

基于非靶向代谢组学分析不同地区羊肉代谢物的差异

张蓝月, 孙万成*, 罗毅皓

(青海大学农牧学院, 青海西宁 810016)

摘要: 为探究不同地区羊肉的代谢物差异, 采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱技术, 结合多元统计分析法和通路分析对青海茶卡、青海玉树、青海祁连、四川、内蒙古和宁夏共 6 个地区的特色羊肉进行非靶向代谢组学研究。结果显示, 从青海 3 个地区羊肉中筛选出 176 个差异显著代谢物 ($VIP \geq 1$, $P < 0.05$), 主要包括氨基酸及其代谢物、苯和取代衍生物、有机酸及其衍生物、杂环化合物、核苷酸及其代谢物等, 共注释到 88 条代谢通路, 主要为组氨酸代谢、新陈代谢通路、D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢通路、辅因子的生物合成和氨基酸的生物合成通路; 从青海省内 3 地区和省外 3 地区当地特色羊肉中筛选出 50 种差异显著代谢物 ($VIP \geq 1$, $P < 0.05$, $FC \geq 2$ 或 $FC \leq 0.5$), 主要包括氨基酸及其代谢物、甘油磷脂、脂肪酸、醇和胺类、苯和取代衍生物等, 共注释到 24 条代谢通路, 主要为新陈代谢通路、嘌呤代谢、酪氨酸代谢、铁死亡和花生四烯酸代谢通路。非靶向代谢组学可从整体水平上揭示不同地区羊肉的代谢差异, 为不同地区特色羊肉的鉴别和品质评价提供方向。

关键词: 羊肉; 非靶向代谢组学; 差异代谢物; 代谢通路

文章编号: 1673-9078(2023)07-91-101

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.7.0985

Untargeted Metabolomics Analysis of Metabolite Differences between Mutton from Different Regions

ZHANG Lanyue, SUN Wancheng*, LUO Yihao

(College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract: To reveal the metabolite differences in mutton samples from different regions, specialty muttons from the Chaka, Yushu, and Qilian counties of Qinghai province, Sichuan, Inner Mongolia, and Ningxia were subjected to untargeted metabolomics analysis, using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight-mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS), multivariate statistical analysis, and pathway analysis. Using the $VIP \geq 1$ and $P < 0.05$ criteria, 176 differential metabolites, including amino acids, amino acid metabolites, benzene, substituted benzene derivatives, organic acids, organic acid derivatives, heterocyclic compounds, nucleotides, and nucleotide metabolites, were identified in muttons from Chaka, Yushu, and Qilian. Furthermore, 88 metabolic pathways, including the histidine metabolism, metabolic, D-glutamine and D-glutamate metabolic, and cofactor and amino acid biosynthesis pathways, were annotated. Using the $VIP \geq 1$, $P < 0.05$, and $FC \geq 2$ or $FC \leq 0.5$ criteria, 50 differential metabolites, including amino acids, amino acid metabolites, glycerophospholipids, fatty acids, alcohols, amines, benzene, and substituted benzene derivatives, were identified in specialty muttons from the six regions. In all, 24 metabolic pathways, including metabolic, purine metabolism, tyrosine metabolism, ferroptosis, and arachidonic acid metabolism pathways, were annotated. Therefore, broad metabolite differences between mutton from different regions can be revealed using untargeted metabolomics analysis. The findings of this study have paved a path for the identification of specialty muttons from different regions and the assessment of their quality.

Key words: mutton; untargeted metabolomics analysis; differential metabolites; metabolic pathways

引文格式:

张蓝月, 孙万成, 罗毅皓. 基于非靶向代谢组学分析不同地区羊肉代谢物的差异[J]. 现代食品科技, 2023, 39(7): 91-101.

ZHANG Lanyue, SUN Wancheng, LUO Yihao. Untargeted metabolomics analysis of metabolite differences between mutton from different regions [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 91-101.

收稿日期: 2022-08-06

基金项目: 青海省优势特色产业集群项目 (2022-09)

作者简介: 张蓝月 (1998-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 1031918349@qq.com

通讯作者: 孙万成 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能食品及农畜产品加工, E-mail: sun.wancheng0108@aliyun.com

羊肉因其富含人体所需的脂肪酸、氨基酸等营养物质且具有良好的感官品质而广受青睐^[1]。我国是羊肉生产大国^[2]，多地均有其特色羊品种，如青藏高原地区的藏羊^[3]、内蒙古地区的苏尼特羊^[4]和宁夏盐池的滩羊^[5]等。目前，对不同地区或品种羊肉的研究多集中在风味物质^[6]、营养物质^[7]等特定物质含量的测定方面，而在羊肉整体代谢物特征的差异方面还鲜有报道。

非靶向代谢组学是一种可以全面同时评估生物样品中数千种外源化学物质、代谢物以及相关内源性代谢机制的新兴科学^[8]，有助于食品品质评价与鉴定。Wang 等^[9]利用非靶向代谢组学探究了 72 日龄临武鸭和 42 日龄北京鸭的代谢物组成差异，发现 72 日龄临武鸭胸脯中的鹅麻黄碱、肌肽和烟酰胺的浓度较高，而琥珀酸、肌酸和肌醇的浓度较低，这一结果可用于鸭肉质量的评估。Yu 等^[10]用电子束辐照对虾肉进行预处理，后利用代谢组学检测预处理的虾肉在不同冷藏时间点的代谢物以对其进行品质评价，实验结果显示辐照可以延长虾肉的货架期。任传英等^[11]采用非靶向代谢组学分析了糙米和大米的代谢差异，结果显示，糙米的多数差异代谢物上调，并通过氨基酸代谢、碳代谢和嘌呤代谢等途径提升了氨基酸、脂肪酸等含量，为糙米的营养评价提供了依据。徐春晖等^[12]利用非靶向代谢组学对狗牯脑、庐山云雾茶和婺源绿茶的代谢物进行分析，确定了 220 个差异代谢物，进一步对差异代谢物进行聚类分析后发现 3 种茶叶具有差异，该研究对茶叶鉴别具有一定意义。

表 1 不同地区羊肉样品信息

Table 1 Information of mutton samples in different regions

采样地区	品种	样本量	编号
青海省海西蒙古族藏族自治州乌兰县茶卡镇	藏羊	3	CK
青海省玉树藏族自治州治多县	藏羊	3	YS
青海省海北藏族自治州祁连县	藏羊	3	QL
内蒙古锡林郭勒盟锡林浩特市苏尼特左旗	苏尼特羊	3	SNT
四川省阿坝藏族羌族自治州松潘县	藏羊	3	SC
宁夏回族自治区吴忠市盐池县	滩羊	3	TY

注：4 个地区的藏羊以地区首字母为编号，苏尼特羊和滩羊以羊品种为编号。

1.2 仪器与设备

LC-20 超高效液相色谱仪，日本 Shimadzu 公司；Triple TOF-6600 质谱仪，美国 AB Sciex 公司；涡旋混合器 MIX-200，上海净信实业发展有限公司；离心机 5427R，德国艾本德公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备

本研究采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱技术，对青海茶卡、青海玉树、青海祁连、四川、内蒙古和宁夏共 6 个地区的当地特色羊肉进行非靶向代谢组学研究，并结合统计学分析法，首先筛选出青海省内 3 个地区羊肉的差异代谢物；再以四川、内蒙古和宁夏 3 个地区的特色品种羊作为省外地区的羊肉样品，与青海省内 3 个地区藏羊的代谢物进行比较和筛选，并对相关代谢通路进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 注释与富集，解析不同地区羊肉中差异代谢物种类和数量的差异，并探明形成差异的代谢途径，以为不同地区特色羊肉的鉴定和品质评价提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

肉样采集于青海茶卡镇、青海治多县、青海祁连县、四川、内蒙古和宁夏等 6 个地区，所有样本均来自于 10 月龄左右健康羊的前腿肉，宰后 1 h 内取样，置于 0~4 °C 冷藏箱成熟 48 h 后-80 °C 冰箱冷冻保存，具体信息见表 1。

甲醇（色谱纯），德国 Meker 公司；甲酸（色谱纯），美国 Thermo Fisher 公司；乙腈（色谱纯），德国 Meker 公司；2-氯苯丙氨酸（色谱纯），美国 Thermo Fisher 公司。

将每份羊肉样品室温下冰上解冻后切碎，剔除可见脂肪及结缔组织，多点取样称量 20 mg 到对应离心管中，加入一粒钢珠，用球磨仪（30 Hz）匀浆 20 s，4 °C、3 000 r/min 离心 30 s，再加入体积分数 70% 甲醇水内标提取液 400 μL（内标为 2-氯苯丙氨酸），1 500 r/min 震荡 5 min 后静置 15 min。4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液 300 μL 至另一对应离心管中，-20 °C 静置 30 min，同条件下离心 3 min，取上清液 200 μL 至进样瓶，每个地区的 3 份羊肉样品

均进行此处理后待上机分析。此外,质控(Quality Control, QC)样本由试验中所有样本混合制备而成^[13],用于评价试验的重复性。

1.3.2 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μ m); 流动相 A: 超纯水(含 0.1%甲酸)、流动相 B: 乙腈(含 0.1%甲酸); 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流速: 0.4 mL/min; 进样量: 2 μ L。梯度洗脱: 0~11 min, 95% A; 11~12 min, 10% A; 12~12.1 min, 10% A; 12.1~14 min, 95% A。

1.3.3 质谱条件

质谱信号的采集分别采用正负离子扫描模式。电子喷雾电离(ESI)源条件设置如下: Ion Source Gas1(离子喷涂电压 1): 50; Ion Source Gas2(离子喷涂电压 2): 60; Curtain Gas(幕帘气体): 35; Temperature(温度): 550 $^{\circ}$ C; Ion Spray Voltage(离子喷射电压): 5 500(正离子模式), -4 500(负离子模式); Declustering Potential(去簇电压): $\pm$ 60(正负离子模式); Collision Energy Spread(碰撞能量扩散): 15; Ion Release Width(离子释放宽度): 15; Collision Energy(碰撞能): $\pm$ 30(正负离子模式); Ion Release Delay(离子释放延迟): 30。

1.4 数据分析

质谱下机原始数据经过 ProteoWizard 转换为 mzML 格式,采用 XCMS 程序进行峰提取,对齐,保留时间校正。采用“SVR”方法对峰面积进行校正,并对各组样本中缺失率>50%的峰进行过滤。校正筛选后的峰,通过检索实验室自建数据库、整合公共库以及 metDNA 方法得到代谢物鉴定信息。最后通过 R 程序进行统计学分析。通过 KEGG 注释与富集分析挖掘筛选出的差异代谢物的生物学信息。

2 结果与讨论

2.1 样本质控分析

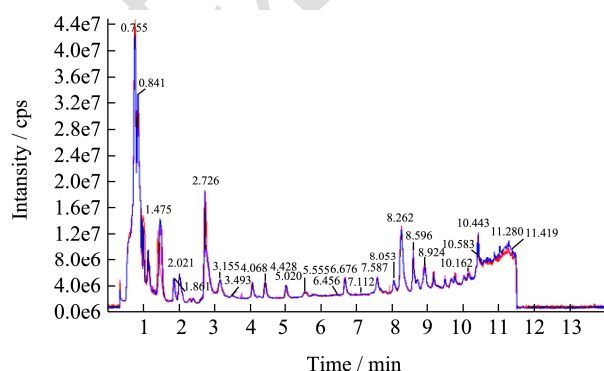


图1 QC 样本 TIC 重叠图

Fig.1 QC sample TIC overlay

注: a: 正离子模式; b: 负离子模式。

本试验中每 9 个检测样本中插入一个 QC 样本,根据 QC 样本质谱检测总离子流图(Total Ion Chromatography, TIC)的重叠图对代谢物提取和检测的稳定性进行评价。3 个羊肉 QC 样本的 TIC 重叠图见图 1,与负离子模式下的 TIC 重叠图相比,正离子模式下总离子流的曲线重叠性更高,表明正离子模式下本研究仪器状态好,系统稳定可靠,因此以下所有分析均选择正离子模式。

2.2 不同地区羊肉代谢物的主成分分析

主成分分析(Principal Component Analysis, PCA)是无监督的多元数据统计分析法^[14],用于了解各组样品间的总体差异和组内样品间的变异程度。为判断不同地区羊肉的代谢物之间是否具有差异,本研究采用 PCA 法对不同分组的羊肉进行分析。

2.2.1 青海省 3 个地区羊肉的 PCA 结果

图 2 为青海茶卡、青海祁连和青海玉树样品的 PCA 图,图中的每个点代表一个样品,同一地区样品相互靠拢,不同地区样品分区明显。但 PC1 和 PC2 的累计贡献率为 50.88%,未达到 60%,说明 PCA 的聚类分析效果不佳,需选择更合适的模式识别法。

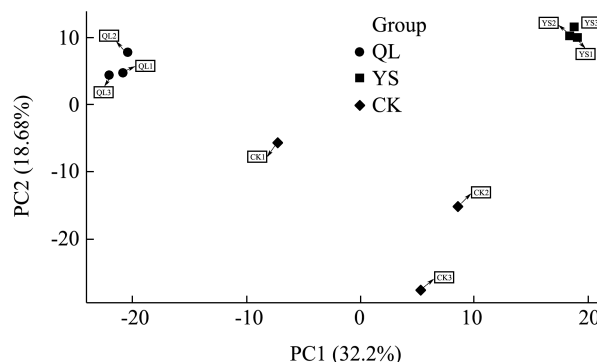


图2 青海省 3 地区 PCA 得分图

Fig.2 PCA score chart of three regions in Qinghai province

2.2.2 青海省内外与省外地区的 PCA 结果

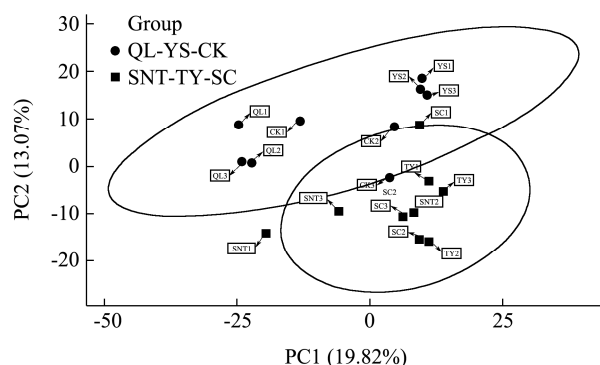


图3 青海省内外与省外样品 PCA 得分图

Fig.3 PCA score chart of samples inside and outside Qinghai province

图3为青海省内(茶卡、玉树、祁连)和省外(四川、内蒙古、宁夏)样品的PCA得分图,PC1和PC2的解释率分别为19.82%和13.07%,累计贡献率为32.89%,未达到60%;并且从图中可以看出青海省内羊肉组和省外羊肉组之间不能完全区分开,省外地区样品SNT1、SC1和青海省样品CK3均为超出置信区间的离群点,以上均说明PCA的聚类分析效果不佳,需考虑更合适的模式识别法。

2.3 不同地区羊肉代谢物的正交偏最小二乘判别分析

正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis, OPLS-DA)是一种有监督模式的多元统计分析法^[15],能够更好地寻找差异代谢物。为进一步提高模型有效性,弥补PCA对不同地区羊肉代谢物聚类效果的不足,本研究继续采用OPLS-DA法对不同分组的羊肉代谢物进行分析。

2.3.1 青海省内外3个地区羊肉的OPLS-DA结果

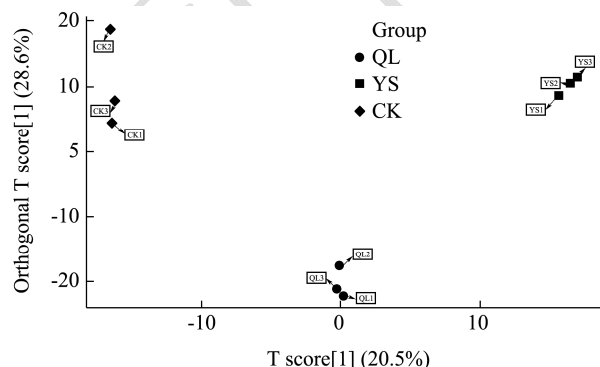


图4 青海省内外3地区 OPLS-DA 得分图

Fig.4 OPLS-DA score plot of three regions in Qinghai province

图4为青海茶卡、青海祁连和青海玉树样品的OPLS-DA得分图,横、纵坐标分别可以体现组间和组

内的差异,3个地区羊肉样品的横坐标相距较远,纵坐标相距小,说明组内差异小,3个地区羊肉存在代谢差异;此外, $R^2Y=0.999$, $Q^2=0.768$,其中 R^2Y 和 Q^2 分别表示模型对青海3地区羊肉代谢物差异的判别解释能力和预测能力, $Q^2>0.5$ 时即可认为是有效模型,因此,本OPLS-DA分析可靠。同时,对该模型进行置换检验,如图5所示,横坐标为模型准确率,纵坐标为200次随机排列组合实验中模型的准确率频数,箭头所指为本OPLS-DA模型准确率所在位置,可以看出 R^2Y 和 Q^2 的 $P<0.05$,说明模型稳定且预测能力好,适合探究青海不同地区羊肉的代谢物差异。

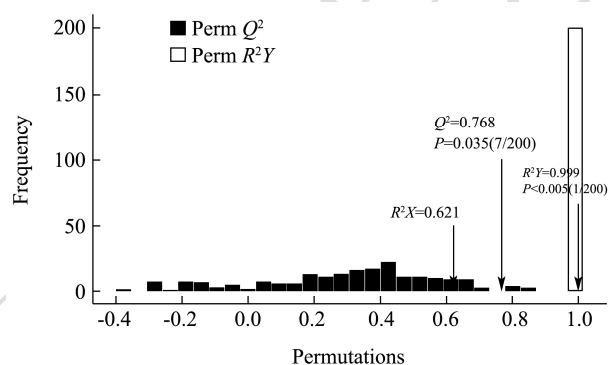


图5 青海省内外3地区 OPLS-DA 模型验证图

Fig.5 OPLS-DA model verification diagram of three regions in Qinghai province

2.3.2 青海省内外与省外地区羊肉的 OPLS-DA 结果

图6为青海省内(茶卡、玉树、祁连)和省外(四川、内蒙古、宁夏)样品的OPLS-DA得分图,与PCA得分图相比,该模型对省内和省外羊肉的区分效果更好,分布在坐标轴的两端,且青海省内羊肉较省外羊肉聚集更紧密。 $R^2Y=0.995$, $Q^2=0.799>0.5$,说明模型可靠。同时,对该模型进行置换检验,如图7所示, R^2Y 和 Q^2 的 $P<0.005$,说明模型稳定且预测能力好,可用于探索青海省内外及省外羊肉的代谢物差异。

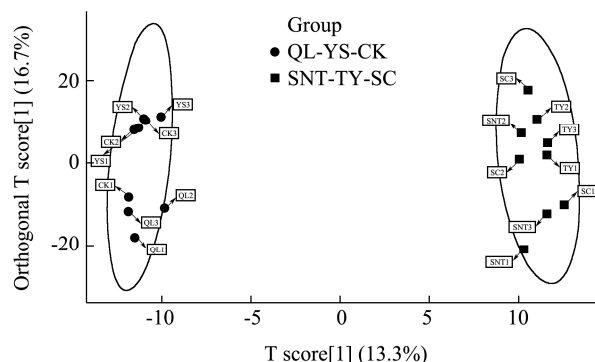


图6 青海省内外与省外样品 OPLS-DA 得分图

Fig.6 OPLS-DA score plot of samples inside and outside Qinghai province

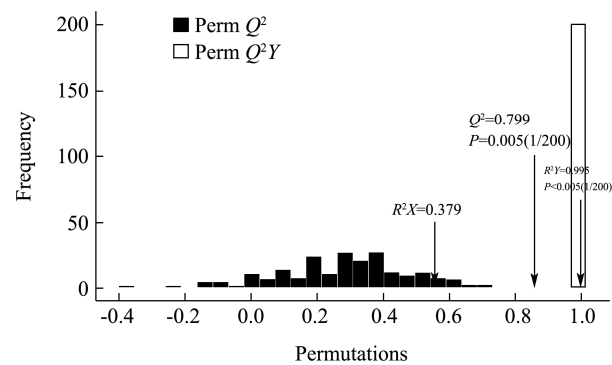


图7 青海省内与省外样品 OPLS-DA 模型验证图

Fig.7 OPLS-DA model verification diagram inside and outside Qinghai province

2.4 差异代谢物筛选及分析

2.4.1 青海省内3个地区羊肉的差异代谢物分析
从青海茶卡、青海祁连和青海玉树的羊肉中检测

表2 青海省内3地区的显著差异代谢物

Table 2 Significantly different metabolites in three regions of Qinghai province

代谢物名称	类别	VIP 值	P 值
4-Pentyn-1-ol	其他	2.13	0.000 010
2,4-Diaminotoluene	苯和取代衍生物	2.11	0.000 666
Dicapthon	苯和取代衍生物	2.09	0.004 596
N-Acetyl-Asp-Glu	有机酸及其衍生物	2.09	0.006 645
Metanephrene	激素和其相关化合物	2.09	0.000 357
DL-2-Aminocaprylic Acid	有机酸及其衍生物	2.08	0.012 454
Matairesinol	木脂素和香豆素	2.07	0.001 083
2-Phenylacetamide	苯和取代衍生物	2.05	0.002 683
Creatinine	有机酸及其衍生物	2.03	0.000 599
Firefly luciferin	有机酸及其衍生物	2.02	0.003 899
Benzamidine	苯和取代衍生物	2.02	0.006 202
N6-cis-p-Coumaroylserotonin	色胺、胆碱、色素	1.99	0.005 500
(-)-Medicarpin	类黄酮	1.99	0.001 097
1-Hydroxy-2-(3-pyridinyl)ethylidene bisphosphonic Acid	其他	1.97	0.009 045
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine	氨基酸及其代谢物	1.96	0.001 710
Urocanic Acid	有机酸及其衍生物	1.96	0.000 549
Albendazole-2-aminosulfone	苯和取代衍生物	1.95	0.011 167
Secoisolariciresinol	木脂素和香豆素	1.94	0.008 458
Rufloxacin	类黄酮	1.91	0.026 961
Acadesine	氨基酸及其代谢物	1.90	0.005 367

注：由于代谢物数量过多，仅选择 VIP 值排在 前 20 个的代谢物进行展示。

为了直观了解差异代谢物在青海省内 3 个地区羊肉中的分布情况，根据差异代谢物的相对含量绘制出热图，如图 8 所示，每行代表一个代谢物，每列代表一个地区羊肉样品中的全部代谢物，红色表示代谢物含量高、绿色表示代谢物含量低。结果显示，青海 3

出 989 个差异代谢物，以变量重要性投影（Variable Importance in Projection, VIP）值 ≥ 1 和以 Student's t-test 得到的 $P < 0.05$ 为标准筛选差异显著的代谢物，共得到 176 种差异显著代谢物，部分结果见表 2，差异代谢物数量最多的前 5 类代谢物分别为氨基酸及其代谢物、苯和取代衍生物、有机酸及其衍生物、杂环化合物、核苷酸及其代谢物。氨基酸通常作为前体物质参与细胞的构建，还能够形成酶来调节细胞代谢^[15]，是评价肉类营养品质的重要因素^[16]。核苷酸是 DNA 和 RNA 的活化前体，参与众多细胞过程，并在代谢和调节功能中发挥重要作用^[17]。有机酸类不仅具有呈香作用，也能够抑制细菌生长，延缓腐败变质^[18]。此外，青海省内 3 地区差异显著代谢物还包含类黄酮，它具有很强的抗氧化活性，对人体健康有益^[19]，有助于对羊肉营养价值进行评价。

地区羊肉的代谢物含量存在差异、各具特色。其中。玉树羊肉中酪氨酸-半胱氨酸、抑二肽素 A、N,N-二羟乙基甘氨酸等氨基酸代谢物较多；祁连羊肉中硬脂酰左旋肉碱、12-羟基硬脂酸等脂肪酸较多，亚油醇乙醇胺（醇和胺类物质）和异丙烟肼（杂环化合物）的含

量也高于青海其他两地；茶卡羊肉中异冬谷酸、1-氨基环丙烷羧酸等有机酸，千屈茶碱-D3、甲基二吡啶-3-乙酸酯等杂环化合物和一些氨基酸及其代谢物较多，如脯氨酸-酪氨酸、L-谷氨酸和L-谷氨酰胺。L-谷氨酰

胺对氮的合成与分解具有重要作用^[15]。研究表明氨基酸可由饲料经肠道摄入^[20]，不同地区羊肉中氨基酸含量的差异最显著 ($P<0.05$)，可能是因为不同地区羊食用的饲料或牧草的氨基酸含量有较大差异。

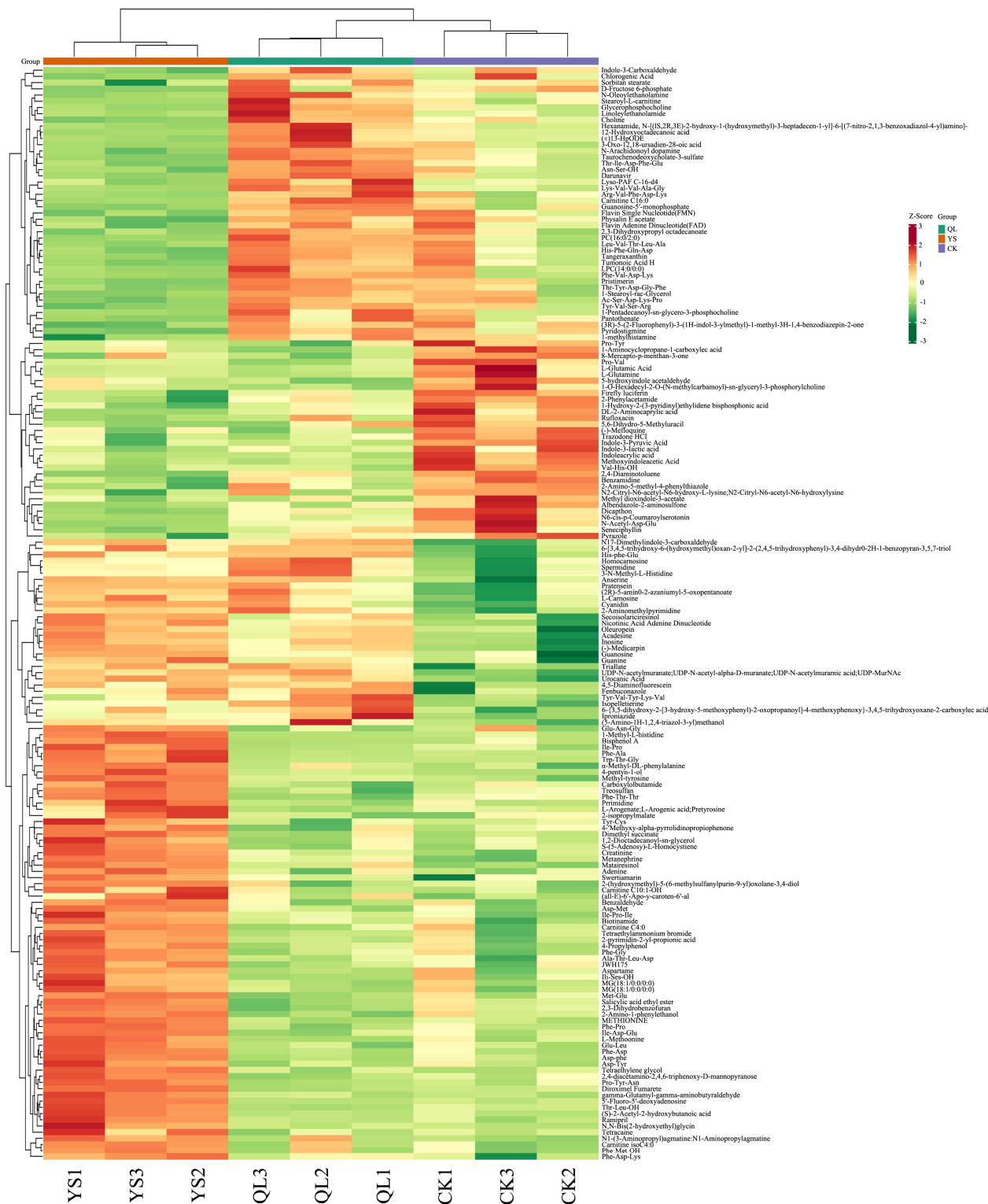


图 8 青海省内 3 地区差异代谢物层次聚类热图

Fig.8 Hierarchical clustering heat map of different metabolites of three regions in Qinghai province

2.4.2 青海省内外与省外地区羊肉的差异代谢物分析

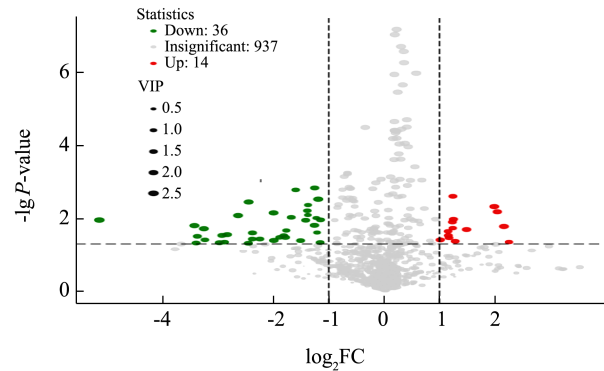


图9 青海省内外与省外样品火山图

Fig.9 Volcanic map inside and outside Qinghai province

从青海省内（茶卡、玉树、祁连）和省外（四川、内蒙古、宁夏）羊肉中检测出 987 种差异代谢物，将 VIP 值、*P* 值和差异倍数（Fold Change, FC）结合，以 $VIP \geq 1$ 、 $P < 0.05$ 、 $FC \geq 2$ 或 $FC \leq 0.5$ 为标准筛选差异显著的代谢物，共得到 50 种差异显著代谢物，部分结果见表 3。将差异代谢物以火山图的形式进行展示，每个点代表一种代谢物，绿色表示下调，红色表

示上调，如图 9 所示有 14 种代谢物上调，36 种代谢物下调。从图 10 的聚类热图可以看出，省内外羊肉有较大差异，数量最多的前 5 类代谢物分别为氨基酸及其代谢物、甘油磷脂、脂肪酸、醇和胺类、苯和取代衍生物。脂肪酸在人体细胞膜结构功能、物质储存和细胞信号传导中起重要作用^[11]，它能够影响肉的风味，与肉品质优劣有巨大相关性，也是评价肌肉营养价值的重要因素^[21]。甘油磷脂是细胞膜的重要组分，参与信号分子的识别与传导过程^[22]，该类物质在青海省外羊肉中均下调。除 N-乙基甘氨酸、尼泊隆二甲基赖氨酸盐酸盐和谷丙二肽外，其余氨基酸及其代谢物在省外羊肉中均下调，同时，青海省外 3 地区羊肉的代谢物中，丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、谷氨酸和 N-乙基甘氨酸等氨基酸在四川藏羊肉中的含量高于内蒙古苏尼特羊和宁夏滩羊，有研究表明氨基酸在生物体内的累计有利于机体抵抗低温和氧化胁迫等不利条件^[23]，因此生活于高原地区的藏羊肉较苏尼特羊和滩羊等生活于低海拔地区的羊肉富集了更多氨基酸以抵抗恶劣气候的影响。

表 3 青海省内外与省外样品的显著差异代谢物

Table 3 Significantly different metabolites inside and outside Qinghai province

代谢物名称	类别	VIP 值	<i>P</i> 值	FC 值	变化
All-Trans-13,14-Dihydroretinol	辅酶和维生素	2.38	0.011 128	0.028 278	下调
Val-His	氨基酸及其代谢物	2.20	0.003 001	0.438 222	下调
1-O-Palmitoyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine	甘油磷脂	2.14	0.015 761	0.092 993	下调
Ile-Glu-His-Lys	氨基酸及其代谢物	2.12	0.008 366	0.160 670	下调
Glu-Ala	氨基酸及其代谢物	2.12	0.016 610	4.479 837	上调
LPC(18:3/0:0)	甘油磷脂	2.09	0.019 154	0.104 710	下调
Anacardic acid	苯和取代衍生物	2.08	0.003 581	0.183 373	下调
20-HETE	脂肪酸	2.03	0.007 086	0.250 494	下调
N(6),N(6)-Dimethyl-L-lysine	氨基酸及其代谢物	1.99	0.004 777	3.970 077	上调
11,12-DHET	脂肪酸	1.89	0.040 056	0.251 227	下调
Lys-His-Ala-Val-Ser	氨基酸及其代谢物	1.89	0.027 793	0.140 225	下调
Isopentenyl pyrophosphate	醛、酮、酯	1.86	0.020 183	2.806 655	上调
Indole-3-lactic acid	杂环化合物	1.83	0.015 478	0.417 902	下调
Naringenin	类黄酮	1.82	0.006 625	4.126 843	上调
Leu-Gly-Asp-Val-Ile	氨基酸及其代谢物	1.81	0.029 189	0.131 332	下调
1-Palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine	甘油磷脂	1.80	0.046 187	0.127 213	下调
4-Quinazolinamine	杂环化合物	1.74	0.033 090	0.290 811	下调
Fulvestrant	苯和取代衍生物	1.74	0.001 482	0.419 065	下调
Guanine	核苷酸及其代谢物	1.74	0.038 711	2.019 068	上调
Pregnanetriol	醇和胺类	1.70	0.024 920	0.192 319	下调

注：由于代谢物数量过多，仅选择 VIP 值排在 20 个的代谢物进行展示。

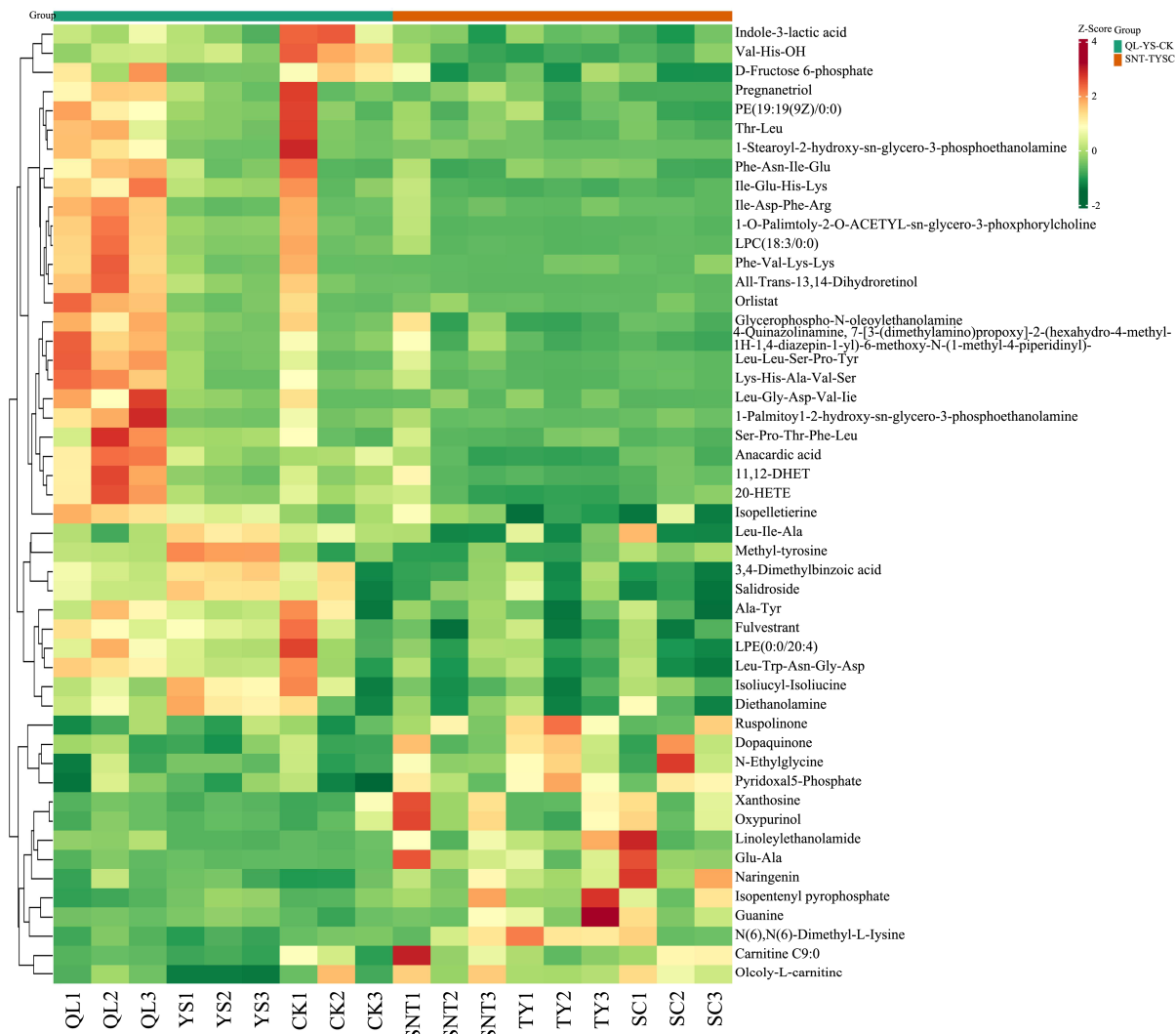


图 10 青海省内与省外样品层次聚类热图

Fig.10 Hierarchical clustering heat map inside and outside Qinghai province

青海省内羊肉中高表达的缬氨酸、异亮氨酸等可作为生物体能源，提高蛋白质合成率，增加肉中蛋白质含量^[24]。同时，青海省内羊肉中包含更多儿童生长发育所必需的组氨酸^[16]。氨基酸除上述作用外，还具有鲜、甜、苦、酸等滋味，丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸和赖氨酸等甜味氨基酸及具有鲜味的丙氨酸在省外羊肉中均下调表达，这可能会使青海省羊肉较省外羊肉更加鲜甜^[25]。此外，青海省外苏尼特羊肉和宁夏滩羊肉中的部分醛、酮、酯类物质较 4 个地区的藏羊肉表现出上调趋势，它们作为风味前体物质和香味物质对羊肉的风味有重要影响^[26]，可能造成不同品种的羊肉具有其独特的风味，王芳^[7]对藏羊、滩羊、湖羊和乌珠穆沁羊品质的比较结果也验证了这一点。

2.5 差异代谢物通路注释与富集分析

2.5.1 青海省内 3 个地区羊肉的代谢通路注释与富集分析

生物的生长过程是一个复杂的代谢过程，由多种反应共同决定^[27]，因此需要继续对代谢通路进行分析。为探明差异代谢物的代谢途径，利用用于代谢通路研究的 KEGG 数据库^[28]共筛选到代谢通路 88 条，其中差异显著 ($P<0.05$) 的代谢通路共有 6 条，KEGG 通路注释结果见表 4。

KEGG 富集图中的每个点代表一条通路，点越大，表明富集到该通路的差异代谢物越多；颜色越红说明富集越显著，从图 11 和表 4 可以看出差异显著的前 3 条代谢通路为组氨酸代谢、新陈代谢通路、D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢通路；富集差异代谢物最多的前 3 条代谢通路为新陈代谢通路、辅因子的生物合成、氨基酸的生物合成通路，以上 5 条通路是大部分差异代谢物会经过的通路。3-甲基-L-组氨酸、1-甲基-L-组氨酸、L-谷氨酸、L-鹅肌肽、L-肌肽、尿刊酸和 1-甲基组胺二盐酸盐等参与组氨酸代谢，组氨酸可以减轻氧化应激并且可以通过抑制细胞促炎因子的表达抑制炎

症^[29], 是肉类的内源抗氧化剂, L-谷氨酸也可对抗氧化应激, 是活性氧清除剂^[15]。除泛酸外, 参与辅因子的生物合成的代谢物均为氨基酸、核苷酸及其代谢物, 辅因子作为一类可与蛋白质结合使其发挥正常催化功能所必需的化合物, 它的生成对体内代谢反应具有重要作用^[30]。富集差异代谢物最多的通路为新陈代谢通路, 该通路上富集的差异代谢物包含了 3-甲基-L-组氨

酸、L-谷氨酸、D-谷氨酰胺、L-鹅肌肽、L-肌肽、尿刊酸、1-甲基组胺二盐酸盐、1-甲基-L-组氨酸、亚精胺和肌酸酐等富集在其他 5 条差异显著 ($P<0.05$) 代谢通路上的全部代谢物。其中, 以上 6 条差异显著 ($P<0.05$) 的代谢通路中, 除近端小管碳酸氢盐再生通路外, 其余 5 条通路均隶属于 KEGG 通路中的新陈代谢模块, 与羊肌肉的代谢密切相关。

表 4 青海省内 3 地区的 KEGG 通路注释结果

Table 4 KEGG pathway annotation results in three regions of Qinghai province

代谢通路 ID	代谢通路名称	差异代谢物数量	P 值
ko00340	Histidine metabolism	7	0.001 267
ko01100	Metabolic pathways	39	0.005 628
ko00471	D-Glutamine and D-glutamate metabolism	3	0.010 485
ko00330	Arginine and proline metabolism	5	0.045 886
ko04964	Proximal tubule bicarbonate reclamation	2	0.048 766
ko00290	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	2	0.048 766

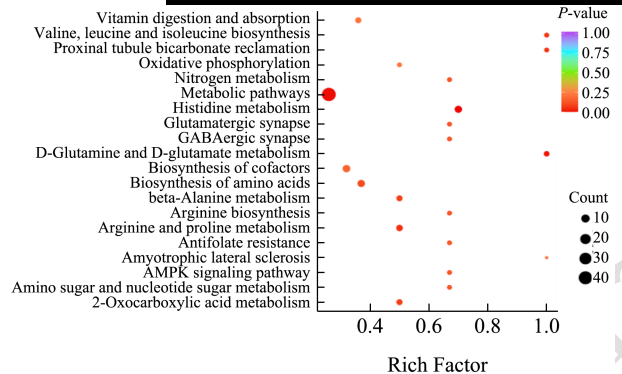


图 11 青海省内 3 地区差异代谢物 KEGG 富集通路图

Fig.11 KEGG enrichment pathway diagram of three regions in Qinghai province

2.5.2 青海省内与省外地区羊肉的代谢通路注释与富集分析

共筛选到代谢通路 24 条, 其中差异显著的代谢通路只有新陈代谢通路, 有 10 个差异代谢物参与该通路。从图 12 可以看出, 虽然嘌呤代谢通路显著性较低, 但富集的代谢物较多; 酪氨酸代谢、铁死亡和花生四烯酸代谢通路显著性较高且富集的代谢物多, 说明这 5 条通路代表性高。黄嘌呤核苷和鸟嘌呤参与嘌呤代谢, 对能量供应和代谢调节至关重要^[31]。铁死亡是铁依赖性的以脂质过氧化为特征的非凋亡性细胞死亡^[32], 异戊烯焦磷酸和 1-硬脂酰基-2-羟基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺富集于该通路, 对机体氧化应激具有重要作用。花生四烯酸通过刺激和调节离子通道、多种受体和酶促进大脑和肌肉的正常运转^[33], 其代谢通路包括环氧合酶、脂氧合酶和细胞色素 P-450 这 3 种途径^[34], 11,12-DHET 和 20-HETE 两种脂肪酸参与该代谢通路, 与羊机体的炎症发生和糖脂代谢^[35]密切相关。

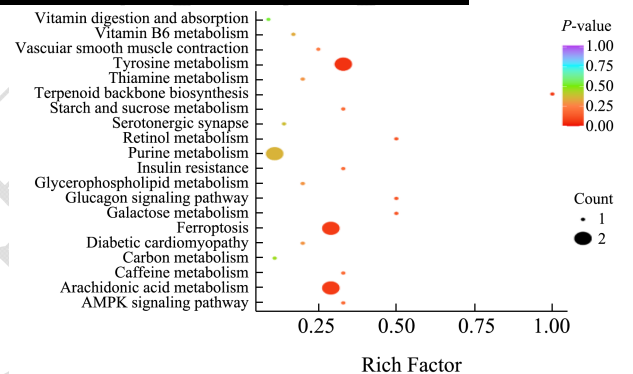


图 12 青海省内与省外样品差异代谢物 KEGG 富集通路图

Fig.12 KEGG enrichment pathway diagram inside and outside Qinghai province

3 结论

采用非靶向代谢组学对青海茶卡藏羊、青海玉树藏羊、青海祁连藏羊、四川藏羊、内蒙古苏尼特羊和宁夏滩羊肉中的代谢物差异进行研究。通过多元统计分析法中的 OPLS-DA 分析, 不仅能够区分青海 3 个地区羊肉, 也能将青海藏羊肉与外地羊肉区分开。

以 $VIP \geq 1$ 和 $P < 0.05$ 为标准, 共从青海茶卡、青海祁连和青海玉树的羊肉中筛选出 176 种差异显著的代谢物, 主要包括氨基酸及其代谢物、苯和取代衍生物、有机酸及其衍生物、杂环化合物、核苷酸及其代谢物等。其中, 玉树和茶卡羊肉中氨基酸及其代谢物较多, 祁连羊肉中脂肪酸较多。差异代谢物主要参与组氨酸代谢通路、新陈代谢通路、D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢通路、辅因子的生物合成通路、氨基酸的生物合成通路。

以 $VIP \geq 1$ 、 $P < 0.05$ 、 $FC \geq 2$ 或 $FC \leq 0.5$ 为标准,

共从青海省3个地区和省外(四川、内蒙古、宁夏)3个地区羊肉中筛选出50种差异显著的代谢物,主要包括氨基酸及其代谢物、甘油磷脂、脂肪酸、醇和胺类、苯和取代衍生物等。与省内羊肉相比,省外羊肉中36种代谢物表现出下调趋势,主要为甘油磷脂类和氨基酸及其代谢物;14种代谢物表现出上调趋势,主要为部分脂肪酸和醛、酮、酯类物质。经通路分析,差异代谢物主要参与新陈代谢通路、嘌呤代谢通路、酪氨酸代谢通路、铁死亡通路和花生四烯酸代谢通路。

该研究对羊肉整体代谢物进行测定,为羊肉品质评价提供了一定参考;同时,从不同地区羊肉中筛选出的差异代谢物也为不同地区特色羊肉的鉴定提供了方向。

参考文献

- [1] 刘志红,赵存,谢遇春,等.基于气相色谱-离子迁移谱技术鉴定内蒙古地区3个品种羊肉挥发性代谢物[J].肉类研究,2021,35(11):24-30.
- [2] 刘瑶.我国羊肉产业现状及未来发展趋势[J].中国饲料,2019,637(17):112-117.
- [3] 周力,任昊,马博妍,等.日粮精粗比对青海牧区藏羊母羔肺脏抗氧化功能及形态发育的影响[J].饲料研究,2021,44(18):7-10.
- [4] 侯艳茹,苏琳,侯普馨,等.饲养方式对苏尼特羊肌纤维组成和肉品质的影响及其调控机理[J].食品科学,2021,42(7):83-89.
- [5] Gao X G, Wang Z Y, Miao J, et al. Influence of different production strategies on the stability of color, oxygen consumption and metmyoglobin reducing activity of meat from Ningxia Tan sheep [J]. Meat Science, 2014, 96(2): 769-774.
- [6] 孟新涛,乔雪,潘俨,等.新疆不同产区羊肉特征风味成分离子迁移色谱指纹谱的构建[J].食品科学,2020,41(16):218-226.
- [7] 王芳.不同品种、月龄和部位绵羊肉品质的比较与分析[D].北京:中国农业科学院,2021.
- [8] Guo P F, Furnary T, Vasiliou V, et al. Non-targeted metabolomics and associations with per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) exposure in humans: A scoping review [J]. Environment International, 2022, 162: 107159.
- [9] Wang X R, Fang C K, He J H, et al. Comparison of the meat metabolite composition of Linwu and Pekin ducks using 600 MHz ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. Poultry Science, 2017, 96(1): 192-199.
- [10] Yu Q, Pan H J, Shao H T, et al. UPLC/MS-based untargeted metabolomics reveals the changes in muscle metabolism of electron beam irradiated *Solenocera melantho* during refrigerated storage [J]. Food Chemistry, 2022, 367: 130713.
- [11] 任传英,卢淑雯,洪滨,等.糙米和大米非靶向代谢组学分析[J].食品科学,2022,43(20):183-190.
- [12] 徐春晖,王远兴.基于UPLC-QTOF-MS结合非靶向代谢组学鉴别3种江西名茶[J].食品科学,2022,43(2):316-323.
- [13] 赵萍,刘俊霞,兰阿峰,等.基于UHPLC-MS非靶向代谢组学分析大鲵肉冷藏过程中代谢物的变化[J].食品科学,2022,43(22):267-280.
- [14] 刘文媛,李春义,巴恒星,等.鹿茸4个区段非靶向代谢组学研究[J].吉林农业大学学报,2020,42(4):454-466.
- [15] 曾令杰,丰丕雪,黄锦翔,等.基于非靶向代谢组学分析酿酒酵母甲酸胁迫的响应和耐受性机制[J].食品科学,2022,43(4):95-104.
- [16] 徐焕,郝力壮,刘书杰,等.不同地区淘汰母牦牛肉营养品质的比较分析[J].食品工业科技,2020,41(9):232-237.
- [17] 周飘.基于LC-MS/MS技术的核苷及核苷酸类物质分析方法的建立及应用[D].郑州:郑州大学,2019.
- [18] 胡明珍,刘慧燕,潘琳,等.基于非靶向代谢组学分析副干酪乳杆菌发酵枸杞汁各阶段代谢差异[J].食品科学,2022,43(8):142-149.
- [19] 刘晗璐,张九凯,韩建勋,等.基于UPLC-QTOF-MS代谢组学技术的NFC和FC橙汁差异成分比较[J].食品科学,2021,42(6):229-237.
- [20] 朱文俊,杨万里,韦聪聪,等.番鸭产蛋前期和产蛋期肝脏组织非靶向代谢组学比较分析[J].中国农业大学学报,2020,25(12):76-85.
- [21] 张剑,曹婧,耿爱莲,等.基于气相色谱-质谱技术的鸡胸肉代谢组学研究[J].中国家禽,2021,43(2):7-14.
- [22] 陈翔,田月月,张丽霞.基于亲水相互作用液相色谱-三重四级杆质谱法研究白茶萎凋过程中代谢物的变化[J].茶叶科学,2020,40(2):238-249.
- [23] Grant C M, Maciver F H, Dawes I W. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Current Genetics, 1996, 29(6): 511-515.
- [24] 曹凤,任红,黄桂东,等.对数生长期酿酒酵母胞内代谢情况分析[J].食品与发酵工业,2022,48(22):68-75.
- [25] 邢路阳.不同地区乌拉特山羊羊肉品质差异研究与胴体分级[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2020.
- [26] 孔园园,张雪莹,李发弟,等.羊肉主要风味前体物质与羊肉风味的关系及影响因素的研究进展[J].农业生物技术学报,2021,29(8):1612-1621.
- [27] 张舒,王长远,冯玉超,等.气相色谱-质谱联用代谢组学技术分析不同产地稻米代谢物[J].食品科学,2021,42(8):206-213.

- [28] 冯熙瑞,马岩石,武晓玲,等.非靶向代谢组学分析阿拉伯半乳糖对嗜黏蛋白阿克曼菌代谢物的影响[J].食品工业科技,2022,43(7):21-34.
- [29] Feng R N, Niu Y C, Sun X W, et al. Histidine supplementation improves insulin resistance through suppressed inflammation in obese women with the metabolic syndrome: a randomised controlled trial [J]. Diabetologia, 2013, 56(5): 985-994.
- [30] 吴井艳.辅因子调控红曲色素合成及机制初探[D].长沙:中南林业科技大学,2021.
- [31] 李添.基于 CUMS 模型大鼠大脑皮层嘌呤代谢通路的柴胡-白芍抗抑郁作用配伍机制研究[D].太原:山西大学,2021.
- [32] 刘静,刘文天.铁死亡在消化系统肿瘤中的研究进展[J].临床与实验病理学杂志,2022,38(3):331-333.
- [33] Tallima H. Clarification of arachidonic acid metabolic pathway intricacies [J]. ACS Omega, 2021, 6(24): 15559-15563.
- [34] 蔡亚玮,刘建宏,马宁.花生四烯酸靶向代谢组学在炎症中的研究现状[J].中国临床药理学杂志,2021,37(19):2721-2723,2728.
- [35] 李沙,苏文,张晓燕,等.花生四烯酸代谢与肝脏糖脂代谢稳态调控[J].生理学报,2021,73(4):657-664.