

代谢组学技术及其在寄生虫学中的应用

胡 双¹ 吴志蕾¹ 邹丰才^{1,2} 韩建强^{3*}

1. 云南农业大学动物科学技术学院, 昆明 650201; 2. 云南省高校兽医公共卫生重点实验室, 昆明 650201;
3. 云南玉溪农业职业技术学院, 云南玉溪 653106

摘要 代谢组学是继基因组学、转录组学和蛋白组学之后,兴起的生物学的新分支,广泛地应用到各个领域,如疾病诊断、药物开发、营养科学和动植物代谢等方面的研究中,现在也逐步地应用于寄生虫学研究领域。寄生虫是危害人类和动物健康的主要病原体之一,把代谢组学技术应用于寄生虫学研究领域,这将为探究寄生虫与宿主互作及寄生虫的防控提供新思路。

关键词 代谢组学;寄生虫学;核磁共振;色谱分析;质谱分析

1 代谢组学技术

代谢组学是研究细胞、组织或生物体受到各种刺激后,产生的所有代谢产物的变化,研究生物体系代谢途径的科学,关注的是相对分子质量小于 1 000 的小分子化合物。根据研究的对象和目的的不同,Oliver^[1]将生物体系的代谢产物分析分为 4 个层次:代谢物靶标分析(Metabolite target analysis)、代谢轮廓分析(Metabolite profiling)、代谢组学(Metabonomics)、代谢指纹分析(Metabolic fingerprinting analysis)。代谢组学技术主要由样本采集、样本预处理和样本数据分析处理技术这三部分组成。生物体系的代谢产物和代谢通路很复杂,至今仍没有一种能满足上述所有要求的代谢组学技术。现有的代谢组学分析技术都有各自的优势和使用范围^[2]。技术联用和多种技术综合分析所得的结果更为准确。代谢组学有核磁共振(NMR)、色谱、质谱、毛细管电泳、红外光谱、电化学检测等分离分析技术。

与转录组学和蛋白组学相比,代谢组学具有以下优势:①小分子的产生和代谢是生物机体作用的最终结果,生物体液的代谢产物分子能够更直接、更准确地反映生物体的病理生理状态。②基因和蛋白表达的有效微小变化会在代谢产物上得到放大,

从而检测更容易。③代谢组学的代谢物信息库简单,远没有全基因测序及大量表达序列标签的数据库那样复杂,也不需要建立在这些之上。④代谢物的种类少,要远小于基因和蛋白质的数据,且代谢物质分子结构相比之下要简单得多。⑤代谢产物在各个生物体系中都是类似的,所以代谢组学研究中采用的技术更容易在各个领域中通用,也更容易被接受。

2 代谢组学研究的主要方法

核磁共振(NMR)是测定有机结构的四大谱学之一,可深入物质内部分子,并且不破坏物质本身,具有准确、迅速和分辨率高等优点,从而被广泛应用。NMR 的优势在于对样本实现无创性和无偏性的检测,对样本本身也无需进行繁琐的处理,能较客观并且成本较低地检测样本;但也有着检测灵敏度较低和范围有限等缺点。色谱的优势在于分离度和灵敏度都很高,可以解决复杂体系的分离分析,但其分析鉴别对象的能力有限,不过这一不足可以通过与其他检测技术联用来弥补。质谱虽然较 NMR 的灵敏度低、检测范围小,但是质谱有较高的专属性和灵敏度,可以同时检测多个化合物,配合色谱技术优越的分析能力,在代谢组学研究中显出极大的应用潜力。因此,越来越多的研究者将色谱和质谱联合应用于代谢组学的研究中。

收稿日期:2016-06-03

* 通讯作者

胡 双,女,1992 年,硕士研究生。

3 代谢组数据分析

代谢组学分析所产生的信息是含量丰富的多维数据,要运用多种分析方法。得到分析体系的原始数据后,将数据进行预处理,保留与组分相关信息,除去多余干扰因素。预处理包括分段积分、归一化、标度化、滤噪和色谱峰对齐等步骤^[9],形成二维数据表。从原始数据中挖掘有效信息后,为解决这些复杂体系中归类和标记物鉴别的问题,主要应用监督和非监督 2 种分类方法。在处理和数据分析的各个阶段中,对数据的统计算法和质量控制的有效性验证也受到了研究者的重视。以液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术为例,对该技术检测出的原始数据首先进行归一化分析,就是对数据进行过滤,除去噪音数据,之后使用 SIMCA 软件对归一化后的数据进行多元变量模式识别分析,用主成分分析(PCA)的方法对数据进行自动建模分析,并用该软件对模型进行正交矫正偏最小二乘法判别分析(O-PLS-DA),最大化地凸显模型内部与预测主成分(Predictive component)相关的差异,最后结合学生氏 t 检验(t -test)的 P 值来筛选差异性表达代谢物,分析代谢通路。

4 代谢组学技术在寄生虫学研究领域中的应用

4.1 采用核磁共振技术的相关研究

核磁共振技术不会破坏样本本身,检测范围广而被广泛应用。吴惠凤等^[10]应用核磁共振成像技术对艾滋病合并弓形虫脑炎的表现特征进行探讨,找出“类靶征”,提高对该病的了解,减少漏诊和误诊。陈璐^[11]运用核磁共振技术与多变量数据分析相结合的代谢组学研究方法,对减毒鼠伤寒沙门氏菌对日本血吸虫感染小鼠的代谢组学的影响进行研究,从而引起小鼠代谢组变化,有助于进一步了解宿主-多病原体相互作用的机制。Neuhau D 应用 Noesyprld 脉冲序列,Tang H 应用 Cpmgprld 脉冲序列,Wu D 应用 Ledbpgppr2s1d 脉冲序列,来采集血浆样本相应的 NMR 谱图,序列可以得到血浆中小分子和大分子代谢物的信号^[9]。Wang 等^[12]研究者应用 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,发现宿主尿样中马尿酸、乙酸和 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^[13]研究者又进一步研究日本血吸虫感染小鼠整个过程的体液和肝脏的变化规律,发现小鼠感染后脂代谢紊乱、抑制 TCA、促进糖酵解和肠道菌群失调等,还在尿样中发现血吸虫病严重程度特征性代谢产物 3- 脲基丙酸。

4.2 采用色谱和质谱及二者联用技术的相关研究

色谱和质谱及其联用技术是最常用的代谢组学技术。国家南方人类基因组中心应用高分辨率嵌入式二维纳米液相色谱等技术对日本血吸虫的虫卵、毛蚴、尾蚴、肝期童虫、成虫等不同发育阶段的 3 273 种蛋白质进行质谱分析,获得了大量数据。Cohen 等^[14]对弓形虫滋养体虫体应用了双向电泳,并对部分蛋白斑点进行质谱鉴定。Cheng 等^[15]应用质谱技术结合双向电泳技术对日本血吸虫雌雄成虫性别进行蛋白差异表达。Lee 等^[16]研究发现 RH 株弓形虫感染较早出现循环抗体,于感染后第 2 天就和应用蛋白质质谱分析检测出抗体。施祖灏等^[17]建立了鸡肉中二硝托胺等 9 种化学合成类抗球虫药多残留的高效液相色谱-串联质谱的分析方法,该方法可靠、稳定,满足鸡肉中化学合成类抗球虫药多残留的检测与验证。党晓群等^[12]运用质谱技术对家蚕微孢子虫蛋白水解酶进行检测与鉴定,分析出水解酪蛋白的蛋白酶主要是锌离子依赖型的细胞质型亮氨酸氨肽酶和丝氨酸蛋白酶,进一步探索了蛋白酶在寄生虫和宿主之间相互作用的机制。谢偲^[13]应用质谱技术和生物信息学技术分析微孢子虫的蛋白质,发现了与微孢子虫侵染、增值和代谢等重要生理过程相关的蛋白质,使家蚕微孢子虫的基础研究更完整。王盈予等^[14]建立了鸡皮及其脂肪中抗球虫药物的超高效液相色谱-串联质谱法的检测方法。

机体的代谢过程是相互联系和依赖的。环境因素会引起基因表达谱的变化,从而导致蛋白质表达的改变,进一步使代谢物发生变化,最后发生临床表现。所以,也有很多研究者将代谢组学技术和转录组学或蛋白组学结合在一起研究。施寿容^[15]运用高效液相色谱-四极杆飞行时间高分辨质谱和 RNA-seq 的代谢组学和转录组学技术,检测肉鸡腹水综合症的代谢标志物和差异基因,及其抗性代谢标志物和基因,共同揭示了脂类物质在肉鸡腹水综合症发生的异常变化和代谢特征,及其发病机制。周永华等^[16]运用质谱技术检测弓形虫急性感染小鼠和对照组的血清蛋白变化,发现弓形虫急性感染小

鼠血清中有特异性蛋白标志物。张英等^[17]应用双向电泳和质谱技术分析鉴定慢性弓形虫感染大鼠脊髓组织蛋白质,发现其损伤机制可能与能量代谢受阻和细胞增殖有关,并且蛋白质差异点将可能成为慢性弓形虫感染的治疗靶点。赵晓宇等^[18]对 16 日龄日本血吸虫童虫可溶性蛋白进行蛋白质双向电泳技术、质谱技术和生物信息学进行分离和分析,并对这些蛋白进行生物学功能预测,发现它们可能与寄生虫生物合成、能量代谢、信号传导和细胞构成等有关。独立的研究往往不能满足科研的需要,所以出现了不同水平组学技术结合的应用,从整体水平对不同层次的研究成果加以整合,使研究更为精细和准确。

5 小 结

结合转录组和蛋白组等技术,构建生物信息通路网络,从而更全面地解读生物体的代谢特征,应用于疾病诊断、药物毒性评价和植物基因功能等领域成为了研究热点。同时,越来越多的学者把代谢组学技术应用到寄生虫学方面的研究,对寄生虫病的早期预警和诊断提供基础,为寄生虫病的防治提供重要依据,更是揭示宿主与寄生虫之间相互作用的有力工具。代谢组学技术还需解决方法学的标准化和程序化,完善代谢产物数据库,仪器设备的小型化、经济化等问题,从而建立快速、准确、便捷的检测分析模式,这将会是代谢组学的新突破。

参 考 文 献

- [1] OLZVER F. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks[J]. Comparative and Functional Genomics, 2001, 2: 155-168.
- [2] 许国旺, 路鑫, 杨胜利. 代谢组学研究进展[J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29(6): 701-711.
- [3] 亓云鹏, 胡杰伟, 柴逸峰, 等. 代谢组学数据处理研究的进展[J]. 计算机与应用化学, 2008, 25(5): 1139-1142.
- [4] 吴惠凤, 莫景雄, 孙捷, 等. 艾滋病合并弓形虫脑炎的核磁共振成像表现特征[J]. 中国艾滋病性病, 2014, 20(7): 492-494.
- [5] 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: 1-10.
- [6] WANG Y, 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.
- [7] WU J, XU W, MING Z, et al. Metabolic changes reveal the development of schistosomiasis in mice [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(8): 23-24.
- [8] COHEN A M, RUMPEL K, COOMBS G H, et al. Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii*[J]. Int J Parasitol, 2002, 32(1): 39-51.
- [9] CHENG G F, LIN J J, FENG X G, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing [J]. Proteomics, 2005, 5(2): 511-521.
- [10] Lee Y H, Kin K Y, Kang M S. Detection of *Toxoplasma* antigens and antibodies in mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*[J]. Korean J Parasitol, 1995, 33(3): 201-210.
- [11] 施祖灏, 张小燕, 卜士金, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测肌肉中 9 中化学合成类抗球虫药多残留 [J]. 色谱, 2012, 30(9): 883-888.
- [12] 党晓群, 马强, 林立鹏, 等. 家蚕微孢子虫水蛋白解酶的活性检测及质谱鉴定和序列分析[J]. 蚕业科学, 2012, 38(2): 281-287.
- [13] 谢丽. 家蚕微孢子虫总蛋白双向电泳及质谱技术分析平台的构建[D]. 重庆, 西南大学, 2005: 1-67.
- [14] 王盈予, 夏曦, 李晓薇, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡皮及脂肪组织中抗球虫类药物残留[J]. 分析化学, 2014, 42(3): 409-414.
- [15] 施寿容. 肉鸡腹水综合征的代谢组学和转录组学研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014, 11: 1-2.
- [16] 周永华, 黄玉政, 陶永辉, 等. 弓形虫急性感染小鼠血清蛋白质质谱分析的初步研究 [J]. 中国血吸虫防治杂志, 2012, 24(3): 311-314.
- [17] 张英, 周永华, 许永良, 等. 慢性弓形虫感染大鼠脊髓组织蛋白质的双向电泳分析和质谱鉴定 [J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(12): 912-915.
- [18] 赵晓宇, 姚丽晓, 孙安国, 等. 日本血吸虫童虫部分差异表达蛋白的质谱分析[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(1): 1-6.