

DOI: 10.12264/JFSC2022-0316

基于 UPLC-Q-TOF/MS 代谢组学技术探究 α -酮戊二酸对碳酸盐碱胁迫下鲫血清代谢的影响

丁璐^{1,2}, 刘英杰^{1,2}, 魏晓凤^{2,3}, 耿传业^{1,2}, 刘文质^{1,2}, 韩琳^{1,2}, 袁芳英^{2,4}, 王鹏², 孙言春^{1,2,3,4}

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;
3. 大连海洋大学食品科学与工程学院, 辽宁 大连 116023
4. 哈尔滨理工大学材料与化学工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150080

摘要: 为探究饲料中添加 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, AKG)对碳酸盐碱生境胁迫下鲫(*Carassius auratus*)血清代谢变化的影响机理, 设置淡水对照组(Con 组)、 NaHCO_3 暴露组(CA 组)以及 NaHCO_3 暴露 AKG 饲料添加组(AKG 组), 采用 UPLC-Q-TOF/MS 代谢组学技术, 结合主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)等多元模式识别技术分析鲫血清代谢物组成及含量变化特征, 鉴定显著差异代谢物并进行相关代谢通路分析。结果显示, 与对照组相比, CA 组有 27 个差异代谢物, 富集到了甘油磷脂代谢、亚油酸代谢、色氨酸代谢等 12 条代谢通路; 与 CA 组相比, AKG 组有 38 个差异代谢物, 富集到了甘油磷脂代谢、亚油酸代谢、不饱和脂肪酸生物合成等 14 条代谢通路。研究结果表明, 碳酸盐碱胁迫会造成鱼类氧化应激损伤, 发生甘油磷脂代谢、鞘脂代谢和能量紊乱, 而饲料中添加 AKG 能够促进 TCA 循环提供稳定的碳源和能量供应, 通过正向调节甘油磷脂代谢、鞘脂代谢和氨基酸代谢等代谢途径来提高盐碱胁迫下鱼类的抗氧化能力和免疫能力, 从而缓解盐碱胁迫诱导的氧化应激损伤。本研究在代谢层面上阐明了 AKG 作为饲料添加剂缓解淡水硬骨鱼类盐碱胁迫损伤的有效性, 为 AKG 在盐碱水域增养殖领域的实际应用提供了科学依据。

关键词: 鲫; α -酮戊二酸; 碳酸盐碱胁迫; 血清代谢组学; 调控机制

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)02-0138-12

中国是水产养殖大国, 由于全球气候变暖趋势愈演愈烈, 河流湖泊水位急剧下降, 地表水的盐碱化程度也持续恶化, 严重压缩了淡水养殖的可用空间^[1]。我国约有 0.46 亿 hm^2 的盐碱水域面积, 其具有显著的高盐碱度、高离子系数和离子比例失衡等特点, 其中碳酸盐型所占面积最大^[2]。据统计, 中国绝大部分盐碱水域的碱度约为 8~30 mmol/L ^[3-4], 而碱度高于 10 mmol/L 的水域绝

大部分处于荒芜闲置状态, 即使浓度低于 10 mmol/L 的盐碱水域通过移植驯化鱼类的开发利用率仍然不足 2%^[5]。研究表明, 高碳酸盐碱生境会造成鱼类呼吸代谢障碍、组织器官氧化应激损伤、肠道菌群失衡、抗氧化系统和免疫系统失衡等一系列生理问题, 严重影响鱼类的正常生长、发育以及繁殖^[6-8]。因此, 如何解决盐碱水域养殖鱼类的摄食率低、生长速度慢、产量低下等

收稿日期: 2022-09-07; 修订日期: 2022-11-21.

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目(2020M681124); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(HSY202006M); 黑龙江省博士后面基金面上项目(LBH-Z20099)

作者简介: 丁璐(1995-), 女, 硕士, 研究方向为水生生物抗逆生长代谢组学. E-mail: dinglu1083@163.com

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

问题, 并进一步可持续利用荒芜闲置的盐碱水域成为当前渔业领域的研究热点。

目前, 通过调整日常膳食饲料添加剂提高水产动物的免疫机能以抵抗环境胁迫危害的方式引起了研究人员的广泛兴趣。其中, α -硫辛酸^[9]、维生素 C^[10]、月桂烯和薄荷醇^[11]等已成功用于减轻低盐胁迫、高温胁迫、氨氮胁迫等环境胁迫对水产动物造成的不利影响。 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, AKG)是生物体内三羧酸循环中关键的小分子活性代谢物, 紧密联结细胞内的碳-氮代谢^[12], 不仅参与谷氨酸、谷氨酰胺、精氨酸等多种氨基酸生物合成, 也直接参与脂肪酸 β 氧化释放能量^[13]。在水产养殖研究领域, 饲料中添加适量 AKG 的研究多集中在促进草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[14]、松浦镜鲤(*Cyprinus carpio*)^[15]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[16]等鱼类肠道营养物质的消化吸收, 提高增重率和特定生长率, 以及抗氧化能力和非特异性免疫能力等方面, 仅少数研究初步开展了 AKG 用于缓解鱼类氨氮胁迫^[15]或者碳酸盐碱胁迫^[17]的工作, 且其研究内容仅局限于生长性能和生理生化指标的变化, 有关饲料中添加 AKG 对水生动物综合代谢调控机制的研究较为匮乏。

代谢组学利用系统生物学方法捕捉细胞、器官、组织等内源性小分子物质代谢特征变化, 从而揭示生物体的代谢本质和微环境状态^[18], 目前已被广泛用于研究鱼类内源性或外源性因子变化的复杂代谢机制^[19]。Sun 等^[20]利用 UPLC-Q-TOF/MS 代谢组学技术研究鲫(*Carassius auratus*) 在碳酸盐碱暴露下差异显著代谢物和代谢通路的变化特征, Xu 等^[21]利用 LC-MS 代谢组学技术研究了不同水平的 α -硫辛酸对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 生理和生化过程中的代谢变化规律, Li 等^[22]采用 LC-MS/MS 代谢组学技术揭示了纳米硒对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) 热应激的保护作用。可见, 高效液相色谱结合四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)因其兼具高准确度、高灵敏度和分辨率已成为代谢组学研究中最受科学家关注的分析技术之一^[20]。

鲫是我国重要的大宗淡水养殖品种, 具有生长速度快、抗逆性强、肉质鲜美等特点, 也常作为实验对象来揭示碳酸盐碱^[23]、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯^[24]、全氟辛酸^[25]等环境胁迫因子的毒性效应以及毒害机制, 是研究淡水鱼耐盐碱生理机制和鱼类适应性进化的可靠模型。本研究采用 UPLC-Q-TOF/MS 代谢组学技术结合多变量统计分析探究饲料中添加 AKG 对盐碱胁迫下鲫血清代谢物的影响以及相关代谢途径变化特征, 在代谢层面上进一步阐明 AKG 调节盐碱胁迫下鱼类的生理代谢机制, 为 AKG 在水产养殖业的应用提供科学理论依据, 以期解决盐碱水域淡水硬骨鱼类养殖的瓶颈难题。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Triple TOF 5600⁺质谱仪(美国 SCIEX 公司); ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Allegra X-30R 高速离心机(美国 Beckman 公司); 涡旋混匀器(德国 IKA 公司); Milli-Q A10 超纯水机(美国 Millipore 公司); 数控超声仪(昆山超声仪器有限公司); α -酮戊二酸(AKG, 生物试剂, 纯度 $\geq 99.0\%$, 上海源叶生物科技有限公司); 间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(MS-222, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 碳酸氢钠、氯化钠(分析纯, 天津市天大化学试剂厂); 甲醇、乙腈、甲酸(质谱纯, 德国 Merck 公司); 生理盐水(四川科伦药业公司); 有机相滤膜(13 mm, 0.22 μm ; 上海安谱公司)。

1.2 实验饲料

选用山东通威饲料有限公司市售商品化鲫配合饲料为基础饲料, 其主要原料包括鱼粉、豆粕、小麦、米糠、矿物元素、维生素、氨基酸等原料, 其营养成分含量: 粗蛋白质 $\geq 29.0\%$, 粗脂肪 $\leq 12.0\%$, 粗纤维 $\geq 5.0\%$, 粗灰分 $\leq 15.0\%$, 水分 $\leq 12.5\%$, 赖氨酸 $\geq 1.4\%$, 总磷 $\geq 0.6\%$, 基础饲料营养成分含量由山东通威饲料有限公司提供。根据相关研究^[15,17], 饲粮中 AKG 添加量拟设为 10.0 g/kg。将基础饲料粉碎过 60 目筛, 采用逐级扩大混合法分别在基础饲料中添加含量为 0、10.0

g/kg 的 AKG 充分混合后, 用小型颗粒机制成直径为 2.0 mm 的试验饲料, 常温风干后储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷库备用。

1.3 实验设计与饲养管理

试验鲫购自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所呼兰试验站(中国哈尔滨), 转移至实验室用 2.0% NaCl (W : W) 溶液浸泡消毒 20 min。暂养驯化 15 d 后, 挑选规格均匀、体色饱满、健康无伤的鲫 180 尾 [体长 (20.50 ± 1.00) cm, 体重 (130.10 ± 5.64) g], 随机分成 3 个处理组, 即 1 个对照组(淡水)和 2 个 NaHCO_3 胁迫组(NaHCO_3 浓度设为 20 mmol/L), 每组 3 个平行, 每个平行 20 尾鱼。为避免 NaHCO_3 胁迫组中实验鲫产生急性应激, 以每天 5 mmol/L 的速度升至实验浓度 20 mmol/L。

实验鲫适应实验条件 7 d 后, 3 个处理组分别投喂不同浓度水平的 AKG 试验饲料 30 d, 即 Con 组(淡水, 基础饲料)、CA 组(20 mmol/L NaHCO_3 , 基础饲料)、AKG 组(20 mmol/L NaHCO_3 , 1.0% AKG 饲料), 日投饵率约为鱼体重的 3%, 每天投喂 3 次(7:30、12:30、17:30), 每次饱食投喂 30 min 后清理残饵和粪便, 避免水质污染。实验期间, 水温约为 $(24\pm 1.0)\text{ }^{\circ}\text{C}$, 对照组 pH 约为 6.8, 20 mmol/L NaHCO_3 暴露组 pH 约为 8.4, 氨氮 $< 1.0\text{ mg/L}$, 溶解氧 $> 7.5\text{ mg/L}$; 每 3 d 换水 1/3, 补充适量的 NaHCO_3 以维持实验设定浓度(酸碱滴定法测定 NaHCO_3 浓度)。采样前 24 h 禁食, 从每个平行组随机抽取 5 尾(每个处理组 15 尾, 共计 45 尾), 用 100 mg/L MS-222 溶液深度麻醉后, 使用 2 mL 无菌注射器尾静脉采血并转移离心管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.4 UPLC-Q-TOF/MS 分析

1.4.1 样品制备 从每个处理组中随机抽取 8 个血清样本于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 解冻后, 吸取 100 μL 至 2 mL 离心管中, 并加入 400 μL 甲醇溶液(甲醇 : 水 = 4 : 1, V/V), 涡旋混匀, 冰浴超声 15 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、13000 r/min 离心 10 min, 取上清液经 0.22 μm 有机相滤膜过滤至自动进样瓶中待测。同

时, 将各组血清样品等量混合制备质量控制样品(quality control, QC), 用于评估高分辨质谱仪器的稳定性和数据的可靠性。

1.4.2 UPLC-Q-TOF/MS 检测 色谱条件: BEH C_{18} 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液(甲醇 : 水 = 1 : 1000, V/V), 流动相 B: 0.1% 甲酸乙腈溶液(甲酸 : 乙腈 = 1 : 1000, V/V); 洗脱梯度: 0~2 min, 5%~20% B; 2~3 min, 20%~60% B; 3~11 min, 60%~80% B; 11~12 min, 80%~100% B; 12~13 min, 100% B; 13~13.1 min, 100%~5% B; 13.1~15 min, 5% B。流速: 0.30 mL/min; 进样量: 10 μL 。

质谱条件: 采用电喷雾离子源(ESI)在正、负离子模式下扫描; 离子源温度: $550\text{ }^{\circ}\text{C}$; 离子源电压: 5500 V/−4500 V (正/负离子模式); 气帘气(CUR): 241.3 kPa; 喷雾气(GAS): 344.8 kPa; 去簇电压(DP): 80 eV; 碰撞能量(CE): $(35\pm 15)\text{ eV}$ 。TOF MS Scan 模式采集一级质谱离子扫描范围 M/Z: 100~1200 Da; IDA 模式采集二级质谱离子扫描范围 M/Z: 50~1200 Da。

1.5 数据处理

使用 Progenesis QI 软件(美国 Waters 公司)对 UPLC-Q-TOF/MS 采集的原始数据进行峰提取、峰对齐、峰过滤等数据预处理, 生成具有保留时间、质荷比和峰面积的数据矩阵。将数据矩阵导入软件 SIMCA 14.1 (瑞典 Umetrics 公司)进行模式识别, 采用主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)对数据进一步分析, 以确定各组间的整体代谢变化。以 $\text{VIP} > 1$ 和 $P < 0.05$ 为条件筛选差异代谢物(differential metabolites, DMs)。根据保留时间, 相对分子质量、二级碎片离子、人类代谢组数据库(HMDB)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)进一步注释识别 DMs, 将 DMs 导入 MetaboAnalyst 5.0 数据库进行代谢通路分析。

2 结果与分析

2.1 PCA 分析和 OPLS-DA 分析

PCA 得分图显示(图 1a~1b), QC 样品紧密聚集

在某一区域, 表明仪器具有高稳定性及实验数据具有可靠性; Con、CA 和 AKG 组组内血清样品点

分布离散, 组间血清样本分布在不同区域但仍存在小部分的重叠, 表明 3 组间虽然存在显著的代

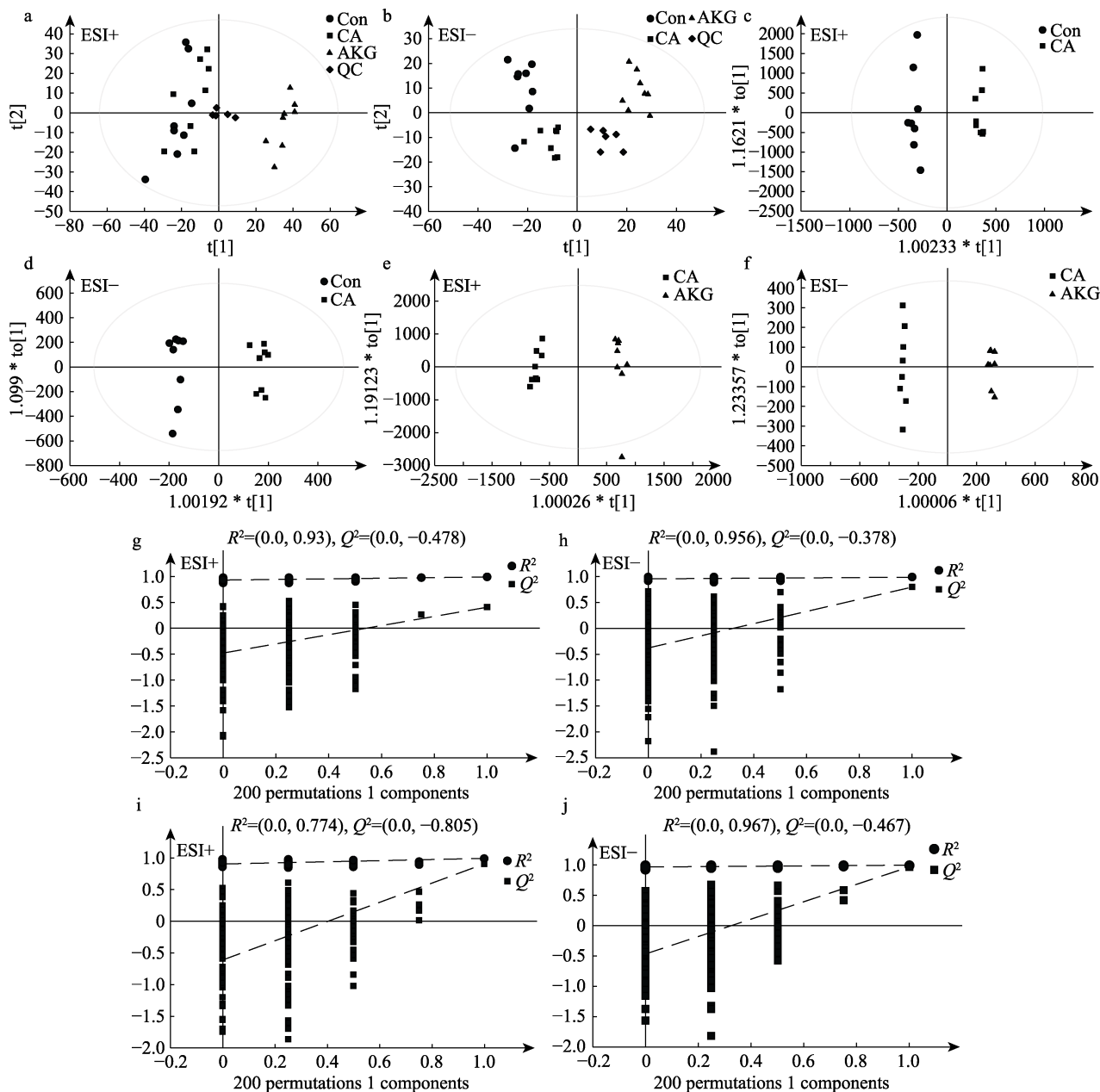


图1 血清代谢组学 PCA 和 OPLS-DA 分析

正负离子模式下 PCA 得分图(a, b); 正负离子模式下 CA vs Con 的 OPLS-DA 得分图(c, d); 正负离子模式下 AKG vs CA 的 OPLS-DA 得分图(e, f); 正负离子模式下 CA vs Con 的 OPLS-DA 模型置换验证图(g, h); 正负离子模式下 AKG vs CA 的 OPLS-DA 模型置换验证图(i, j); ESI+表示正离子模式, ESI-表示负离子模式, Con 为淡水对照组, CA 为 NaHCO_3 暴露组, AKG 为 NaHCO_3 暴露 AKG 饲料添加组, QC 为质量控制样品, R^2 是 OPLS-DA 模型的解释方差, Q^2 是 OPLS-DA 模型的预测能力。

Fig. 1 Serum metabolomic PCA and OPLS-DA analysis

The PCA score plots in positive and negative ion modes (a, b); The OPLS-DA score plots of CA vs Con in positive and negative ion modes (c, d); The OPLS-DA score plots of AKG vs CA in positive and negative ion modes (e, f); The OPLS-DA permutation test of CA vs Con in positive and negative ion modes (g, h); The OPLS-DA permutation test of AKG vs CA in positive and negative ion modes (i, j); ESI+ represents positive ion mode, ESI- represents negative ion mode, Con is freshwater control group; CA is the NaHCO_3 exposure group; AKG is NaHCO_3 exposure and AKG feeding group, QC is quality control sample, R^2 is the explained variance of the OPLS-DA model, and Q^2 is the predictive ability of the OPLS-DA model.

谢变化, 但无监督的 PCA 模型却不能实现组间完全分离。因此, 采用有监督的 OPLS-DA 模型进一步分析组间血清代谢物组成及含量的变化。OPLS-DA 得分图(图 1c~f)显示, CA vs Con、AKG vs CA 各组间样本完全分布在两个不同区域。OPLS-DA 模型质量参数, 正离子模式下 CA vs Con、AKG vs CA 的 R^2Y 累积值分别为 0.989 和 0.977, Q^2 分别为 0.405 和 0.913; 负离子模式下 CA vs Con、AKG vs CA 的 R^2Y 累积值分别为 0.987 和 0.998, Q^2 分别为 0.796 和 0.968, 说明 OPLS-DA 模型具有较好的拟合能力和预测能力。在 200 次置换检验中(图 1g~j), OPLS-DA 模型的 R^2 和 Q^2 的原始值大于随机置换产生的值, 验证了建立的 OPLS-DA 模型具有可靠性, 适合后续数据分析。

2.2 差异代谢物鉴定

为了直观展示 CA vs Con、AKG vs CA 组间血清代谢物整体差异情况, 以差异倍数(fold-change, FC)>1.5、 $P<0.05$ 以及 $VIP>1$ 为筛选阈值绘制火山图(图 2a)。以 $P<0.05$ 和 $VIP>1$ 为筛选条件, 在对照组和两个实验组之间共鉴定筛选出 59 种具有统计学意义的差异代谢物(differential metabolites, DMs), DMs 的相对含量和代谢物之间的关系以热图的形式进行展示(图 2b)。如图 2c 所示, 与 Con 组相比, CA 组鉴定到 10 个上调的 DMs 和 17 个下调的 DMs, 分别为 16 种甘油磷脂类、6 种脂肪酰基、2 种鞘脂类以及 3 种氨基酸、肽和类似物; 与 CA 组相比, AKG 组鉴定到 25 个上调的 DMs 和 13 个下调的 DMs, 主要为 22 种甘油磷脂类、10 种脂肪酰基类、3 种鞘脂类、1 种甘油脂类、1 种氨基酸、肽和类似物、1 种非金属磷酸盐; 两个对比组 CA vs Con 组和 AKG vs CA 组含有 6 个相同的 DMs(图 2d)。

2.3 代谢通路富集分析

为了进一步探究饲料中添加 AKG 对碳酸盐胁迫下鲫血清代谢途径的影响, 联合 KEGG 数据库和 MetaboAnalyst 5.0 数据库对 DMs 进行代谢通路富集分析。代谢通路富集结果表明, 如图 3 所示, 在 CA vs Con 组中共富集到了 12 条代谢通路, 其中甘油磷脂代谢、亚油酸代谢、色氨酸代谢等代谢通路受到显著影响; 在 AKG vs Con 组

中富集到了 14 条代谢通路, 其中甘油磷脂代谢、亚油酸代谢、 α -亚麻酸代谢和不饱和脂肪酸的生物合成等代谢途径受到显著影响。图 4 显示了差异代谢物与关键代谢通路之间的关系, 表明饲料中添加 AKG 可以调控碳酸盐胁迫对鲫血清代谢途径的影响。

3 讨论

盐碱水域在世界范围内广泛分布, 但因其高盐碱、高 pH, 离子比例失衡等水体理化特点^[2], 导致盐碱水域养殖淡水水产动物生长速度慢, 病害多发, 渔业产量低下, 盐碱水资源利用率低, 甚至无法利用^[7-8,26]。另外, 由于全球变暖, 湖泊河流水位下降, 淡水养殖面积也逐渐缩小, 盐碱水域开展淡水鱼增养殖试验成为世界各国科研工作者的研究热点。 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, AKG)作为三羧酸循环的中间体, 具有调节机体能量代谢、氮代谢、脂质代谢、提高机体免疫力等多种生物学功能^[13], 然而饲料中添加 AKG 对盐碱生境胁迫下淡水硬骨鱼类的代谢影响及其作用机制尚不明确。本研究以不同浓度的碳酸盐模拟真实盐碱水域情况开展实验, 运用 UPLC-Q-TOF/MS 高通量非靶向代谢组学技术结合模式识别技术对鲫淡水组、盐碱暴露组和盐碱 AKG 饲料添加组进行差异代谢物和代谢通路分析, 结果表明 AKG 通过调节甘油磷脂代谢通路、不饱和脂肪酸生物合成、鞘脂代谢通路等脂质代谢以及以精氨酸谷氨酰胺为代表的氨基酸代谢来缓解盐碱胁迫给鱼类带来的氧化应激损伤。

氧化应激是水生生物应对环境胁迫的机制之一^[27]。在正常环境条件下, 生物体细胞内线粒体氧化还原代谢产生活性氧(reactive oxygen species, ROS), 由抗氧化系统及时清除^[28]。在持续的环境胁迫下, 生物体细胞内 ROS 持续增加, ROS 介导的氧化应激与生物细胞膜上的多不饱和脂肪酸迅速发生脂质过氧化反应形成脂质过氧化产物^[27]。当氧化应激损伤超过生理耐受极限时, 生物细胞膜的结构和功能严重受损, 最终诱导细胞凋亡^[29]。已有研究表明盐碱胁迫诱导水生动物产生 ROS 并导致氧化应激^[30]。在本研究中, 对 Con 组、CA

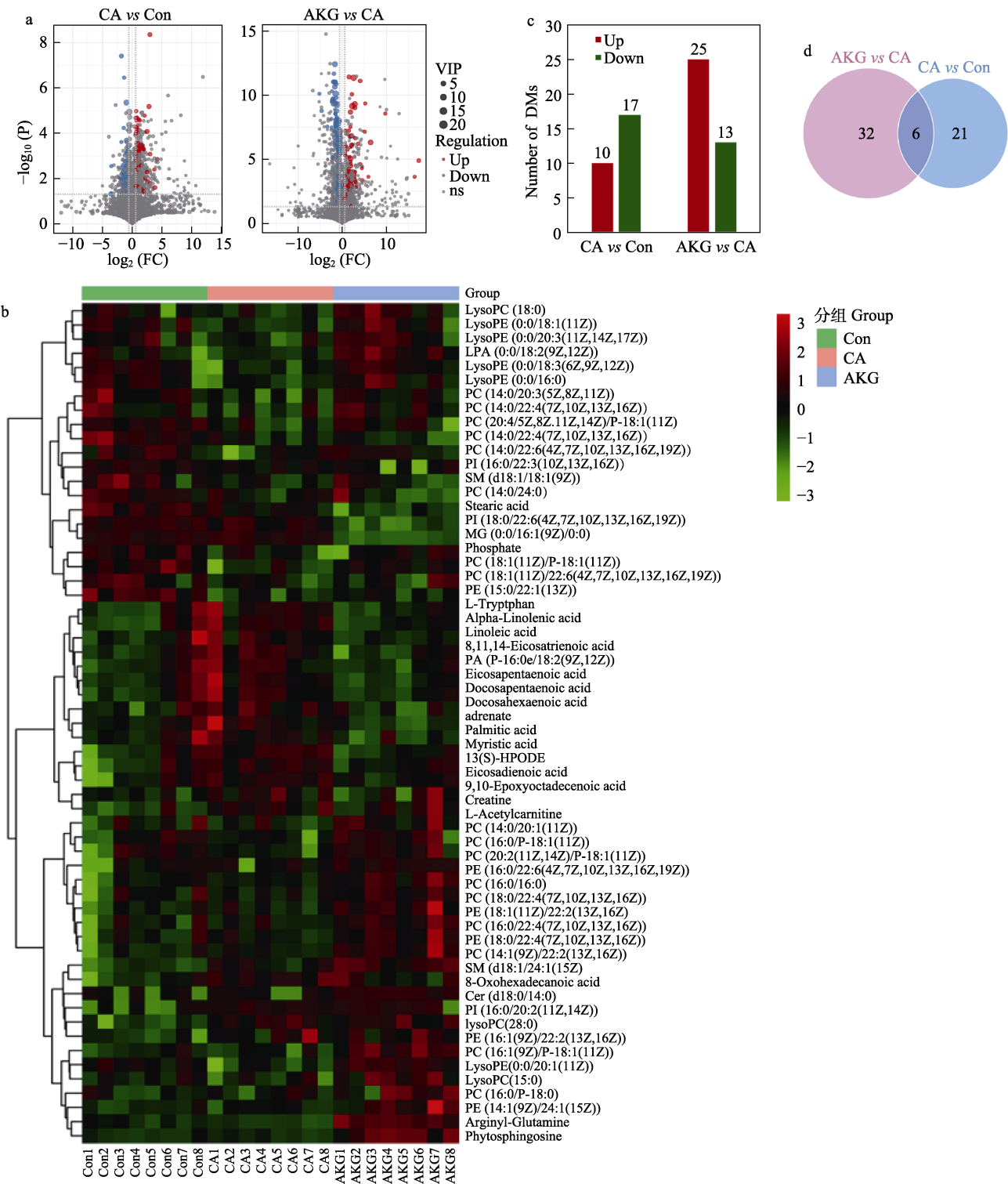


图 2 血清差异代谢物鉴定

差异代谢物火山图(a); 差异代谢物聚类热图(b); 差异代谢物数目(c); 差异代谢物韦恩图(d).

Con 为淡水对照组; CA 为 NaHCO_3 暴露组; AKG 为 NaHCO_3 暴露 AKG 饲料添加组; FC 为差异倍数; DMs 为代谢差异物.

Fig. 2 Identification of serum differential metabolites

Volcano plot of differential metabolites (a); Cluster heatmap of differential metabolites (b);

Number of differential metabolites (c); Venn diagram of differential metabolites (d).

Con is freshwater control group; CA is the NaHCO_3 exposure group; AKG is NaHCO_3 -AKG feeding group;

FC means fold change; DMs means differential metabolities.

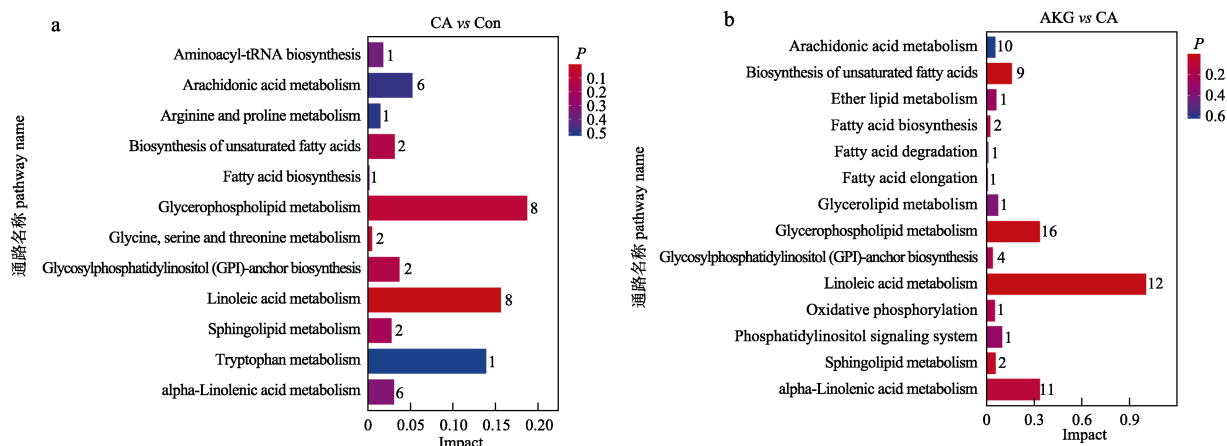


图 3 血清差异代谢物的代谢通路富集分析

a. CA vs Con 组; b. AKG vs CA 组. Con 为淡水对照组; CA 为 NaHCO_3 暴露组; AKG 为 NaHCO_3 暴露 AKG 饲料添加组.

Fig. 3 Metabolic pathway enrichment analysis of serum differential metabolites

a. CA vs Con group; b. AKG vs CA group. Con is freshwater control group; CA is NaHCO_3 exposure group; AKG is NaHCO_3 -AKG feeding group.

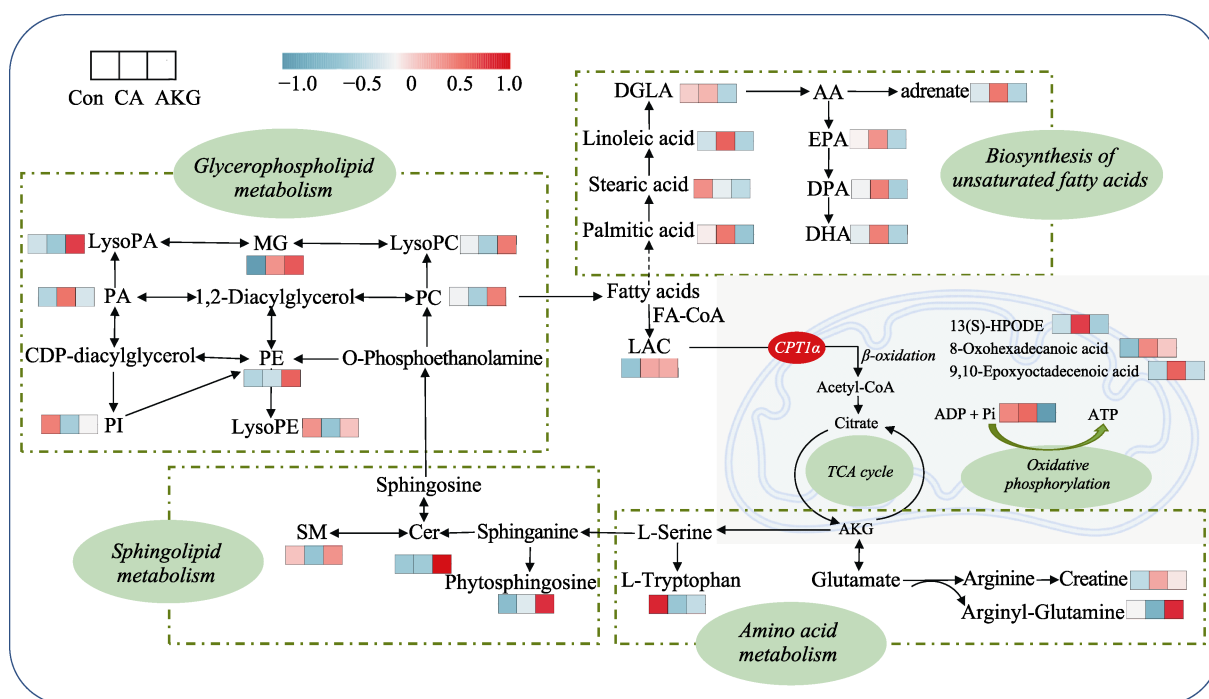


图 4 血清差异代谢物-代谢通路相互作用网络图

Con 为淡水对照组; CA 为 NaHCO_3 暴露组; AKG 为 NaHCO_3 暴露 AKG 饲料添加组.

Fig. 4 Interaction network diagram of serum differential metabolite-metabolic pathways

Con is freshwater control group; CA is NaHCO_3 exposure group; AKG is NaHCO_3 exposure and AKG feeding group.

组以及 AKG 组 3 组间的代谢物进行成对比较分析发现, 亚油酸、 α -亚麻酸、二高- γ -亚麻酸(dihomo- γ -linolenic acid, DGLA)、二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)以及二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)、二十二碳五烯酸(docosapentaenoic acid, DPA)、二十碳二烯酸、

肾上腺素酸等不饱和脂肪酸代谢物, 8-氧代十六烷酸、9,10-EOA、13(S)-HPODE 等脂质过氧化产物, 以及 L-乙酰胆碱(L-acetylcarnitine, LAC)和磷酸盐(phosphate, Pi)等与能量代谢相关的代谢物在 CA 组上升, 而在 AKG 组中下降。多不饱和脂肪酸不仅是生物体内 β 氧化产能的首选底物, 也是

激素和其他信号分子生物合成的中间产物^[31], 具有促进细胞生长发育、免疫调节、抑制炎症因子等多种生理功能^[32]。LAC 将长链脂肪酸从细胞质转运到线粒体进行 β -氧化释放能量, 在脂肪代谢中发挥重要作用^[33]。已有研究表明生物体内 LAC 水平增加可能是为了加强脂肪酸 β -氧化和增强抗氧化防御系统以减少 ROS 对生物体造成的氧化应激损伤^[33]。Pi 影响 ATP 的产生从而调节氧化磷酸化的平衡, 保证生物体内能量代谢的稳态^[34]。Dalvi 等^[35]探究鲶(*Horabagrus brachysoma*)耐热性适应机制时发现 Pi 含量大幅增加可能是高能磷酸键水解释放 Pi 以对抗 ROS 的产生。上述代谢物分析表明本研究 CA 组中鲫通过自身调节不饱和脂肪酸生物合成产生大量的脂肪酸以应对盐碱胁迫产生的 ROS 氧化应激损伤, 在该过程中长链脂肪酸运输载体和脂肪酸 β -氧化水平也相应增加, 并产生脂质过氧化产物; 而饲料中添加 1.0% AKG 后能够参与 TCA 循环增强细胞能量代谢, 提供稳定的碳源和能量供应, 减少了盐碱胁迫下鱼体内源性不饱和脂肪酸和能量的损耗以及脂质过氧化物的产生, 说明饲料中添加 1.0% AKG 能够提供生长发育所需的能量和提高抗氧化能力, 调节细胞内氧化还原稳态, 保护机体免受盐碱胁迫带来的氧化应激损伤, 这与饲料中添加 α -酮戊二酸提高草鱼^[14]和松浦镜鲤^[17]的抗氧化酶活性的研究结果一致。

甘油磷脂是生物细胞膜不可或缺的成分, 也是生物体内物质运输、能量转换和信息传输的关键参与者^[36], 主要包括磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)以及磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)等^[37]。PC 和 PE 占细胞膜磷脂的 60%~80%, 在体内可被磷脂酶催化水解生成脂肪酸(fatty acid, FA)和溶血磷脂(lysophospholipid, LPL)等, 参与 DNA、RNA、蛋白质以及类花生酸的生物合成, 促进机体快速生长和繁殖^[38]。虽然 PI 仅占细胞总脂质的 5%~10%, 但却是主要磷脂 PC、PE、PS 等的合成底物^[39]。在本研究中, 大部分 PC、PE、PI 以及 LPL 等甘油磷脂类代谢物水平在 CA 组中显著下降, 在 AKG 组中显著上升, 这表明盐碱胁迫

下鱼体内发生高脂质分解代谢导致甘油磷脂代谢紊乱, 破坏了细胞膜的结构与功能, 而饲料中添加 1.0% AKG 可以促进 PC、PE、PI 等磷脂的生物合成, 调节碳酸盐胁迫造成的甘油磷脂代谢紊乱, 从而维持细胞膜功能和结构的完整性。

在鞘脂代谢过程中, 神经酰胺(ceramide, Cer)、鞘磷脂(sphingomyelin, SM)以及植物鞘氨酸(phytosphingosine, PHS)等代谢物具有较高的生物活性, 能够直接参与炎症反应、能量代谢的调控以及细胞增殖、分化和凋亡等多种类型的信号转导^[40]。Cer 是鞘脂代谢的中心枢纽, 可在鞘磷脂合酶的催化下合成 SM, 也可作为细胞因子和生长因子诱导细胞内信号转导^[41]。SM 生物合成一般直接由细胞内鞘磷脂合成酶合成, 当体内 SM 需求不足时, 会启动鞘脂代谢通路下神经酰胺合成鞘磷脂的补救合成途径^[42]。SM 水解是凋亡细胞死亡过程中的一个必要过程^[43]。PHS 作为 Cer 的前体, 具有抗菌(革兰氏阳性细菌、酵母和霉菌)和抗炎作用^[44]。在本研究中, 与对照组相比, CA 组中 SM[d18:1/18:1 (9Z)]含量显著下调, SM[d18:1/24:1 (15Z)]含量显著上调, 提示鱼体在盐碱胁迫下产生炎症反应并发生细胞凋亡, 而鱼体自身调节鞘脂代谢产生大量的鞘磷脂来抵御盐碱损伤, 这与盐碱胁迫下鲫鳃组织生理变化的研究结果保持一致^[23]; 与 CA 组相比, AKG 组中 SM[d18:1/24:1 (15Z)]、Cer (d18:0/14:0)以及 PHS 等代谢物水平显著上调, 说明饲料中添加 1.0% AKG 可以加快鞘脂代谢产生大量的鞘脂类代谢物参与炎症反应, 促进细胞增殖分化、凋亡细胞死亡等信号转导, 保证鱼体正常的生命活动。

精氨酸是鱼体内重要的功能性必需氨基酸, 具有促进细胞分裂、伤口复原, 调节免疫力和分泌激素等生物学作用^[45]。当生物体发生应激反应时, 精氨酸会降解为肌酸、鸟氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺等多种物质以满足机体生长和代谢的需求^[46]。肌酸在肌酸激酶的催化下能够产生磷酸肌酸从而促进三磷酸腺苷(ATP)循环, 在细胞能量代谢过程中扮演重要角色^[47]。已有研究表明饲料中添加肌酸能够提高条纹鲈幼鱼(*Morone saxatilis*)的生长性能、抗氧化能力、免疫力以降低盐碱胁迫

迫造成的应激损伤^[48]。精氨酸谷氨酰胺由精氨酸和谷氨酰胺残基形成,是一种水溶性的、稳定的谷氨酰胺来源,研究发现精氨酸谷氨酰胺可以减轻新生小鼠高氧诱导肺损伤^[49],在临床上治疗缺氧诱导的小肠损伤^[50]。在本研究中,与 Con 组相比,CA 组中肌酸的含量显著上升($P<0.05$),精氨酸谷氨酰胺含量显著下降($P<0.05$);与 CA 组相比,AKG 组中肌酸的含量上升($P>0.05$),而精氨酸谷氨酰胺的含量显著上升($P<0.05$),说明盐碱胁迫下可能通过消耗大量的精氨酸谷氨酰胺以及产生肌酸以提高自身的抗氧化能力和免疫力来应对氧化应激损伤,而饲料中添加 AKG 能够增强氨基酸代谢,及时补充精氨酸谷氨酰胺、肌酸等物质以满足机体正常的生理代谢。

4 结论

本研究基于非靶向 UPLC-Q-TOF/MS 代谢组学技术结合模式识别技术探讨了饲料中添加 AKG 对盐碱生境胁迫下鲫血清代谢组的影响以及调控机制。结果表明,饲料中添加适量 AKG 能直接参与鲫机体的 TCA 循环,通过增强细胞能量代谢以满足鱼体在盐碱胁迫下的高能量需求,通过正向调节甘油磷脂代谢、鞘脂代谢和氨基酸代谢等代谢途径,提高盐碱胁迫下鱼体的抗氧化能力和免疫力,维持细胞内氧化还原稳态,从而保护机体免受盐碱胁迫诱导的氧化应激损伤。本研究在代谢层面上从小分子代谢物的角度阐明了 AKG 作为饲料添加剂缓解淡水硬骨鱼类盐碱胁迫损伤的调控机制,为扩大盐碱水域淡水鱼增殖活动提供了科学依据,对提高我国盐碱水资源有效利用具有重要的生态、经济和社会效益。

参考文献:

- [1] Ondrasek G, Rengel Z. Environmental salinization processes: Detection, implications & solutions[J]. The Science of the Total Environment, 2021, 754: 142432.
- [2] Lu G Z, Yao Z L, Lai Q F, et al. Growth performance, blood parameters, and texture characteristics of juvenile large-mouth 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.]
- [3] 王慧, 来琦芳, 房文红, 等. 不同类型咸水的水产养殖研究[C]//可持续水产养殖——资源、环境、质量——2003 水产科技论坛论文集. 北京, 2003: 123-127.
- [4] Zhang R, Luo L, Wang S H, et al. Screening and functional analysis of alkalitolerant microorganisms in carbonate-type saline-alkali ponds in northeast china[J/OL]. Chinese Journal of Fisheries, 2022, 1-8. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/23.1363.S.20220518.1031.002.html>. [张瑞, 罗亮, 王世会, 等. 东北碳酸盐型盐碱池塘耐(嗜)碱微生物的筛选及功能分析[J/OL]. 水产学杂志, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/23.1363.S.20220518.1031.002.html>.
- [5] 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, 李姗姗, 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.]
- [6] Chang Y M, He Q, Sun Y C, et al. Changes in plasma free amino acid levels in *Leuciscus waleckii* exposed to different environmental alkalinity levels[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(1): 117-124. [常玉梅, 何强, 孙言春, 等. 碳酸盐碱度胁迫下瓦氏雅罗鱼血浆游离氨基酸水平的变化[J]. 中国水产科学, 2016, 23(1): 117-124.]
- [7] 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.]
- [8] Tu H Q, Zhao J L, Zhao Y, et al. Study on the timing sequence of two pathway of *Oreochromis niloticus* ammonia metabolism under the stress of carbonate alkalinity[J]. Freshwater Fisheries, 2018, 48(3): 25-32. [涂翰卿, 赵金良, 赵岩, 等. 碳酸盐碱胁迫下尼罗罗非鱼氮代谢两种途径时序研究[J]. 淡水渔业, 2018, 48(3): 25-32.]
- [9] Fu Z Q, Dong Y F, Tang S S, et al. Effects of dietary α -lipoic acid on growth, antioxidant capacity and intestinal health of *Litopenaeus vannamei* under low salinity stress[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(9): 5203-5218. [符振强, 董扬帆, 汤上上, 等. 低盐胁迫下饲料中添加 α -硫辛酸对凡纳滨对虾生长、抗氧化能力及肠道健康的影响[J]. 动物营养学报, 2021, 33(9): 5203-5218.]
- [10] Li X. Effects of dietary vitamin C on growth performance, physiological and biochemical indexes and liver histology

- structure in *Lateolabrax maculatus* reared in high temperature[D]. Xiamen: Jimei University, 2019. [李潇. 高温环境下饲料维生素 C 对花鲈幼鱼生长性能、生理生化指标及肝脏组织结构的影响[D]. 厦门: 集美大学, 2019.]
- [11] Hoseini S M, Yousefi M, Hoseinifar S H, et al. Antioxidant, enzymatic and hematological responses of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with myrcene- or menthol-supplemented diets and exposed to ambient ammonia[J]. *Aquaculture*, 2019, 506: 246-255.
- [12] Wei Y H, Zhang C, Shu G. Advances in the biological functions and molecular mechanisms of α -ketoglutaric acid[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2020, 56(9): 31-35, 40. [魏易烺, 张姤, 束刚. α -酮戊二酸的生物学功能及分子机制研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2020, 56(9): 31-35, 40.]
- [13] Legendre F, MacLean A, Tharmalingam S, et al. A metabolic network mediating the cycling of succinate, a product of ROS detoxification into α -ketoglutarate, an antioxidant[J]. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2022, 11(3): 560.
- [14] Wang H Q, Zhao Y R, Jin B T, et al. Effects of dietary α -ketoglutarate supplementation on growth and serum biochemical parameters of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fingerlings[J]. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2016, 68: 1239-1244.
- [15] Wu D, Fan Z, Li J N, et al. Evaluation of α -ketoglutarate supplementation on the improvement of intestinal antioxidant capacity and immune response in songpu mirror carp (*Cyprinus carpio*) after infection with *Aeromonas hydrophila*[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 690234.
- [16] Pradhan C, Soharwardi U, Dileep N, et al. Suitable ratio of dietary L-carnitine and α -ketoglutarate improves growth and health performance in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2021, 47(6): 1933-1950.
- [17] Fan Z, Peng F, Li J N, et al. Effects of α -ketoglutarate on growth performance, antioxidant capacity and ammonia metabolism against chronic carbonate alkalinity stress in Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio* Songpu)[J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(5): 2029-2040.
- [18] Wishart D S. Metabolomics for investigating physiological and pathophysiological processes[J]. *Physiological Reviews*, 2019, 99(4): 1819-1875.
- [19] Gong B, Bao F Y, Wang Y L, et al. Metabonomics study on the effect of traditional Chinese medicines feed addition on growth performance and serum metabolic profile of juvenile Chinese softshell turtle (*Pelodiscus sinensis* Wiegmann)[J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 20: 100632.
- [20] 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.
- [21] Xu C, Wang X D, Han F L, et al. α -lipoic acid regulate growth, antioxidant status and lipid metabolism of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: Optimum supplement level and metabonomics response[J]. *Aquaculture*, 2019, 506: 94-103.
- [22] Li L L, Liu Z, Quan J Q, et al. Metabonomics analysis reveals the protective effect of nano-selenium against heat stress of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Journal of Proteomics*, 2022, 259: 104545.
- [23] 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.
- [24] 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: 135814.
- [25] Dong H K, Lu G H, Yan Z H, et al. Molecular and phenotypic responses of male crucian carp (*Carassius auratus*) exposed to perfluorooctanoic acid[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 653: 1395-1406.
- [26] Lu Z, Huang W Q, Wang S, et al. Liver transcriptome analysis reveals the molecular responses to low-salinity in large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. *Aquaculture*, 2020, 517: 734827.
- [27] Wen B, Jin S R, Chen Z Z, et al. Physiological responses to cold stress in the gills of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) revealed by conventional biochemical assays and GC-TOF-MS metabolomics[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 640-641: 1372-1381.
- [28] Birnie-Gauvin K, Costantini D, Cooke S J, et al. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review[J]. *Fish and Fisheries*, 2017, 18(5): 928-942.
- [29] Katikaneni A, Jelcic M, Gerlach G F, et al. Lipid peroxidation regulates long-range wound detection through 5-lipoxygenase in zebrafish[J]. *Nature Cell Biology*, 2020, 22(9): 1049-1055.
- [30] Tian L, Tan P, Yang L, et al. Effects of salinity on the growth, plasma ion concentrations, osmoregulation, non-specific immunity, and intestinal microbiota of the yellow drum (*Nibea albiflora*)[J]. *Aquaculture*, 2020, 528: 735470.
- [31] Yi S K, Liu L F, Zhou L F, et al. Screening of biomarkers

- related to ovarian maturation and spawning in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) based on metabolomics and transcriptomics[J]. *Marine Biotechnology*, 2020, 22(2): 180-193.
- [32] Wu H H, Zhang H, Jia J, et al. Research progress of physiologic function and application of functional polyunsaturated fatty acids[J]. *China Food Additives*, 2021, 32(8): 134-140. [吴洪号, 张慧, 贾佳, 等. 功能性多不饱和脂肪酸的生理功能及应用研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(8): 134-140.]
- [33] Marcon M, Mocelin R, de Oliveira D L, et al. Acetyl-L-carnitine as a putative candidate for the treatment of stress-related psychiatric disorders: Novel evidence from a zebrafish model[J]. *Neuropharmacology*, 2019, 150: 145-152.
- [34] Bose S, French S, Evans F J, et al. Metabolic network control of oxidative phosphorylation: Multiple roles of inorganic phosphate[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(40): 39155-39165.
- [35] Dalvi R S, Das T, Debnath D, et al. Metabolic and cellular stress responses of catfish, *Horabagrus brachysoma* (Günther) acclimated to increasing temperatures[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2017, 65: 32-40.
- [36] Loizides-Mangold U. On the future of mass-spectrometry-based lipidomics[J]. *The FEBS Journal*, 2013, 280(12): 2817-2829.
- [37] Long S S, Dong X H, Liu H, et al. Effect of dietary oxidized fish oil on liver function in hybrid grouper (♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*) [J]. *Aquaculture Reports*, 2022, 22: 101000.
- [38] Burstyn-Cohen T, Maimon A. TAM receptors, phosphatidylserine, inflammation, and cancer[J]. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 2019, 17(1): 156.
- [39] Blunsom N J, Cockcroft S. Phosphatidylinositol synthesis at the endoplasmic reticulum[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2020, 1865(1): 158471.
- [40] Nagahara Y, Kawakami K, Sikandan A, et al. Sphingoid base-upregulated caspase-14 expression involves MAPK[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2018, 41(5): 743-748.
- [41] Ledeen R W, Wu G S. Sphingolipids of the nucleus and their role in nuclear signaling[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2006, 1761(5-6): 588-598.
- [42] 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.
- [43] Andrieu-Abadie N, Levade T. Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1585(2-3): 126-134.
- [44] Shah M D, Tani K, Yong Y S, et al. Antiparasitic potential of chromatographic fractions of *Nephrolepis biserrata* and liquid chromatography-quadrupole time-of-flight-mass spectrometry analysis[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2021, 26(2): 499.
- [45] Wang Y, Jiang T B, Sun Z W. Advance in animal nutritional regulation of L-arginine metabolites[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2017, 53(3): 13-17. [王莹, 姜廷波, 孙泽威. L-精氨酸代谢产物对动物营养调控的研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2017, 53(3): 13-17.]
- [46] Sun Y C, Han S C, Yao M Z, et al. High-throughput metabolomics method based on liquid chromatography-mass spectrometry: Insights into the underlying mechanisms of salinity-alkalinity exposure-induced metabolites changes in *Barbus capito* [J]. *Journal of Separation Science*, 2021, 44(2): 497-512.
- [47] Wuertz S, Reiser S. Creatine: A valuable supplement in aquafeeds? [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2023, 15(1): 292-304.
- [48] Burns A F, Gatlin D M III. 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.
- [49] Ma L Y, Li N, Liu X Y, et al. Arginyl-glutamine dipeptide or docosahexaenoic acid attenuate hyperoxia-induced lung injury in neonatal mice[J]. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*, 2012, 28(11-12): 1186-1191.
- [50] Ma L Y, Li N, Neu J. Small Intestinal hypoxic injury and Use of Arginyl-Glutamine Dipeptide: Applications to Pediatrics[M]//Glutamine in Clinical Nutrition. New York: Humana Press, 2015: 369-382.

Effects of α -ketoglutarate supplementation on serum metabolism of crucian carp under carbonate alkaline stress based on UPLC-Q-TOF/MS metabolomics

DING Lu^{1,2}, LIU Yingjie^{1,2}, WEI Xiaofeng^{2,3}, GENG Chuanye^{1,2}, LIU Wenzhi^{1,2}, HAN Lin^{1,2}, YUAN Fangying^{2,4}, WANG Peng², SUN Yanchun^{1,2,3,4}

1. College of Food Sciences and 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;

3. School of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

4. School of Materials and Chemical Engineering, Harbin University of Science and Technology, Harbin 150080, China

Abstract: China has a large area of saline-alkali waters with high salinity, high pH, and ion ratio imbalance, which seriously affects the growth and reproduction of fish and leads to extremely low fishery development and utilization. α -ketoglutarate (AKG), as the crucial metabolic intermediate of the tricarboxylic acid cycle, has a variety of biological functions such as regulating energy metabolism, nitrogen metabolism, and lipid metabolism and improving the body's antioxidant capacity and non-specific immunity. However, the effect and regulatory mechanism of AKG supplementation on the physiological metabolism of freshwater teleosts in saline-alkali habitats are still unclear. This article preliminarily discusses the effects of α -ketoglutarate (AKG) supplementation on the serum metabolism of crucian carp (*Carassius auratus*) under saline-alkali stress based on ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) non-targeted metabolomics. The experimental crucian carp were randomly divided into a freshwater control group (Con group), NaHCO_3 exposure group (CA group), and NaHCO_3 exposure and AKG feeding group (AKG group) and fed for 30 days. The UPLC-Q-TOF/MS technology was used to establish a serum metabolomics analysis method. Multivariate pattern recognition techniques including principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to analyze the changes in serum metabolite composition and content in crucian carp and identify significantly different metabolites. MetaboAnalyst 5.0 and the KEGG database were used to analyze related metabolic pathways and construct an interaction network diagram of serum differential metabolite-metabolic pathways to clarify the regulation mechanism of AKG supplementation on the growth and metabolism of crucian carp under saline-alkali stress. According to the results of DMs and KEGG pathway enrichment analysis, there were 27 differential metabolites in the CA group compared with the control group, and enrichment in 12 metabolic pathways including glycerophospholipid metabolism, linoleic acid metabolism, tryptophan metabolism, etc; while 38 differential metabolites were identified in the AKG group compared with the CA group, and enrichment in 14 metabolic pathways including glycerophospholipid metabolism, linoleic acid metabolism, α -linolenic acid metabolism, and unsaturated fatty acid biosynthesis, etc. The study showed that carbonate alkali stress caused fish oxidative stress damage, causing disorders of the glycerophospholipid metabolism, sphingolipid metabolism, and energy. However, AKG supplementation can promote the TCA cycle to increase carbon source and energy supply and improve the antioxidant capacity and immune capacity of fish under carbonate alkaline stress by positively regulating metabolic pathways such as glycerophospholipid metabolism, sphingolipid metabolism, and amino acid metabolism, thereby alleviating carbonate alkaline-induced oxidative stress damage. This study clarified the effectiveness of AKG as a feed additive to alleviate the damage to freshwater teleosts under saline-alkali stress at the metabolic level. This provides a scientific basis for the application of AKG in the field of aquaculture in saline-alkali waters and has important ecological, economic, and social significance for improving the utilization of saline-alkali water resources.

Key words: *Carassius auratus*; α -ketoglutarate; carbonate alkaline stress; serum metabolomics; regulatory mechanisms

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