

硒化氨基多糖对黑鲷脾脏代谢物的影响

周秀锦¹, 江晓琼², 邵宏宏¹, 张静¹, 冷向阳³, 杨会成⁴ (1. 舟山海关综合技术服务中心, 浙江舟山 316021; 2. 舟山市科学技术局, 浙江舟山 316021; 3. 上海爱博才思分析仪器贸易有限公司, 上海 200335; 4. 浙江海洋开发研究院, 浙江舟山 316021)

摘要 通过研究饲喂硒化氨基多糖后黑鲷脾脏代谢物的变化, 探讨其免疫调节机制。对照组未添加硒化氨基多糖, 试验组饲喂添加硒化氨基多糖的饲料, 采用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术(UPLC-QTOF-MS), 结合XCMS^{plus}软件、高分辨二级数据库对副溶血弧菌攻毒48和96 h时黑鲷脾脏内源性代谢物进行了非靶向代谢组学分析, 筛选出潜在的脾脏内源性生物标志物。通过MetaboAnalyst 4.0网站进行相关代谢通路分析, 揭示硒化氨基多糖调节脾脏免疫的潜在机制。结果表明, 黑鲷脾脏在副溶血弧菌攻毒48和96 h时, 分别有存在显著差异的31和36种潜在生物标志物, 指向了8和10条代谢通路($P < 0.05$)。硒化氨基多糖通过多条代谢通路增强了黑鲷脾脏的自身免疫机能。该研究结果为阐明硒化氨基多糖的免疫增强机制和合理开发免疫增强剂提供了科学依据。

关键词 超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术; 非靶向代谢组学; 黑鲷; 硒化氨基多糖; 免疫调节

中图分类号 O 657.63 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2022)14-0081-06

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.14.020

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effects of Selenized Glycosaminoglycan on the Spleen Metabolites of *Acanthopagrus schlegelii*

ZHOU Xiu-jin¹, JIANG Xiao-qiong², SHAO Hong-hong¹ et al (1. Integrated Technical Service Center in Zhoushan Customs, Zhoushan, Zhejiang 316021; 2. Zhoushan Bureau of Science and Technology, Zhoushan, Zhejiang 316021)

Abstract The changes of spleen metabolites in *Acanthopagrus schlegelii* after feeding selenized glycosaminoglycan were studied, and the immunomodulatory mechanism was discussed. The selenized glycosaminoglycan was not added in control group, the feed with adding selenized glycosaminoglycan was fed in experimental group. Using UPLC-QTOF-MS, combined with XCMS^{plus} software and high-resolution secondary database, untargeted metabolomic analysis was made on the endogenous metabolites of *A. schlegelii*'s spleen challenged by *V. parahaemolyticus* 48 and 96 h, potential endogenous biomarkers of spleen were screened out. The related metabolic pathways were analyzed on MetaboAnalyst 4.0 website. The potential mechanism of selenized glycosaminoglycan in regulating the immunity of spleen was revealed. The results showed that 31 and 36 potential biomarkers were found in the spleen of *A. schlegelii* challenged by *V. parahaemolyticus* 48 and 96 h respectively, which were involved in 9 and 10 metabolic pathways ($P < 0.05$). The immune function of *A. schlegelii* spleen was enhanced by selenized glycosaminoglycan through multiple metabolic pathways. The study results provided the scientific basis for elucidating the immunoenhancement mechanism of selenized glycosaminoglycan and rational development of immune enhancers.

Key words UPLC-QTOF-MS; Untargeted metabolomics; *Acanthopagrus schlegelii*; Selenized glycosaminoglycan; Immunomodulation

黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)因具有广温、广盐性、抗逆性强、生长迅速、肉质好等优点而成为我国东南沿海地区及太平洋西岸海水养殖的经济鱼类^[1]。随着海洋经济的不断发展,黑鲷养殖集约化程度越来越高,海水中病原菌种类越来越多,黑鲷的发病率也越来越高^[2]。具有嗜盐性的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)广泛附着在海产品表面,是鱼类弧菌病中危害最大的病原菌之一^[3],是海水养殖黑鲷的主要危害因子。目前已有利用添加免疫增强剂的饲料饲喂海水鱼类来防治疾病的文献报道^[4-5]。硒是海鱼机体必需的微量元素之一^[6],它参与体内一些决定性的新陈代谢。通过化学修饰方法将多糖与无机硒结合,获得硒化氨基多糖^[7]。硒化氨基多糖的生物活性普遍高于硒和多糖,更易于吸收和利用^[8]。目前已有关于硒化氨基多糖作为增强适应性免疫性潜力的含硒膳食补充剂^[9]的报道。目前关于外源硒可以提高黑鲷幼鱼的生长性能和血清免疫活性的相关文献^[10],但关于硒化氨基多糖对黑鲷免疫调节机制的研究报道较少。

代谢组学是以组群指标分析为基础、以高通量检测和数据处理为手段、以信息建模与系统整合为目标的系统生物学,可以直接反映机体内生物化学过程和状态的变化,在系

统研究生物内源性小分子代谢物的整体和动态变化规律上具有独特优势^[11-14]。目前代谢组学分析技术应用比较广泛的主要有核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术和高分辨质谱(high-resolution mass spectrometers, HRMS)技术2种。NMR技术因具有不损失检测样品且重复性良好等特点而被广泛应用于代谢组学中^[15-17],检测灵敏度相对较低、不能完全反映代谢组学中的变化是该技术的主要缺点^[18]。HRMS技术与色谱联用可获得目标化合物的相对分子量及结构信息,已成为代谢组学研究的主要技术手段^[19-20]。笔者采用高通量、高灵敏度、高分辨率的UPLC-QTOF-MS技术,结合非靶向代谢组学方法,研究硒化氨基多糖调节攻毒后黑鲷免疫力的潜在机制和靶标途径,旨在为黑鲷免疫增强剂的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物试验及样本制备 低聚氨基多糖(low molecular aminopolysaccharide, LA)分子量约50 ku;自制硒化低聚氨基多糖,其中硒有效含量为27.3 mg/g。黑鲷幼鱼由浙江省海洋水产研究所实验场提供,分组前停饲1 d,将初始体重(13.00±0.20)g的健康黑鲷幼鱼随机分成2组,每组3个重复,每个重复25尾,放入容积310 L(水体积260 L)的玻璃纤维缸内微流水式饲养。试验组饲喂添加0.6 mg Se/kg 硒化氨基多糖的饲料,对照组饲喂未添加硒化氨基多糖的饲料,试验期为8 w,饲喂试验结束后停饲,黑鲷腹腔注射0.2 mL

基金项目 国家国际科技合作专项项目(2015DFA30980)。

作者简介 周秀锦(1974—),女,河南商人,高级工程师,硕士,从事食品质量安全与控制研究。

收稿日期 2021-05-12

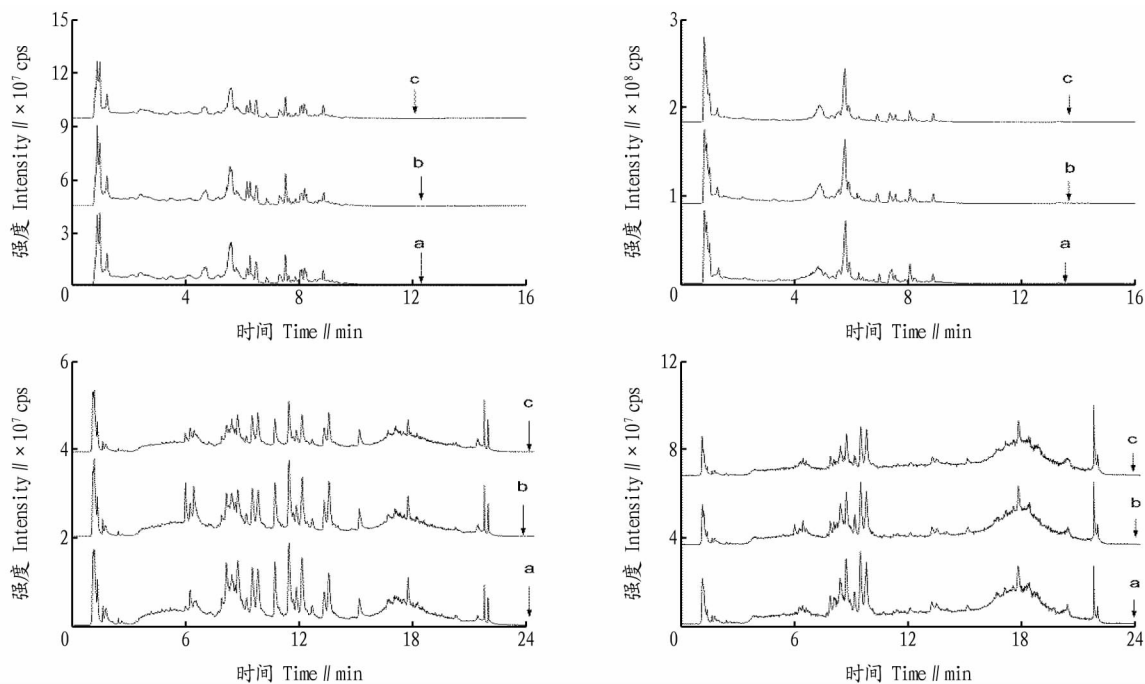
副溶血弧菌活菌液(副溶血弧菌在普通营养琼脂培养基上 28 ℃ 下过夜培养,然后用灭菌生理盐水洗脱,稀释到试验所需菌液浓度 5.5×10^8 CFU/mL 时攻毒,观察黑鲟的健康状况并统计死亡率。对照组黑鲟脾脏分别在饥饿 48 和 96 h 时,使用 MS-222(间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐 60 mg/L,色谱纯,美国 Sigma-Aldrich 公司产品)麻醉后摘取;试验组在攻毒试验 48 和 96 h 时摘取黑鲟脾脏组织,每组 10 个平行样,称重后液氮快速冷冻,置于 -80 ℃ 超低温冰箱中保存,备用。

1.2 黑鲟脾脏样品前处理、超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术分析及数据处理 参考该课题组前期研究所用代谢组学分析方法^[21]进行黑鲟脾脏样品前处理、液相色谱分离、黑鲟脾脏样品中的内源性代谢物检测。利用 XCMS^{plus} 结合上海爱博才思分析仪器贸易有限公司(SCIEX)独有的内源性代谢物二级谱库(Metabolite HR MS² library,该谱库包含代谢物的分子式、分子量、CAS 码、结构式、一级质谱及二级质谱等信息)对质谱采集的数据进行全面的非靶向代谢组学分析^[22]。采用 XCMS^{plus} 软件进行内源性代谢物的主成分分

析(principal component analysis, PCA),使用 MetaboAnalyst 4.0 网站软件在线进行代谢通路分析。

2 结果与分析

2.1 脾脏 PCA 轮廓分析 黑鲟在攻毒 48 和 96 h 时均未发生死亡现象,个别鱼体在攻毒 72 h 时表现出摄食能力降低、游动相对缓慢,其他临床症状均不明显。在快速分析试验中,采用 UPLC 分析系统可以获得较高的重现性和分离效果。该试验中醋酸铵和醋酸组合的流动相为大分子代谢物和小分子代谢物提供了最佳的色谱条件。采用 2 种不同性质的色谱柱对脾脏样品进行分离:极性小的小分子代谢物在 T₃ 色谱柱上呈现较好的分离,极性大的小分子代谢物则在 HILLIC 色谱柱上分离效果最好;在正、负离子模式下对对照组、试验组攻毒 48 和 96 h 时的脾脏样本进行 QTOF-MS/MS 分析和数据采集。图 1 为各组样品典型的总离子流色谱图(total ion chromatograms, TIC)。由图 1 可知,对照组攻毒 48 和 96 h 时黑鲟脾脏的指纹图谱存在一定的差异,表明试验组黑鲟脾脏的内源性代谢物主要组分有明显变化。



注: A.HILLIC、负离子模式; B.HILLIC、正离子模式; C.T₃、负离子模式; D.T₃、正离子模式; a.对照组; b.攻毒 48 h; c.攻毒 96 h

Note: A.HILLIC, ES⁻; B.HILLIC, ES⁺; C.T₃, ES⁻; D.T₃, ES⁺; a.Control group; b.Virus challenge after 48 h; c.Virus challenge after 96 h

图 1 不同采集模式下各组样品典型色谱图样品 TIC 图谱

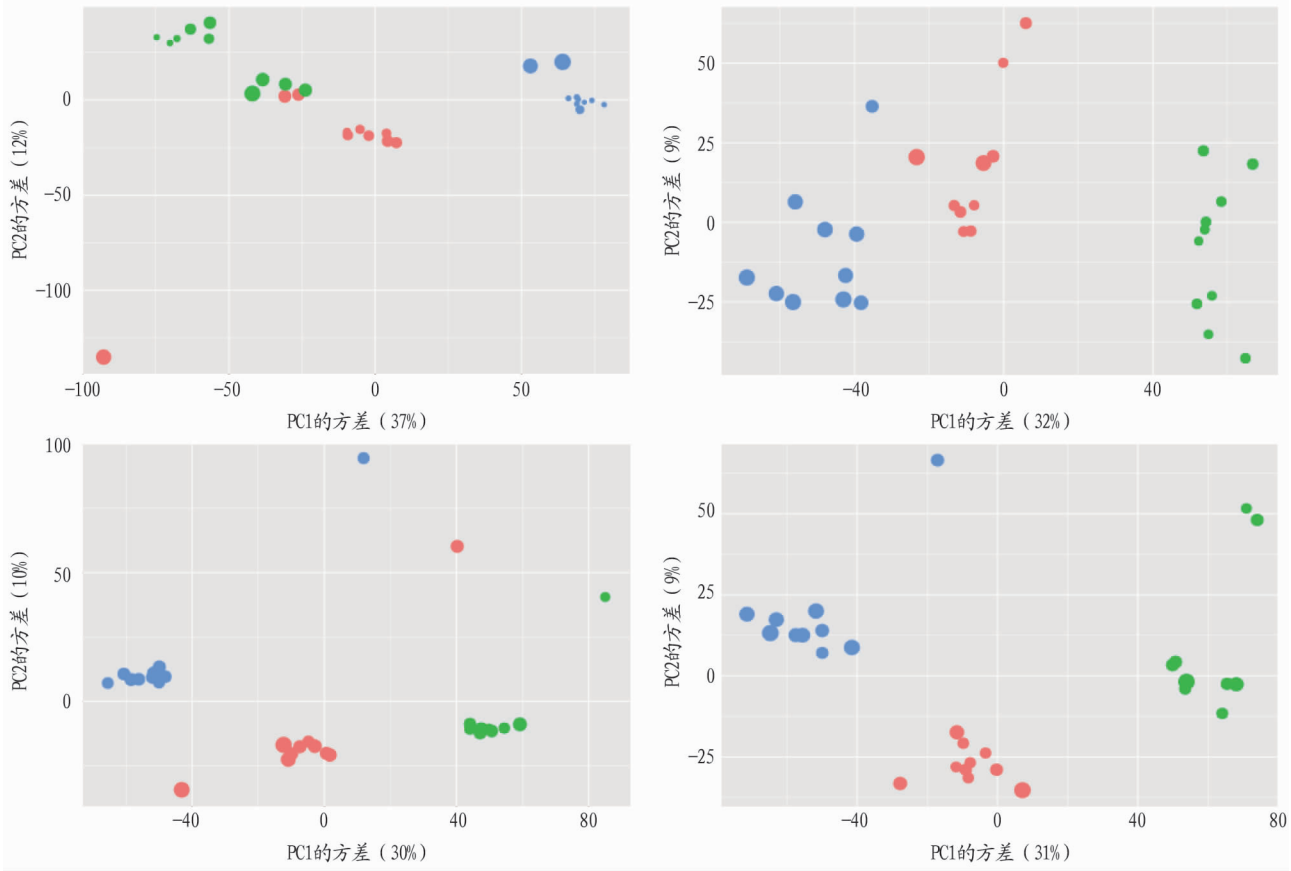
Fig.1 Typical TIC patterns of each group of samples under different acquisition modes

为了考察饲喂硒化氨基多糖后副溶血弧菌活菌液攻毒后黑鲟脾脏代谢物的变化,使用 XCMS^{plus} 软件分析在正、负离子模式下采集的高分辨质谱数据,采取主成分分析(PCA)方法自动进行 PCA 轮廓分析。黑鲟脾脏代谢 PCA 轮廓分析结果见图 2。从图 2 可以看出,试验组攻毒 48 和 96 h 后,与对照组相比,在正、负离子模式下经 HILLIC 色谱柱和 T₃ 色谱柱分离的脾脏代谢物主成分均有明显的分离趋势,无交叉和重叠现象,表明试验组在副溶血弧菌攻毒后黑鲟脾脏代谢产物指纹图谱均发生了显著变化。

2.2 潜在生物标志物的鉴定 潜在生物标志物的鉴定方法为试样经色谱柱分离后被离子化为不同质量的离子,进入质谱质量分析器,形成赖以定性的一级和二级质谱信息,通过一级质谱信息可以确定相对分子量,利用二级质谱信息可以获得其结构碎片信息。将经 T₃ 色谱柱和 HILLIC 色谱柱分离,在正、负离子模式下的高分辨质谱检测结果,经检索 Metabolite HR MS² library 数据库(SCIEX)发现,饲喂硒化氨基多糖的试验组攻毒 48 h 时共准确鉴定出 31 个有显著差异的潜在生物标志物,与对照组相比除甜菜碱水平升高外,30 种

潜在生物标志物水平呈现明显的降低趋势;攻毒 96 h 时共准确鉴定出 36 个有显著差异的潜在生物标志物,与攻毒 48 h 时相比,除了 L-精氨酸和鸟氨酸水平升高外,其他 34 种潜在生物标志物水平均呈明显下降趋势;在整个试验过程中,4-

胍基丁酸和 α-亚麻酸呈现先上升(攻毒 48 h)后下降(攻毒 96 h)的趋势。这表明硒化氨基多糖对黑鲷脾脏具有显著的免疫调节作用。具体结果见表 1。



注:A.T₃、负离子模式;B.T₃、正离子模式;C.HILIC、负离子模式;D.HILIC、正离子模式;红色表示攻毒 48 h;蓝色表示攻毒 96 h;绿色表示对照组
Note:A.T₃,ESI⁻;B.T₃,ESI⁺;C.HILIC,ESI⁻;D.HILIC,ESI⁺;The red represent virus challenge after 48 h;The blue represent virus challenge after 96 h;The green represent the control group

图 2 不同采集模式下脾脏代谢分析的 PCA 轮廓分析
Fig.2 PCA profile analysis of spleen metabolic analysis under different acquisition models

表 1 非靶向代谢组学分析的差异代谢物

Table 1 Differential metabolites obtained from untargeted metabolomics analysis

序号 No.	名称 Name	分子式 Formula	色谱柱/ 离子模式 Chromatographic column /Ionization mode	质荷比 Mass-to- charge ratio	保留时间 Retention time min	修正 P 值 Corrected P value	攻毒时间 Infection time//h
1	4-胍基丁酸	C ₅ H ₁₁ N ₃ O ₂	T ₃ /ESI ⁻	144.077 9	1.30	2.67×10 ⁻⁷	96
2	腺嘌呤	C ₅ H ₅ N ₅	HILIC/ESI ⁻	134.047 2	2.24	2.22×10 ⁻⁵	48
3	腺苷	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	T ₃ /ESI ⁻	134.047 2	3.53	8.56×10 ⁻⁸	96
			HILIC/ESI ⁺	268.104 0	4.88	6.80×10 ⁻³	48
			HILIC/ESI ⁺	268.104 0	4.88	2.26×10 ⁻⁵	96
4	腺苷(一磷)酸	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	T ₃ /ESI ⁺	348.070 4	1.66	2.01×10 ⁻³	96
5	α-亚麻酸	T ₃ H ₃₀ O ₂	T ₃ /ESI ⁻	277.217 3	11.15	5.42×10 ⁻¹⁰	96
6	花生酸	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	T ₃ /ESI ⁻	311.295 6	16.69	1.68×10 ⁻⁷	96
7	精氨基琥珀酸	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₆	HILIC/ESI ⁻	289.115 4	9.49	6.68×10 ⁻⁷	96
8	甜菜碱	C ₅ H ₁₁ NO ₂	T ₃ /ESI ⁺	118.086 3	1.20	2.77×10 ⁻³	48
9	肌酸	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	HILIC/ESI ⁻	130.062 2	7.64	5.23×10 ⁻⁵	48
10	脱氧腺苷一磷酸	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₆ P	HILIC/ESI ⁻	130.062 2	7.64	2.98×10 ⁻¹¹	96
			HILIC/ESI ⁺	332.075 4	8.23	3.28×10 ⁻³	48
			HILIC/ESI ⁻	330.060 9	8.19	3.04×10 ⁻¹¹	96
11	脱氧胞苷	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₄	HILIC/ESI ⁻	226.083 3	5.91	5.14×10 ⁻⁵	48

接下表

续表 1

序号 No.	名称 Name	分子式 Formula	色谱柱/ 离子模式 Chromatographic column /Ionization mode	质荷比 Mass-to- charge ratio	保留时间 Retention time min	修正 <i>P</i> 值 Corrected <i>P</i> value	攻毒时间 Infection time//h
12	脱氧鸟苷	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	T ₃ /ESI ⁻ HILLIC/ESI ⁻	266.089 5 251.078 6	2.14 5.12	8.21×10 ⁻⁶ 4.95×10 ⁻⁵	48 96
13	D-核糖-5-磷酸	C ₅ H ₁₁ O ₈ P	HILLIC/ESI ⁻	229.011 9	8.57	1.24×10 ⁻⁵	48
14	芥(子)酸	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	T ₃ /ESI ⁻	337.311 2	16.71	8.11×10 ⁻¹¹	96
15	甘油酸	C ₃ H ₆ O ₄	T ₃ /ESI ⁻	105.019 3	1.26	2.75×10 ⁻³	48
16	鸟苷	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	T ₃ /ESI ⁻ T ₃ /ESI ⁻	282.084 4 282.084 4	1.80 1.80	2.47×10 ⁻⁶ 4.40×10 ⁻¹¹	48 96
17	鸟苷一磷酸	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₈ P	HILLIC/ESI ⁺ T ₃ /ESI ⁻	364.065 3 362.050 7	8.80 1.34	3.87×10 ⁻³ 3.14×10 ⁻³	48 96
18	组胺	C ₅ H ₉ N ₃	HILLIC/ESI ⁺	112.086 9	5.86	1.37×10 ⁻³	96
19	次黄(嘌呤核)苷	C ₁₀ H ₁₂ N4O5	T ₃ /ESI ⁺ T ₃ /ESI ⁻	269.088 0 267.073 5	1.74 1.77	2.00×10 ⁻⁹ 1.10×10 ⁻¹¹	48 96
20	L-精氨酸	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	T ₃ /ESI ⁻	173.104 4	1.08	1.52×10 ⁻⁸	96
21	左旋谷氨酸	C ₅ H ₉ NO ₄	T ₃ /ESI ⁻	146.045 9	1.18	4.41×10 ⁻¹³	96
22	左旋谷酰胺	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	HILLIC/ESI ⁻ HILLIC/ESI ⁻	145.061 9 145.061 9	8.04 8.04	5.93×10 ⁻⁸ 7.23×10 ⁻¹³	48 96
23	L-组氨酸	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	T ₃ /ESI ⁻ T ₃ /ESI ⁻	154.062 2 154.062 2	1.08 1.08	5.66×10 ⁻⁷ 2.16×10 ⁻⁹	48 96
24	亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	T ₃ /ESI ⁻	279.233 0	12.18	1.48×10 ⁻¹⁰	96
25	L-异亮氨酸	C ₆ H ₁₃ NO ₂	T ₃ /ESI ⁺ T ₃ /ESI ⁻	132.101 9 130.087 4	1.95 1.95	2.31×10 ⁻⁸ 3.22×10 ⁻¹²	48 96
26	L-亮氨酸	C ₆ H ₁₃ NO ₂	T ₃ /ESI ⁺ HILLIC/ESI ⁻	132.101 9 130.087 4	1.94 6.75	2.76×10 ⁻⁶ 2.13×10 ⁻⁵	48 96
27	L-蛋氨酸	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	HILLIC/ESI ⁺	150.058 3	7.10	2.42×10 ⁻³	96
28	L-苯丙氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₂	T ₃ /ESI ⁺ HILLIC/ESI ⁻	166.086 3 164.071 7	2.75 6.65	2.70×10 ⁻⁸ 3.74×10 ⁻⁷	48 96
29	L-脯氨酸	C ₅ H ₉ NO ₂	T ₃ /ESI ⁺ HILLIC/ESI ⁺	116.070 6 116.070 6	1.23 7.38	2.81×10 ⁻⁵ 9.72×10 ⁻¹¹	48 96
30	L-丝氨酸	C ₃ H ₇ NO ₃	HILLIC/ESI ⁺ HILLIC/ESI ⁺	106.049 9 106.049 9	8.11 8.11	5.73×10 ⁻⁵ 1.45×10 ⁻⁸	48 96
31	L-苏氨酸	C ₄ H ₉ NO ₃	HILLIC/ESI ⁺ HILLIC/ESI ⁺	120.065 5 120.065 5	7.80 7.80	1.04×10 ⁻¹¹ 6.24×10 ⁻¹²	48 96
32	L-色氨酸	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	T ₃ /ESI ⁻	203.082 6	3.79	1.46×10 ⁻¹³	48
33	L-酪氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₃	T ₃ /ESI ⁺ T ₃ /ESI ⁺	182.081 2 182.081 2	1.64 1.64	8.63×10 ⁻¹³ 2.41×10 ⁻¹⁰	48 96
34	L-缬氨酸	C ₅ H ₁₁ NO ₂	T ₃ /ESI ⁻ T ₃ /ESI ⁻	116.071 7 116.071 7	1.33 1.33	3.96×10 ⁻⁵ 9.22×10 ⁻⁷	48 96
35	神经酸	C ₂₄ H ₄₆ O ₂	T ₃ /ESI ⁻	365.342 5	17.60	3.85×10 ⁻⁶	96
36	十八烯酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	T ₃ /ESI ⁻	281.248 6	13.60	1.00×10 ⁻⁷	96
37	鸟氨酸	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	T ₃ /ESI ⁻	131.082 6	1.08	8.48×10 ⁻⁵	96
38	泛酸	C ₉ H ₁₇ NO ₅	HILLIC/ESI ⁻	218.103 4	3.22	2.5×10 ⁻²	48
39	苯乙醛	C ₈ H ₈ O	HILLIC/ESI ⁻ HILLIC/ESI ⁻	119.050 2 119.050 2	1.82 1.82	2.65×10 ⁻³ 4.40×10 ⁻⁴	48 96
40	硬脂酸	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	T ₃ /ESI ⁻	283.264 3	15.22	1.08×10 ⁻⁶	96
41	胸苷	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅	HILLIC/ESI ⁻	241.083 0	2.30	1.00×10 ⁻¹⁰	48
42	胸腺嘧啶	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	T ₃ /ESI ⁻	125.035 7	2.04	1.66×10 ⁻¹¹	48
43	尿嘧啶	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	T ₃ /ESI ⁻	111.020 0	1.35	5.95×10 ⁻³	48
44	尿苷	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	T ₃ /ESI ⁻	243.062 3	1.63	2.32×10 ⁻⁷	48
45	5-单磷酸尿苷	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₉ P	HILLIC/ESI ⁻	323.028 6	8.23	2.10×10 ⁻⁴	48
46	咪唑丙烯酸	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	HILLIC/ESI ⁺	139.050 2	3.46	1.10×10 ⁻³	96
47	脱氧肌苷	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₄	HILLIC/ESI ⁻ HILLIC/ESI ⁻	251.078 6 251.078 6	5.12 5.12	3.36×10 ⁻⁵ 1.52×10 ⁻⁷	48 96

2.3 代谢途径分析 根据 Metabolite HR MS² library 数据库检索得出的潜在生物标志物,录入 MetaboAnalyst 4.0 网站,以鱼为分析模型,进行相关代谢通路分析。经分析发现,副溶血弧菌攻毒 48 h 时,黑鲷脾脏代谢物中有显著差异的 31 种潜在生物标志物主要指向 8 条代谢通路(*P*<0.05);攻毒 96 h 时,黑鲷脾脏代谢物中有显著差异的 36 种潜在生物标志物主要指向 10 条代谢通路(*P*<0.05),主要涵盖缬氨酸、亮氨酸

和异亮氨酸的生物合成,氨酰转移核糖核酸合成、嘌呤代谢等,具体见表 2~3。

2.4 硒化氨基多糖对黑鲷脾脏代谢的影响 脾脏是鱼类的造血组织和重要的外周免疫器官,在其发挥免疫作用的过程中其内源性代谢物也发生相应变化。在整个试验过程中,黑鲷脾脏组织在副溶血弧菌攻毒 48 和 96 h 时可鉴定出的代谢物种类和代谢模式明显不同,揭示了其内源性代谢物的种数

表 2 MetPA 分析攻毒 48 h 后的代谢通路分析结果

Table 2 The analysis results of metabolic pathways after virus challenge 48 h by MetPA

序号 No.	代谢通路 Metabolic pathways	代谢物总量 Total amount of met- abolites	参与通路 代谢物数量 Number of metabolites involved in the pathway	代谢物种类 Compounds of metabolites	P 值 P value
1	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成	13	5	L-苏氨酸、L-亮氨酸、L-缬氨酸、L-异亮氨酸、L-鸟氨酸	4.37×10^{-4}
2	氨基酰基转移核糖核酸生物合成	67	11	L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-谷氨酰胺、L-丝氨酸、L-缬氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-脯氨酸	8.22×10^{-4}
3	嘌呤代谢	66	10	D-5-磷酸核酮糖、L-谷氨酰胺、腺苷、一磷酸脱氧腺苷、脱氧肌苷、一磷酸鸟苷、肌苷、脱氧鸟苷、鸟苷、腺嘌呤	2.73×10^{-3}
4	嘧啶代谢	41	7	L-谷氨酰胺、尿苷酸、尿苷、脱氧胞苷、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶	6.23×10^{-3}
5	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成	4	2	L-苯丙氨酸、L-酪氨酸	1.73×10^{-2}
6	苯丙氨酸代谢	11	3	苯乙醛、L-苯丙氨酸、L-酪氨	2.01×10^{-2}
7	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	31	5	甘油酸、甜菜碱、L-丝氨酸、L-苏氨酸、肌酸	2.61×10^{-2}
8	泛酸和辅酶 A 生物合成	15	3	泛酸、L-缬氨酸、尿嘧啶	4.72×10^{-2}

表 3 MetPA 分析攻毒 96 h 后的代谢通路分析结果

Table 3 The analysis results of metabolic pathways after virus challenge 96 h by MetPA

序号 No.	代谢通路 Metabolic pathways	代谢物总量 Total amount of met- abolites	参与通路 代谢物数量 Number of metabolites involved in the pathway	代谢物种类 Compounds of metabolites	P 值 P value
1	氨基酰基转移核糖核酸生物合成	67	13	L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-精氨酸、L-谷氨酰胺、L-丝氨酸、L-蛋氨酸、L-缬氨酸、L-异亮氨酸、L-苏氨酸、L-酪氨酸、L-脯氨酸、L-谷氨酸、L-亮氨酸	6.46×10^{-4}
2	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成	13	5	L-苏氨酸、L-亮氨酸、L-缬氨酸、L-异亮氨酸、L-鸟氨酸	6.45×10^{-4}
3	嘌呤代谢	66	9	单磷酸腺苷、腺苷、脱氧腺苷酸、脱氧肌苷、单磷酸鸟苷、脱氧鸟苷、鸟苷、腺嘌呤、肌苷	6.1×10^{-3}
4	精氨酸和脯氨酸代谢	43	8	L-谷氨酰胺、鸟氨酸、精氨基丁酸、L-精氨酸、L-谷氨酸、L-脯氨酸、肌酸、4-胍丁酸	9.87×10^{-3}
5	组氨酸代谢	14	4	L-谷氨酸、尿苷酸、L-组氨酸、组胺	1.47×10^{-2}
6	氮素代谢	9	3	L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、L-组氨酸	2.25×10^{-2}
7	不饱和脂肪酸的生物合成	42	7	L 神经酸、芥酸、硬脂酸、花生四烯酸、油酸、亚油酸、A-亚麻酸	2.78×10^{-2}
8	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成	4	2	L-苯丙氨酸、L-酪氨酸	2.83×10^{-2}
9	苯丙氨酸代谢	11	3	苯乙醛、L-苯丙氨酸、L-酪氨酸	3.97×10^{-2}
10	D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢	5	2	L-谷氨酸、L-谷氨酰胺	4.49×10^{-2}

呈现明显的动态变化。内源性代谢物中氨基酸是构成机体免疫系统的基本结构物质,与免疫系统的组织发生、器官发育以及功能发挥起着重要的作用。该研究试验组黑鲷脾脏中脯氨酸、谷氨酸、赖氨酸等多种氨基酸的含量明显低于对照组,表明硒化氨基多糖促进了黑鲷机体内的蛋白质和氨基酸代谢;代谢通路分析结果证实 14 种氨基酸参与了机体免疫,其中谷氨酸和谷氨酰胺在攻毒 48 h 时参与氨基酰基转移核糖核酸生物合成、嘧啶代谢和嘌呤代谢 3 条主要代谢通路,在攻毒 96 h 时参与氨基酰基转移核糖核酸生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢和组氨酸代谢等 5 条主要代谢通路。机体内谷氨酸可能是对细胞免疫和体液免疫均有一定抑制作

用的潜在抑制剂。谷氨酸的前体是谷氨酰胺,谷氨酰胺通过减少 H₂O₂ 的积累、保护 DNA 免受损害而发挥着重要的抗氧化作用^[23],同时促进了巨噬细胞和淋巴细胞的有丝分裂和分化增殖,增加了机体炎症因子的产生,增强了免疫功能^[24-25],攻毒后谷氨酸和谷氨酰胺水平呈现下降趋势,提示可能是因为硒化氨基多糖参与了调节脾脏免疫反应;缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸属于机体必需氨基酸中的支链氨基酸(BCAAs),其含量占动物肌肉蛋白质中必需氨基酸含量的 35%^[26],具有蛋白质合成、能量产生、神经传递和免疫功能^[27]。该研究中试验组脾脏样品中的 BCAAs 水平在攻毒后均呈现下降的趋势,表明 BCAAs 通过线粒体的支链氨基转

移酶被分解代谢为乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A, 然后进入三羧酸循环[其中亮氨酸产生乙酰辅酶 A (CoA) 及乙酰乙酯 CoA、缬氨酸产生琥珀酸单酯 CoA、异亮氨酸产生乙酰 CoA 及琥珀酸单酯 CoA]^[28], 参与机体能量代谢来促进乳酸-葡萄糖的循环和通过促进糖异生保持体内能量平衡, 减少乳酸的累积, 抑制脑内 5-羟色胺的合成, 起到缓解肌肉酸痛和延缓疲劳发生发展的效果^[29]。该研究黑鲷脾脏内多种氨基酸水平的变化现象表明了硒化氨基多糖对黑鲷脾脏的免疫增强调节功能与氨基酸代谢有密切关系。

甜菜碱具有活性甲基, 作为一种直接有效的甲基供体, DNA、RNA、蛋白质和许多其他重要的含甲基 (CH₃) 代谢化合物都需要甲基基团。对甲基群代谢和调控的研究表明, 甲基供体、代谢与疾病之间存在着显著的相关关系; 同时, 甜菜碱可以增强细胞的保水能力, 可能是通过控制细胞体积、稳定蛋白质和维持细胞膜完整性, 保护细胞内酶免受渗透或温度引起的灭活^[30-31]。已有文献报道甜菜碱能降低炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的表达, 具有降低炎症相关疾病发生率的潜力^[32-33]。它们在免疫反应中的重要性可能是由于其在免疫识别和抗体产生过程中发生 DNA 甲基化^[34], 也能改善鱼类红细胞生成、血清蛋白质和脂肪水平、抗氧化状态、免疫功能、神经传递^[30]。脾脏内代谢物甜菜碱水平在攻毒 48 h 时呈相对上调趋势, 96 h 时呈现下调趋势, 提示硒化氨基多糖可能干预了脾脏甲基循环的生化通路, 从而增强了黑鲷脾脏的抗病力。

精氨酸和脯氨酸可转化为鸟氨酸, 鸟氨酸攻毒 96 h 的水平相对上调, 其原因可能是副溶血弧菌攻毒后黑鲷机体内蛋白质分解加速, 鸟氨酸含量上升, 通过鸟氨酸循环的转氨基作用, 将毒性较高的 -NH₂ 转化为低毒的尿素排出体外^[35], 同时鸟氨酸参与了谷氨酸、谷氨酰胺和脯氨酸的生物合成, 从而增强黑鲷脾脏的免疫力。在核苷酸代谢过程中, 嘧啶、嘌呤等碱基成分对单胺氧化酶的活性具有抑制作用, 能够提高活性氧自由基的清除能力, 增强小鼠的抗氧化作用^[36]。该研究中试验组黑鲷脾脏中嘧啶、嘌呤在攻毒后均呈现下降趋势, 说明黑鲷体内的氧化应激状态减弱。

3 结论

该研究采用 UPLC-QTOF-MS 技术在副溶血弧菌活菌液攻毒后对饲喂硒化氨基多糖的黑鲷脾脏进行了代谢组学研究。分别采用 T₃ 和 HILIC 2 种色谱柱分离结合 XCMS^{plus} 方法进行分析, 攻毒 96 h 时筛选出 36 个有显著差异的潜在生物标志物, 经 MetaboAnalyst 4.0 网站软件分析, 饲喂硒化氨基多糖对黑鲷脾脏的 10 个代谢通路产生了影响。该研究结果表明硒化氨基多糖发挥免疫增强作用与氨基酸代谢存在密切的关系, 为今后深入探讨硒化氨基多糖的免疫增强机制和合理开发免疫增强剂奠定了实验基础。

参考文献

- [1] SHAO Q J, MA J J, XU Z R, et al. Dietary phosphorus requirement of juvenile black seabream, *Sparus macrocephalus* [J]. *Aquaculture*, 2008, 277 (1/2): 92-100.
- [2] 黄浦江, 彭景书. 黑鲷常见病及其防治 [J]. *农技服务*, 2016, 33 (9): 1-2.

- [3] 吴后波, 潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病 [J]. *中国水产科学*, 2001, 8 (1): 89-93.
- [4] 吴曼丽, 陈贝, 刘洁, 等. 口服投喂抗菌肽 Scygonadin 对黑鲷免疫及抗氧化指标的影响 [J]. *生物技术世界*, 2015 (11): 4-7.
- [5] 李春震, 胡颀, 唐雪莲, 等. 人参多糖对黑鲷生长性能及抗氧化酶 mRNA 表达的影响 [J]. *华中农业大学学报*, 2015, 34 (6): 94-100.
- [6] BIRRINGER M, PILAWA S, FLOHÉ L. Trends in selenium biochemistry [J]. *Nat Prod Rep*, 2002, 19 (6): 693-718.
- [7] STAAF M, YANG Z, HUTTUNEN E, et al. Structural elucidation of the viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* Lb161 [J]. *Carbohydr Res*, 2000, 326 (2): 113-119.
- [8] 唐福, 周静, 谷连坤, 等. 富硒大蒜对体内外人胃癌细胞生长的影响 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2001, 23 (6): 461-464.
- [9] WANG J L, ZHAO B T, WANG X F, et al. Synthesis of selenium-containing polysaccharides and evaluation of antioxidant activity *in vitro* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 51 (5): 987-991.
- [10] 陈星灿, 王磊, 相兴伟, 等. 不同类型硒对黑鲷幼鱼生长及血清免疫指标的影响 [J]. *水产科学*, 2018, 37 (5): 577-583.
- [11] WAGNER S, SCHOLZ K, SIEBER M, et al. Tools in metabolomics: An integrated validation approach for LC-MS metabolic profiling of mercapturic acids in human urine [J]. *Anal Chem*, 2007, 79 (7): 2918-2926.
- [12] KIRKWOOD J S, MAIER C, STEVENS J F. Simultaneous, untargeted metabolic profiling of polar and nonpolar metabolites by LC-Q-TOF mass spectrometry [J]. *Curr Protoc Toxicol*, 2013, 4 (1): 1-12.
- [13] YU D Y, RUPASINGHE T W T, BOUGHTON B A, et al. A high-resolution HPLC-QqTOF platform using parallel reaction monitoring for in-depth lipid discovery and rapid profiling [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1026: 87-100.
- [14] FATHI F, BRUN A, ROTT K H, et al. NMR-based identification of metabolites in polar and non-polar extracts of avian liver [J]. *Metabolites*, 2017, 7 (4): 1-9.
- [15] NIU Q Y, LI Z Y, DU G H, et al. ¹H NMR based metabolomic profiling revealed doxorubicin-induced systematic alterations in a rat model [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 118: 338-348.
- [16] JÉGOU M, GONDRET F, LALANDE-MARTIN J, et al. NMR-based metabolomics highlights differences in plasma metabolites in pigs exhibiting diet-induced differences in adiposity [J]. *Eur J Nutr*, 2016, 55 (3): 1189-1199.
- [17] XU H D, WANG J S, LI M H, et al. ¹H NMR based metabolomics approach to study the toxic effects of herbicide butachlor on goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2015, 159: 69-80.
- [18] EMWAS A H M. The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1277: 161-193.
- [19] ALZWEIRI M, WATSON D G, PARKINSON J A. Metabonomics as a clinical tool of analysis: LC-MS approaches [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2012, 36 (1): 94-115.
- [20] CASTRO-PUYANA M, HERRERO M. Metabolomics approaches based on mass spectrometry for food safety, quality and traceability [J]. *Trends Anal Chem*, 2013, 52: 74-87.
- [21] 周秀锦, 杨会成, 张静, 等. 基于肝脏代谢组分析研究低聚硒化氨基多糖对黑鲷的免疫调节作用 [J]. *色谱*, 2019, 37 (9): 939-945.
- [22] SMITH C A, WANT E J, O' MAILLE G, et al. XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification [J]. *Anal Chem*, 2006, 78 (3): 779-787.
- [23] WU Z H, JIN L, ZHENG W Y, et al. NMR-based serum metabolomics study reveals a innovative diagnostic model for missed abortion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496 (2): 679-685.
- [24] GU M, BAI N, XU B Y, et al. Protective effect of glutamine and arginine against soybean meal-induced enteritis in the juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 70: 95-105.
- [25] SUN L D, YI L Z, ZHANG C, et al. Glutamine is required for snakehead fish vesiculovirus propagation via replenishing the tricarboxylic acid cycle [J]. *J Gen Virol*, 2016, 97 (11): 2849-2855.
- [26] RENNIE M J, BOHÉ J, SMITH K, et al. Branched-chain amino acids as fuels and anabolic signals in human muscle [J]. *J Nutr*, 2006, 136: 264S-268S.
- [27] MONIRUJJAMAN M, FERDOUSE A. Metabolic and physiological roles of branched-chain amino acids [J]. *Adv Mol Biol*, 2014, 2014: 1-6.
- [28] SHIMOMURA Y, MURAKAMI T, NAKAI N Y, et al. Exercise promotes BCAA catabolism: Effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise [J]. *J Nutr*, 2004, 134: 1583S-1587S.

为主要食物来维持自身的生长和繁殖,对水体起到净化作用;其排泄物能对浮游植物的繁殖和生长起促进作用,也有可能对水体造成污染。由于养殖种类、密度、方式及养殖海域的特性不同,关于贝类对生态环境的影响有不同的结果^[36]。因此,在贝类养殖时养殖密度要合理,防止因密度过大引起的海域富营养化,从而导致浮游植物大量繁殖。

参考文献

[1] HAVEN D S, MORALES-ALAMO R. Aspects of biodeposition by oysters and other invertebrate filter feeders [J]. *Limnology and oceanography*, 1966, 11(4): 487-498.

[2] KAUTSKY N, EVANS S. Role of biodeposition by *Mytilus edulis* in the circulation of matter and nutrients in a Baltic coastal ecosystem [J]. *Marine ecology progress series*, 1987, 38(3): 201-212.

[3] 周毅, 杨红生, 张福绥. 海水双壳类类的生物沉积及其生态效应 [J]. *海洋科学*, 2003, 27(2): 23-26.

[4] 刘鹏, 周毅, 王峰, 等. 浅水区(潮间带)滤食性贝类生物沉积的现场测定 [J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(2): 253-258.

[5] HECK K L JR, VALENTINE J F. Plant-herbivore interactions in seagrass meadows [J]. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 2006, 330(1): 420-436.

[6] ZHOU Y, YANG H S, LIU S L, et al. Feeding and growth on bivalve biodeposits by the deposit feeder *Stichopus japonicus* Selenka (Echinodermata: Holothuroidea) co-cultured in lantern nets [J]. *Aquaculture*, 2006, 256(1/2/3/4): 510-520.

[7] REUSCH T B H. Differing effects of eelgrass *Zostera marina* on recruitment and growth of associated blue mussels *Mytilus edulis* [J]. *Marine ecology progress series*, 1998, 167: 149-153.

[8] REUSCH T B H, CHAPMAN A R O, GRÖGER J P. Blue mussels *Mytilus edulis* do not interfere with eelgrass *Zostera marina* but fertilize shoot growth through biodeposition [J]. *Marine ecology progress series*, 1994, 108(3): 265-282.

[9] LEMMENS J, CLAPIN G, LAVERY P, et al. Filtering capacity of seagrass meadows and other habitats of Cockburn Sound, Western Australia [J]. *Marine ecology progress series*, 1996, 143(1): 187-200.

[10] PETERSON B J, HECK K L JR. Positive interactions between suspension-feeding bivalves and seagrass—a facultative mutualism [J]. *Marine ecology progress series*, 2001, 213: 143-155.

[11] 尹绍武, 廖经球, 黄海, 等. 东风螺生物学及养殖生态学研究进展 [J]. *水产科学*, 2007, 26(11): 632-636.

[12] 文海翔, 张涛, 杨红生, 等. 温度对硬壳蛤 *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758) 呼吸排世的影响 [J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(6): 549-554.

[13] 侯兴, 王颖, 刘天红, 等. 4 种常见经济滤食性贝类摄食活动对球等鞭金藻产生二甲基硫化物的影响 [J]. *渔业科学进展*, 2021, 42(5): 124-131.

[14] 费尊乐, 毛兴华, 朱明远, 等. 渤海生产力研究: 叶绿素 a、初级生产力与渔业资源开发潜力 [J]. *海洋水产研究*, 1991(12): 55-69.

[15] DRENNER R W, HAMBRIGHT K D, VINYARD G L, et al. Experimental study of size-selective phytoplankton grazing by a filter-feeding cichlid and the cichlid's effects on plankton community structure [J]. *Limnology and oceanography*, 1987, 32(5): 1138-1144.

[16] 王俊, 姜祖辉, 董双林. 滤食性贝类对浮游植物群落增殖作用的研究 [J]. *应用生态学报*, 2001, 12(5): 765-768.

[17] 王俊, 姜祖辉, 董双林. 栉孔扇贝对单细胞藻类生长间接作用的研究 [J]. *海洋水产研究*, 2001, 22(2): 42-46.

[18] 苏家齐, 朱长波, 李俊伟, 等. 流沙湾浮游植物群落特征季节变化及其与养殖活动的关系 [J]. *渔业科学进展*, 2018, 39(6): 11-23.

[19] 苏家齐, 朱长波, 李俊伟, 等. 流沙湾浮游动物群落特征及与鱼贝养殖的关系 [J]. *海洋渔业*, 2019, 41(3): 278-293.

[20] 黄翔鸽, 李长玲, 刘楚吾, 等. 两种微藻改善虾池环境增强凡纳对虾抗病力的研究 [J]. *水生生物学报*, 2002, 26(4): 342-347.

[21] 陈坤, 张前前, 史海燕, 等. 浮游植物计数方法比较研究 [J]. *海洋环境科学*, 2007, 26(4): 383-385.

[22] 成永旭. 生物饵料培养学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 66-67.

[23] 张继红, 吴桃, 高亚平, 等. 5 种滤食性贝类对牙鲆的粪便、残饵及网箱养殖区沉降物的摄食行为 [J]. *水产学报*, 2013, 37(5): 727-734.

[24] 柴雪良, 张炯明, 方军, 等. 乐清湾、三门湾主要滤食性养殖贝类碳收支的研究 [J]. *上海水产大学学报*, 2006, 15(1): 52-58.

[25] 罗杰, 刘皓, 刘楚吾, 等. 管角螺代谢物对浮游植物增殖的影响 [J]. *水产养殖*, 2016, 37(10): 1-6.

[26] 吴小平, 吴宗文, 高启平, 等. 碳汇渔业养殖工程装备及效能研究 [J]. *重庆水产*, 2012(2): 28-33.

[27] 李锋, 葛长字, 方建光, 等. 不同温度和接种密度下亚心形扁藻增殖的初步研究 [J]. *海洋水产研究*, 2007, 28(6): 61-66.

[28] 杨东方, 陈生涛, 胡均, 等. 光照、水温 and 营养盐对浮游植物生长重要影响大小的顺序 [J]. *海洋环境科学*, 2007, 26(3): 201-207.

[29] 钱振明, 邢荣莲, 汤宁, 等. 光照和盐度对 8 种底栖硅藻生长及其生理生化成分的影响 [J]. *烟台大学学报(自然科学与工程版)*, 2008, 21(1): 46-52.

[30] SOMMER U. Nutrient competition between phytoplankton species in multi-species chemostat experiments [J]. *Arch Hydrobiol*, 1983, 96(4): 399-416.

[31] 林忠洲, 徐善良, 邵波, 等. 不同氮磷质量浓度下青岛大扁藻和牟氏角毛藻的种间竞争关系 [J]. *宁波大学学报(理工版)*, 2013, 26(1): 12-17.

[32] 孙育平, 赵曰水. 不同氮、磷浓度下亚心形扁藻的生长及水体中氮、磷变化 [J]. *水产科学*, 2011, 30(4): 197-201.

[33] AUSTIN A P, RIDLEY-THOMAS C I, LUCEY W P, et al. Effects of nutrient enrichment on marine periphyton: Implications for abalone culture [J]. *Botanic marina*, 1990, 33(3): 235-239.

[34] 于瑾, 蒋霞敏, 梁洪, 等. 氮、磷、铁对牟氏角毛藻生长速率的影响 [J]. *水产科学*, 2006, 25(3): 121-124.

[35] 黄翔鸽, 李长玲, 刘楚吾, 等. 波吉卵囊藻对氮和磷营养盐需求的研究 [J]. *海洋通报*, 2002, 21(3): 32-38.

[36] 张继红. 滤食性贝类养殖活动对海域生态系统的影响及生态容量评估 [D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2008.

(上接第 86 页)

[29] GIL-SOLSONA R, NÁCHER-MESTRE J, LACALLE-BERGERON L, et al. Untargeted metabolomics approach for unraveling robust biomarkers of nutritional status in fasted gilthead sea bream (*Sparus aurata*) [J]. *PeerJ*, 2017, 5: 1-19.

[30] MUTHAPPA N A, GUPTA S, YENGKOKPAM S, et al. Lipotropes promote immunobiochemical plasticity and protect fish against low-dose pesticide-induced oxidative stress [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2014, 19(1): 61-81.

[31] HAJIREZAEI S, MIRVAGHEFI A, FARAHMAND H, et al. NMR-based metabolomic study on the toxicological effects of pesticide, diazinon on adaptation to sea water by endangered Persian sturgeon, *Acipenser persicus* fingerlings [J]. *Chemosphere*, 2017, 185: 213-226.

[32] GO E K, JUNG K J, KIM J Y, et al. Betaine suppresses proinflammatory signaling during aging: The involvement of nuclear factor- κ B via nuclear

factor-inducing kinase/1 κ B kinase and mitogen-activated protein kinases [J]. *J Gerontol: Series A*, 2005, 60(10): 1252-1264.

[33] OLLI K, LAHTINEN S, RAUTONEN N, et al. Betaine reduces the expression of inflammatory adipokines caused by hypoxia in human adipocytes [J]. *Br J Nutr*, 2013, 109(1): 43-49.

[34] KLASING K C, ADLER K L, REMUS J C, et al. Dietary betaine increases intraepithelial lymphocytes in the duodenum of coccidia-infected chicks and increases functional properties of phagocytes [J]. *J Nutr*, 2002, 132(8): 2274-2282.

[35] LIU Y W, WANG X H, LI Y Y, et al. Metabolomic analysis of short-term sulfamethazine exposure on marine medaka (*Oryzias latipes*) by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry [J]. *Aquat Toxicol*, 2018, 198: 269-275.

[36] 陈书明, 聂向庭. 鹿茸醇提物抗氧化作用的实验研究 [J]. *实验动物科学与管理*, 2000, 17(1): 22-24.