with growth, immune defense, and fatty acid metabolism—such as arginine biosynthesis, unsaturated fatty acid biosynthesis, purine metabolism, glycerophospholipid metabolism, sphingolipid metabolism, and glutathione metabolism—experience pronounced disruption. This exacerbates hepatic damage, compromises immune defense, destabilizes cellular membrane integrity and function, and suppresses cellular proliferation, ultimately impairing normal growth.

By integrating growth performance, biochemical analysis, and metabolomics, this study provides a comprehensive understanding of the adverse effects of carbonate-alkaline environments on the growth and hepatic metabolism of crucian carp. The findings offer critical insights for optimizing aquaculture practices involving freshwater bony fish in saline-alkaline waters, contributing to the sustainable utilization of saline-alkaline water resources with significant ecological, economic, and societal benefits.

Key words: *Carassius auratus*; carbonate alkaline exposure; growth and development; biochemical analysis; liver metabolomics

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