

## 研究报告

## 屎肠球菌对斑节对虾肠道代谢组学及炎症因子的影响

孙学亮<sup>1,2,3</sup>, 于宏<sup>2,3</sup>, 张震<sup>2,3</sup>, 初宇轩<sup>2,3</sup>, 陈成勋<sup>2,3</sup>, 郭永军<sup>2,3</sup>, 孙敬锋<sup>\*2,3</sup>, 赵林<sup>\*1</sup>

1 天津大学环境科学与工程学院, 天津 300072

2 天津农学院水产学院, 天津 300384

3 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384

孙学亮, 于宏, 张震, 初宇轩, 陈成勋, 郭永军, 孙敬锋, 赵林. 屎肠球菌对斑节对虾肠道代谢组学及炎症因子的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1958-1972.

SUN Xueliang, YU Hong, ZHANG Zhen, CHU Yuxuan, CHEN Chengxun, GUO Yongjun, SUN Jingfeng, ZHAO Lin. Effect of *Enterococcus faecium* on intestinal metabolomics and inflammatory factors of *Penaeus monodon*[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 1958-1972.

**摘要:** 【背景】屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)作为乳酸菌属的潜在益生菌, 因其具有良好的生物学特性在动物养殖中应用广泛, 但是屎肠球菌对肠道代谢组学的研究很少。【目的】以斑节对虾为试验动物, 初步探究屎肠球菌 R8 对肠道代谢组学及炎症因子的影响, 为屎肠球菌作为益生菌在对虾养殖中的应用提供理论基础。【方法】将 400 条斑节对虾随机分配, 设计饲料中屎肠球菌添加量分别为  $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  CFU/g 的 3 个试验组, 不添加屎肠球菌为对照组进行试验, 养殖周期为 28 d。养殖周期结束后测定斑节对虾免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM)、对虾酚氧化酶(phenoloxidase, PO)、白介素 6 (interleukin 6, IL-6)、补体片段 3a (complement fragment 3a, C3a)的活性含量并运用 LC-MS 代谢组学研究肠道内源代谢物的变化, 分析差异代谢物和相关的代谢通路。【结果】添加屎肠球菌对斑节对虾炎症因子有积极的影响, 增加了斑节对虾体内免疫球蛋白 IgM、对虾酚氧化酶、补体片段 3a 的含量, 降低了其体内 IL-6 的含量, 对肠道差异代谢物的分析发现, 对照组与试验组共同差异代谢物 165 个, 化合物成分主要是脂质和类脂分子、有机酸和衍生物、有机氧化合物、有机杂环化合物、核苷、核苷酸和类似物等。差异代谢物对 37 条代谢通路有影响, 其中, 花生四烯酸代谢通路、 $\alpha$ -亚麻酸代谢通路、胆碱代谢通路和嘧啶代谢通路是显著富集的代谢通路( $P<0.05$ ), 而且花生

资助项目: 天津市海水养殖产业技术体系创新团队建设项目(ITTMR2021000); 天津市科技计划(19YFZCSN00430); 2021 年度天津市高等学校基本科研业务费资助项目(科技类)

This work was supported by the Tianjin Mariculture Industry Technology System Innovation Team Construction Project (ITTMR2021000), the Tianjin Science and Technology Project (19YFZCSN00430), and the 2021 Tianjin University Basic Scientific Research Business Fee Subsidy Project (Science and Technology).

\*Corresponding authors. E-mail: SUN Jingfeng, jf456s@163.com; ZHAO Lin, zhaolin@tju.edu.cn

Received: 2022-07-25; Accepted: 2022-10-10; Published online: 2022-11-23

四烯酸代谢、 $\alpha$ -亚麻酸代谢、胆碱代谢、嘧啶代谢和甘油磷脂代谢的富集代谢物数目最多。【结论】屎肠球菌对斑节对虾肠道中的脂代谢、氨基酸代谢、核苷酸代谢及炎症因子有积极的影响, 为屎肠球菌在对虾养殖中的应用奠定理论基础, 具有重要的意义和应用前景。

关键词: 屎肠球菌; 斑节对虾; 肠道代谢组学; 炎症因子

## Effect of *Enterococcus faecium* on intestinal metabolomics and inflammatory factors of *Penaeus monodon*

SUN Xueliang<sup>1,2,3</sup>, YU Hong<sup>2,3</sup>, ZHANG Zhen<sup>2,3</sup>, CHU Yuxuan<sup>2,3</sup>, CHEN Chengxun<sup>2,3</sup>, GUO Yongjun<sup>2,3</sup>, SUN Jingfeng<sup>\*2,3</sup>, ZHAO Lin<sup>\*1</sup>

1 School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2 School of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China

3 Tianjin Key Laboratory of Aquatic Ecology and Aquaculture, Tianjin 300384, China

**Abstract: [Background]** As a lactic acid-producing probiotic candidate, *Enterococcus faecium* is widely used in animal breeding owing to the satisfactory biological characteristics. However, a few studies of the influence of *E. faecium* on intestinal metabonomics are available. **[Objective]** To explore the effect of *E. faecium* on intestinal metabonomics and inflammatory factors of *Penaeus monodon* (giant tiger prawn) and thus to lay a theoretical basis for the application of *E. faecium* as a probiotic in prawn culture. **[Methods]** A total of 400 giant tiger prawns were randomly classified into four groups. For three groups (experimental groups) of them, *E. faecium* was added into the feed at  $10^7$ ,  $10^8$ , and  $10^9$  CFU/g, respectively. For the remainder, no *E. faecium* was added to the feed, and this group was regarded as control. The experiment lasted 28 days. Then, the content of immunoglobulin IgM, phenol oxidase (PO), interleukin-6 (IL-6), and complement fragment 3a (C3a) in *P. monodon* was measured, and the changes of intestinal metabolites were studied by LC-MS. On this basis, differential metabolites and related metabolic pathways were analyzed. **[Results]** The addition of *E. faecium* had positive effect on the inflammatory factors of *P. monodon*. It increased the content of IgM, PO, and C3a and reduced the content of IL-6 in *P. monodon*. A total of 165 differential metabolites between the control group and the experimental groups were identified, which were mainly lipids and lipid-like molecules, organic acids and derivatives, organic oxygen compounds, organic heterocyclic compounds, nucleosides, nucleotides and analogues, etc. The differential metabolites were involved in 37 metabolic pathways, including arachidonic acid metabolism,  $\alpha$ -linolenic acid metabolism, choline metabolism, and pyrimidine metabolism ( $P < 0.05$ ), and arachidonic acid metabolism  $\alpha$ -linolenic acid metabolism, choline metabolism, pyrimidine metabolism, and glycerophosphatide metabolism topped the pathways in the number of metabolites. **[Conclusion]** *E. faecium* has positive effect on lipid metabolism, amino acid metabolism, nucleotide metabolism, and inflammatory factors in the intestine of *P. monodon*, which lays a theoretical foundation for the application of *E. faecium* in shrimp culture, and has

important significance and application prospects.

**Keywords:** *Enterococcus faecium*; *Penaeus monodon*; intestinal metabolomics; inflammatory factor

益生菌是一类对宿主有益的特殊菌群,通过促进消化酶的合成和分泌刺激宿主免疫系统,进而改善水产动物的性能和健康<sup>[1-2]</sup>。益生菌主要分为双歧杆菌类、乳杆菌类、革兰氏阳性球菌类,以及一些酵母菌和酶类<sup>[3]</sup>。益生菌凭借着安全、可靠、性能优良等特点,被广泛应用于畜禽养殖、现代医学等领域。其中乳杆菌类、球菌类和芽胞杆菌类在水产养殖中的应用最为广泛。使用微生态制剂被认为是改善水产养殖条件有价值的实践,这可能有助于提高水产产量并且对环境友好<sup>[4]</sup>。益生菌被世界卫生组织定义为“活的微生物”<sup>[5]</sup>,可直接饲喂动物,具有安全、可靠、性能优良等特点,当摄入足够量时能够对宿主体健康产生有益影响<sup>[6]</sup>,所以益生菌在水产养殖行业的应用已逐渐成为水产行业研究的焦点<sup>[7]</sup>。

屎肠球菌作为潜在的益生菌,是乳酸菌属革兰氏阳性菌,作为肠道共生菌具有多种生物学特性,最重要的是其黏附能力仅次于干酪乳杆菌,可在肠道中黏附定殖生长,并形成优势菌群<sup>[8]</sup>。由于其繁殖速度快,具有较好的黏附能力,而且可以产生乳酸和一些抗菌的物质,对肠道健康具有促进作用,并可以调节肠道微生态平衡<sup>[9]</sup>。有研究表明,在日粮中添加益生菌可改善动物的非特异性免疫酶活性和抗病力等<sup>[10]</sup>。然而屎肠球菌影响水产动物肠道代谢组学和炎性因子的报道很少,代谢组学的研究更有助于了解机体的代谢机制。而且现在水产养殖使用的益生菌大多为牛奶、奶酪等陆地来源,但是由于虾类物种在分类和生态上的巨大差异可能导致使用效果不明显等问题。因此,宿主源为水产动物的微生物作为益生菌,其在水产

养殖中的使用应该受到特别的关注,因为其可能更容易附着在目标水产动物的肠道上,在各种鱼虾类和养殖环境中,其有益作用的稳定性也更明显。

斑节对虾(*Penaeus monodon*),联合国粮农组织通称“大虎虾”,在分类学上隶属于节肢动物门(*Arthropoda*)甲壳纲(*Crustacea*)十足目(*Decapoda*)游泳亚目(*Natantia*),对虾科(*Penaeidae*),对虾属(*Penaeus*)*Litopenaeus*亚属<sup>[11]</sup>,是对虾属中体型最大的种。然而屎肠球菌对斑节对虾肠道代谢组学和炎性因子影响的研究很少。本研究首次研究鱼源屎肠球菌对斑节对虾肠道代谢组学及炎性因子的影响,以期对斑节对虾养殖过程中屎肠球菌的使用和效果预估提供新的思路和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

斑节对虾来自天津市海通水产养殖基地。从训饵池中挑选400尾体长大致相同 $[(6.00 \pm 0.10) \text{ cm}]$ 、规格均一 $[(6.00 \pm 0.10) \text{ g}]$ 、健康无残缺的斑节对虾。

鱼源屎肠球菌R8由本实验室分离纯化,使用前先使用LB液体培养基在28℃、150 r/min活化培养24 h,计数备用。

试验分为4组,分别为1个对照组和3个试验组(分别为 $10^7$ 、 $10^8$ 及 $10^9$ 组),每组3个平行。试验组 $10^7$ 、 $10^8$ 和 $10^9$ 饲料中添加的屎肠球菌活菌浓度分别为 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$  CFU/g,每个浓度对应一个试验组,对照组饲料中不添加屎肠球菌。

试验饲料采用的是商品料, 其主要营养成分为: 水分 $\leq 12\%$ , 粗蛋白质 $\geq 40\%$ , 粗脂肪 $\geq 4\%$ , 粗纤维 $\leq 6\%$ , 粗灰分 $\leq 16\%$ , 总磷 $\geq 1.0\%$ , 赖氨酸 $\geq 1.8\%$ 。将这些饲料分成 4 组, 每组 500 g, 然后将饲料平铺在塑料上均匀地喷洒各自对应的菌液, 每组菌液为 500 mL, 对照组不喷。然后放置 48 h 待菌液渗透进饲料后投喂。

### 1.1.2 主要试剂和仪器

免疫球蛋白 M (IgM) ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) 检测试剂盒、酚氧化酶 (PO) ELISA 检测试剂盒、补体片段 3a (C3a) ELISA 检测试剂盒和白细胞介素 6 (IL-6) ELISA 检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所。紫外可见分光光度计, 岛津仪器有限公司; 全自动酶标仪, ECAN 仪器有限公司。

### 1.2 试验分组及管理

试验地点为天津市海升水产养殖有限公司养殖车间。养殖水体为高 46 cm 的圆柱形开口的养殖池, 容积为 500 L。圆桶的中央设置用于排水的立管。试验时间为 28 d, 每组 30 尾随机分配至对照组、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  的养殖池中, 每个试验组设置 3 个重复, 每组尾数相同。试验每天投喂 4 次。日投喂量为体重的 10%, 以对虾在 1.5 h 内吃完为准。使用叶轮鼓风机 24 h 供氧, 暂养训饵池及试验养殖池均采用 2-3 个假水草供其附着, 试验桶上方覆盖一层塑料防止其逃跑, 同时保证水温不会发生太大变化, 日常温度 29 °C 左右。投喂对照组饲料暂养训饵 7 d, 空腹饲养 24 h 后正式开始试验。暂养阶段死虾会被新虾替换, 正式开始试验之后死虾不会再被替换。在试验期间, 每 3 天取饲料样品 1 g 放入 100 mL 的 LB 液体培养基中, 在 28 °C、150 r/min 培养 24 h 后测定活菌数, 保证屎肠球菌的活性。试验用水的体积为 250 L, 每日更换一次, 每次换水的体积均为试验用水体

积的一半。水的盐度为 6‰, 使用前一天配好水并且全池泼洒适量的土霉素杀菌消毒, 隔夜后使用。

### 1.3 试验样品处理与指标测定

养殖 28 d 后, 将各组养殖的斑节对虾全部进行解剖, 取出其肝胰脏和肌肉放入 -80 °C 保存, 用于检测生理生化指标。另外, 在无菌环境下取出斑节对虾肠道放入 -80 °C 保存, 用于肠道代谢物分析。

生理生化指标测定: 免疫球蛋白 IgM、对虾酚氧化酶、虾补体片段 3a 和对虾白细胞介素 6 指标测定分别按照对应的 ELISA 检测试剂盒说明书进行。

### 1.4 肠道代谢物分析

#### 1.4.1 样本的前处理

取出 -80 °C 保存的斑节对虾肠道组织样品, 准确称量 100 mg 样品, 先分别加入 4 °C 预冷的无菌去离子水 200  $\mu$ L、无水甲醇水溶液 800  $\mu$ L, 之后在冰水浴中超声处理 60 min, 然后在 -20 °C 静置 30 min, 最后 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 后取上清液, 上清液经过 0.22  $\mu$ m 有机相滤膜过滤处理后备用。同时, 做质量控制 (quality control, QC) 样品, 按照上述组织处理方法制备。评估仪器状态准备上机。

#### 1.4.2 LC-MS 检测

使用自动进样器 (4 °C 预冷) 进行自动进样, 利用 liquid chromatograph mass spectrometer (LC-MS) 系统进行上机分离分析。检测条件为: 进样量 5  $\mu$ L, 柱温箱温度 25 °C, 样品流速为 0.3 mL/min。正离子扫描模式: 色谱流动相 A 为 0.1% 的甲醇溶液, B 为乙腈溶液; 负离子扫描模式: 色谱流动相 A 为水, B 为乙腈溶液。上样后进行梯度洗脱, 洗脱梯度为: 0-3 min, 用 95%-30% 的 A 进行洗脱; 3-10 min, 用 30%-15% 的 A 进行洗脱; 10-12 min, 用 15%-0% 的 A 进行洗脱; 12-13 min, 用 0% 的 A

进行洗脱; 13–13.5 min, 用 0–95%的 A 进行洗脱; 13.5–15 min, 用 95%的 A 进行洗脱。在样本的进样过程中插入质量控制样品, 用于评估仪器系统的状态以及试验数据的可靠性。每次进样后分别采用电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)进行正离子和负离子模式检测。样品经 UHPLC 分离后用质谱仪进行质谱分析。

### 1.4.3 数据处理

将质谱仪采集到的数据先进行数据预处理, 包括对原始数据缺失值进行模拟(missing value recoding)和数据归一化(normalization), 处理好的数据导入数据库[metlin、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 和 Human Metabolome Database (HMDB)]进行产物鉴定。鉴定后的代谢物数据导入 ropls (R packages) V16.2 软件进行样本比较分析; 鉴定后的代谢物数据通过 KEGG Compound 软件对 KEGG 化合物分类进行分析; 鉴定后的代谢物数据通过 KEGG 功能通路进行分析; 鉴定后的代谢物数据通过 VennDiagram (R packages) V1.6.20 软件对差异代谢物的 Venn 图进行分析; 鉴定后的代谢物数据通过比对 HMDB 4.0 数据库获得代谢物的分类信息并统计作图, 并通过软件 scipy (Python) V1.0.0, 根据  $P<0.05$  进行差异代谢物的筛选, 做 KEGG 通路富集和热图。

### 1.5 数据分析

试验所有数据使用 Excel 2019 处理并采用 SPSS 18.0 进行方差分析,  $P<0.05$  表示差异显著。所有数据用平均值 $\pm$ 标准误表示,  $n=3$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 屎肠球菌对斑节对虾肌肉及肝脏组织中免疫球蛋白 IgM 的影响

由表 1 可知, 饲料中添加屎肠球菌的试验组肌肉和肝脏组织中的免疫球蛋白 IgM 均有显

著提高, 均高于对照组, 而且各试验组之间均有显著性差异( $P<0.05$ )。在肌肉组织中, 对照组、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  各组的 IgM 含量随屎肠球菌添加量的增加而显著升高( $P<0.05$ ), 各试验组的 IgM 含量均显著高于对照组( $P<0.05$ ), 且  $10^9$  组的 IgM 含量显著高于其他各组( $P<0.05$ ), 含量为  $(314.08\pm 17.765)$  mg/g-prot。在肝脏组织中, 对照组、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  各组的 IgM 含量随屎肠球菌添加量的增加也显著升高( $P<0.05$ ), 各试验组的 IgM 含量均显著高于对照组( $P<0.05$ ),  $10^9$  组在试验组中 IgM 的含量最高, 含量为  $(314.67\pm 6.562)$  mg/g-prot, 且显著高于其他各组( $P<0.05$ )。结果表明, 饲料中添加屎肠球菌能够显著提升斑节对虾肌肉及肝脏组织中的免疫球蛋白含量( $P<0.05$ ),  $10^9$  组的对虾肌肉及肝脏组织中的免疫球蛋白含量最高且具有显著性, 说明添加浓度为  $10^9$  组对于增强斑节对虾自身免疫能力的效果更显著。

### 2.2 屎肠球菌对斑节对虾肌肉及肝脏组织中对虾酚氧化酶(PO)的影响

由表 2 可知, 饲料中添加屎肠球菌的试验组肌肉和肝脏组织中的对虾酚氧化酶 PO 活

表 1 屎肠球菌对斑节对虾肌肉及肝脏组织中免疫球蛋白 IgM 的影响

Table 1 Effect of *Enterococcus faecium* on immunoglobulin IgM in muscle and liver of *Penaeus monodon*

组别	肌肉组织	肝脏组织
Group	Muscle tissue	Liver tissue
	(mg/g-prot)	(mg/g-prot)
Control	155.81 $\pm$ 0.141a	156.47 $\pm$ 0.212a
$10^7$	207.92 $\pm$ 2.883b	209.35 $\pm$ 2.481b
$10^8$	256.64 $\pm$ 8.251c	260.92 $\pm$ 1.621c
$10^9$	314.08 $\pm$ 17.765d	314.67 $\pm$ 6.562d

$n=3$ , 同列中标有不同小写字母表示组内有显著性差异( $P<0.05$ )。下同

$n=3$ , different lowercase letters in the same column indicate significant differences within the group ( $P<0.05$ ). The same below.

表 2 屎肠球菌对斑节对虾肌肉及肝脏组织中对虾酚氧化酶的影响

Table 2 Effect of *Enterococcus faecium* on *Penaeus monodon* phenol oxidase in muscle and liver tissue

组别 Section	肌肉组织 Muscle tissue (U/g-prot)	肝脏组织 Liver tissue (U/g-prot)
Control	282.87±0.001a	290.81±0.001a
10 <sup>7</sup>	327.78±8.112b	342.10±25.522b
10 <sup>8</sup>	443.11±16.474d	436.76±23.591d
10 <sup>9</sup>	397.03±8.833c	413.23±12.433c

力均有显著的提高( $P<0.05$ ), 都显著高于对照组( $P<0.05$ ), 各试验组 PO 活力相互之间也都有显著性差异( $P<0.05$ ), 且 10<sup>8</sup> 组中 PO 的活力最高, 活力分别为(443.11±16.474) U/g-prot 和(436.76±23.591) U/g-prot, 且显著高于其他各试验组( $P<0.05$ )。在肌肉中, 对照组、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>9</sup> 组之间呈先升高后降低趋势, 10<sup>9</sup> 组 PO 活力显著低于 10<sup>8</sup> 组, 但显著高于对照组和 10<sup>7</sup> 组。在肝脏组织中, 对照组、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>9</sup> 组之间也呈现先升高后下降趋势, 各组 PO 活力分别为(290.81±0.001)、(342.10±25.522)、(436.76±23.591) 和(413.23±12.433) U/g-prot, 可以发现, 10<sup>9</sup> 组 PO 活力显著低于 10<sup>8</sup> 组( $P<0.05$ ), 但显著高于对照组和 10<sup>7</sup> 组( $P<0.05$ )。结果表明, 10<sup>8</sup> 组对斑节对虾 PO 活力的提升具有显著作用, 也对机体免疫力的提升具有显著作用。

### 2.3 屎肠球菌对斑节对虾肌肉及肝脏组织中对虾白介素 6 (IL-6) 的影响

表 3 显示了饲料中添加屎肠球菌对斑节对虾肌肉及肝脏中 IL-6 的影响。从表 3 中数据可知, 肌肉组织中各组之间有显著差异性( $P<0.05$ ), 对照组、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>9</sup> 组之间呈先下降后上升趋势, 所有试验组 IL-6 含量均显著低于对照组( $P<0.05$ ), 各组 IL-6 含量分别为(259.52±0.002)、(214.91±8.495)、(177.89±7.161)

和(186.41±6.925) ng/g-prot, 可以发现 10<sup>8</sup> 组 IL-6 含量最低, 且显著低于其他试验组( $P<0.05$ )。在肝脏组织中, 各组之间也有显著性差异( $P<0.05$ ), 对照组、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>9</sup> 组之间也呈先下降后上升趋势, 所有试验组的 IL-6 含量均显著低于对照组( $P<0.05$ ), 各组 IL-6 含量分别为(270.20±0.001)、(210.22±5.423)、(174.03±6.121) 和(186.84±3.378) ng/g-prot, 可以发现 10<sup>8</sup> 组 IL-6 含量最低且显著低于其他试验组( $P<0.05$ )。

### 2.4 屎肠球菌对斑节对虾肌肉及肝脏组织中虾补体片段 3a(C3a)的影响

饲料中添加屎肠球菌对斑节对虾肌肉及肝脏组织中虾补体片段 3a 的影响如表 4 所示, 各试验组在肌肉和肝脏组织中的虾补体片段 3a 含量都有显著提高( $P<0.05$ )。在肌肉组织中, 各

表 3 屎肠球菌对斑节对虾肌肉及肝脏组织中对虾白细胞介素 6 的影响

Table 3 Effect of *Enterococcus faecium* on shrimp interleukin-6 in muscle and liver tissue of *Penaeus monodon*

组别 Section	肌肉组织 Muscle tissue (ng/g-prot)	肝脏组织 Liver tissue (ng/g-prot)
Control	259.52±0.002d	270.20±0.001d
10 <sup>7</sup>	214.91±8.495c	210.22±5.423c
10 <sup>8</sup>	177.89±7.161a	174.03±6.121a
10 <sup>9</sup>	186.41±6.925b	186.84±3.378b

表 4 屎肠球菌对斑节对虾肌肉及肝脏组织中虾补体片段 3a 的影响

Table 4 Effect of *Enterococcus faecium* on shrimp complement fragment 3a in muscle and liver tissue of *Penaeus monodon*

组别 Section	肌肉组织 Muscle tissue (mg/g-prot)	肝脏组织 Liver tissue (mg/g-prot)
Control	197.26±0.002a	195.29±0.004a
10 <sup>7</sup>	360.36±8.919b	348.17±11.661b
10 <sup>8</sup>	459.62±5.911c	444.27±7.201c
10 <sup>9</sup>	472.47±19.063d	470.22±2.797d

组之间都有显著性差异( $P<0.05$ ),呈现显著上升趋势( $P<0.05$ ),各组虾补体片段 3a 含量分别为( $197.26\pm0.002$ )、( $360.36\pm8.919$ )、( $459.62\pm5.911$ )和( $472.47\pm19.063$ ) mg/g-prot,可以发现,  $10^9$  组的虾补体片段 3a 的含量最高,且显著高于其他各试验组( $P<0.05$ )。在肝脏组织中,各组之间都有显著性差异( $P<0.05$ ),也呈现显著上升趋势( $P<0.05$ ),各组虾补体片段 3a 含量分别为( $195.29\pm0.004$ )、( $348.17\pm11.661$ )、( $444.27\pm7.201$ )和( $470.22\pm2.797$ ) mg/g-prot,可以发现虾补体片段 3a 含量最高的是  $10^9$  组且显著高于其他各试验组( $P<0.05$ )。

## 2.5 屎肠球菌对斑节对虾肠道代谢物的影响

### 2.5.1 主成分分析

通过主成分分析(principal component analysis, PCA)可以观察实验模型中的组间分离趋势,以及是否有异常点出现,同时从原始数据上反映组间和组内的变异度。如图 1 所示,所有组数据都在 95%的置信度下,不同组别间

具有明显的分组趋势,且试验组均远离对照组,可以说明饲料中添加屎肠球菌影响了斑节对虾的组织代谢。另外,  $10^7$ 、 $10^8$  组介于对照组与  $10^9$  组之间且有向  $10^9$  组偏移的趋势,从一定程度上也可以说明饲料中添加屎肠球菌对于斑节对虾组织代谢影响存在浓度依赖。

### 2.5.2 正交偏最小二乘判别分析

正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)可以更好地区分组间差异,提高模型的有效性和解析能力。由图 2 可知,各试验组与对照组都有明显的分离趋势。

### 2.5.3 差异代谢物韦恩(Venn)分析

Venn 分析可用来展示每组特有的代谢物或组间共有的代谢物,不同的颜色代表不同的分组(或样本),重叠部分的数字代表多个分组中共有的代谢物数目,非重叠部分的数字代表对应分组所特有的代谢物数目。由图 3 可以看出,各试验组与对照组共有的代谢物数目为 165,  $10^7$  组与对照组共有的代谢物数目为 224,特有

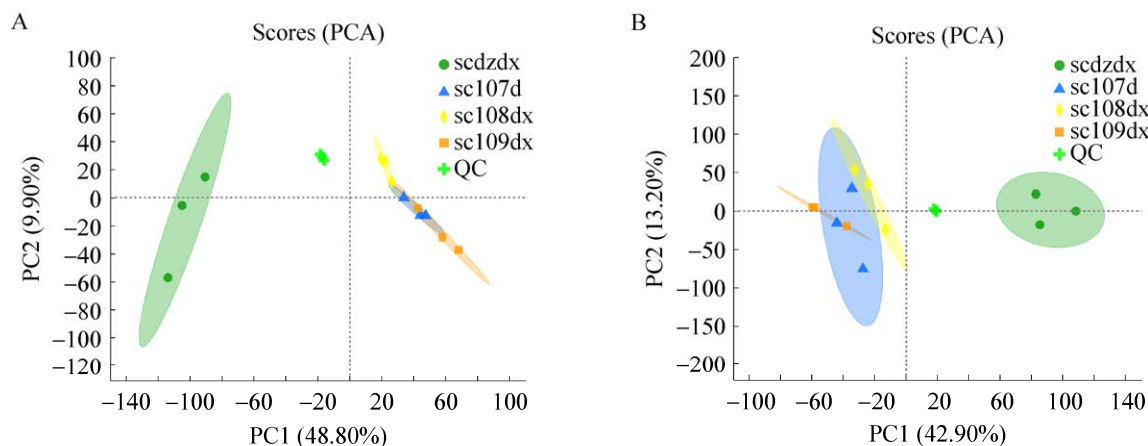


图 1 正、负离子模式下 PCA 得分图 A: 正离子模式下 PCA 得分图. B: 负离子模式下 PCA 得分图. Scdzdx: 对照组; sc107dx、sc108dx 和 sc109dx: 分别为试验组  $10^7$ 、 $10^8$  和  $10^9$ ; QC: 质量控制

Figure 1 PCA score diagram under positive and negative ion mode. A: PCA score chart in positive ion mode. B: PCA score chart in negative ion mode. scdzdx: Control group; sc107dx, sc108dx and sc109dx: Represent experimental groups  $10^7$ ,  $10^8$  and  $10^9$ , respectively; QC: Quality control.



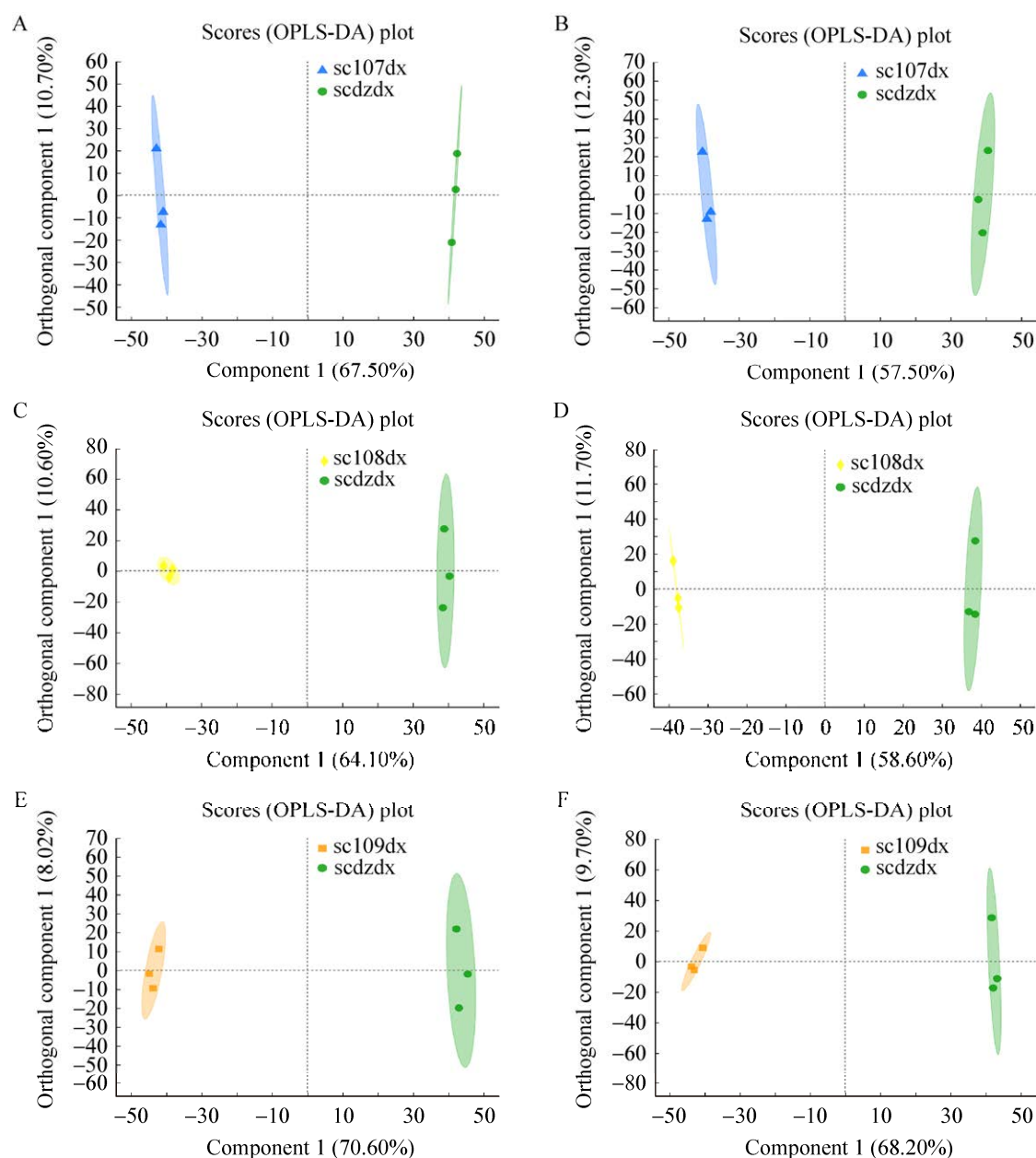


图 2 正、负离子模式下对照组和各试验组 OPLS-DA 得分图 A、B 分别是正、负离子模式下对照组和试验组  $10^7$  的 OPLS-DA 得分图. C、D 分别是正、负离子模式下对照组和试验组  $10^8$  的 OPLS-DA 得分图. E、F 分别是正、负离子模式下对照组和试验组  $10^9$  的 OPLS-DA 得分图. scdzdx: 对照组; sc107dx、sc108dx 和 sc109dx: 分别是试验组  $10^7$ 、 $10^8$  和  $10^9$

Figure 2 OPLS-DA scores of the control group and each test group under positive and negative ion mode. A and B were the scores OPLS-DA of control group and  $10^7$  under positive ion mode and negative ion mode. C and D were the OPLS-DA scores of control group and  $10^8$  under positive ion mode and negative ion mode. E and F were the OPLS-DA scores of control group and  $10^9$  under positive ion mode and negative ion mode. scdzdx: Control group; sc107dx, sc108dx and sc109dx: Represent experimental groups  $10^7$ ,  $10^8$  and  $10^9$ , respectively.



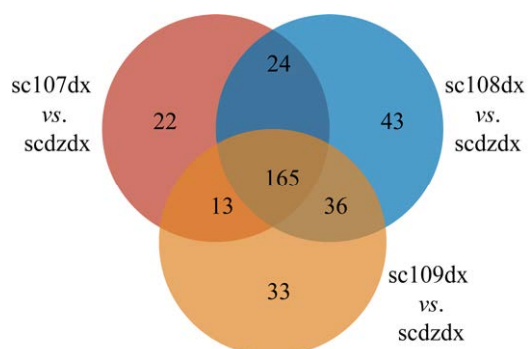


图3 不同代谢组 Venn 分析 scdzdx: 对照组; sc107dx: 试验组  $10^7$ ; sc108dx: 试验组  $10^8$ ; sc109dx: 试验组  $10^9$

Figure 3 Different metabolic groups Venn analysis. scdzdx: Control group; sc107dx: Experimental group  $10^7$ ; sc108dx: Experimental group  $10^8$ ; sc109dx: Experimental group  $10^9$ .

的代谢物数目为 22,  $10^8$  组与对照组共有的代谢物数目为 268, 特有的代谢物数目为 43,  $10^9$  组与对照组共有的代谢物数目为 247, 特有的代谢物数目为 33。

#### 2.5.4 差异代谢物 HMDB 化合物分类分析

各试验组和对照组共有的 165 个代谢物通过比对 HMDB 4.0 数据库, 获得代谢集中代谢物的分类信息如图 4 所示, 按照代谢物类型可分为脂质和类脂分子、有机酸和衍生物、有机氧化合物、有机杂环化合物、核苷、核苷酸和类似物、苯类化合物、有机氧化合物、有机化合物、有机氮化合物、苯丙酸和聚酮, 其中最多的是脂质和类脂分子, 有 73 个差异代谢物, 占比为 55.73%; 其次为有机酸和衍生物, 有 32 个差异代谢物, 占比为 24.43%。结果表明, 屎肠球菌对于斑节对虾的肠道脂质代谢产生了影响。

#### 2.5.5 差异代谢物聚类分析

选择各试验组和对照组共用的 165 个代谢物进行聚类分析, 代谢物在各组间的表达量差异如图 5 所示, 各试验组与对照组代谢物表达量有明显差异, 各试验组中脂质和类脂分子的表达量最高, 包括氨基酸、甘油磷脂、有机酮

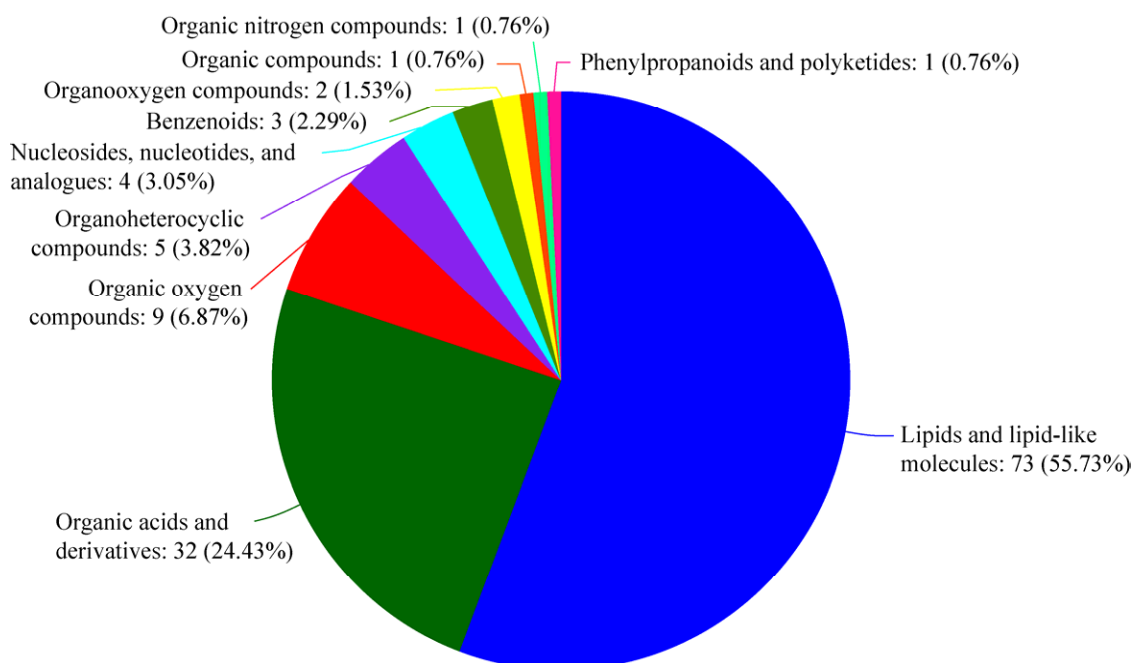


图4 HMDB 化合物分类

Figure 4 HMDB compound classification.

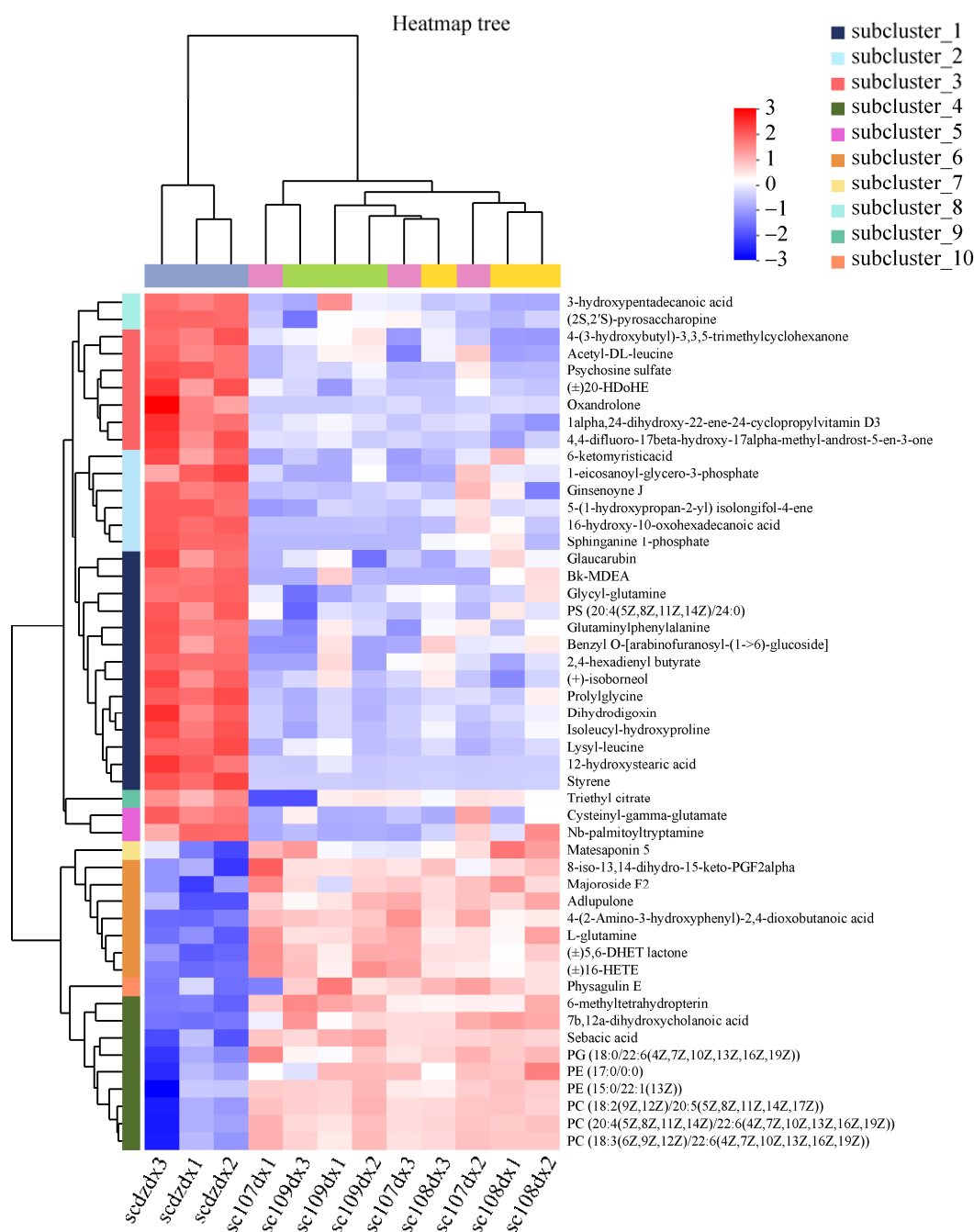


图5 差异代谢物聚类分析 scdzdx1 是对照组 1, scdzdx2 是对照组 2, scdzdx3 是对照组 3, sc107dx1 是  $10^7$  试验组 1, sc107dx2 是  $10^7$  试验组 2, sc107dx3 是  $10^7$  试验组 3, sc108dx1 是  $10^8$  试验组 1, sc108dx2 是  $10^8$  试验组 2 和 sc108dx3 是  $10^8$  试验组 3, sc109dx 是  $10^9$  试验组 1, sc109dx2 是  $10^9$  试验组 2 和 sc109dx3 是  $10^9$  试验组 3

Figure 5 Cluster analysis of differential metabolites. scdzdx1 is control group 1, scdzdx2 is control group 2, scdzdx3 is control group 3, sc107dx1 is  $10^7$  test group 1, sc107dx2 is  $10^7$  test group 2, sc107dx3 is  $10^7$  test group 3, sc108dx1 is  $10^8$  test group 1, sc108dx2 is  $10^8$  test group 2 and sc108dx3 is  $10^8$  test group 3, sc109dx is  $10^9$  test group 1, sc109dx2 is  $10^9$  test group 2 and sc109dx3 is  $10^9$  test group 3.

和有机酸等。

### 2.5.6 差异代谢物 KEGG 通路富集分析

由图 6 可知,横坐标为富集显著性  $P$  值, $P$  值越小,在统计学上就越有显著意义。一般  $P < 0.05$  认为该功能为显著富集项;纵坐标为 KEGG 通路。图中气泡的大小代表该通路中富

集到代谢集中代谢物数量的多少。图中共有 37 个代谢通路受到影响,其中花生四烯酸代谢、 $\alpha$ -亚麻酸代谢、胆碱代谢和嘧啶代谢是显著的富集( $P < 0.05$ ),而且花生四烯酸代谢、 $\alpha$ -亚麻酸代谢、胆碱代谢和嘧啶代谢和甘油磷脂代谢的富集代谢物数目最多。

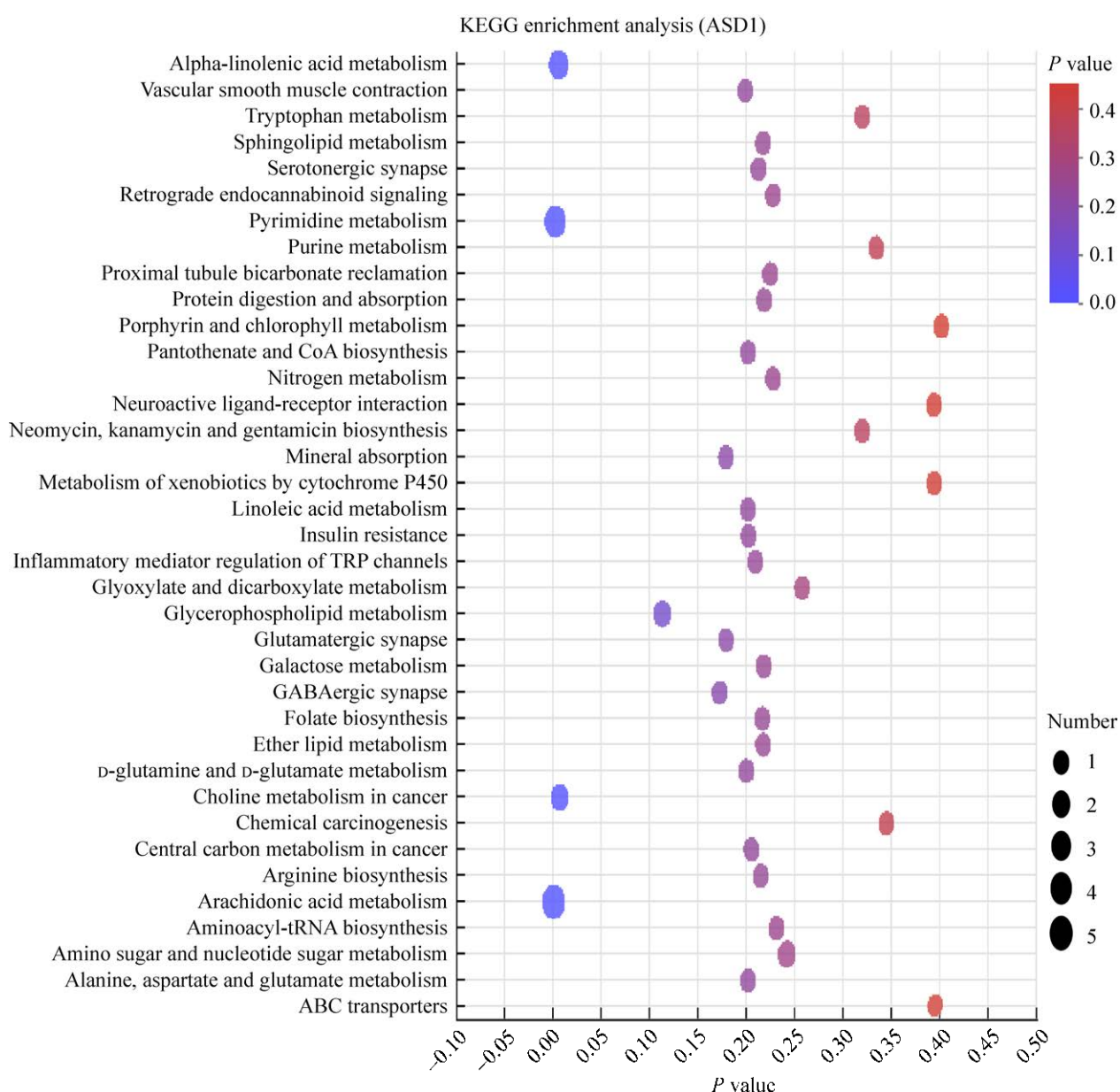


图 6 差异代谢物 KEGG 通路富集分析

Figure 6 Enrichment analysis of differential metabolite KEGG pathway.

### 3 讨论

#### 3.1 不同屎肠球菌浓度对斑节对虾肌肉及肝脏组织中免疫球蛋白 IgM 的影响

IgM 是抗原刺激诱导体液免疫应答中最先产生的 Ig, IgM 不是细胞, 但可结合补体, 主要分布于血清中。在机体的早期防御中起着重要的作用<sup>[12]</sup>。有研究表明, 在鱼类的其他组分中发现了非免疫球蛋白或糖蛋白分子, 它们能在免疫应答中起到介导炎症、抑制病原活性和调节抗原呈递等作用<sup>[13]</sup>。本试验结果表明, 添加了不同量的屎肠球菌对肌肉中免疫球蛋白的含量有显著提升( $P<0.05$ ), 进而可以提高斑节对虾的免疫能力, 增强虾类对于外界不良环境的抵抗。

#### 3.2 不同屎肠球菌浓度对斑节对虾肌肉及肝脏组织中对虾酚氧化酶(PO)的影响

PO 在甲壳类动物中被认为是一种酶原, 在宿主识别、防御、细胞间通讯和黑色素沉着方面起重要作用<sup>[14-15]</sup>。有研究表明,  $\text{Cu}^{2+}$ 胁迫下克氏原螯虾显著抑制 PO 活性, 严重影响机体的免疫能力, 这说明在不良环境下, PO 对于机体具有重要作用<sup>[16]</sup>。本试验研究结果表明, 饲料中添加不同浓度的屎肠球菌对于斑节对虾体内酚氧化酶的增加起到促进作用, 可以说明屎肠球菌对斑节对虾抵抗外界不良环境、病菌、病毒起到了积极的作用, 提高了其对抗外界风险的能力。

#### 3.3 不同屎肠球菌浓度对斑节对虾肌肉及肝脏组织中白介素 6 (IL-6) 的影响

白介素-6 (IL-6) 是一种促炎性细胞因子, 属于白细胞介素的一种。IL-6 能够刺激参与免疫反应细胞增殖、分化并提高其功能<sup>[17]</sup>。有研究表明, 黄条鰺在脂多糖刺激后, 白介素细胞急剧增加, 说明机体在药物刺激下产生免疫反应时会增加白介素细胞的表达<sup>[18]</sup>。本试验

结果表明, 添加屎肠球菌起到了降低斑节对虾体内白介素 6 含量的作用, 白细胞介素 6 的降低说明斑节对虾体内的促炎性因子减少, 进而说明屎肠球菌的添加抑制了炎性因子对机体的损伤。

#### 3.4 不同屎肠球菌浓度对斑节对虾肌肉及肝脏中补体片段 3a 的影响

补体片段 3a 是补体中含量最高的补体成分<sup>[19]</sup>, 在机体的免疫系统中起到重要的防御及免疫监视作用, 可抵抗病原微生物的感染, 消灭病变的衰老细胞<sup>[20]</sup>。本试验研究结果表明, 添加不同浓度的屎肠球菌提高了斑节对虾体内补体片段 3a 的含量, 降低了其被外界病原微生物感染的几率, 并且促进了体内衰老细胞的清除, 增加了其对外界不良环境的抵抗能力。

#### 3.5 不同屎肠球菌浓度对斑节对虾肠道代谢的影响

代谢物的差异可以表明机体内源性物质的变化, 有研究表明饲料中添加牛磺酸、黄连素和维生素 D3 等对水产动物的代谢都具有影响<sup>[21-23]</sup>。从本试验的差异代谢物分析和富集分析结果可以看出, 饲料中添加屎肠球菌对于斑节对虾的脂肪代谢、氨基酸代谢、碳水化合物代谢和核苷酸代谢等产生了影响。从 KEGG 富集通路的结果分析中发现花生四烯酸代谢、 $\alpha$ -亚麻酸代谢、胆碱代谢和嘧啶代谢是显著的富集( $P<0.05$ )。

花生四烯酸(arachidonic acid, AA)是一种  $\omega$ -6 多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PFA), 其在细胞膜中主要以磷脂的形式存在<sup>[24]</sup>。对于处于应激状态的细胞, 花生四烯酸可提高抗应激的能力, 广泛参与多种生理和病理过程<sup>[25]</sup>。有研究表明, 花生四烯酸通过抑制脂肪细胞的增殖、分化和凋亡促进脂肪的水解, 并且可以降低炎症相关的化学因子<sup>[26]</sup>。在本研究中, 与对照组相比, 在饲料中添加屎肠球菌后, 花生

四烯酸代谢产生的差异代谢物 20-羟基二十碳四烯酸、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的表达水平显著上调,从而可以降低炎症因子的表达,这与其他研究结果<sup>[26]</sup>一致,屎肠球菌可以通过影响花生四烯酸代谢通路来抑制炎症因子的表达,进而可能导致斑节对虾白介素 6 含量的减少。

$\alpha$ -亚麻酸是  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸。有研究表明平衡的 DHA/EPA 对水生动物减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)累积和抑制全身炎症方面具有重要作用<sup>[27]</sup>。本试验研究结果发现,二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的表达水平显著上调,结合生理指标的检测结果显示,可以说明饲料中添加屎肠球菌可以影响  $\alpha$ -亚麻酸代谢,提高酚氧化酶活力,进而减少活性氧积累对机体的损伤,对斑节对虾的抗炎功能有促进作用,这与相关研究结果<sup>[27]</sup>一致。

嘧啶在生物体中广泛存在,对于嘧啶和在生物体中的代谢途径的研究非常重要<sup>[28]</sup>。嘧啶是脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)的组成部分,其代谢不仅可以实现嘧啶在细胞内的循环再利用,还可以为肠道微生物的生长提供氮源或碳源<sup>[29]</sup>。本研究结果表明,饲料中添加屎肠球菌对斑节对虾的嘧啶代谢具有显著的富集作用,可能是嘧啶代谢对于斑节对虾炎症因子的表达具有抑制作用,但仍需进一步验证。

胆碱是磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)的关键组成成分,磷脂酰胆碱在极低密度脂蛋白的合成中起到非常关键的作用,对于脂肪代谢具有重要作用。甘油磷脂是生物体内最主要的磷脂成分之一,是胆汁和细胞膜表面活性物质,其还可以形成生物膜,并参与细胞膜对蛋白质的识别和信号转导<sup>[30]</sup>。本试验结果表明,在饲料中添加屎肠球菌影响了斑节对虾的脂质代谢通路。对于差异代谢物的分析发现,PC 和

PE (phosphatidylethanolamine)表达水平均显著上调。PE 存在于细胞膜中的膜磷脂,细胞膜参与信号传递、溶质、代谢物和蛋白质转运的调节,介导各种生物过程<sup>[31]</sup>。PE 也是 PC 的重要前体,可用于修饰某些蛋白质酶和其他大分子,有研究表明,当 PC 和 PE 的表达水平降低时会导致磷脂的不饱和度降低,进而影响细胞的正常功能<sup>[32]</sup>。综上所述,我们推测屎肠球菌影响了胆碱代谢通路,增强了免疫细胞和抗炎因子的信号传递,从而增加了抗炎因子含量,这与生理生化指标的测定结果一致,免疫球蛋白、补体含量和酚氧化酶活力提高,而白介素 6 含量降低,说明添加屎肠球菌后可以增强机体的免疫力并抑制炎症因子。

## 4 结论

本试验通过在饲料中添加不同量的屎肠球菌投喂斑节对虾,进行了 28 d 的饲养。研究结果表明,饲料中添加屎肠球菌对于免疫球蛋白(IgM)、对虾酚氧化酶(PO)、白细胞介素 6 (IL-6)及补体片段 3a (C3a)和肠道代谢有积极的影响作用,降低了斑节对虾体内炎症并改善了肠道氨脂类代谢、氨基酸代谢、核苷酸代谢和碳水化合物代谢。

## REFERENCES

- [1] 王振刚. 益生菌对凡纳滨对虾生长、免疫、肠道菌群、差异基因表达的影响[D]. 大连: 大连海洋大学硕士学位论文, 2022.  
WANG ZG. Effects of probiotics on growth, immunity, gut flora and differential gene expression of *Litopenaeus vannamei*[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2022 (in Chinese).
- [2] 孙冬岩, 孙笑非, 王文娟. 益生菌作为健康调节剂在水产养殖中的研究进展[J]. 饲料研究, 2021, 44(6): 129-131.  
SUN DY, SUN XF, WANG WJ. Research progress of probiotics as health regulators in aquaculture[J]. Feed

- Research, 2021, 44(6): 129-131 (in Chinese).
- [3] 步海平. 益生菌在水产养殖中的应用[J]. 渔业致富指南, 2022(1): 41-43.  
BU HP. Application of probiotics in aquaculture[J]. Fishery Guide to be Rich, 2022(1): 41-43 (in Chinese).
- [4] AKHTER N, WU B, MEMON AM, MOHSIN M. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 45(2): 733-741.
- [5] 陈崎凤. 益生菌在水产养殖中应用的研究[J]. 现代农业研究, 2020, 26(11): 75-76.  
CHEN QF. Application of probiotics in aquaculture[J]. Modern Agriculture Research, 2020, 26(11): 75-76 (in Chinese).
- [6] 李淑翠. 益生菌在对虾养殖中的应用研究[J]. 江西水产科技, 2020(6): 52-53.  
LI SC. Study on the application of probiotics in shrimp culture[J]. Jiangxi Fishery Science and Technology, 2020(6): 52-53 (in Chinese).
- [7] WANG YB, LI JR, LIN JD. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook[J]. Aquaculture, 2008, 281(1-4): 1-4.
- [8] 宋华文, 王金才, 赵丽梅. 一株金鲷鱼源屎肠球菌的分离鉴定[J]. 江西水产科技, 2021(2): 12-14.  
SONG HW, WANG JC, ZHAO LM. Isolation and identification of an *Enterococcus faecalis* from pomfret[J]. Jiangxi Fishery Science and Technology, 2021(2): 12-14 (in Chinese).
- [9] 马丰英, 景宇超, 崔栩, 孙玉章, 王艳玲, 蒋贻海. 屎肠球菌及其微生态制剂的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2019, 55(7): 54-58.  
MA FY, JING YC, CUI X, SUN YZ, WANG YL, JIANG YH. Research progress on *Enterococcus faecalis* and its microecological preparations[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2019, 55(7): 54-58 (in Chinese).
- [10] 鞠安琪, 谷巍, 张海朋, 曲磊, 张冬星, 陈龙, 康元环, 单晓枫, 钱爱东. 屎肠球菌对鲤鱼非特异性免疫酶活性和抗病力的影响[J]. 中国兽医科学, 2018, 48(2): 228-233.  
JU AQ, GU W, ZHANG HP, QU L, ZHANG DX, CHEN L, KANG YH, SHAN XF, QIAN AD. Effects of *Enterococcus faecium* on non-specific immuno-enzyme activity and resistance in carp[J]. Chinese Veterinary Science, 2018, 48(2): 228-233 (in Chinese).
- [11] 孙溪蔓. 海蜆-蚶仔-对虾多营养级复合养殖池塘的水质研究[D]. 大连: 大连海洋大学硕士学位论文, 2018.  
SUN XM. Water quality of level multi-nutrient polyculture pond of farming *Rhopilema esculenta*-*Ruditapes philippinarum*-*Penaeus monodon*[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2018 (in Chinese).
- [12] 马文锋. 低蛋白日粮添加不同必需氨基酸对生长肥育猪生长性能、血液生化指标和肉品质的影响[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2011.  
MA WF. Low-protein diet supplemented with amino acids on the growth performance and meat quality index in growing-finishing pigs[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [13] 张媛媛, 宋理平. 鱼类免疫系统的研究进展[J]. 河北渔业, 2018(2): 49-56.  
ZHANG YY, SONG LP. Research progress of fish immune system[J]. Hebei Fisheries, 2018(2): 49-56 (in Chinese).
- [14] XIONG J, JIN M, YUAN Y, LUO JX, LU Y, ZHOU QC, LIANG C, TAN ZL. Dietary nucleotide-rich yeast supplementation improves growth, innate immunity and intestinal morphology of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Aquaculture Nutrition, 2018, 24(5): 1425-1435.
- [15] 韩凤丽. 斑节对虾酚氧化酶原基因的表达[D]. 苏州: 苏州大学硕士学位论文, 2009.  
HAN FL. Expression of *proPO* gene of *Penaeus monodon*[D]. Suzhou: Master's Thesis of Soochow University, 2009 (in Chinese).
- [16] 张娟, 魏克强, 赵婷.  $\text{Cu}^{2+}$ 胁迫对克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)酚氧化酶原激活系统活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(5): 865-870.  
ZHANG J, WEI KQ, ZHAO T. Effect of  $\text{Cu}^{2+}$  stress on activity of prophenoloxidase activating system in *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2016, 35(5): 865-870 (in Chinese).
- [17] 杨亚锋. 中药组方对 2 型糖尿病皮肤溃疡病变相关炎症因子的影响[D]. 泰安: 泰山医学院硕士学位论文, 2014.  
YANG YF. Traditional Chinese medicine formula for type2 diabetes skin ulcer disease factors related to inflammation[D]. Taian: Master's Thesis of Taishan Medical University, 2014 (in Chinese).
- [18] 王琳, 王滨, 徐永江, 关长涛. 黄条(鱼师)白介素-1 $\beta$ 基因克隆及其免疫应答分析[J]. 渔业科学进展, 2022, 43: 1-13.  
WANG L, WANG B, XU YJ, GUAN CT. Two putative interleukin-1 beta molecules involved in the immune response of *Seriola lalandi*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43: 1-13 (in Chinese).

- [19] 郑晓梅. 载脂蛋白-J mRNA 在大鼠脑出血模型中表达的实验性研究[D]. 泸州: 泸州医学院硕士学位论文, 2010.
- ZHENG XM. The expression of apo-J mRNA in rat acute experimental intracerebral hemorrhage models[D]. Luzhou: Master's Thesis of Luzhou Medical College, 2010 (in Chinese).
- [20] 孔鹏飞. 海湾扇贝补体样成分 AiC1qDC-1 基因克隆及其功能的研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所)硕士学位论文, 2010.
- KONG PF. Molecular cloning and functional characterization of a novel complement-like component AiC1qDC-1 from bay scallop *Argopecten irradians*[D]. Qingdao: Master's Thesis of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese).
- [21] 黄颖. 饲料牛磺酸对尼罗罗非鱼的代谢组影响及其机制研究[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2018.
- HUANG Y. Study on the metabolic effects and mechanism of dietary taurine supplementation on Nile tilapia[D]. Xiamen: Master's Thesis of Xiamen University, 2018 (in Chinese).
- [22] 刘海姿. 饲料中添加黄连素对美洲鳗鲡幼鱼生长、肠道免疫及代谢的影响[D]. 厦门: 集美大学硕士学位论文, 2021.
- LIU HZ. Effects of dietary berberine supplementation on growth, intestinal immunity and metabolism of juvenile American eel *Anguilla rostrata*[D]. Xiamen: Master's Thesis of Jimei University, 2021 (in Chinese).
- [23] 李向. 小肽和维生素 D<sub>3</sub> 对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)生长、肝脏代谢和肠道微生物的影响[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2020.
- LI X. Effects of small peptides and vitamin D<sub>3</sub> on growth, liver metabolism and intestinal microorganisms of largemouth bass *Micropterus salmoides*[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2020 (in Chinese).
- [24] WANG TQ, FU XJ, CHEN QF, PATRA JK, WANG DD, WANG ZG, GAI ZB. Arachidonic acid metabolism and kidney inflammation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(15): 3683.
- [25] KUWATA H, HARA S. Role of acyl-CoA synthetase ACSL4 in arachidonic acid metabolism[J]. Prostaglandins & Other Lipid Mediators, 2019, 144: 106363.
- [26] BURNS JL, NAKAMURA MT, MA DWL. Differentiating the biological effects of linoleic acid from arachidonic acid in health and disease[J]. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2018, 135: 1-4.
- [27] 马宏峰. 亚油酸对高脂小鼠脂质代谢的影响及其机制研究[D]. 合肥: 合肥工业大学硕士学位论文, 2007.
- MA HF. Effect of LA on high fat mouse in lipid metabolism and its mechanisms[D]. Hefei: Master's Thesis of Hefei University of Technology, 2007 (in Chinese).
- [28] 张彦坤, 杨兵坤, 李航宇, 胡林勇, 赵新全, 徐世晓, 孙平. 饥饿胁迫下剑尾鱼肝脏代谢组学研究[J]. 四川动物, 2021, 40(6): 611-621.
- ZHANG YK, YANG BK, LI HY, HU LY, ZHAO XQ, XU SX, SUN P. Metabolomics of *Xiphophorus helleri* liver under starvation stress[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2021, 40(6): 611-621 (in Chinese).
- [29] 张海彬. 微生物中嘧啶代谢途径的研究进展[J]. 生物技术, 2021, 31(6): 619-624, 566.
- ZHANG HB. Research progress of pyrimidine metabolism in microbes[J]. Biotechnology, 2021, 31(6): 619-624, 566 (in Chinese).
- [30] VOGELS GD, van der DRIFT C. Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms[J]. Bacteriological Reviews, 1976, 40(2): 403-468.
- [31] 姚明珠, 刘英杰, 李姗姗, 陈中祥, 王鹏, 孙言春. NaHCO<sub>3</sub> 生境胁迫下方正银鲫鳃靶器官代谢组学研究[J]. 中国水产科学, 2022, 29(6): 792-802.
- YAO MZ, LIU YJ, LI SW, CHEN ZX, WANG P, SUN YC. Metabolomics study on gill tissues of *Carassius auratus gibelio* under NaHCO<sub>3</sub> habitat stress[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(6): 792-802 (in Chinese).
- [32] 李姗姗, 韩世成, 刘英杰, 丁璐, 魏晓凤, 王鹏, 孙言春. 高温胁迫下虹鳟肝脏代谢组学研究[J]. 中国水产科学, 2022, 29(8): 1168-1178.
- LI SW, HAN SC, LIU YJ, DING L, WEI XF, WANG P, SUN YC. Metabolomics of rainbow trout liver under heat stress[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(8): 1168-1178 (in Chinese).