

基于肝脂和¹H-NMR技术的草鱼肝胰脏及血清代谢组学分析

黄春红^{1,2}, 肖调义^{1*}, 胡毅¹, 赵玉蓉¹, 刘巧林¹

(1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南长沙 410128;

2. 湖南文理学院生命科学学院, 水产高效健康生产湖南省协同创新中心,
动物学湖南省高校重点实验室, 湖南常德 415000)

摘要: 为了探讨草鱼肝胰脏脂质过量蓄积的生化基础并促进草鱼的健康养殖, 采用¹H-NMR分析技术对肝脂含量分别为3%~4%和14%~16%的两组草鱼的肝胰脏和血清进行了代谢组学分析。结果表明, 从草鱼肝胰脏和血清中分别检测到了58和47种代谢物。葡萄糖、别嘌呤二醇、牛磺酸、乳酸、谷氨酸、肌酸、丙氨酸、sn-甘油-3-磷酸胆碱、甘氨酸、石碳酸、次黄嘌呤、乙酸、赖氨酸、亮氨酸和缬氨酸为两组草鱼肝胰脏主要差异代谢物; 其中, 肝脂含量为14%~16%的草鱼肝胰脏中葡萄糖和别嘌呤二醇的含量明显高于肝脂含量为3%~4%的草鱼组, 但乳酸和多种氨基酸含量则低于肝脂含量为3%~4%的草鱼组。乳酸、葡萄糖、肌酸、柠檬酸、亮氨酸、丙酮酸、缬氨酸、脯氨酸、鸟嘌呤核苷、异亮氨酸、谷氨酸、sn-甘油-3-磷酸胆碱、丙氨酸、赖氨酸和甘氨酸为两组草鱼血清主要差异代谢物; 其中肝脂含量为14%~16%的草鱼血清中葡萄糖、柠檬酸、脯氨酸、谷氨酸、sn-甘油-3-磷酸胆碱、精氨酸以及甘氨酸7种代谢物含量高于肝脂含量为3%~4%的草鱼组, 血清乳酸等含量则明显低于肝脂含量为3%~4%的草鱼组。肝脂含量为14%~16%的草鱼组其体内糖的有氧氧化和糖酵解途径均受到了明显的抑制, 同时存在氨基酸代谢异常, 这可能是导致草鱼肝脂过量蓄积的重要原因之一。

关键词: 草鱼; 肝胰脏; 血清; ¹H-NMR; 代谢组学

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是中国年产量最大的淡水养殖鱼类, 2013年其年产量已达到506.99万t^[1], 高密度和配合饲料养殖模式下, 饲料营养水平设计不合理^[2-3]及饲料原料选择不当^[4-5]等, 都可导致草鱼发生肝胰脏脂质过量蓄积, 既损害草鱼的健康, 危害草鱼产业可持续发展, 也降低鱼肉品质和养殖户的经济效益。早在1990年, Lin等^[6]认为草鱼肝胰脏正常脂肪含量应低于5%; 肝胰脏脂肪含量大于5%为脂肪肝, 即肝脏脂肪过量蓄积; 肝胰脏脂肪含量达到5%~10%、10%~15%和15%~20%时可依次确定为肝脏脂质沉积、肝实质脂肪浸润和肝脏细胞核萎缩阶段。目前, 草鱼肝胰脏脂质过量蓄积已引起了广泛关注, 但其发生的生化机理研究相对较少。

代谢组学是一种检测生物机体整体代谢特征的技术。该技术主要通过质子核磁共振光谱(¹H-NMR)、气相色谱-质谱(GC-MS)联用、液相色谱-质谱(LC-MS)联用等分析技术来检测生物体的体液(如尿液、血清)和组织(如肌肉、肝)中内源性代谢物的指纹图谱, 同时通过无监督的主成分分析(principal component analysis, PCA)、有监督的偏最小二乘分析(partial least squares analysis, PLS)、偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)、变量重要性投影分析(variable importance in projection, VIP)等多元统计分析方法来确定代谢物受到病理或生理刺激后的定量变化模式, 进而反映细胞

收稿日期: 2015-01-08 修回日期: 2015-03-30

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46-42)

通信作者: 肖调义, E-mail: tyxiao1128@163.com

或者内脏器官的功能异常以及随时间的变化过程^[7-8]。这对于了解生物体不同疾病的发生和发展进程,以及临床有效诊断指标的筛选将有较大帮助。目前,已有许多学者将代谢组学技术应用于临床疾病的诊断与预后^[9-10]。采用¹H-NMR 分析技术,比较分析肝脂含量小于 5% 的正常肝脂草鱼与肝脂含量大于 5% 的肝脂过量蓄积草鱼的肝胰脏和血清代谢物,旨在从生化水平初步探讨草鱼肝脂过量蓄积的原因,进而为优化设计草鱼配合饲料营养水平提供参考。

1 材料与方法

1.1 草鱼肝胰脏及血清

实验草鱼于 2014 年 5 月采自湖南省常德市安乡县鸭踏湖渔场,草料养殖的草鱼和配合饲料养殖的草鱼各 20 尾,体质量为 1 206 ~ 1 550 g。实验鱼先用丁香酚(50 mg/L)麻醉,再逐尾采集尾静脉血液约 3 mL 于真空采血管中,经解剖后迅速分离肝胰脏 300 mg 左右,于液氮中速冻和保存,采集剩余肝胰脏以备肝脂含量测定。血液先室温放置 30 min,再于 4 °C,3 000 r/min 离心 12 min,取血清分装于 1.5 mL 灭菌离心管中,于液氮中速冻和保存。参照 GB/T 9695.7-2008^[11],采用索氏抽取法测定草鱼肝脂含量。根据草鱼肝脂含量测定结果,选择液氮保存的肝脂含量为 3%~4% 的 3 尾正常肝脂草鱼(L 组)的肝胰脏样品和血清样品,以及肝脂含量为 14%~16% 的 3 尾肝脂过量蓄积草鱼(H 组)的肝胰脏样品和血清样品,用于代谢组学分析。

1.2 仪器及设备

超低温冰箱(DW-86L828 型)、真空冷冻干燥机(LGJ-10 型)、离心机(TGL-16 型)、电子天平(Mettler Toledo XP205)、¹H-NMR 光谱仪(Agilent DD2 600 MHz spectrometer equipped with a triple-resonance cryoprobe)(表 1)。

1.3 肝胰脏及血清样品前处理方法

从液氮中取出肝胰脏,置于预冷的 180 °C 干热灭菌的研钵中,用液氮将肝胰脏研磨成粉,并迅速转移至预冷和灭菌的 1.5 mL 离心管中,迅速将离心管置于液氮中,持续冻存 5 h;取出离心管,于预冷的真空冷冻干燥机中冷冻干燥。准确称取肝胰脏样品约 500 mg,加入 1 000 μL 超纯水,涡旋 1 min;冰水浴中 4 s 超声,3 s 间歇,循环 8 次,

45% 振幅;4 °C,13 000 r/min 离心 15 min;取上清液 500 μL,于 4 °C,13 000 r/min 超滤膜离心 30 min;取 450 μL 滤液于另一离心管中,加入 4.136 1 mmol/L ACDSS 试剂(anachro certified DSS standard solution) 50 μL,涡旋 10 s;4 °C,13 000 r/min 离心 2 min;取 480 μL 上清液于核磁管中检测。除不需超声波萃取外,于 4 °C 冰箱中解冻的血清的其余预处理步骤同肝胰脏样本。检测过程由武汉安隆科讯生物有限公司完成。

表 1 核磁采集参数及数据

Tab. 1 Acquisition parameters and data of ¹H-NMR

采集参数 parameters of acquisition	数据 data
温度/K temperature	298.15
磁频率/MHz magnet frequency	599.83
瞬变/扫描 transients/scans	64 (hepatopancreas) &32 (serum)
循环延迟 recycle delay	0.01
频率域大小 frequency domain size	65 536
光谱宽度 spectral width	7 225.434
时间域大小 time domain size	28 902
脉冲序列 pulse sequence	metnoesy

1.4 数据处理与分析方法

先将¹H-NMR 自由感应衰减(free induction decay, FID)信号导入到 Chenomx NMR suit (version 7.7, Chenomx, Edmonton, Canada) 软件中完成傅立叶转换。再以 DSS-d6(chemical shape indicator)峰(0.0)为全部谱图化学位移标准,对其进行反转卷积操作,同时调整谱图峰形。根据¹H-NMR 谱图中信号的相关信息,如化学位移、峰形、半峰宽、耦合裂分等,以 DSS-d6 的浓度和峰面积为标准,结合 Chenomx 软件自带的数据库分别对不同草鱼肝胰脏样品和血清样品谱图信号逐一比对分析,获得不同种类代谢物及其绝对浓度值。将草鱼肝胰脏与草鱼血清的代谢物及其对应的绝对值浓度导出到 EXCEL 表格中,分别得到一个变量矩阵。以变量矩阵为数据源进行质量归一化处理,再进行 PCA、PLS-DA、VIP 分析。PCA 和 PLS-DA 分别通过 R 语言中 pca methods Bioconductor 包和 pls 包完成数据分析,通过 ggplot2 包进行可视化作图。采用 SPSS 19.0 软件对组间主要差异代谢物浓度进行单因素方差分析和多重比较,显著性水平设为 0.05。

上均存在明显分离,表明两组草鱼的代谢轮廓存在差异。草鱼肝胰脏 PCA 载荷图(图 2-b)显示葡萄糖(glucose)、别嘌呤醇(oxypurinol)、牛磺酸(taurine)、乳酸(lactate)、谷氨酸(glutamate)、肌酸(creatine)和丙氨酸(alanine)等多种代谢物对区分正常肝脂草鱼与肝脂过量蓄积草鱼肝胰脏

样本所作贡献较大。

L 组与 H 组组内样品具有高重复性;L 组与 H 组两组样品在第一主成分上的代谢轮廓不同,但在第二主成分上的代谢轮廓相似(图 3-a)。载荷图(图 3-b)显示葡萄糖、别嘌呤醇以及多种氨基酸等对区分两组样品所作贡献较大。

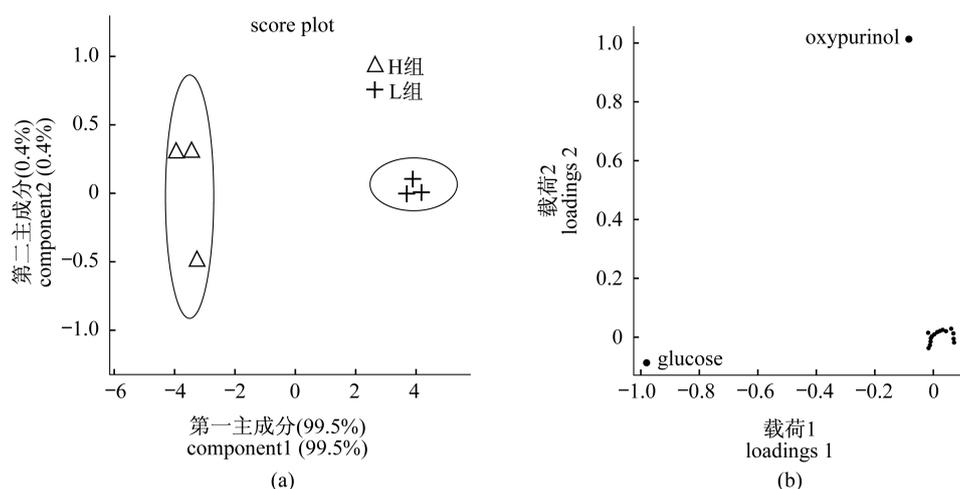


图 3 正常肝脂草鱼与肝脂过量蓄积草鱼肝胰脏组织样品 PLS-DA 得分图(a)与载荷图(b)

b 图右下角黑点从左至右分别为赖氨酸、谷氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、肌酸、缬氨酸、甘氨酸、石炭酸、丙氨酸、乙酸、组氨酸、sn-甘油-3-磷酸胆碱、异亮氨酸、牛磺酸

Fig. 3 PLS-DA score plot (a) and loading plot (b) of heptapancreas from grass carp with normal (L) and excessive (H) heptapancreas lipid

Black spots in the corner of figure b were lysine, glutamate, methionine, threonine, creatine, valine, glycine, alanine, phenol, acetic acid, histidine, sn-glycerol-3-phosphocholine, isoleucine, taurine from left to right, respectively

2.3 正常肝脂草鱼与肝脂过量蓄积草鱼肝胰脏 VIP 分析

L 组与 H 组草鱼肝胰脏 VIP 值排名前 15 的代谢物浓度组间差异性均显著($P < 0.05$),且均以葡萄糖的浓度最高(表 2),H 组草鱼肝胰脏中仅葡萄糖和别嘌呤醇含量高于 L 组,其余 13 种代谢物含量均低于 L 组。第一主成分的 VIP 分析表明葡萄糖在区分两组肝胰脏样品中所作贡献最大(图 4)。

2.4 正常肝脂草鱼与肝脂过量蓄积草鱼血清代谢物归属谱图

草鱼血清样品谱图显示,从草鱼血清中共获得 47 种代谢物。其中,氨基酸及其衍生物 16 种、有机酸 19 种、糖类 1 种、核酸组分 4 种,甲醇,乙醇,丙二醇,肌醇,胆碱,氧-磷酸胆碱,sn-甘油-3-磷酸胆碱等 7 种(图 5)。

2.5 正常肝脂草鱼与肝脂过量蓄积草鱼血清 PCA 及 PLS-DA 分析

两组草鱼的 3 个平行样本分别团聚在一起,表明组内样本重复性较好;两组样本在第一主成分上和第二主成分上均存在明显分离,表明两组样品的代谢轮廓不同(图 6-a)。血清样品载荷图显示葡萄糖和乳酸等在区分两组样本上贡献较大(图 6-b)。

L 组与 H 组血清 PLS-DA 得分图表明两组样品组内重复性较高(图 7-a);两组样品在第一主成分上存在明显分离,即两组样品在第一主成分上的代谢轮廓不同,但两组样品在第二主成分上无法分离,表明两组样品在该方向上具有相似的代谢轮廓。草鱼血清载荷图表明,葡萄糖、乳酸、肌酸、柠檬酸及多种氨基酸对区分两组血清样品所作贡献较大(图 7-b)。

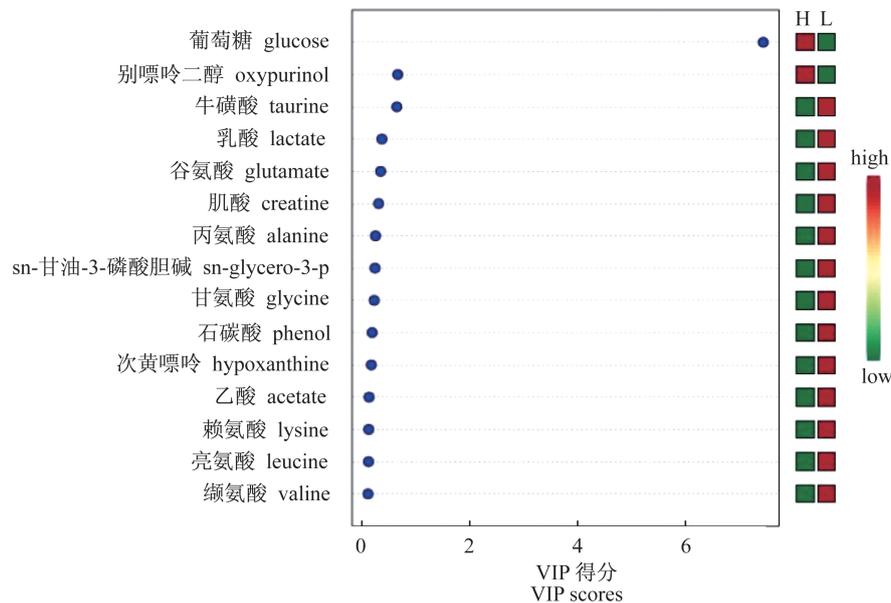


图 4 正常肝脂草鱼与肝脂过量蓄积草鱼肝胰脏样品 VIP 图

图左侧为 VIP 值排名前 15 的代谢物;图中为各代谢物的 VIP 值,值越大说明代谢物在区分样品中所作贡献越大;图右侧为根据各代谢物浓度在不同组中的贡献大小而进行的颜色编码

Fig. 4 Variable importance in projection of hepatopancreas from grass carp with normal (L) and excessive (H) hepatopancreas lipid

Metabolites with VIP values top 15 are listed in the left of the figure; the VIP value of each metabolite is showed in the middle of the figure, the bigger the VIP value, the greater contribution it has in distinguishing normal (L) and excessive (H) lipid hepatopancreas samples; color codes of metabolites relevant to the contribution in distinguishing normal (L) and excessive (H) lipid hepatopancreas samples are presented in the right of the figure

表 2 正常肝脂草鱼与肝脂过量蓄积草鱼肝胰脏差异代谢物及浓度
Tab. 2 Metabolites concentration in the hepatopancreas of grass carp with normal (L) and excessive (H) hepatopancreas lipid

代谢物名称 metabolites	正常肝脂组 hepatopancreas with normal lipid	肝脂过量蓄积组 hepatopancreas with excessive lipid
葡萄糖 glucose	56.74 ± 2.57 ^a	85.07 ± 1.22 ^b
别嘌呤醇 oxypurinol	2.81 ± 0.15 ^a	5.73 ± 0.40 ^b
牛磺酸 taurine	6.26 ± 0.12 ^a	4.20 ± 0.17 ^b
乳酸 lactate	3.42 ± 0.18 ^a	2.54 ± 0.03 ^b
谷氨酸 glutamate	2.03 ± 0.12 ^a	0.77 ± 0.04 ^b
肌酸 creatine	2.06 ± 0.14 ^a	1.03 ± 0.03 ^b
丙氨酸 alanine	1.40 ± 0.09 ^a	0.82 ± 0.01 ^b
sn-甘油-3-磷酸胆碱 sn-glycero-3-phosphocholine	1.98 ± 0.13 ^a	0.43 ± 0.04 ^b
甘氨酸 glycine	0.74 ± 0.08 ^a	0.31 ± 0.01 ^b
石碳酸 phenol	0.63 ± 0.07 ^a	0.18 ± 0.03 ^b
次黄嘌呤 hypoxanthine	0.77 ± 0.03 ^a	0.17 ± 0.03 ^b
乙酸 acetate	0.30 ± 0.02 ^a	0.19 ± 0.00 ^b
赖氨酸 lysine	0.69 ± 0.01 ^a	0.22 ± 0.03 ^b
亮氨酸 leucine	0.56 ± 0.01 ^a	0.15 ± 0.00 ^b
缬氨酸 valine	0.49 ± 0.04 ^a	0.15 ± 0.01 ^b

注:同行肩标字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Notes: difference between groups with different lowercase letters is significant ($P < 0.05$), the same as below

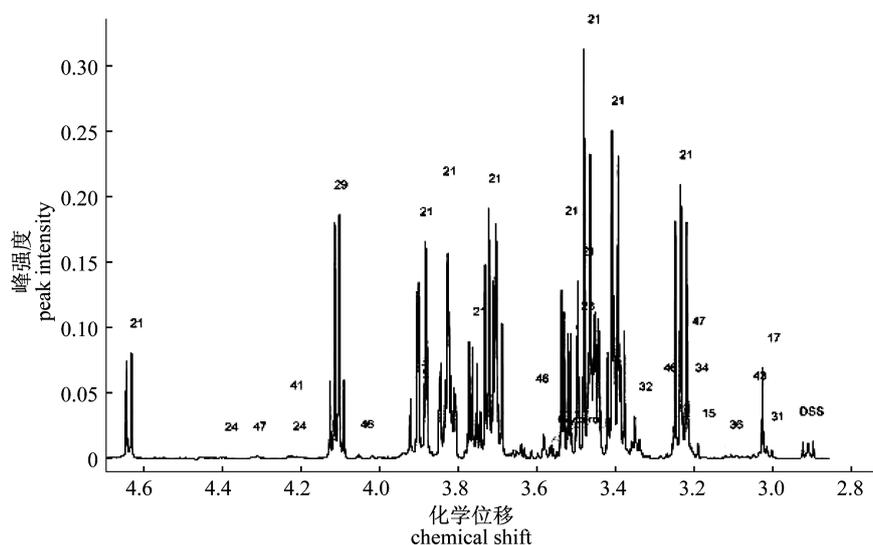


图5 草鱼血清样品信号归属谱图

草鱼血清样品的信号归属片段,归属范围为3.0~5.0区间,归属的代谢物用编号标识

Fig.5 Signal assignment spectrum of serum from grass carp

Serum signal assignment fragment of grass carp with assignment interval 3.0 – 5.0,metabolites were coded according to numbers

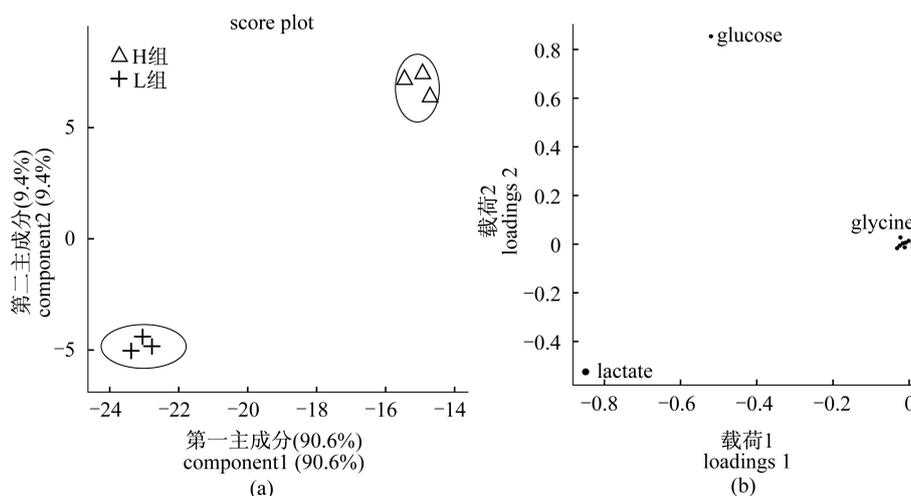


图6 正常肝脂草鱼与肝脂过量蓄积草鱼血清样品 PCA 得分图(a)与载荷图(b)

b 图黑点由左至右分别为肌酸、柠檬酸、脯氨酸、缬氨酸、sn-甘油-3 磷酸胆碱、丙氨酸、亮氨酸、谷氨酸、丙酮酸

Fig.6 PCA score plot(a) and loading plot(b) of serum from grass carp with normal(L) and excessive(H) hepato-pancreas lipid

Black spots in figure b were creatine, citric acid, proline, valine, alanine, sn-glycerol-3-phosphocholine, leucine, glutamate, pyruvate from left to right, respectively

2.6 正常肝脂草鱼与肝脂过量蓄积草鱼血清 VIP 分析

两组草鱼血清 VIP 值排名前 15 的代谢物浓度组间差异均显著 ($P < 0.05$) (图 8, 表 3), 且以葡萄糖和乳酸在区分两组血清样本中所作贡献最

大。H 组草鱼血清中除葡萄糖、柠檬酸、脯氨酸、谷氨酰胺、sn-甘油-3-磷酸胆碱、精氨酸以及甘氨酸等 7 种代谢物的浓度高于 L 组以外, 其余 8 种代谢物浓度均相对较低。

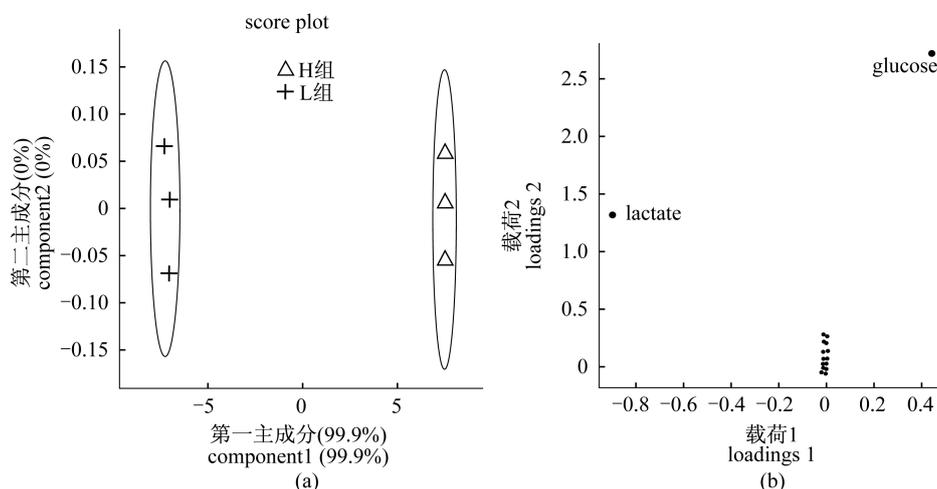


图7 正常肝脂草鱼与肝脂过量蓄积草鱼血清样品 PLS-DA 得分图 (a) 与载荷图 (b)

b 图左侧黑点由上至下分别为异亮氨酸、丙氨酸、缬氨酸、柠檬酸、脯氨酸、鸟嘌呤核苷、丙酮酸; b 图右侧黑点由上至下分别为赖氨酸、苏氨酸、肌酸、sn-甘油-3 磷酸胆碱、丙氨酸、琥珀酸、谷氨酸

Fig. 7 PLS-DA score plot (a) and loading plot (b) of serum from grass carp with normal (L) and excessive (H) hepato-pancreas lipid

Black spots on the left side of figure b were isoleucine, alanine, valine, citric acid, proline, guanosine, pyruvate from top to bottom, respectively; black spots on the right side of figure b were lysine, threonine, creatine, sn-glycerol-3-phosphocholine, alanine, glutamate, succinate from top to bottom, respectively

3 讨论

3.1 草鱼肝胰脏典型差异代谢物与肝脂过量蓄积

有关脂肪过量沉积的肝脏代谢组学研究中,大多以大鼠 (*Rattus norvegicus*) 和人 (*Homo sapiens*) 肝脏、血液和尿液等代谢组学研究较多^[11-14]。脂肪肝鱼类代谢组学的研究相对较少, Wood 等^[15]、Ong 等^[16] 以及 Jang 等^[17] 相继对白斑角鲨 (*Squalus acanthias*) 血浆和酒精性脂肪肝斑马鱼 (*Danio rerio*) 肝脏代谢物进行了分析, 并发现了一些重要代谢物。动物和人脂肪肝在组织学方面具有相似特征^[18], 在发生机制方面可能也存在一定的相似性。Nicholas 等^[11] 基于¹H-NMR 技术对酒精性脂肪肝小鼠 (*Mus musculus*) 肝脏进行了代谢组学分析, 发现酒精性脂肪肝小鼠肝脏中葡萄糖、乳酸以及丙氨酸含量下降, 而乙酸含量则上升。酒精性脂肪肝斑马鱼肝脏的¹H-NMR 分析结果也表明, 其肝脏葡萄糖、丙氨酸等分泌量下降, 而乙酸等分泌量则上升^[17]。上述研究结果表明, 啮齿动物和鱼类酒精性脂肪肝在代谢方面的形成机制存在相似性。Ong 等^[16] 研究认为¹H-NMR 能够比较全面地提供脂肪肝斑马鱼肝脏中葡萄糖、氨基酸、丙

酮酸以及其他小分子成分的相关信息。本研究中, 非酒精所致的草鱼肝脂过量蓄积肝胰脏代谢物中, 葡萄糖和别嘌呤二醇含量上升, 而乳酸、丙氨酸、乙酸、肌酸、sn-甘油-3-磷酸胆碱以及多种氨基酸含量则下降, 这一定程度上验证了 Ong 等^[16] 的结果, 同时也表明鱼类非酒精性脂肪肝与酒精性脂肪肝在代谢方面的形成机制不同。

葡萄糖是生物体内有氧氧化途径的主要底物, 乳酸则为生物体内糖酵解途径的主要产物, 肝脂过量蓄积组草鱼肝胰脏中葡萄糖浓度和乳酸含量分别明显高于和低于正常肝脂组, 意味着肝脂过量蓄积组肝胰脏内糖的有氧氧化途径和糖酵解途径都不同程度地受到了抑制, 即糖代谢异常应该是草鱼肝胰脏发生脂质过量蓄积的重要原因。肝脂过量蓄积组草鱼肝胰脏中丙氨酸、赖氨酸、亮氨酸等多种氨基酸含量明显低于正常肝脂组, 表明草鱼肝胰脏中脂质过量蓄积除与糖类代谢异常有关以外, 还与氨基酸代谢异常有关。草鱼配合饲料中蛋白质、淀粉、脂肪水平一般都明显高于草料, 长期摄食配合饲料的草鱼可能由于体内能量过剩导致脂肪在肝胰脏中蓄积, 损害肝功能, 继而引起能量代谢障碍, 能量代谢障碍反过来又加剧脂肪在肝胰脏中蓄积, 代谢障碍和肝脂蓄积之间

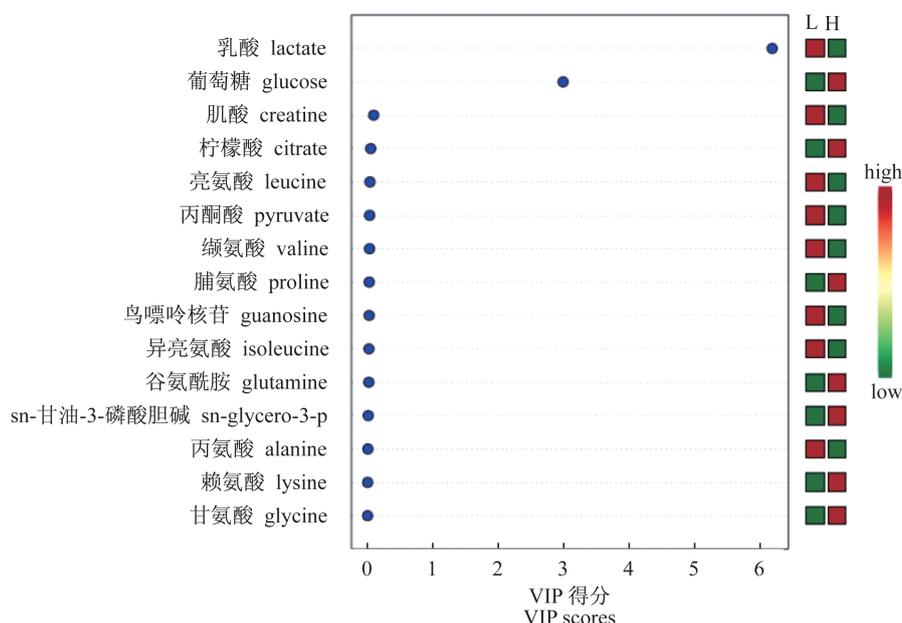


图 8 正常肝脂组 (L) 与肝脂过量蓄积组草鱼 (H) 血清 VIP 图

图左侧为 VIP 值排名前 15 的代谢物; 图中为各代谢物的 VIP 值, 值越大说明代谢物在区分样品中所作贡献越大; 图右侧为根据各代谢物浓度在不同组中的贡献大小而进行的颜色编码

Fig. 8 Variable importance in projection of serum from grass carp with normal (L) and excessive (H) hepato-pancreas lipid

Metabolites with VIP values top 15 are listed in the left of the figure, the VIP value of each metabolite is showed in the middle of the figure; the bigger the VIP value, the greater contribution it has in distinguishing serum samples from grass carp with normal (L) and excessive (H) lipid hepato-pancreas; color codes of metabolites relevant to the contribution in distinguishing serum samples from grass carp with normal (L) and excessive (H) lipid hepato-pancreas are presented in the right of the figure

表 3 正常肝脂草鱼与肝脂过量蓄积草鱼血清主要差异代谢物及浓度
Tab. 3 Metabolites concentration in the serum of grass carp with normal (L) and excessive (H) hepato-pancreas lipid

代谢物名称 metabolites	正常肝脂组 hepato-pancreas with normal lipid	肝脂过量蓄积组 hepato-pancreas with excessive lipid
乳酸 lactate	2 226.68 ± 18.03 ^a	909.19 ± 10.38 ^b
葡萄糖 glucose	1 519.14 ± 13.68 ^a	2 868.05 ± 51.83 ^b
肌酸 creatine	80.95 ± 1.90 ^a	46.65 ± 1.59 ^b
柠檬酸 citrate	8.09 ± 0.46 ^a	37.54 ± 2.76 ^b
亮氨酸 leucine	48.23 ± 2.51 ^a	31.57 ± 2.65 ^b
丙酮酸 pyruvate	20.82 ± 0.14 ^a	10.64 ± 0.02 ^b
缬氨酸 valine	49.20 ± 2.27 ^a	36.10 ± 2.27 ^b
脯氨酸 proline	16.39 ± 1.69 ^a	27.91 ± 1.61 ^b
鸟嘌呤核苷 guanosine	61.98 ± 4.07 ^a	34.03 ± 5.04 ^b
异亮氨酸 isoleucine	41.75 ± 1.20 ^a	30.02 ± 3.53 ^b
谷氨酰胺 glutamine	13.25 ± 2.58 ^a	25.63 ± 2.19 ^b
sn-甘油-3-磷酸胆碱 sn-glycero-3-phosphocholine	12.68 ± 0.87 ^a	29.56 ± 0.55 ^b
丙氨酸 alanine	28.15 ± 3.57 ^a	23.49 ± 3.18 ^b
赖氨酸 lysine	22.42 ± 0.85 ^a	28.73 ± 5.23 ^b
甘氨酸 glycine	47.42 ± 0.34 ^a	50.54 ± 1.65 ^b

形成恶性循环。由于本研究仅采用¹H-NMR 这种单一分析技术来研究肝胰脏代谢物,因此尚无法满足代谢组学对肝胰脏样本全谱分析的要求。如果同时结合 GC 或 GC-MS 联用技术来研究肝胰脏中脂肪酸代谢谱,则更有利于从生化方面探讨草鱼肝脂过量蓄积的原因。

3.2 草鱼血清典型差异代谢物与肝脂过量蓄积

本研究中,肝脂过量蓄积草鱼血清内葡萄糖和柠檬酸含量明显高于正常肝脂草鱼,而乳酸和丙酮酸等则明显低于正常肝脂草鱼,脯氨酸、谷氨酸、赖氨酸等氨基酸含量也高于正常肝脂组草鱼。这表明肝脂过量蓄积草鱼体内不仅糖的有氧氧化及糖酵解途径受到了明显抑制,同时还存在蛋白质或氨基酸代谢异常,这与草鱼肝胰脏代谢组学研究结果一致。但是,肝胰脏代谢组学属于肝活检,对鱼体侵害性较大,而血清代谢组学研究对鱼体伤害小,预处理方法更简便,其结果揭示的规律与肝胰脏代谢组学基本相似,因此基于¹H-NMR 技术的血清代谢组学研究具有更广阔的前景。

综合分析草鱼肝胰脏及血清主要差异代谢物,草鱼体内糖和氨基酸等能量代谢异常是导致肝脂过量蓄积的重要生化基础。饲料中三大产能营养素(蛋白质、脂肪、碳水化合物)的含量、比例及其来源^[4,19]均可影响草鱼肝脂沉积量,是与草鱼肝脂过量蓄积密切相关的营养因素。柠檬酸循环与氧化磷酸化是三大产能营养素共同的代谢途径。由于以上两种代谢途径均发生在线粒体中,因此凡是影响线粒体结构与功能的因素,可能均可以影响上述三大营养素的代谢,最终可能因能量代谢障碍而引起肝脂过量蓄积。线粒体氧化途径的破坏或线粒体功能障碍可能是导致肝脂过量蓄积的重要原因。氧化应激导致的线粒体功能障碍与脂肪肝之间的关系当前研究得相对较多^[20-22]。例如,体外实验表明,在脂质过氧化状态下,线粒体细胞色素 b、细胞色素 cc1 和 aa3 的含量分别仅为非脂质过氧化状态下的 0.14~0.40 倍、0.65~0.76 倍和 0.73~0.84 倍^[21],即氧化应激可能通过影响线粒体内膜上的递氢体而降低氧化磷酸化水平。另有研究表明非酒精性脂肪肝的肝损伤与氧化应激介导有关^[23]。斑马鱼酒精性脂肪肝的发生与长期摄取酒精引起的鱼体内氧化一还原状态改变以及氧化应激有关^[17]。细胞

缺氧^[24]、营养物质过剩(如高脂饮食)^[25-26]、养殖环境因素(如金属离子)^[27]等都可以造成线粒体氧化磷酸化损伤或能量代谢异常,进而引起多器官功能障碍综合症。高密度养殖条件下,鱼类往往处于相对缺氧状态。随着鱼体的生长,营养不平衡,饵料投喂量增加,养殖周期延长,鱼类缺氧和养殖环境恶化加剧,可能最终造成鱼类线粒体氧化磷酸化损伤和肝脂过量蓄积。对啮齿动物的研究也表明,自由基清除能力下降和氨基酸代谢障碍是脂肪肝发生和发展的早中期事件,单纯性脂肪肝小鼠体内参与肝细胞抗氧化的酶类、线粒体结构与功能相关的蛋白质和氨基酸合成酶类的表达量均明显降低^[28]。另外,sn-甘油-3-磷酸胆碱属于甘油磷酸酯,即磷脂的一种。由于磷脂是构成生物体内生物膜的重要组成成分。肝脂过量蓄积组草鱼血清中 sn-甘油-3-磷酸胆碱含量约为正常肝脂草鱼的 2.5 倍。血清 sn-甘油-3-磷酸胆碱含量升高可能意味着草鱼体内生物膜结构,例如线粒体膜、内质网膜等结构受损,即部分细胞器结构和功能异常。综上所述,由于线粒体是生物体内蛋白质、脂类、碳水化合物三大有机物有氧氧化的场所,因此氧化应激导致的线粒体结构和功能异常可能是草鱼体内糖类和氨基酸等能量代谢障碍和肝脂过量蓄积发生的重要原因,因此有关氧化应激与线粒体功能障碍,以及营养因素或养殖环境因素与氧化应激等在草鱼肝脂过量蓄积中的作用值得深入研究。

4 结论

通过基于¹H-NMR 技术的代谢组学分析,分别从草鱼肝胰脏及血清中获得 58 和 47 种代谢物。与正常肝脂组草鱼相比,肝脂过量蓄积组草鱼体内氨基酸、糖类及核酸等代谢途径均受到了不同程度的影响,尤其是肝脂过量蓄积组草鱼体内糖的有氧氧化途径和糖酵解途径等受到明显的抑制,这可能是造成草鱼肝脂过量蓄积的重要原因。肝细胞内与能量代谢密切相关的线粒体的形态、结构及功能异常可能是导致草鱼肝胰脏内糖类和蛋白质等能量代谢障碍的主要原因,这一点值得深入研究。

参考文献:

- [1] The ministry of agriculture fisheries bureau. China fisheries year book [M]. Beijing: China Agriculture

- Press,2014. [农业部渔业局. 中国渔业年鉴. 北京: 中国农业出版社,2014.]
- [2] Du Z Y, Liu Y J, Tian L X, *et al.* Effect of dietary lipid level on growth, feed utilization and body composition by juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Aquaculture Nutrition, 2005, 11(2) :139 - 146.
- [3] Guo X Z, Liang X F, Fan L, *et al.* Effects of non-protein energy sources on serum biochemical indices and histology of liver in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(3) :582 - 587. [郭小泽, 梁旭方, 方刘, 等. 饲料中非蛋白能量源对草鱼血清生化指标和肝脏组织的影响. 水生生物学报, 2014, 38(3) :582 - 587.]
- [4] Tian L X, Liu Y J, Feng J, *et al.* Effect of different types of starch on growth, the deposition of mesenteric fat and body composition of *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2002, 26(3) :247 - 251. [田丽霞, 刘永坚, 冯健, 等. 不同种类淀粉对草鱼生长、肠系膜脂肪沉积和鱼体组成的影响. 水产学报, 2002, 26(3) :247 - 251.]
- [5] Tan Q S, Liu Q, Chen X X, *et al.* Growth performance, biochemical indices and hepatopancreatic function of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*, would be impaired by dietary rapeseed meal[J]. Aquaculture, 2013, 414 - 415:119 - 126.
- [6] Lin D, Mao Y Q, Cai F S. Nutritional lipid liver disease of grass carp *ctenopharyngodon idellus*(C. et V.) [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 1990, 8(4) :363 - 373.
- [7] Lindon J C, Holmes E, Bollard M E, *et al.* Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis [J]. Biomarkers, 2004, 9(1) :1 - 31.
- [8] Jiye Aa. Analysis of metabolomic data; Principle component analysis[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2010, 15(5) :481 - 489. [阿基业. 代谢组学数据处理方法 - 主成分分析. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(5) :481 - 489.]
- [9] Holmes E, Nicholls A W, Lindon J C, *et al.* Chemometric models for toxicity based on NMR spectra of biofluids [J]. Chemical Research in Toxicology, 2000, 13(6) :471 - 478.
- [10] Holmes E, Nicholson J K, Tranter G. Metabonomic characterization of genetic variations in toxicological and metabolic responses using probabilistic neural networks [J]. Chemical Research in Toxicology, 2001, 14(2) :182 - 191.
- [11] Nicholas P C, Kim D, Crews F T, *et al.* 1H NMR-based metabolomic analysis of liver, serum, and brain following ethanol administration in rats[J]. Chemical Research in Toxicology, 2008, 21(2) :408 - 420.
- [12] Sheng G P. GC/MS and LC/MC based metabonomic study of liver disease[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008. [盛国平. 基于 GC/MS 和 LC/M 技术的肝病代谢组学研究. 杭州:浙江大学, 2008.]
- [13] Ma X L. Metabonomics study diabetes mellitus and traditional uygur medicine syndrome based on different analytical methods [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2013. [马晓丽. 基于代谢组学技术的糖尿病特征代谢物及维医证型研究. 乌鲁木齐:新疆医科大学, 2013.]
- [14] Zhang Q, Gao J, Li L, *et al.* Metabonomic study of blood plasma in the assessment of liver graft function [J]. Acta Academiae Medicinae Ssinicae, 2007, 29(6) :725 - 729. [张琪, 高静, 李伶, 等. 血浆代谢组学研究用于肝移植植物功能变化的评估. 中国医学科学院学报, 2007, 29(6) :725 - 729.]
- [15] Wood C M, Walsh P J, Kajimura M, *et al.* The influence of feeding and fasting on plasma metabolites in the dogfish shark (*Squalus acanthias*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular and Integrative Physiology, 2010, 155(4) :435 - 444.
- [16] Ong E S, Chor C F, Zou L, *et al.* A multi-analytical approach for metabolomic profiling of zebrafish (*Danio rerio*) livers [J]. Molecular Biosystems, 2009, 5(3) :288 - 298.
- [17] Jang Z H, Chung H C, Ahn Y G, *et al.* Metabolic profiling of an alcoholic fatty liver in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Molecular Biosystems, 2012, 8(7) :2001 - 2009.
- [18] Solinas P, Isola M, Lilliu M A, *et al.* Animal models are reliably mimicking human diseases? A morphological study that compares animal with human NAFLD [J]. Microscopy Research and Technique, 2014, 77(10) :790 - 796.
- [19] Cao J M, Guan G Q, Liu Y J, *et al.* Effects of different dietary levels of protein, fat and carbohydrate on growth rate and tissue nutritional

- composition in grass carp [J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 1997, 24 (2): 56 - 60. [曹俊明, 关国强, 刘永坚, 等. 饲料蛋白质、脂肪、碳水化合物水平对草鱼生长和组织营养成分组成的影响. *水产科技情报*, 1997, 24(2): 56 - 60.]
- [20] Forsmark A P, Lee C P, Dallner G, *et al.* Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, 22 (3): 391 - 400.
- [21] Kojima H, Sakurai S, Uemura M, *et al.* Mitochondrial abnormality and oxidative stress in nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2007, 31 (S1): 61 - 66.
- [22] Long J G, Wang X M, Gao H X, *et al.* Malonaldehyde acts as a mitochondrial toxin; Inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in isolated rat liver mitochondria [J]. *Life Science*, 2006, 79 (15): 1466 - 1472.
- [23] Rolo A P, Teodoro J S, Palmeira C M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Free Radical and Biology Medicine*, 2012, 52 (1): 59 - 69.
- [24] Fink M P. Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia [J]. *Critical Care*, 2002, 6 (6): 491 - 499.
- [25] Ding X D, Fan J G, Xu Z J, *et al.* Mitochondrial damage and ATP reserve of high fat diet steatohepatitis rat [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2005, 13 (13): 1524 - 1528. [丁晓东, 范建高, 徐正婕, 等. 高脂饮食性脂肪性肝炎大鼠肝脏线粒体损伤和 ATP 储备改变. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(13): 1524 - 1528.]
- [26] Li H K, Xie Z Q, Zhang Q H, *et al.* Transcriptomic and metabolomic profiling of obesity-prone and obesity-resistant rats under high fat diet [J]. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7 (11): 4775 - 4783.
- [27] Hu W, Zhi L, Zhuo M Q, *et al.* Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and inhibition effects of several metal ions on G6PD activity *in vitro* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2013, 39 (3): 637 - 647.
- [28] Wang L, Li Y M, He F C, *et al.* Proteomic and metabolomics study of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Chinese Journal of Digestion*, 2008, 28 (10): 718 - 720. [王兰, 励有名, 贺福初, 等. 非酒精性脂肪肝的蛋白质组学和代谢组学研究. *中华消化杂志*, 2008, 28(10): 718 - 720.]

Metabonomics analysis of hepatopancreas and serum of grass carp based on the hepatopancreas lipid and ¹H-NMR

HUANG Chunhong^{1,2}, XIAO Tiaoyi^{1*}, HU Yi¹, ZHAO Yurong¹, LIU Qiaolin¹

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China;

2. Key Laboratory of Zoology in Hunan Higher Education, Collaborative Innovation Center for Efficient and Health Production of Fisheries in Hunan Province, College of Life Science, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, China)

Abstract: Excessive lipid accumulation in hepatopancreas of grass carp is very common under high density and mixed cultivation. To explore the biochemical mechanism of excessive lipid accumulation in hepatopancreas and promote the healthy cultivation of grass carp, metabonomics analysis of hepatopancreas and serum of grass carp based on ¹H-NMR and hepatopancreas lipid were carried out. Grass carp were classified into normal hepatopancreas lipid (3% to 4%) group and excessive hepatopancreas lipid (14% – 16%) group. The results indicated that 58 and 47 metabolites were detected in the hepatopancreas and serum of grass carp, respectively. Glucose, oxypurinol, taurine, lactate, creatine, glutamate, alanine, sn-glycerol-3-phosphorylcholine, glycine, phenol, hypoxanthine, acetic acid, lysine, leucine and valine were main hepatopancreas metabolites differing in normal and excessive hepatopancreas lipid grass carp. Among the above metabolites, only glucose and oxypurinol in the excessive hepatopancreas lipid group were higher than those in the normal hepatopancreas lipid group. Lactic acid, glucose, creatine, citric acid, leucine, valine, proline, pyruvic acid, guanosine, isoleucine, glutamate, sn-3-of glycerol phosphocholine, alanine, lysine and glycine were main serum metabolites differing in normal and excessive hepatopancreas lipid grass carp. Among the above serum metabolites, only glucose, citric acid, glutamate, proline, sn-glycerol-3-choline phosphate, arginine and glycine in grass carp with excessive hepatopancreas lipid were higher than those in the normal hepatopancreas lipid group. It is concluded that both aerobic oxidation and glycolysis of glucose in the body of grass carp with excessive hepatopancreas lipid are obviously inhibited and the metabolism of amino acids are abnormal, which may be one of the important biochemical causes of excessive lipid accumulation in hepatopancreas of grass carp.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; hepatopancreas; serum; ¹H-NMR; metabonomics

Corresponding author: XIAO Tiaoyi. E-mail: tyxiao1128@163.com