

·综述·

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2018.09.05

代谢组学技术在水产动物疾病研究中的应用

赵贤亮, 陈鹤, 孔祥会*

(河南师范大学水产学院动物医学系, 河南新乡 453007)

摘要 代谢组学是定量描述生物内源性代谢物质的整体及其对内因和外因变化应答规律的一门新学科。近年来,代谢组学技术在水产动物疾病中的研究备受关注,特别是为感染性疾病发生机制及防控研究提供了一种新的手段。本文介绍了代谢组学技术及其在水产动物研究中的应用,包括代谢组学技术在水产动物感染性疾病、细菌耐药及环境应激等方面应用进行综述,分析了代谢组学在水产动物疾病研究中面临的问题与挑战,并对未来水产动物代谢组学研究趋势进行了展望,以期代谢组学技术在水产动物疾病发病机制和药物研发方面更深入的运用提供参考。

关键词 代谢组学; 水产动物疾病; 细菌耐药; 环境应激

中图分类号 Q591

Application of Metabonomics in the Study of Aquatic Animal Diseases

ZHAO Xian-Liang, CHEN He, KONG Xiang-Hui*

(Department of Animal Medicine, College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract Metabonomics is a new technique for the qualitative and quantitative analysis of all metabolites of organisms or cells at a specific time and state. In recent years, the metabonomics technology in aquatic animal diseases has attracted much attention, especially for the mechanism of infectious diseases and disease prevention. This article describes the metabonomics technology and its application in aquaculture animal research, especially in infectious diseases, bacterial resistance and environmental stress. Meanwhile, we will discuss the problems and challenges in disease research and the prospects of further development of metabonomics in aquatic animals. Our aim is to provide reference information for the further application of metabonomics technologies in the pathogenesis of aquatic animal diseases and drug discovery.

Key words metabonomics; aquatic animal diseases; bacterial resistance; environmental stress

近年来,基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学等各种组学技术在水产动物生长发育、抗病免疫、系统进化和生物毒理过程及相关机制研究中得到广泛的应用。通过各种组学研究,可以深刻理解水产动物的各种生命活动规律的内在联系及其分子机制,并根据相应结果进一步运用到抗病育种、药物筛选和环境监测等多个研究领域。在各种组学研究层次中,基因和蛋白制紧密相连,反映了机体的生理活动,而代谢物则更多地反映了细胞所处的环境,能更全面地反映机体的表型特征^[1]。

1999年,Nicholson等^[2]提出代谢组学的概念,认为代谢组学技术是对生物体内所有物质进行定量分析,并寻找代谢物与机体生理和病理变化之间的相关性。生物体或细胞在外源性物质刺激或病理生理改变的条件下,内源性代谢物会发生变化,利用色谱或核磁共振等方法对体液、细胞或组织中的所有

低分子量内源性代谢物组(endogenous metabolites)进行定性及定量分析,检测其代谢变化,即代谢组学

收稿日期: 2018-01-26; 修回日期: 2018-03-25; 接受日期: 2018-04-25

国家自然科学基金(No. 31502204); 河南省科技攻关计划项目(No. 172102310545 & 182102110326); 河南师范大学优秀青年科学基金(No. 5101229279105)

* 通讯作者 Tel: 0373-3326557; E-mail: xhkong@htu.cn.

Received: January 26, 2018; Revised: March 25, 2018; Accepted: April 25, 2018

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 31502204); Henan Science and Technology Program (No. 172102310545 & 182102110326) and the Excellent Youth Foundation of Henan Normal University (No. 5101229279105)

* Corresponding author Kong Xiang-Hui Tel: 0373-3326557; E-mail: xhkong@htu.cn

是通过测定整个机体的系统代谢图谱来研究基因功能调控机制的学科。与其它组学相比,基因组学告知有关基因组结构和基因组成,转录组学和蛋白质组学告知有关基因表达或功能变化,而代谢组学则告知有关代谢组份已经发生的变化^[3]。因此,代谢组学技术成为研究生物生长发育、生理应激、抗病免疫等作用机制的有力工具。

水产动物疾病的发生是宿主、病原及环境三者共同影响的结果,特别是病原微生物的感染是诱发疾病的主要因素。本文将从代谢组学在水产动物病源性疾病预防、细菌耐药及环境应激等方面的应用进行综述,并分析其在水产动物研究中面临的问题和挑战,以及未来的发展趋势。

1 代谢组学技术

代谢物组学是定量分析某一生物体或细胞在特定时期内所有的低分子量代谢产物的科学,而代谢组学则是定量描述生物内源性代谢物质的整体,及其对内因和外因变化应答规律的一门科学。代谢组学以高能量检测和数据处理为手段,描绘出机体代谢物谱,即代谢轮廓,之后再利用统计学和生物信息学方法进行数据处理,研究机体的变化应答机制,为疾病的检测及治疗开辟了一条新的道路。

代谢组学技术流程包括实验设计、样品制备、代谢物检测分析和鉴定、数据分析和模型建立。其快速发展有赖于先进的分析检测技术,同时结合了模式识别和有效的计算分析方法。代谢组学技术常用的研究方法有色谱质谱联用技术和核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)。色谱技术主要有气相色谱(gas chromatography, GC)、液相色谱(liquid chromatography, LC)、毛细管电泳(capillary

electrophoresis, CE)等。质谱(mass spectrometry, MS)是通过制备、分离、检测气相离子来鉴定化合物的一种专门技术,已广泛应用于各个学科领域。因此,常用的联用技术有GC-MS、LC-MS、CE-MS。GC-MS的方法是用气相色谱毛细管柱先高效分离样品,再进行质谱检测,结合标准质谱数据库检索各个化合物,这是代谢组学研究的利器^[4]。GC-MS在微生物代谢组学分析中应用十分广泛,其不仅能分析挥发性化合物,对半挥发性和非挥发性化合物也可以通过衍生化的方法来研究。LC-MS在代谢组学分析中占据着重要的位置,可用于分析难挥发、大分子量、稳定性差、难衍生化的化合物。为了提高分离效果,常采用HPLC-MS或UPLC-MS等技术^[5, 6]。CE-MS是以上两种技术的互补技术,能高效快速地进行样品分析。由于采用毛细管电泳技术分离样品的方法,其对分离强极性、离子化的样品效果更好^[7]。质谱与色谱的联用极大提高了对样品检测的灵敏度,同时,质谱技术拥有相对成熟的代谢物指纹图谱库,可以实现代谢物的快速鉴定,并且能够对样品进行定量分析。核磁共振技术是应用最早,也是最为常见的技术之一,其对样品无特殊要求,处理方式简单,无需提前分离,无需损坏样品,稳定性高,并且可对样品进行定量研究,被广泛地用于微生物、植物和动物的代谢研究中^[8]。常用的核磁共振技术包括氢谱(¹H-NMR)、碳谱(¹³C-NMR)、磷谱(³¹P-NMR)和氟谱(¹⁹F-NMR),其中以¹H-NMR的应用最为广泛^[9]。核磁共振在分辨率和灵敏度方面比MS相对逊色,并且需要相对大体积的样品。但随着更高磁场(900 MHz),低温冷冻探针和小体积微探针(60 μL)的引进,使这些问题得到较大的解决^[10]。各种代谢组学方法的优缺点及适用检测对象见Table 1。

Table 1 Sample preparation, pros and cons of various metabonomics techniques and their applicable field

Technique	Sample preparation	Advantages	Disadvantages	Applicable filed
GC-MS [4, 11]	Above 10 μL; Derivatization needed	High sensitivity; Large linear range; Large commercial and public libraries	Slow; Destructive to sample	Sufficiently volatile and thermally stable compounds
LC-MS [5, 6, 11]	Above 10 μL; Simple pretreatment, rapidity	High sensitivity; Usually no Derivatization required; Many modes of separation	Slow; Limited commercial libraries	More versatile and amenable than GC-MS
CE-MS [7, 12]	1-20 nL; Simple pretreatment, rapidity	High sensitivity; High separation efficiency	Slow; Limited loading capacity	Polar compound
NMR [8, 10, 13]	About 500 μL; Minimal sample preparation	High precision; Rapid analysis; Non-invasive; Non-destructive	Low sensitivity; Only medium to high abundance metabolites will be detected	Compounds containing carbon, hydrogen

随着代谢组学技术领域的发展,其在水产动物疾病中的研究也越来越重要。通常,单一的技术手段并不能够对样品进行全面的检测,为了实现对样品代谢物的整体分析,需要采用多种组学技术的联合使用,从而弥补单个代谢组学技术的缺点,实现对样品更为精准的检测。通过对机体代谢图谱的全面分析,可以获得大量多维的信息,包括化合物的分子信息,样品的质量和结构信息,中间代谢物的含量变化,生物标志物的确定和病理、毒理方面的变化等。在实际应用中,要根据研究目的和研究对象的不同,选择合适的方法进行代谢物方面的研究。

2 代谢组学技术在宿主感染性疾病中的应用

代谢组学技术适合分析复杂的生物混合物,在疾病的相关研究中,特别是疾病的早期诊断具有无法比拟的优势。代谢组学一般分析流程是通过发现生物标志代谢物来检测和确定疾病的发生过程,研究代谢网络的变化,从而在代谢水平阐明机体的抗感染机制。目前,代谢组学技术在水产动物免疫方面的研究主要集中在细菌、病毒、寄生虫感染后相关生物标志物的发现与应用等方面。

2.1 水产动物细菌病的代谢组学研究

水产动物细菌性疾病是指由各种致病菌引起的疾病。该类疾病有发病急、传播快、发病率和死亡率高等特点,是水产动物感染性疾病中危害最大的一种。因此,一直受到国内外水产病害科研工作者的关注。代谢组学技术在水产养殖中的应用,主要是通过比较正常组与发病组的代谢物及代谢通路变化,鉴定筛选相应的生物标志物,并利用生物标志物来调节机体的防御作用。

近年来,很多学者通过 GC-MS 和 NMR 技术研究鱼体在感染病原菌后体内代谢水平的变化,从而发现一系列生物标志物,进而采用外源添加生物标志物来调节机体的代谢水平,提高鱼体对各种病原菌的抗感染能力^[14-17]。Guo 等^[14]采用 GC-MS 技术,比较迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)感染鲫鱼(*Carassius auratus*)后,存活组与濒临死亡组的代谢物组学差异,发现存活组鲫鱼肝中棕榈酸上升和 D-甘露糖显著下降,代谢通路中不饱和脂肪酸合成增加,果糖和甘露糖代谢降低,可以明显提高鲫鱼感染迟缓爱德华氏菌后的存活率。Zhao 等^[15]研究发现,Interferon- α 2b 提高斑马鱼(*Danio rerio*)对细菌的抵抗能力,是通过增加不饱和脂肪酸的合成,特

别是亚油酸,能显著提高斑马鱼抵御溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和爱德华氏菌的感染能力。同样,基于 GC-MS 的代谢物组学研究发现,外源添加生物标志物 N-乙酰葡萄糖胺^[16]和 L-脯氨酸^[17],罗非鱼在感染链球菌(*Streptococcus iniae*)后的存活率明显高于对照组。Ji 等^[18, 19]对基于贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)鳃的代谢物组学与蛋白质组学研究,发现藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)和鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染后,代谢生物标志物如某些氨基酸,甜菜碱,ATP 的变化可引起能量代谢和渗透调节紊乱。总的来说,通过代谢组学技术发现生物标志物,并通过外源添加的方式来影响机体的代谢水平,提高水产动物对病原微生物的抵抗力,为细菌性疾病的防控开辟了一条新的道路。

2.2 水产动物病毒病的代谢组学研究

水产动物的病毒性疾病是水产养殖中危害最大的一类疾病。然而,可用于防治病毒的药物较少,且药物的防治效果并不明显。目前,疫苗是预防鱼类病毒病最有效方法。因此,针对水产动物病毒性疾病的研究显得尤为重要。Wu 等^[20]利用 HPLC-ESI-MS 方法,对新加坡石斑鱼虹彩病毒(*Singapore grouper iridovirus*, SGIV)的脂质结构进行分析。结果发现,甘油磷脂酰胆碱、醚脂酰胆碱、甘油磷脂酰肌醇和鞘磷脂是维持虹彩病毒结构的主要磷脂成分。对胚胎细胞的感染研究证明,病毒的脂质结构在病毒的侵染、装配和释放机制中发挥着重要的作用。同时,研究者构建了超过 220 种脂质代谢物的数据库,为水产动物病毒性疾病的治疗方面提供理论基础^[20]。在白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)感染虾的研究中,发现机体吸收氨基酸的能力受到抑制,且蛋白质代谢也受到干扰^[21]。另一研究也发现,白斑综合征病毒感染后,机体出现脂质代谢和渗透压调节的紊乱^[22]。Su 等^[23]通过检测白斑综合征病毒感染后血细胞蛋白质组和代谢组的变化,发现几种代谢途径(糖酵解,戊糖磷酸途径,核苷酸生物合成,谷氨酰胺分解和氨基酸合成)的生物标志物显著上调,证明 PI3K-AKT-mTOR 通路在激活白斑综合征病毒诱导的瓦尔堡效应(Warburg effect)中,具有极其重要的作用。这些研究为阐明白斑综合征病毒的感染及防控机制奠定了基础。目前,应用代谢组学技术对机体抗病毒机制的研究并不多见,代谢组学技术能从代谢通路调节水平研究机体的抗病毒机制,其飞速发展给这一领域带来新的机遇。

2.3 水产动物寄生虫病的代谢组学研究

寄生虫病也是一直困扰水产养殖业的疾病之一。水体环境是寄生虫生活史循环的重要途径,多种寄生虫卵通过水体环境进入到鱼体寄生,造成水产动物生长发育迟缓,抵抗力下降,严重时可能引起水生动物的大量死亡。Kodama 等^[24]发现,粘孢子虫(myxosporean)感染河豚(*Takifugu rubripes*)后出现机体消瘦的症状。通过 GC-MS 方法研究发现,消瘦的河豚与正常的河豚代谢轮廓具有明显差异。粘孢子虫感染后血清中葡萄糖、亚麻酸和酪氨酸水平显著下降,引起鱼体肝功能紊乱,肠道损伤,从而影响营养物质的吸收。代谢组学不仅应用在寄生虫感染的机制研究,还可通过研究宿主-寄生虫之间的相互作用,对药物作用模式和寄生虫抗药机制进行分析^[25-27]。这为代谢组学在抗寄生虫药物的发现提供了新思路,将有利于水产养殖动物寄生虫病的防控。

2.4 代谢组学技术在水产动物健康水平评估方面的应用

除了细菌、病毒和寄生虫病等感染疾病的研究,代谢组学技术还可对水产动物健康状况进行评估。Roznere 等^[28]通过 GC-MS 和 LC-MS 方法,分析野生贻贝(*Amblema plicata*)在驯化不同时间段的代谢物组学特征,发现核苷酸代谢可作为评估淡水贻贝健康状态的生物标志物。代谢组学技术对机体细胞增生或异常也可进行评估。例如,Stentiford 等^[29]通过傅里叶变换离子回旋共振(Fourier transform ion cyclotron resonance, FT-ICR)等技术,比较近海比目鱼(*Limanda limanda*)肝肿瘤和其他病状,从而鉴别肝肿瘤特异性的代谢物谱,为诊断鱼类肿瘤疾病提供新的方法。本课题组及其它学者通过比较鱼体易感与抗病鱼体的代谢物组学研究,筛选了一批与存活相关的生物标志物,通过外源注射或口服的方法显著提高鱼体对病原的抗感染能力^[11,16,17]。可以预见,代谢组学技术在水产动物免疫防御、抗病育种和食品安全领域必将发挥更大的作用。

3 代谢组学技术在病原耐药方面的应用

随着水产养殖业集约化迅猛发展,对水产动物细菌疾病的有效防控成为避免巨大经济损失的重要措施。随着抗生素及化学药物在水产养殖业的使用弊端日益凸显,细菌耐药问题的研究已成为世界性问题。苏玉斌等^[30]基于 GC-MS 的代谢物组学,研究了细菌的耐药机制,通过对卡那霉素抗性和敏感

的迟缓爱德华氏菌进行比较,发现丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,以及精氨酸和脯氨酸代谢这 3 条重要代谢通路,在细菌卡那霉素耐药机制中发挥着重要作用。外源添加葡萄糖和丙氨酸这两种生物标志物,能激活底物促进 TCA 循环,提高 NADH 生成和质子动力势,从而促使卡那霉素的吸收,增强卡那霉素对细菌的杀菌作用。进一步研究^[31]发现,果糖作为迟缓爱德华氏菌耐药的标志物,也具有显著提高卡那霉素的作用效果。同样,基于对耐环氧氟沙星的大肠杆菌的蛋白质组和代谢组研究,发现肌醇作为耐药细菌的重要生物标志物,能去极化耐药菌的膜电位,促进吞噬细胞对耐药细菌的吞噬作用^[32]。基于以上研究,Peng 等^[33]提出了代谢重编程的概念,通过鉴定出代谢过程中关键的生物标志物,改变机体原有的代谢途径,而增加旁路途径的代谢水平,筛选和鉴定出有效的药物用于疾病的治疗和提高宿主免疫。这种基于代谢组学的代谢重编程研究思路的提出,将有利于解决水产养殖过程中细菌耐药的问题,并与其他产生耐药问题的解决提供新的思路。

4 代谢组学技术在环境应激中的应用

环境因素对水产动物疾病的发生起着至关重要的作用,包括温度、pH、重金属污染、药物毒副作用和低氧胁迫等因素,均可影响水产动物疾病的爆发。代谢物最能反映细胞所处的环境,直接反映机体的表型特征。代谢组学技术在处理复杂样品方面的优势,使得这种技术在环境应激中的研究越来越广泛^[34,35]。代谢组学在水产动物环境胁迫研究的应用,有助于揭示水产动物在环境变化下的生理适应机制,为养殖水环境的调控提供科学依据。

水产动物疾病的发生与养殖水体环境的恶化密切相关。通过检测机体在特定环境中的代谢组,为了解环境污染对水产动物生理功能的影响提供全局的认识。Li 等^[36]基于 NMR 的代谢物组学研究表明,银纳米晶体颗粒和硝酸银颗粒处理大型蚤(*Daphnia magna*)能干扰机体能量代谢和氧化应激过程,导致生物标志物,如 3-羟基丁酸、精氨酸、赖氨酸和磷酸胆碱的显著变化。Ji 等^[37]研究在不同盐度海水中,对菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)进行急性砷暴露,发现生物标志物,如琥珀酸盐、牛磺酸和 ATP 升高,而苏氨酸和谷氨酰胺降低。同时,其结果也说明盐度会影响蛤对砷的代谢反应。Tjeerdema^[38]通过³¹P-NMR 组学技术发

现,高浓度铜离子会造成鲍(*Haliotis rufescens*)肌肉中磷酸精氨酸浓度下降,造成鲍失去攀附的能力。这使鲍成为了海洋中铜离子监测的重要生物标志物。同样,基于核磁共振的代谢物组学研究表明,白蛤(*Ruditapes philippinarum*)暴露在金属污染的环境下,如汞离子^[39]、铜离子^[40]和苯并芘^[41],会影响其肌肉和渗透压代谢,使白蛤成为了海洋环境中重金属研究较好的生物指示剂。Long 等^[42]运用 GC-MS 和 LC-MS 方法,全面分析摇蚊(*Chironomus tepperi*)暴露在不同浓度氯化锌浓度下的代谢变化,发现糖代谢中间代谢物如葡萄糖-6-磷酸,果糖-6-磷酸全面下调,柠檬酸循环的中间代谢物也有显著增加。这些结果表明,锌暴露的毒理学反应明显与铜等其他重金属不同,这也为锌暴露候选生物标志物的生物监测提供有用的方案。Lin 等^[43]研究了亚致死浓度的原油水溶组分(water-accommodated fraction, WAF)与化学分散的水溶组分(chemically enhanced water-accommodated fraction, CEWAF)对鲑鱼(*Onchorhynchus tshawytscha*)代谢组的影响。结果发现,鲑鱼肝中甲酸含量增加,以及肝或肌肉中甘油磷酸胆碱含量降低,可作为原油水溶组分或化学分散的水溶组分暴露的亚致死生物标记物。同样,通过检测沙蚕(*Nereis virens*)体内氨基酸和碳水化合物的表达变化,可用于监测原油污染^[44]。总体来说,色谱-质谱联用和核磁共振的代谢组学方法,为毒理学研究提供了一种灵敏的检测手段,为水产动物应对环境应激的机制研究提供了新的思路与方法。

在药物毒理作用方面,运用代谢组学技术,研究金鱼(*Carassius auratus*)在受到丁草胺^[45]、敌敌畏^[46]、氯氟氰菊酯^[47]的毒性应激时,其代谢毒理过程有变化。为了降低这些药物对机体的毒性影响,机体自身通过代谢调节氧化应激水平,氨基酸代谢水平来进行自我保护。另外,利用代谢组学技术构建的金鱼急性帕金森病模型,在研究帕金森病理和发病机制方面具有很大的应用价值^[48],这在构建化学诱导的疾病模型方面具有巨大潜力。

低氧胁迫对水产动物的影响非常明显,养殖水体缺氧容易造成鱼类大规模死亡。金鱼对低氧有较强的耐受能力。基于核磁共振代谢组学研究表明,与正常组相比,缺氧条件显著影响鱼体能量代谢物,如乳酸、糖原、ATP/ADP 和磷酸肌酸的含量。缺氧还影响氨基酸(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸)和神经递质(γ -氨基丁酸、谷氨酸)的水平。另外,鲨肌醇(scyllo-inositol)水平在心、肝和肌肉组织中也发生

显著变化,这些与鱼缺氧相关的生物标志物为低氧胁迫的研究提供新的见解^[49]。

5 问题与展望

代谢组学作为一种能够系统反应机体内所有代谢物变化的高效技术,通过研究器官、组织和细胞所产生的最终代谢产物,并进行代谢通路富集,构建机体代谢网络的变化过程,从而揭示机体特定生物学过程及疾病发生过程的分子机制。近年来,研究者通过各种代谢组学技术获得了大量的代谢物信息与代谢通路变化,筛选到大量疾病相关生物标志物。这些信息对我们认识水产动物疾病的发生、水产动物免疫状况及环境应激等具有重要作用。但代谢组学技术的发展还存在一定的阻碍。首先,与其他组学技术相比,现有的分析手段在灵敏度和动态检测的范围方面有一定的局限性,且其检测手段受到样品量的限制,这是代谢组学技术要解决的问题。其次,代谢物数据信息量大,但却无相对应的代谢数据库,信息处理较为繁琐。另一方面,水产动物代谢物数据和代谢通路普遍缺少,无法对代谢物数据进行全面系统的分析与比较。因此,解决代谢组学检测技术及水产动物数据库建设问题,对于水产动物代谢组学技术的发展具有重要作用。

综上所述,代谢组学可以从整体上反映生命活动在代谢水平上的特征和规律,为水产动物的免疫、疾病的发生和诊断以及毒理学的研究提供了新的方法和手段。在现阶段,应用 GC-MS、核磁共振等技术对水产动物疾病的研究主要集中在鱼类和贝类,而对其他水产养殖动物的研究相对较少。今后,可以应用代谢组学技术研究更多水产动物疾病。同时,随着代谢组学研究的技术平台的不断提高和研究方法的不断改进,在可以预见的将来,代谢组学技术必将在水产养殖领域有更加广泛的应用。当然,代谢组学如能结合基因组学、转录组学和蛋白质组学,可以更全面地了解生物体在当前生理阶段或外界刺激下的真实反应,才能更直观揭示其病原、机体和环境等因素与水产动物疾病发生的关系,为水产动物疾病防控研究提供坚实的理论基础。

参考文献(References)

- [1] Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: Metabolomics; the apogee of the omics trilogy [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(4): 263-269
- [2] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of

- biological NMR spectroscopic data [J]. *Xenobiotica*, 1999, **29** (11): 1181-1189
- [3] German JB, Bauman DE, Burrin DG, *et al.* Metabolomics in the opening decade of the 21st century: building the roads to individualized health [J]. *J Nutr*, 2004, **134**(10): 2729-2732
- [4] Schauer N, Steinhäuser D, Strelkov S, *et al.* GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples [J]. *FEBS Lett*, 2005, **579**(6): 1332-1337
- [5] Wilson ID, Plumb R, Granger J, *et al.* HPLC-MS-based methods for the study of metabolomics [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, **817**(1): 67-76
- [6] Want EJ, Wilson ID, Gika H, *et al.* Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS [J]. *Nat Protoc*, 2010, **5** (6): 1005-1018
- [7] Ramautar R, Somsen GW, de Jong GJ. CE-MS in metabolomics [J]. *Electrophoresis*, 2009, **30**(1): 276-291
- [8] Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, *et al.* Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts [J]. *Nat Protoc*, 2007, **2**(11): 2692-2703
- [9] Cassiède M, Nair S, Dueck M, *et al.* Dataset of urinary metabolites measured by ^1H NMR analysis of normal human urine [J]. *Data Brief*, 2016, **10**: 227-229
- [10] Wishart DS. Quantitative metabolomics using NMR [J]. *Trends Analyt Chem*, 2008, **27**(3): 228-237
- [11] Vinaixa M, Schymanski EL, Neumann S, *et al.* Mass spectral databases for LC/MS-and GC/MS-based metabolomics: state of the field and future prospects [J]. *Trends Analyt Chem*, 2016, **78**: 23-35
- [12] Lindenburg PW, Haselberg R, Rozing G, *et al.* Developments in interfacing designs for CE-MS: towards enabling tools for proteomics and metabolomics [J]. *Chromatographia*, 2015, **78** (5-6): 367-377
- [13] Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, *et al.* The future of NMR-based metabolomics. [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2017, **43**: 34-40
- [14] Guo C, Huang XY, Yang MJ, *et al.* GC/MS-based metabolomics approach to identify biomarkers differentiating survivals from death in crucian carps infected by *Edwardsiella tarda* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, **39**(2): 215-222
- [15] Zhao X, Wu C, Peng X, *et al.* Interferon- α 2b against microbes through promoting biosynthesis of unsaturated fatty acids [J]. *J Proteome Res*, 2014, **13**(9): 4155-4163
- [16] Cheng ZX, Ma YM, Li H, *et al.* N-acetylglucosamine enhances survival ability of tilapia infected by *Streptococcus iniae* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, **40**(2): 524-530
- [17] Zhao XL, Han Y, Ren ST, *et al.* L-proline increases survival of tilapia infected by *Streptococcus agalactiae* in higher water temperature [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, **44**(1): 33-42
- [18] Ji CL, Wu H, Wei L, *et al.* Responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenges by metabolomics and proteomics [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, **35** (2): 489-498
- [19] Wu H, Ji C, Wei L, *et al.* Proteomic and metabolomic responses in hepatopancreas of *Mytilus galloprovincialis* challenged by *Micrococcus luteus* and *Vibrio anguillarum* [J]. *J Proteomics*, 2013, **94**: 54-67
- [20] Wu J, Chan R, Wenk MR, *et al.* Lipidomic study of intracellular Singapore grouper iridovirus [J]. *Virology*, 2010, **399**(2): 248-256
- [21] Liu PF, Liu QH, Wu Y, *et al.* A pilot metabolic profiling study in hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* with white spot syndrome virus based on ^1H -NMR spectroscopy [J]. *J Invertebr Pathol*, 2015, **124**: 51-56
- [22] Fan W, Ye Y, Chen Z, *et al.* Metabolic product response profiles of *Cherax quadricarinatus* towards white spot syndrome virus infection [J]. *Dev Comp Immunol*, 2016, **61**: 236-241
- [23] Su MA, Huang YT, Chen IT, *et al.* An invertebrate Warburg effect: a shrimp virus achieves successful replication by altering the host metabolome via the PI3K-Akt-mTOR pathway [J]. *PLoS Pathog*, 2014, **10**(6): e1004196
- [24] Kodama H, Otani K, Iwasaki T, *et al.* Metabolomic investigation of pathogenesis of myxosporean emaciation disease of tiger puffer fish *Takifugu rubripes* [J]. *J Fish Dis*, 2014, **37**(7): 619-627
- [25] Creek DJ, Barrett MP. Determination of antiprotozoal drug mechanisms by metabolomics approaches [J]. *Parasitology*, 2014, **141**(1): 83-92
- [26] Creek DJ, Anderson J, McConville MJ, *et al.* Metabolomic analysis of trypanosomatid protozoa [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2012, **181**(2): 73-84
- [27] Vincent IM, Barrett MP. Metabolomic-based strategies for anti-parasite drug discovery [J]. *J Biomol Screen*, 2015, **20**(1): 44-55
- [28] Roznere I, Watters GT, Wolfe BA, *et al.* Nontargeted metabolomics reveals biochemical pathways altered in response to captivity and food limitation in the freshwater mussel *Amblema plicata* [J]. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 2014, **12**: 53-60
- [29] Stentford GD, Viant MR, Ward DG, *et al.* Liver tumors in wild flatfish: a histopathological, proteomic, and metabolomic study [J]. *OMICS*, 2005, **9**(3): 281-299
- [30] 苏玉斌, 李惠, 彭宣宪. 迟缓爱德华氏菌卡那霉素耐药代谢组学的研究 [J]. 中国科技论文在线 (Su YB, Li H, Peng XX. Metabolomics approach for investigation of kanamycin-resistant *Edwardsiella tarda* [J]. *Highlights Sciencepaper Online*), 2015, **8**(19): 2002-2008
- [31] Su YB, Peng B, Han Y, *et al.* Fructose restores susceptibility of multidrug-resistant *Edwardsiella tarda* to kanamycin [J]. *J Proteome Res*, 2015, **14**(3): 1612-1620
- [32] Chen XH, Zhang BW, Li H, *et al.* Myo-inositol improves the host's ability to eliminate halofloxacin-resistant *Escherichia coli* [J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 10720
- [33] Peng B, Li H, Peng XX. Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming [J]. *Protein Cell*, 2015, **6**(9): 628-637
- [34] 梁宇杰, 伍一军. 代谢组学方法在生态毒理学中的应用进展 [J]. 生态毒理学报 (Liang YJ, Wu YJ. Progress in application of metabolomic approaches in ecotoxicology [J]. *Asian J Ecotoxicol*), 2011, **06**(5): 459-465
- [35] 耿柠波, 张海军, 王菲迪, 等. 代谢组学技术在环境毒理学研究中的应用 [J]. 生态毒理学报 (Geng NB, Zhang HJ, Wang FD, *et al.* A review on the application of metabolomic approaches in environmental toxicology [J]. *Asian J Ecotoxicol*), 2016, **11**(3): 26-35
- [36] Li L, Wu H, Ji C, *et al.* A metabolomic study on the responses of *Daphnia magna* exposed to silver nitrate and coated silver nanoparticles [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2015, **119**: 66-73
- [37] Ji CL, Wu HF, Liu XL, *et al.* The influence of salinity on toxicological effects of arsenic in digestive gland of clam *Ruditapes philippinarum* using metabolomics [J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2013, **31**(2): 345-352
- [38] Tjeerdema RS. Application of NMR-based techniques in aquatic toxicology: brief examples [J]. *Mar Pollut Bull*, 2008, **57** (6-12): 275-279
- [39] Liu X, Zhang L, You L, *et al.* Toxicological responses to acute mercury exposure for three species of Manila clam *Ruditapes philippinarum* by NMR-based metabolomics [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2011, **31**(2): 323-332
- [40] Zhang L, Liu X, You L, *et al.* Metabolic responses in gills of Manila clam *Ruditapes philippinarum* exposed to copper using NMR-based metabolomics [J]. *Mar Environ Res*, 2011, **72**(1-2): 33-39
- [41] Zhang L, Liu X, You L, *et al.* Benzo (a) pyrene-induced metabolic responses in Manila clam *Ruditapes philippinarum* by proton nuclear magnetic resonance (^1H -NMR) based metabolomics [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2011, **32**(2): 218-225
- [42] Long SM, Tull DL, Jeppe KJ, *et al.* A multi-platform

- metabolomics approach demonstrates changes in energy metabolism and the transsulfuration pathway in *Chironomus tepperi* following exposure to zinc [J]. *Aquat Toxicol*, 2015, **162**:54-65
- [43] Lin CY, Anderson BS, Phillips BM, *et al.* Characterization of the metabolic actions of crude versus dispersed oil in salmon smolts via NMR-based metabolomics [J]. *Aquat Toxicol*, 2009, **95**(3): 230-238
- [44] Fernández-Varela R, Tomasi G, Christensen JH. An untargeted gas chromatography mass spectrometry metabolomics platform for marine polychaetes [J]. *J Chromatogr A*, 2015, **1384**: 133-141
- [45] Xu HD, Wang JS, Li MH, *et al.* ¹H-NMR based metabolomics approach to study the toxic effects of herbicide butachlor on goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2015, **159**: 69-80
- [46] Liu Y, Chen T, Li MH, *et al.* ¹H-NMR based metabolomics approach to study the toxic effects of dichlorvos on goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Chemosphere*, 2015, **138**: 537-545
- [47] Li M, Wang J, Lu Z, *et al.* NMR-based metabolomics approach to study the toxicity of lambda-cyhalothrin to goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2014, **146**: 82-92
- [48] Lu Z, Wang J, Li M, *et al.* ¹H-NMR-based metabolomics study on a goldfish model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, **223**:18-26
- [49] Lardon I, Eyckmans M, Vu TN, *et al.* ¹H-NMR study of the metabolome of a moderately hypoxia-tolerant fish, the common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Metabolomics*, 2013, **9**(6): 1216-1227