

文章编号: 1000-0615(2018)06-0838-08

DOI: 10.11964/jfc.20170410789

锌对团头鲂幼鱼血清¹H NMR代谢组的影响

蒋明^{1,2}, 杨长庚¹, 王卫民², 文华^{1*}, 吴凡¹,
刘伟¹, 田娟¹, 陆星¹, 喻丽娟¹

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 鱼类营养与饲料研究室, 湖北 武汉 430223;

2. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为了发掘团头鲂对锌(Zn)敏感的代谢标志物, 以3种Zn含量分别为7.4、32.1和332.4 mg/kg的半纯化饲料(分别标记为L、M和H组), 喂养初始体质量为(3.6±0.1) g团头鲂12周, 应用¹H(氢谱)核磁共振波谱法(¹H NMR)检测团头鲂血清代谢物的种类和浓度, 再用最小二乘法判别(PLS-DA)和变量重要性(VIP)分析3个处理团头鲂血清的代谢轮廓和主要差异代谢物。结果显示, 血清中52种代谢物被定性和定量, 其中氨基酸及其衍生物23种、有机酸16种、糖类4种、核酸组分4种、维生素3种和其他组分2种, 经PLS-DA和VIP分析, 3组的代谢轮廓相异, 其中L组血清中脯氨酸、丙氨酸、赖氨酸等8种氨基酸和葡萄糖含量较M组高, H组血清中则有12种氨基酸和葡萄糖含量较M组高。差异代谢物依次为脯氨酸、乳酸、葡萄糖、丙氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、肌酸、反式-4-羟基-L-脯氨酸、牛磺酸、丝氨酸、 τ -甲基组氨酸、精氨酸、缬氨酸、蛋氨酸和甘露糖。以上结果显示, 饲料中Zn缺乏和过量会抑制团头鲂的氨基酸代谢和糖代谢, 脯氨酸、乳酸和葡萄糖是团头鲂对Zn敏感的潜在生物标志物。

关键词: 团头鲂; 锌; 代谢组; 脯氨酸; 乳酸

中图分类号: Q 592.1; S 965.1

文献标志码: A

微量矿物质元素是动物维持生长和生理功能所需的一大类营养元素, 因为动物存在微量元素的代谢池和自稳态调节机制, 所以很难准确评估动物微量元素营养状态^[1], 寻找对微量元素敏感的生物代谢标志物是当前动物微量元素研究的热点之一^[2]。鱼类可以从养殖水体中吸收部分微量元素, 因此, 准确判断鱼类微量元素的营养状态较陆生动物更加困难^[3]。锌(Zn)是鱼类必需的微量元素, 参与鱼类的生长、发育、免疫和抗氧化性能等多种生理功能, 影响其代谢的因素错综复杂^[4]。本实验室关于团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)幼鱼^[5]和成鱼^[6]对锌营养需求测试的生理生化指标中, 多种指标只在未添加Zn和添加Zn组间有差异, 说明大多数指标对Zn的剂量敏感度不高。

代谢组学是近年来新兴的一个重要组学平台, 广泛应用在医学、药学和营养学等学科领域^[7]。营养代谢组学是代谢组学的一个分支, 是一种适合探索营养与代谢复杂关系的研究方法, 有助于揭示营养成分与健康的关系机制^[8]。近年来, 代谢组学平台也应用到水产动物营养与饲料研究领域^[9], 如Prathomya等^[10]利用核磁共振(¹H NMR)研究了高脂肪饲料、高碳水化合物饲料和高脂肪高碳水化合物饲料对团头鲂血清和肝脏代谢物的影响; Sheedy等^[11]利用¹H NMR研究了短期饥饿对鲍鱼(*Haliotis rubra*×*H. laevigata*)消化腺代谢物的影响, 并认为N-二甲基甘氨酸是反映其饥饿状态的敏感标志物; Wei等^[12-13]利用¹H NMR代谢组技术研究替代鱼粉影响大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)生长性能的作用机制。以上

收稿日期: 2017-04-14 修回日期: 2017-10-10

资助项目: 国家大宗淡水鱼类产业技术体系专项(CARS-45-8); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2013JBFM22)

通信作者: 文华, E-mail: wenhua.hb@163.com

研究显示,¹H NMR代谢组技术是一种发掘反映鱼类营养状态敏感标志物的良好技术。因此,本实验应用¹H NMR组学方法检测分析了不同Zn含量饲料投喂12周后团头鲂幼鱼的血清代谢物,以期从营养代谢组学的角度认识锌对团头鲂生理代谢过程的影响,发掘团头鲂对锌敏感的潜在生物代谢标志物。

1 材料与方法

1.1 血清样本来源及制备

以酪蛋白-明胶为蛋白源,混合油脂(豆油、玉米油,质量比为1:1)为脂肪源,糊精为糖源,以分析纯七水硫酸锌($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)为Zn源,按照文献^[5]所述的饲料配方配制成3组Zn含量分别为7.4、32.1和332.4 mg/kg半纯化饲料,分别记为L、M和H组。前期的实验结果显示,团头鲂幼鱼对Zn的需要量为32.6 mg/kg,因此,7.4、32.1和332.4 mg/kg含Zn饲料对团头鲂幼鱼而言,分别为Zn缺乏、适量和过量。以3种饲料投喂初始平均体质量为(3.6±0.1) g的团头鲂12周^[5],12周后鱼体均禁食24 h,随后每个实验桶中随机取10尾鱼进行尾部静脉采血,血样在4℃静置0.5 h后3 000 r/min离心5 min,取上层血清样本,用液氮速冻后,于-80℃冰箱冰冻待测。

1.2 血清¹H-NMR代谢物检测

将制备好的血清样本在室温条件下(20℃)进行解冻,用Eppendorf Centrifuge 5415R高速离心机于4℃、13 000 r/min离心2 min,取上清液于Millipore超滤膜中(Millipore Amicon® ULTRA 3 ku),离心过滤(30 min, 4℃, 13 000 r/min);合并同组滤液并加入DSS标液,用微型漩渦混合仪(上海泸西分析仪器厂有限公司, XW-80A)涡旋30 s,使滤液与ACDSS (Anachro certified DSS standard solution - 4.1361 mmol/L)试剂充分混匀。受血清样本数量限制, L组分4个平行样本, M组分6个平行样本, H组分5个平行样本,每个平行样本取0.45 mL上清液于核磁管中用NMR谱仪(Bruker AV III 600 MHz)进行核磁数据采集(表1)。

1.3 数据处理及分析方法

将¹H NMR自由感应衰减(free induction decay, FID)信号导入到Chenomx NMR suit (version 7.7,

表1 核磁数据采集参数

Tab. 1 Acquisition parameters and data of ¹ H NMR		
采集参数 parameter		具体数据 data
温度/K	temperature	147.77
磁频率/MHz	magnet frequency	600.13
瞬变/扫描	transients/scans	128
循环延迟	recycle delay	1
频率域大小	frequency domain size	65 536
光谱宽度	spectral width	12 019.231
时间域大小	time domain size	32 768
脉冲序列	pulse sequence	noesygpr1d.comp

Chenomx, Edmonton, Canada)软件中,自动进行傅立叶转换,调整相位并校正基线。以DSS-d6峰(0.0 ppm)作为全部谱图化学位移的标准,并对其进行反转卷积操作,调整谱图峰形(CSI)。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的浓度和谱峰面积为标准,结合Chenomx自带数据库对样本谱图的信号逐一比对分析,获得不同种类代谢物及其绝对浓度值。然后把代谢物和对应的绝对值浓度导出到Excel表格中,即得到了一个变量矩阵。以变量矩阵为数据源进行质量归一化处理,再进行最小二乘法判别分析(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)和变量重要性(variable importance in projection, VIP)分析。PLS-DA分别通过R语言中l s包完成数据分析,通过ggplot 2包进行可视化作图。

主要差异代谢物均以(平均值±标准差)表示,用SPSS 18.0统计软件中One-Way ANOVA方差分析和Tukey's均值多重比较法对数据的差异显著性进行分析处理,当P<0.05时,表示差异显著。

2 结果

2.1 血清代谢物谱图及代谢物种类

根据Chenomx软件自带的数据库对15份团头鲂血清样品谱图(图1)信号逐一比对分析,结果共获得52种代谢物,其中氨基酸及其衍生物23种、有机酸16种、糖类4种、核酸组分4种、维生素3种,其他组分2种。因血清中柠檬酸受酸碱度影响,所以未能定量。

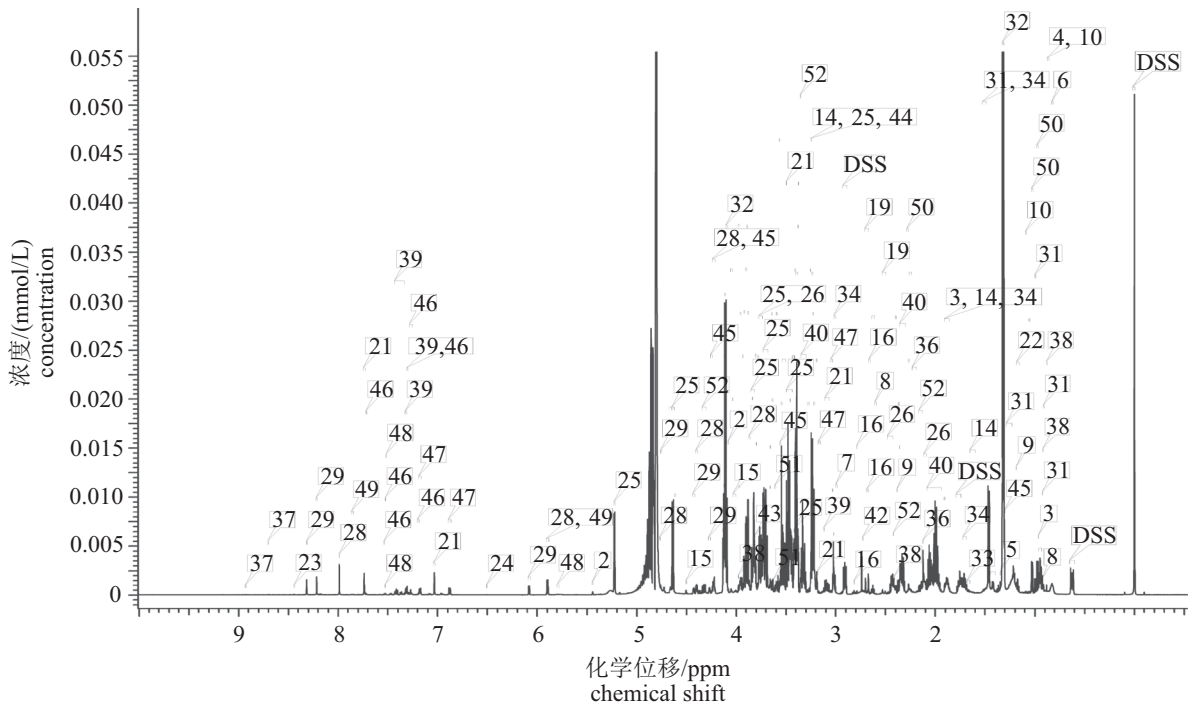


图1 团头鲂血清样品信号归属谱图

团头鲂血清样品的信号归属片段, 归属范围为1~10 ppm区间, 归属的代谢物用编号标识; 以下物质被检出: 1. 1,3-二甲基脲, 2. 1,6-脱水- β -D-葡萄糖, 3. 2-氨基丁酸, 4. 2-羟基丁酸酯, 5. 2-羟基异丁酸酯, 6. 2-羟基异戊酸, 7. 2-氧戊二酸盐, 8. 2-氧代异己酸, 9. 3-羟基丁酸酯, 10. 3-甲基-2-氧代戊酸, 11. 醋酸, 12. 乙酰乙酸, 13. 丙氨酸, 14. 精氨酸, 15. 抗坏血酸, 16. 天门冬氨酸, 17. 甜菜碱, 18. 胆碱, 19. 柠檬酸, 20. 肌酸, 21. τ -甲基组氨酸, 22. 乙醇, 23. 甲酸, 24. 延胡索酸盐, 25. 葡萄糖, 26. 谷氨酰胺, 27. 甘氨酸, 28. 鸟苷, 29. 肌苷, 30. 异丁酸酯, 31. 异亮氨酸, 32. 乳酸, 33. 亮氨酸, 34. 赖氨酸, 35. 甘露糖, 36. 蛋氨酸, 37. 烟酸盐, 38. 泛酸钙盐, 39. 苯丙氨酸, 40. 脯氨酸, 41. 丙酮酸, 42. 肌氨酸, 43. 丝氨酸, 44. 牛磺酸, 45. 苏氨酸, 46. 色氨酸, 47. 酪氨酸, 48. 尿嘧啶, 49. 尿苷, 50. 缬氨酸, 51. 肌醇, 52. 反式-4-羟基-L-脯氨酸

Fig. 1 Signal assignment spectrum of serum from *M. amblycephala*

Serum signal assignment fragment of blunt snout bream with assignment interval 1~10 ppm, metabolites were coded according to numbers; the following metabolites were detected: 1. 1,3-dimethylurate, 2. 1,6-anhydro- β -D-glucose, 3. 2-aminobutyrate, 4. 2-hydroxybutyrate, 5. 2-hydroxyisobutyrate, 6. 2-hydroxyisovalerate, 7. 2-oxoglutarate, 8. 2-oxoisocaproate, 9. 3-hydroxybutyrate, 10. 3-methyl-2-oxovalerate, 11. acetate, 12. acetoacetate, 13. alanine, 14. arginine, 15. ascorbate, 16. aspartate, 17. betaine, 18. choline, 19. citrate, 20. creatine, 21. τ -methylhistidine, 22. ethanol, 23. formate, 24. fumarate, 25. glucose, 26. glutamine, 27. glycine, 28. guanosine, 29. inosine, 30. isobutyrate, 31. isoleucine, 32. lactate, 33. leucine, 34. lysine, 35. mannose, 36. methionine, 37. nicotinurate, 38. pantothenate, 39. phenylalanine, 40. proline, 41. pyruvate, 42. sarcosine, 43. serine, 44. taurine, 45. threonine, 46. tryptophan, 47. tyrosine, 48. uracil, 49. uridine, 50. valine, 51. myo-Inositol, 52. trans-4-hydroxy-L-proline

2.2 PLS-DA和PLS载荷分析

团头鲂血清样本(L、M、H组)的PLS-DA得分图显示, L、M和H组的平行样本分别聚集在一起, 说明各组组内的变异较小; 在主成分2方向上, L与H、M与H组分离, 这说明此方向上的L和M组与H组代谢轮廓不同; 而在主成分1方向上, L和H组样本相近, 说明其代谢轮廓在此方向上类似, 但L和M组在此方向上明显分离, 说明这2组样本的代谢轮廓在此方向上不同(图2)。PLS-DA模型质量排列检测图(Permutation test, $P=0.001$)表明此次PLS-DA模型的质量较高(图3)。

2.3 VIP差异代谢物分析及差异代谢物列表

PLS-DA中的第一主成分(component 1)的VIP得分图显示, 脯氨酸为第1重要的差异代谢物, 依次为乳酸、葡萄糖、丙氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、肌酸、反式-4-二羟基-L-脯氨酸、牛磺酸、丝氨酸、 τ -甲基组氨酸、精氨酸、缬氨酸、蛋氨酸和甘露糖(图4)。

血清中15种代谢差异物及浓度结果显示, M组的血清脯氨酸、葡萄糖、肌酸、 τ -甲基组氨酸、精氨酸和甘露糖显著低于其他2组。H组的乳酸、葡萄糖、丙氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺、肌酸、丝氨酸、蛋氨酸和甘露糖显著高于其他2组(表2)。

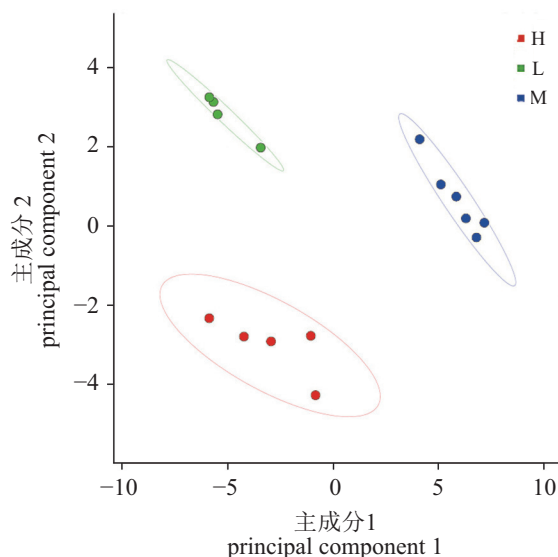


图2 团头鲂(Zn缺乏、正常和过量)血清样本
PLS-DA得分图

Fig. 2 PLS-DA score plot of serum from *M. amblycephala* with deficiency (L), normal (M) and excessive (H) Zn

3 讨论

当前鱼类营养代谢组学研究较少^[9], 但已有文献显示, ¹H NMR代谢组技术是进行水产养殖研究的有效工具, 可以从多个角度研究营养、疾病和环境等因素对鱼类生理生化代谢过程的

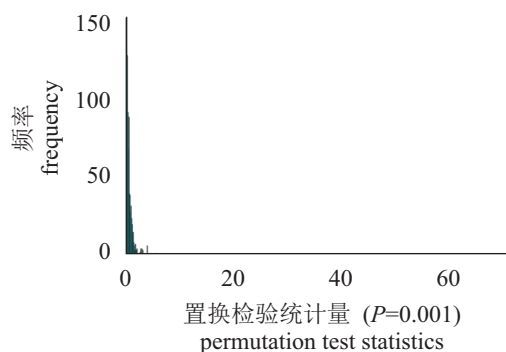


图3 PLS-DA模型质量排列检测图

Fig. 3 PLS-DA model validation by permutation tests based on separation distance

影响。如黄春红等^[14]利用¹H NMR代谢组技术检测了草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的肝胰脏和血清, 分别检测到58种和47种物质; Wagner等^[15]利用¹H NMR代谢组学技术研究了芝麻素对大西洋鲑(*Salmo salar*)肝脏和肌肉中代谢物的影响, 分别鉴定了11种和23种代谢物, 认为芝麻素主要影响了大西洋鲑的能量代谢; Wei等^[12-13]报道了饲料中替代鱼粉对大菱鲆肌肉和肝脏代谢组的影响, 分别获得40种和37种代谢物。Schock等^[16]利用¹H NMR代谢组学技术评估了饲料中鱼粉含量对军曹鱼(*Rachycentron canadum*)血清代谢组的影

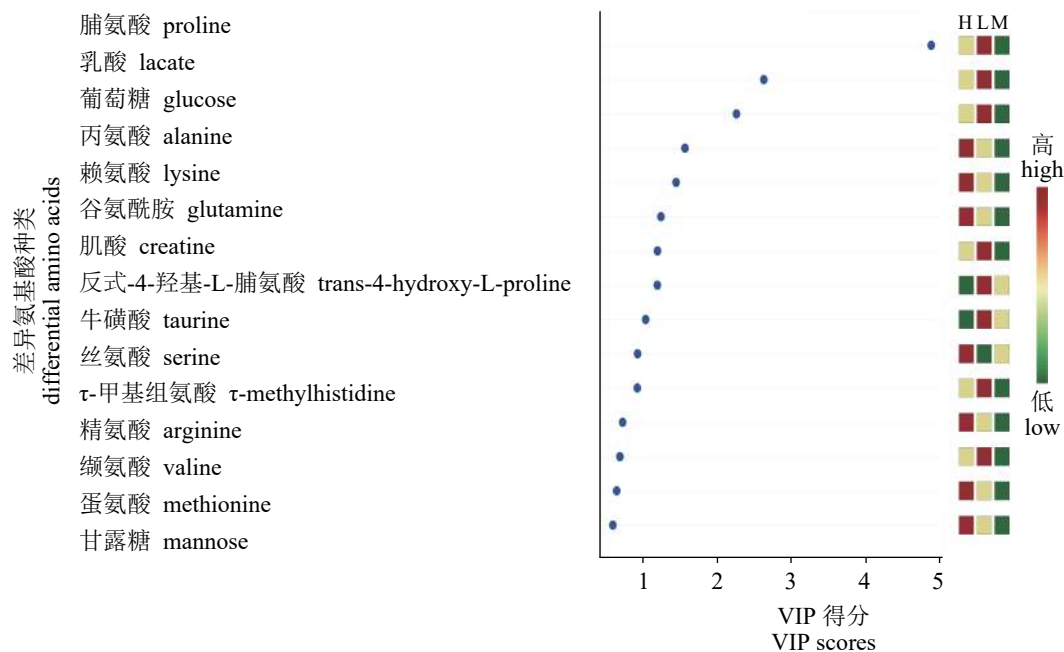


图4 团头鲂(Zn缺乏、正常和过量)血清样本代谢物VIP得分图

Fig. 4 Variable importance in projection score of serum metabolites from *M. amblycephala* with deficiency (L), normal (M) and excessive (H) Zn

表 2 血清差异代谢物列表及浓度
Tab. 2 List and concentration of serum differential metabolites

差异代谢物 differential metabolites	L	M	H
脯氨酸 proline	3.141±0.076 ^a	1.780±0.122 ^b	2.91±0.159 ^c
乳酸 lactate	6.439±0.299 ^a	6.481±0.101 ^a	6.840±0.055 ^b
葡萄糖 glucose	3.814±0.083 ^a	3.551±0.157 ^b	3.860±0.027 ^a
丙氨酸 alanine	0.518±0.015 ^a	0.502±0.014 ^a	0.592±0.011 ^b
赖氨酸 lysine	0.263±0.016 ^a	0.255±0.012 ^a	0.328±0.008 ^b
谷氨酰胺 glutamine	0.317±0.003 ^a	0.337±0.033 ^a	0.402±0.009 ^b
肌酸 creatine	0.140±0.012 ^a	0.108±0.002 ^b	0.164±0.003 ^c
反式-4-羟基-L-脯氨酸 trans-4-hydroxy-L-proline	0.308±0.012 ^a	0.312±0.040 ^a	0.233±0.011 ^b
牛磺酸 taurine	0.874±0.023 ^a	0.893±0.019 ^a	0.797±0.014 ^b
丝氨酸 serine	0.108±0.010 ^a	0.141±0.008 ^b	0.187±0.004 ^c
τ-甲基组氨酸 τ-methylhistidine	0.297±0.005 ^a	0.264±0.008 ^b	0.307±0.012 ^a
精氨酸 arginine	0.085±0.003 ^{ab}	0.071±0.014 ^a	0.095±0.006 ^b
缬氨酸 valine	0.189±0.005 ^a	0.166±0.004 ^b	0.190±0.003 ^a
蛋氨酸 methionine	0.075±0.004 ^a	0.078±0.002 ^a	0.094±0.002 ^b
甘露糖 mannose	0.041±0.003 ^a	0.033±0.002 ^b	0.047±0.001 ^c

注：同行数据后不同字母者表示差异显著($P<0.05$, Tukey's法)

Notes: in the same line, different superscript letters are significantly different determined by Tukey's test ($P<0.05$)

响,对34种物质进行了定性和定量。本实验对血清中的52种代谢物进行了定性和定量,鉴定了15种差异代谢物,主要涉及氨基酸代谢和能量代谢。与已有报道相比,本研究定性定量的血清代谢物种类较多,反映了Zn对团头鲂代谢物的影响,这说明¹H NMR代谢组技术可以应用到团头鲂营养学研究。

脯氨酸是本实验中的第1差异代谢物。脯氨酸和其代谢物羟脯氨酸是具有特殊化学和生物化学功能的氨基酸^[17-18]。它是动物胶原蛋白中含量最多的氨基酸,占氨基酸含量的30%以上,也是蛋白质合成中要求最多的氨基酸。脯氨酸在蛋白质的合成、结构和代谢(特别是精氨酸、多胺和谷氨酸)等功能中起重要作用,脯氨酸作为自由基清除剂^[19],保护蛋白质的肽骨架,从而达到降低细胞的氧化应激伤害;此前研究还表明,脯氨酸作为一种渗透压物质具有分子伴侣作用,可以显著提高细胞中蛋白质的正确折叠比率,对动物伤口愈合、抗氧化反应和免疫反应亦有重要作用^[20]。Zhao等^[21]研究发现,脯氨酸是罗非鱼(*Oreochromis sp.*)高温应激的标志代谢物,在高

温应激下,罗非鱼肝脏中脯氨酸含量升高并对无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)感染起到保护作用,提高其存活率,同时还指出高温应激主要改变罗非鱼的氨基酸代谢通路。在本研究中,饲料中缺少和过量Zn都引起血清中脯氨酸显著升高,本研究的另外一部分实验结果同样显示,饲料中缺少Zn或过量Zn都对团头鲂抗氧化能力产生负面影响^[5]。这可能是饲料中缺少Zn和过量Zn改变了团头鲂氧化应激状态,因此Zn缺乏和过量对团头鲂均是一种营养性胁迫。血清中脯氨酸升高可能是团头鲂抗氧化应激保护的一种响应机制,其具体的代谢通路需要进一步研究。

本研究15种差异代谢物中,有12种是氨基酸或氨基酸代谢中间产物,这说明饲料中Zn对团头鲂氨基酸代谢具有显著影响。早期研究显示,饲料中Zn缺乏会导致大鼠(*Rattus norvegicus*)血液中氨基酸升高,其主要原因是游离氨基酸不能转运到组织中进行蛋白质合成,异化过程增强^[22];鸡(*Gallus gallus*)缺Zn时会引起尿液中氮含量增加^[23]。从本实验的结果分析,饲料中Zn缺乏也导致血

清中脯氨酸、丙氨酸、赖氨酸等8种氨基酸含量升高。而过量的Zn则导致12种氨基酸升高,这提示,饲料中Zn过量对团头鲂氨基酸转运的影响更加深远。主要原因可能是Zn缺乏和过量会导致某些关键氨基转移酶合成受阻,导致机体游离氨基酸转运效率降低^[24]。

乳酸是细胞在无氧条件下,通过酶的作用,把葡萄糖等有机物分解成不彻底的氧化物,在健康的生理条件下,在肝细胞中乳酸经由丙酮酸、乙酰辅酶A途径转变为脂肪酸、胆固醇、酮体和乙酸等物质,亦可经由丙酮酸,通过氨基转移作用产生丙氨酸,参与蛋白质代谢^[25]。贾冬^[26]报道了脓毒症大鼠血清乳酸、乳酸清除率及转氨酶水平与肝脏损伤的关系,其实验结果显示,血清中乳酸水平与大鼠肝损伤密切相关,并认为血清乳酸水平可作为肝功能健康程度指标。在本实验中,饲料中Zn过量亦导致了团头鲂肝脏损伤和肝功能指标异常^[5],从而导致处理乳酸的能力下降,引起乳酸堆积,进而引起血清中乳酸含量升高。另一方面,血液中乳酸值升高往往意为着较严重的血液循环代谢障碍^[27]。崔立娇等^[28]研究发现,饲料中缺乏Zn会引起星斑川鲮(*Platichthys stellatus*)血液中红细胞数量和血红蛋白显著降低,Zn过量亦会引起血液红细胞数减少。而血红蛋白是转运氧气的载体,红细胞数和血红蛋白是贫血的评价指标,这提示,饲料中Zn缺乏和过量都可能会抑制星斑川鲮的血氧运输能力。本实验中,饲料中Zn过量导致团头鲂血清乳酸增加,可能是饲料中过量的Zn对团头鲂有较强的毒性,使血红蛋白和红细胞数量减少,降低了运氧能力,使组织不能充分利用氧,导致用氧障碍性缺氧,同时使团头鲂血液循环代谢出现障碍,从而导致血清乳酸含量升高。

葡萄糖是第3位差异代谢物,本实验中饲料中Zn缺乏和过量都导致血清葡萄糖(血糖)升高,而血糖浓度是反映机体糖代谢的一项重要指标,因此Zn对团头鲂糖代谢有显著影响。Suliburska等^[29]指出Zn可以调节高血压病人的葡萄糖代谢, Marchesini等^[30]研究表明,日常补充Zn可以调节肝硬化病人的糖代谢。早期的研究亦表明,Zn能抑制小鼠(*Mus musculus*)肠道对葡萄糖的吸收^[31]。Zn能够调节细胞的胰岛素分泌,从而影响糖代谢^[32]。此外,肝脏亦对血糖的调节起重

要的作用,饲料中Zn缺乏和过量都会导致肝脏功能受损,这可能会抑制肝脏对血糖的吸收利用,从而导致血糖升高。

综上所述,饲料中Zn缺乏和过量会抑制团头鲂氨基酸代谢和糖代谢,脯氨酸、乳酸和葡萄糖是评估团头鲂Zn营养状态的潜在生物标志物。

参考文献:

- [1] Underwood E J. Trace Elements in Human and Animal Nutrition[M]. 5th ed. Orlando, FL: Academic Press, 1986: 496
- [2] Hambidge M. Biomarkers of trace mineral intake and status[J]. The Journal of Nutrition, 2003, 133(S3): 948S-955S.
- [3] National Research Council (NRC). Nutrient Requirements of Fish and Shrimp[M]. Washington, DC: National Academy Press, 2011: 176
- [4] Prabhu A J, Schrama J W, Kaushik S J. Mineral requirements of fish: a systematic review[J]. Reviews in Aquaculture, 2016, 8(2): 172-219.
- [5] 蒋明, 黄凤, 文华, 等. 饲料锌对团头鲂幼鱼生长性能、血清生化指标和抗氧化功能的影响[J]. 中国水产科学, 2015, 22(6): 1167-1176.
Jiang M, Huang F, Wen H, et al. Effects of dietary zinc on growth, serum biochemical indices, and antioxidant responses in juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(6): 1167-1176(in Chinese).
- [6] Jiang M, Wu F, Huang F, et al. Effects of dietary Zn on growth performance, antioxidant responses, and sperm motility of adult blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. Aquaculture, 2016, 464: 121-128.
- [7] Hollywood K, Brison D R, Goodacre R. Metabolomics: current technologies and future trends[J]. Proteomics, 2006, 6(17): 4716-4723.
- [8] Ismail N A, Okasha S H, Dhawan A, et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in children with chronic hepatitis[J]. Advances in Bioscience and Biotechnology, 2012, 3(7): 972-977.
- [9] Young T, Alfaro A C. Metabolomic strategies for aquaculture research: A primer[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2016.
- [10] Prathomya P, Prisingkorn W, Jakovlić I, et al. ¹H NMR-based metabolomics approach reveals metabolic altera-

- tions in response to dietary imbalances in *Megalobrama amblycephala*[J]. *Metabolomics*, 2017, 13: 17.
- [11] Sheedy J R, Lachambre S, Gardner D K, *et al.* ¹H-NMR metabolite profiling of abalone digestive gland in response to short-term starvation[J]. *Aquaculture International*, 2016, 24(2): 503-521.
- [12] Wei Y, Liang M, Mai K, *et al.* ¹H NMR-based metabolomics studies on the effect of size-fractionated fish protein hydrolysate, fish meal and plant protein in diet for juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2017, 23(3): 523-536.
- [13] Wei Y L, Liang M Q, Mai K S, *et al.* The effect of ultra-filtered fish protein hydrolysate levels on the liver and muscle metabolic profile of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) by ¹H NMR-based metabolomics studies[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(7): 3515-3527.
- [14] 黄春红, 肖调义, 胡毅, 等. 基于肝脂和¹H-NMR技术的草鱼肝胰脏及血清代谢组学分析[J]. *水产学报*, 2015, 39(9): 1368-1379.
- Huang C H, Xiao T Y, Hu Y, *et al.* Metabonomics analysis of hepatopancreas and serum of grass carp based on the hepatopancreas lipid and ¹H-NMR[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(9): 1368-1379(in Chinese).
- [15] Wagner L, Trattner S, Pickova J, *et al.* ¹H NMR-based metabolomics studies on the effect of sesamin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Food Chemistry*, 2014, 147: 98-105.
- [16] Schock T B, Newton S, Brenkert K, *et al.* An NMR-based metabolomic assessment of cultured cobia health in response to dietary manipulation[J]. *Food Chemistry*, 2012, 133(1): 90-101.
- [17] Hu C A A, Phang J M, Valle D. Proline metabolism in health and disease[J]. *Amino Acids*, 2008, 35(4): 651-652.
- [18] Kaul S, Sharma S S, Mehta I K. Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assays[J]. *Amino Acids*, 2008, 34(2): 315-320.
- [19] Paniello R C, Hayden R E, Bello S L. Improved survival of acute skin flaps with amino acids as free radical scavengers[J]. *Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 1988, 114(12): 1400-1403.
- [20] Wu G Y, Bazer F W, Burghardt R C, *et al.* Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition[J]. *Amino Acids*, 2011, 40(4): 1053-1063.
- [21] Zhao X L, Han Y, Ren S T, *et al.* L-proline increases survival of tilapias infected by *Streptococcus agalactiae* in higher water temperature[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(1): 33-42.
- [22] Wallwork J C, Duerre J A. Effect of zinc deficiency on methionine metabolism, methylation reactions and protein synthesis in isolated perfused rat liver[J]. *The Journal of Nutrition*, 1985, 115(2): 252-262.
- [23] 周明, 丁昌春. 鸡缺锌对含硫氨基酸代谢的影响[J]. *中国兽医学报*, 1999, 19(2): 181-183.
- Zhou M, Ding C C. Effect of zinc deficiency on sulfur amino acid metabolism in chickens[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 1999, 19(2): 181-183(in Chinese).
- [24] Glover C N, Hogstrand C. Amino acid modulation of *in vivo* intestinal zinc absorption in freshwater rainbow trout[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2002, 205(Pt 1): 151-158.
- [25] 刘源, 许汪斌, 代冬梅. 血乳酸的生理代谢及临床意义[J]. *临床合理用药杂志*, 2013, 6(5): 174-175.
- Liu Y, Xu W B, Dai D M. Physiological metabolism of blood lactate and its clinical application[J]. *Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use*, 2013, 6(5): 174-175(in Chinese).
- [26] 贾冬. 脓毒症大鼠血清乳酸、乳酸清除率及转氨酶水平与肝脏损伤关系的探讨[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2013
- Jia D. The serum lactate lactate clearance rate and transaminase levels in septic rats and its relationship with liver damage[D]. Shenyang: China Medical University, 2013 (in Chinese)
- [27] Bakker J, De Lima A P. Increased blood lactate levels: an important warning signal in surgical practice[J]. *Critical Care*, 2004, 8(2): 96-98.
- [28] 崔立娇, 张利民, 王际英, 等. 饲料锌水平对星斑川鲷幼鱼生长、组织积累和抗氧化功能的影响[J]. *水产学报*, 2010, 34(9): 1420-1428.
- Cui L J, Zhang L M, Wang J Y, *et al.* Effects of dietary zinc on growth performance, tissue accumulation and antioxidation of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(9): 1420-1428(in Chinese).
- [29] Suliburska J, Bogdanski P, Szulinska M, *et al.* Hypotensive therapy disorders zinc and glucose status in hyper-

- tensive patients[J]. *Pharmanutrition*, 2014, 2(3): 117.
- [30] Marchesini G, Bugianesi E, Ronchi M, *et al.* Zinc supplementation improves glucose disposal in patients with cirrhosis[J]. *Metabolism*, 1998, 47(7): 792-798.
- [31] Lyall V, Nath R, Mahmood A. Inhibition of D-glucose uptake by zinc in rat intestine[J]. *Biochemical Medicine*, 1979, 22(2): 192-199.
- [32] Slepchenko K G, James C B L, Li Y V. Inhibitory effect of zinc on glucose-stimulated zinc/insulin secretion in an insulin-secreting β -cell line[J]. *Experimental Physiology*, 2013, 98(8): 1301-1311.

¹H NMR-based metabolomics studies on the effect of Zn in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)

JIANG Ming^{1,2}, YANG Changgeng¹, WANG Weimin², WEN Hua^{1*}, WU Fan¹,
LIU Wei¹, TIAN Juan¹, LU Xing¹, YU Lijuan¹

(1. *Fish Nutrition and Feed Division, Yangtze River Fisheries Research Institute, China Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;*

2. *College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*)

Abstract: A ¹H NMR-based metabolomics approach was used to explore the impact of dietary Zn on the serum metabolic profile of *Megalobrama amblycephala*. Fish were fed diets containing graded levels of Zn (7.4, 32.1, and 332.4 mg/kg diet; supplied as ZnSO₄·7H₂O) for 12 weeks. We identified 52 metabolites in serum including 23 amino acids or intermediary metabolites, 16 organic acids, 4 sugars, 4 nucleic acids, 3 vitamins and 2 others. Multivariate data analyses (PLS-DA and VIP) showed dietary Zn affected the metabolic profile impartially and these metabolites (such as proline, lactate, glucose, alanine, lysine, glutamine, creatine, trans-4-hydrox-L-proline, taurine, serine, τ -methylhistidine, arginine, valine, methionine and mannose) were identified as characteristic metabolites. These metabolites are mainly increased in the groups (7.4 and 332.4 mg/kg diet) compared with the group (32.1 mg/kg), suggesting that Zn deficiency and excess inhibited amino acid and carbohydrate metabolism. In conclusion, proline, lactate and glucose were found to have potentials for being new biomarkers for Zn nutritional status of *M. amblycephala*.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; zinc; metabolomics; proline; lactate

Corresponding author: WEN Hua. E-mail: wenhua.hb@163.com

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-45-8); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (2013JBFM22)