

急性低温胁迫下耐寒克氏原螯虾的 消化代谢响应机制

韩艳秋¹,王培培²,胡宏辉³,罗玉静³,李冰^{1,3},刘志龙¹,
王继强⁴,张叶伟³,于丽华³,苏胜彦^{1,3}

(1 南京农业大学 无锡渔业学院,江苏 无锡 214081;2 广西壮族自治区水产引种中心,广西 南宁 530000;3 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心 农业农村部淡水渔业与种质资源利用重点实验室,江苏 无锡 214081;4 盘锦绕阳农业科技发展有限公司,辽宁 盘锦 124000)

【摘要】【目的】解析不同遗传背景克氏原螯虾在急性低温胁迫下的消化代谢响应策略。【方法】以普通群体(CT组)和经过长期选育的耐低温品系(RC组)克氏原螯虾为研究对象,进行急性低温胁迫处理(6℃,3 min),观察试验虾活动状态及是否出现异常反应或死亡现象,同时采集试验虾肠黏膜和肝胰腺组织,测定肠道消化酶(α -淀粉酶和脂肪酶)活性,对肝胰腺组织进行代谢组学分析,筛选差异代谢物,对其进行功能富集分析。【结果】低温胁迫 3 min 内 2 组克氏原螯虾均无即刻死亡个体;试验虾低温胁迫 3 min 后,RC 组 38% 个体可正常活动,CT 组全部个体均出现躯体翻转、活动停滞等低温胁迫应激反应。低温胁迫后 RC 组的肠道 α -淀粉酶与脂肪酶活性均显著低于 CT 组($P<0.05$)。代谢组学分析表明,基于代谢物谱 RC 组与 CT 组可实现明确区分,表明耐低温品系已形成稳定且可遗传的代谢特征。在代谢通路层面,从阳离子模式筛选得到 87 个差异代谢物,以 $P<0.05$,即 $-\lg P>1.3$ 且拓扑影响值 >0.05 为筛选条件,鉴定出 1 条显著富集通路,即甘油酸磷脂代谢通路;提取的甘油酸磷脂代谢子网络显示,胆碱激酶、磷酸胆碱胞苷转移酶、神经型磷脂酶、磷脂酰转移酶样蛋白 3、甘油磷酸胆碱磷酸二酯酶 1、胆碱磷酸乙醇胺磷酸转移酶 1 和磷酸酶 1 等多个关键酶参与并构成以上述差异代谢物为中心的代谢调控结构,2 种关键差异代谢物磷酸胆碱(P-Chol)和甘油磷酸胆碱(GPC)在 RC 组中均显著下调。【结论】在急性低温胁迫下,克氏原螯虾耐低温品系通过对甘油酸磷脂代谢的重塑和下调消化酶活性来应对低温胁迫。

【关键词】 克氏原螯虾;急性低温胁迫;甘油磷脂代谢;消化代谢响应机制

【中图分类号】 S966.12

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2027)03-0105-09

Response mechanisms of digestive and metabolic in cold-resistant strain *Procambarus clarkii* under acute cold stress

Han Yanqiu¹, Wang Peipei², Hu Honghui³, Luo Yujing³, Li Bing^{1,3}, Liu Zhilong¹,
Wang Jiqiang⁴, Zhang Yewei³, Yu Lihua³, Su Shengyan^{1,3}

(1 Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi, Jiangsu 214081, China; 2 Guangxi Zhuang Autonomous Region Aquatic Seed Introduction and Breeding Center, Nanning, Guangxi 530000, China; 3 Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences (CAFS), Wuxi, Jiangsu 214081, China; 4 Panjin Raoyang Agricultural Science and Technology Development Co. Ltd., Panjin, Liaoning 124000, China)

【收稿日期】 2026-01-13 **【修回日期】** 2026-04-18

【基金项目】 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心基本科研业务费项目(2025JBFR03);江苏省种业振兴揭榜挂帅项目(JBGS[2021]123);盘锦市“带土移植”项目(DTYZ2024003);中央公益性科研机构基础研究基金项目(2023TD39)

【作者简介】 韩艳秋(2002—),女,河南沈丘人,在读硕士,主要从事耐低温克氏原螯虾遗传选育研究。E-mail:15136709192@163.com

【通信作者】 苏胜彦(1982—),男,山西榆次人,研究员,博士,硕士生导师,主要从事分子数量遗传学、生物信息及克氏原螯虾新品种选育研究。E-mail:susy@ffrc.cn

Abstract: 【Objective】 The study aims to analyze the digestive and metabolic response strategies of *Procambarus clarkii* with different genetic backgrounds under acute cold stress. **【Method】** The control group (CT) and long-term selected cold resistant strain (RC) were subjected to unified acute cold stress treatment at 6 °C for 3 min. The activity status of experimental *Procambarus clarkii*, as well as abnormal reactions and mortality were observed. Intestinal mucosa and hepatopancreas tissues were sampled to determine the activities of intestinal digestive enzymes including α -amylase and lipase. Metabolomic analysis was performed on hepatopancreas tissues under positive-ion mode to screen differentially expressed metabolites, followed by functional enrichment analysis. **【Result】** No immediate mortality was observed in both groups of *Procambarus clarkii* within 3 min of low-temperature stress. After 3 min of stress exposure, 38% of individuals in the cold resistant strain (RC) maintained normal activity, whereas all individuals in the control group (CT) exhibited stress responses such as body inversion and movement stagnation. The activities of intestinal α -amylase and lipase in the RC group were significantly lower than those in the CT group ($P < 0.05$). Metabolomic analysis showed distinct separation between RC and CT groups according to metabolite profiles, indicating that the cold resistant strain had formed stable and heritable metabolic characteristics. At the metabolic pathway level, a total of 87 differentially expressed metabolites were screened under positive ion mode. With screening criteria of $P < 0.05$ ($-\lg P > 1.3$) and pathway impact value > 0.05 , one significantly enriched pathway was identified, namely glycerophospholipid metabolism pathway. The extracted sub-network of glycerophospholipid metabolism indicated that multiple key enzymes, including choline kinase (CHKA), phosphate cytidylyltransferase1A (PCYT1A), patatin-like phospholipase domain-containing protein6 (PNPLA6), phospholipase A/acyltransferase3 (PLAAT3), glycerophospho-choline phosphodiesterase 1 (GPCPD1), choline/ethanolamine phosphotransferase 1 (CEPT1) and phosphatase 1 (PHOSPHO1), participated in and constructed the metabolic regulatory network centered on the above differentially expressed metabolites. Two critical metabolites, phosphocholine (P-Cho) and glycerophosphocholine (GPC), were both significantly down-regulated in the cold resistant strain (RC). **【Conclusion】** Under acute cold stress, the cold resistant strain copes with low temperature stress via remodeling of glycerophospholipid metabolism and down-regulating digestive enzyme activities.

Key words: *Procambarus clarkii*; acute cold stress; glycerophospholipid metabolism; digestive and metabolic response mechanisms

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)属于甲壳动物,是我国第四大淡水养殖虾类,截至2024年,我国克氏原螯虾年产量已达 345×10^4 t,养殖面积达到 2.03×10^6 hm²^[1]。克氏原螯虾原产于北美洲中南部及墨西哥东北部,目前我国主要分布于湖北、安徽、湖南、江苏、江西等省份,其为雌雄异体、体内受精的卵生动物,繁殖过程具有抱卵孵化、雌虾抱卵护幼的特点,通常一年产卵一次,繁殖活动多在洞穴内完成^[2]。在国内,克氏原螯虾长期采用自繁自养的养殖模式,该模式已引发系统性种质衰退^[3],其中低温不耐受特性尤为突出,克氏原螯虾在5 °C的环境中可存活约1周,低于5 °C时存活时间显著缩短^[4],这限制了其在北方地区的养殖推广,但目前克氏原螯虾低温适应相关研究还未见报道。水温是调控甲壳动物(含克氏原螯虾)地理分布、生长、蜕壳及繁殖的核心环境因子^[5]。不同甲壳动物对低温

的生理阈值差异较大^[4,6],且其低温耐受能力具有生理可塑性,这种可塑性的遗传基础已在多种水产动物中得到广泛验证^[7]。通过持续环境胁迫驯化筛选,可快速积累适应性遗传变异,实现存活率等抗逆性状的代际增益^[8-10]。

肠道 α -淀粉酶和脂肪酶可调控能量利用与重分配,在甲壳动物环境胁迫响应中发挥着关键作用^[11-12],甲壳动物的遗传背景会影响其在急性低温胁迫后的肠道淀粉酶活性。长期低温选择压力下,耐低温品系可能在肠道消化酶活力上产生遗传性定向选择,这种由环境耐受性引起的肠道消化酶活力变化已在日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)^[13]、六斑刺鲃(*Diodon holocanthus*)^[14]等多种水生物种中有所报道。肝胰腺作为甲壳动物的代谢枢纽,负责碳水化合物、脂肪和蛋白质的消化、吸收、储存与转运,低温环境下机体可通过调节代谢

通路来平衡能量供需^[15-16],从而提高甲壳动物抵御低温胁迫、维持生理平衡的能力。

综上所述,甲壳动物低温耐受能力的生理可塑性依赖于消化功能调控与肝胰腺代谢重编程等机制。本课题组通过多代选择育种,获得了F₆代克氏原螯虾耐低温品系(cold resistant strain, RC),其可在6℃环境下正常生长摄食,且存活率、活动能力与抗氧化防御能力均显著高于普通养殖群体^[17-18]。但低温适应并非仅依赖抗氧化防御体系,急性低温胁迫下消化与代谢的能量重分配是决定克氏原螯虾低温耐受能力的关键。目前,低温适应能力不同的克氏原螯虾品系在急性低温胁迫下的消化酶活性调节及肝胰腺代谢重编程研究尚未见报道。为此,本研究以克氏原螯虾RC品系(F₆代)和普通养殖群体为试验对象,经短时低温胁迫后,比较两群体肠道 α -淀粉酶、脂肪酶活性及肝胰腺代谢谱差异,以期揭示克氏原螯虾低温适应的消化与代谢调控机制,为其低温适应理论及耐低温种质培育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

采用本课题组在辽宁省沈阳市基地所选育的克氏原螯虾耐寒品系F₆代(RC)与当地普通养殖克氏原螯虾种群(CT)为试验对象,活体样本均由沈阳玉兰农业有限公司捕捞后保鲜空运至无锡渔业学院,挑选活力较好、无明显外伤的个体作为试验虾。

1.2 样本处理

试验用克氏原螯虾在正式试验前均暂养2周,以消除运输及环境变化带来的应激影响,暂养期间水体温度维持在(26±1)℃,溶解氧保持在(6.4±0.2)mg/L。试验开始前,对RC组与CT组虾个体进行标记。

为诱发可比的低温生理响应,在不引起大规模死亡的前提下,采用统一的短时低温胁迫作为试验处理条件。将标记后的RC组与CT组各50只虾个体同时置于6℃水体中,进行3min的急性低温胁迫处理。低温胁迫处理期间,持续观察并记录2组克氏原螯虾的活动状态及是否出现异常反应或死亡。低温处理结束后,立即从RC组与CT组中各随机挑选3尾雄虾和3尾雌虾解剖,采集肝胰腺组织,于无RNA酶的冻存管中,置于液氮中低温过夜冻存后,转移至-80℃冰箱中保存。采集试验虾肠道组织,轻轻挤出内容物后将空肠剪开,先用载玻片刮去表

层残留的食糜,再刮取黏膜,采集的黏膜样品立即放入液氮中速冻,-80℃冰箱冻存,以备后续测定。

1.3 肠道消化酶活性测定

取肠黏膜组织,采用淀粉酶和脂肪酶试剂盒(南京建成生化工程研究所)测定 α -淀粉酶(α -amylase, AMS)和脂肪酶(lipase, LPS)活性,具体测定方法按照试剂盒的说明书进行。

1.4 肝胰腺组织样本处理

取约0.5g肝胰腺组织样品置于研钵中,分次加入液氮,边加边研磨,使肝胰腺组织呈均匀粉末状,其间要确保样品始终处于冷冻状态不发生融化。取100mg研磨后的肝胰腺组织样本置于EP管中,加入体积分数80%甲醇水溶液500 μ L进行涡旋振荡,振荡后的样品冰浴静置5min,4℃下15000r/min离心20min,取上清液。上清液加质谱级水稀释至甲醇含量为53%,再次进行离心(条件同上),并收集上清液。每个样本取20 μ L上清液混合,即得质控样本(quality control, QC)。

1.5 肝胰腺代谢组学分析

代谢组学检测试验在北京诺禾致源科技股份有限公司完成,采用液相色谱-串联质谱(liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS/MS)技术对代谢物样本进行定性与定量分析,具体试验条件如下:液相色谱采用HPLC C18色谱柱(规格:100mm×2.1mm,粒径1.9 μ m),分别设置阳离子与阴离子检测模式的流动相体系:阳离子模式流动相A为0.1%甲酸的水溶液,流动相B为纯甲醇;阴离子模式流动相A为pH9.0的5mmol/L醋酸铵水溶液,流动相B为纯甲醇。色谱分离的共性参数设定为:流速0.2mL/min,柱温40℃,进样量5 μ L。梯度洗脱程序如下:0~1.5min,流动相B保持2%;1.5~3min,流动相B由2%线性升至100%;3~10min,维持100%流动相B进行洗脱;10~10.1min,流动相B由100%快速降至2%;10.1~12min,保持2%流动相B以平衡色谱柱,确保后续样本检测的稳定性。采用Q Exactive™ HF-X高分辨质谱仪采集质谱数据,结合上述色谱条件进行代谢物离子信号的采集与记录,为后续代谢组学分析提供基础数据支持。

1.6 肝胰腺代谢组学数据处理与统计分析

将原始数据导入Compound Discoverer 3.1(CD 3.1)搜库软件中进行处理,对代谢物的保留时间与质荷比等参数进行简单筛选后,设置保留时间偏差0.2min和质量偏差 5×10^{-6} 对样品进行峰对

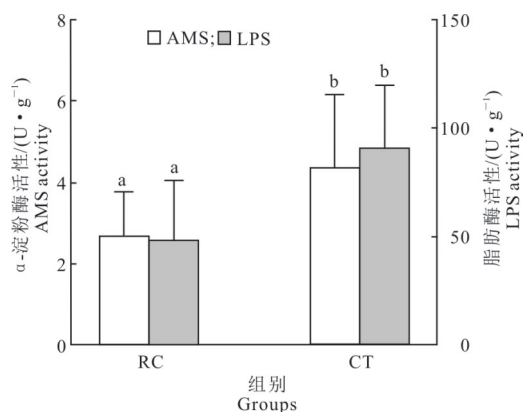
齐,使鉴定结果更加准确,随后进一步设置质量偏差 5×10^{-6} 、信号强度偏差 30%、信噪比 3、最小信号强度及加和离子等信息进行峰提取,并对峰面积进行定量,再对目标离子进行整合,通过分子离子峰和碎片离子进行代谢物分子式的预测,并在 mz-Cloud (<https://www.mzcloud.org/>)、mzVault 和 Masslist 数据库中进行比对,最后得到代谢物的定性和相对定量结果。为评估代谢组数据的稳定性与可靠性,分别在阳离子和阴离子模式下进行主成分分析(principal component analysis, PCA),以不同处理组样本在 PCA 图中的分离程度判断组间代谢差异,以质量控制(quality control, QC)样本在 PCA 图中的聚集程度验证仪器分析过程的稳定性及数据的重复性;使用 KEGG 数据库、HMDB 数据库和 Lipid-maps 数据库对鉴定到的代谢物进行注释及分类;采用 *t* 检验分析各代谢物在两组间的差异显著性。以变量投影重要度(variable importance in the projection, VIP) > 1.0、差异倍数(fold change, FC) > 1.2 或 < 0.83 且 $P < 0.05$ 为标准对差异代谢物(differentially expressed metabolites, DEMs)进行筛选,对筛选到的差异代谢物进行聚类分析、偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)、KEGG 通路富集分析与代谢通路拓扑分析。

2 结果与分析

2.1 2组克氏原螯虾的耐低温性能及肠道酶活性差异

低温胁迫处理 3 min 内,2组克氏原螯虾均未出

现即刻死亡现象。胁迫处理 3 min 后观察发现,RC 组中仍有 38% 的个体可维持正常爬行等生理活动;而 CT 组所有个体均出现身体翻倒、活动暂停等典型的低温胁迫响应现象。由图 1 可知,在急性低温胁迫处理条件下,RC 组个体的肠道 α -淀粉酶和脂肪酶活性均较 CT 组显著降低($P < 0.05$),提示急性低温胁迫对 RC 组克氏原螯虾肠道消化酶活性的抑制作用更为明显。



同种酶图柱上标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

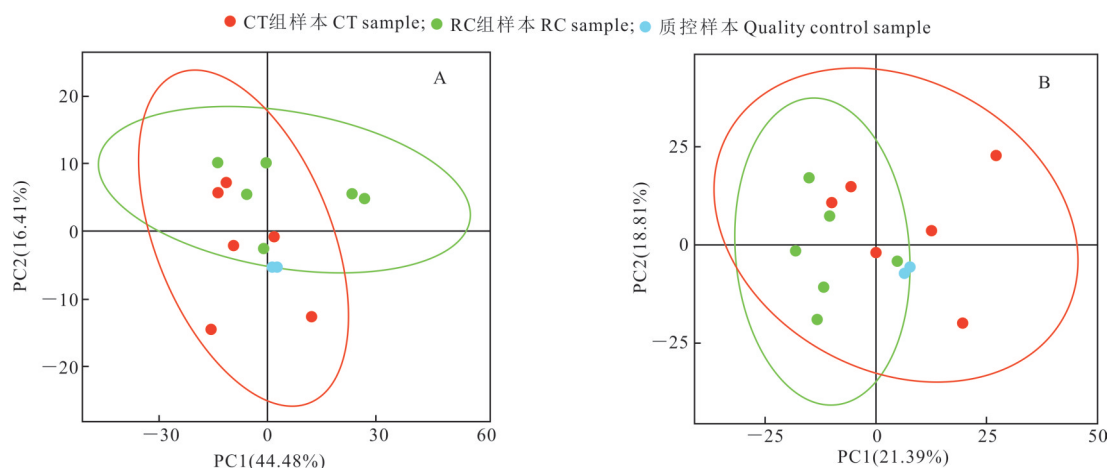
Values with different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$) in the same enzyme group.

图 1 急性低温胁迫对耐寒(RC)和普通(CT)克氏原螯虾肠道 α -淀粉酶(AMS)和脂肪酶(LPS)活性的影响

Fig. 1 Effects of acute cold stress on intestinal α -amylase (AMS) and lipase (LPS) activities in cold-resistant strain (RC) and control (CT) *Procambarus clarkii*

2.2 肝胰腺代谢组数据质控

代谢组数据的 PCA 分析结果如图 2 所示。



A. 阴离子模式代谢物主成分分析; B. 阳离子模式代谢物主成分分析。

A. PCA of metabolites detected in negative-ion mode; B. PCA of metabolites detected in positive-ion mode.

图 2 耐寒(RC)和普通(CT)克氏原螯虾肝胰腺组织代谢组数据主成分分析

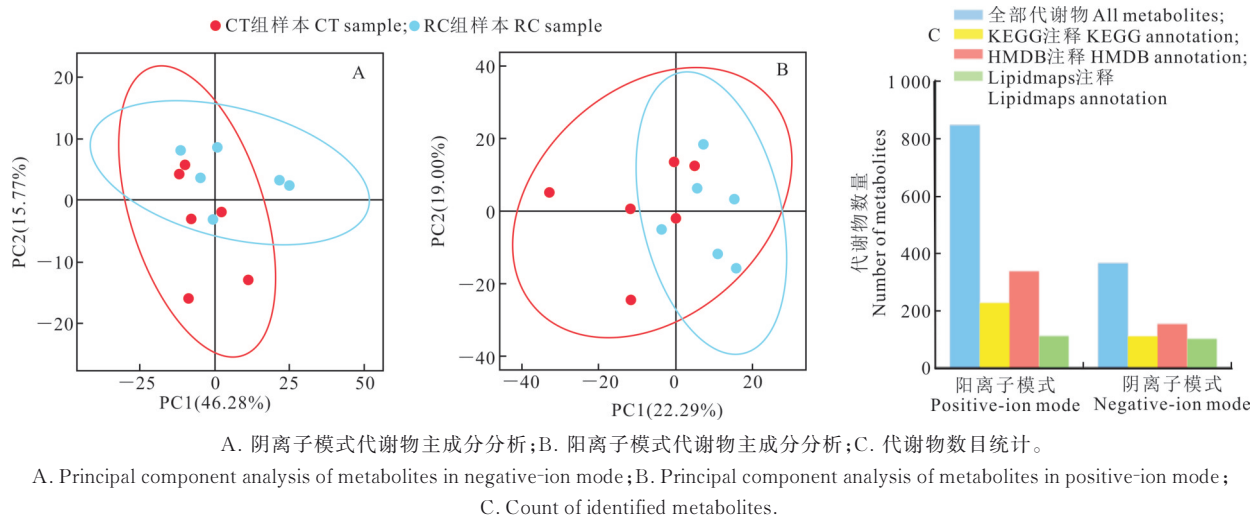
Fig. 2 Principal component analysis (PCA) of metabolomic data from the hepatopancreas of cold resistant strain (RC) and control (CT) *Procambarus clarkii*

图2表明,试验数据整体质量良好。在阴离子模式(图2-A)下,主成分1(PC1)和主成分2(PC2)的贡献率分别为44.48%和16.41%,累计贡献率达60.89%,能够较好地反映样本间的主要代谢差异;RC和CT样本在PCA图上明显分离,表明2组样本在代谢物组成上存在差异;QC 3个样本紧密聚集于坐标图中心区域,说明仪器分析过程稳定、数据重复性良好。在阳离子模式(图2-B)下,PC1和PC2的贡献率分别为21.39%和18.81%,累计贡献率为40.20%;RC和CT样本表现出明显的分离趋势;QC 3个样本依旧集中分布,这进一步验证了检测系统的稳定性与试验结果的可靠性。综合来看,2种离子模式下的PCA结果均表明,QC样本聚集良好,

RC和CT样本分离明显,表明试验仪器运行稳定、数据质量可靠,所得代谢组数据可用于后续差异代谢物筛选及生物通路分析。

2.3 肝胰腺代谢物鉴定及注释

对2组虾肝胰腺代谢物进行PCA,结果(图3-A, B)显示,相较于CT组,RC组代谢物更为集中,且2组样本在阴阳离子模式下代谢物均可以较好地聚类区分。对2种群克氏原螯虾肝胰腺中的代谢物进行注释(图3-C),共鉴定出1 216种代谢物,其中阳离子模式下848种,阴离子模式下368种;将代谢物分别进行KEGG、HMDB及Lipidmaps数据库注释,结果阳离子模式下分别注释到229,340和113个代谢物,阴离子模式下分别注释到113,156和105个代谢物。



A. 阴离子模式代谢物主成分分析;B. 阳离子模式代谢物主成分分析;C. 代谢物数目统计。

A. Principal component analysis of metabolites in negative-ion mode;B. Principal component analysis of metabolites in positive-ion mode;
C. Count of identified metabolites.

图3 耐寒(RC)和普通(CT)克氏原螯虾肝胰腺代谢物注释与主成分分析

Fig. 3 Metabolite annotation and principal component analysis of hepatopancreas metabolites in cold-resistance strain (RC) and control (CT) *Procambarus clarkii*

2.4 肝胰腺代谢物分类

Lipidmaps 脂质分类结果(表1)显示,克氏原螯虾肝胰腺脂质代谢物可归为7大类,其中脂肪酰类38种,占33.93%;甘油磷脂类29种,占25.89%;甾醇类19种,占16.96%;聚酮类化合物16种,占14.29%;异戊烯脂质7种,占6.25%;鞘脂2种,占1.79%;甘油脂1种,占0.89%。整体来看,克氏原螯虾肝胰腺脂质组成以脂肪酰类和甘油磷脂类为主。

KEGG 通路注释分类结果(表1)显示,代谢相关通路注释的代谢物最多,有253种,占比66.23%;其次为生物体系统,通路有79种代谢物,占比20.68%;环境信息处理相关通路注释到36种代谢物,占比9.42%;细胞过程与遗传信息处理通路注释到的代谢物数量较少,各有7种,占比均为1.83%。KEGG 分类结果表明,注释代谢物主要富集于代谢通路,其

次为生物体系统与环境信息处理相关通路,细胞过程和遗传信息处理通路的代谢物较少。

HMDB 注释分类结果(表1)显示,代谢物主要分为脂类和类脂质分子、有机酸及其衍生物、有机杂环化合物等3大类,其中脂类和类脂质分子类代谢物数量最多(92种),占比最大;其次为有机酸及其衍生物(78种)和有机杂环化合物(64种)类代谢物;苯类化合物,苯丙素类和聚酮类化合物,核苷、核苷酸及其类似物类代谢物分别为28,21和17种;有机含氧化合物、有机含氮化合物、生物碱及其衍生物类代谢物数量较少;烃类衍生物类代谢物仅有1种。

综合HMDB、KEGG和Lipidmaps等3个数据库的注释分类结果可知,本研究中的代谢物主要集中于脂质代谢及能量代谢等生物学过程,其中脂质和类脂质分子在数量与功能层面均占据主导地位。

表 1 克氏原螯虾代谢物的 HMDB、KEGG、Lipidmaps 数据库注释结果表

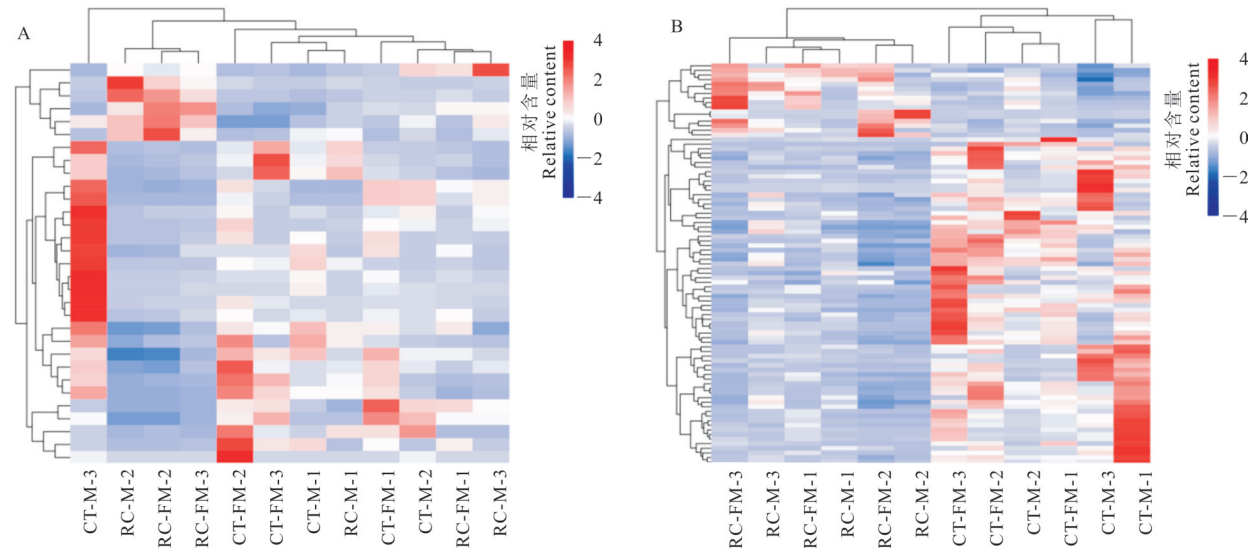
Table 1 Classification of metabolites in *Procambarus clarkii* annotated by HMDB, KEGG and Lipidmaps databases

数据库 Database	化合物种类 Compound type	数量 Quantity	占比/% Proportion
Lipidmaps 数据库 Lipidmaps data	脂肪酰类 Fatty acyls	38	33.93
	甘油磷脂类 Glycerophospholipids	29	25.89
	甾醇类 Sterols	19	16.96
	聚酮类化合物 Polyketides	16	14.29
	异戊烯脂质 Prenol lipids	7	6.25
	鞘脂 Sphingolipids	2	1.79
	甘油脂 Glycerolipids	1	0.89
KEGG 数据库 KEGG data	代谢 Metabolism	253	66.23
	生物体系统 Organismal systems	79	20.68
	环境信息处理 Environmental information processing	36	9.42
	细胞过程 Cellular processes	7	1.83
	遗传信息处理 Genetic information processing	7	1.83
HMDB 数据库 HMDB data	脂质和类脂质分子 Lipids and lipid-like molecules	92	27.14
	有机酸及其衍生物 Organic acids and derivatives	78	23.01
	有机杂环化合物 Organoheterocyclic compounds	64	18.88
	苯类化合物 Benzenoids	28	8.26
	苯丙素类和聚酮类化合物 Phenylpropanoids and polyketides	21	6.19
	核苷、核苷酸及其类似物 Nucleosides, nucleotides, and analogues	17	5.01
	有机含氧化合物 Organic oxygen compounds	16	4.72
	有机含氮化合物 Organic nitrogen compounds	14	4.13
	生物碱及其衍生物 Alkaloids and derivatives	8	2.36
	烃类衍生物 Hydrocarbon derivatives	1	0.29

2.5 肝胰腺 DEMs 筛选及 PLS-DA 分析验证

以 $VIP>1.0$, $FC>1.2$ 或 <0.83 且 $P<0.05$ 为标准,对 DEMs 进行筛选,阳离子模式下共获得 16 种上调 DEMs,阴离子模式下共获得 6 种上调

DEMs;阳离子模式下共获得 71 种下调 DEMs,阴离子模式下共获得 25 种下调 DEMs。由图 4 可见,2 种群克氏原螯虾的代谢物差异明显,且在阳离子模式下 DEMs 可以准确聚类至 2 个不同的种群。



A. 阴离子模式差异代谢物热图;B. 阳离子模式差异代谢物热图。每一行代表一种差异代谢物;CT-M-3表示CT组雄虾3号样本,CT-FM-3表示CT组雌虾3号样本,其他依此类推。

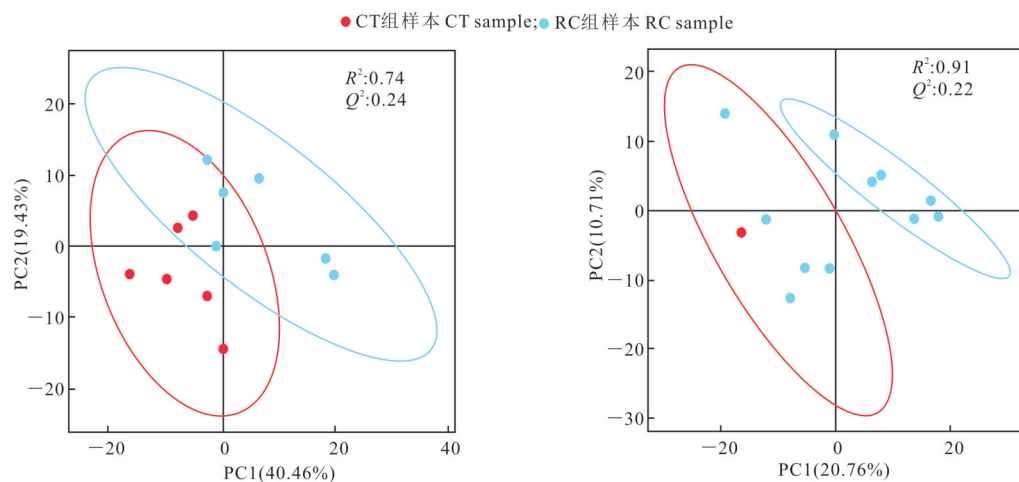
A. Differentially expressed metabolites in negative-ion mode;B. Differentially expressed metabolites in positive-ion mode. Each row denotes a differential metabolite;CT-M-3 represents the sample of male *Procambarus clarkii* number 3 in the CT group, and CT-FM-3 represents the sample of female *Procambarus clarkii* number 3 in the CT group. The rest are deduced by analogy.

图 4 急性低温胁迫下耐寒(RC)与普通(CT)克氏原螯虾差异代谢物聚类热图

Fig. 4 Clustering heatmap of DEMs in *Procambarus clarkii* between the cold-resistance strain (RC) and control (CT) groups under acute cold stress

进一步对 DEMs 进行 PLS-DA 分析,结果见图 5。由图 5 可知,阳离子模式下模型拟合优度(R^2)为 0.91,显著高于阴离子模式的 0.74;阳离子模式和阴离子模式的交叉验证预测率(Q^2)分别为 0.22 和

0.24,水平相近。综合聚类结果和模型参数表现可知,阳离子模式下 RC 和 CT 区分度较好且模型的拟合优度更好,故后续差异 DEMs 筛选及通路富集分析均基于阳离子模式结果进行。



A. 阴离子模式差异代谢物;B. 阳离子模式差异代谢物。

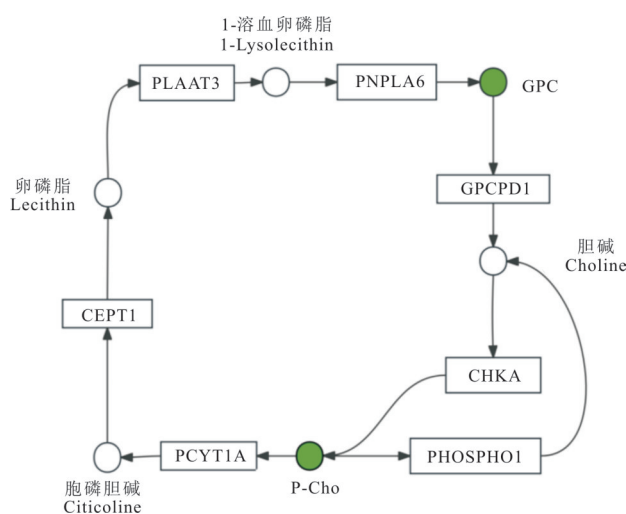
A. Differentially expressed metabolites in negative-ion mode;B. Differentially expressed metabolites in positive-ion mode.

图5 急性低温胁迫下耐寒(RC)与普通(CT)克氏原螯虾差异代谢物 PLS-DA 分析图

Fig. 5 PLS-DA of differential metabolites between cold-tolerant (RC) and control (CT) *Procambarus clarkii* under acute cold stress

2.6 肝胰腺差异代谢物功能富集分析

将阳离子模式下的 87 个 DEMs 导入 Metabo Analyst 6.0 数据库进行代谢通路富集分析,结果如图 6 所示。以 $P < 0.05$, 即 $-\lg P > 1.3$ 、拓扑影响值 > 0.05 作为重要代谢通路的筛选条件,共筛选出 1 条显著代谢通路,即甘油酸磷脂代谢通路,有 2 种 DEMs 出现在该通路中,分别是磷酸胆碱(phosphocholine, P-Cho)和甘油磷酸胆碱(glycerophosphocholine, GPC)。提取甘油酸磷脂代谢通路子网络图,图 6 展示了克氏原螯虾在急性低温胁迫下 DEMs 所涉及的甘油酸磷脂代谢(glycerophospholipid metabolism)子通路,通路涉及的关键酶包括胆碱激酶(choline kinase, CHKA)、磷酸胆碱胞苷转移酶(phosphate cytidyltransferase 1A, PCYT1A)、神经元型磷脂酶(patatin-like phospholipase domain-containing protein 6, PNPLA6)、磷脂酰转移酶样蛋白 3 (phospholipase A/acyltransferase 3, PLAAT3)、甘油磷酸胆碱磷酸二酯酶 1 (glycerophosphocholine phosphodiesterase 1, GPCPD1)、胆碱磷酸乙醇胺磷酸转移酶 1 (choline/ethanolamine phosphotransferase 1, CEPT1) 和磷酸酶 1 (phosphatase 1, PHOSPHO1),与 CT 组相比,RC 组克氏原螯虾体内 P-Cho 和 GPC 均显著下调。



图中绿色圆点代表显著下调的差异代谢物。

Green dots represent significantly down-regulated differential metabolites in the figure.

图6 克氏原螯虾响应急性低温胁迫的甘油酸磷脂代谢子网络

Fig. 6 Glycerophospholipid metabolism subnetwork of *Procambarus clarkii* under acute cold stress

3 讨论

几乎所有生物体都有代偿性调节机制,能够通过生理和代谢变化来适应外界环境的温度变化^[19]。为了能在低温环境下生存,甲壳动物会通过代谢抑

制^[20]、调整膜脂组成^[14]等一系列的措施来应对低温环境胁迫,代谢抑制可减慢机体的代谢速率,降低能量消耗;调整膜脂组成可防止因低温造成的膜相变和渗透性破坏,增加糖原储备。然而,生理代谢调节等机制能够适应的温度范围有限。变温动物在应对低温胁迫时,普遍采取降低整体代谢率的策略,以减少能量消耗,将有限的能量重新分配至维持基本生理过程^[21]。在本研究中,RC 组在急性低温下肠道 α -淀粉酶与脂肪酶活性显著降低,这并非简单的酶活性因低温而被动降低,而是一种适应性的主动调节。消化是一个高能耗的生理过程,涉及多种消化酶的合成、分泌以及营养物质的吸收和同化,需要消耗大量 ATP^[22]。在低温环境下,动物活动减少,摄食需求降低,此时维持高水平的消化功能会造成能量的浪费。RC 品系通过主动抑制消化吸收功能,从而实现对整体代谢率的迅速下调,该结果与之前对罗非鱼的研究报道^[23]一致。

本研究代谢组学分析进一步揭示,RC 组与 CT 组可基于代谢物谱清晰区分,表明连续多世代的选育使耐低温品系形成了稳定且可遗传的代谢特征。差异代谢物富集结果显示,甘油磷脂代谢通路发生显著富集,通路中磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱含量均显著下调。该变化由 CHKA、PCYT1A 及磷脂酶家族 PNPLA6、PLAAT3、GPCPD1 等关键酶协同调控。低温胁迫通常会导致细胞膜脂质发生相变,从液晶态转为凝胶态,从而影响膜蛋白的功能和物质的跨膜运输^[24],甘油磷脂是构成细胞膜最基本的骨架结构,其组成和动态平衡对于维持细胞膜在低温下的流动性和完整性至关重要^[25],水生动物的脂肪酸代谢对温度变化很敏感^[26],膜脂肪酸去饱和常被认为是水生生物适应低温的重要机制,对维持膜的流动性、酶活力和细胞的正常功能具有重要作用^[27]。冷应激导致细胞中脂肪酸的组成发生改变,不饱和脂肪酸所占比例上升,这有利于维持细胞膜的流动性^[28-30],例如当吉富罗非鱼在 15℃ 环境中时,其肝组织中的不饱和脂肪酸比例显著升高^[31]。甘油磷脂是细胞双层膜的主要组成成分,本研究代谢组的结果显示,低温胁迫下 RC 组甘油磷脂代谢通路被抑制,其中磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱 2 种代谢物均较 CT 组下调。在代谢网络中,甘油磷酸二酯酶催化代谢反应生成的 GPC 与 P-Cho,是后续胆碱代谢途径的直接前体物质,二者一旦进入该途径便被磷酸胆碱-磷酸胆碱胞苷转移酶活化为胞苷二

磷酸(cytidine diphosphate-choline, CDP)胆碱^[32],随后与二酰甘油结合生成磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)^[32-33]。PC 分子在 sn-2 位具有高度的酰基选择性,优先接受不饱和脂肪酸形成 PC(16:0/PUFA)等不饱和磷脂^[34]。因而,当组织或细胞对多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)的需求显著上升时,外源或内源 PUFA 会被迅速转运至内质网并酰化到 PC 的 sn-2 位,驱动 CDP-胆碱途径的通量加速,以满足膜流动性、信号分子合成及脂肪酸储存的需求。该过程导致游离的 P-Cho 与 GPC 被快速消耗,因而在代谢物中检测到的自由 P-Cho/GPC 浓度下降,而不饱和磷脂及其下游 PUFA 产物则相对增多,这正是代谢流向从胆碱前体向不饱和脂肪酸-PC 复合体转移的直接表现。RC 品系通过这种高效的代谢重塑,在低温胁迫下迅速调整膜脂组成,从而维护细胞膜结构与功能的稳定。

[参考文献]

- [1] 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. 中国水产学会中国渔业统计年鉴:2024[M]. 北京:中国农业出版社,2024.
Bureau of Fisheries and Fishery Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook:2024[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2024.
- [2] 金诗语. 克氏原螯虾繁殖和摄食的生态学研究[D]. 北京:中国科学院大学,2019.
Jin S Y. Ecological study on reproduction and feeding of *Procambarus clarkii*[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2019.
- [3] 邹宇凡,吴玮杰,白志毅,等. 克氏原螯虾三群体双列杂交组合生长性能和耐干露能力比较分析[J]. 上海海洋大学学报, 2024, 33(2):361-370.
Zou Y F, Wu W J, Bai Z Y, et al. Comparative analysis of growth performance and desiccation resistance of three-population diallel hybrid combination of *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2024, 33(2):361-370.
- [4] Chung Y S, Cooper R M, Graff J, et al. The acute and chronic effect of low temperature on survival, heart rate and neural function in crayfish (*Procambarus clarkii*) and prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) species[J]. Open Journal of Molecular and Integrative Physiology, 2012, 2(3):75-86.
- [5] 蔡云川,于培松,刘付永忠,等. 水产养殖寒潮灾害防灾减灾技术措施[J]. 海洋与渔业, 2014(12):68-69.
Cai Y C, Yu P S, Liu F Y Z, et al. Technical measures for prevention and mitigation of cold wave disaster in aquaculture[J]. Ocean & Fishery, 2014(12):68-69.
- [6] Davis L B, Hofmann E E, Klinck J M, et al. Distributions of krill and Antarctic silverfish and correlations with environmental

- variables in the western Ross Sea, *Antarctica* [J]. Marine Ecology Progress Series, 2017, 584: 45-65.
- [7] Gui J F, Bao Z M, Zhang X J. Development strategy for aquaculture genetic breeding and seed industry [J]. Chinese Journal of Engineering Science, 2016, 18(3): 8.
- [8] Gjerdem T, Robinson N, Rye M. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: a review [J]. Aquaculture, 2012, 350/351/352/353: 117-129.
- [9] Dégremont L, Bédier E, Soletchnik P, et al. Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*) [J]. Aquaculture, 2005, 249(1/2/3/4): 213-229.
- [10] 吴俊伟, 涂翰卿, 策金华, 等. 尼罗罗非鱼选育二代盐碱耐受性和生长研究 [J]. 水产学杂志, 2016, 29(3): 30-34.
- Wu J W, Tu H Q, Jia J H, et al. Salinity-alkalinity tolerance and growth of second selected generation of *Oreochromis niloticus* [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2016, 29(3): 30-34.
- [11] 周文月. 重金属镉对克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 的肠道毒性效应 [D]. 太原: 山西大学, 2023.
- Zhou W Y. Intestinal toxicity effect of heavy metal cadmium on *Procambarus clarkii* [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2023.
- [12] Rodríguez-Viera L, Alpízar-Pedraza D, Mancera J M, et al. Toward a more comprehensive view of α -amylase across decapods crustaceans [J]. Biology, 2021, 10(10): 947.
- [13] Shen W Y, Qu Y, Zhang H, et al. Response of gut microbiota, digestive enzyme ability, and immune function to starvation in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* [J]. Aquaculture Nutrition, 2022, 2022(1): 6836727.
- [14] 苏志星, 岳彦峰, 施兆鸿, 等. 六斑刺鲃仔稚鱼发育过程中消化酶和非特异性免疫因子的活性变化 [J]. 海洋渔业, 2021, 43(1): 61-70.
- Su Z X, Yue Y F, Shi Z H, et al. Activities of digestive enzymes and non-specific immune indicators in *Diodon holocanthus* during larval and juvenile stages [J]. Marine Fisheries, 2021, 43(1): 61-70.
- [15] 孔祥会, 王桂忠, 王克坚, 等. 低温驯化下锯缘青蟹肝胰腺蛋白表达及脂肪酸组成的变化 [J]. 水生生物学报, 2005, 29(5): 524-532.
- Kong X H, Wang G Z, Wang K J, et al. Changes of protein expression and fatty acid composition in hepatopancreas of *Scylla serrata* under low temperature acclimation [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(5): 524-532.
- [16] 李志强. 温度变化对中华绒螯蟹生理功能的影响 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2023.
- Li Z Q. Effects of temperature variation on physiological function of *Eriocheir sinensis* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2023.
- [17] 卢泽宇. 基于形态学与整合多组学技术研究克氏原螯虾耐寒品系的耐寒性状与相关分子机制 [D]. 南京: 南京农业大学, 2023.
- Lu Z Y. Based on morphology and integration of multi-omics exploring the cold tolerance performance and related molecular mechanisms of cold-resistant *Procambarus clarkii* strain [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2023.
- [18] Hu H H, Zhang Y W, Liu Z L, et al. Microbial diversity affects the cold tolerance of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) by regulating histamine metabolism [J]. Microbial Ecology, 2025, 88(1): 140.
- [19] Kong X H, Wang G Z, Li S J. Effects of low temperature acclimation on antioxidant defenses and ATPase activities in the muscle of mud crab (*Scylla paramamosain*) [J]. Aquaculture, 2012, 370: 144-149.
- [20] Issartel J, Renault D, Voituren Y, et al. Metabolic responses to cold in subterranean crustaceans [J]. Journal of Experimental Biology, 2005, 208(Pt15): 2923-2929.
- [21] Johnston I A, Dunn J. Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish [J]. Symposia of the Society for Experimental Biology, 1987, 41: 67-93.
- [22] Sievert L M, Suita Y, Mayes D M, et al. Specific dynamic action, postprandial thermophily, and the impact of temperature on gastric digestion in the cornsnake *Pantherophis guttatus* [J]. Zoological Studies, 2013, 52(1): 33.
- [23] 宾石玉, 张妍, 林勇, 等. 低温胁迫对罗非鱼消化酶活性的影响 [J]. 广西师范大学学报 (自然科学版), 2014, 32(1): 127-132.
- Bin S Y, Zhang Y, Lin Y, et al. Effects of low temperature stress on digestive enzyme activity in tilapia [J]. Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition), 2014, 32(1): 127-132.
- [24] Bustamante gonzález A J. Caracterización de mecanismos implicados en la regulación de la respuesta a estrés por frío en plantas [D/OL]. Valencia (Spain): Universitat Politècnica de València, 2019[2025-11-13]. <https://doi.org/10.4995/THE-SIS/10251/118800>.
- [25] Zheng G W, Li L X, Li W Q. Glycerolipidome responses to freezing-and chilling-induced injuries: examples in *Arabidopsis* and rice [J]. BMC Plant Biology, 2016, 16(1): 70.
- [26] Yoon D S, Byeon E, Kim D H, et al. Effects of temperature and combinational exposures on lipid metabolism in aquatic invertebrates [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2022, 262: 109449.
- [27] 许友卿, 郑一民, 丁兆坤. 冷应激对水生动物代谢的影响及调控研究进展 [J]. 中国水产科学, 2017, 24(5): 1149-1159.
- Xu Y Q, Zheng Y M, Ding Z K. Research progress on the effects, mechanisms, and control of cold stress in aquatic animals [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(5): 1149-1159.

(下转第126页)