

厚壳贻贝外套膜对细菌肽聚糖胁迫的代谢响应

杨子霖 范孝俊 肖文慧 曹萍麟 张晓林 严小军 廖智

(浙江海洋大学海洋科学与技术学院海洋生物资源与分子工程实验室, 舟山 316022)

摘要: 为了解贻贝(*Mytilus*)外套膜免疫相关机制, 对贻贝进行肽聚糖(Peptidoglycan, PGN)胁迫, 并利用超高压液相色谱-质谱联用技术, 对贻贝外套膜在PGN胁迫后48h的代谢物组成及含量进行组学鉴定, 同时对胁迫前后的外套膜组织开展了游离氨基酸组成, 外套膜黏液抑菌活性及抗氧化能力分析。结果表明, PGN胁迫导致贻贝外套膜部分代谢物含量发生显著变化($P<0.05$), 从中共鉴定到486种差异代谢物, 包括232种上调和254种下调代谢物; 其中, 上调差异代谢物主要富集于细胞信号转导及氨基酸代谢相关途径, 而下调SDM主要富集到脂质代谢和维生素代谢相关途径。此外, PGN胁迫导致外套膜中过氧化氢酶活力上调($P<0.05$), 并导致外套膜黏液对枯草芽孢杆菌的抑制率显著上升($P<0.05$)。研究为深入了解贻贝应对免疫胁迫的分子策略, 以及贻贝健康养殖奠定了基础。

关键词: 外套膜; 肽聚糖; 免疫; 代谢组学; 厚壳贻贝

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2025)05-052517-12



贝类不仅是一类具有重要生态意义的物种, 同时也是当前水产养殖业的主要品种之一。对贝类免疫过程及分子机制研究, 不仅有助于了解贝类在富含各种微生物的水体环境中的生存策略, 也有助于贝类养殖业发展过程中的病害防治^[1, 2]。贻贝(*Mytilus*)是我国第四大养殖贝类, 对其免疫体系的研究具有重要的意义和价值。以往研究已发现贻贝的免疫体系与其他贝类相比具有较强的特殊性。首先表现为贻贝具有较强的疾病耐受性^[3]。此外, 贻贝对各种环境污染物也表现出较强的耐受性, 因此贻贝属物种可视为一类环境指示或监测生物^[4, 5], 或水体污染治理生物^[6, 7]。由此可见, 贻贝属物种必然具有一套特殊的免疫防御策略, 可维持贻贝在复杂水体环境中的生存。也正因为贻贝强大的生态适应和免疫能力, 贻贝目前也被公认为一类典型的入侵生物^[8]。因此, 对贻贝免疫相关机制的研究已成为目前无脊椎生物免疫研究的重要领域^[9]。

贝类免疫体系涉及其体内多种组织或器官。其中, 血细胞被认为是其免疫防御的主要组织, 其特点表现为血细胞具有强大的免疫识别, 免疫信号

传递以及免疫效应分子分泌能力^[10, 11]。但值得关注的是, 对贝类而言, 其外套膜组织不仅是贝壳生成的主要组织^[12, 13], 同时也是一种重要的免疫相关组织^[14, 15]。已有研究发现, 贝类外套膜可分泌富含免疫相关分子的囊泡而参与免疫防御过程^[14]; 同时, 外套膜具有较高水平的抗菌肽分泌功能^[16, 17], 甚至可分泌内源性抗生素分子(如红霉素)用于消灭入侵的病原菌^[18]。值得注意的是, 已发现贻贝外套膜细胞中具有与血细胞相似的免疫信号传递途径^[19], 且贝类外套膜可在免疫胁迫后表现出明显的免疫响应特征, 包括激活胞外信号调节激酶系统^[20], 上调Smad蛋白介导的生长因子- β 的免疫信号调节功能^[15], 上调丝裂原活化蛋白激酶信号途径关键基因表达及相关蛋白的磷酸化水平^[20], 以及激活丝氨酸蛋白酶抑制剂^[21]等响应策略。此外, 外套膜还可通过长链非编码RNA调节体系, 参与了对免疫胁迫的响应过程^[22, 23]。上述结果表明, 外套膜在贝类的免疫系统中发挥着重要作用。但目前针对贝类外套膜的免疫相关研究多集中在对其部分基因或蛋白的功能分析, 尚缺乏在组学层面对其免疫相关机制

收稿日期: 2024-10-15; 修订日期: 2024-12-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32271580); 国家自然科学基金重点国际合作与交流项目(42020104009)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (32271580 and 42020104009)]

通信作者: 廖智, E-mail: liaozhi@zjou.edu.cn

的系统性了解。分子组学是当前研究贝类免疫响应过程和机制的重要手段^[24]。其中,代谢组学作为一种系统研究生物体内代谢物种类及其含量的技术,已广泛用于贻贝在不同环境因子胁迫条件下的分子响应研究^[25],贻贝对环境污染物的代谢响应分析^[26],贻贝不同组织的代谢机制比较^[27],以及贻贝对微生物的免疫过程分析^[28]。目前对于贻贝外套膜代谢过程及免疫防御机制的研究仍缺乏,因此存在较大研究空间。

肽聚糖(Peptidoglycan, PGN)是一种重要的病原体模式识别分子(Pathogen-associated molecular pattern, PAMP),主要存在于革兰氏阳性菌细胞壁^[29],也是生物先天免疫系统重要的免疫识别靶标分子^[30]。PGN常被作为革兰氏阳性菌的模拟物,用以判断宿主生物对革兰氏阳性菌的免疫响应过程和机制^[31]。在此前研究中,发现贻贝对革兰氏阳性菌相比对革兰氏阴性菌具有更快的免疫响应速度^[32];此外,贻贝抗菌肽也往往表现出对革兰氏阳性菌更强的抑制活性^[33—35]。上述结果表明,贻贝对革兰氏阳性菌具有快速的反应及较强的清除能力。为进一步了解贻贝外套膜在免疫过程中的作用,以及贻贝外套膜对革兰氏阳性菌的免疫响应机制,采用PGN模拟革兰氏阳性菌对厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)进行胁迫,利用超高压液相色谱-质联用技术(Ultra liquid chromatography-tandem mass spectroscopy, UPLC-MS/MS),对贻贝外套膜开展PGN胁迫前后的代谢组学分析。同时,进一步对胁迫前后的贻贝外套膜开展了游离氨基酸组成分析,抗氧化能力分析及外套膜黏液的抑菌活性检测。上述研究结果有助于揭示外套膜在贻贝面临PAMP胁迫条件下的免疫响应过程和机制,为深入了解贻贝外套膜在应对革兰氏阳性菌入侵过程中的可能机制提供新的科学认知。

1 材料与方法

1.1 厚壳贻贝的采集与样品处理

厚壳贻贝来自浙江舟山嵊泗海域,在恒温水族箱中用洁净海水暂养(温度22℃,盐度25‰)。在暂养7d后,将贻贝随机分为两组,每组30只个体;每组采取6个平行实验,每个平行组中含5只贻贝。其中,对照组贻贝在后闭壳肌处以微量注射器注射灭菌海水20 μ L;实验组贻贝在后闭壳肌处注射预先配置好的0.5 mg/mL PGN(来源于金黄色葡萄球菌,购自MACKLIN Reagent公司,货号P742432)溶液,注射体积20 μ L。

1.2 外套膜组织样品的采集与代谢物的提取

上述贻贝经处理48h后,选取贻贝外套膜作为

代谢物提取组织。所有试剂提前在-20℃进行预冷。称取60 mg组织样本,加入含有混合内标的甲醇-水(体积比4:1),研磨(60 Hz, 2min);冰水浴超声提取(10min)后离心(8000 $\times$ g, 4℃, 10min)取上清液经冷冻干燥后,加入甲醇-水(体积比1:4)溶液复溶。再次经离心(12000 $\times$ g, 4℃, 10min)后吸取上清液,经0.22 μ m微孔膜过滤后,上样UPLC-MS/MS(Waters ACQUITY UPLC I-Class plus/Thermo QE plus)进行分析。质控样品(Quality control, QC)由所有样本等体积混合制备,处理和分析方法与其他样品相同。在仪器分析过程中,每隔3个样品对质控样品进行分析,以评估其稳定性。

1.3 超高压液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)分析

采用ACQUITY UPLC HSS T3反相色谱柱(粒径1.8 μ m, 100 mm $\times$ 2.1 mm)进行代谢物分离。流动相分别为A液(含0.1%甲酸的水)和B液(含0.1%甲酸的乙腈);洗脱梯度为12min内B液比例从5%上升至100%,流速为0.35 mL/min,柱温设置为45℃。

色谱柱洗脱组分注入MS/MS,以正负离子模式进行质谱扫描分析。采用全扫描结合信息串联模式进行质谱数据采集;质荷比(m/z)范围设置为100—1200,采用低能扫描(Ce, 4 eV)和高能扫描(CE-ramp, 20—45eV)方式破碎母离子。采用氦气(99.999%)为碰撞诱导离解气体。质谱扫描时间0.2s,延迟0.02s,毛细管电压2.5 kV,锥电压40 V,源温度320℃,脱溶剂气体350℃,去溶剂气体流量900 L/h。分析过程中以固定间隔注入质控样品(QC)评估质谱检测的重复性。

原始质谱数据经Progenesis QI v3.0 软件(Nonlinear Dynamics, Newcastle, 英国)进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐和归一化处理。代谢物鉴定基于质谱所得精确分子质量,二级质谱碎片峰以及同位素分布,分别采用The Human Metabolome Database (HMDB)、Lipidmaps (v2.3)和METLIN数据库进行代谢物鉴定。

1.4 差异代谢物的筛选与功能富集分析

采用多维分析和单维分析相结合的方法,来筛选组间差异代谢产物(Significant different metabolites, SDM),筛选标准为来自OPLS-DA和PLS-DA分析中的变量权重值(Variable important in projection, VIP)>1及 $P<0.05$ 。对筛选到的SDM利用KEGG数据库(<https://www.genome.jp/kegg/>)开展KEGG功能注释分析,所得SDM的KEGG ID进行通路富集分析。应用超几何检验,筛选出与整个背景相比,SDM显著富集的KEGG pathway条目,显著富集筛选依据为 $P<0.05$ 。

在此基础上, 进一步开展差异代谢物的基因集富集分析(Gene set enrichment analysis, GSEA)。基于富集分数计算、富集分数显著性水平评估和多重假设验证校正三个步骤进行GSEA分析。

1.5 贻贝外套膜游离氨基酸组成分析

参照文献[36]方法开展贻贝外套膜组织游离氨基酸组成分析。贻贝外套膜组织用研磨粉碎仪进行粉碎, 粉碎后组织样本进行超声破碎(功率150 W), 再经离心($4000 \times g$, 4°C , 10min)后, 以超滤法(截留分子量为3 kD)提取小分子代谢物; 上样全自动微量氨基酸分析仪(LA8080A, 日立公司)开展分析。样本事先经离子交换柱(铝离子交换树脂, $4.6 \text{ mm} \leq 60.0 \text{ mm}$)进行分离并注入反应柱(热传导膜不锈钢柱, $4.6 \text{ mm} \leq 42.5 \text{ mm}$); 交换柱温度设置为 50°C , 反应柱温度设置为 135°C ; 缓冲液流速 0.4 mL/min ; 茚三酮流速 0.35 mL/min 。检测波长 570 nm , 检测时间150min。氨基酸标准品为日本日立公司标准氨基酸混合液(B型和AN- II型)。

1.6 外套膜组织抗氧化能力测试

贻贝外套膜组织经研磨粉碎仪研磨、离心后取上清液进行总蛋白定量和酶活力测定。其中, 过氧化氢酶(Catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)和谷胱甘肽还原酶(Glutathione reductases, GR)酶活采用试剂盒(南京建成)并按说明书方法进行; 过氧化氢(Hydrogen Peroxide)和丙二醛(Malondialdehyde, MDA)测定采用试剂盒(南京建成)并按说明书方法进行。总蛋白浓度采用BCA(Bicinchoninic acid)法测定。

1.7 外套膜提取物的抑菌活性测试

采用生长曲线抑制法, 对贻贝对照组外套膜以及经PGN胁迫48h后的外套膜组织黏液进行抑菌活性测试。采用解剖刀刮取外套膜黏液, 经冷冻干燥和称重后待用。测试菌种购自中国普通微生物菌种保藏管理中心, 包括哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。菌株以LB培养基培养至对数生长期, 吸取 $180 \mu\text{L}$ 菌液加入至96孔细胞培养板中, 再加入 $20 \mu\text{L}$ 外套膜黏液粉末溶液(质量终浓度分别为500和 $62.5 \mu\text{g/mL}$)。空白对照组为 $180 \mu\text{L}$ 菌液与 $20 \mu\text{L}$ 纯水。细菌在恒温 37°C 下培养8h后测定 600 nm 处的光密度值(Optical density, OD), 根据实验组与对照组 OD_{600} 值的比值计算样品对细菌的抑制率。

1.8 统计分析方法

采用IBM SPSS Statistics 26 的单因素方差分析(One-way ANOVA)进行数据的组间显著性差异分析, 采用三次重复试验; 数值以平均值 $\pm$ 方差展示,

$P < 0.05$ 代表显著差异。

2 结果

2.1 代谢组学多元统计分析结果

分别对贻贝外套膜对照组(灭菌海水注射组, Ctrl组)和贻贝外套膜实验组(PGN溶液注射组, PGN组)进行非靶向UPLC-MS/MS代谢组学分析。每组基于6次平行实验, 所得质谱数据经Progenesis QI v3.0软件处理后, 再基于各代谢物的保留时间, 精确质量数、二级碎片及同位素分布特征, 结合数据库检索开展代谢物的定性和定量分析。鉴定到Score ≥ 36 分的有效代谢物总计4859种。所有代谢组学分析的质谱原始数据已上传至Metabolights数据库, 编号为OMIX005177。

采用BPC (Base peak chromatogram)法对QC样本的重复性和稳定性进行评价, 并进一步采用PCA (Principle component analysis) 法对所得数据进行稳定性分析。实验组和对照组样本数据经7次循环交叉验证后得到的PCA模型图见图 1A。同时, 采用OPLS-DA (Orthogonal partial least squares-discriminant analysis)模型对实验组和对照组代谢组学数据进行统计(图 1B)。对照组和实验组样本在OPLS-DA得分图上具有显著的差异, 表明PGN胁迫导致贻贝外套膜的代谢组发生了明显变化。此外, 对OPLS-DA模型进行200次响应排序检验, 计算基于该模型的 R^2 和 Q^2 值, 用以评估该模型的可靠性和可预测性。通过分析, 计算出PGN组相比Ctrl组的 R^2 值为(0.0, 0.926), Q^2 值为(0.0, -0.525)。上述数据表明模型预测能力及稳健性良好, 无过度拟合现象, 可用于后续的差异成分分析。

对所有鉴定到的代谢物进行分类表征(图 2), 贻贝外套膜中所鉴定的代谢物包含十个类别, 主要为脂类和类脂分子(占比35.09%)、有机酸及其衍生物(占比17.36%)和有机杂环化合物(占比15.83%)。

2.2 差异代谢物筛选与注释

采用单变量分析和 T 检验手段进行两组间代谢物的统计。进一步采用多维分析和单维分析相结合手段, 并基于OPLS-DA模型得到变量权重值 $\text{VIP} > 1$ 及 T 检验 $P < 0.05$ 作为SDM筛选阈值。经筛选, PGN组贻贝外套膜相比Ctrl组, 共筛选到486种差异代谢物, 其中, 有232种SDM上调, 254种SDM下调。对所有SDM的表达量数据进行火山图分析(图 3)。

进一步对VIP值最大的50种SDM进行层次聚类分析(图 4)。PGN组相比Ctrl组, 其差异代谢物层次聚类关系良好。其中, 上调代谢物主要包括甜菜碱类、谷氨酰-脯氨酸二肽、戊烯酸、羟基肉桂

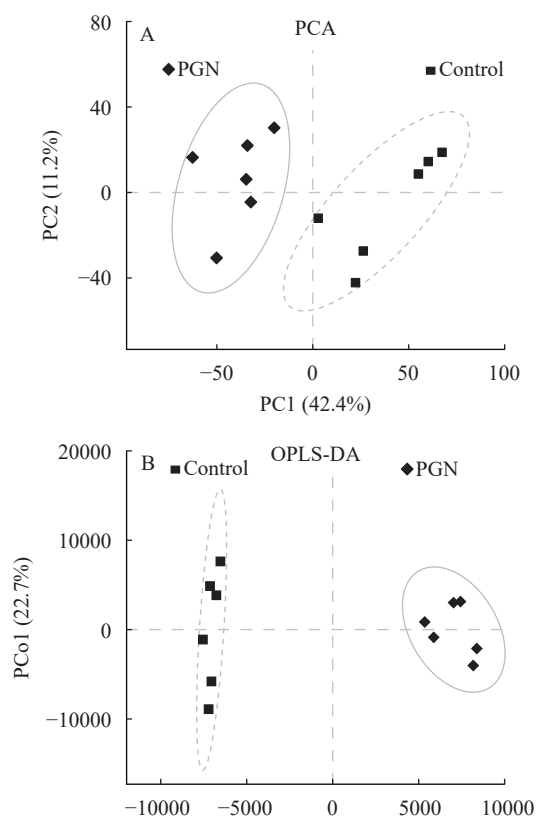


图1 经PGN胁迫后,厚壳贻贝外套膜PGN组和Ctrl组代谢物的PCA (A)和OPLS-DA (B)得分图

Fig. 1 PCA (A) and OPLS-DA (B) score plots of metabolites in the PGN and Ctrl groups of the outer membrane of *M. coruscus* mantle after PGN stress

酸、亮氨酸、牛磺酸、法尼基丙酮、氧化型谷胱甘肽、坦索罗辛以及邻苯二甲酸二丁酯等;下调代谢物主要包括羟基花生四烯酸、聚十异戊烯焦磷酸、去氧皮质酮、hepoxilin B3及磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺和磷脂酸等。

为进一步了解差异代谢物的生物学功能及其代谢途径变化机制,利用SDM所注释的KEGG ID进行通路富集分析。应用超几何检验筛选SDM所富集的代谢通路。共有139种SDM被显著富集于56条代谢通路($P < 0.05$)。其中,105种上调SDM显著富集于47条代谢通路;34种下调SDM显著富集于15条代谢通路。图5A展示了上调SDM富集程度最高的20条代谢通路;图5B展示了下调SDM显著富集的所有15条代谢通路。由图5可见,上调SDM和下调SDM富集的代谢通路具有明显差异。其中,上调SDM显著富集的代谢通路主要为mTOR和FoxO信号途径,以及氨基酸代谢途径;而下调SDM富集的代谢通路主要为自噬途径、脂肪酸代谢及维生素代谢相关途径。

对SDM显著富集的代谢通路进一步开展

GSEA分析。分别选取氨基酸-tRNA合成途径和自噬途径作为上调SDM和下调SDM显著富集的通路,其GSEA分析图形见图6A和6B。显著富集于这两条代表性通路的SDM表达量聚类图分别见图6C和6D。共有18种上调SDM富集于氨基酸-tRNA合成途径(图6C),其ES (Enrichment score)值为0.694, NES (Normalized enrichment score)值为2.38,两者均为正数,表明该通路在图中曲线左侧分组(PCN

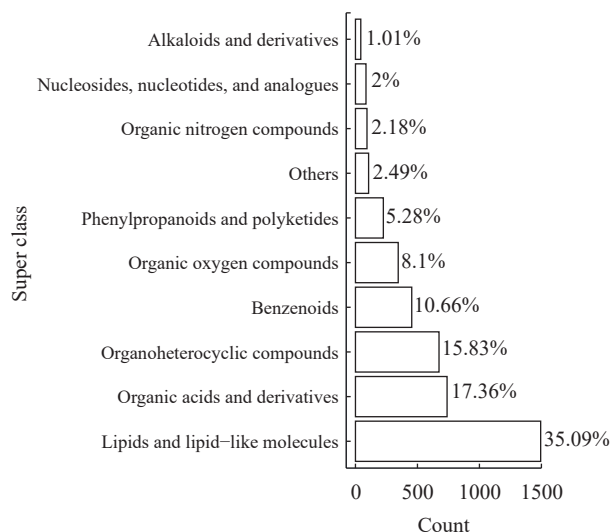


图2 厚壳贻贝外套膜鉴定代谢物的物质分类图

Fig. 2 Taxonomic of the metabolites identified from the mantle of *M. coruscus*

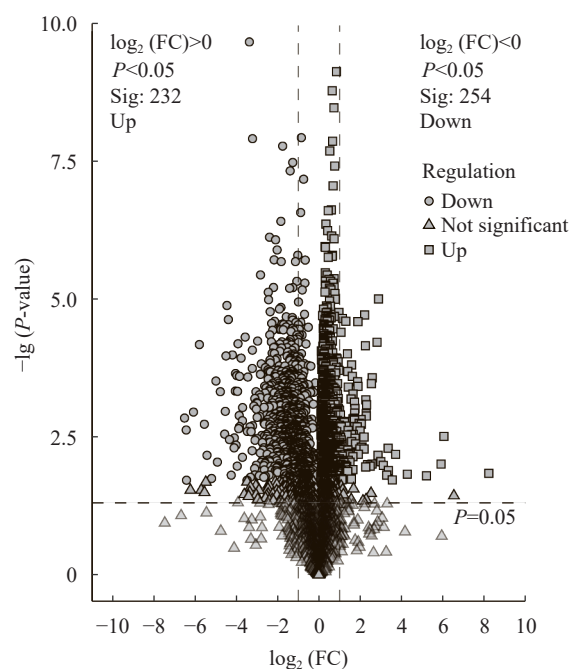


图3 厚壳贻贝外套膜经PGN胁迫后代代谢物的差异统计火山图
Fig. 3 Statistical volcano of the metabolite differences in the outer membrane of *M. coruscus* under PGN stress

组)中激活,在右侧分组(Ctrl组)中抑制; $P<0.001$ 且 FDR (False Discovery Rate) <0.001 ,表明该通路的富集程度为极显著。另有5种下调SDM显著富集于自噬途径(图 6D),其ES值和NES值分别为 -0.815 和 -1.6 ,表明该通路在PGN组中抑制,在Ctrl组中激活;其 P value为 0.01 ,FDR为 0.042 ,表明该通路为显著富集。

2.3 游离氨基酸分析结果

利用氨基酸分析仪分别对PGN组和Ctrl组贻贝外套膜组织的游离氨基酸含量进行测定(表 1)。在20种标准氨基酸中,脯氨酸、色氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺未能在外套膜组织中检测到。在检测到的16种标准氨基酸中,天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸和精氨酸在PGN组外套膜中相比Ctrl组呈现明显上调($P<0.05$),该结果与代谢组学分析结果相吻合;其余氨基酸在两组中无显著性差异($P>0.05$)。

此外,在非标准氨基酸检测结果中,牛磺酸和尿素等含量在PGN组中上调,但差异不显著($P>0.05$)。

2.4 外套膜组织抗氧化能力测试

进一步对PGN组和Ctrl组贻贝外套膜组织开展抗氧化能力测定(表 2)。相比Ctrl组,PGN组贻贝外套膜的过氧化氢酶酶活显著上调($P<0.05$);与此对应的是过氧化氢含量的显著下调($P<0.05$);此外,PGN组贻贝外套膜中丙二醛含量显著下调($P<0.05$);以上数据表明PGN组贻贝外套膜相比Ctrl组在部分抗氧化指标上具有明显增强。但谷胱甘肽还原酶和超氧化物歧化酶活性在两组中无显著性差异($P>0.05$)。

2.5 外套膜提取物的抑菌活性测试

外套膜黏液经冷冻干燥并复溶后,分别配置成 500 和 $62.5 \mu\text{g/mL}$ 两种浓度,分别代表高浓度和低浓度,对哈维氏弧菌(革兰氏阴性菌)和枯草芽孢杆

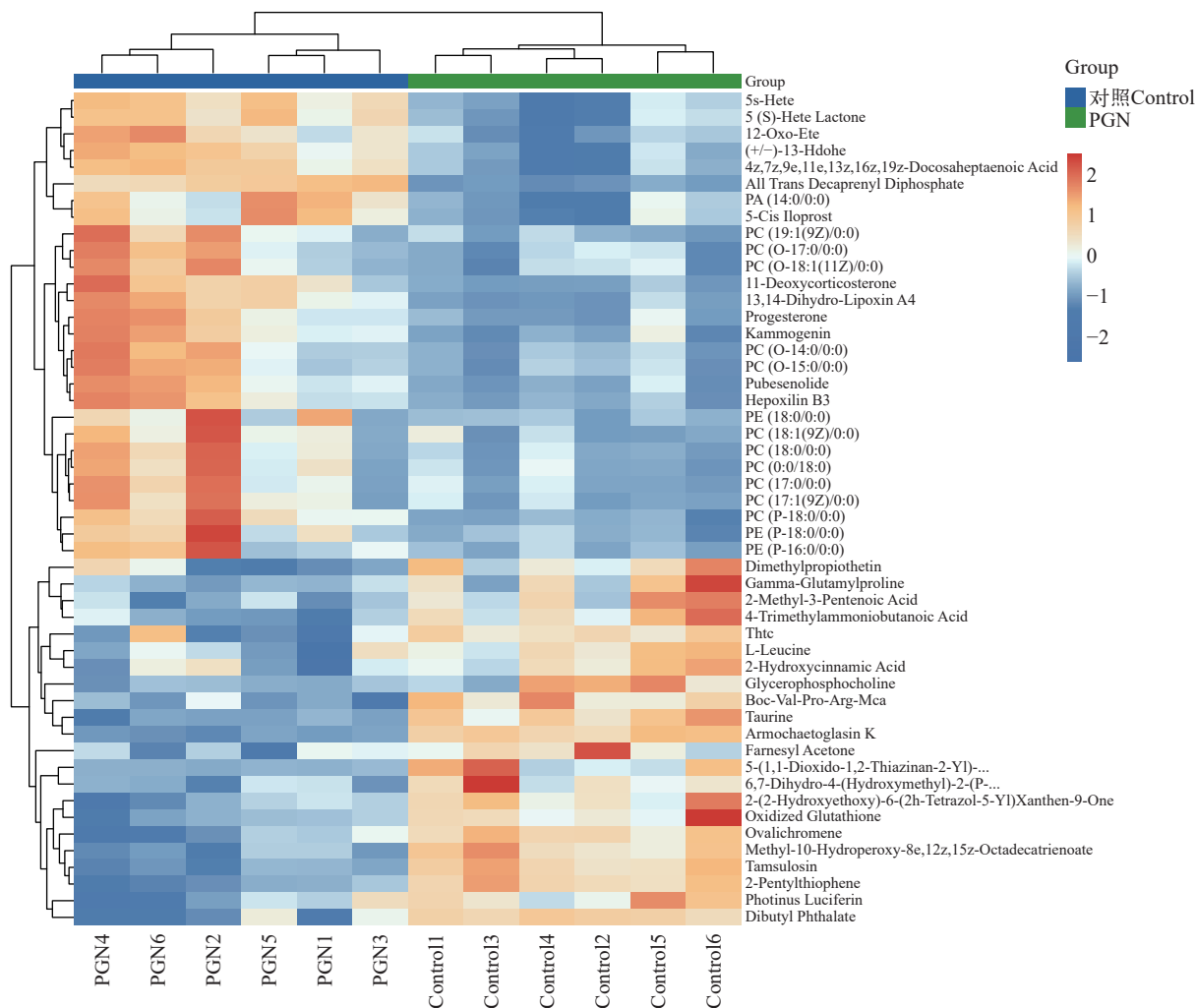


图 4 厚壳贻贝经PGN胁迫后,外套膜中TOP50差异代谢物热图

Fig. 4 Hierarchical clustering analysis of 50 SDMs with the highest VIP-value from *M. coruscus* mantle under PGN stress

红色代表上调,蓝色代表下调,根据颜色尺度描述代谢物差异水平

Red represents up-regulation, blue represents down-regulation, and the level of metabolite difference is described according to the color scale

菌(革兰氏阳性菌)分别开展抑菌活性测试。测试结果表明, 外套膜黏液对两种测试菌株均表现出弱的抑制活性, 其中, Ctrl组贻贝外套膜黏液对哈维氏弧菌抑制率分别为20.91% (500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度)和14.37% (62.5 $\mu\text{g/mL}$ 浓度), 对枯草芽孢杆菌的抑制率分别

为16.75% (500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度)和6.96% (62.5 $\mu\text{g/mL}$ 浓度; 图 7)。

值得注意的是, PGN组贻贝外套膜黏液相比Ctrl组, 对枯草芽孢杆菌的抑制率明显上升($P<0.05$; 图 7)。其中, 在500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, PGN组相比Ctrl

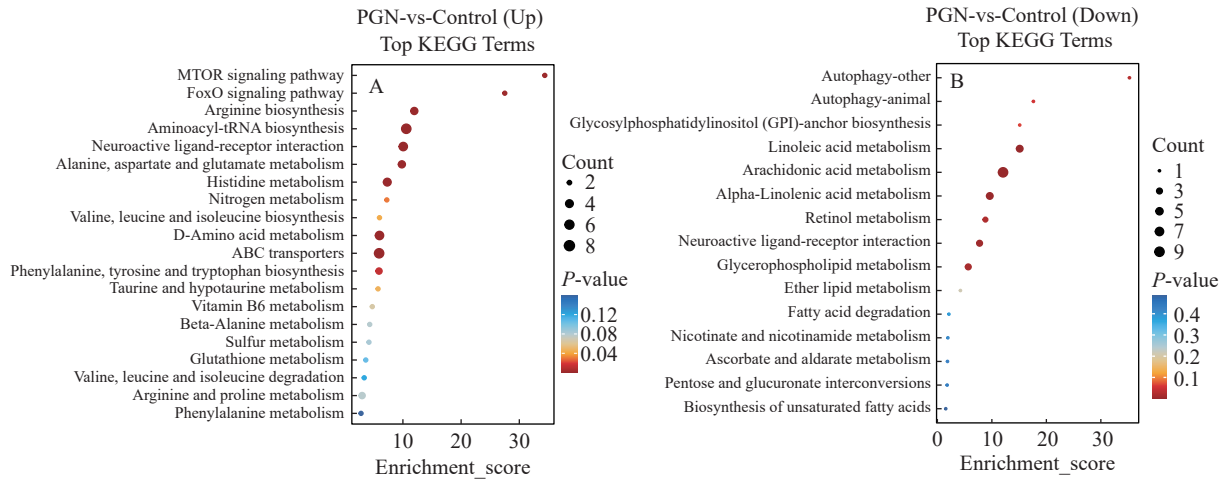


图 5 厚壳贻贝经PGN胁迫后, 外套膜中差异代谢物KEGG通路富集气泡图

Fig. 5 Significantly enriched KEGG pathways for the differential metabolites from the mantle of *M. coruscus* under PGN stress

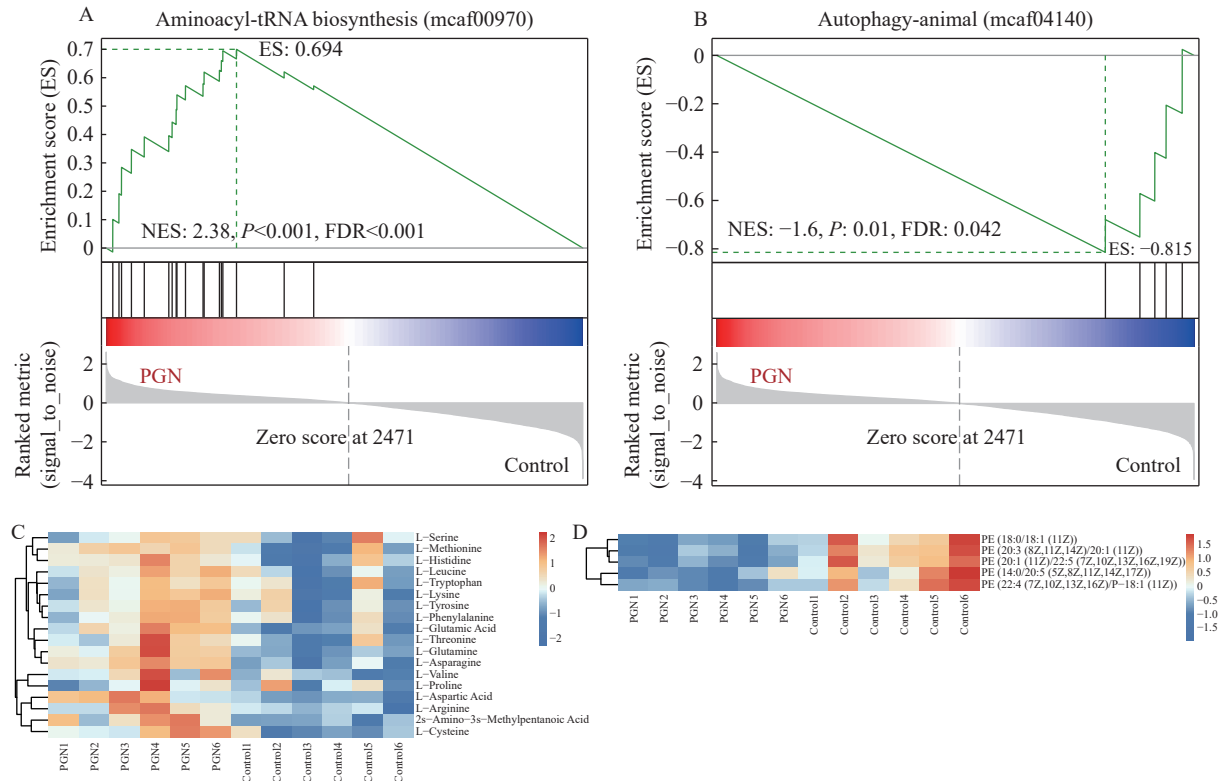


图 6 贻贝外套膜中差异代谢物富集的代表性通路的GSEA分析图

Fig. 6 GSEA analysis results for the representative enriched KEGG pathways

A. 差异代谢物富集的氨基酸-tRNA生物合成途径的GSEA曲线图; B. 差异代谢物富集的自噬途径GSEA曲线图; C. 富集于氨基酸-tRNA生物合成途径的差异代谢物的表达量热图; D. 富集于自噬途径的差异代谢物的表达量热图

A. GSEA curve of the aminoacyl-tRNA biosynthesis pathway; B. GSEA curve of the autophagy-animal pathway; C. heatmap of the expression level of SDMs enriched in the aminoacyl-tRNA biosynthesis pathway; D. heatmap of the expression level of SDMs enriched in the autophagy-animal pathway

表 1 厚壳贻贝经PGN胁迫后外套膜组织游离标准氨基酸分析结果

Tab. 1 Concentration of free amino acids in the mantle of *M. coruscus* treated by PGN stress (ng/g)

氨基酸名称 Name of amino acids	对照组 Control group	PGN胁迫组 PGN stressed group
天冬氨酸Aspartic acid	137.71±17.22	247.84±27.32*
苏氨酸Threonine	15.84±1.93	23.36±5.71
丝氨酸Serine	40.65±6.41	51.67±11.81
谷氨酸Glutamic acid	173.30±19.24	271.07±54.65*
甘氨酸Glycine	106.80±9.26	125.50±27.64
丙氨酸Alanine	135.62±36.57	193.05±47.12
缬氨酸Valine	13.98±1.65	16.62±2.27
半胱氨酸Cysteine	29.29±2.97	50.90±8.60*
蛋氨酸Methionine	7.38±1.17	10.03±1.97
异亮氨酸Isoleucine	15.99±1.26	19.63±3.82
亮氨酸Leucine	17.39±1.65	22.30±4.11
酪氨酸Tyrosine	26.76±3.02	35.59±9.13
苯丙氨酸Phenylalanine	12.70±3.83	17.16±2.23
赖氨酸Lysine	52.99±5.86	57.71±11.43
组氨酸Histidine	39.69±2.21	42.20±14.37
精氨酸Arginine	166.87±15.94	231.02±49.91*
牛磺酸Taurine	2169.03±165.75	2898.70±498.62
尿素Urea	1617.13±247.78	1892.13±233.03
α-氨基己二酸 α-aminoadipic acid	9.76±1.32	9.91±2.73
胱硫醚Cystathionine	7.44±0.80	8.19±1.69
β-丙氨酸β-alanine	13.99±2.70	13.62±2.02
鸟氨酸Ornithine	39.67±2.39	49.13±8.45
鹅肌肽Anserine	106.62±13.27	165.89±42.55

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 下同The same applies below

表 2 对照组和PGN胁迫组厚壳贻贝外套膜组织抗氧化能力

Tab. 2 Antioxidant ability of *M. coruscus* mantle in the control group and the experimental group

抗氧化指标 Antioxidant index	对照组 Control group	PGN胁迫组 PGN stressed group
过氧化氢酶 Catalase (U/g prot)	2.34±0.43	6.03±2.85*
过氧化氢Hydrogen peroxide (mmol/g prot)	0.35±0.06	0.23±0.05*
丙二醛Malonaldehyde (nmol/mg prot)	5.41±1.06	3.42±0.42**
谷胱甘肽还原酶 Glutathione reductase (U/g prot)	10.96±1.86	7.36±5.00
超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase (U/g prot)	8.12±0.96	10.68±2.05

组, 其抑制率提升8%; 在62.5 $\mu\text{g/mL}$ 下, 抑制率提升12%; 但贻贝外套膜黏液对哈维氏弧菌的抑制率并未受PGN胁迫的影响。在两种浓度下, PGN组贻贝外套膜黏液相比Ctrl组, 其对哈维氏弧菌的抑制率在高浓度下有显著增强($P<0.05$), 但低浓度下无明显

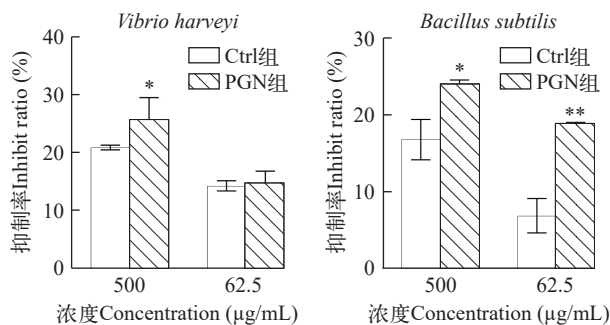


图 7 对照组和PGN胁迫组厚壳贻贝外套膜黏液对哈维氏弧菌和枯草芽孢杆菌的生长抑制率(%; * $P<0.05$; ** $P<0.01$)

Fig. 7 Inhibition ratio (%) of *M. coruscus* mantle mucus against *Vibrio harveyi* and *Bacillus subtilis*

显变化($P>0.05$; 图 7)。

3 讨论

贝类外套膜被认为不仅与贝类贝壳的形成有关, 其免疫相关功能也已被证实^[15]。PGN是细菌细胞壁的特有成分之一, 也代表了一类重要的病原体相关分子模式, 可被宿主细胞识别并产生免疫级联反应^[30]。本文采用PGN胁迫方式, 结合贻贝外套膜的代谢组学变化, 探讨了贻贝外套膜的免疫防御机制。

3.1 PGN胁迫诱导的贻贝外套膜上调差异代谢物特征

我们首先注意到, 厚壳贻贝外套膜中的代谢物含量在PGN胁迫下发生明显改变。相比对照组, 外套膜在PGN胁迫下, 其上调SDM主要为氨基酸及其衍生物、有机羧酸类化合物等。其中, 部分代谢物已被证实与免疫存在关联。例如, 羟基肉桂酸被认为具有抗炎、抗氧化及细胞保护等生物功能^[37]; 4-Trimethylammoniobutanoic acid在小鼠中被认为与其肠道菌群的种属及丰度调节有关^[38]; 甘油磷酸胆碱在神经免疫细胞中, 被认为与细胞因子激活以及能量代谢调节存在关联^[39]; 牛磺酸已被证实具有在细胞抗氧化及抗炎中发挥了重要作用^[40, 41]; Armochoetoglasin是一类酪氨酸衍生物, 属于Cytochalasans家族, 被认为具有抗炎和抗菌功能^[42]; 法尼基丙酮(Farnesyl acetone)最早发现于金合欢精油, 被认为具有抗菌、抗炎和抗氧化活性^[43, 44]。上述代谢物在PGN组贻贝外套膜组织中的上调, 意味着贻贝外套膜可能通过提升抗炎、抗氧化及抗菌活性来应对外界微生物的入侵。此前已有研究证实, 贝类外套膜可通过囊泡运输方式分泌免疫相关分子并用以在组织外产生免疫效应^[14]; 此外, 在外套膜黏液中, 具有抑菌活性的物质成分包括各种抗菌肽分子^[45]及小分子代谢物, 如抗生素类物质^[18]。值得注意的

是, 贝类外套膜黏液的抑菌活性具有选择性, 如在牡蛎外套膜黏液中可检测到至少13种共生微生物的存在^[46], 表明部分微生物可在外套膜黏液中生存。本研究中发现, 贻贝外套膜在PGN胁迫后, 其外套膜黏液对枯草芽孢杆菌的抑制率相比对照组有明显上升(图 7), 表明PGN胁迫提升了贻贝外套膜的抑菌活性, 推测与PGN胁迫后, 贻贝外套膜免疫效应因子的分泌量增加有关。

3.2 PGN胁迫诱导的贻贝外套膜下调差异代谢物特征

外套膜在PGN胁迫下, 其下调SDM主要为脂类及其衍生物, 主要包括各种磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺, 均细胞膜的主要磷脂成分, 同时也作为细胞内多种生理活性分子的前体物质, 参与细胞内多种生理过程。例如, 磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺均可通过代谢转化为第二信使分子而参与细胞信号转导过程^[47, 48]; 此外, 磷脂酰胆碱还参与了基因表达调节及血糖平衡^[49]; 而磷脂酰乙醇胺可转化为N-酰基乙醇胺并发挥抗炎和促进细胞凋亡等作用^[50]。本研究注意到, 部分下调SDM与免疫调节存在关联, 例如, 黄体酮是一类性激素, 同时也被认为是一种免疫调节分子, 具有免疫抑制功能^[51, 52]; 此外, 有3种下调SDM, 羟基二十碳四烯酸、二十四碳四烯酸及 hepoxilin B3, 在以往研究中发现均属于12-脂氧合酶代谢途径^[53], 且该途径已被证实与免疫炎症反应的调节有关^[54]。尽管上述下调代谢物缺乏在贝类中的研究数据, 但从现有研究结果来看, 上述下调代谢物反映了贻贝外套膜在面临PGN胁迫后, 可能通过调节炎症反应来减轻对细胞的伤害。

3.3 上调差异代谢物富集的代谢通路特征

从SDM显著富集的代谢通路来看, 上调SDM和下调SDM分别富集到不同的代谢通路(图 5), 表明贻贝外套膜面对PGN胁迫产生了复杂的代谢响应。其中, 在上调SDM富集的代谢通路中, mTOR信号途径是细胞代谢调节的主要通路之一, 其功能涉及细胞的能量代谢和自噬调节^[55]。此外, mTOR信号途径已被证实可通过整合来自免疫微环境的各种信号, 协调免疫细胞及其代谢功能, 从而发挥在细胞免疫和体液免疫过程中的调节作用^[56]。已有研究表明, 贻贝中mTOR信号途径与贝类细胞的溶酶体活性及细胞自噬存在重要关联^[57]。在本研究中, 上调SDM富集于mTOR信号途径, 表明PGN胁迫导致贻贝外套膜细胞mTOR信号途径被激活, 因此可能对细胞自噬产生抑制作用。GSEA分析结果进一步证实了PGN胁迫导致贻贝外套膜自噬途径的抑制(图 6B和6D)。该结果表明, 贻贝外套膜

细胞在PGN胁迫条件下, 可能通过对细胞自噬的抑制来防止过度免疫的产生及由此对组织细胞的损坏^[58]。此外, Foxo信号通路也是新陈代谢的重要调节途径之一, 可通过对糖代谢和脂代谢的整合, 在细胞生长与分化、氧胁迫与衰老及自噬中发挥重要作用^[59]。值得注意的是, Foxo信号途径被发现对昆虫的肠道免疫具有促进作用^[60]; Foxo信号途径的激活也有助于提升细胞氧化应激水平并延长细胞寿命^[61, 62]。本研究中发现PGN组外套膜的过氧化氢酶活力上调, 且过氧化氢与丙二醛含量下调(表 2), 表明贻贝外套膜在PGN胁迫条件下表现为抗氧化活性的增强趋势。但该趋势是否与外套膜中Foxo信号途径的激活存在关联, 尚需后续深入地研究。此外, 本研究注意到上调SDM所富集的代谢通路中, 多数与氨基酸代谢相关(图 5A), 表明PGN胁迫对外套膜组织的氨基酸代谢产生了影响。对外套膜组织的游离氨基酸含量分析也进一步证实了该影响。其中, 天冬氨酸、谷氨酸和精氨酸在PGN胁迫后出现显著上调。天冬氨酸和谷氨酸与能量代谢存在关联, 其转化产物草酰乙酸和 α -酮戊二酸可参与到三羧酸循环^[63]。精氨酸具有广泛的生物学功能, 但值得注意的是, 精氨酸被认为是一种免疫相关氨基酸, 其含量的升高有助于提升细胞的免疫能力^[64]。上述氨基酸含量在PGN胁迫后的上调, 推测外套膜可能通过提升游离氨基酸的合成, 或加强对蛋白质分子的水解来提升游离氨基酸含量, 以此提升外套膜的能量代谢水平及免疫能力。

3.4 下调差异代谢物富集的代谢通路特征

贻贝外套膜在PGN胁迫后的下调SDM所富集的代谢通路中, 多数与脂代谢相关(图 5B), 表明PGN胁迫导致外套膜脂代谢相关通路的抑制。该结果与多数脂类化合物, 特别是磷脂化合物在PGN胁迫后出现含量下调相吻合(图 4)。这表明脂质含量的下降可能与脂质代谢途径的抑制存在关联。类似现象在合浦珠母贝的免疫胁迫研究中也报道^[65]。脂质化合物被认为与免疫调节存在重要关联。例如, 亚油酸可通过调节NF- κ B信号途径从而影响细胞自噬能力^[66], 花生四烯酸可抑制炎性小体而产生抗炎效应^[67]等。因此, 上述脂质化合物相关的代谢途径的抑制, 推测与贻贝外套膜在PGN胁迫后, 可通过降低自噬及调节炎症反应的平衡等策略来应对。此外, 本研究也注意到, 贻贝外套膜中部分维生素代谢相关途径, 如视黄醇、尼克酸和尼克酰胺、维生素C等代谢相关途径在PGN胁迫后也表现为抑制效应。上述维生素及其代谢途径已被认为与免疫存在重要关联。例如, 视黄醇及其代谢途

径被认为对人体肠道的黏液免疫具有调节作用^[68], 维生素C及其代谢途径也被认为是人类疾病中重要的免疫代谢途径^[69]; 而尼克酸和尼克酰胺代谢途径被认为是与抗炎效应相关的重要调节途径^[70]。由此可见, 上述维生素相关代谢途径的改变, 可能代表了贻贝外套膜在对PGN的免疫响应的一种调控机制, 但具体细节仍有待后续深入研究。

综上所述, 外套膜作为贻贝的重要免疫组织, 在PGN胁迫后表现出明显的代谢组学变化。其上调SDM和下调SDM分别富集到不同的代谢通路。以上结果表明贻贝外套膜对PGN胁迫产生了复杂的代谢响应, 其响应机制主要表现为提升细胞的免疫水平、调节与平衡炎症反应及抑制细胞自噬等。对外套膜组织的游离氨基酸分析、外套膜黏液抑菌活性分析及酶活力分析初步证实了上述代谢物及其代谢途径在PGN胁迫后的变化特征。以上研究为了解贻贝外套膜的免疫功能及其机制, 以及后续贝类的健康养殖提供了科学依据。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Coates C J, Söderhäll K. The stress-immunity axis in shellfish [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2021(186): 107492.
- [2] Allam B, Raftos D. Immune responses to infectious diseases in bivalves [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015(131): 121-136.
- [3] Rey-Campos M, Moreira R, Gerdol M, *et al.* Immune tolerance in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes after repeated contact with *Vibrio splendidus* [J]. *Frontiers in Immunology*, 2019(10): 1894.
- [4] Kasiotis K M, Emmanouil C, Anastasiadou P, *et al.* Organic pollution and its effects in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* in Eastern Mediterranean coasts [J]. *Chemosphere*, 2015(119): S145-S152.
- [5] Bolognesi C, Cirillo S, Chipman J K. Comet assay in ecogenotoxicology: Applications in *Mytilus* sp [J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2019(842): 50-59.
- [6] Petersen J K, Hasler B, Timmermann K, *et al.* Mussels as a tool for mitigation of nutrients in the marine environment [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, **82**(1-2): 137-143.
- [7] Baltas H, Dalgic G, Bayrak E Y, *et al.* Experimental study on copper uptake capacity in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, **23**(11): 10983-10989.
- [8] Malagoli D, Franchi N, Sacchi S. The eco-immunological relevance of the anti-oxidant response in invasive molluscs [J]. *Antioxidants*, 2023, **12**(6): 1266.
- [9] Figueras A, Moreira R, Sendra M, *et al.* Genomics and immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* in a changing environment [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(90): 440-445.
- [10] de la Ballina N R, Maresca F, Cao A, *et al.* Bivalve haemocyte subpopulations: a review [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022(13): 826255.
- [11] Burgos-Aceves M A, Faggio C. An approach to the study of the immunity functions of bivalve haemocytes: physiology and molecular aspects [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017(67): 513-517.
- [12] Clark M S, Peck L S, Arivalagan J, *et al.* Deciphering mollusc shell production: the roles of genetic mechanisms through to ecology, aquaculture and biomimetics [J]. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2020, **95**(6): 1812-1837.
- [13] Bjärnmark N A, Yarra T, Churcher A M, *et al.* Transcriptomics provides insight into *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia) mantle function and its role in biomineralisation [J]. *Marine Genomics*, 2016(27): 37-45.
- [14] Huang J, Li L, Jiang T, *et al.* Mantle tissue in the pearl oyster *Pinctada fucata* secretes immune components via vesicle transportation [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022(121): 116-123.
- [15] Shi Y, Pan X, Xu M, *et al.* The role of Smad1/5 in mantle immunity of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021(113): 208-215.
- [16] Oh R, Lee M J, Kim Y O, *et al.* Myticusin-beta, antimicrobial peptide from the marine bivalve, *Mytilus coruscus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(99): 342-352.
- [17] Li H, Zhao J, Li Y, *et al.* Transcriptome analysis reveals tissue-specific responses of *Mytilus unguiculatus* to *Vibrio alginolyticus* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2024(144): 109301.
- [18] Yue X, Zhang S, Wang H, *et al.* The mud-dwelling clam *Meretrix petechialis* secretes endogenously synthesized erythromycin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, **119**(49): e2214150119.
- [19] Li Y F, Liu Y Z, Chen Y W, *et al.* Two toll-like receptors identified in the mantle of *Mytilus coruscus* are abundant in haemocytes [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(90): 134-140.
- [20] Zhang H, Ou Z, Xu M, *et al.* Molecular cloning and characterization of a putative mitogen-activated protein kinase (Erk1/2) gene: involvement in mantle immunity of *Pinctada fucata* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018(80): 63-70.
- [21] Shen C, Zhang M, Liang H, *et al.* Gene cloning and functional study of PmKSPI from *Pinctada fucata martensii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022(131): 1157-1165.

- [22] Zheng Z, Li W, Xu J, *et al.* LncMSEN1, a mantle-specific LncRNA participating in nacre formation and response to polyI: C stimulation in pearl oyster *Pinctada fucata martensii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(96): 330-335.
- [23] Zheng Z, Xie B, Cai W, *et al.* Identification of a long non-coding RNA (LncMSEN2) from pearl oyster and its potential roles in exoskeleton formation and LPS stimulation [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(103): 403-408.
- [24] Balbi T, Auguste M, Ciacci C, *et al.* Immunological responses of marine bivalves to contaminant exposure: contribution of the -omics approach [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021(12): 618726.
- [25] Beauclercq S, Grenier O, Arnold A A, *et al.* Metabolomics and lipidomics reveal the effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on immune cells of the blue mussel, *Mytilus edulis* [J]. *Harmful Algae*, 2023(129): 102529.
- [26] Lettieri G, Marinaro C, Notariale R, *et al.* Impact of heavy metal exposure on *Mytilus galloprovincialis* spermatozoa: a metabolomic investigation [J]. *Metabolites*, 2023, **13**(8): 943.
- [27] James L, Gomez E, Ramirez G, *et al.* Liquid chromatography-mass spectrometry based metabolomics investigation of different tissues of *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D, Genomics & Proteomics*, 2023(45): 101051.
- [28] Ji C, Wu H, Wei L, *et al.* Responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenges by metabolomics and proteomics [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, **35**(2): 489-498.
- [29] Pazos M, Peters K. Peptidoglycan [M]. Subcellular Biochemistry, Cham: Springer International Publishing, 2019: 127-168.
- [30] Wolf A J, Underhill D M. Peptidoglycan recognition by the innate immune system [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2018, **18**(4): 243-254.
- [31] Bastos P A D, Wheeler R, Boneca I G. Uptake, recognition and responses to peptidoglycan in the mammalian host [J]. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 2021, **45**(1): fuaa044.
- [32] Costa M M, Prado-Alvarez M, Gestal C, *et al.* Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, **26**(3): 515-523.
- [33] Casas S M, Comesaña P, Cao A, *et al.* Comparison of antibacterial activity in the hemolymph of marine bivalves from Galicia (NW Spain) [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2011, **106**(2): 343-345.
- [34] Meng D M, Dai H X, Gao X F, *et al.* Expression, purification and initial characterization of a novel recombinant antimicrobial peptide Mytichitin-a in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2016(127): 35-43.
- [35] Liao Z, Wang X C, Liu H H, *et al.* Molecular characterization of a novel antimicrobial peptide from *Mytilus coruscus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, **34**(2): 610-616.
- [36] Fan X J, Wang Y, Cai L P, *et al.* Effects of acute seawater acidification on metabolism of mantle in *Mytilus coruscus* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2023, **54**(3): 921-933. [范孝俊, 王莹, 蔡吕萍, 等. 海水酸化对厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)外套膜代谢组的急性影响 [J]. 海洋与湖沼, 2023, **54**(3): 921-933.]
- [37] Hao S, Li X, Han A, *et al.* Hydroxycinnamic acid from corn cob and its structural analogues inhibit A β 40 fibrillation and attenuate A β 40-induced cytotoxicity [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, **68**(33): 8788-8796.
- [38] Zhang Y, Dong L, Dai X, *et al.* Modulation of intestinal metabolites by calorie restriction and its association with gut microbiota in a xenograft model of colorectal cancer [J]. *Discover Oncology*, 2024, **15**(1): 46.
- [39] Márquez S, Fernández J J, Mancebo C, *et al.* Tricarboxylic acid cycle activity and remodeling of glycerophosphocholine lipids support cytokine induction in response to fungal patterns [J]. *Cell Reports*, 2019, **27**(2): 525-536. e4.
- [40] Baliou S, Adamaki M, Ioannou P, *et al.* Protective role of taurine against oxidative stress (Review) [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2021, **24**(2): 605.
- [41] Qaradakh T, Gadanec L K, McSweeney K R, *et al.* The anti-inflammatory effect of taurine on cardiovascular disease [J]. *Nutrients*, 2020, **12**(9): 2847.
- [42] Gao W, Jiang R, Zeng H, *et al.* Armochaetoglasins L and M, new cytochalasins from an arthropod-derived fungus *Chaetomium globosum* [J]. *Natural Product Research*, 2024, **38**(9): 1599-1605.
- [43] Atiphasaworn P, Monggoot S, Gentekaki E, *et al.* Antibacterial and antioxidant constituents of extracts of endophytic fungi isolated from *Ocimum basilicum* var. thrysiflora leaves [J]. *Current Microbiology*, 2017, **74**(10): 1185-1193.
- [44] Al-Dalahmeh Y, Almahmoud S A J, Al-Bataineh N, *et al.* *Scrophularia peyronii* post. from Jordan: chemical composition of essential oil and phytochemical profiling of crude extracts and their in vitro antioxidant activity [J]. *Life*, 2023, **13**(6): 1404.
- [45] Haug T, Stensvåg K, Olsen M ØM, *et al.* Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, *Modiolus modiolus* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2004, **85**(2): 112-119.
- [46] Braun P C, Bongo R D. Inhibitory relationships of resident bacteria isolated from the mantle fluids of *Crasostrea virginica* [J]. *Canadian Journal of Microbiology*,

- 2022, **68**(9): 576-582.
- [47] Gibellini F, Smith T K. The Kennedy pathway-de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine [J]. *IUBMB Life*, 2010, **62**(6): 414-428.
- [48] Momchilova A, Markovska T. Phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine are sources of diacylglycerol in ras-transformed NIH 3T3 fibroblasts [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1999, **31**(2): 311-318.
- [49] Furse S, de Kroon A I P M. Phosphatidylcholine's functions beyond that of a membrane brick [J]. *Molecular Membrane Biology*, 2015, **32**(4): 117-119.
- [50] Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, *et al.* Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**(7): 5298-5305.
- [51] Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, *et al.* Progesterone as an immunomodulatory molecule [J]. *International Immunopharmacology*, 2001, **1**(6): 1037-1048.
- [52] Groh L A, Verel D E, van der Heijden C D C C, *et al.* Immune modulatory effects of progesterone on oxLDL-induced trained immunity in monocytes [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2022, **112**(2): 279-288.
- [53] Antón R, Camacho M, Puig L, *et al.* Hepoxilin B3 and its enzymatically formed derivative trioxilin B3 are incorporated into phospholipids in psoriatic lesions [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2002, **118**(1): 139-146.
- [54] Imai Y, Dobrian A D, Morris M A, *et al.* Lipids and immunoinflammatory pathways of beta cell destruction [J]. *Diabetologia*, 2016, **59**(4): 673-678.
- [55] Deleyto-Seldas N, Efeyan A. The mTOR-autophagy axis and the control of metabolism [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, **9**: 655731.
- [56] Xu X, Ye L, Araki K, *et al.* mTOR, linking metabolism and immunity [J]. *Seminars in Immunology*, 2012, **24**(6): 429-435.
- [57] Sforzini S, Moore M N, Oliveri C, *et al.* Role of mTOR in autophagic and lysosomal reactions to environmental stressors in molluscs [J]. *Aquatic Toxicology*, 2018(195): 114-128.
- [58] Kuo C J, Hansen M, Troemel E. Autophagy and innate immunity: Insights from invertebrate model organisms [J]. *Autophagy*, 2018, **14**(2): 233-242.
- [59] Lee S, Dong H H. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism [J]. *The Journal of Endocrinology*, 2017, **233**(2): R67-R79.
- [60] Khan S A, Kojour M A M, Han Y S. Recent trends in insect gut immunity [J]. *Frontiers in Immunology*, 2023(14): 1272143.
- [61] Soh R, Hardy A, zur Nieden N I. The FOXO signaling axis displays conjoined functions in redox homeostasis and stemness [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2021(169): 224-237.
- [62] Martins R, Lithgow G J, Link W. Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity [J]. *Aging Cell*, 2016, **15**(2): 196-207.
- [63] Kamei Y, Hatazawa Y, Uchitomi R, *et al.* Regulation of skeletal muscle function by amino acids [J]. *Nutrients*, 2020, **12**(1): 261.
- [64] Popovic P J, Zeh H J, Ochoa J B. Arginine and immunity [J]. *The Journal of Nutrition*, 2007, **137**(6 suppl 2): 1681S-1686S.
- [65] Wu H, Yang C, Hao R, *et al.* Lipidomic insights into the immune response and pearl formation in transplanted pearl oyster *Pinctada fucata martensii* [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022(13): 1018423.
- [66] Lee D K, Choi K H, Oh J N, *et al.* Linoleic acid reduces apoptosis via NF- κ B during the in vitro development of induced parthenogenic porcine embryos [J]. *Theriogenology*, 2022(187): 173-181.
- [67] Pereira M, Liang J, Edwards-Hicks J, *et al.* Arachidonic acid inhibition of the NLRP3 inflammasome is a mechanism to explain the anti-inflammatory effects of fasting [J]. *Cell Reports*, 2024, **43**(2): 113700.
- [68] Mora J R, Iwata M, von Andrian U H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2008, **8**(9): 685-698.
- [69] Peng L, Chen L, Wan J, *et al.* Single-cell transcriptomic landscape of immunometabolism reveals intervention candidates of ascorbate and aldarate metabolism, fatty acid degradation and PUFA metabolism of T-cell subsets in healthy controls, psoriasis and psoriatic arthritis [J]. *Frontiers in Immunology*, 2023(14): 1179877.
- [70] Ma Y, Bao Y, Wang S, *et al.* Anti-inflammation effects and potential mechanism of saikosaponins by regulating nicotinate and nicotinamide metabolism and arachidonic acid metabolism [J]. *Inflammation*, 2016, **39**(4): 1453-1461.

METABOLIC RESPONSE OF *MYTILUS CORUSCUS* MANTLE TO PEPTIDOGLYCAN STRESS

YANG Zi-Lin, FAN Xiao-Jun, XIAO Wen-Hui, CAO Ping-Lin, ZHANG Xiao-Lin, YAN Xiao-Jun and LIAO Zhi

(Laboratory of Marine Biology Resource and Molecular Engineering, Marine Science and Technical College,
Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract: *Mytilus coruscus* is a shellfish with huge economic importance in China, and the mantle is an important immune-related organ. To investigate the immune function of the mantle and its underlying mechanisms, peptidoglycan (PGN) was used as a stressor, and ultra-high-pressure liquid chromatography-mass spectrometry technique was employed to identify the composition and content of metabolites from the mantle at 48h of post peptidoglycan stress. In addition, free amino acids, antimicrobial activities, and antioxidant activities of the mantle were analyzed and compared between the control and stressed samples. The results revealed that PGN stress induced significant changes in mantle metabolites, and a total of 486 metabolites with significant difference (SDMs) was identified, including 232 up-regulated and 254 down-regulated SDMs ($P < 0.05$). Among these, lipids and lipid-like molecules, organic acids and their derivatives, and organo-heterocyclic compounds were the most prominent SDMs. KEGG enrichment analysis further revealed that these SDMs were enriched in different pathways, showing a complex response of the mantle to the PGN stress. Notably, the up-regulated SDMs were enriched in pathways related to cell signaling and amino acid metabolism, while down-regulated SDMs were enriched in lipid metabolisms, vitamin related metabolisms, and autophagy. Gene set enrichment analysis (GSEA) further confirmed the regulation of some SDMs and the enrichment of aminoacyl-tRNA biosynthesis and autophagy-animal. In addition, free amino acid analysis also confirmed the up-regulation ($P < 0.05$) of certain amino acids, such as aspartic acid, glutamic acid, and arginine, in the mantle under PGN stress. Enzymatic activity analysis revealed an increase ($P < 0.05$) of catalase activity and a decrease of hydrogen peroxide in the PGN stressed mussel mantle. Interestingly, antimicrobial function analysis revealed that the mucus from PGN stressed mantle presented stronger inhibition against *Bacillus subtilis*, indicating that PGN stress induce stronger antibacterial activity in mussel mantle. These findings indicated that the mussel mantle may respond to PGN stress by enhancing immune capacity, regulating inflammatory balance, and inhibiting cell autophagy. This study provides valuable insights into the molecular strategies of mussel mantle in response to immune stress and offers a scientific basis for future efforts to promote healthy aquaculture of mussels.

Key words: Mantle; Peptidoglycan; Immunity; Metabolomics; *Mytilus coruscus*