

吴志蕾, 何紫薇, 胡双, 等. 基于 GC-MS 技术分析日本血吸虫寄生对钉螺代谢产物的影响 [J]. 福建农业学报, 2020, 35 (4): 372-378.
WU Z L, HE Z W, HU S, et al. GC-MS Analysis on Metabolites of *Oncomelania hupensis* Infested by *Schistosoma japonicum* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 35 (4): 372-378.

基于 GC-MS 技术分析日本血吸虫寄生对钉螺代谢产物的影响

吴志蕾^{1,2}, 何紫薇², 胡双², 石莲琴², 杨建发², 邹丰才², 黄翠琴^{3*}

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225000; 2. 云南农业大学动物医学院, 云南 昆明 650201; 3. 龙岩学院生命科学学院/福建省家畜传染病防治与生物技术重点实验室, 福建 龙岩 360012)

摘要:【目的】了解日本血吸虫寄生对钉螺代谢物的影响, 为钉螺的生物防控提供参考。【方法】通过镜检确认钉螺是否有血吸虫寄生, 无尾蚴寄生的为阴性钉螺, 有尾蚴寄生的为阳性钉螺。应用气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 检测阳性和阴性钉螺的代谢产物和含量, 根据正交-偏最小二乘法筛选和分析其差异代谢物。【结果】获得 18 种差异显著的代谢产物, 其中苯甲醇、蔗糖、邻苯二甲酸二辛酯和 3-羟基丁酸等在阴性钉螺中的量比阳性钉螺高 2.3~765 倍, 并分析上述代谢产物变化对能量代谢、蛋白质合成与分解、信号传导和基因表达等的影响。【结论】获得了日本血吸虫阳性和阴性钉螺代谢物的差异数据, 并证实日本血吸虫的寄生对钉螺宿主的营养代谢、生长发育和繁殖能力等造成不利影响, 为揭示日本血吸虫与钉螺互作机制和的生物灭螺提供理论基础。

关键词: 钉螺; 日本血吸虫; GC-MS 检测; 代谢组学

中图分类号: S 855.9

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2020) 04-0372-07

GC-MS Analysis on Metabolites of *Oncomelania hupensis* Infested by *Schistosoma japonicum*

WU Zhi-lei^{1,2}, HE Zi-wei², HU Shuang², SHI Lian-qin², YANG Jian-fa², ZOU Feng-cai², HUANG Cui-qin^{3*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225000, China; 2. College of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China; 3. College of Life Sciences, Longyan University/Fujian Key Laboratory of Livestock Infectious Disease Control and Biotechnology, Longyan, Fujian 360012, China)

Abstract: 【Objective】Metabolites of *Oncomelania hupensis* infested by parasite *Schistosoma japonicum* were analyzed to search for a biological control for the disease on the snails. 【Method】Under microscopic examination, snails were determined whether or not being infested by the parasite. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to analyze the metabolites of the positive and negative snails for comparison. An orthogonal-partial least squares method was applied to differentiate the healthy and diseased subjects. 【Result】Eighteen substances were found to present in the two categories of specimens with significant differences. Among them, benzyl alcohol, sucrose, dioctyl phthalate, and 3-hydroxybutyric acid showed 2.3 to 765 times higher in quantity on the healthy than the infested snails. Those identified metabolites were known to be associated with energy metabolism, protein synthesis and decomposition, signal transduction, and/or gene expression. 【Conclusion】The chemical disparities on the metabolites between the healthy and diseased *O. hupensis* suggested that the *S. japonicum* parasitism seriously affected the nutritional metabolism, growth development, and reproductive capacity of the snails. The finding would aid further study on the interaction mechanism between the parasite and its host for the development of an effective biological control of the disease.

Key words: *Oncomelania hupensis*; *Schistosoma japonicum*; GC-MS; metabolomics

收稿日期: 2019-08-01 初稿; 2019-12-18 修改稿

作者简介: 吴志蕾 (1977-), 女, 研究方向: 预防兽医学 (E-mail: 59597968@qq.com); 何紫薇 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 人兽共患寄生虫病 (E-mail: 973441900@qq.com)

* 通信作者: 黄翠琴 (1978-), 女, 教授, 研究方向: 兽医寄生虫学 (E-mail: cuiqinh@126.com)

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFD0501303); 福建省自然科学基金项目 (2016J0711); 中央引导地方科技发展专项 (2018L3011)

0 引言

【研究意义】日本血吸虫病是由日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 引起的一种严重危害人类和动物健康、影响社会经济发展的寄生虫病。湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 是日本血吸虫的唯一中间宿主, 消灭钉螺是控制血吸虫病的重要措施。因此, 研究钉螺代谢物及其与日本血吸虫寄生的关系, 揭示日本血吸虫与钉螺互作机制, 可为生物灭螺提供理论基础。【前人研究进展】代谢组学主要研究平台包括气相色谱质谱联用 (GC/MS)、液相色谱质谱联用 (LC/MS)、毛细管电泳质谱联用 (CE/MS) 和核磁共振等^[1]。目前代谢组学技术已广泛应用于疾病诊断、药物开发、营养代谢等方面, 在寄生虫领域得以应用^[2]。陈璐^[3]运用核磁共振技术与多变量数据分析相结合的代谢组学方法, 分析了减毒鼠伤寒沙门氏菌对日本血吸虫感染小鼠的代谢组的影响, 为进一步了解宿主-多病原体相互作用提供了数据。Wang 等^[4]应用核磁共振 (NMR) 技术分析了日本血吸虫单独感染引发的宿主代谢上的动态变化, 结果表明宿主尿样中马尿酸、乙酸和三羧酸循环 (TCA) 中间产物下降, 丙酮酸和肠道菌群相关代谢物含量下降。Wu 等^[5]进一步研究了日本血吸虫感染小鼠整个过程的体液和肝脏组织的代谢动态变化, 结果说明小鼠感染后出现脂代谢紊乱、抑制 TCA、促进糖酵解和肠道菌群失调等, 还在尿样中发现与血吸虫病严重程度相关的特征性代谢产物 3-脲基丙酸。越来越多的学者把代谢组学应用到弓形虫、鸡球虫和微孢子虫等寄生虫研究方向, 为寄生虫病的早期预警和诊断提供基础, 并为寄生虫病的防治提供重要依据。【本研究切入点】日本血吸虫是公共卫生研究的重要内容, 过去一直从血防的角度来预防该病的发生与传播, 但仍未能根除该病。对钉螺的研究, 始终停留在日本血吸虫中间宿主的角度来探索。目前杀灭钉螺的措施主要有药物灭螺、生态灭螺和生物灭螺。化学药物杀螺效果较为理想, 但药物对人和动物及环境都存在健康危害。在毛蚴感染钉螺后, 钉螺会产生适应毛蚴及其本身生存的代谢产物, 若用其自身的抑制剂研制新型灭螺药, 有可能切断日本血吸虫在钉螺体内的发育, 能更有针对性的消灭阳性钉螺, 保持生态平衡。【拟解决的关键问题】本研究采用 GC-MS 技术分别对有血吸虫尾蚴寄生的钉螺和没有尾蚴寄生的钉螺进行代谢组学分析, 筛选两者间的差异代谢产物, 探索日本血吸虫入侵钉螺后的相互作用和代谢

通路, 为后续钉螺的生物控制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 样本分组

湖北钉螺样本由江苏省血吸虫病防治研究所馈赠, 均采集自野外山地、田地沟渠等适宜钉螺生存的自然环境。选择其中活性较强的钉螺进行镜检观察, 辨别阳性钉螺和阴性钉螺。分别收集阳性钉螺 Y 组和阴性钉螺 W 组, 每 5 只钉螺组织为一个样本, 每组设 6 个生物学重复, 随后送至上海百趣生物公司 (www.biotre.cn) 提取钉螺代谢物, 并进行 GC-TOF-MS 代谢组学检测分析。

1.2 主要仪器

GC 色谱仪 (Agilent 7890A, Agilent, USA), 质谱仪 (LECO Chroma TOF PEGASUS HT, LECO, USA), 研磨仪 (JXFSTPRP-24, 上海净信科技有限公司)。

1.3 主要试剂

L-2-氯苯丙氨酸, 购自上海恒柏生物科技有限公司; 硅烷化试剂 (BSTFA), 含 1% 三甲基氯硅烷 (TMCS, v/v), 购自 REGIS Technologies. Inc. USA; 代谢物提取液: 甲醇、乙腈、丙酮、水的体积比为 30 : 30 : 30 : 10。

1.4 样品处理

1.4.1 钉螺镜检 (1) 用灭菌 4% 生理盐水清洗钉螺 3 遍; (2) 把钉螺置于载玻片, 用另一片载玻片压破钉螺壳, 加一滴生理盐水镜检; (3) 在显微镜下观察是否有日本血吸虫胞蚴或尾蚴的存在。发现胞蚴或尾蚴的钉螺为阳性钉螺, 未发现的为阴性钉螺; (4) 每 5 只阳性钉螺、5 只阴性钉螺各为 1 份样品组, 阴阳性钉螺各提供 6 份样品组 (30 个钉螺), 置于冻存管中备用提取代谢物, 或在液氮中保存备用。

1.4.2 钉螺代谢物的萃取 取 50 mg 去壳钉螺全脏器组织样本于 2 mL 离心管中, 加入 0.4 mL 提取液 (甲醇、氯仿体积比为 3 : 1), 再加入 20 μ L L-2 氯苯丙氨酸, 漩涡混匀^[6]。在离心管中加入钢珠, 40 Hz 研磨仪处理 4 min, 冰浴条件下超声 5 min。超声结束立即将样本置于 4℃, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。随后取出 0.34 mL 上清于 2 mL 进样瓶 (甲烷硅基化的) 中。干燥后的代谢物加入 80 μ L 甲氧胺盐试剂, 混匀后放入烘箱中 80℃ 孵育 0.5 h^[7]。随后每个样品中加入 100 μ L BSTFA, 将混合物 70℃ 孵育 2 h。

1.4.3 代谢物上机检测 将已提取好的代谢物进行上机检测, 上机条件: Agilent 7890 气相色谱-飞行时间

质谱联用仪，配有 Agilent DB-5MS 毛细管柱（30 m×250 μm×0.25 μm），GC-TOF-MS 具体分析条件如下：进样量 1 μL，为不分流模式；载气为氦气；前进口吹扫流速是 3 mL·min⁻¹；柱流速是 1 mL·min⁻¹；柱温在 50℃ 保持 1 min，再以 10℃·min⁻¹ 的速率上升至 290℃，保持 7 min；前进口温度 280℃；传输线温度 270℃；离子源温度 220℃；电离电压 -70 eV；扫描方式为 30–600 m/z，扫描速率 20 spectra/sec；溶剂延迟 460 s^[8]。

1.5 代谢物检测方法

采用 LECO 公司的 Chroma TOF2.3X 软件和 LECO-FiehnRtx5 数据库对上机得到的数据进行原始峰定性和定量，再将所得的 GC-MS 原始数据进行噪音数据过滤，使用内标归一法对数据进行标准化处理^[9]。过滤得到的峰面积导入 SIMCA 软件（V14，Umetrics AB，Umea，Sweden），对数据进行多元变量模式识别分析。采用主成分分析（PCA）、正交矫正偏最小二乘法（OPLS-DA）对数据进行总览和判别分析。最后根据变量重要投影值 VIP（Variable Importance in the Projection）> 1 和 *t* 检验 *P*<0.05 的标准筛选代谢产物^[10]。

1.6 代谢组学数据分析

使用 LECO/Fiehn 代谢组学文库鉴定化合物，对原始数据进行预处理，通过软件进行原始数据的提取和过滤，目的是除去噪音数据。之后通过 SIMCA 软件，对归一化后的数据进行多元变量模式识别分析^[11]。本试验中用主成分分析法对数据进行自动建模分析，用正交矫正偏最小二乘法判别分析方法最大化地凸显模型内部与预测主成分（Predictive component）相关的差异，最后结合 *t* 检验的 *P* 值来筛选差异性表达代谢物，分析代谢特征^[11]。

2 结果与分析

2.1 系统稳定性检测

由内标（L-2-氯苯丙氨酸）保留时间（Retention time，min）来衡量，从表 1 中数据可以看到，其标准差为：0.001 771，说明系统十分稳定。

2.2 代谢组学谱图分析

对 2 组共 12 个样本的钉螺提取的代谢物进行 GC-MS 检测后，获得所有样本的总离子流色谱图（Total ion chromatogram，TIC）（图 1），横坐标表示出峰时间，纵坐标表示峰高，峰越高，表明物质含量越多，强度越大。每个峰对应一个或几个组分，图上有大量的峰，表示检测出了大量不同物质。得到的总离子流色谱图表明钉螺组织样本品质

表 1 内标（L-2-氯苯丙氨酸）保留时间
Table 1 Retention time of internal standard (L-2-chlorophenylalanine)

W 组样本 W Group sample	保留时间 Retention time/min	Y 组样本 Y Group sample	保留时间 Retention time/min
W-1	18.633	Y-1	18.632
W-2	18.629	Y-2	18.635
W-3	18.632	Y-3	18.632
W-4	18.630	Y-4	18.633
W-5	18.631	Y-5	18.633
W-6	18.630	Y-6	18.634
平均值 Average	18.632	标准差 Standard deviation	1.771×10 ⁻³

良好，峰面积可进行下一步分析。

2.3 差异代谢物筛选

采用 OPLS-DA 模型第一主成分的变量重要投影值 VIP>1 标准，并结合 *t*-test 进行统计检验，结果以 *P*<0.05 判定为两组有显著差异，具有统计学意义，由此确定差异代谢产物。多元变量统计模式识别后，过滤掉不相关的正交信号，利用上述方法筛选差异性表达代谢物^[12–13]。

表 2 中的相似度表示与 LECO-Fiehn Rtx5 数据库中的匹配度，相似度>700 则鉴定为可信代谢物，相似度<200 为不确定代谢物，相似度在 200~700 为假定注释。通过 VIP 值和 *t* 检验对代谢物进行筛选，及其在载荷图中对应编号，在 508 个峰中筛选得到 18 种差异代谢产物，按差异从大到小排序为：苯甲醇、蔗糖、邻苯二甲酸二辛酯、5-氨基戊酸、3-羟基丁酸、叶绿醇、胞嘧啶、酵母氨酸、鸟嘌呤、2-单棕榈酸甘油酯、4-乙酰氨基丁酸、花生四烯酸、D-阿拉伯糖醇、2,4-二氨基丁酸、4-氨基丁酸、脯氨酸、缬氨酸和瓜氨酸（表 2）。

从表 2 可以看出，在 508 个钉螺代谢产物中共筛选到 18 种差异代谢产物，其在阳性钉螺中的含量均远低于阴性钉螺，阳性钉螺中没有发现明显升高的物质，结果表明日本血吸虫寄生对钉螺的生理代谢产生了严重影响，其中对钉螺代谢功能影响较明显的有以下 11 种代谢物。

（1）苯甲醇：阴、阳性钉螺之间差异最大的代谢产物是苯甲醇，阴性组中的含量是阳性组的 765 倍。苯甲醇可以影响生物降解以及葡萄糖的降解，其含量变化会影响糖代谢过程^[14]。

（2）D-阿拉伯糖醇：D-阿拉伯糖醇的减少也会导致机体无法正常抑制蔗糖的代谢与吸收，抑制血

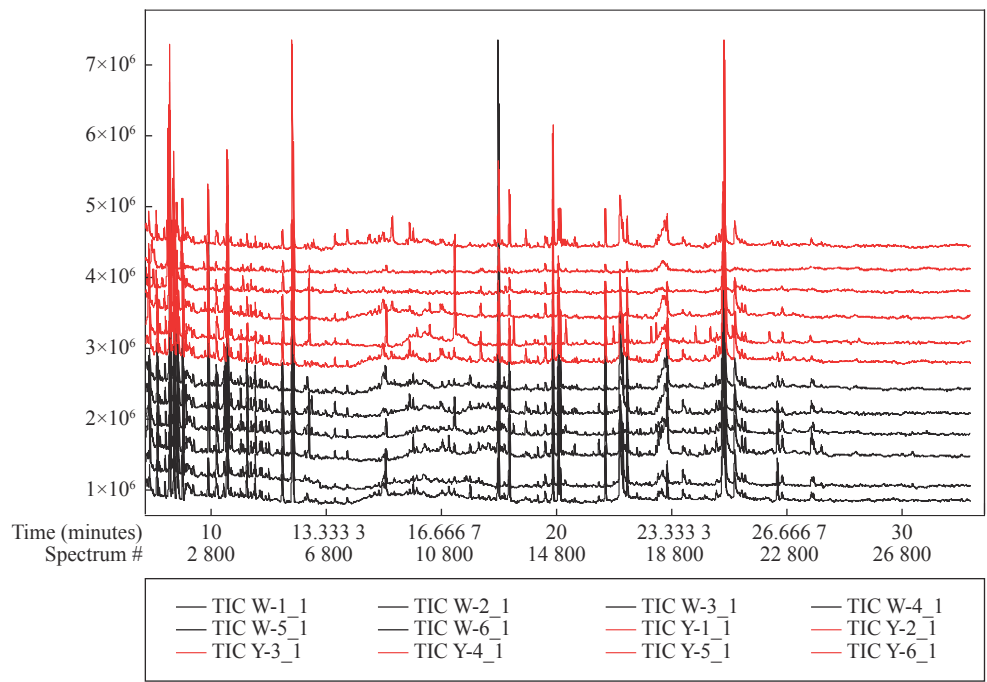


图 1 全部 12 组钉螺样本的 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 GC-MS total ion chromatograms of 12 *O. hupensis* specimens

表 2 阳性钉螺与阴性钉螺差异代谢物筛选结果

Table 2 Screened metabolites on positive and negative snails

代谢物 Metabolite	相关功能 Related function	相似度 Similarity	各组归一化峰面积平均值 Mean normalized peak area of each group		VIP值 Variable importance in the Projection	P值
			阳性钉螺组 Positive <i>Oncomelania</i> group	阴性钉螺组 Negative <i>Oncomelania</i> group		
苯甲醇 Benzyl alcohol	糖代谢	397.0	0.000 1	0.075 6	1.784 1	0.042 9
蔗糖 Sucrose	调节酶活性、能量载体	805.5	0.028 9	0.728 2	2.149 1	0.038 5
邻苯二甲酸二辛酯 Dioctyl phthalate	内分泌、生殖、心脏节律	575.2	0.000 1	0.002 5	1.694 8	0.041 0
5-氨基戊酸 5-Aminovaleric acid	抑制神经递质	555.0	0.011 5	0.171 5	2.244 6	0.004 9
3-羟基丁酸 3-Hydroxybutyric	能量代谢	769.9	0.011 0	0.079 8	1.591 2	0.012 9
叶绿醇 Phytol	对肝脏糖代谢的调节作用	332.0	0.002 1	0.014 2	1.817 1	0.008 9
胞嘧啶 Cytosin	遗传、脂类合成代谢	383.9	0.003 8	0.022 4	1.862 0	0.033 5
酵母氨酸 Saccharopine	赖氨酸代谢途径中间产物	229.2	0.033 8	0.145 3	1.718 5	0.032 6
鸟嘌呤 Guanine	遗传	737.1	0.010 7	0.044 5	1.723 5	0.009 0
2-单棕榈酸甘油酯 2-Monopalmitin	脂肪代谢	678.2	0.020 5	0.072 6	1.585 1	0.035 9
4-乙酰氨基丁酸 4-Acetamidobutyric acid	有毒化学物质	442.8	0.064 1	0.203 0	1.442 7	0.013 4
花生四烯酸 Arachidonic acid	抑制免疫	800.5	0.021 6	0.062 7	1.521 9	0.034 4
D-阿拉伯糖醇 D-arabitol	糖代谢	770.1	0.027 5	0.061 7	1.696 1	0.029 5
2,4-二氨基丁酸 2,4-Diaminobutyric acid	细胞稳定性	438.5	0.039 5	0.110 6	1.887 2	0.022 1
4-氨基丁酸 4-Aminobutyric acid	抑制神经递质	506.5	0.086 6	0.236 2	1.934 8	0.040 7
脯氨酸 Proline	细胞稳定性	865.1	0.176 6	0.470 5	1.844 1	0.043 6
缬氨酸 Valine	蛋白质合成分解	909.3	0.286 5	0.644 9	1.531 5	0.042 0
瓜氨酸 Citruline	免疫、酸碱度、血糖、胆固醇	847.9	0.049 2	0.110 8	1.853 2	0.038 9

糖升高和脂肪生长^[15], 表明阳性钉螺糖代谢途径严重受阻, 导致机体能量负平衡。

(3) 邻苯二甲酸二辛酯: 有类似雌激素的作用, 是一种潜在的内分泌干扰物, 阳性组中含量降低会影响钉螺生殖功能。

(4) 4-氨基丁酸: 属于非蛋白氨基酸, 是一种抑制性神经递质, 可调节激素分泌^[16], 是三羧酸循环的重要组成部分, 其含量降低严重影响机体能量循环过程, 导致碳氮平衡失调^[17]。

(5) 3-羟基丁酸: 具有抑制细胞凋亡的作用^[18], 其含量的减少也会严重紊乱机体能量代谢^[19]。

(6) 胞嘧啶: 与脂类中某些磷脂的合成密切相关^[20], 其含量的异常可影响脂类的合成代谢。

(7) 酵母氨酸: 作为赖氨酸合成与分解代谢途径的中间物质, 酵母氨酸减少反映出赖氨酸含量的变化, 而赖氨酸是参与机体能量代谢和促进机体生长发育的重要氨基酸之一^[21], 表明血吸虫寄生严重阻碍了钉螺自身能量代谢功能, 掠夺其营养物质。

(8) 2-单棕榈酸甘油酯: 参与脂肪代谢, 其含量的改变影响了脂肪正常的合成与分解。

(9) 2,4-二氨基丁酸: 是一种神经酰胺受体, 可引起神经毒性, 也是细胞壁的化学结构, 其含量的降低会影响细胞的稳定性。

(10) 脯氨酸: 是机体重要能量来源, 其代谢可以及时提供充足能量, 并对细胞膜系统有着保护的功能; 脯氨酸又是胶原蛋白主要组成成分, 参与伤口愈合和组织修复, 与免疫机制相关联^[22], 阳性组脯氨酸含量降低导致细胞渗透压失去平衡, 肝细胞发生水泡样变性。

(11) 缬氨酸: 是合成一种免疫抗生素的重要中间体, 能够抑制蛋白质的分解^[23], 其含量的异常影响了蛋白质的合成分解。

3 讨论

3.1 日本血吸虫寄生对钉螺代谢影响分析

关于寄生虫与宿主的相互作用, 学者大都认同, 寄生虫的寄生会影响宿主营养物质的消化吸收与能量代谢。本试验结果也表明: 阳性钉螺中差异代谢物的含量比阴性钉螺低几倍甚至几百倍, 血吸虫寄生造成钉螺糖代谢、能量代谢等正常功能发生障碍, 损伤机体, 可导致阳性钉螺死亡。

18 种差异代谢物中, 大多数物质都与机体糖代谢相关, 其次是能量代谢。日本血吸虫寄生钉螺后, 这几种代谢物含量有所减少, 使钉螺无法正常维持机体免疫系统和酸碱度平衡, 无法帮助肝脏排

除氨毒, 平衡血糖和胆固醇。导致宿主能量和营养的缺乏, 糖代谢会异常加快使得钉螺体内糖贮存消化加速。另外, 蔗糖和 3-羟基丁酸与机体的能量代谢相关。蔗糖是重要的能量载体及来源, 有机物合成应用到大部分原料, 都需要由蔗糖裂解提供碳架, 是生长和发育过程中的重要化合物^[24], 其含量的异常影响了个体的生长和发育。3-羟基丁酸有着抑制细胞凋亡的作用^[25], 其含量的减少也会严重紊乱能量代谢的功能。由此可见, 日本血吸虫尾蚴寄生钉螺后抢夺其营养和能量, 严重紊乱钉螺的生理代谢功能。

3.2 从代谢学角度分析钉螺防治前景

日本血吸虫病不仅危害人畜健康, 还对社会经济造成严重危害。虽然过去一直从血防的角度来根治该病的发生与传播, 但仍未能去除该病。该寄生虫病地域性危害严重, 并且缺乏快速简易的诊断方法和有效的疫苗和药物, 好在控制和研究其唯一的中间宿主钉螺, 可以有效防控该病的发生与传播^[26]。然而, 传统的灭螺手段不仅给人类和其他生物带来致畸形、致癌等危害, 还会影响环境和生态平衡。所以, 需要研制新的灭螺药剂。本研究证实日本血吸虫的寄生对宿主钉螺的代谢、生长、生存和繁殖能力等造成不利影响, 能否成功寄生则表现为钉螺与日本血吸虫的相容性。日本血吸虫毛蚴入侵钉螺软体后, 经母胞蚴发育、子胞蚴发育、尾蚴成熟逸出几个阶段, 这个过程中钉螺会释放出类黏液性质的化学物质, 称为毛蚴松^[27], 其能否在钉螺体内生存取决于日本血吸虫侵袭能力与宿主相互作用的结果^[28]。钉螺宿主由于被寄生所导致的死亡或生殖能力下降等影响在遗传进化上也具有重要意义。

日本血吸虫在钉螺体内的寄生机制极其复杂, 深入了解寄生虫与宿主之间的寄生关系可对其控制、防治提供有力依据。虽然, 本次研究未能明确探索出可抑制血吸虫毛蚴在钉螺体内寄生的代谢物质, 但为日本血吸虫和钉螺的防控研究提供了新思路, 今后将从代谢组学角度开展更深一步研究。

参考文献:

- [1] 陈峥, 刘波, 史怀, 等. 基于代谢组学的芽胞杆菌属胞外代谢物异质性研究 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (12): 1347-1351.
CHEN Z, LIU B, SHI H, et al. Metabonomic heterogeneity of extracellular metabolites of three *Bacillus* genera [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27 (12): 1347-1351. (in Chinese)
- [2] 胡双, 吴志蕾, 邹丰才, 等. 代谢组学技术及其在寄生虫学中的应用 [J]. 养殖与饲料, 2016 (9): 10-12.
HU S, WU Z L, ZOU F C, et al. Metabolomics and its application in

- parasitology [J]. *Animals Breeding and Feed*, 2016 (9): 10–12. (in Chinese)
- [3] 陈璐. 减毒鼠伤寒沙门氏菌影响日本血吸虫感染小鼠代谢组的 NMR 研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2013.
- CHEN L. NMR studies of the effects of attenuated *salmonella typhimurium* on the *schistosoma japonicum* infected mice's metabolome [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2013. (in Chinese)
- [4] WANG Y L, UTZINGER J, XIAO S H, et al. System level metabolic effects of a *Schistosoma japonicum* infection in the Syrian hamster [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2006, 146 (1): 1–9.
- [5] WU J F, XU W X, MING Z P, et al. Metabolic changes reveal the development of schistosomiasis in mice [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2010, 4 (8): e807.
- [6] 任向楠, 梁琼麟. 基于质谱分析的代谢组学研究进展 [J]. *分析测试学报*, 2017, 36 (2): 161–169.
- REN X N, LIANG Q L. Advance in metabolomics based on mass spectrometry [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2017, 36 (2): 161–169. (in Chinese)
- [7] 赵丹萍, 张建军, 贺成, 等. 基于代谢组学技术的白芍养血柔肝作用机制研究 [J]. *中草药*, 2017, 48 (16): 3412–3418.
- ZHAO D P, ZHANG J J, HE C, et al. Study on mechanism of nourishing blood and smoothing liver effects of *Paeoniae Radix Alba* based on metabolomics information [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2017, 48 (16): 3412–3418. (in Chinese)
- [8] 于斐, 刘少壮, 仲明惟, 等. 基于 GC-TOF-MS 的结直肠癌代谢组学差异分析 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2016, 54 (7): 60–68.
- YU F, LIU S Z, ZHONG M W, et al. Metabolomics analysis of colorectal cancer based on GC-TOF-MS [J]. *Journal of Shandong University(Health Sciences)*, 2016, 54 (7): 60–68. (in Chinese)
- [9] 黄慧敏, 张小凤, 易根云, 等. 基于气相色谱-飞行时间质谱联用技术分析枯草芽孢杆菌对变异链球菌的抑制作用 [J]. *微生物学通报*, 2018, 45 (10): 2174–2182.
- HUANG H M, ZHANG X F, YI G Y, et al. Measurement of inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Streptococcus mutans* by gas-chromatography-time of flight-mass spectrometry [J]. *Microbiology China*, 2018, 45 (10): 2174–2182. (in Chinese)
- [10] 黄慧敏. 基于代谢组学技术分析枯草芽孢杆菌对致龋菌的生长抑制作用 [D]. 兰州: 兰州大学, 2018.
- HUANG H M. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on cariogenic bacteria by metabolomics approaches [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2018. (in Chinese)
- [11] 田列. 痰瘀互结证代谢综合征大鼠模型代谢组学研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2016.
- TIAN L. Study on metabolomics in rat model of metabolic syndrome with phlegm-stasis syndrome [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2016. (in Chinese)
- [12] KIND T, WOHLGEMUTH G, LEE D Y, et al. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81 (24): 10038–10048.
- [13] STOREY J D, TIBSHIRANI R. Statistical significance for genome wide studies [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100 (16): 9440–9445.
- [14] 高阳, 李影, 夏成, 等. 奶牛酮病血浆差异代谢物及其代谢途径分析 [J]. *中国畜牧杂志*, 2015, 51 (3): 51–56.
- GAO Y, LI Y, XIA C, et al. Plasma different metabolites and their metabolic pathway analysis for ketosis in dairy cow [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2015, 51 (3): 51–56. (in Chinese)
- [15] 胡瑞芳, 姜慧, 李玥莹. 蔗糖代谢相关酶的研究进展 [J]. *北方园艺*, 2012 (1): 167–170.
- HU R F, JIANG H, LI Y Y. Research advance on sucrose synthesize enzymes [J]. *Northern Horticulture*, 2012 (1): 167–170. (in Chinese)
- [16] 明永飞, 尤进茂, 傅晓云, 等. 高效液相色谱荧光检测法测定瓜子中的 4-氨基丁酸 [J]. *分析化学*, 2005, 33 (3): 432.
- MING Y F, YOU J M, FU X Y, et al. Determination of 4-aminobutyric acid in some melon seeds with fluorescence detection by high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2005, 33 (3): 432. (in Chinese)
- [17] 张宿. γ -氨基丁酸的生理作用及应用 [J]. *安徽农业科学*, 2019 (18): 1–9.
- ZHANG X. The Physiological Mechanism and Application of γ -aminobutyric Acid [J]. *Journal of Anhui Agricultural*, 2019 (18): 1–9. (in Chinese)
- [18] WU Q. Environmental dependence of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates [J]. *Acta Polymerica Sinica*, 2000, 21 (6): 755–756.
- [19] PLECKO B, STOECKLER-IPSIROGLU S, SCHÖBER E, et al. Oral β -hydroxybutyrate supplementation in two patients with hyperinsulinemic hypoglycemia: monitoring of β -hydroxybutyrate levels in blood and cerebrospinal fluid, and in the brain by *in vivo* magnetic resonance spectroscopy [J]. *Pediatric Research*, 2002, 52 (2): 301–306.
- [20] 夏建飞, 梁琼麟, 钟宏福, 等. 糖肾方对糖尿病肾病患者嘌呤及嘧啶代谢的影响 [J]. *中成药*, 2011, 33 (1): 13–17.
- XIA J F, LIANG Q L, ZHONG H F, et al. Effect of Tangshen For Mula on the purine and pyrimidine metabolism of patients with diabetic nephropathy [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2011, 33 (1): 13–17. (in Chinese)
- [21] 田颖, 时明慧. 赖氨酸生理功能的研究进展 [J]. *美食研究*, 2014, 31 (3): 60–64.
- TIAN Y, SHI M H. The research progress of the physiologic functions of lysine [J]. *Journal of Researches on Dietetic Science and Culture*, 2014, 31 (3): 60–64. (in Chinese)
- [22] 王丽媛, 丁国华, 黎莉. 脯氨酸代谢的研究进展 [J]. *哈尔滨师范大学自然科学学报*, 2010, 26 (2): 84–89.
- WANG L Y, DING G H, LI L. Progress in synthesis and metabolism of proline [J]. *Natural Science Journal of Harbin Normal University*, 2010, 26 (2): 84–89. (in Chinese)

- [23] 王均成, 王可, 张春宇. L-缬氨酸的应用和育种研究进展 [J]. *发酵科技通讯*, 2012, 41 (1): 30–34.
WANG J C, WANG K, ZHANG C Y. Advances in the application and breeding of L-valine [J]. *Fermentation Technology Communication*, 2012, 41 (1): 30–34. (in Chinese)
- [24] 杜晓峰, 鞠川, 胡薇. 血吸虫尾蚴感染分子机制研究进展 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2013, 25 (6): 664–667.
DU X F, JU C, HU W. Progress in researches of molecular mechanism of schistosome cercariae infection [J]. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 2013, 25 (6): 664–667. (in Chinese)
- [25] 肖小强. 3-羟基丁酸及其衍生物对神经胶质细胞生长的影响 [D]. 汕头: 汕头大学, 2007.
XIAO X Q. The effect of 3-hydroxybutyrate and its derivatives on the growth of glial cells [D]. Shantou: Shantou University, 2007. (in Chinese)
- [26] 马巍, 匡尚富, 廖文根, 等. 我国血吸虫病防治现状与研究方向 [J]. *中国水利水电科学研究院学报*, 2006, 4 (4): 241–245, 276.
MA W, KUANG S F, LIAO W G, et al. The research status and directions of schistosomiasis prevention in China [J]. *Journal of China Institute of Water Resources and Hydropower Research*, 2006, 4 (4): 241–245, 276. (in Chinese)
- [27] CHERNIN E. Some host-finding attributes of *Schistosoma mansoni* miracidia [J]. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1974, 23 (3): 320–327.
- [28] 阎丘思嘉, 周云飞, 汪世平. 钉螺与血吸虫的共生机制 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2014, 30 (12): 1239–1244.
LÜ QIU S J, ZHOU Y F, WANG S P. Mechanism on symbiosis of *Oncomelania hupensis* and *Schistosoma japonicum* [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2014, 30 (12): 1239–1244. (in Chinese)

(责任编辑: 张梅)