



基于代谢组解析大黄鱼对低温和饥饿胁迫的适应机制

曾霖¹, 宋炜^{2,3*}, 谢正丽⁴, 王永红¹, 熊逸飞², 张惠³

(1. 蚌埠学院食品与生物工程学院, 安徽蚌埠 233030;

2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090;

3. 浙江海洋大学, 国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江舟山 316000;

4. 中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所, 上海 200090)

摘要: 为探讨大黄鱼对低温和饥饿氧化损伤的响应机制, 实验将体重为 (21.38±2.46) g 的大黄鱼在低温 (8 °C) 或/和禁食条件下饲养。实验组可分为 4 个处理组: 对照组 (C 组)、低温组 (CC 组)、饥饿组 (F 组) 和饥饿+低温组 (CF 组), 每组 3 个平行。低温和饥饿胁迫 30 d 后, 计算成活率; 采取肝脏样本, 进行组织学观察, 并利用化学荧光法和 LC-MS 非靶向代谢组学技术分析处理组间活性氧 (ROS) 和代谢产物的差异。结果显示, 与 C 组相比, CC 组、F 组和 CF 组的成活率显著降低, 而 ROS 含量显著升高, 且肝细胞均出现不同程度的空泡和核萎缩现象, 表明低温和饥饿胁迫对大黄鱼产生了氧化损伤。大黄鱼低温应激后, 从 CC vs. C 和 CF vs. F 组中分别筛选出 84 种和 154 种差异代谢物, 有 5 种重要的重叠代谢途径: 甘油磷脂代谢、糖基磷脂酰肌醇 (GPI)-锚生物合成和自噬等, 表明细胞膜流动性和自噬在大黄鱼低温适应过程中发挥重要作用。大黄鱼饥饿应激后, 从 F vs. C 和 CF vs. CC 组中分别筛选出 184 种和 50 种差异代谢物, 有 4 种重要的重叠代谢途径: 甘油磷脂代谢、糖基磷脂酰肌醇 (GPI)-锚生物合成、ABC 运输体和自噬等, 表明能量代谢和自噬在大黄鱼饥饿过程中发挥重要作用。从 CF vs. C 组中筛选出差异代谢物 126 种, 主要富集在糖基磷脂酰肌醇 (GPI)-锚生物合成、甘油磷脂代谢、氧化磷酸化、淀粉和蔗糖代谢、FoxO 信号通路、自噬和谷胱甘肽代谢等, 表明细胞膜流动性、能量代谢、自噬和抗氧化系统在大黄鱼适应低温和饥饿联合胁迫过程中发挥重要作用。本研究结果为深入研究低温及其诱导的饥饿对大黄鱼生理功能的影响提供科学依据。

关键词: 大黄鱼; 低温; 饥饿; 代谢组学; 液相色谱-质谱联用仪

中图分类号: O 657; S 965.322

文献标志码: A

由于人类活动对自然环境的破坏, 寒潮和寒流等极端事件频发, 导致极其严重的低温冷冻灾害^[1]。鱼类的行为和生理功能易受温度变化的影响。水温降低导致鱼类摄食量减少, 甚至停止摄食, 并伴随着机体氧化损伤、免疫力低下, 抗病

力弱等症^[2-3]。当水温低于鱼类的耐受能力时, 将导致其死亡^[4]。低温及其诱导的饥饿胁迫是越冬鱼类大量死亡的主要驱动因素。降低越冬鱼类的死亡率已成为水产养殖业的研究热点^[5]。然而, 有关越冬导致鱼类死亡的生理机制研究较少。

收稿日期: 2022-10-28 修回日期: 2023-02-28

资助项目: 国家重点研发计划 (2022YFD2401102, 2019YFD0900904); 青岛海洋科学与技术试点国家实验室山东省专项经费 (2022QNLM30001); 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-47); 中国水产科学研究院基
本科研业务费专项 (2020TD76)

第一作者: 曾霖, 从事养殖生理生态学研究, E-mail: zenglin615@126.com

通信作者: 宋炜 (照片), 从事水产养殖研究, E-mail: songw@ecsf.ac.cn



鱼类通过一系列的适应机制来应对低温胁迫, 如维持细胞能量平衡, 调节细胞膜的流动性, 激活抗氧化系统来抑制活性氧 (reactive oxygen, ROS) 的过量产生^[6]。此外, 生活在极低温环境中的鱼类已经进化出特有的功能蛋白, 如抗冻蛋白、抗冻糖蛋白和分子伴侣如热休克蛋白等^[7-8]。温度能显著影响维持生命活动的新陈代谢。新陈代谢是机体通过物质和能量进行相互作用来适应环境变化的过程^[9]。代谢组学可以高效地定量分析机体内的代谢物, 为环境变化对鱼类代谢物的影响研究提供了良好契机^[10]。目前, 利用代谢组学研究鱼类低温适应机制已有少量报道, 如长期低温胁迫对黄棕盘丽鱼 (*Symphysodon aequifasciatus*) 的能量代谢、蛋氨酸循环、渗透压调节、膜的流动性和抗氧化系统的影响具有组织特异性^[11]。免疫、生长和抗氧化系统在暗纹东方鲀 (*Takifugu fasciatus*) 低温适应过程中发挥重要作用^[12]。低温应激对舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 的氨基酸和能量代谢产生了显著影响^[13]。这些研究表明, 低温对鱼类生理的影响具有物种特异性。

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 是我国最重要的经济鱼类之一, 已在福建、浙江和广东等地进行了大规模养殖, 2019 年全国养殖产量已达 22.55 万 t^[14]。大黄鱼对胁迫 (包括低温和饥饿) 非常敏感。水温为 10 °C 时, 大黄鱼游动迟缓、摄食量减少甚至禁食; 水温降至 8 °C 时, 大黄鱼出现死亡, 其最低耐受温度约为 5 °C^[15-16]。大黄鱼在越冬期间因受到低温和饥饿胁迫出现大规模死亡 (尤其是东海海域), 给养殖户带来巨大的经济损失^[17]。目前, 关于寒冷和饥饿胁迫对大黄鱼代谢的影响研究未见报道。肝脏是鱼类重要的代谢器官, 在环境适应过程中发挥重要作用^[18]。本研究利用非靶向液相色谱-质谱联用仪 (LC-MS) 检测低温和饥饿胁迫下大黄鱼肝脏的代谢物, 可为鱼类对低温和饥饿胁迫的响应机制研究提供理论依据, 同时为改善鱼类越冬成活率的策略制定提供科学指导。

1 材料与方法

1.1 样本采集

实验大黄鱼 [体重 (21.38±2.46) g] 来自中国水产科学研究院东海水产研究所福建福鼎研究中心。将鱼放入 12 个容积为 600 L 的钢化玻璃桶中暂养 2 周, 30 尾/桶。暂养期间, 每天采用过饱和方式投喂商业饲料 2 次 (08:00 和 16:00)。水质参数:

水温 (20±0.42) °C、盐度 24.78±0.37、pH 值 7.29±0.34、溶解氧 (7.31±0.42) mg/L、总氨氮为 (0.14±0.02)~(0.19±0.03)mg/L。暂养结束后, 将实验鱼分为投喂组和饥饿组, 6 桶/组。然后从每个处理组中随机取 3 桶, 将水温维持在 20 °C; 另外 3 桶以 1.5 °C/d 的速率将水温从 20 降至 8 °C (投喂组的水温降至 9.5 °C 时, 大黄鱼停止摄食)。20 和 8 °C 养殖用水分别由 2 套独立的循环水系统提供。实验鱼共分为对照组 (C 组)、低温组 (CC 组)、饥饿组 (F 组) 和低温+饥饿组 (CF 组), 每个处理组 3 个平行。暴露实验 30 d 后, 每桶随机取 4 尾鱼的肝脏用于活性氧 ROS 测量, 1 尾鱼的肝脏用于组织切片, 另取 1 尾鱼的肝脏用于 LC-MS 分析。本研究中, 实验动物的养殖和样本采集等方案均遵循蚌埠学院和中国水产科学研究院东海水产研究所实验动物伦理和实验动物使用指南。

1.2 ROS 测量和组织切片观察

按照 Zeng 等^[19] 的方法获取肝脏匀浆液, 然后使用南京建成生物工程研究所试剂盒 (E004-1-1), 按照说明书采用化学荧光法测量 ROS 含量。按照 Zeng 等^[19] 的方法, 经过乙醇梯度脱水、包埋、切片和苏木精-伊红 (H.E) 染色等步骤制作组织切片, 在光学显微镜下随机观察 6 个视野, 统计 H.E 中肝脏空泡的相对面积 (%)。

1.3 LC-MS 样品制备和分析

按照 Zhang 等^[20] 的方法进行代谢物的样本制备。将 50 mg 肝脏样品放入含有液氮的研钵中速冻, 加入 400 μL 含标准溶液 (L-2-氯苯丙氨酸, 0.02 mg/mL) 的萃取溶剂 (甲醇: 水的体积比为 4:1) 中研磨; 超声萃取 30 min。再将萃取液放入 2.0 mL Eppendorf 管中, 以 13 000 r/min 4 °C 离心 15 min, 提取上清液。将上清液通过微滤器 (0.22 μm) 过滤到 LC 小瓶中。密封保存于超低温冰箱直到 LC-MS 分析。从各个样品中取 20 μL 样本混合均匀, 制备质控 (quality control, QC) 样本; 另取部分样品通过 UHPLC-Q Exactive HF-X 系统 (赛默飞, 美国) 进行分析。

将 2 μL 的代谢物样本注入 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm; Waters, 美国); 通过流动相 A [水: 乙腈 (含 0.1% 甲酸), 体积比 95:5] 和流动相 B [乙腈: 异丙醇: 水 (含 0.1% 甲酸), 体积比 47.5:47.5:5.0] 进行二元梯度洗脱; 最后采用正、负离子扫描模式进行质谱

检测。质谱参数: 质谱扫描范围为 70~1 050 m/z, 加热温度 425 °C, 毛细管温度 325 °C, 喷雾电压 \pm 3 500 V, 碰撞能 20、40 和 60 eV。在整个分析过程中, 每隔 6 个样本插入 1 个 QC 样本, 以评估可重复性。

1.4 代谢产物鉴定

采用 progenesis QI (waters corporation, milford, 美国) 软件对原始数据进行预处理, 获得包含质量电荷比 (m/z)、保留时间 (retention time, RT)、峰强度等信息的数据矩阵, 并对峰值进行标注, 随后通过公共数据库 (<https://www.hmdb.ca/>, <https://www.lipidmaps.org/>) 对代谢物进行鉴定。

1.5 数据分析

采用 SIMCA 软件对归一化数据进行主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA)。以 OPLS-DA 中的变量投影重要性 VIP>1, 代谢物的差异倍数 FC>1.5, 以及 *t* 检验 (SPSS 22.0 软件) 中 $P<0.05$ 为标准, 筛选差异代谢物。差异代谢物通过 KEGG (<https://www.kegg.jp/>) 数据库进行比对、注释和代谢通路富集。

2 结果

2.1 成活率和 ROS 含量

CC 组的成活率显著低于 C 组, CF 组的成活率显著高于 CC 组 ($P<0.05$)。CC 和 F 组的 ROS 含量显著高于 C 组, CC 和 F 组间的 ROS 含量无显

著差异。CF 组的 ROS 含量显著高于 C 组, 但低于 CC 和 F 组 (图 1)。

2.2 组织切片

C 组的肝细胞正常, CC、F 和 CF 组均出现不同程度的空泡和核萎缩现象 (图 2)。CC、F 和 CF 组的空泡率显著高于 C 组 (图 3)。

2.3 代谢物的总体变化

LC-MS 共提取了 13 440 个代谢物峰分析。为了研究大黄鱼越冬期间低温和 (或) 饥饿对其代谢物的影响, 本研究将实验组分为 5 个比较组: CC vs. C (低温应激)、CF vs. F (饥饿条件下的低温应激)、F vs. C (饥饿应激)、CF vs. CC (低温条件下的饥饿应激) 和 CF vs. C (低温和饥饿联合应激)。然后将 5 个比较组进一步分为 3 组, 即 CC vs. C 与 CF vs. F 进行比较 (摄食或饥饿条件下的低温应激)、F vs. C 和 CF vs. CC (常温或低温条件下的饥饿应激) 以及 CF vs. C (低温和饥饿联合应激)。基于正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 可知, $R^2Y \geq 0.99$, 且 $Q^2 > 0.789$ (表 1), 表明模型稳定性较好, 可用于后续分析。

2.4 差异代谢物筛选

基于 OPLS-DA 模型实验结果, CC vs. C 中筛选出差异代谢物 84 种, 其中上调和下调代谢物分别为 58 和 26 种; CF vs. F 中筛选出差异代谢物 154 种, 其中上调和下调代谢物分别为 84 和 70 种; CC vs. C 与 CF vs. F 有 23 种共同的差异代

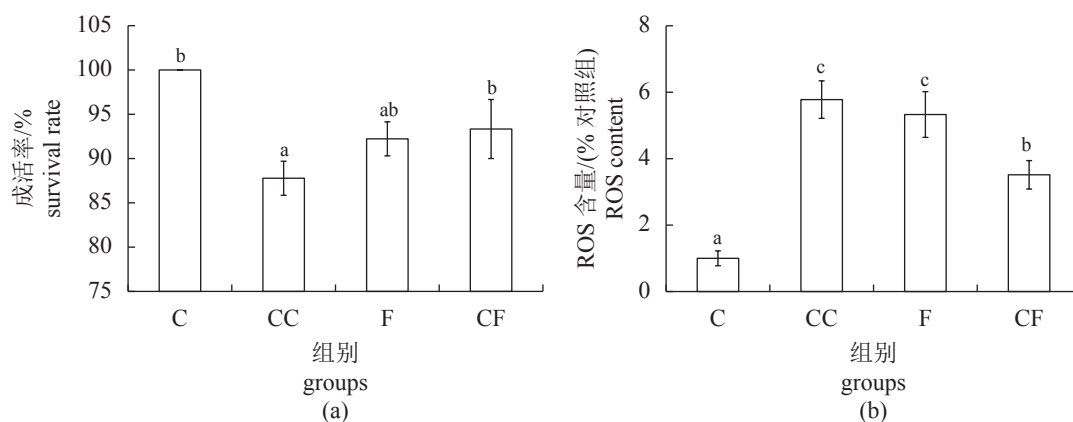


图 1 低温和饥饿对大黄鱼成活率 (a) 和肝脏 ROS 含量 (b) 的影响

C.对照组, CC.低温组, F.饥饿组, CF.低温+饥饿组。不同字母表示存在显著差异 ($P<0.05$), 下同。

Fig. 1 Effects of low temperature and starvation on survival rate (a) and ROS content (b) in the liver of *L. crocea*

C. control group, CC. low temperature group, F. starvation group, CF. low temperature+starvation group. Different letters denote significant differences ($P<0.05$), the same below.

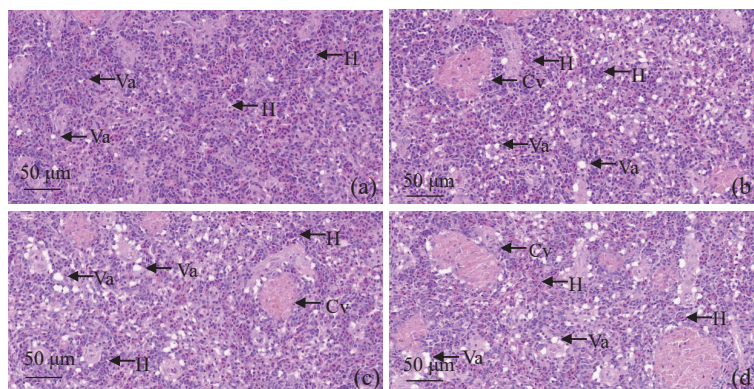


图 2 低温和饥饿对大黄鱼肝脏组织学的影响

(a) C 组, 正常肝细胞; (b) CC 组, 中度空泡和核萎缩出现; (c) F 组, 中度空泡和核萎缩出现; (d) CF 组, 中度空泡和核萎缩出现。Va.空泡, H.肝细胞, Cv.中央脉。

Fig. 2 Effects of low temperature and starvation on liver histology in *L. crocea*

(a) C group, normal hepatocytes; (b) CC group, mild vacuoles and nuclear atrophy were appeared; (c) F group, mild vacuoles and nuclear atrophy were appeared; (d) CF group, mild vacuoles and nuclear atrophy were appeared. Va. vacuoles, H. hepatocytes, Cv. central vein.

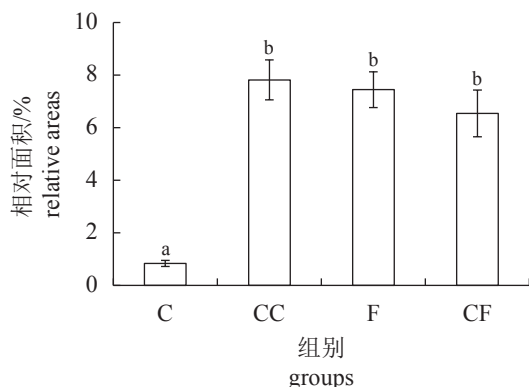


图 3 低温和饥饿胁迫下的大黄鱼肝脏组织空泡相对面积

Fig. 3 Relative areas of hepatic vacuoles in *L. crocea* under low temperature and starvation stresses

表 1 OPLS-DA 模型的评价参数

Tab. 1 Evaluation parameters of OPLS-DA model

主成份得分 score of PCA	组别 groups				
	CC vs. C	CF vs. F	F vs. C	CF vs. CC	CF vs. C
R ² X	0.814	0.691	0.744	0.807	0.644
R ² Y	0.998	0.995	0.991	0.997	0.999
Q ²	0.911	0.835	0.917	0.848	0.789

谢产物 (表 2, 图 4)。

F vs. C 中筛选出差异代谢物 184 种, 其中上调和下调代谢物分别为 153 种和 31 种; CF vs. CC 中筛选出差异代谢物 50 种, 其中上调和下调代谢物分别为 28 种和 22 种; CC vs. C 与 CF vs. F 有 6 种共同的差异代谢产物 (表 2, 图 4)。

CF vs. C 中筛选出差异代谢物 126 种, 其中

表 2 差异代谢物统计分析

Tab. 2 Statistics of differential metabolites

分组比较 group comparison	差异代谢物数量 number of differential metabolites	上调代谢物数量 number of up-regulated metabolites	下调代谢物数量 number of down-regulated metabolites
CC vs. C	84	58	26
CF vs. F	154	84	70
F vs. C	184	153	31
CF vs. CC	50	28	22
CF vs. C	126	98	28

上调和下调代谢物分别为 98 种和 28 种 (表 2)。

2.5 差异代谢产物分类

基于人类代谢组数据库 (The Human Metabolome Database, HMDB), 对各比较组的差异代谢物进行分类, CC vs. C 中的差异代谢物主要集中于羧酸及其衍生物 (26.47%)、脂肪酰基 (16.18%)、甘油磷脂 (14.71%)、有机氮化合物 (5.88%)、有机氧化合物 (5.88%) 和吡啶及其衍生物 (4.41%) 等。CF vs. F 中的差异代谢物主要集中于甘油磷脂 (30.25%)、羧酸及其衍生物 (19.33%)、有机氧化合物 (9.24%)、脂肪酰基 (8.40%) 和嘌呤核苷酸 (4.20%) 等。F vs. C 中的差异代谢物主要集中于羧酸及其衍生物 (30.30%)、甘油磷脂 (12.12%)、脂肪酰基 (9.09%)、有机氧化合物 (9.09%) 和苯及取代衍生物 (5.30%) 等。CF vs. CC 中的差异代谢物主要集中于有机氧化合物 (28.95%)、羧酸及其衍生物 (15.79%)、甘油磷脂 (10.53%) 和有机氮化合物

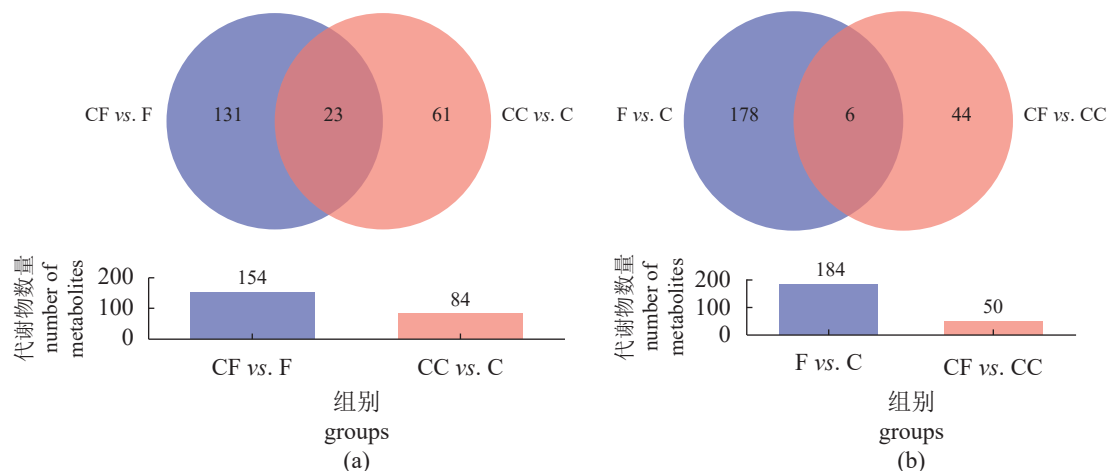


图 4 各组差异代谢物韦恩图

Fig. 4 Venn diagram of differential metabolites in groups

(7.89%) 等。CF vs. C 中的差异代谢物主要集中于羧酸及其衍生物 (28.41%)、脂肪酰 (18.18%)、有机氧化合物 (9.09%) 和嘧啶核苷酸 (5.68%) 等 (图 5)。

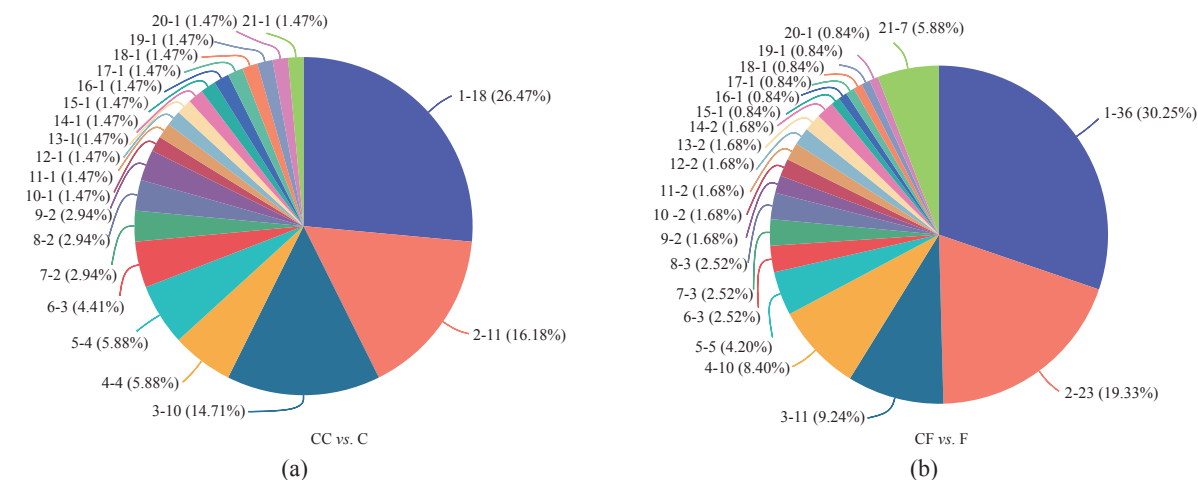
2.6 KEGG 富集通路分析

对所有差异代谢物 KEGG 功能注释与富集, CC vs. C 中的差异代谢物主要集中于甘油磷脂代谢: M (M 代表代谢, 下同), 糖基磷脂酰肌醇 (GPI)-锚生物合成: M, 赖氨酸降解: M, 精氨酸生物合成: M, 鞘脂代谢: M, 自噬-其他: CP (CP 代表细胞过程, 下同), 淀粉和蔗糖代谢: M 等 (图 6-a)。

CF vs. F 中的差异代谢物主要集中于 FoxO 信号通路: EIP (EIP 代表环境信息处理, 下同), 甘油磷脂代谢: M, ABC 运输体: EIP, 谷胱甘肽代谢: M, 辅因子的生物合成: M, 嘌呤代谢: M,

GPI-锚生物合成: M, 牛磺酸和次黄嘌呤代谢: M, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢: M, 神经活性配体受体相互作用: EIP, 乙醚脂质代谢: M, 鞘脂代谢: M, 铁下垂: CP, β -丙氨酸代谢: M, 缝隙连接: CP, 精氨酸和脯氨酸代谢: M, 精氨酸生物合成: M, 乙醛酸和二羧酸代谢: M 和自噬-其他: CP 等 (图 6-b)。

F vs. C 中的差异代谢物主要集中于谷胱甘肽代谢: M, 辅因子的生物合成: M, GPI-锚生物合成: M, 氧化磷酸化: M, 精氨酸和脯氨酸代谢: M, 精氨酸生物合成: M, 赖氨酸降解: M, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢: M, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢: M, 甘油磷脂代谢: M, 铁下垂: CP, 苯丙氨酸代谢: M, 淀粉和蔗糖代谢: M, ATP 结合盒 (ATP-binding cassette, ABC) 运输体: EIP, 自噬-其他: CP 等 (图 6-c)。



(图 5 Fig. 5)

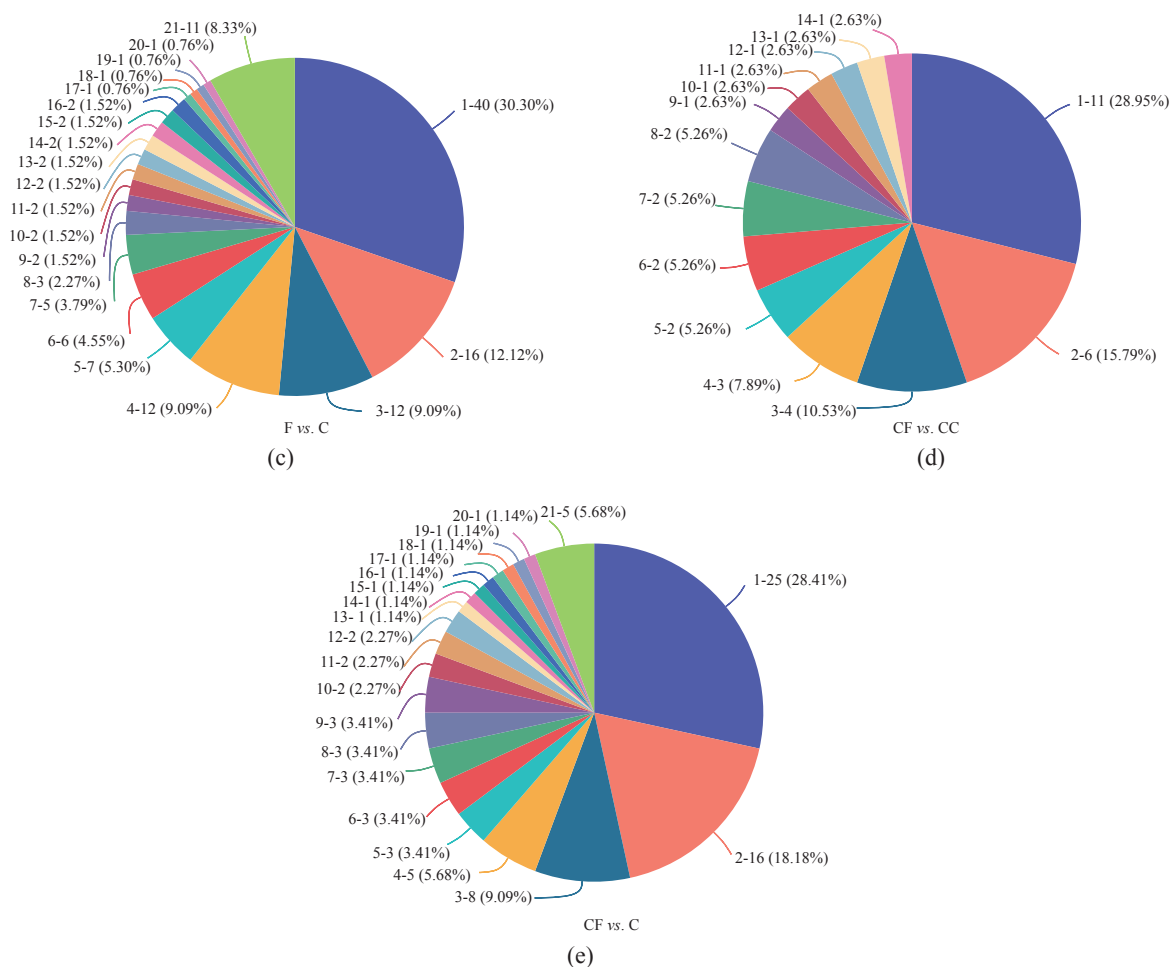


图5 代谢组差异代谢产物的HMDB分析

图中的数字含义为序号-数量(百分比)。如1-25(28.41%)代表序号1中含有25种代谢物,占总代谢物的28.41%。(a)1.羧酸和衍生物,2.脂肪酰,3.甘油磷脂,4.有机氮化合物,5.有机氧化合物,6.吡啶和衍生物,7.苯和取代衍生物,8.嘌呤核苷,9.嘧啶核苷酸,10.噁唑,11.肉桂酸和衍生物,12.二噻,13.二氢咪唑,14.黄酮,15.酮酸和衍生物,16.核苷和核苷酸类似物,17.有机磷和衍生物,18.异丙酚脂类,19.蕨类植物和衍生物,20.类固醇和类固醇衍生物,21.其他。(b)1.甘油磷脂,2.羧酸及其衍生物,3.有机氧化合物,4.脂肪酰基,5.嘌呤核苷酸,6.有机氮化合物,7.丙二醇脂类,8.嘧啶核苷,9.苯及其取代衍生物,10.吡啶及其衍生物,11.有机磺酸及其衍生物,12.苯丙酸,13.吡啶及其衍生物,14.甾体及甾体衍生物,15.噁唑类,16.肉桂酸及其衍生物,17.甘油脂,18.咪唑啉,19.内酯,20.有机磷及其衍生物,21.其他。(c)1.羧酸及其衍生物,2.甘油磷脂,3.脂肪酰基,4.有机氧化合物,5.苯及其取代衍生物,6.异丙酚脂类,7.有机氮化合物,8.酚类,9.(3'→5'')-二核苷酸及其类似物;10.肉桂酸及其衍生物,11.吡啶及其衍生物,12.嘌呤及其衍生物,13.嘌呤核苷酸,14.嘧啶核苷,15.嘧啶核苷酸,16.类固醇及其衍生物,17.(5'→5'')-二核苷酸,18.氮卓类,19.苯并吡啶,20.二氢咪唑,21.其他。(d)1.有机氧化合物,2.羧酸及其衍生物,3.甘油磷脂,4.有机氮化合物,5.吡啶及其衍生物,6.异丙酚脂类,7.嘧啶核苷酸,8.类固醇及其衍生物,9.苯并吡啶,10.二芳基庚烷,11.脂肪酰,12.有机磺酸及其衍生物,13.嘌呤及其衍生物,14.嘌呤核苷,15.嘧啶核苷酸,16.二芳基庚烷,17.二噻,18.二氢咪唑,19.黄酮,20.咪唑并嘧啶,21.其他。

Fig. 5 HMDB analysis of differential metabolites in the metabolome

The numbers in the figure represent the serial number - quantity (percentage). For example, 1-25 (28.41%) represents that number 1 contains 25 metabolites, accounting for 28.41% of the total metabolism. (a) 1. carboxylic acids and derivatives, 2. fatty acyls, 3. glycerophospholipids, 4. organonitrogen compounds, 5. organooxygen compounds, 6. indoles and derivatives, 7. benzene and substituted derivatives, 8. purine nucleosides, 9. pyrimidine nucleotides, 10. azolidines, 11. cinnamic acids and derivatives, 12. diazines, 13. dihydrofurans, 14. flavonoids, 15. keto acids and derivatives, 16. nucleoside and nucleotide analogues, 17. organic phosphoric acids and derivatives, 18. prenol lipids, 19. pteridines and derivatives, 20. steroids and steroid derivatives, 21. others. (b) 1. glycerophospholipids, 2. carboxylic acids and derivatives, 3. organooxygen compounds, 4. fatty acyls, 5. purine nucleotides, 6. organonitrogen compounds, 7. prenol lipids, 8. pyrimidine nucleosides, 9. benzene and substituted derivatives, 10. indoles and derivatives, 11. organic sulfonic acids and derivatives, 12. phenylpropanoic acids, 13. pyridines and derivatives, 14. steroids and steroid derivatives, 15. azolidines, 16. cinnamic acids and derivatives, 17. glycerolipids, 18. imidazopyrimidines, 19. lactones, 20. organic phosphoric acids and derivatives, 21. others. (c) 1. carboxylic acids and derivatives, 2. glycerophospholipids, 3. fatty acyls, 4. organooxygen compounds, 5. benzene and substituted derivatives, 6. prenol lipids, 7. organonitrogen compounds, 8. phenols, 9. (3'→5'')-dinucleotides and analogues, 10. cinnamic acids and derivatives, 11. indoles and derivatives, 12. pteridines and derivatives, 13. purine nucleotides, 14. pyrimidine nucleosides, 15. pyrimidine nucleotides, 16. steroids and steroid derivatives, 17. (5'→5'')-dinucleotides, 18. azepines, 19. benzopyrans, 20. dihydrofurans, 21. others. (d) 1. organooxygen compounds, 2. carboxylic acids and derivatives, 3. glycerophospholipids, 4. organonitrogen compounds, 5. indoles and derivatives, 6. prenol lipids, 7. pyrimidine nucleotides, 8. steroids and steroid derivatives, 9. benzopyrans, 10. diarylheptanoids, 11. fatty acyls, 12. organic sulfonic acids and derivatives, 13. pteridines and derivatives, 14. purine nucleosides, 15. pyrimidine nucleotides, 16. diarylheptanoids, 17. diazines, 18. dihydrofurans, 19. flavonoids, 20. imidazopyrimidines, 21. others.

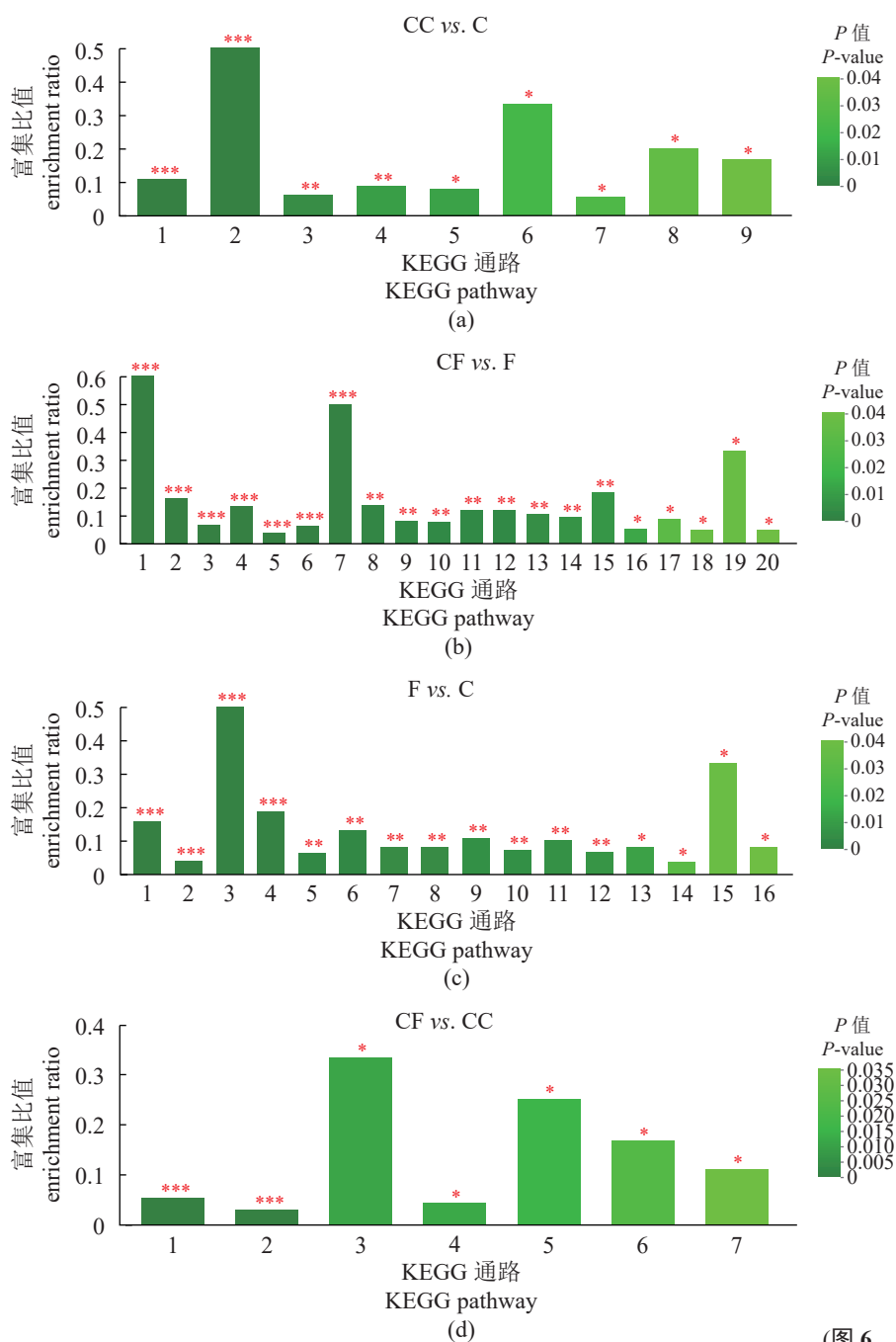
CF vs. CC 中的差异代谢物主要集中于甘油磷脂代谢: M, ABC 运输体: EIP, 自噬-其他: CP, 初级胆汁酸生物合成: M, GPI-锚生物合成: M, 自噬-动物: CP 等 (图 6-d)。

CF vs. C 中的差异代谢物主要集中于嘌呤代谢: M, GPI-锚生物合成: M, 精氨酸生物合成: M, 甘油磷脂代谢: M, 氧化磷酸化: M, 赖氨酸降解: M, 鞘脂代谢: M, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢: M, 自噬-其他: CP, 溶酶体: CP,

淀粉和蔗糖代谢: M, FoxO 信号通路: EIP, 谷胱甘肽代谢: M 等 (图 6-e)。

3 讨论

大黄鱼在越冬期间死亡现象频发, 主要原因是低温及其诱导的饥饿导致鱼类的生理功能发生了变化^[21]。为了深入探究这些致死因子的作用机制, 实验先研究低温和饥饿对大黄鱼的氧化损伤, 然后采用非靶向 LC-MS 技术获取差异代谢产物来



(图 6 Fig. 6)

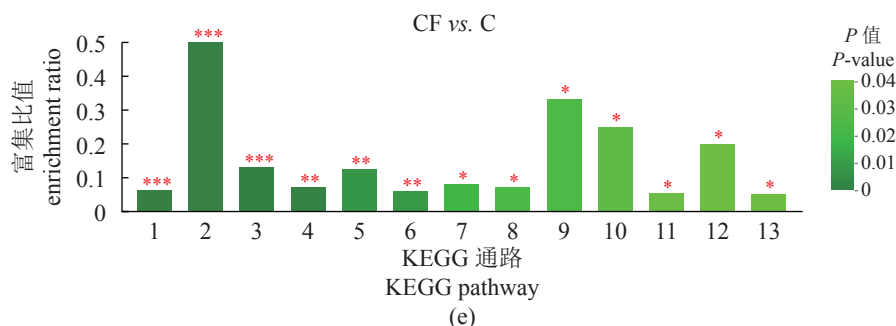


图 6 差异代谢产物的 KEGG 通路

(a) 1. 甘油磷脂代谢: M, 2. 糖基磷脂酰肌醇 (GPI)-锚生物合成: M, 3. 赖氨酸降解: M, 4. 精氨酸生物合成: M, 5. 鞘脂代谢: M, 6. 自噬-其他: CP, 7. 淀粉和蔗糖代谢: M, 8. 肌动蛋白细胞骨架的调节: CP, 9. 自噬-动物: CP. (b) 1. Foxo 信号通路: EIP, 2. 甘油磷脂代谢: M, 3. ABC 转运体: EIP, 4. 谷胱甘肽代谢: M, 5. 辅因子生物合成: M, 6. 嘌呤代谢: M, 7. 糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚生物合成: M, 8. 牛磺酸和牛磺酰胺代谢: M, 9. 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢: M, 10. 神经活性配体-受体相互作用: EIP, 11. 醚脂代谢: M, 12. 鞘脂代谢: M, 13. 铁蛋白代谢: CP, 14. β -丙氨酸代谢: M, 15. 缝隙连接: CP, 16. 精氨酸和脯氨酸代谢: M, 17. 精氨酸生物合成: M, 18. 乙醛酸和二羧酸代谢: M, 19. 自噬-其他: CP, 20. 半胱氨酸和蛋氨酸代谢: M. (c) 1. 谷胱甘肽代谢: M, 2. 辅因子生物合成: M, 3. 糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚生物合成: M, 4. 氧化磷酸化: M, 5. 精氨酸和脯氨酸代谢: M, 6. 精氨酸生物合成: M, 7. 赖氨酸降解: M, 8. 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢: M, 9. 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢: M, 10. 甘油磷脂代谢: M, 11. 铁下垂: CP, 12. 苯丙氨酸代谢: M, 13. 淀粉和蔗糖代谢: M, 14. ABC 转运体: EIP, 15. 自噬-其他: CP, 16. 鞘脂代谢: M. (d) 1. 甘油磷脂代谢: M, 2. ABC 转运体: EIP, 3. 自噬-其他: CP, 4. 初级胆汁酸生物合成: M, 5. 糖基磷脂酰肌醇 (GPI)-锚定生物合成: M, 6. 自噬-动物: CP, 7. 叶酸-碳库: M. (e) 1. 嘌呤代谢: M, 2. 糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚生物合成: M, 3. 精氨酸生物合成: M, 4. 甘油磷脂代谢: M, 5. 氧化磷酸化: M, 6. 赖氨酸降解: M, 7. 鞘脂代谢: M, 8. 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢: M, 9. 自噬-其他: CP, 10. 溶酶体: CP, 11. 淀粉和蔗糖代谢: M, 12. Foxo 信号通路: EIP, 13. 谷胱甘肽代谢: M. M. 代谢物, CP. 细胞过程, EIP. 环境信息处理. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Fig. 6 KEGG enriched pathway of differential metabolite

(a) 1. glycerophospholipid metabolism: M, 2. glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis: M, 3. lysine degradation: M, 4. arginine biosynthesis: M, 5. sphingolipid metabolism: M, 6. autophagy-other: CP, 7. starch and sucrose metabolism: M, 8. regulation of actin cytoskeleton: CP, 9. autophagy-animal: CP. (b) 1. FoxO signaling pathway: EIP, 2. glycerophospholipid metabolism: M, 3. ABC transporters: EIP, 4. glutathione metabolism: M, 5. biosynthesis of cofactors: M, 6. purine metabolism: M, 7. glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis: M, 8. taurine and hypotaurine metabolism: M, 9. glycine, serine and threonine metabolism: M, 10. neuroactive ligand-receptor interaction: EIP, 11. ether lipid metabolism: M, 12. sphingolipid metabolism: M, 13. ferroptosis: CP, 14. beta-alanine metabolism: M, 15. gap junction: CP, 16. arginine and proline metabolism: M, 17. arginine biosynthesis: M, 18. glyoxylate and dicarboxylate metabolism: M, 19. autophagy-other: CP, 20. cysteine and methionine metabolism: M. (c) 1. glutathione metabolism: M, 2. biosynthesis of cofactors: M, 3. glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis: M, 4. oxidative phosphorylation: M, 5. arginine and proline metabolism: M, 6. arginine biosynthesis: M, 7. lysine degradation: M, 8. glycine, serine and threonine metabolism: M, 9. alanine, aspartate and glutamate metabolism: M, 10. glycerophospholipid metabolism: M, 11. ferroptosis: CP, 12. phenylalanine metabolism: M, 13. starch and sucrose metabolism: M, 14. ABC transporters: EIP, 15. autophagy-other: CP, 16. sphingolipid metabolism: M. (d) 1. glycerophospholipid metabolism: M, 2. ABC transporters: EIP, 3. autophagy-other: CP, 4. primary bile acid biosynthesis: M, 5. glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis: M, 6. autophagy-animal: CP, 7. one carbon pool by folate: M. (e) 1. purine metabolism: M, 2. glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis: M, 3. arginine biosynthesis: M, 4. glycerophospholipid metabolism: M, 5. oxidative phosphorylation: M, 6. lysine degradation: M, 7. sphingolipid metabolism: M, 8. alanine, aspartate and glutamate metabolism: M, 9. autophagy - other: CP, 10. lysosome: CP, 11. starch and sucrose metabolism: M, 12. FoxO signaling pathway: EIP, 13. glutathione metabolism: M. M. metabolite, CP. cellular processes, EIP. environmental information processing. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

解析大黄鱼对低温和饥饿胁迫的适应机制。

鱼类是变温动物, 温度对鱼类的摄食状态有显著的影响。当水体温度过低时, 鱼类减少甚至停止摄食^[15]。本研究中, 当水温降至 14 °C 时, 大黄鱼减少摄食量; 当水温降至 10 °C 时, 大黄鱼完全停止摄食^[17]。禁食是生物适应低温环境的一种重要策略, 在自然界中广泛存在, 如冬眠的青蛙、蛇、鳄鱼和乌龟等^[22-23]。与 C 组相比, CC 和 F 组的 ROS 增加, 且细胞组织出现了空泡和核

异常现象, 表明低温和饥饿对大黄鱼机体产生了氧化损伤。与 CC 和 F 组相比, CF 组的 ROS 含量减少, 且 CF 组的成活率显著高于 CC 组, 表明饥饿可以提高鱼类的低温胁迫耐受性。Lu 等^[24]认为, 饥饿可以通过提高鱼类的脂类分解代谢和自噬来缓解低温对其机体的损伤。CC 和 F 组的成活率和 ROS 含量无显著差异, 其主要原因是低温胁迫下大黄鱼停止摄食, 从而诱导了相似的饥饿胁迫损伤。从 CC vs. C 和 CF vs. F 比较可知, 大黄鱼

可以通过以下几种常见的代谢途径来应对低温胁迫, 如甘油磷脂代谢和 GPI-锚生物合成等。甘油磷脂和糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白是细胞膜的重要组成部分, 在维持细胞膜流动性, 促进能量和物质转运等方面发挥重要作用^[25-26], 这表明大黄鱼可以通过增加不饱和脂肪酸的含量, 提高细胞膜的流动性来应对低温应激。已有研究表明, 低温增加了虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和大西洋鲑 (*Salmo salar*) 的不饱和脂肪酸含量^[27]。此外, 南极鱼细胞膜含有较高的单不饱和脂肪酸 (MUFA, C20:1n-9) 和多不饱和脂肪酸 (PUFA, C20:5n-3)^[28]。自噬在清除自身代谢产物, 加快细胞 (器) 更新, 维持细胞内稳态方面发挥重要作用^[29]。低温胁迫诱导细胞产生氧化损伤, 破坏细胞的结构和功能, 产生大量的受损细胞器和蛋白质等。大黄鱼通过自噬途径将这些受损的细胞成份运输到相应的部位进行新陈代谢或细胞器再利用, 从而增强机体的低温胁迫耐受性。学者们利用转录组技术研究了大黄鱼对低温胁迫的响应, 发现差异表达基因显著富集在细胞膜流动性和自噬信号通路中^[30]。

CC vs. C 与 CF vs. F 还存在不同的代谢途径。如 CC vs. C 中的差异代谢物集中于淀粉和蔗糖代谢途径。低温应激破坏鱼类的能量代谢, 此时, 鱼类需要通过激活相关的基因和酶表达来应对环境变化, 这一过程需要消耗大量的能量^[11]。葡萄糖能迅速为机体提供能量, 淀粉和蔗糖是葡萄糖产生的前体, 大黄鱼可以通过淀粉和蔗糖代谢途径来弥补葡萄糖的不足, 这有利于重新构建能量平衡来应对低温胁迫。本团队最近的研究表明, 大黄鱼通过改善能量代谢来提高低氧和铜胁迫的耐受性^[31]。因此, 调节能量代谢是一种重要的低温适应机制。CF vs. F 中的差异代谢物集中于 FoxO 信号通路和谷胱甘肽代谢等, 转录因子 FoxO 可以激活靶基因来诱导细胞自噬。自噬能将氧化受损的细胞器降解成小分子物质, 在抑制氧化应激的同时还能为细胞提供能量代谢和重构原料^[32]。谷胱甘肽是重要的非酶抗氧化剂, 在维持细胞氧化还原平衡方面发挥重要作用^[11]。这表明饥饿胁迫状态下的大黄鱼可以通过调节自噬和抗氧化系统来适应低温胁迫。

从 F vs. C 和 CF vs. CC 比较可知, 大黄鱼可以通过以下几种代谢途径来应对饥饿胁迫, 如与低温应激相似的代谢途径甘油磷脂代谢和 GPI-锚

生物合成, 其主要原因是低温应激诱导机体采取饥饿策略以适应环境变化, 从而产生了相似的代谢途径。甘油磷脂代谢除具有维持细胞膜流动性外, 还参与了机体的能量代谢^[25-26], 从而弥补饥饿胁迫对机体能量代谢的影响。饥饿胁迫差异代谢产物还富集在 ABC 运输体和自噬等途径中。ABC 转运体可将 ATP 水解获得的能量用于生物分子的跨膜转运, 参与细胞渗透压调节、脂质和胆固醇转运、细胞分化和抗原呈递等生理功能^[33]。

然而, CC vs. C 与 CF vs. F 也存在不同的代谢途径。如 F vs. C 中的差异代谢物集中于谷胱甘肽代谢、氧化磷酸化、淀粉和蔗糖代谢等。淀粉和蔗糖可以分解成葡萄糖, 从而快速为机体提供能量。氧化磷酸化是一种高效的产能方式。由此可知, 维持机体能量平衡是大黄鱼一种重要的饥饿适应机制。饥饿诱导机体产生氧化损伤, 大黄鱼可以通过调控谷胱甘肽含量来适应饥饿胁迫。CF vs. CC 中的差异代谢物集中于初级胆汁酸生物合成。初级胆汁酸在促进脂质的消化与吸收方面起着非常重要的作用。脂肪是能量的主要贮存形式, 同时也是机体慢性胁迫适应过程的主要能量来源^[34]。因此, 低温应激下的大黄鱼可以通过调节初级胆汁酸生物合成来适应饥饿胁迫。

低温和饥饿联合胁迫下 (CF vs. C) 大黄鱼的差异代谢物所集中的多种代谢途径与低温胁迫 (CC vs. C 或 CF vs. F) 和饥饿胁迫 (F vs. C 或 CF vs. CC) 相同, 并未出现特异的代谢途径。如 GPI-锚生物合成、甘油磷脂代谢、FoxO 信号通路、自噬、谷胱甘肽代谢、氧化磷酸化、甘油磷脂代谢、淀粉和蔗糖等, 表明自噬、抗氧化系统、能量代谢和细胞膜流动性在维持大黄鱼适应低温和饥饿联合胁迫中发挥重要作用。

4 结论

本研究首次采用代谢组学方法研究了大黄鱼对低温和饥饿胁迫的响应机制。低温和饥饿胁迫均可诱导机体产生大量的 ROS, 破坏细胞结构, 并造成了一定程度的死亡。大黄鱼通过细胞膜流动性代谢途径来适应低温应激; 通过调节能量代谢等代谢途径来适应饥饿应激。自噬、抗氧化系统、能量代谢和细胞膜流动性等代谢途径在大黄鱼适应低温和饥饿联合胁迫的过程中发挥作用。研究结果为大黄鱼适应低温和饥饿应激的生理机制提供了新的见解。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Ding W X, Zhang C Y, Hu J Y, *et al.* Unusual fish assemblages associated with environmental changes in the East China Sea in February and March 2017[J]. *Remote Sensing*, 2021, 13(9): 1768.
- [2] Ibrahim R E, El-Houseiny W, Behairy A, *et al.* The palliative role of *Eruca sativa* leaves dietary supplementation against oxidative stress, immunosuppression, and growth retardation in temperature-stressed *Oreochromis niloticus*[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2019, 84: 26-35.
- [3] Tonning K A, Budge S M, Tyedmers P. Overwinter changes in the lipid profile of young-of-the-year striped bass (*Morone saxatilis*) in freshwater ponds[J]. *Bio-molecules*, 2021, 11(11): 1678.
- [4] Chu P, Wang T, Sun Y R, *et al.* Effect of cold stress on the MAPK pathway and lipidomics on muscle of *Takifugu fasciatus*[J]. *Aquaculture*, 2021, 540: 736691.
- [5] Xu W J, Li H Y, Wu L Y, *et al.* Genetically based physiological responses to overwinter starvation in gibel carp (*Carassius gibelio*)[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2020, 11: 578777.
- [6] Fadhlou M, Couture P. Combined effects of temperature and metal exposure on the fatty acid composition of cell membranes, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in yellow perch (*Perca flavescens*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 180: 45-55.
- [7] Venketesh S, Dayananda C. Properties, potentials, and prospects of antifreeze proteins[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2008, 28(1): 57-82.
- [8] Bilyk K T, Zhuang X, Vargas-Chacoff L, *et al.* Evolution of chaperone gene expression and regulatory elements in the antarctic notothenioid fishes[J]. *Heredity*, 2021, 126(3): 424-441.
- [9] Wu W Y, Sun J, Ji H, *et al.* AMP-activated protein kinase in the grass carp *Ctenopharyngodon idellus*: Molecular characterization, tissue distribution and mRNA expression in response to overwinter starvation stress[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2020, 246-247: 110457.
- [10] Zhang Y K, Yang B K, Zhang C N, *et al.* Effects of polystyrene microplastics acute exposure in the liver of swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) revealed by LC-MS metabolomics[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 850: 157772.
- [11] 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.
- [12] 文鑫. 暗纹东方鲀 (*Takifugu fasciatus*) 应对低温胁迫的生理响应和分子机制研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2019.
- Wen X. Physiological response and molecular mechanism of *Takifugu fasciatus* to low temperature stress[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2019 (in Chinese).
- [13] Zhang Z G, Zhou C, Fan K P, *et al.* Metabolomics analysis of the effects of temperature on the growth and development of juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 769: 145155.
- [14] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴-2020[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 22.
- Fisheries and Fisheries Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook-2020[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2020: 22 (in Chinese).
- [15] Volkoff H, Rønnestad I. Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish[J]. *Temperature*, 2020, 7(4): 307-320.
- [16] 李伟业, 罗海忠, 殷小龙, 等. 低温胁迫对耐低温和非耐低温品系大黄鱼 *MT*, *AQP1*, *TCP1* 基因表达的影响 [J]. 大连海洋大学学报, 2021, 36(1): 38-43.
- Li W Y, Luo H Z, Yin X L, *et al.* Effects of low temperature stress on expression of *MT*, *AQP1*, and *TCP1* genes in low temperature-resistant and non-low temperature-resistant strains of large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2021, 36(1): 38-43 (in Chinese).
- [17] Qian B Y, Qi X, Bai Y, *et al.* The *p53* signaling pathway of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) responds to acute cold stress: evidence via spatiotemporal expression analysis of *p53*, *p21*, *MDM2*, *IGF-1*,
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- Gadd45, Fas, and Akt*[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e10532.
- [18] Zheng J L, Zhu Q L, Shen B, *et al.* Effects of starvation on lipid accumulation and antioxidant response in the right and left lobes of liver in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. *Ecological Indicators*, 2016, 66: 269-274.
- [19] Zeng L, Ai C X, Zheng J L, *et al.* Cu pre-exposure alters antioxidant defense and energy metabolism in large yellow croaker *Larimichthys crocea* in response to severe hypoxia[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 687: 702-711.
- [20] Zhang X L, Zhou Q X, Zou W, *et al.* Molecular mechanisms of developmental toxicity induced by graphene oxide at predicted environmental concentrations[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(14): 7861-7871.
- [21] Suo N, Wu Y D, Zhou Z X, *et al.* Genome-wide association and expression analysis revealed the candidate variants and molecular underpinnings of cold-stress response in large yellow croaker[J]. *Marine Biotechnology*, 2022, 24(5): 927-941.
- [22] Muir T J, Dishong B D, Lee Jr R E, *et al.* Energy use and management of energy reserves in hatchling turtles (*Chrysemys picta*) exposed to variable winter conditions[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2013, 38(6): 324-330.
- [23] Zhang J H, Cai R Q, Liang J J, *et al.* Molecular mechanism of Chinese alligator (*Alligator sinensis*) adapting to hibernation[J]. *Journal of Experimental Zoology-Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2021, 336(1): 32-49.
- [24] Lu D L, Ma Q, Wang J, *et al.* Fasting enhances cold resistance in fish through stimulating lipid catabolism and autophagy[J]. *The Journal of physiology*, 2019, 597(6): 1585-1603.
- [25] Farooqui A A, Horrocks L A, Farooqui T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders[J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2000, 106(1): 1-29.
- [26] Zurzolo C, Simons K. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: membrane organization and transport[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bio-membranes*, 2016, 1858(4): 632-639.
- [27] Liu C Y, Zhou Y G, Dong K, *et al.* Differences in fatty acid composition of gill and liver phospholipids between steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) under declining temperatures[J]. *Aquaculture*, 2018, 495: 815-822.
- [28] Malekar V C, Morton J D, Hider R N, *et al.* Effect of elevated temperature on membrane lipid saturation in Antarctic notothenioid fish[J]. *PeerJ*, 2018, 6: e4765.
- [29] Xia X J, Wang X, Qin W H, *et al.* Emerging regulatory mechanisms and functions of autophagy in fish[J]. *Aquaculture*, 2019, 511: 734212.
- [30] 曾霖, 王永红, 宋炜, 等. 基于转录组解析铜驯化对低温胁迫下大黄鱼氧化损伤的影响. *中国水产科学*, 2022, 29(10): 1425-1436.
- Zeng L, Wang Y H, Song W, *et al.* Effects of Cu acclimation on oxidative damage in the large yellow croaker under cold stress based on transcriptome analysis[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(10): 1425-1436 (in Chinese).
- [31] Zeng L, Ai C X, Zhang J S, *et al.* Pre-hypoxia exposure inhibited copper toxicity by improving energy metabolism, antioxidant defence and mitophagy in the liver of the large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 708: 134961.
- [32] Fasano, Disciglio V, Bertora, *et al.* FOXO3a from the Nucleus to the Mitochondria: a round trip in cellular stress response[J]. *Cells*, 2019, 8(9): 1110.
- [33] Jones P M, George A M. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2004, 61(6): 682-699.
- [34] Winston J A, Theriot C M. Diversification of host bile acids by members of the gut microbiota[J]. *Gut Microbes*, 2020, 11(2): 158-171.

Metabolomics-based analysis of adaptive mechanism of *Larimichthys crocea* to low temperature and starvation stresses

ZENG Lin¹, SONG Wei^{2,3*}, XIE Zhengli⁴, WANG Yonghong¹, XIONG Yifei², ZHANG Hui³

(1. School of Food and Biological Engineering, Bengbu University, Bengbu 233030, China;

2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

3. National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China;

4. Fishery Machinery and Instrument Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

Abstract: Large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) is the most important warm-water marine commercial fish, which is widely distributed in the southeast coastal regions in China, such as Zhejiang, Fujian and Guangdong provinces. It is highly sensitive to cold and starvation, and massive death of this species can be observed during winters, leading to significant economic losses for farmers. This study aims to explore the response mechanism of *L. crocea* to oxidative damage caused by low temperature and starvation. Fish with an average weight of (21.38±2.46) g were exposed to low temperature (8 °C) or/and under starvation stress. The fish were divided into four groups: control group (C group), cold group (CC group), fasting group (F group) and cold+fasting group (CF group), each with three replicates. The experiment lasted 30 d, survival rate was calculated, liver samples were obtained for histological observation, chemical fluorescence and LC-MS technology were used to analyze the difference of reactive oxygen species (ROS) and metabolites in different treatment groups. The results showed that compared with C group, the survival rate of CC group, F group and CF group was significantly decreased, while the ROS content was significantly increased ($P<0.05$), and demonstrated vacuolation and nuclear atrophy, indicating cold and starvation stresses induced oxidative damage. A total of 184 and 50 differential metabolites were obtained from CC vs. C and CF vs. F, respectively. There were five important co-metabolic pathways: glycerophospholipid metabolism, glycosylphosphatidylinositol (GPI) - anchor biosynthesis, arginine biosynthesis, sphingolipids metabolism and autophagy, indicating cell membrane fluidity and autophagy played an important role in cold adaptation. A total of 184 and 50 different metabolites were obtained from F vs. C and CF vs. CC, respectively. There were four important overlapping metabolic pathways: glycerophospholipid metabolism, glycosylphosphatidylinositol (GPI) - anchor biosynthesis, ABC transporters and autophagy, indicating energy and material transport function, as well as autophagy played an important role in starvation stress of *L. crocea*. 126 differential metabolites were obtained from CF vs. C, which were significantly enriched in glycosylphosphatidylinositol (GPI) - anchor biosynthesis, glycerophospholipid metabolism, oxidative phosphorylation, starch and sucrose metabolism, FoxO signal pathway, autophagy and glutathione metabolism, indicating cell membrane fluidity, energy metabolism, autophagy and antioxidant systems played an important role in cold and starvation adaptation. The results provide scientific basis for further study about the effects of low temperature and fasting on the physiological functions of *L. crocea*.

Key words: *Larimichthys crocea*; low temperature; starvation; metabolomics; LC-MS

Corresponding author: SONG Wei. E-mail: songw@ecsf.ac.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2022YFD2401102, 2019YFD0900904); Marine S & T Fund of Shandong Province for Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) (2022QNLM30001); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-47); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD76)