

转录组和代谢组学联合分析小管福寿螺温度胁迫响应机制

储海燕^① 杨海韵^② 常婷婷^① 沈雯佳^② 井木子^②
林友福^② 宁阔^① 李宏^① 陈炼^{②*}

① 南京师范大学生命科学学院 南京 210023; ② 南京林业大学生命科学学院 南京 210037

摘要: 温度是影响水生生物生长、发育和新陈代谢的重要因素。对环境温度的耐受性是影响小管福寿螺 (*Pomacea canaliculata*) 分布和扩散的重要因子。为探究温度胁迫下小管福寿螺的响应调控机制, 本研究采用转录组学和代谢组学联合分析小管福寿螺肝胰腺组织在高温 (36 °C) 和低温 (10 °C) 胁迫 48 h 后, 基因表达情况以及代谢产物的变化。与对照组 (25 °C) 相比, 高温胁迫下共获得 446 个差异表达基因和 233 种差异代谢物; 低温胁迫下筛选出 288 个差异表达基因和 119 种差异代谢物。高温组差异表达基因和代谢物在氨基酸、脂质运输和免疫系统通路中上调, 在脂肪酸代谢和细胞色素 P450 通路中下调。在低温胁迫下, 丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、富马酸和 α -酮戊二酸发生显著变化, 可能影响三羧酸循环的能量产生。此外, 还有一些基因显著富集在药物代谢和热休克蛋白等相关通路中, 以减轻温度胁迫对小管福寿螺生理过程的影响。随机选取 6 个基因进行荧光定量 PCR 验证, 基因表达趋势与转录组结果一致。综上所述, 急性温度胁迫会引起小管福寿螺肝胰腺的免疫应激和能量代谢等过程, 小管福寿螺通过调控氨基酸代谢及增加不饱和脂肪酸的含量等使自身快速适应环境温度变化。

关键词: 小管福寿螺; 温度; 肝胰腺; 转录组; 代谢组

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2025) 01-045-14

Integrated Transcriptomic and Metabolomic Responses in the Hepatopancreas of an Invasive Apple Snail Under Temperature Stress

CHU Hai-Yan^① YANG Hai-Yun^② CHANG Ting-Ting^① SHEN Wen-Jia^②
JING Mu-Zi^② LIN You-Fu^② NING Kuo^① LI Hong^① CHEN Lian^{②*}

① College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023;

② College of Life Sciences, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China

Abstract: [Objectives] Temperature is an important factor that affects the growth, development, and metabolism of aquatic organisms. Temperature tolerance significantly affects the survival and expansion of the

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32170434), 2024 年江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (No. SJCX24_0633);

* 通讯作者, E-mail: chenlian_2004@163.com;

第一作者介绍 储海燕, 女, 硕士研究生; 研究方向: 分子生态学; E-mail: chuhaiyan0222@163.com.

收稿日期: 2024-06-03, 修回日期: 2024-09-11 DOI: 10.13859/j.cjz.202424137 CSTR: 32109.14.cjz.24137

invasive Apple Snail *Pomacea canaliculata*. **[Methods]** Transcriptome sequencing and metabolomic analysis were used to examine the alterations in the hepatopancreas of *P. canaliculata* exposed to high (36 °C) and low (10 °C) temperature stress for 48 h. After cleaning the raw sequencing data, we identified differentially expressed genes by $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$ and $P < 0.05$. Gene ontology (GO) annotation and pathway enrichment analysis were then performed on the differentially expressed genes. Significantly changed metabolites were identified by variable important in projection > 1 , $P < 0.05$, and $|\log_2\text{FoldChange}| > 1.5$. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) was used to search for the metabolic pathways of significantly changed metabolites. The Pearson correlation coefficient was used to analyze the correlation between differentially expressed genes and significantly changed metabolites. **[Results]** Compared to the control group, the high-temperature group had 446 genes and 233 metabolites with differential expression, while the low-temperature group had 288 genes and 119 metabolites exhibiting differential expression. The majority of genes and metabolites were upregulated in pathways related to amino acids, lipid transport, and immune system processes (Fig. 1), while they were downregulated in lipid acid and cytochrome P450 pathways during high-temperature stress (Fig. 2). Under low-temperature stress, significant changes were observed in alanine, aspartate, glutamate, fumaric acid, and alpha-ketoglutaric acid (Figs. 3, 4), which are involved in the energy production of the TCA cycle. Furthermore, several genes enriched in the drug metabolism pathway and heat shock proteins were found to mitigate the effects on their physiological processes. Finally, the expression patterns of these differentially expressed genes in the quantitative real-time PCR analyses were similar to those obtained by RNA-seq, indicating the accuracy and reliability of the RNA-Seq results (Fig. 6). **[Conclusion]** Acute temperature stress can induce immune stress and energy metabolism processes in the hepatopancreas of *P. canaliculata*. *P. canaliculata* rapidly adapts to environmental temperature changes by regulating amino acid metabolism and increasing the content of unsaturated fatty acids.

Key words: *Pomacea canaliculata*; Temperature; Hepatopancreas; Transcriptomic; Metabolomic

小管福寿螺 (*Pomacea canaliculata*) 原产于南美洲 (Cowie et al. 2006), 是全球 100 种恶性外来入侵物种之一 (Lowe et al. 2000)。小管福寿螺于 20 世纪引入中国, 由于其繁殖能力强, 生长迅速, 取食范围广, 对环境具有极强的耐受性, 因此在中国南方迅速传播 (Liu et al. 2020), 并且存在继续向北扩张的趋势 (Lei et al. 2017)。小管福寿螺喜食水稻幼苗和其他水生作物, 给中国南方省份造成了巨大的经济损失, 并破坏了水生生态系统的平衡 (Kwong et al. 2010)。2012 年, 原农业部将其列入第一批国家重点管理外来入侵物种。

温度是影响水生动物生命周期、生长和生存最重要的环境因素之一 (Song et al. 2022)。

已有研究表明, 对环境温度的耐受性是影响小管福寿螺分布和扩散的关键因子 (Ito 2002, Yoshida et al. 2014)。在野外, 冬季气温降低至 10 °C 以下时, 小管福寿螺的生长、摄食和运动受到明显抑制 (Hayes et al. 2015)。随着温度从 15 °C 升高到 30 °C, 其摄食和存活率均显著增加 (Seuffert et al. 2010)。然而, 当温度高于 35 °C 时, 小管福寿螺的生长速度显著下降 (Seuffert et al. 2013)。对于许多入侵物种来说, 新栖息地的气候是决定其定殖成功的主要因素 (Matsukura et al. 2016)。水生动物能够感知温度的变化, 调节自身的生理活动以适应环境 (Wang et al. 2018)。当小管福寿螺暴露在极端温度下时, 会产生一系列的应激反应以缓解生

存压力 (Soyano et al. 2018)。低温变化使小管福寿螺体内积累大量甘油和葡萄糖, 便于分级供能 (Matsukura et al. 2009)。一些软体动物应对低温胁迫时还存在多种策略, 如增加抗冻蛋白 (antifreeze proteins, AFPs) 的含量以抑制自由水形成的结晶, 分泌黏液减少体表冰晶的形成等 (Ansart et al. 2003)。高温时热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs) 作为分子伴侣能够有效保证蛋白质正常合成和折叠, 维持小管福寿螺内环境和细胞结构的稳定 (Zheng et al. 2012)。

转录组可用于研究生物在不同环境下基因的表达情况, 挖掘相关代谢通路并探讨其生理调控机制 (Mu et al. 2020)。代谢组可以系统地评估生物在受到干扰后小分子代谢物的变化, 揭示其参与生命活动的机制 (Lulijwa et al. 2022)。转录组学和代谢组学联合分析可以更加全面地了解生物体经温度胁迫后的反应途径 (Ning et al. 2019)。目前, 转录组学和代谢组学联合分析已广泛应用于日本对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) (Ren et al. 2020)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) (Zhao et al. 2021) 和海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) (Song et al. 2022) 等水生生物的温度胁迫研究中, 揭示其关键基因的调控以及代谢通路的变化, 为进一步了解水生生物温度调控机制提供了实验依据。

本研究拟采用转录组学和代谢组学联合分析, 研究小管福寿螺肝胰腺组织在温度胁迫下转录和代谢通路的变化, 进一步阐明小管福寿螺对温度胁迫的响应策略, 这对于理解小管福寿螺的入侵机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验样本

2021年7月在浙江省丽水市莲都区池塘中采集小管福寿螺, 螺长 (33 ± 3) mm, 在人工气候室内驯养2周 (温度 25 °C, 光照强度 2 000 lx, 光周期 12L : 12D, 相对湿度 80%)。每日喂食新鲜生菜, 2 d 更换一次曝气水。选取 108 只雌

性小管福寿螺进行温度胁迫实验, 分为高温组 (36 °C)、低温组 (10 °C) 和对照组 (25 °C)。每组设置 3 个重复, 每组重复 12 只放入塑料盒 (长宽高为 30 cm、20 cm、10 cm) 内。不同温度处理 48 h 后, 每个组分别取 6 只个体共计 18 只个体的肝胰腺组织用于代谢组学分析, 每组 3 只个体共计 9 只个体的肝胰腺组织用于转录组学分析和荧光定量验证。将收集的肝胰腺样本在液氮中快速冷冻, 放入 -80 °C 保存。

1.2 转录组学分析

将 9 个肝胰腺样本用适量的 Trizol 试剂提取总 RNA。使用生物分析仪 (Agilent 公司, Agilent Bioanalyzer 2100 system) 检测提取 RNA 的完整性和浓度。由北京诺禾致源科技有限公司构建 cDNA 文库, 利用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台完成转录组高通量测序, 获得原始数据。

原始数据去除带接头、低质量和 N (无法确定碱基信息) 比例大于 10% 的序列, 获得高质量数据 (clean reads)。使用 Hisat2 软件 (2.0.5) 将各样本高质量数据与小管福寿螺的参考基因组 (ASM307304v1, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_003073045.1/) 进行比对。基因表达的定量以每百万片段中每千碱基转录本的片段数 (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads, FPKM) 表示。使用 edgeR 3.8.6 中的 ESeq2 软件包进行基因差异表达分析。筛选差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的标准为 $|\log_2 \text{FoldChange}| > 1$ 且 $P < 0.05$ 。使用 ggplots2 绘制差异表达基因火山图, 分别使用 TopGO、ClusterProfiler 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析以及京都基因和基因组数据库 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。

1.3 代谢组学分析

取 18 个肝胰腺样本, 每样本称取 100 mg 液氮研磨物, 加入 500 μl 的 80% 甲醇涡旋振荡后充分悬浮。冰浴静置 5 min, 4 °C 下以 15 000 r/min

离心 20 min。取一定量的上清加质谱级水稀释至甲醇含量为 53%，4 °C 15 000 r/min 离心 20 min，将上清液注入液相色谱串联质谱 (ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, UHPLC-MS/MS) 系统分析。UHPLC-MS/MS 分析采用超高效液相色谱系统 (Thermo Fisher 公司, Vanquish UHPCL) 和复合四极杆-轨道阱质谱仪 (Thermo Fisher 公司, Q Exactive™ HF-X)，由北京诺禾致源科技有限公司进行代谢组学检测。正离子模式：流动相 A 为 0.1% 甲酸，流动相 B 为甲醇。负离子模式：流动相 A 为 5 mmol/L 醋酸铵，流动相 B 为甲醇，柱温为 40 °C，流速为 0.2 ml/min。洗脱梯度：0 ~ 3 min 2% 甲醇；3 ~ 10 min 85% 甲醇；10 ~ 10.1 min 100% 甲醇；10.1 ~ 12 min 2% 甲醇。离子源工作参数：喷雾电压为 3.5 kV，鞘气流速 241.36 kPa，离子传输管温度为 320 °C。

使用 Compound Discoverer 3.1 (CD3.1, Thermo Fisher) 对 UHPLC-MS/MS 生成的原始数据进行处理，对每种代谢物进行峰比对、峰拾取和定量。在 SIMCA14.1 软件包中运用主成分分析 (principal components analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal projections to latent structures-discriminant analysis, OPLS-DA) 进行差异物代谢分析。根据差异倍数，*P* 值和 OPLS-DA 模型的变量重要度投影值 (variable importance in the projection, VIP) 来筛选显著差异代谢物 (significantly changed metabolites, SCMs)，筛选标准为变量重要度投影值 (VIP) 大于 1、*P* < 0.05 且 $|\log_2 \text{FoldChange}| > 1.5$ 。利用 KEGG 数据库检索差异代谢物 (SCMs) 的功能和代谢途径。

1.4 转录组代谢组关联分析

基于皮尔逊相关性 (Person) 方法计算所有基因和代谢物之间的相关性，按照相关性系数 (rcorrelation coefficient, *R*) 和相关性的 *P* 值进行筛选，筛选阈值为 $|R| > 0.80$ 且 *P* < 0.01。分别选取最显著的前 20 个差异表达基因 (DEGs) 和差异代谢物 (SCMs) 绘制网络图。

所有得到的差异表达基因 (DEGs) 和差异代谢物 (SCMs) 都被映射到 KEGG 通路数据库，以获取它们共同的通路信息。

1.5 实时荧光定量 PCR 验证

为验证转录组测序结果的准确性，在转录组分析结果中随机选取 5 个差异基因进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 验证。使用 Primer Premier 5 设计引物 (表 1)，以 β -actin 基因作为内参基因 (Cadierno et al. 2018)，引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。利用 RNA 提取试剂盒和 cDNA 第 1 链合成试剂盒 (诺维赞生物科技股份有限公司, RC113-C1) 提取 9 个胰腺组织的总 RNA。使用 cDNA 第 1 链合成试剂盒 (诺维赞生物科技股份有限公司, R312-02) 进行反转录，每 20 μ l 反应溶液中使用 1 000 ng RNA，cDNA 稀释 5 倍后用于荧光定量实验。qRT-PCR 反应在实时荧光定量 PCR 系统 (Thermo Fisher 公司, StepOnePlus™) 上进行。本实验进行 3 次生物学重复，反应体系为 15 μ l：正反方向引物 (10 pmol/L) 各 0.3 μ l，cDNA 模板 1.5 μ l，核酸荧光染料 SYBR Green I 7.5 μ l (诺维赞生物科技股份有限公司, Q341)，无酶无菌水 5.4 μ l。反应程序：95 °C 预变性 30 s；95 °C 变性 10 s，60 °C 延伸 30 s，共 40 个循环。数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。利用 Graph Prism 7 软件进行数据分析并绘图。

2 结果

2.1 转录组学分析

2.1.1 差异表达基因的筛选与分析 9 个样品共获得 38.3 Gb 的高质量数据，质量值不低于 20 的碱基所占百分比 (Q20) 超过 96.94%，质量值不低于 30 的碱基所占百分比 (Q30) 超过 91.87% (表 2)。火山图结果显示，高温组共有 446 个基因差异表达，其中显著上调和下调的差异表达基因 (DEGs) 分别为 188 个和 258 个，其中细胞色素 P450 基因显著下调。低温组共筛选出 188 个差异表达基因 (DEGs)，

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of primer in quantitative real-time PCR

基因名称 Gene ID	基因描述 Gene description	引物序列 Primer sequence (5'-3')
LOC112553680	软骨基质蛋白 Cartilage matrix protein-like	F: GAAGTGGAGGACGAGGAGGT R: CCGTGGGCTTAGTGAGGTT
LOC112557039	蛋白质 Roadkill Protein roadkill	F: AGATGGTCCAACGCCTGTC R: GGAGTCAACCCCTGGTAGAAC
LOC112568024	热休克蛋白 70 Heat shock protein 70	F: CGACTTGGGCACAACCTAC R: TCTTCGCAGCGTCTCTAC
LOC112565731	氨肽酶 Aminopeptidase	F: TCTTCCTGTCTACGCCATCG R: GGATCGGTAGCATTCTGAGTCAAC
LOC112556679	细胞色素 P450 Cytochrome P450	F: AGATGGTCCAACGCCTGTC R: GGAGTCAACCCCTGGTAGAAC
<i>β-actin</i>		F: TCACCATTTGGCAACGAGAGAT R: TCTCGTGAATACCAGCCGACT

表 2 小管福寿螺转录组样品测序数据质控分析

Table 2 Quality control analysis of transcriptome sequencing for *Pomacea canaliculata*

组别及样品编号 Group and sample number	总 reads 数 Number of reads	高质量数据大小 Size of clean reads (Gb)	GC 含量 GC content (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	
高温组 High-temperature	1	43 301 194	6.11	47.51	97.69	93.54
	2	42 507 156	5.91	47.93	97.69	93.57
	3	45 127 050	6.37	47.98	97.66	93.49
低温组 Low-temperature	1	47 089 430	6.50	49.35	97.50	93.20
	2	47 172 468	6.42	47.72	96.94	91.87
	3	50 638 808	7.05	48.14	97.73	93.72
对照组 Control	1	41 672 824	6.24	47.41	97.61	93.41
	2	45 767 470	6.52	48.35	97.64	93.4
	3	45 611 594	6.48	48.48	97.60	93.35

Q20. 质量值 ≥ 20 的碱基所占百分比; Q30. 质量值 ≥ 30 的碱基所占百分比。

Q20 and Q30 indicate percentages of bases with the quality value ≥ 20 and the quality value ≥ 30 .

其中, 114 个基因显著上调, 74 个基因显著下调。热休克蛋白 70 (HSP70) 基因显著上调。这些基因涉及能量代谢、信号转导、解毒、细胞生长和应激反应。

2.1.2 差异表达基因 GO 富集分析 GO 富集分析包括生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 三种类别。高温组的差异表达基因 (DEGs) 显著富集于免疫系统过程、免疫反应和脂质转运等生物过程中, 以及氧化还原酶活性、羧酸酯水解酶活性、铁

离子结合和血红素结合等分子功能中 (图 1a)。低温组的一些差异表达基因 (DEGs) 富集于包括细胞-基质粘附的生物过程中; 在细胞成分类别中则显著富集于细胞外空间; 在分子功能类别中, 它们大多与酶抑制剂活性有关 (图 1b)。

2.1.3 KEGG 富集通路分析 将高温组、低温组中的差异表达基因进行 KEGG 富集分析。在这些通路中, 代谢是最常见的富集通路。与对照组相比, 高温组的差异表达基因 (DEGs) 在谷胱甘肽代谢、淀粉和蔗糖代谢、细胞色素 P450 的生物代谢和花生四烯酸代谢等通路中

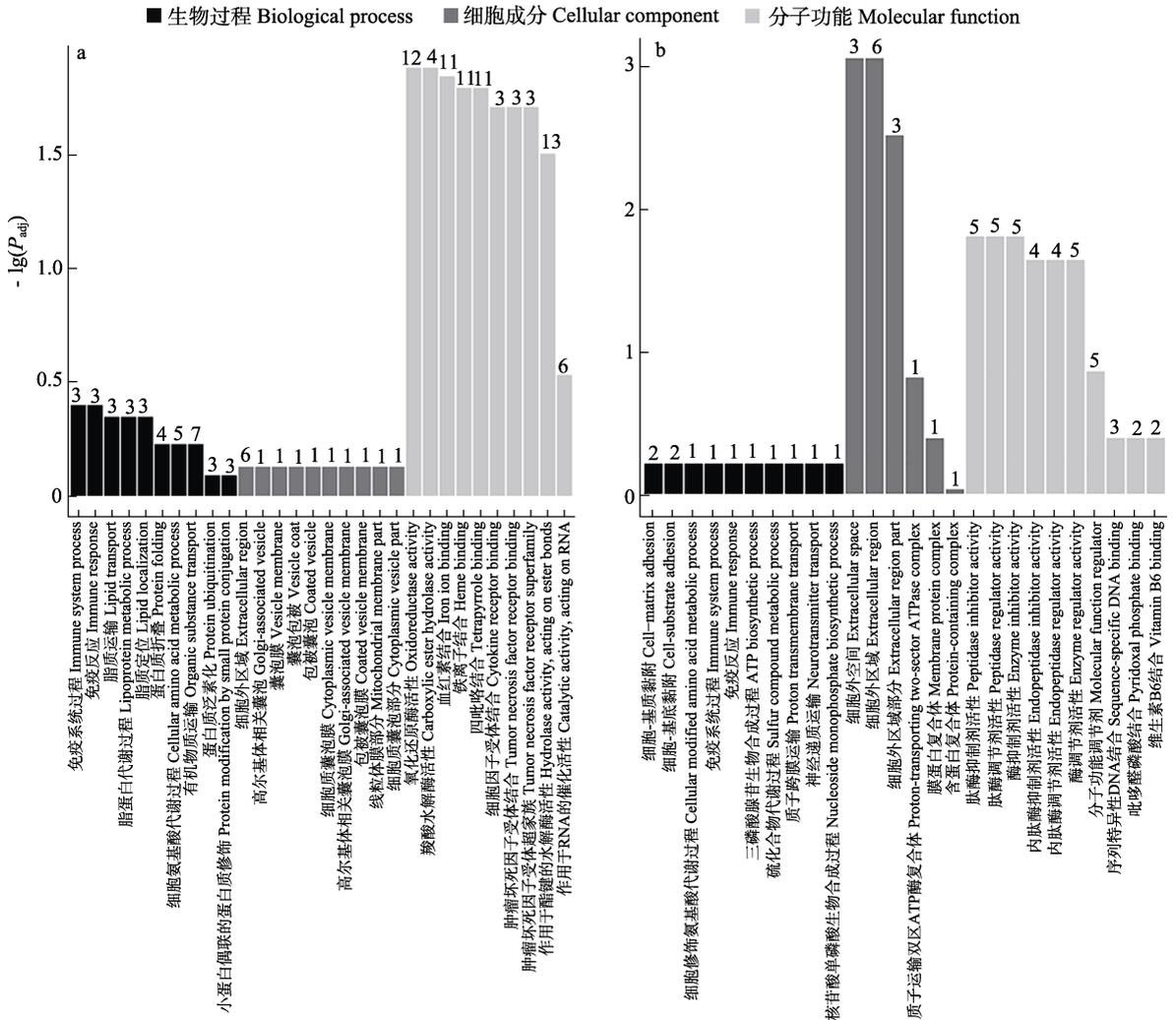


Fig. 1 Gene ontology (GO) terms enrichment analysis of differentially expressed genes between different temperature groups of *Pomacea canaliculata*

a. 高温组与对照组; b. 低温组与对照组。图中横坐标为基因本体富集项目, 纵坐标 P_{adj} 表示校正的 P 值, 为基因本体富集的显著性水平。柱状图上的数字代表富集到该通路的基因数。

a. Between high temperature group and the control group; b. Between low temperature group and the control group. The horizontal axis represents GO term, and the vertical axis represents the significance level of GO term enrichment, P_{adj} indicates adjusted P value. The numbers on the bars indicate the number of genes enriched in that pathway.

显著富集 (图 2a)。低温组的大多数差异表达基因 (DEGs) 富集于硒化合物代谢、视黄醇代谢、脂肪酸代谢、药物代谢-其他酶、谷胱甘肽代谢和甘油酯代谢 (图 2b)。

2.2 代谢组分析

正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)

的分散点图中, 高温组与对照组之间以及低温组和对照组之间均出现明显分离, 表明高温组与对照组以及低温组与对照组之间均存在明显的差异 (图 3)。排序检验结果表明, 在高温组中, 模型的解释率 $R^2 = 0.9$, 模型的预测能力 $Q^2 = -0.8$, 在低温组中, $R^2 = 0.92$, $Q^2 = -0.82$ 。

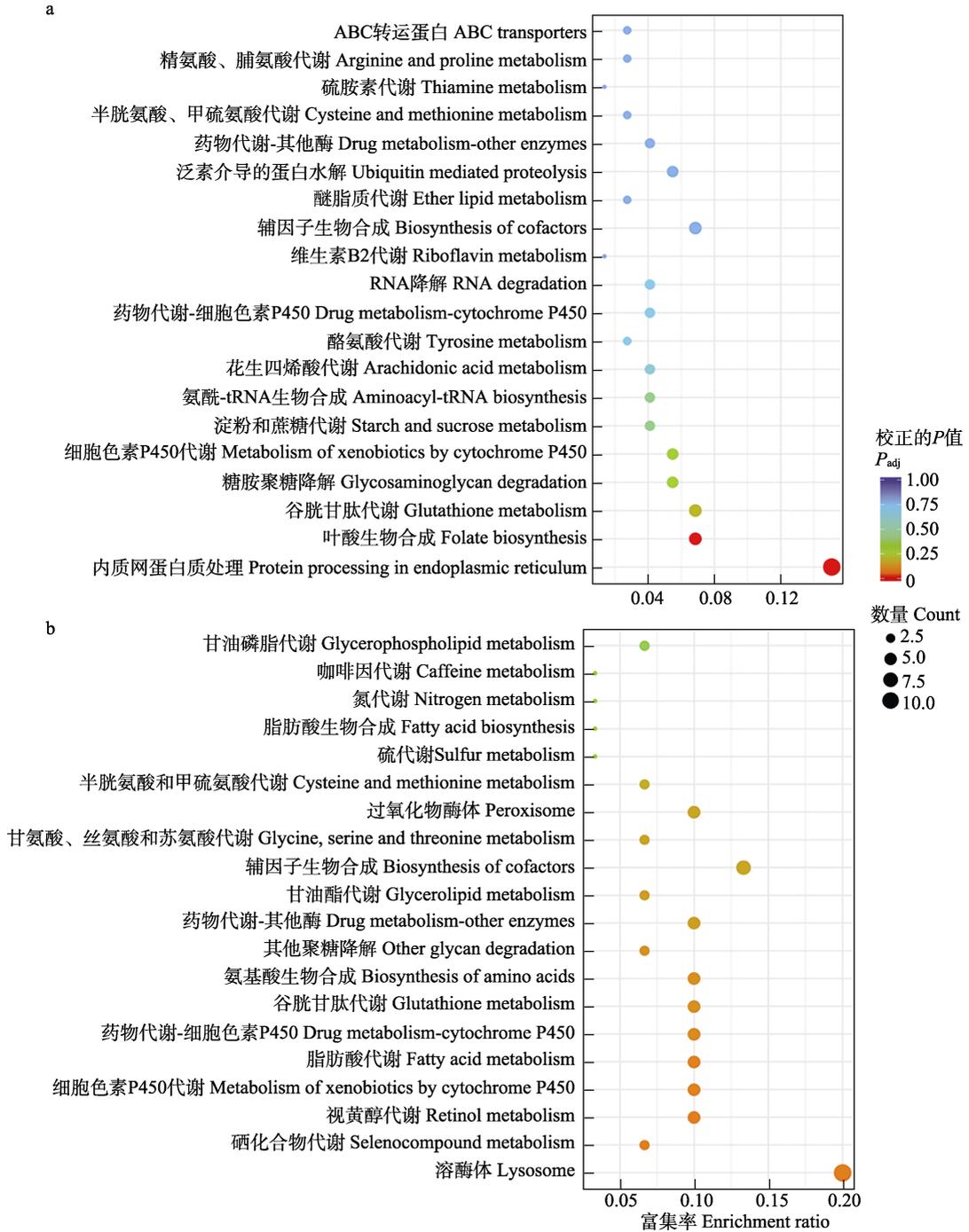


图 2 小管福寿螺不同温度处理组间差异表达基因的 KEGG 通路富集分析

Fig. 2 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes between different temperature groups of *Pomacea canaliculata*

a. 高温组与对照组；b. 低温组与对照组。图中纵坐标为 KEGG 通路。

a. Between high temperature group and the control group; b. Between low temperature group and the control group. The vertical axis represents the KEGG pathways.

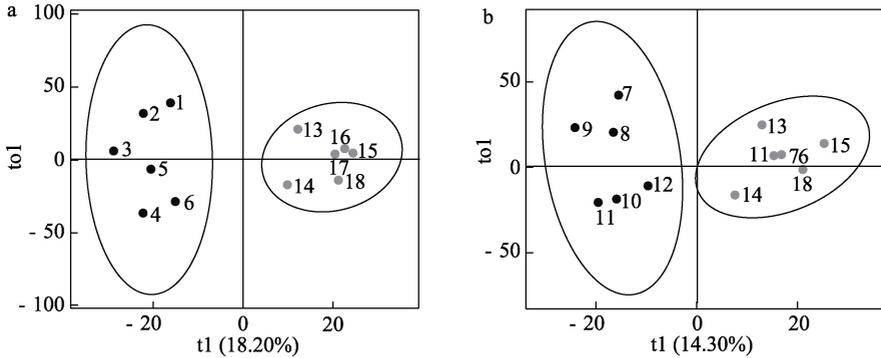


图 3 正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 得分散点图

Fig. 3 Orthogonal projections for latent structures-discriminant analysis (OPLS-DA) score plots

a. 高温组与对照组; b. 低温组与对照组。编号 1~6 为高温组样本, 7~12 为低温组样本, 13~18 为对照组样本。t1 为主成分的得分值, 表示样本组间差异, to1 为正交成分得分值, 表示样本组内差异。

a. Between high temperature group and the control group; b. Between low temperature group and the control group. 1 - 6 were samples of high temperature group, 7 - 12 were samples of low temperature group, and 13 - 18 were samples of the control group. t1 is the score value for the principal component, indicating differences between groups, and to1 is the score value for the orthogonal component, indicating differences within groups.

$R^2 > Q^2$, Q^2 回归线与 Y 轴截距小于 0, 说明 OPLS-DA 模型为有效模型, 样本数据真实可靠性较高, 稳定性和预测能力较强。

与对照组相比, 高温组共鉴定出 233 个差异代谢物 (SCMs), 其中 133 个显著上调, 100 个显著下调。低温组共筛选出 119 个差异代谢物 (SCMs), 其中 49 个显著上调, 70 个显著下调。基于 LC-MS 分析结果表明, 高温组差异代谢物显著富集于蛋白质消化吸收、氨基酰-tRNA 生物合成和苯丙氨酸代谢 (图 4a), 而低温组中差异代谢物显著富集丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢 (图 4b)。在高温条件下, L-苏氨酸、L-苯丙氨酸、蛋氨酸、L-天门冬氨酸、L-丝氨酸和 L-组氨酸等与机体相关的代谢物含量均下降。参与三羧酸循环的富马酸和 α -酮戊二酸等代谢物含量则在低温条件下增加。

2.3 转录组和代谢组联合分析

将高温组中差异表达基因和关键代谢物进行联合分析, 细胞色素 P4503A41 (LOC112556679)、乙酰转移酶结构域 (LOC112565344) 和真核延伸因子激酶 (LOC112561805) 基因的表达与酰基肉碱

(acyl carnitine, ACar) 水平呈明显正相关, 而与天冬氨酸-苯丙氨酸甲酯、阿魏酰基-1, 4-丁二胺呈明显负相关 (图 5a)。低温组的差异表达基因与甲基丙二酸、富马酸水平呈明显正相关, 而与酪氨酸和 C23 胆汁酸呈明显负相关 (图 5b)。

2.4 qRT-PCR 验证

qRT-PCR 结果表明, 随机选取的 5 个差异基因表达情况与转录组数据的差异表达趋势一致 (图 6), 证明转录组测序数据具有可靠性。

3 讨论

温度影响水生动物的生长、存活和代谢 (Meng et al. 2019)。小管福寿螺的快速扩张与其温度耐受性密切相关, 其对高温有较强的耐受性, 而冬季低温则限制了其向北方的传播 (董胜张等 2010)。极端温度环境会引起小管福寿螺的呼吸和代谢紊乱, 导致其死亡率上升 (Seuffert et al. 2010)。为了减少温度对自身产生的危害, 外温动物会通过预先暴露在亚致死温度下, 进行一系列生理过程的调节 (Leiva et al. 2019)。

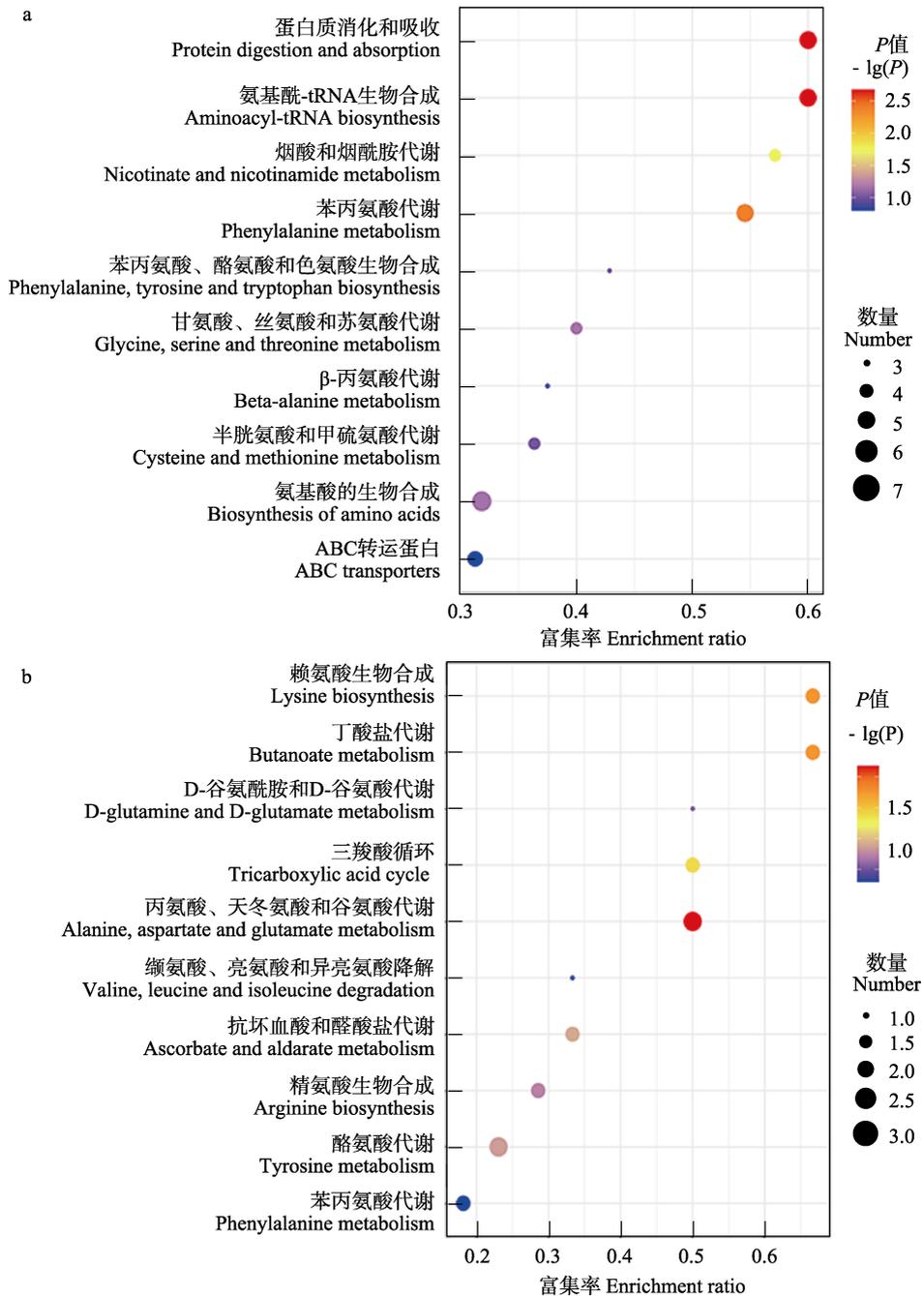


图 4 小管福寿螺差异代谢物 KEGG 富集气泡图

Fig. 4 KEGG enrichment bubble diagram of significantly changed metabolites in hepatopancreas tissue of *Pomacea canaliculata*

a. 高温组与对照组；b. 低温组与对照组。图中纵坐标为 KEGG 通路。

a. Between high temperature group and the control group; b. Between low temperature group and the control group. The vertical axis represents the KEGG pathways.

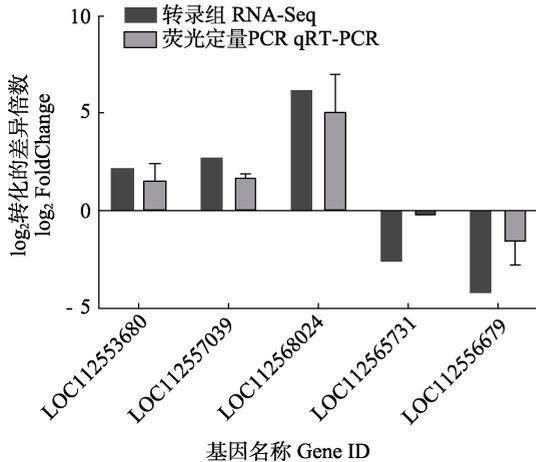


图 6 小管福寿螺转录组差异表达基因的 qRT-PCR 验证

Fig. 6 qRT-PCR verification of differentially expressed genes in *Pomacea canaliculate*

The Y-axis represents the logarithm of the change in expression level.

3.1 氨基酸代谢

氨基酸在生物体内的物质代谢和调控方面扮演重要角色。在本研究中，氨基酸代谢是受到温度胁迫影响较为显著的途径，丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、富马酸和 α -酮戊二酸的水平在低温胁迫下发生显著变化，而苏氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、天冬氨酸、丝氨酸和组氨酸的水平在高温胁迫下发生显著变化。三羧酸循环通过一系列化学反应释放储存的能量以形成 ATP，提供生物体能量 (Akram 2014)，富马酸和 α -酮戊二酸作为三羧酸循环的中间产物，其表达水平显著上调， α -酮戊二酸还能将游离氨合成三羧酸循环中的氨基甲酰磷酸酯 (Chin et al. 2014)。在日本对虾的研究中也发现类似的结果，冷胁迫会引起三羧酸循环中间产物的改变 (Ren et al. 2020)。丝氨酸在低温胁迫下显著上调，而丝氨酸是乙酰-辅酶 A 的重要前体 (Wu et al. 2018)，可能影响三羧酸循环的能量产生。天冬氨酸作为草酰乙酸的重要前体，在高温胁迫下显著下调。此外，在冷胁迫下，小管福寿螺的许多基因参与蛋白酶体、亚油酸代谢和视黄醇代谢过程 (Xiao et al. 2022)。在

本研究中，相关有机酸含量的增加促进三羧酸循环的过程，表明小管福寿螺经过低温胁迫后，会调节三羧酸循环中间产物补充能量供给。而高温可能通过抑制某些氨基酸的生成以减少能量消耗。

3.2 脂质代谢

脂质在软体动物细胞结构的组成、信号分子转导以及免疫调节等方面发挥关键作用，用于维持细胞及机体的免疫代谢平衡 (Xu et al. 2021)。高温和低温均会影响细胞膜的脂质构成，而脂质是维持细胞膜功能的重要物质 (Harayama et al. 2018, Casares et al. 2019)。植物、微生物和动物会通过增加细胞膜磷脂中不饱和脂肪酸的比例，引起生物膜物理特性的变化，改变低温下细胞膜内碳氢化合物的顺序 (Hayward et al. 2014)。花生四烯酸是生物体内广泛分布的不饱和脂肪酸，参与炎症、癌症等病理过程，在免疫系统中发挥重要作用 (Xu et al. 2022)。研究表明，达氏鲟 (*Acipenser dabryanus*) 肝中脂肪酸水平在短期热应激下显著下调，产生代谢紊乱，造成肝损伤 (Chen et al. 2023)。在本研究中，高温胁迫后，脂质和脂肪酸代谢相关基因的表达水平显著下调，差异表达基因 (DEGs) 在脂质运输和花生四烯酸代谢途径中明显富集，推测热应激会干扰小管福寿螺肝胰腺的脂质代谢，破坏细胞膜的结构与功能，并阻碍脂蛋白的合成，可能导致脂质代谢紊乱，影响小管福寿螺的生理功能。体内温度变化可能会导致小管福寿螺细胞膜流动性降低 (Song et al. 2019)。推测小管福寿螺可能通过富集花生四烯酸等代谢途径，以增加不饱和脂肪酸的含量并保持膜的流动性，从而减少高温胁迫对细胞膜造成的损害。

3.3 免疫反应

已有研究表明，急性温度胁迫会对软体动物的免疫系统产生严重影响 (Zhu et al. 2022)。当小管福寿螺受到高温胁迫时，差异表达基因 (DEGs) 显著富集到免疫系统过程和免疫反应中。此外，高温增加了病原菌的繁殖，免疫相

关基因的上调可能是小管福寿螺应对病原体增加而产生的反应。细胞色素 P450 的功能主要集中在分解毒素、杀虫剂和各种药物,以及合成与生命活动(如抗应激和繁殖)相关的激素(Zanger et al. 2013)。在低温胁迫下,小管福寿螺体内细胞色素 P450 基因的转录水平发生变化,并被证实具有抗低温功能(Wang et al. 2020)。此外小管福寿螺可通过长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)调控细胞色素 P450 的表达,从而产生低温适应(Xiao et al. 2022)。低温胁迫下细胞色素 P450 显著富集于药物代谢途径,表明细胞色素 P450 可能有助于小管福寿螺对低温胁迫的适应,减轻温度胁迫对其生理过程的影响。在高温组中,差异表达基因(DEGs)显著富集于细胞色素 P450 代谢。这些研究结果表明,细胞色素 P450 代谢在小管福寿螺抵抗温度胁迫的过程中起关键作用。其他研究中也发现类似的结论,在温度胁迫下,低纬度地区菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)细胞色素 P450 基因均出现显著上调,有助于其抵抗急性温度胁迫(Jahan et al. 2022)。细胞色素 P450 等多个基因与酰基肉碱(ACar)呈显著正相关,已有研究表明,酰基肉碱代谢的变化与肿瘤生长密切相关,表明血液中酰基肉碱的变化可能会导致免疫系统紊乱(王旋成等 2023)。热休克蛋白家族(HSPs)是生物体为应对非生物胁迫(如高温和干旱)而产生的重要分子伴侣蛋白(Jacob et al. 2017),当其无法维持细胞结构的稳定时,泛素途径和免疫反应就会被激活,以防止蛋白质错误折叠,减少机体产生损伤(Chen et al. 2023)。HSPs 基因的上调是小管福寿螺应对温度应激而产生的显著反应。已有研究表明,小管福寿螺的 HSP40 和 HSP70 在低温胁迫下表达量较高,而高温胁迫能够诱导小管福寿螺 HSP70 (Song et al. 2014) 和 HSP90 高表达(Liu et al. 2018)。本研究发现,热休克蛋白 70 (HSP70) 在低温组中显著上调,推测可能和小管福寿螺

温度耐受相关,以减少低温对机体造成的损伤。

参 考 文 献

- Akram M. 2014. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 68(3): 475–478.
- Ansart A, Vernon P. 2003. Cold hardiness in molluscs. *Acta Oecologica*, 24(2): 95–102.
- Cadierno M P, Dreon M S, Heras H. 2018. Validation by qPCR of reference genes for reproductive studies in the invasive apple Snail *Pomacea canaliculata*. *Malacologia*, 62(1): 163–170.
- Casares D, Escribá P V, Rosselló C A. 2019. Membrane lipid composition: effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9): 2167.
- Chen Y, Wu X, Lai J, et al. 2023. Integrated biochemical, transcriptomic and metabolomic analyses provide insight into heat stress response in Yangtze Sturgeon (*Acipenser dabryanus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 249: 114366.
- Chin R M, Fu X, Pai M Y, et al. 2014. The metabolite α -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature*, 510(7505): 397–401.
- Cowie R H, Hayes K A, Thiengo S C. 2006. What are apple snails confused taxonomy and some preliminary resolution // Joshi R C, Sebastian L S. *Global Advances in Ecology and Management of Golden Apple Snails*. Nueva Ecija: Philippine Rice Research Institute, 3–23.
- Harayama T, Riezman H. 2018. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(5): 281–296.
- Hayes K A, Burks R L, Castro-Vazquez A, et al. 2015. Insights from an integrated view of the biology of apple snails (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia*, 58(1/2): 245–302.
- Hayward S A L, Manso B, Cossins A R. 2014. Molecular basis of chill resistance adaptations in poikilothermic animals. *Journal of Experimental Biology*, 217(1): 6–15.
- Ito K. 2002. Environmental factors influencing overwintering success of the golden apple snail, *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae), in the northernmost population of Japan. *Applied Entomology and Zoology*, 37(4): 655–661.

- Jacob P, Hirt H, Bendahmane A. 2017. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnology Journal*, 15(4): 405–414.
- Jahan K, Nie H, Yin Z, et al. 2022. Comparative transcriptome analysis to reveal the genes and pathways associated with adaptation strategies in two different populations of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) under acute temperature challenge. *Aquaculture*, 552: 737999.
- Kwong K L, Dudgeon D, Wong P K, et al. 2010. Secondary production and diet of an invasive snail in freshwater wetlands: implications for resource utilization and competition. *Biological Invasions*, 12(5): 1153–1164.
- Lei J, Chen L, Li H. 2017. Using ensemble forecasting to examine how climate change promotes worldwide invasion of the golden apple snail (*Pomacea canaliculata*). *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(8): 404.
- Leiva F P, Calosi P, Verberk W C E P. 2019. Scaling of thermal tolerance with body mass and genome size in ectotherms: a comparison between water- and air-breathers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences*, 374(1778): 20190035.
- Liu G F, Yang Q Q, Lin H F, et al. 2018. Differential gene expression in *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda) under low temperature condition. *Journal of Molluscan Studies*, 84(4): 397–403.
- Liu J, Sun Z, Wang Z, et al. 2020. A comparative transcriptomics approach to analyzing the differences in cold resistance in *Pomacea canaliculata* between Guangdong and Hunan. *Journal of Immunology Research*, 2020: 8025140.
- Lowe S, Browne M, Boudjelas S, et al. 2000. 100 of the world's worst invasive alien species: A selection from the global invasive species database. The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN), 12.
- Lulijwa R, Alfaro A C, Young T. 2022. Metabolomics in salmonid aquaculture research: applications and future perspectives. *Reviews in Aquaculture*, 14(2): 547–577.
- Matsukura K, Izumi Y, Yoshida K, et al. 2016. Cold tolerance of invasive freshwater snails, *Pomacea canaliculata*, *P. maculata*, and their hybrids helps explain their different distributions. *Freshwater Biology*, 61(1): 80–87.
- Matsukura K, Tsumuki H, Izumi Y, et al. 2009. Temperature and water availability affect decrease of cold hardiness in the apple snail, *Pomacea canaliculata*. *Malacologia*, 51(2): 263–269.
- Meng X, Dong L, Shi X, et al. 2019. Screening of the candidate genes related to low-temperature tolerance of *Fenneropenaeus chinensis* based on high-throughput transcriptome sequencing. *PLoS One*, 14(4): e0211182.
- Mu Y N, Li W R, Wu B, et al. 2020. Transcriptome analysis reveals new insights into immune response to hypoxia challenge of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Fish & Shellfish Immunology*, 98: 738–747.
- Ning M, Wei P, Shen H, et al. 2019. Proteomic and metabolomic responses in hepatopancreas of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* infected by microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 87: 534–545.
- Ren X, Yu Z, Xu Y, et al. 2020. Integrated transcriptomic and metabolomic responses in the hepatopancreas of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) under cold stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 206: 111360.
- Seuffert M E, Burela S, Martín P R. 2010. Influence of water temperature on the activity of the freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) at its southernmost limit (southern pampas, Argentina). *Journal of Thermal Biology*, 35(2): 77–84.
- Seuffert M E, Martín P R. 2013. Juvenile growth and survival of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) reared at different constant temperatures. *SpringerPlus*, 2(1): 312.
- Song H M, Mu X D, Gu D G, et al. 2014. Molecular characteristics of the HSP70 gene and its differential expression in female and male golden apple snails (*Pomacea canaliculata*) under temperature stimulation. *Cell Stress and Chaperones*, 19(4): 579–589.
- Song J, Liu B, Wang C. 2022. Metabolomic and transcriptomic responses of *Argopecten irradians* concentricus to thermal stresses. *Frontiers in Marine Science*, 9: 818083.
- Song M, Zhao J, Wen H S, et al. 2019. The impact of acute thermal stress on the metabolome of the black rockfish (*Sebastes*

- schlegelii*). *PLoS One*, 14(5): e0217133.
- Soyano K, Mushirobira Y. 2018. The mechanism of low-temperature tolerance in fish. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1081: 149–164.
- Wang B, Hao X, Xu J, et al. 2020. Cytochrome P450 metabolism mediates low-temperature resistance in pinewood nematode. *FEBS Open Bio*, 10(6): 1171–1179.
- Wang L, Song X, Song L. 2018. The oyster immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 80: 99–118.
- Wu Z, Jin L, Zheng W, et al. 2018. NMR-based serum metabolomics study reveals a innovative diagnostic model for missed abortion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 496(2): 679–685.
- Xiao Q, Lin Y, Li H, et al. 2022. Transcriptome sequencing reveals the differentially expressed lncRNAs and mRNAs in response to cold acclimation and cold stress in *Pomacea canaliculata*. *BMC Genomics*, 23(1): 382.
- Xu C, Ma Q, Li E, et al. 2021. Response of lipid molecular structure to dietary lipid type in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: a deep lipidomics analysis. *Aquaculture Reports*, 19: 100596.
- Xu H G, Meng X X, Wei Y L, et al. 2022. Arachidonic acid matters. *Reviews in Aquaculture*, 14(4): 1912–1944.
- Yoshida K, Matsukura K, Cazzaniga N J, et al. 2014. Tolerance to low temperature and desiccation in two invasive apple snails, *Pomacea canaliculata* and *P. maculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae), collected in their original distribution area (northern and central Argentina). *Journal of Molluscan Studies*, 80(1): 62–66.
- Zanger U M, Schwab M. 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(1): 103–141.
- Zhao T, Ma A, Yang S, et al. 2021. Integrated metabolome and transcriptome analyses revealing the effects of thermal stress on lipid metabolism in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. *Journal of Thermal Biology*, 99: 102937.
- Zheng G, Dong S, Hou Y, et al. 2012. Molecular characteristics of HSC70 gene and its expression in the golden apple snails, *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda). *Aquaculture*, 358: 41–49.
- Zhu W, Zhang C, Tan K, et al. 2022. Variation of lipids and fatty acids in noble scallop *Chlamys nobilis* under low temperature stress. *Aquaculture*, 554: 738121.
- 董胜张, 白旭, 潘颖瑛, 等. 2010. 温度胁迫对我国不同地理种群福寿螺生长及存活的影响. *湖北农业科学*, 49(11): 2878–2882.
- 王旋成, 朱一帆, 周海琳, 等. 2023. 血清非靶代谢组学联合靶向胆汁酸代谢组学筛查结肠癌的潜在生物标志物. *南方医科大学学报*, 43(3): 443–453.