动物营养学报 2021,33(11):6203-6212
Chinese Journal of Animal Nutrition

doi:10.3969/j.issn.1006-267x.2021.11.021

发育期间乳鸽血清代谢物及代谢通路的变化

安　勇[1,2]　计　峰[2*]　王雪敏[1*]　王　铮[2]　张　帅[1,2]

(1.河北工程大学生命科学与食品工程学院,邯郸 056000;2.北京市农林科学院畜牧兽医研究所,北京 100089)

摘　要: 本试验应用液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术分析乳鸽发育期间血清代谢物的变化。选取14日龄、体重(398.33±43.28) g与21日龄、体重(449.17±49.44) g的健康乳鸽各6只,翅静脉采血,分离血清作为样本,采用基于LC-MS非靶向代谢组学技术进行分析,根据变量投影重要度(VIP)和独立样本*t*检验筛选出差异代谢物,并作通路富集分析。结果显示:在2个日龄乳鸽血清样本中共检测到11 538个特征代谢峰,正、负离子模式下共鉴定出694种代谢物。经搜库(自建库、Metlin、HMDB等数据库)定性分析,共筛选出71种差异代谢物,其中有49种差异代谢物丰度显著上调($P<0.05$),22种差异代谢物丰度显著下调($P<0.05$)。KEGG通路富集共获得29条代谢通路,其中14条代谢通路差异显著($P<0.05$),主要为甘油脂代谢、醚脂代谢、糖基磷脂酰肌醇(GPI)-锚定生物合成等。乳鸽血清S-腺苷蛋氨酸、*L*-棕榈酰肉碱、硬脂酰肉碱和磷脂类代谢物的含量随着日龄增加而显著增加($P<0.05$)。上述结果有助于了解乳鸽发育期生理状态的变化,为生产中更好地满足其营养需要提供参考。

关键词: 乳鸽;血清;差异代谢物;代谢通路

中图分类号:S836　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1006-267X(2021)11-6203-10

鸽(*Columba livia domestica*)属于鸟纲,鸽形目,鸠鸽科,鸽属,是一种较早被人类驯养的鸟类[1-2]。鸽肉和鸽蛋营养价值丰富,具有多种药用功效,民间素有"一鸽胜九鸡"的说法,因此近年来鸽已发展为我国第四大家禽[3]。与其他家禽不同的是,鸽作为晚成鸟,出壳后的乳鸽最初无法独立进食,必须依靠亲鸽通过口对口逆呕式哺喂才能存活[4-6]。鸽乳是由亲鸽嗉囊组织分泌的一种富含营养成分的乳酪状物质,随着乳鸽日龄的增长,鸽乳逐渐与亲鸽摄食的谷物混合,最后鸽乳完全被谷物取代[7-9]。已有研究表明,14日龄是乳鸽生长发育的重要转折点,14日龄后乳鸽的生长强度和生长速度均有所下降[10]。谢鹏等[11]研究发现,21日龄时亲鸽分泌的鸽乳减少,这是乳鸽后期生长速度变慢的主要原因。然而,现有研究多集中于哺育期亲鸽生理状态的变化,对乳鸽生长发育期的代谢物特点研究较少。因此,本试验应用液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术对14和21日龄乳鸽血清中代谢物进行检测,以了解乳鸽发育期生理状态的变化,为生产中更好地满足其营养需要提供参考。

1　材料与方法

1.1　试验动物

试验选取14日龄、体重(398.33±43.2) g与21日龄、体重(449.17±49.44) g的健康乳鸽各6只,试验乳鸽来自北京市密云区鸽场。12只乳鸽由亲鸽哺喂(2+2模式),按照日龄分为2组,每组6个重复,每个重复1只,于同一舍饲养,统一饲喂玉米、豌豆、高粱和小麦为基础的配合饲料,自由

收稿日期:2021-04-23

基金项目:北京市农林科学院改革与发展课题(XMS201906);北京市科委国家现代农业科技城产业培育与成果惠民项目(Z171100001517003);北京市农林科学院畜牧兽医研究所课题(201705)

作者简介:安　勇(1995—),男,山东淄博人,硕士研究生,研究方向为饲料科学。E-mail: 982356929@qq.com

* **通信作者:**计　峰,副研究员,硕士生导师,E-mail: jifengji@sina.com;王雪敏,教授,硕士生导师,E-mail: 512918118@qq.com

采食和饮水,按常规进行饲养管理,每天光照16 h,舍内温度控制在(22±6) ℃。

1.2 样品采集

从乳鸽的翅静脉进行无菌采血,然后在4 ℃下以3 000 r/min离心10 min后取血清,于-80 ℃保存以备检测。

1.3 试剂与仪器

主要试剂:甲醇(Fisher公司,美国)、乙腈(Fisher公司,美国)、甲酸(Fisher公司,美国)、纯水(Fisher公司,美国)、丙醇(Fisher公司,美国),以上试剂均为色谱纯。

主要仪器:Triple TOF5600三重四级杆质谱(AB Sciex公司,美国)、ExionLC AD液相色谱系统(AB Sciex公司,美国)、HSS T3色谱柱(1.8 μm,2.1 mm×100 mm,Waters公司,美国)、JXDC-20型氮气吹扫仪(上海净信实业发展有限公司)、LNG-T88型台式快速离心浓缩干燥器(太仓市华美生化仪器厂)、Wonbio-96c型高通量组织破碎仪(上海万柏生物科技有限公司)、SBL-10TD型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、Centrifuge 5430R型高速冷冻离心机(Eppendorf公司,德国)、NewClassic MF MS105DU型电子天平(梅特勒公司,瑞士)。

1.4 样本制备

取100 μL血清样本于2 mL离心管中,加入1颗直径6 mm的研磨珠。用400 μL提取液(甲醇:水=4:1,体积比)含0.02 mg/mL的内标(*L*-2-氯苯丙氨酸)提取代谢物。样本溶液于高通量组织破碎仪研磨6 min(-10 ℃,50 Hz),然后低温超声提取30 min(5 ℃,40 kHz)。将样本于-20 ℃静置30 min,再离心15 min(4 ℃,13 000×*g*),最后移取上清液上机分析。

1.5 质控(QC)样本

取等体积的所有样本提取物混合制备成QC样本,在仪器分析过程中,每6个样本中插入1个QC样本,以考察整个分析过程的重复性。

1.6 液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)分析

仪器平台为AB SCIEX公司的超高效液相色谱串联飞行时间质谱(UPLC-Triple TOF)系统。

1.6.1 色谱条件

10 μL样本经HSS T3色谱柱(1.8 μm,2.1 mm×100 mm)分离后进入质谱检测。流动相A为95%水+5%乙腈(含0.1%甲酸),流动相B为47.5%乙腈+47.5%异丙醇+5%水(含0.1%甲酸)。分离梯度:0~0.1 min,流动相B从线性0升至5%;0.1~2.0 min,流动相B从线性5%升至25%;2~9 min,流动相B线性从25%升至100%;9~13 min,流动相B线性维持100%;13.0~13.1 min,流动相B线性从100%降至0;13.1~16.0 min,流动相B线性维持0。流速为0.40 mL/min,柱温为40 ℃。

1.6.2 质谱条件

样本质谱信号采集采用正负离子扫描模式,质量扫描范围质荷比(m/z):50~1 000。离子喷雾电压,正离子电压5 000 V,负离子电压-4 000 V,去簇电压80 V,喷雾气50 psi,辅助加热气50 psi,气帘气30 psi,离子源加热温度550 ℃,(40±20) V循环碰撞能。

1.7 数据预处理和搜库

上机完成之后,LC-MS原始数据导入代谢组学处理软件Progenesis QI(Waters公司,美国)进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐,最终得到一个保留时间、质荷比和峰强度的数据矩阵,数据矩阵用80%规则来去除缺失值,再进行空缺值填补(原始矩阵中最小值填补空缺值),为减小样本制备及仪器不稳定带来的误差,用总和归一化法对样本质谱峰的响应强度进行归一化,得到归一化后的数据矩阵。同时删除QC样本相对标准偏差(RSD)>30%的变量,并进行log10对数化处理,得到最终用于后续分析的数据矩阵。同时将MS和MS/MS质谱信息与代谢公共数据库HMDB(http://www.hmdb.ca/)和Metlin数据库(https://metlin.scripps.edu/)进行匹配,得到代谢物信息。

1.8 统计与分析

预处理后的数据上传美吉生物云平台(https://cloud.majorbio.com)进行数据分析。利用R软件包ropls(Version1.6.2)进行主成分分析(PCA)和正交最小偏二乘判别分析(OPLS-DA),并使用7次循环交互验证来评估模型的稳定性。此外,进行student's *t* 检验分析。差异代谢物的选择基于OPLS-DA模型得到的变量投影重要度(VIP)和student's *t* 检验 *P* 值来确定,VIP>1、*P*<0.05的代谢物为差异代谢物,并通过KEGG数据库(https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html)进行代谢通路注释,获得差异代谢物参与的通路。利

用 Python 软件包 scipy(version 1.0.0)进行通路富集分析,并通过 Fisher 精确检验获得与试验处理最相关的生物学途径。

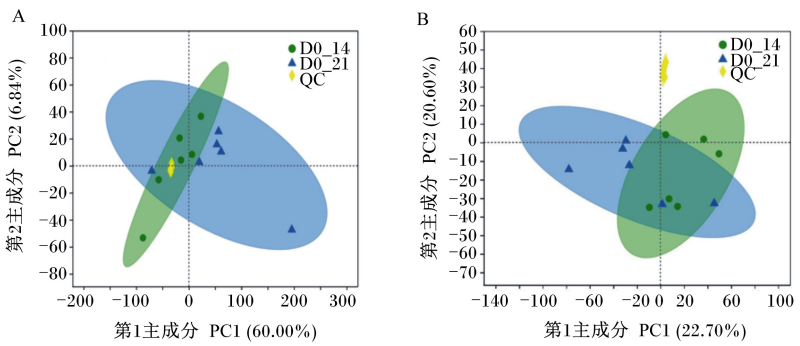
2　结果与分析

2.1　LC-MS 数据的特征

在 14 和 21 日龄乳鸽血清样本中共提取到 11 538个质谱峰。经搜库(自建库、Metlin、HMDB 等数据库)定性分析,共鉴定出 694 种代谢物,其中正离子模式鉴定到 332 种代谢物,负离子模式鉴定到 362 种代谢物。

2.2　PCA

通过 PCA 可初步了解组间整体代谢差异和组内的重复稳定性,PCA 结果可以显示样本间代谢组的分离趋势,反映了样本间代谢组的差异大小。由图 1 可知,PCA 模型中 QC 样本紧密聚集在一起,表明本试验稳定性和重复性较好。2 组样本之间有明显的分离趋势,说明 2 组样本的代谢产物存在差异,且样本全部处于 95%置信区间内。R^2X 为决定 PCA 模型质量的主要参数,PCA 正离子模型和负离子模型的 R^2X 分别为 0.669、0.533,2 个参数值均大于 0.5,说明 PCA 模型良好。



A:正离子模型 PCA 得分图 PCA score graph of the positive ion model;B:负离子模型 PCA 得分图 PCA score graph of the negative ion model。

D0_14:14 日龄乳鸽 14-day-old pigeon;D0_21:21 日龄乳鸽 21-day-old pigeon;QC:质控样本 quality control sample。下图同 the same as below。

图 1　14 与 21 日龄乳鸽血清样本正、负离子模型 PCA 得分图。

Fig.1　PCA score graphs of positive and negative ion models of serum samples from 14- and 21-day-old squabs

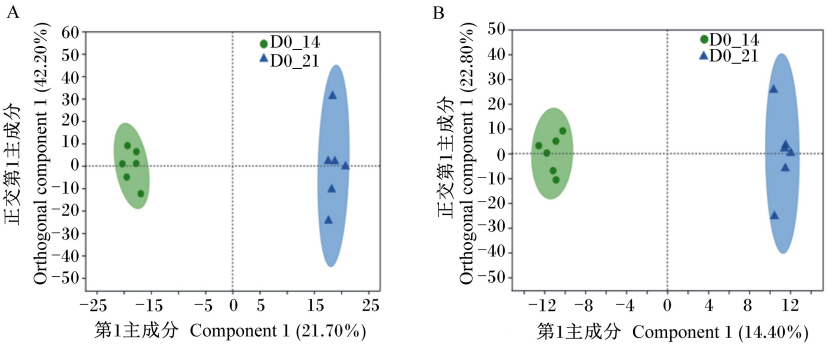
2.3　OPLS-DA

OPLS-DA 是代谢组学数据分析中常用方法,是最小偏二乘判别分析(PLS-DA)的扩展。OPLS-DA 能够将 PCA 中不相关的差异信息去除,然后筛选差异代谢物。OPLS-DA 模型得分图(图 2)显示,2 组样本均在 95%的置信区间内,14 日龄组和 21 日龄组分别分布在第 1 主成分(PC1)的左侧和右侧,说明 2 组样本之间存在差异。对于 OPLS-DA 正离子模型,$R^2X=0.699$、$R^2Y=0.996$、$Q^2=0.370$;对于 OPLS-DA 负离子模型,$R^2X=0.480$、$R^2Y=0.996$、$Q^2=0.507$,其中 R^2X 和 R^2Y 分别表示所建模型对 X 和 Y 矩阵的解释率,Q^2 表示模型的预测能力。理论上 R^2、Q^2 数值越接近 1,说明模型越好,数值低则说明模型的拟合准确性差。通常情况下,R^2、Q^2 高于 0.5 较好,高于 0.3 即可接受,从图 2 可知该模型具有较高的解释力和预测力。为了验证 OPLS-DA 模型是否存在过拟合,对模型进行验证,以确保后续结果可靠,设置检验为 200 次,验证模型结果(图 3)显示 Q^2 截距小于 R^2,且 Q^2 回归直线呈现左低右高的趋势,表明 OPLS-DA 模型稳健可靠,未发生过拟合,可进一步根据 VIP 分析筛选差异代谢物。

2.4　差异代谢物的筛选

通过 OPLS-DA 模型 PC1 的 VIP 及独立样本 t 检验的 P 值,寻找 2 个日龄乳鸽血清中的差异性表达代谢物。设置限定条件为 VIP>1、FC>1 或 FC<1 且 $P<0.05$,筛选出的差异代谢物如表 1 所示。在 14 与 21 日龄乳鸽血清样本中共筛选出 71 种差异代谢物(38 种正离子化差异代谢物和 33 种负离子化差异代谢物),其中有 49 种丰度显著上调($P<0.05$),22 种丰度显著下调($P<0.05$)。根据 HMDB 数据库化合物分类可将差异代谢物归为如

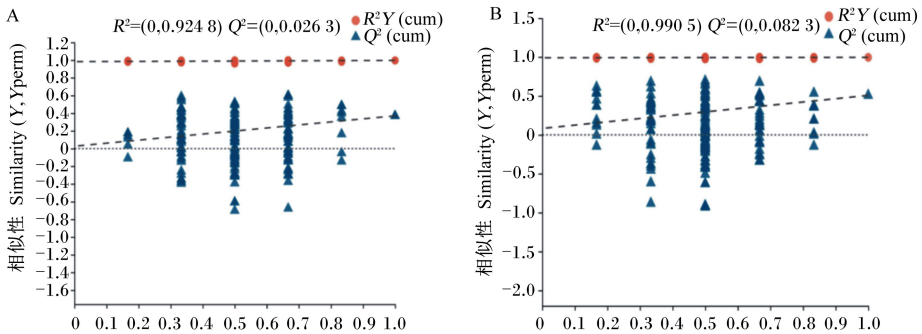
下 6 种类型:类脂类分子(35 种)、有机杂环化合物(6 种)、有机酸及其衍生物(5 种)、苯基丙氨酸和聚酮(5 种)、有机氧化合物(4 种)、核苷酸类似物(2 种)。



A:正离子模型 OPLS-DA 得分图 OPLS-DA score graph of the positive ion model;B:负离子模型 OPLS-DA 得分图 OPLS-DA score graph of the negative ion model。

图 2 14 和 21 日龄乳鸽血清样本正、负离子模型 OPLS-DA 得分图

Fig.2 OPLS-DA score graphs of positive and negative ion models of serum samples from 14- and 21-day-old squabs



A:正离子模型置换检验图 displacement inspection chart of positive ion mode;B:负离子模型置换检验图 displacement inspection chart of negative ion mode。

图 3 14 和 21 日龄乳鸽血清样本 OPLS-DA 模型置换检验图

Fig.3 OPLS-DA model replacement test chart of serum samples from 14- and 21-day-old squabs

表 1 14 和 21 日龄乳鸽血清中的差异代谢物

Table 1 Differential metabolites in serum of 14 and 21 day-old squabs

序号 No.	差异代谢物 Differential metabolites	变量投影重要度 VIP	差异倍数 FC	*P* 值 *P*-value
1	溶血磷脂酰胆碱[20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)] LysoPC[20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)]	1.21	1.04	0.021
2	溶血磷脂酰胆碱(P-18:0) LysoPC(P-18:0)	1.18	1.05	0.016
3	磷脂酰甘油[18:1(9Z)/0:0] PG[18:1(9Z)/0:0]	1.41	1.10	0.025
4	十八碳烯酸 Vaccenic acid	1.92	1.18	0.003
5	11Z-十六碳烯酸 11Z-hexadecenoic acid	1.52	1.15	0.035
6	溶血血小板活化因子(C16) Lyso-PAF (C16)	1.37	1.05	0.007
7	1-十七碳酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 1-heptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	1.12	0.95	0.028

续表 1

序号 No.	差异代谢物 Differential metabolites	变量投影重要度 VIP	差异倍数 FC	*P* 值 *P*-value
8	磷脂酰胆碱[18:2(9*Z*,12*Z*)/20:4(8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)] PC[18:2(9*Z*,12*Z*)/20:4(8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)]	1.12	1.04	0.024
9	反式,反式黏糠酸 *Trans-trans*-muconic acid	1.48	1.10	0.005
10	Janthitrem C	1.03	1.04	0.039
11	溶血磷脂酰胆碱[22:4(7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*)] LysoPC[22:4(7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*)]	1.27	1.05	0.012
12	溶血磷脂酰胆碱(O-18:0) LysoPC(O-18:0)	1.15	1.05	0.038
13	甘油磷酸胆碱 Glycerophosphocholine	1.22	1.08	0.029
14	4′-羟基-*R*-苯丙酮 4′-hydroxy-*R*-phenprocoumon	1.37	1.12	0.031
15	诺孕酯 Norgestimate	1.01	0.95	0.015
16	16-溴-9*E*-十六碳烯酸 16-bromo-9*E*-hexadecenoic acid	2.16	1.45	0.027
17	Riesling acetal	1.16	0.86	0.037
18	棕榈酰左旋肉碱 Palmitoyl-*L*-carnitine	1.26	1.07	0.033
19	草木犀甙 Melilotin	2.75	1.79	0.008
20	溶血磷脂乙醇胺[20:4(8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)/0:0] LysoPE[20:4(8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)/0:0]	1.16	1.05	0.013
21	溶血磷脂酰胆碱[18:2(9*Z*,12*Z*)] LysoPC[18:2(9*Z*,12*Z*)]	2.56	1.47	0.008
22	N-油酰基甘氨酸 N-oleoyl glycine	3.23	2.38	0.007
23	*D*-葡萄糖基二氢鞘氨醇 *D*-glucosyldihydrosphingosine	1.69	1.19	0.033
24	Bakkenolide B	2.27	1.61	0.048
25	12-OAHSA	3.51	4.24	0.002
26	神经酰胺(d18:1/22:0) Ceramide(d18:1/22:0)	1.00	1.05	0.048
27	磷脂酰乙醇胺[22:5(4*Z*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*)/22:6(4*Z*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*,19*Z*)] PE[22:5(4*Z*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*)/22:6(4*Z*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*,19*Z*)]	1.54	1.17	0.036
28	鞘磷脂(d18:1/14:0) SM(d18:1/14:0)	1.29	1.12	0.048
29	磷脂酰丝氨酸[16:0/24:1(15*Z*)] PS[16:0/24:1(15*Z*)]	1.58	1.20	0.025
30	硬脂酰肉碱 Stearoylcarnitine	1.22	1.07	0.036
31	心磷脂[a-13:0/i-24:0/18:2(9*Z*,11*Z*)/i-20:0][rac] CL[a-13:0/i-24:0/18:2(9*Z*,11*Z*)/i-20:0][rac]	1.32	0.92	0.026
32	油酰基肉碱 Oleoylcarnitine	1.44	1.07	0.012
33	(±)-Myristoylcarnitine	1.81	1.16	0.003
34	癸酰基左旋肉碱 Decanoyl-*L*-carnitine	2.92	2.39	0.014
35	羟脯氨酰异亮氨酸 Hydroxyprolyl-isoleucine	1.06	0.94	0.010
36	异丁酰肉碱 Isobutyryl carnitine	1.82	1.29	0.019
37	蜀黍苷 Dhurrin	2.06	0.68	0.028
38	3-ethyl-2-(1-pyrrolidinyl)-2-cyclopenten-1-one	1.82	0.78	0.026
39	17-十八碳炔酸 17-octadecynoic acid	1.24	1.04	0.018
40	谷氨酸组氨酸 Histidinyl-glutamate	2.17	0.67	0.029
41	山茶皂甙元 B Camelliagenin B	2.14	0.68	0.024
42	磷脂酰丝氨酸[20:5(5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)/24:1(15*Z*)] PS[20:5(5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)/24:1(15*Z*)]	1.10	1.05	0.022
43	环氧樟脑醛 Epoxycampholenic aldehyde	1.48	1.22	0.017
44	N-阿魏酰基色胺 Nb-feruloyltryptamine	2.30	0.67	0.044

续表 1

序号 No.	差异代谢物 Differential metabolites	变量投影重要度 VIP	差异倍数 FC	*P* 值 *P*-value
45	(*E*)-8-羟基-2-辛烯-4,6-二炔酸 (*E*)-8-hydroxy-2-octene-4,6-diynoic acid	1.72	1.13	0.012
46	肌腱蛋白 1-3 Kinetensin 1-3	1.58	1.17	0.003
47	S-腺苷蛋氨酸 S-adenosylmethionine	1.60	1.12	0.015
48	2-(阿拉伯糖基氨基)-3-(葡糖基氨基)丙烷腈 2-(arabinosylamino)-3-(glucosylamino) propanenitrile	1.75	1.10	0.000
49	磷脂酰乙醇胺[15∶0/20∶2(11*Z*,14*Z*)] PE[15∶0/20∶2(11*Z*,14*Z*)]	1.49	0.94	0.030
50	脱氧尿苷 Deoxyuridine	2.03	1.44	0.022
51	磷脂酰乙醇胺[P-16∶0/14∶1(9*Z*)] PE[P-16∶0/14∶1(9*Z*)]	2.11	1.30	0.024
52	溶血磷脂酰胆碱(16∶0) LysoPC(16∶0)	1.93	0.79	0.009
53	5,7-二羟基-2',6-二甲氧基异黄酮-7-鼠李糖苷 5,7-dihydroxy-2',6-dimethoxyisoflavone-7-rhamnoside	1.77	1.18	0.027
54	红藻胶 Furcelleran	1.53	1.20	0.048
55	*L*-棕榈酰肉碱 *L*-palmitoylcarnitine	2.70	1.97	0.023
56	20-羟基-PGF2a 20-hydroxy-PGF2a	2.54	1.90	0.019
57	3-dehydrosphinganinium (1+)	1.64	1.31	0.034
58	1-棕榈酰甘油磷酸肌醇 1-palmitoylglycerophosphoinositol	1.07	1.08	0.018
59	Taraxacolide 1-O-b-*D*-glucopyranoside	1.25	0.88	0.035
60	十二烷基肉碱 Dodecanoylcarnitine	2.62	2.00	0.010
61	磷脂酰丝氨酸[18∶1(11*Z*)/20∶2(11*Z*,14*Z*)] PS[18∶1(11*Z*)/20∶2(11*Z*,14*Z*)]	2.00	0.74	0.041
62	矮牵牛花素 3-龙胆二糖苷 Petunidin 3-gentiobioside	2.39	1.59	0.039
63	9,12-十六烷二酰基肉碱 9,12-hexadecadienoylcarnitine	1.72	0.78	0.016
64	Hebevinoside X	2.13	0.72	0.037
65	4-羟基苯甲醛 4-hydroxybenzaldehyde	1.41	0.90	0.019
66	谷氨酰色氨酸 Glutamyltryptophan	1.54	1.10	0.016
67	磺酰胆碱甘氨酸 Sulfolithocholylglycine	1.65	0.87	0.048
68	乙丙嗪 Ethopropazine	1.87	0.85	0.027
69	3-甲基二氧吲哚 3-methyldioxyindole	1.76	0.78	0.046
70	3-甲基戊二酸 3-methylglutaric acid	1.68	0.82	0.002
71	多巴醌 Dopaquinone	1.52	0.89	0.033

差异倍数>1,代表 21 日龄乳鸽血清中该代谢物含量高于 14 日龄乳鸽。*P* 值由 *t* 检验获得。

FC greater than 1 mean that this metabolite content in serum of 21-day-old squabs was more than that of 14-day-old squabs. *P*-value was obtained by *t*-test.

2.5 KEGG 通路富集分析

利用 KEGG 数据库对差异代谢物进行注释,发现 14 与 21 日龄乳鸽血清样本中 71 种具有显著差异的代谢物共注释到 29 条代谢通路。由表 2 可知,富集差异代谢物较多且显著的通路主要有甘油脂代谢、醚脂代谢、糖基磷脂酰肌醇(GPI)-锚定生物合成。

3 讨 论

代谢组学是对生物体代谢物进行定性定量分析,并寻找代谢物与生理和病理变化相对关系的研究[12]。按研究的目的,代谢组学又可分靶向和非靶向,其中非靶向代谢组学能从整体反映代谢物的变化,全面地挖掘小分子代谢物,有利于发现新的代谢物和新的代谢通路[13]。利用非靶向代谢

组学技术对 14 和 21 日龄乳鸽血清样本进行分析,总共筛选出 71 个显著差异代谢物,包括类脂类分子(35种)、有机杂环化合物(6种)、有机酸及其衍生物(5 种)、苯基丙氨酸和聚酮(5 种)、有机氧化合物(4 种)、核苷酸类似物(2 种)。

表 2　14 与 21 日龄乳鸽血清差异代谢物 KEGG 通路富集分析

Table 2　Enrichment analysis of KEGG pathway in serum of 14- and 21-day-old squabs

代谢通路 Metabolic pathways	Total[1)]	Raw P[2)]	FDR[3)]
甘油脂代谢 Glycerophospholipid metabolism	9	<0.000 1	0.000 2
醚脂代谢 Ether lipid metabolism	2	0.002 7	0.017 5
糖基磷脂酰肌醇-锚定生物合成 Glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis	2	0.009 5	0.041 3

1)该通路中的代谢个数。The number of metabolites in the metabolic pathway.

2)代谢通路富集分析的 *P* 值。The *P*-value of metabolic pathway enrichment analysis.

3)经错误发现率方法进行多重假设检验校正后的 *P* 值。The *P*-value was obtained by multiple hypothesis testing using false discovery rate method.

S-腺苷蛋氨酸(S-adenosyl methionine,SAM)是蛋氨酸的活性形式,为机体内重要的甲基供体,参与 DNA、RNA、脂质和神经递质等化合物的甲基化反应[14]。SAM 在机体生理功能和生化反应中起到不可替代的重要代谢与调控作用[15]。此外,SAM 直接参与多胺的形成,促进细胞的生长和蛋白质的合成[16]。蛋白质是生长发育最基本的营养成分之一,本试验中,与 14 日龄乳鸽相比,21 日龄乳鸽血清中 SAM 含量显著上调,这可能表明随着日龄增长机体蛋白质的合成增加。冯艳等[17]研究指出,SAM 可以调控肌肉发育,通过促进蛋白质合成并抑制其降解,使其在体内沉积,从而提高畜禽骨骼肌肌肉产量。另有研究表明,饲粮中添加蛋氨酸可以显著提高乳鸽的胸肌和腿肌的产量[18],这可能与 SAM 促进肌肉发育的作用相关。他人关于乳鸽生长规律的研究也发现,乳鸽在 21 日龄较 14 日龄胸肌产量有显著提高[19],这与本试验中 21 日龄乳鸽血清中 SAM 含量显著增加相符合。但 SAM 在乳鸽体内的作用方式及机理还有待进一步研究。

肉碱是一种在肝脏、肾脏和大脑中合成的类维生素化合物,是动物脂肪酸代谢的一个重要因素[20]。已知肉碱最重要的代谢功能是将脂肪转运到细胞的线粒体中进行脂肪酸氧化[21]。*L*-棕榈酰肉碱、硬脂酰肉碱是肉碱的长链酰基脂肪酸衍生酯。与 14 日龄乳鸽相比,21 日龄乳鸽血清 *L*-棕榈酰肉碱、硬脂酰肉碱的含量显著增加,这表明乳鸽生长后期脂肪酸氧化增强,从而释放能量供乳鸽生长发育利用。

本试验中代谢物 KEGG 注释化合物分类最多的是磷脂类,主要有溶血磷脂酰胆碱[20:4(5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)]、溶血磷脂酰胆碱(P-18:0)、磷脂酰胆碱[18:2(9*Z*,12*Z*)/20:4(8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)]、溶血磷脂酰胆碱[22:4(7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*)]、溶血磷脂酰胆碱[18:2(9*Z*,12*Z*)]、磷脂酰乙醇胺[22:5(4*Z*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*)/22:6(4*Z*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*,19*Z*)]、磷脂酰乙醇胺[15:0/20:2(11*Z*,14*Z*)]、溶血磷脂酰胆碱(16:0)。磷脂是构成生物膜脂质双层结构的主要成分,具有抗氧化、刺激细胞生长、免疫调节、促进羽毛生长等生理作用[22-23]。在生产实践中发现,乳鸽在后期生长发育过程中羽毛生长速度最快。除磷脂酰乙醇胺[15:0/20:2(11*Z*,14*Z*)]、溶血磷脂酰胆碱(16:0)外,其余 6 种代谢物在 21 日龄乳鸽血清中的丰度均显著上调。这可能与乳鸽生长发育后期代谢生成大量磷脂以满足羽毛快速生长有关。综上所述,乳鸽发育后期(14~21 日龄)血清中 S-腺苷蛋氨酸、*L*-棕榈酰肉碱、硬脂酰肉碱和磷脂类代谢物质发生了显著的变化。上述结果有助于了解乳鸽发育期生理状态的变化,为生产中更好地满足其营养需要提供参考。

4　结　论

① 本试验应用非靶向代谢组学方法研究了乳鸽生长发育期间(14 和 21 日龄)血清中小分子代谢物的变化,共有 71 种差异代谢物被鉴别出,其中 49 种显著上调,22 种显著下调,且 S-腺苷蛋氨酸、*L*-棕榈酰肉碱、硬脂酰肉碱和磷脂类代谢物质

发生了显著的变化。

② 通过代谢通路富集研究发现,甘油脂代谢、醚脂代谢、糖基磷脂酰肌醇-锚定生物合成等 14 条代谢通路发生显著改变。

参考文献:

[1] STRINGHAM S A,MULROY E E,XING J C,et al. Divergence, convergence, and the ancestry of feral populations in the domestic rock pigeon[J]. Current Biology,2012,22(4):302-308.

[2] 张晓昀.碱性氨基酸对乳鸽早期生长发育调控的研究[D].博士学位论文.杭州:浙江大学,2018.
ZHANG X Y. Research on early development regulation of pigeon squabs by cationic amino acids[D]. Ph. D. Thesis. Hangzhou: Zhejiang University, 2018. (in Chinese)

[3] 龙菊,何映霞,叶静.鸽肉的营养成分分析及其评价[J].食品工业科技,2011,32(12):447-448.
LONG J, HE Y X, YE J. Analysis and evaluation of nutritional components of *Columba domesticus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(12):447-448. (in Chinese)

[4] 刘裕.乳鸽的饲养技术[J].畜牧兽医科技信息,2017(10):99.
LIU Y. Breeding technology of squab pigeon[J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine,2017(10):99. (in Chinese)

[5] GILLESPIE M J, HARING V R, MCCOLL K A, et al. Histological and global gene expression analysis of the 'lactating' pigeon crop[J]. BMC Genomics, 2011,12:452.

[6] GILLESPIE M J, STANLEY D, CHEN H L, et al. Functional similarities between pigeon 'milk' and mammalian milk: induction of immune gene expression and modification of the microbiota[J]. PLoS One,2012,7(10):e48363.

[7] SALES J,JANSSENS G P J. Nutrition of the domestic pigeon (*Columba livia domestica*)[J]. World's Poultry Science Journal,2003,59(2):221-232.

[8] 邹晓庭,徐倩倩,马晓汶,等.乳鸽早期生长发育及氨基酸营养调控研究[J].经济动物学报,2019,23(1):1-8,12.
ZOU X T,XU Q Q,MA X W,et al. Research on early growth development of squab and its regulation by amino acids[J]. Journal of Economic Animal,2019,23(1):1-8,12. (in Chinese)

[9] GILLESPIE M J,CROWLEY T M,HARING V R,et al. Transcriptome analysis of pigeon milk production-role of cornification and triglyceride synthesis genes[J]. BMC Genomics,2013,14:169.

[10] 陈明霞.肉鸽生长发育规律及其营养调控研究进展[J].家禽科学,2019(8):49-52.
CHEN M X. The growth and nutrition regulation of domestic pigeon (*Columba livia*)[J]. Poultry Science,2019(8):49-52. (in Chinese)

[11] 谢鹏,万雪萍,卜柱,等.鸽乳分泌特征及鸽营养需求研究进展[J].中国家禽,2018,40(11):47-51.
XIE P,WAN X P,BU Z,et al. Formation of crop milk and nutrition requirement of the domestic pigeon (*Columba livia domestica*): a review[J]. China Poultry, 2018,40(11):47-51. (in Chinese)

[12] SUMNER L W,LEI Z T,NIKOLAU B J,et al. Modern plant metabolomics: advanced natural product gene discoveries, improved technologies, and future prospects[J]. Natural Product Reports,2015,32(2):212-229.

[13] 马宁,杨亚军,刘希望,等.基于液质平台代谢组学生物样本的采集和制备[J].中国兽医学报,2017,37(6):1193-1200.
MA N,YANG Y J,LIU X W,et al. Biological sample collection and preparation for metabonomic study with LC-MS platform[J]. Chinese Journal of Veterinary Science,2017,37(6):1193-1200. (in Chinese)

[14] 周亚妮.S-腺苷蛋氨酸对 *ApoE* 基因敲除小鼠动脉粥样硬化形成的影响[D].硕士学位论文.武汉:华中科技大学,2019.
ZHOU Y N. Effect of S-adenosylmethionine on atherosclerosis in *ApoE*-knockout mice[D]. Master's Thesis. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology,2019. (in Chinese)

[15] LU S C, MATO J M. S-adenosylmethionine in liver health, injury, and cancer[J]. Physiological Reviews, 2012,92(4):1515-1542.

[16] 徐巧云,胡良宇,王梦芝.蛋氨酸在动物体内代谢途径与周转机制[J].动物营养学报,2017,29(11):3877-3884.
XU Q Y,HU L Y,WANG M Z. Metabolic pathway and turnover mechanism of methionine in animals[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition,2017,29(11):3877-3884. (in Chinese)

[17] 冯艳,杨琳,朱勇文,等.蛋氨酸调控动物主要生理功能的机制[J].中国科学(生命科学),2019,49(3):228-237.
FENG Y,YANG L,ZHU Y W,et al. Methionine reg-

ulates the major physiological functions of animals [J].Science in China (Life Science),2019,49(3):228-237.(in Chinese)

[18] JIANG S G,PAN N X,CHEN M J,et al.Effects of dietary supplementation with *DL*-methionine and *DL*-methionyl-*DL*-methionine in breeding pigeons on the carcass characteristics, meat quality and antioxidant activity of squabs[J].Antioxidants,2019,8(10):435.

[19] GAO C Q,YANG J X,CHEN M X,et al.Growth curves and age-related changes in carcass characteristics,organs,serum parameters,and intestinal transporter gene expression in domestic pigeon (*Columba livia*)[J].Poultry Science,2016,95(4):867-877.

[20] 王晶晶,丁卫星,王荣谈,等.*L*-肉碱的生理功能以及对猪繁殖性能的影响[J].饲料工业,2013,34(6):56-58.
WANG J J,DING W X,WANG R T,et al.The physiological function of *L*-carnitine and its effect on pig reproductive performance[J].Feed Industry,2013,34(6):56-58.(in Chinese)

[21] MA N,LIU X W,KONG X J,et al.Feces and liver tissue metabonomics studies on the regulatory effect of aspirin eugenol eater in hyperlipidemic rats[J].Lipids in Health and Disease,2017,16(1):240.

[22] 侯改霞,牛英鹏.磷脂与运动研究进展[J].体育学刊,2005,12(4):56-58.
HOU G X,NIU Y P.A review of phospholipids and sports[J].Journal of Physical Education,2005,12(4):56-58.(in Chinese)

[23] 胡小中.磷脂酰胆碱的生理功能和作用机理[J].粮油食品科技,2011,19(4):42-44.
HU X Z.Physiological function of phosphatidylcholine and its possible mechanism of action[J].Science and Technology of Cereals,Oils and Foods,2011,19(4):42-44.(in Chinese)

Changes of Serum Metabolites and Pathways during Development of Squabs

AN Yong[1,2] JI Feng[2*] WANG Xuemin[1*] WANG Zheng[2] ZHANG Shuai[1,2]

(1. *College of Life Sciences and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Handan* 056000, *China*; 2. *Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing* 100089, *China*)

Abstract: The changes of serum metabolites during the development of squabs were analyzed with the technique of liquid chromatography-mass spectrometry. Six 14-day-old healthy squabs with the body weight of (398.33±43.28) g and six 21-day-old healthy squabs with the body weight of (449.17±49.44) g were selected for wing venous blood sampling, and serum was prepared and analyzed with non-target metabolomics based on the technique of LC-MS. The differential metabolites were screened out according to the variable importance in projection (VIP) and independent sample *t*-test, and their pathway enrichments were analyzed. The results showed that a total of 11 538 characteristic metabolic peaks were detected in the serum of 14- and 21-day-old squabs, and 694 metabolites identified in the positive and negative ion models. After the qualitative analysis of database (self-built database, Metlin, HMDB etc.), a total of 71 differential metabolites were screened, of which 49 differential metabolites were significantly up-regulated ($P<0.05$), and 22 differential metabolites were significantly down-regulated ($P<0.05$). The KEGG pathway enrichment resulted in 29 metabolic pathways, 14 of which were significantly different ($P<0.05$), mainly glycerophospholipid metabolism, ether lipid metabolism, glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis etc. The contents of serum S-adenosylmethionine, *L*-palmitoylcarnitine, stearoylcarnitine and some metabolites of phospholipids were significantly rosed with the increase of age of squabs ($P<0.05$). The above data are helpful to understand the changes of the physiological state of the squabs during the development and provide references for better satisfying their nutritional needs in production. [***Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(11): 6203-6212**]

Key words: squabs; serum; differential metabolites; metabolic pathway

* Corresponding authors: JI Feng, associate professor, E-mail: jifengji@sina.com; WANG Xuemin, professor, E-mail: 512918118@qq.com

(责任编辑 管景颖)