

发酵豆粕部分替代鱼粉后添加晶体赖氨酸对凡纳滨对虾肝胰腺代谢的转录调控

郭旭^{1,2,3}, 陈晨^{1,2,3,#}, 戴习林^{1,2,3}, 王文雁⁴, 高斐斐⁴, 华雪铭^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学, 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

4. 上海市奉贤区水产技术推广站, 上海 201499)

摘要: 为研究发酵豆粕部分替代鱼粉后, 饲料中赖氨酸(Lys)含量变化在凡纳滨对虾机体内的响应调控机制, 在基础饲料中分别添加0%、0.25%、0.50%、0.75%和1.00%的晶体赖氨酸配制5种等氮等脂的实验饲料, 记为Lys0、Lys25、Lys50、Lys75和Lys100。选择初始体重为(2.0±0.1)g的凡纳滨对虾在室内水泥池中进行56d的养殖实验。饲养结束后对生长性能、肌肉粗蛋白和脂肪含量、肝胰腺健康程度差异显著的Lys0组和Lys75组对虾肝胰腺进行了代谢组学和转录组学分析。结果显示, 以Lys0作对照, Lys75组共检测出28个差异代谢物, 其中有2个代谢物下调, 26个代谢物上调; 对注释到KEGG数据库中7种差异代谢物进行信号通路分析, 筛选出4条比较重要的代谢通路, 分别为甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的代谢, 花生四烯酸代谢, 鞘脂类代谢和甘油磷脂代谢。Lys75组对虾肝胰腺中胆碱显著下调, γ -丁甜菜碱双加氧酶表达显著上调, 己糖激酶基因和乙酰胆碱酯酶基因表达显著下调。研究表明, 饲料赖氨酸水平的提高有助于对虾肝胰腺中脂肪酸的 β 氧化供能, 起到节约蛋白质的作用, 也能保护对虾肝胰腺健康, 促进对虾生长。

关键词: 凡纳滨对虾; 发酵豆粕; 晶体赖氨酸; 转录; 代谢

中图分类号: S 963.31

文献标志码: A

随着水产养殖业的日益发展, 业界对人工配合饲料的需求不断上升, 但有限的鱼粉资源致使养殖成本增加, 严重制约了水产养殖业的可持续发展。植物原料因资源丰富, 价格低廉, 营养价值较高, 而成为水产饲料的研究热点。豆粕在氨基酸平衡性上较其他植物蛋白源有优势, 是替代鱼粉的首选植物蛋白源, 但由于进口依赖度高, 经过发酵以提高现有豆粕资源的有效性已成为业界共识。相较于豆粕, 发酵豆粕中的抗营养因子

含量大幅度降低, 部分蛋白被降解为优质多肽和小肽, 并含有多种生物活性物质, 但仍存在氨基酸平衡性差的问题, 因此在饲料中使用发酵豆粕时有必要添加氨基酸。

氨基酸是动物必需的营养物质, 具有广泛的生物学功能, 它是蛋白质的组成单位, 能量代谢物质。此外, 它还作为信号分子广泛参与多种生理功能的维持与调控, 并在转录、翻译、翻译后修饰等多个层面上发挥作用^[1]。目前, 人们对于

收稿日期: 2022-01-02 修回日期: 2022-04-14

资助项目: 上海市科技兴农项目(沪农科创字(2019)第3-5号); 广东省重点领域研发计划

第一作者: 郭旭(照片), 从事水产动物营养与饲料研究, E-mail: 930277490@qq.com; #为共同第一作者

通信作者: 华雪铭, 从事水产动物营养与饲料研究, E-mail: xmhua@shou.edu.cn



晶体氨基酸的研究仍主要集中在其对水生动物生长、血清和肝脏生化、营养物质消化吸收、肠道健康及提高饲料利用率^[2-7]等方面, 关于晶体氨基酸在水产动物体内代谢机理的研究鲜有报道。肝胰腺是对虾最大的功能器官, 当肝胰腺出现病变或代谢功能紊乱时, 机体正常的生理功能便无法运行, 进而导致机体发病甚至死亡^[8-10]。深入研究凡纳滨对虾肝胰腺的代谢功能有助于全面、系统地了解包括赖氨酸在内的必需氨基酸的生理功能。

代谢组学作为系统生物学的组成部分, 通过对所有代谢物的定量分析, 寻找活系统中代谢物与生理病理变化的相对关系^[11]。随着生物学研究的深入, 单一代谢组学分析局限性日益显现, 借助多组学分析则可以将生物机体调控规律及代谢途径等了解地更加透彻。将代谢组学与转录组学结合进行组学间的相互验证, 通过转录预测代谢物, 通过代谢验证转录结果, 既体现个别表型特征, 又体现集体趋势, 更有利于深入解析各项生物系统的代谢机制。研究表明, 包括蛋白质在内的饲料营养水平对动物的代谢物有着显著影响^[12-13]。赖氨酸(Lys)作为多数植物蛋白的第一限制性氨基酸, 在促进甲壳动物生长、提高蛋白沉积率、饲料转化率和增强机体免疫方面发挥重要作用。此外, 赖氨酸作为肉碱的前体, 能促进线粒体内长链脂肪酸的 β 氧化^[14], 间接提高饲料蛋白的利用率。而在发酵豆粕替代鱼粉条件下, 改变饲料赖氨酸水平可能会对代谢物和细胞中的基因转录产生影响。鉴于此, 本实验运用代谢组学和转录组学联合分析手段, 在前期生长和健康最适赖氨酸需求量研究的基础上^[15], 探究饲料中添加晶体赖氨酸对凡纳滨对虾肝胰腺代谢和转录表达的影响, 揭示晶体赖氨酸对凡纳滨对虾生长的代谢及分子调控机制, 为氨基酸在凡纳滨对虾配合饲料中的合理应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验设计与饲料制作

参照刘韬^[16]设计的发酵豆粕部分替代鱼粉的凡纳滨对虾饲料配方, 以鱼粉、发酵豆粕、花生粕、豆粕、血粉作为主要蛋白源, 鱼油和大豆磷脂作为脂肪源配制基础饲料, 其中, 蛋氨酸和精氨酸含量为其实验得出的最适需求量。在此基础上分别添加0(Lys0)、0.25%(Lys25)、0.50%(Lys50)、0.75%(Lys75)、1.00%(Lys100)的晶体赖氨酸, 配

制成5组等氮等脂的实验饲料, 以不添加晶体赖氨酸的饲料组(Lys0)作为对照, 实验饲料组成及营养水平见表1, 各组饲料赖氨酸实测值分别为2.43%、2.65%、2.87%、3.06%、3.24%。

1.2 饲养管理

养殖实验在上海海洋大学滨海养殖基地进行, 实验用凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)购自上海奉贤区某养殖场。挑选750尾活力好, 大小基本一致的幼虾(2.0 ± 0.1 g), 随机分配到15个网箱(网箱规格1.90 m \times 1.25 m \times 1.00 m)中, 每个网箱50尾, 每组3个平行。对虾每天在6:00、11:00、17:00、22:00饱食投喂并于投喂1 h后查看饲料摄食情况, 1.5 h后虹吸出残饵风干称重。实验期间每两天换一次充分曝气后的池塘水, 换水量为30%, 定期用虹吸管清理池底的残饵粪便。实验养殖周期56 d, 水温25~31 $^{\circ}$ C, 氨氮 <0.3 mg/L, pH为 8.0 ± 0.2 , 溶氧 >5 mg/L。

1.3 样品采集

经前期研究结果表明^[16], Lys75组的生长性能、肌肉粗蛋白和脂肪含量在所有实验组中最高, 且肝胰腺健康程度也显著高于Lys0组, 因此选择Lys0组和Lys75组进行代谢组学和转录组学分析。在这2个组的每个网箱中随机取6尾对虾, 在无菌条件下取其新鲜肝胰腺, 放入无RNA酶、无菌的离心管, 暂存于液氮中, 随后转入 -80° C的冰箱中保存以待后续分析测定。

1.4 样本处理

代谢组学分析 取50 mg凡纳滨对虾肝胰腺组织于1.5 mL离心管中加入400 μ l提取液(乙腈:甲醇=1:1), 涡旋混匀30 s后, 低温超声提取30 min(5 $^{\circ}$ C, 40 KHz), 将样品于 -20° C静置30 min后, 4 $^{\circ}$ C、13000 \times g离心15 min, 移取上清液, 氮气吹干, 低温超声萃取5 min(5 $^{\circ}$ C, 40 KHz), 4 $^{\circ}$ C、13000 g离心5 min, 移取上清液至进样小瓶中进行LC-MS代谢组学上机分析。

转录组学分析 采用TRIzol(Invitrogen)法提取凡纳滨对虾肝胰腺中的总RNA, 具体流程如下: ①取适量凡纳滨对虾肝胰腺组织, 液氮充分研磨后转移入加有1 mL Trizol 预冷的1.5 mL离心管中, 震荡使其充分裂解, 室温放置5 min。②4 $^{\circ}$ C, 13000 \times g离心5 min后, 吸取上层液体至另一离心管中, 按0.2 mL氯仿/1 mL Trizol 的量加入预冷的

表 1 实验饲料配方及营养水平

项目 items		组别 groups					%
		Lys0	Lys25	Lys50	Lys75	Lys100	
原料	ingredients						
鱼粉	fish meal	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	
发酵豆粕	fermented soybean meal	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	
花生粕	peanut meal	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	
豆粕	soybean meal	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	
次粉	wheat middling	6.95	6.95	6.95	6.95	6.95	
面粉	flour	20.91	20.66	20.41	20.16	19.91	
血粉	dried blood	3.99	3.99	3.99	3.99	3.99	
鱼油	fish oil	1.97	1.97	1.97	1.97	1.97	
乌贼膏	squid visceral ointment	3.99	3.99	3.99	3.99	3.99	
啤酒酵母	brewers yeast	4.99	4.99	4.99	4.99	4.99	
多维	vitamin premix ¹	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	
多矿	mineral premix ²	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	
磷酸二氢钙	ca(H ₂ PO ₄) ₂	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	
赖氨酸	lysine	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00	
蛋氨酸	methionine	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	
大豆磷脂	lecithin powder	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	
胆固醇	cholesterol	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	
氯化胆碱	choline chloride	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	
合计	total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	
营养水平(干物质基础)	nutrient levels (% DM basis)						
粗蛋白	CP	41.64	41.36	41.82	41.65	41.09	
粗脂肪	EE	7.42	7.35	7.58	7.61	7.48	
粗灰分	Ash	6.93	6.73	6.72	6.78	6.89	
赖氨酸	Lysine	2.43	2.65	2.87	3.06	3.24	

注: 1. 每千克维生素预混料含有: VA 8000000IU, VD 2000000IU, VE 50 g, VK 10 g, VB 15 g, VB₂15g, VB₆ 8 g, VB₁₂ 0.02 g, 烟酰胺 40 g, D-泛酸钙 25 g, 叶酸 2.5 g, 生物素 0.08 g, 肌醇 100 g; 2. 每千克矿物质预混料含有: Ca 10.5 g, K 90 g, Mg 12 g, Fe 1.0 g, Cu 3.0 g, Zn 10 g, Mn 3.8 g, Co 0.8 g, Se 20 mg

Notes: 1. Containing the following per kg of vitamin premix: VA 8000000IU, VD 2000000IU, VE 50 g, VK 10 g, VB 15 g, VB₂ 15 g, VB₆ 8 g, VB₁₂ 0.02 g, nicotinamide 40 g, calcium D-pantothenate 25 g, folic acid 2.5 g, biotin 0.08 g, inositol 100g; 2. Containing the following per kg of mineral premix: Ca 10.5 g, K 90 g, Mg 12 g, Fe 1.0 g, Cu 3.0 g, Zn 10 g, Mn 3.8 g, Co 0.8 g, Se 20 mg

氯仿, 即 200 uL, 震荡混匀后常温放置 5 min。
③ 4 °C、13 000×g 离心 15 min 后, 吸取上层水相 400 uL 至另一离心管中, 加入等体积预冷的异丙醇, 室温放置 10 min。
④ 4 °C、13 000×g 离心 10 min 后, 弃上清, 留白色沉淀于管底, 加入 1 mL 预冷的 75% 乙醇, 使沉淀悬浮。
⑤ 4 °C、12 000×g 离心 5 min 后, 弃上清, 再离心数秒, 甩下管壁上悬挂的残液, 用 10 uL 枪头吸尽残液, 室温晾置 3-5 min。
⑥ 加入 20~50 uL 灭菌的 0.1%DEPC 水溶解。总 RNA 抽提完成后, 依次完成 OligodT 富集 mRNA、mRNA 片段化、反转合成 cDNA、adaptor 连接等操作流程后进行 Illumina 上机测序。测序完成后首先对原始数据进行统计和质控, 后续进

行基因表达量分析、基因表达差异分析、差异基因 KEGG 通路富集分析等基础生信分析。

代谢组学和转录组学样本处理均委托美吉生物公司完成。

1.5 数据处理和统计分析

代谢物的提取; LC/MS 分析信息提取 (去噪平滑, 基线校正, 重叠峰识别); 数据预处理 (归一化, 数据转换, 标准化); 模式识别; 差异代谢物统计分析 (运用 R 软件包 ropls(Version1.6.2) 进行 PCA,PLS-DA,OPLS-DA 等分析); KEGG 通路功能分析。

基因表达定量软件采用 RSEM, 表达量指标

为 TPM; 差异表达使用的软件是 DESeq2(三个生物学重复), 筛选标准为: $p\text{-adjust} < 0.05$ & $|\log_2FC| \geq 1$; 当一个基因同时满足这两个条件时, 则视该基因为差异表达基因。采用 R 脚本对基因集中的基因/转录本进行 KEGG PATHWAY 富集分析, 当经过校正的 P 值 ($P_{\text{adjust}} < 0.05$) 时, 认为此 KEGG PATHWAY 功能存在显著富集情况。

2 结果

2.1 原始数据统计分析

PCA 分析 (Principal Component Analysis) 可以有效的找出数据中最“主要”的元素和结构, 去除噪音和冗余。样本代谢物表达模式越相似, 反映在 PCA 图中的距离越近。由图 1 中凡纳滨对虾肝胰腺代谢谱显示, Lys0 和 Lys75 组有一定分离趋势, 表明两组之间的代谢物发生了改变。置信椭圆表示本组“真实”样本在 95% 的置信度下, 分布在此区域内; 超过此区域可认为是可能异常样本, 两组样本均未超出说明所分析的样本中不存在离群值。

实验中各样品对应的测序碱基平均错误率在 0.0259%~0.0274%, 小于 0.1%, 同时 Q20 在 96.89%~

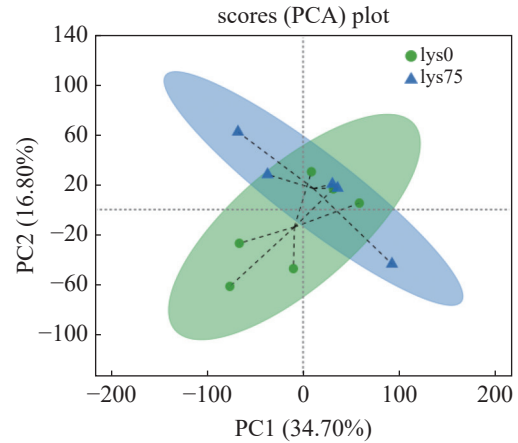


图 1 凡纳滨对虾肝胰腺主成分分析

Fig. 1 PCA analysis of LC-MS metabolite profiles

97.62% 之间, 大于 85%, Q30 在 92.17%~93.81%, 大于 80%, 此结果说明了 6 个样本的测序结果比较理想, 数据符合继续分析的要求 (表 2)。

2.2 质控数据统计

由表 3 可以看出质控后各样品质控数据对应的测序碱基平均错误率均在 0.1% 以下, Q20、Q30 均在 90% 以上, 质量较高, 因此对后续结果的分析较为准确。

表 2 6 个样本的原始测序数据统计

Tab. 2 Evaluation results of raw reads of 6 samples

样品 sample	错误率 error rates					
	raw reads	raw bases	error rate/%	Q20/%	Q30/%	GC content/%
Lys0	48775762	7365140062	0.0268	97.12	92.69	51.79
Lys0	49809466	7521229366	0.0267	97.13	92.74	50.18
Lys0	46442308	7012788508	0.0256	97.62	93.81	52.05
Lys75	47443196	7163922596	0.0268	97.11	92.75	48.93
Lys75	43081998	6505381698	0.0274	96.89	92.17	49.19
Lys75	50476674	7621977774	0.0259	97.48	93.45	50.22

表 3 6 个样本的质控数据统计

Tab. 3 Evaluation results of clean reads of 6 samples

样品 sample	错误率 error rate					
	raw reads	raw bases	error rate/%	Q20/%	Q30/%	GC content/%
Lys0	48188564	7134585976	0.0257	97.71	93.47	51.66
Lys0	49209612	7268231043	0.0257	97.72	93.51	49.99
Lys0	46003128	6798805065	0.0247	98.13	94.48	51.93
Lys75	46812724	6882449977	0.0255	97.79	93.64	48.69
Lys75	42568310	6288444171	0.0263	97.49	92.96	48.99
Lys75	50004628	7396155090	0.025	98.00	94.13	50.06

2.3 差异代谢物及代谢途径分析

Lys0 及 Lys75 组组间共检测出 28 个差异代谢物组, 与 Lys0 组相比, Lys75 组中有 26 个代谢物下调, 2 个代谢物上调。其中注释到 KEGG 数据库中的代谢物有 7 种, 分别为 6-酮-前列腺素 E1、维生素 D₃、L-墨蝶呤、 α -酰基甘油磷酸胆碱、鞘磷脂、N-乙酰基-L-亮氨酸、胆碱 (表 4)。将这些差异代谢物带入 KEGG 信号通路分析, Lys0

及 Lys75 组间共筛选出 4 条代谢通路, 分别为甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的代谢 (Glycine, serine and threonine metabolism)、花生四烯酸代谢 (Arachidonic acid metabolism)、甘油磷脂代谢 (Glycerophospholipid metabolism)、鞘脂类代谢 (Sphingolipid metabolism)(表 5)。Lys0 与 Lys75 组间整合通路图见图 2。

表 4 Lys0 与 Lys75 组间显著差异代谢物 (以 Lys0 组为对照)

Tab. 4 Identification of significantly different metabolites in hepatopancreas between Lys0 and Lys75 (Lys0 as control group)

差异代谢物	differential metabolites	VIP	P	FC	水平	level
6-酮-前列腺素E1	PGE1	3.23	0.0067	1.19	Up	
维生素D ₃	VD ₃	2.66	0.0357	0.88	Down	
L-墨蝶呤	Sepiapterine	2.35	0.0237	0.87	Down	
α -酰基甘油磷酸胆碱	α -Choline glycerophosphate	2.34	0.0391	0.91	Down	
鞘磷脂	sphingomyelin	2.07	0.0125	0.92	Down	
N-乙酰基-L-亮氨酸	N-Acetyl-L-leucine	1.98	0.0241	1.09	Up	
胆碱	Choline	1.69	0.0324	0.95	Down	

注: 1.OPLS-DA模型得到的投影(VIP)值和双尾t检验得到的归一化峰面积的P值受变量影响; 以VIP > 1和P < 0.05为显著性; 2. FC: 两组样本代谢物中平均表达量的比值(Lys75/Lys0), FC>1表示上调, FC<1表示下调

Notes: 1.variable influence on projection (VIP) values obtained from OPLS-DA model and P values from a two-tailed Student's t-test on the normalized peak area; Metabolites with VIP > 1 and P < 0.05 were considered discriminative; 2.FC =fold change, FC: The ratio of the average expression of metabolites in the two sets of samples (Lys75/Lys0), FC>1 means up-regulation, FC<1 means down-regulation

表 5 Lys0 与 Lys75 组间差异代谢通路 (以 Lys0 组为对照)

Tab. 5 Identification of different metabolism pathways in hepatopancreas between Lys0 and Lys75 groups (Lys0 as control group)

代谢通路	pathway	P-value	富集的差异代谢物	SDMs	水平	level
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	Glycine, serine and threonine metabolism	0.041	胆碱	Choline	下调	down
花生四烯酸代谢	Arachidonic acid metabolism	0.061	6-酮-前列腺素E1	PGE1	上调	up
甘油磷脂代谢	Glycerophospholipid metabolism	0.079	α -酰基甘油磷酸胆碱、胆碱	α -Choline glycerophosphate	下调	down
鞘脂代谢	Sphingolipid metabolism	0.020	鞘脂	sphingolipids	下调	down

2.4 基因表达量差异分析

以 Lys0 为对照组, Lys75 为实验组, 共检测出 17 种显著差异表达的基因, 其中 4 种基因上调, 13 种基因下调, 注释到 KEGG 数据库中的差异基因有 8 种 (表 6)。

2.5 差异基因的 KEGG 富集

对 Lys0 和 Lys75 组的差异基因和代谢物进行转录组学和代谢组学整合分析 (表 7, 图 3), 筛选出 3 个差异基因及其参与的 6 条信号通路, 3 个差异基因编码的酶分别为丁基甜菜碱双加氧酶、乙酰胆碱脂酶、己糖激酶。6 条信号通路依次为

赖氨酸降解、甘油磷脂代谢、糖酵解和糖异生、淀粉和蔗糖的代谢、胆碱能突触、果糖和甘露糖的代谢。

3 讨论

实验结果显示凡纳滨对虾的差异代谢物及富集出的代谢通路较少, 这可能与受试动物、试验周期及饲料营养素种类有关 (表 4、表 5)。由表 5 的差异代谢物通路富集可以看出饲料中添加晶体赖氨酸主要影响凡纳滨对虾的氨基酸代谢和脂类代谢 (表 5)。

甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢通路归属于氨

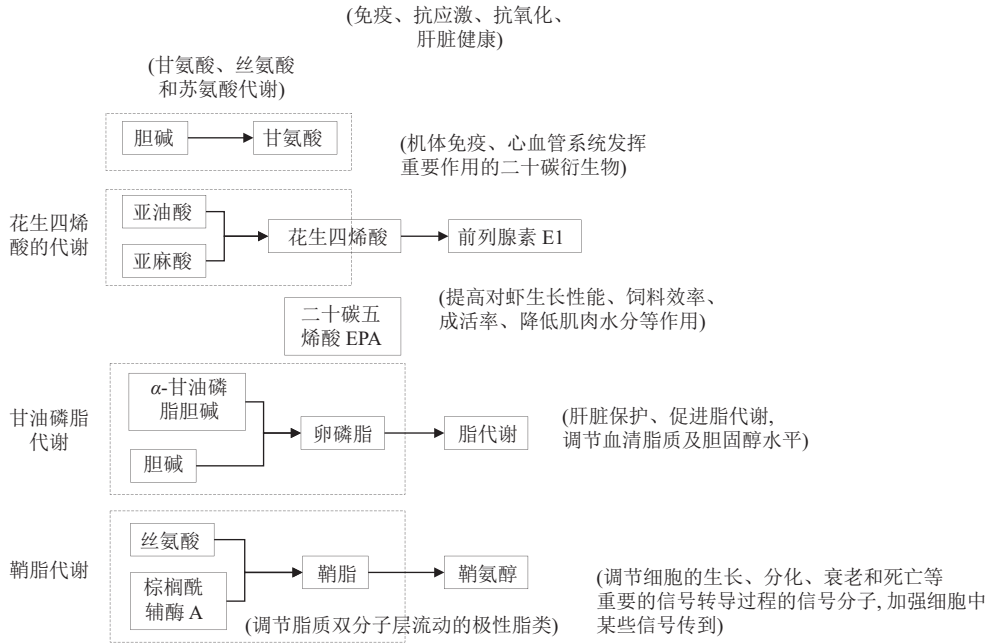


图 2 Lys0 与 Lys75 两组代谢组学整合后的 KEGG 代谢通路

Fig. 2 KEGG pathway enrichment after the metabolomics integration between Lys0 and Lys75 group

表 6 Lys0 和 Lys75 两组差异最为显著的 8 种基因表达量统计结果 (以 Lys0 组为对照)

Tab. 6 Most significant up / down-regulation of 8 kinds of gene expression between Lys0 and Lys75(Lys0 as control group)

基因名称	KO name	Log2FC(Lys75/Lys0)	P-adjust	显著性 significant	调整 regulate
岩藻糖基转移酶8	FUT8	-7.3656	0.0058	yes	down
肌动蛋白β1	ACTB_G1	-2.5163	0.0069	yes	down
翻译起始因子2亚基1	EIF2S1	12.6150	0.0000	yes	up
钙激活氯离子通道调节	CLCA3_4	-1.7308	0.0455	yes	down
钙激活氯离子通道调节	CLCA1	-1.7169	0.0055	yes	down
γ-丁甜菜碱双加氧酶	E1.14.11.1	3.8235	0.0144	yes	up
己糖激酶	HK	-1.6270	0.0001	yes	down
乙酰胆碱酯酶	ACHE	-8.8932	0.0051	yes	down

注: 1. KO name: 基因名称; 2. log₂FC(Lys75/Lys0): 该基因/转录本在两样本间差异倍数以2为底的对数值, Lys0为对照; 3. Padjust: 多重检验校正后的P值; 4. Significant: 基因在两样本间的显著性, yes为显著; 5. Regulate: 上下调情况, 以Lys0为对照, up为上调, down为下调。
 Note: 1. KO name: gene name; 2. log₂FC(Lys75/Lys0): the logarithmic value of the gene/transcript difference between two samples based on the base 2, Lys0 is the control; 3. Padjust: P-value adjusted for multiple testing; 4. Significant: whether the difference between the two samples is significant, yes is significant; 5. Regulation: up and down, Lys0 is the control, up is up-regulation, and down is down-regulation.

表 7 Lys0 与 Lys75 组间差异代谢通路 (以 Lys0 组为对照)

Tab. 7 Identification of different metabolism pathways in hepatopancreas between Lys0 and Lys75 groups. (Define Lys0 as control group)

基因 gene	基因中文名称 name	通路编号 pathway id	通路名称 description	调整 regulation
E1.14.11.1	γ-丁甜菜碱双加氧酶	map00310	赖氨酸分解代谢	up
ACHE	乙酰胆碱酯酶	map00564	甘油磷脂代谢	down
HK	己糖激酶	map00010	糖酵解/糖异生	down
HK	己糖激酶	map00500	淀粉和蔗糖代谢	down
ACHE	乙酰胆碱酯酶	map04725	胆碱能突触	down
HK	己糖激酶	map00051	果糖和甘露糖代谢	down

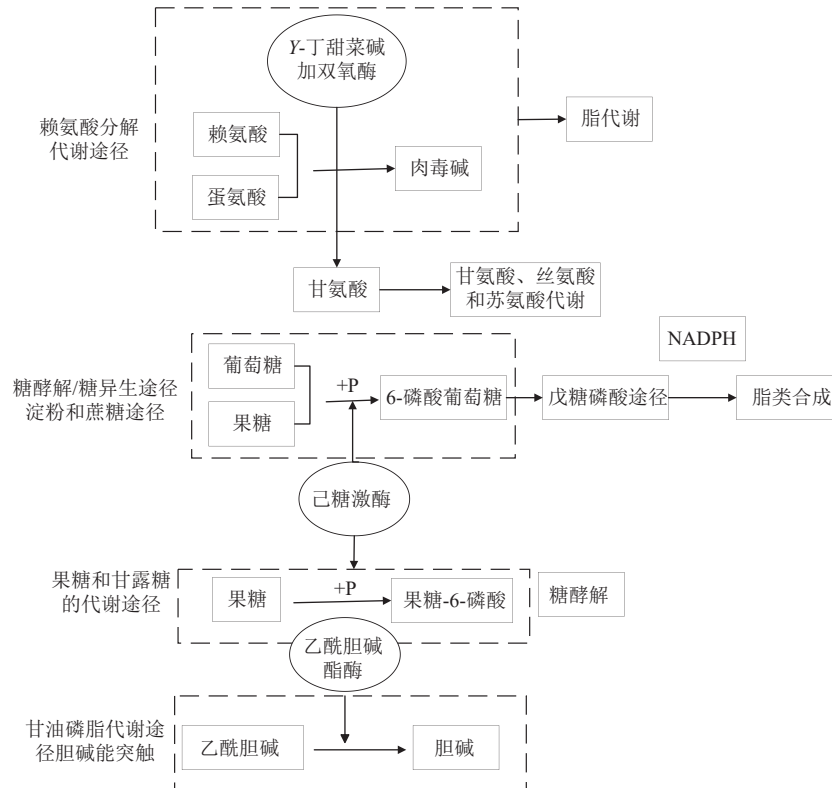


图3 Lys0与Lys75组代谢组学与转录组学联合分析后的KEGG代谢通路富集

Fig. 3 KEGG pathway enrichment after integrated analysis of transcriptomics and metabolomics between Lys0&Lys75 groups

基酸代谢, 主要在对虾肝胰腺中进行, 三者之间可通过甘氨酸羟甲基转移酶和苏氨酸缩醛酶互相转化, 与能量代谢及脂肪代谢密切相关^[17]。也有研究表明甘氨酸和丝氨酸对水产动物的免疫及肝脏健康至关重要^[18-21], 同时甘氨酸还能提高鱼类的抗氧化及抗应激能力^[22-23]。胆碱作为合成甘氨酸的前体物质, 在本实验中 Lys75 组胆碱含量下调可能与机体甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢合成作用加强有关。表明了饲料中添加晶体氨基酸有助于提高对虾抗氧化能力及肝胰腺蛋白合成能力, 促进肌肉蛋白沉积。

花生四烯酸作为不饱和脂肪酸, 在调节鱼类生长性能、脂质代谢、细胞膜流动性和免疫功能等方面起着至关重要的作用^[24-25]。可由亚油酸、亚麻酸转化而来, 是类似于前列腺素这样一些对机体免疫和心血管系统发挥重要作用的二十碳衍生物的直接前体^[26]。本实验中 6-酮-前列腺素 E1(PGE1) 上调可能与花生四烯酸的酶促代谢加强有关, 研究发现, PGE1 在肝脏保护、抗氧化、免疫损伤机制的抑制调节作用方面发挥重要作用^[27], 因此这可能是对虾对自身肝胰腺的一种保护调节。

也有研究发现对虾体内花生四烯酸和二十碳五烯酸 (EPA) 存在一定的抑制关系, 花生四烯酸水平下调可以促进二十碳五烯酸 (EPA) 在机体内蓄积^[28-29]。EPA 作为甲壳类动物的必需脂肪酸之一, 具有提高对虾生长性能、饲料效率、成活率, 降低肌肉水分等作用。因此, 本研究中花生四烯酸合成前列腺素作用加强可能间接提高对虾体内 EPA 含量而改善对虾生长性能。

卵磷脂由胆碱和磷脂酸构成, 属于甘油磷脂, 在机体的肝脏保护和促进脂质代谢方面发挥重要作用^[30-31]。本实验中参与合成卵磷脂的两种关键前体物质 α -甘油磷酸胆碱和胆碱在 Lys75 组中显著下调, 说明对虾肝胰腺卵磷脂的合成代谢加强, 以此调节血清脂质, 降低胆固醇, 保护对虾肝胰腺健康。

鞘脂是一类参与构成脂质双分子层并调节脂质双分子层膜的流动性的极性脂类。其代谢产物如鞘氨醇是一种参与调节细胞的生长、分化、衰老和死亡等重要的信号转导过程的信号分子。本试验中 Lys75 组鞘脂含量降低, 一方面可能是其在鞘磷脂磷酸二酯酶的作用下水解为鞘氨醇以加

强细胞中某些信号传导过程^[32]。另一方面, 丝氨酸和棕榈酰辅酶 A 作为合成鞘脂的前体物质, 当丝氨酸更多的参与肝脏蛋白代谢用于蛋白合成时, 可能会造成鞘脂合成代谢减弱造成鞘脂下调。

研究发现, 动物可在肝脏、肾、脑等器官中以赖氨酸、蛋氨酸等为原料合成肉毒碱^[33]; γ -丁甜菜碱双加氧酶是赖氨酸分解代谢通路中赖氨酸合成肉毒碱过程中的一种关键酶。肉毒碱主要作用是作为载体将长链脂肪从线粒体外运送到膜内, 促进脂肪酸的 β -氧化^[34]。肉碱能降低血清总胆固醇和甘油三脂含量, 提高血清高密度脂蛋白-胆固醇含量和血清磷脂含量^[35]。

对于肉毒碱提高水产动物生长性能的现象, 研究认为其可能的作用机制是一方面增加鱼体脂肪的供能消耗, 产生节约蛋白质的效应^[36-37]; 另一方面提高了动物血液中类胰岛素-I 生长因子 (IGF-I) 的水平, 加快了动物生长^[33]。本研究中发现 γ -丁甜菜碱双加氧酶基因表达显著上调使丁基甜菜碱双加氧酶增加, 将有助于肉毒碱的生成。此外在赖氨酸经过一系列酶促反应生成肉毒碱的同时生成部分甘氨酸, 通过甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢通路参与氨基酸代谢, 这可能与代谢组分析中发现的甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢加强有关。因此丁基甜菜碱双加氧酶基因可能是通过调控赖氨酸分解代谢进而影响对虾生长性能的一种关键酶。

戊糖磷酸途径是糖酵解外另一种重要的糖代谢途径。戊糖途径的主要作用是产生大量的 NADPH, 进而为中性脂肪和固醇等生物合成反应生物合成提供氢负离子供体^[38]。己糖激酶是促进葡萄糖磷酸化的一种关键酶, 从淀粉和蔗糖途径及糖酵解/糖异生途径及来看, 己糖激酶基因表达的显著下调可能抑制己糖激酶酶活, 进而导致果糖和葡萄糖无法通过己糖激酶转化为 6-磷酸葡萄糖参与戊糖磷酸途径, 减少 NADPH 和脂类生物的合成。

果糖-6-磷酸是糖酵解过程中生成的重要产物之一^[39], 可由葡萄糖 6-磷酸在磷酸葡萄糖异构酶的催化之下所形成, 也可由果糖经己糖激酶磷酸化后生成。从果糖和甘露糖的代谢通路来看, 己糖激酶基因表达的下调可能抑制己糖激酶酶活, 致使果糖无法顺利磷酸化为果糖-6-磷酸参与糖酵解, 对对虾体内的糖代谢产生一定的抑制作用。

乙酰胆碱脂酶是生物神经传导中发挥重要功

能的一种关键酶^[40]。乙酰 CoA 是肝脏合成胆固醇的原料, 由于 L-肉碱有清除体内游离酰基的作用, 体内残留的游离肉碱与酰基结合, 减少了肝脏合成胆固醇的原料, 从而降低了体内胆固醇的合成, 使血液中胆固醇含量降低^[36]。该酶降解乙酰胆碱, 终止神经递质对突触后膜的兴奋作用, 保证神经信号分子在生物体内正常的传导。本研究中乙酰胆碱脂酶基因表达的下调是否影响对虾体内某些信号传递还有待研究。

4 结论

前期的生长实验结果以及后续对应的组学分析表明: 在发酵豆粕部分替代鱼粉条件下, 饲料中添加适量的晶体赖氨酸有助于提高对虾肝胰腺的蛋白合成能力, 利于肌肉蛋白沉积; 同时卵磷脂及肉毒碱的合成促进了肝胰腺中脂肪酸的 β 氧化供能, 起到节约蛋白质的作用; 最后以还原型辅酶 II (NADPH) 为媒介抑制肝胰腺中油脂和胆固醇的合成代谢, 避免对虾体内油脂、胆固醇等的过量堆积, 保护对虾肝胰腺及肠道健康, 共同促进对虾生长。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 蒋晓雪, 郭非凡. 氨基酸调控肝脏糖脂代谢的作用与机制[J]. 生理学报, 2021, 73(5): 723-733.
Jiang X X, Guo F F. The role and mechanism of amino acids in regulating hepatic glucose and lipid metabolism[J]. Acta Physiologica Sinica, 2021, 73(5): 723-733 (in Chinese).
- [2] 李惠, 黄峰, 胡兵, 等. 发酵豆粕替代鱼粉对斑点叉尾生长和饲料表观消化率的影响[J]. 淡水渔业, 2007, 37(5): 41-44.
Li H, Huang F, Hu B, et al. Effects of replacement of fish meal with fermented soybean in the diet for channel catfish (*Ictalurus punctatus*) on growth performance and apparent digestibility of feed[J]. Freshwater Fisheries, 2007, 37(5): 41-44 (in Chinese).
- [3] 王崇, 雷武, 解绶启, 等. 饲料中豆粕替代鱼蛋白对异育银鲫生长、代谢及免疫功能的影响[J]. 水生生物学报, 2009, 33(4): 740-747.
Wang C, Lei W, Xie S Q, et al. Effect of dietary replace-

- ment of fishmeal protein by soybean meal protein on growth performance, metabolism and immunity of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(4): 740-747 (in Chinese).
- [4] 冷向军, 王文龙, 李小勤. 发酵豆粕部分替代鱼粉对凡纳滨对虾的影响[J]. *粮食与饲料工业*, 2007(3): 40-41.
Leng X J, Wang W L, Li X Q. Experiment on feeding *Penaeus vannamei* boones with fermented soybean meal as partial substitute for fish meal[J]. *Cereal & Feed Industry*, 2007(3): 40-41 (in Chinese).
- [5] 李程琼, 石和荣, 杜君裕, 等. 发酵豆粕在日本鳗鲡 (*Auguilla japonica*) 配合饲料中的应用研究 [C]//节能环保和谐发展——2007 中国科协年会论文集 (三), 2007: 232-237.
Li C Q, Shi H R, Du J Y, *et al.* Application research of fermented soybean meal in Japanese eel (*Auguilla japonica*) compound feed[C]//Annual meeting of China Association for Science and Technology(3), 2007: 232-237 (in Chinese).
- [6] 王炳谦, 徐奇友, 徐连伟, 等. 豆油代替鱼油对哲罗鱼稚鱼生长和体成分的影响[J]. *中国水产科学*, 2006, 13(6): 1023-1027.
Wang B Q, Xu Q Y, Xu L W, *et al.* Effects of soybean oil as replacement of fish oil in diet on growth performance and body composition of juvenile *Hucho taimen*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(6): 1023-1027 (in Chinese).
- [7] Wang Y, Guo J L, Bureau D P, *et al.* Replacement of fish meal by rendered animal protein ingredients in feeds for cuneate drum (*Nibea miichthioides*)[J]. *Aquaculture*, 2006, 252(2-4): 476-483.
- [8] Yang J, Xu G W, Zheng Y F, *et al.* Strategy for metabolomics research based on high-performance liquid chromatography and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1084(1-2): 214-221.
- [9] Robertson D G, Reily M D, Sigler R E, *et al.* Metabolomics: evaluation of nuclear magnetic resonance (NMR) and pattern recognition technology for rapid *in vivo* screening of liver and kidney toxicants[J]. *Toxicological Sciences*, 2000, 57(2): 326-337.
- [10] Gibelin H, Eugene M, Hebrard W, *et al.* A new approach to the evaluation of liver graft function by nuclear magnetic resonance spectroscopy. A comparative study between Euro-Collins and University of Wisconsin solutions[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2000, 38(11): 1133-1136.
- [11] Czerwik S. Nutritional metabolomics: development and validation of ageing biomarkers[C]// Orbit Correction and Analysis in Circular Accel. AIP Publishing, 2013.
- [12] Upadhaya S D, Yun H M, Kim I H. Influence of low or high density corn and soybean meal-based diets and protease supplementation on growth performance, apparent digestibility, blood characteristics and noxious gas emission of finishing pigs[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2016, 216: 281-287.
- [13] Jang Y D, Jang S K, Kim D H, *et al.* Effects of dietary protein levels for gestating gilts on reproductive performance, blood metabolites and milk composition[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2014, 27(1): 83-92.
- [14] Tanphaichitr V, Horne D W, Broquist H P. Lysine, a precursor of carnitine in the rat[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1971, 246(20): 6364-6366.
- [15] 郭旭, 戴习林, 华雪铭, 等. 发酵豆粕部分替代鱼粉后凡纳滨对虾对赖氨酸的需求量[J]. *水产学报*, 2021, 45(6): 910-919.
Guo X, Dai X L, Hua X M, *et al.* Optimum lysine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when fermented soybean meal partially replacing fish meal in the feed[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(6): 910-919 (in Chinese).
- [16] 刘韬. 发酵豆粕替代鱼粉及添加晶体精氨酸和蛋氨酸对凡纳滨对虾生长和抗应激能力的免疫调节 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
Liu T. Immune regulation of fermented soybean meal partly replacing fish meal and dietary crystalline arginine and methionine on growth and anti-stress ability of *Litopenaeus vannamei*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018 (in Chinese).
- [17] 单蕊. 参苓白术散干预非酒精性脂肪肝大鼠的肝脏代谢组学研究 [D]. 昆明: 云南中医药大学, 2020.
Shan R. Study on the effect of Shenlingbaizhu powder on liver metabolomics of rats with nonalcoholic fatty liver[D]. Kunming: Yunnan University of Chinese Medicine, 2020 (in Chinese).
- [18] Tang H M, Zhang X, Gong B, *et al.* Proteomics and metabolomics analysis of tomato fruit at different matur-

- ity stages and under salt treatment[J]. *Food Chemistry*, 2020, 311: 126009.
- [19] 张艳, 李卉, 满成云, 等. 基于气相色谱-质谱联用技术的平菇多糖治疗大鼠急性肝损伤的代谢组学研究[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(20): 303-307.
- Zhang Y, Li H, Man C Y, *et al.* Metabolomics study of *Pleurotus ostreatus* polysaccharides on the treatment of acute liver injury in rats based on gas chromatography-Mass Spectrometry[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(20): 303-307 (in Chinese).
- [20] 袁丕瑞. 参苓白术散对免疫抑制小鼠免疫功能的影响研究[J]. *临床合理用药杂志*, 2011, 4(29): 67-68.
- Yuan P R. Study on the effect of Shenlingbaizhusan powder on the immune function of immunosuppressed mice[J]. *Journal of Clinical Rational Use*, 2011, 4(29): 67-68 (in Chinese).
- [21] 郭峰涛. 甘氨酸对非酒精性脂肪性肝病大鼠脂联素及CMKLR1表达的影响及意义 [D]. 太原: 山西医科大学, 2015.
- Guo F T. The Research on the effect and significance of glycine on the expression of adiponectin and CMKLR1 in rat with non-alcoholic fatty liver disease[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2015 (in Chinese).
- [22] Wu G Y. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition[J]. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 1-17.
- [23] Xie S W, Tian L X, Jin Y, *et al.* Effect of glycine supplementation on growth performance, body composition and salinity stress of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* fed low fishmeal diet[J]. *Aquaculture*, 2014, 418-419: 159-164.
- [24] Calder P C. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function[J]. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2008, 79(3-5): 101-108.
- [25] Brash A R. Arachidonic acid as a bioactive molecule[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2001, 107(11): 1339-1345.
- [26] 周之伟, 王文娟, 白文佩. 花生四烯酸及其代谢产物与围绝经期的关系[J]. *国际妇产科学杂志*, 2015, 42(2): 177-179, 186.
- Zhou Z W, Wang W J, Bai W P. Arachidonic acid and its metabolites with perimenopause[J]. *Journal of International Obstetrics and Gynecology*, 2015, 42(2): 177-179, 186 (in Chinese).
- [27] 房龙, 赵洪川. 前列腺素E₁对肝脏的保护作用[J]. *中日友好医院学报*, 2004, 18(4): 245-247.
- Fang L, Zhao H C. Protective effect of prostaglandin E₁ on the liver[J]. *Journal of China-Japan Friendship Hospital*, 2004, 18(4): 245-247 (in Chinese).
- [28] 谢奉军. 大黄鱼仔稚鱼氨基酸及脂肪酸营养生理的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- Xie F J. Studies on nutritional physiology of amino acid and fatty acid for large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) larvae[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011 (in Chinese).
- [29] 王成强, 王际英, 黄炳山, 等. 饲料花生四烯酸水平对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长性能、抗氧化能力、血清生化指标以及肝脏和肌肉脂肪酸组成的影响[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(9): 3567-3580.
- Wang C Q, Wang J Y, Huang B S, *et al.* Effects of dietary arachidonic acid level on growth performance, antioxidant ability, serum biochemical parameters and fatty acid composition in liver and muscle of Juvenile Hybrid Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(9): 3567-3580 (in Chinese).
- [30] 马会芳. 基于质谱技术的甘油磷脂和甘油三酯高效分析方法及其应用研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- Ma H F. High performance analysis of phospholipids and triglycerides based on Mass Spectrometry and its application[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018 (in Chinese).
- [31] 李贞. 卵磷脂的生物学功能及其应用[J]. *畜牧与饲料科学*, 2016, 37(2): 94-95.
- Li Z. Research progress on biological function and application of lecithin[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2016, 37(2): 94-95 (in Chinese).
- [32] 孙九丽, 林慧珍, 苟萍. 鞘脂代谢及其相关疾病研究进展[J]. *生物技术*, 2011, 21(5): 93-97.
- Sun J L, Lin H Z, Gou P. Research progress of sphingolipid metabolism and related diseases[J]. *Biotechnology*, 2011, 21(5): 93-97 (in Chinese).
- [33] 胡梦红, 王有基. 新型水产饲料添加剂-左旋肉碱(L-Carnitine)[J]. *现代渔业信息*, 2006, 21(6): 18-20.
- Hu M H, Wang Y J. The prospect of L-Carnitine as a additive in fish diets[J]. *Modern Fisheries Information*, 2006, 21(6): 18-20 (in Chinese).

- [34] 向泉, 唐龙碧. L-肉碱在水产动物营养中的作用[J]. 中国饲料, 1999(18): 18-19.
Xiang X, Tang L B. The role of L-carnitine in aquatic animal nutrition[J]. China Feed, 1999(18): 18-19 (in Chinese).
- [35] 李春华. 低蛋氨酸日粮添加 L-肉碱对肉仔鸡生产性能、脂肪代谢、蛋白质代谢的影响 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
Li C H. Effects of L-Carnitine Supplementation in low methionine diets on growth performance, carcass composition, protein and lipid metabolism in Broilers[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012 (in Chinese).
- [36] 张东鸣, 黄权, 周景祥, 等. 不同饲料蛋白质水平条件下 L-肉碱对鲤鱼生长和肌肉营养成分的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2002, 24(1): 82-87.
Zhang D M, Huang Q, Zhou J X, et al. Effect of L-carnitine on growth performance and muscle composition of *Cyprinus carpio* L. Fed diets with different levels of protein[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2002, 24(1): 82-87 (in Chinese).
- [37] 王立新, 周继术, 王涛, 等. L-肉碱对鲫鱼生长和肌肉营养成分的影响[J]. 淡水渔业, 2005, 35(5): 19-21.
Wang L X, Zhou J S, Wang T, et al. Effects of dietary L-carnitine on growth and muscle composition of Crucian carp[J]. Freshwater Fisheries, 2005, 35(5): 19-21 (in Chinese).
- [38] 黄骥, 王建飞, 张红生. 植物戊糖磷酸途径及其两个关键酶的研究进展[J]. 植物学通报, 2004, 21(2): 139-145.
Huang J, Wang J F, Zhang H S. Advances on plant pentose phosphate pathway and its key enzymes[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2004, 21(2): 139-145 (in Chinese).
- [39] French C J, Hochachka P W, Mommsen T P. Metabolic organization of liver during spawning migration of sockeye salmon[J]. American Journal of Physiology, 1983, 245(6): R827-R830.
- [40] 孙春红, 邹峥嵘. 植物来源的生物碱类乙酰胆碱酯酶抑制剂研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(21): 3172-3184.
Sun C H, Zou Z R. Research progress on plant-derived acetylcholinesterase inhibitory alkaloids[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(21): 3172-3184 (in Chinese).

Transcriptional regulation of hepatopancreas metabolism in *Litopenaeus vannamei* fed with supplemental crystalline lysine which fermented soybean meal partially replacing fish meal in the feed

GUO Xu^{1,2,3}, CHEN Chen^{1,2,3,#}, DAI Xilin^{1,2,3}, WANG Wenyan⁴, GAO Feifei⁴, HUA Xueming^{1,2,3*}

(1. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition (CREEFN), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. Fengxian Fisheries Technology Promotion Station in Shanghai, Shanghai 201499, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the regulation mechanism of dietary lysine (Lys) content in *Litopenaeus vannamei* after partially replacing fish meal with fermented soybean meal, where 0%, 0.25%, 0.50%, 0.75% and 1.00% of crystalline lysine was added to the basic feed (recorded as Lys0, Lys25, Lys50, Lys75 and Lys100). *Litopenaeus vannamei* with an initial body weight of (2.0±0.1) g were selected for a 56-day feeding trial in an indoor cement pond fed with above 5 isonitrogenous and iso-lipidic experimental diets respectively, and those in Lys0 and Lys75 groups under went metabolomics and transcriptomic analysis based on significantly different growth performance, crude protein and lipid content in muscle, hepatopancreas health as well ($P<0.05$). The results showed that compared to Lys0 group, a total of 28 different metabolites were detected in Lys75 group, among which 2 metabolites were down-regulated and 26 metabolites were up-regulated; Signal pathway analysis was performed on 7 different metabolites annotated to the KEGG database, and 4 important metabolic pathways were screened out, namely glycine, serine and threonine metabolism, arachidonic acid metabolism, Sphingolipid metabolism, glycerophospholipid metabolism. In the Lys75 group, choline was significantly down-regulated in the hepatopancreas ($P<0.05$), the expression of γ -butyl betaine plus dioxygenase genes was significantly up-regulated ($P<0.05$), and the expressions of hexokinase genes and acetylcholinesterase genes were significantly down-regulated ($P<0.05$). The results indicated the increase of dietary lysine level due to crystal lysine addition helped the β -oxidation of fatty acids in the hepatopancreas, playing a role in protein saving and protecting the health of the hepatopancreas as well, thus promoted the growth of the shrimp.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; fermented soybean meal; crystal lysine; transcription; metabolism

Corresponding author: HUA Xueming. E-mail: xmhua@shou.edu.cn

Funding projects: Shanghai Science and Technology Agriculture Development Project [2019 (3-5)]; Key Research and Development Project of Guangdong Province (2020B0202010001)