

DOI:10.13350/j.cjpb.230705

• 论著 •

细粒棘球蚴感染小鼠血清的代谢组学分析*

李锦田^{1,2}, 罗黎^{1,3}, 林鑫^{1,3}, 艾尼娃尔·艾克拜^{1,3}, 郑向向⁴, 吐尔干艾力·阿吉^{1,2,*}(1. 新疆医科大学第一附属医院, 新疆乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学公共卫生学院;
3. 新疆医科大学第一临床医学院; 4. 北京邮电大学电子工程学院)

【摘要】 目的 检测分析感染细粒棘球蚴的囊型包虫病(cystic echinococcosis, CE)小鼠与健康小鼠血清代谢产物的差异性,从代谢组学层面为CE的早期诊断和发病机制研究提供依据。方法 门静脉注射感染细粒棘球蚴原头蚴,建立CE小鼠模型。用液相色谱质谱联用技术(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)分别对CE小鼠和对照组小鼠血清进行检测,采用无监督的主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)、正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)及学生t检验筛选差异代谢物,并对其进行层次聚类和代谢通路富集分析。结果 PLS-DA和OPLS-DA分析两组血清共获得198个显著差异代谢产物,显著上调的代谢产物有88个,显著下调的代谢产物有110个。与对照组比较,CE组小鼠血清中辅酶Q8、磷脂酸、肾上腺素、胆碱、5-氨基酮草酸、L-异亮氨酸、L-缬氨酸、肌酸和 γ -氨基丁酸等含量增多,L-精氨酸、D-甘油酸、胆碱磷酸、谷胱甘肽、前列腺素、花生四烯酸和溶血磷脂酰胆碱等代谢物含量均显著减少(均 $P < 0.01$)。胆碱(AUC=1, $P < 0.01$)、肌酸(AUC=0.97, $P < 0.01$)、L-缬氨酸(AUC=0.902, $P < 0.01$)、溶血磷脂酰胆碱(AUC=0.899, $P < 0.01$)与花生四烯酸(AUC=0.838, $P < 0.01$)代谢物的受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)下面积均大于0.75,被选为具有诊断价值的候选生物标志物。差异代谢物富集精氨酸和脯氨酸代谢、脂肪代谢调节、醛固酮的合成与分泌代谢途径。结论 小鼠感染细粒棘球蚴早期血清中存在差异代谢产物,其与氨基酸代谢、脂肪代谢途径密切相关,但将血清中的差异代谢产物作为CE早期感染诊断的生物标志物仍需进一步筛选与验证。

【关键词】 囊型包虫病;血清;代谢组学;生物标志物**【中图分类号】** R532.32**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2023)07-0770-07

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jul;18(7):770-776.]

Metabolomics analysis of serum in mice infected with *Echinococcus granulosus*

LI Jintian^{1,2}, LUO Li^{1,3}, LIN Xin^{1,3}, AIKEBAI Ainiwaer^{1,3}, ZHENG Xiangxiang⁴, AJI Tuerganaili^{1,2}

(1. The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054; 2. School of Public Health, Xinjiang Medical University; 3. The First Clinical College of Medicine, Xinjiang Medical University; 4. School of Electronic Engineering, Beijing University of Posts and Telecommunications) ***

【Abstract】 **Objective** To investigate the differences in serum metabolites between cystic echinococcosis (CE) mice infected with *Echinococcus granulosus* (Eg) and healthy mice, which provided a basis for the early diagnosis and pathogenesis of CE. **Methods** The CE mice model was established by portal vein injection of protoscoleces. Serum samples from CE mice and healthy mice were detected by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Unsupervised principal component analyses (PCA), partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA), orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) and student's t test were used to screen out the differential metabolites, and hierarchical clustering and metabolic pathway enrichment analysis were performed. **Results** 198 serum metabolites between two groups were obtained by PLS-DA and OPLS-DA analysis, 88 metabolites were significantly up-regulated and 110 metabolites were significantly down-regulated. Compared with the control group, the contents of coenzyme Q8, phospholipid acid, epinephrine, choline, 5-amino-antagonic oxalic acid, L-isoleucine, L-valine, creatine and γ -aminobutyric acid in serum of CE mice were increased. The contents of L-arginine, D-glyceric acid, cholinophosphate, glutathione, prostaglandin, arachidonic acid and lysophosphatidylcholine were decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The area under receiver operating characteristic (ROC) curve of choline (AUC=1, $P < 0.01$), creatine (AUC=0.97, $P < 0.01$), L-valine (AUC=0.902, $P < 0.01$), lysophosphatidylcholine (AUC=0.899, $P < 0.01$) and arachidonic acid (AUC

* **【基金项目】** 新疆维吾尔自治区自然科学基金重点项目(No. 2022D01D17)。** **【通讯作者】** 吐尔干艾力·阿吉, E-mail: tuergan78@sina.com**【作者简介】** 李锦田(1995-),女,新疆乌鲁木齐人,博士在读。研究方向:棘球蚴感染机制。E-mail:1627149187@qq.com

=0.838, $P < 0.01$) was greater than 0.75, and they were selected as candidate biomarkers with diagnostic performance. Differential metabolites enriched arginine and proline metabolism, lipid metabolism regulation, aldosterone synthesis and secretion metabolic pathways. **Conclusion** Metabolomics provides a reference for the diagnosis and screening of CE with high sensitivity and specificity. The serum differential metabolites during the early host infection of Eg are closely related to amino acid metabolism and lipid metabolism pathway. The valuable serum biomarkers of early CE infection still need to be further verified and studied.

【Key words】 cystic echinococcosis; serum; metabolomics; candidate biomarkers

囊型包虫病(cystic echinococcosis, CE)是由细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*, Eg)的中绦期幼虫感染引起的人畜共患寄生虫疾病,该幼虫主要寄生于人体肝脏和肺部^[1]。CE在北非、近东和中东、中亚、俄罗斯东部、南美洲和中国西部发病率高^[2],尤其在畜牧业发达地区的中间宿主(人类和家畜)和终宿主(犬科动物)中传播广泛且危害严重^[3]。Eg在宿主脏器中成功寄生后,生长发育形成由囊壁包裹着充满液体的囊泡,生长潜伏期长达10~15年。CE早期无明显症状,患者多在中晚期出现临床症状后就医,增加了疾病的复杂性且需耗费大量的医疗资源^[4-5]。CE诊断主要依赖于影像学 and 血清学检测,然而彩色多普勒超声和电子计算机断层扫描影像学检测直径小于2 cm的病灶仍是个挑战^[1]。血清学诊断CE的灵敏度和特异度为60%~90%^[6-7],假阳性和假阴性的发生常会造成误诊或漏诊^[8-9]。因此亟待开发一种灵敏特异的CE早期诊断检测方法。

代谢组学作为继基因组学和蛋白组学后新兴的高通量代谢组,代谢产物与表征、现象之间的联系更加紧密^[10]。机体因病原体入侵细胞代谢发生变化,其中小分子代谢物能够反映病理生理过程中的生物反应^[11]。液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)非靶向代谢技术广泛用于分析肝癌、肝硬化及病毒性肝炎患者血清中差异代谢产物研究,以筛选潜在的血清生物标记物^[12-13],为疾病的早期诊断和肝病损伤疾病分子机制研究提供参考。

寄生虫基因组学和转录组学测序表明,Eg具有完整的糖酵解、三羧酸循环和磷酸戊糖途径,但自身缺乏氨基酸、核苷酸和脂质合成能力,其生长发育对宿主体内关键代谢物的依赖性^[14-15]。Eg在宿主体内寄生生长为囊泡,囊液中游离氨基酸浓度高于CE患者血清浓度^[16]。使用放射性元素在体外培养Eg实验中标记脂质,发现Eg自身能够摄取周围环境中的胆固醇以促进自身生长发育^[17]。Novak等^[18]报道感染多房棘球绦虫的沙鼠肾脏、脾脏和器官中葡萄糖水平降低,且肝脏中的糖原水平也降低。Zhu等^[19]采用LC-MS/MS方法检测感染Eg小鼠肝脏和粪便中的代谢产物,结果表明氨基酸代谢、核苷酸代谢在CE感染过程中

发挥重要作用。本实验拟使用LC-MS非靶向代谢组学技术结合多元统计分析研究CE小鼠血清中的差异代谢物,鉴定代谢途径并寻找潜在代谢标志物,为CE的早期诊断和分子机制研究提供参考。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物 体重18~20 g、8周龄C57雌性小鼠20只,购于新疆医科大学动物实验中心。本研究获得新疆医科大学第一附属医院伦理委员会批准(批准号:20211015-53)。

1.2 主要试剂及仪器设备 色谱级甲醇、甲酸、水、乙腈均购自美国Thermo公司,L-2-氯苯丙氨酸(分析纯)购自上海恒创生物科技有限公司。QE plus高分辨质谱仪为美国赛默飞世尔科技公司生产;ACQUITY UPLC I-Class plus高效液相色谱仪和ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm,1.8 μm)色谱柱,美国Waters公司生产。

2 方法

2.1 动物模型的建立 无菌条件下从感染细粒棘球绦虫的新鲜羊肝中获取细粒棘球绦虫原头蚴,悬浮于生理盐水中,4℃保存。使用小鼠麻醉机将小鼠麻醉消毒后在剑突下方开约1 cm长的切口,模型组通过肝脏门静脉注射0.2 mL含2 000只原头蚴的生理盐水混悬液,健康对照组小鼠注射等量生理盐水,5只/笼在清洁级环境中饲养。

2.2 血清制备与处理 建立模型3个月后将小鼠麻醉,心脏采血,制备血清。取血清100 μL,加入20 μL内标0.06 mg/mL L-2-氯苯丙氨酸,涡旋10 s;加入300 μL蛋白沉淀剂甲醇-乙腈(V:V=2:1),涡旋1 min,冰水浴超声提取10 min,-20℃下静置2 h,4℃、13 000 r/min离心10 min;取上清,使用0.22 μm的有机相针孔过滤器过滤150 μL并转移到液相进样小瓶进行LC-MS分析。将待测血清等体积混合制备质控样品用于评价整个实验过程中系统质谱平台的稳定性

2.3 LC-MS分析 采用ACQUITY UPLC I-Class plus超高效液相串联QE plus高分辨质谱仪组成的液质联用系统。色谱条件:ACQUITY UPLC HSS T3

色谱柱,45 °C柱温。流动相:流动相 A(含 0.1%甲酸的水),流动相 B(含 0.1%甲酸的乙腈)。梯度洗脱程序:0~2 min,5%流动相 B;2~4 min,30%流动相 B;4~8 min,50%流动相 B;8~10 min,80%流动相 B;10~15 min,100%流动相 B;15~16 min,5%流动相 B。流速:0.35 mL/min。进样体积:2 μL。质谱条件:ESI 离子源,分别采用正负离子扫描模式采集样品质谱信号。

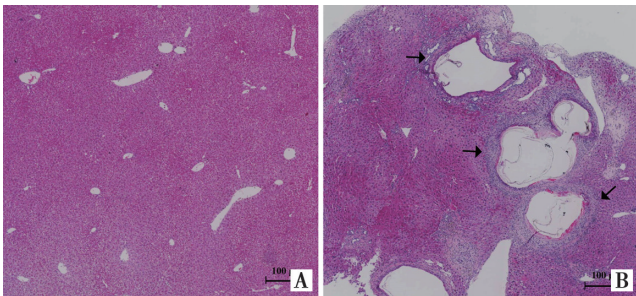
2.4 小鼠肝脏病理学检查 小鼠采血后脱颈处死,取肝脏组织,放入 4%多聚甲醛中固定,梯度乙醇脱水后石蜡包埋,4 μm 厚连续切片,置烤箱中过夜后用苏木素-伊红染色,显微镜下采图,观察病理学变化。

2.5 统计学分析 原始数据经代谢组学处理软件 Progenesis QI v2.3 行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐和归一化。多元统计分析先通过无监督的主成分分析(principal component analyses, PCA)观察各样品之间的总体分布和整个分析过程的稳定性,然后进行有监督的偏最小二乘法分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)及正交偏最小二乘法分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA),以区分各组间代谢物总体差异,找到组间的差异代谢物,利用京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库对差异代谢物进行注释,注释的 e 截止值设置为 0.3。采用 SPSS 20.0 软件进行单变量统计分析,潜在的诊断参照物筛选及性能评估采用 t 检验、差异倍数分析,以及受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)。

结 果

1 小鼠肝脏病理变化

为确定建立模型 3 个月后小鼠肝脏感染情况,对小鼠肝脏组织用苏木素-伊红染色,结果如图 1。健康对照组小鼠肝细胞形态正常,细胞核清晰;CE 组小鼠全部成功感染,肝脏中有囊泡病灶的角质层和生发层结构,病灶周围有炎性细胞浸润(图 1)。



A 健康小鼠对照 B CE 模型组小鼠肝脏病理变化

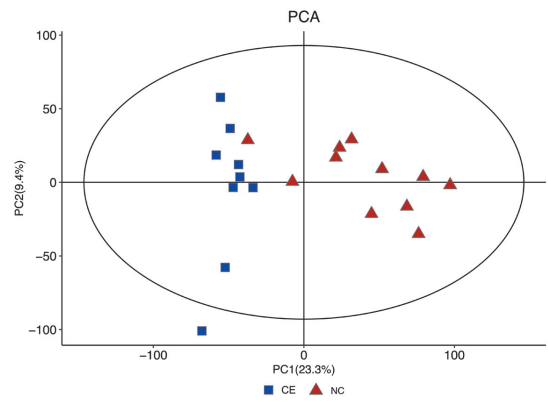
图 1 CE 模型组小鼠肝脏病理变化

A Healthy control mice B Liver pathology of CE model group

Fig. 1 Pathological morphology of mouse liver

2 PCA 分析

为确定 Eg 感染后血清中代谢物自然的分布情况,对 CE 组与对照组小鼠血清代谢物建立 PCA 模型。5 个预测主成分 PCA 模型 X 轴累积解释率为 0.525,椭圆区域代表 95%的置信区间,两组血清样品在第一主成分(principal component 1, PC1)解释率为 23.3%,在第二主成分(principal component 2, PC2)解释率为 9.4%,PC1 体现组间差异,PC2 体现组内差异,仍需进一步放大组间差异分析(图 2)。



注:横轴 PC1 和纵轴 PC2 分别表示排名第一和第二的主成分得分,蓝色分散点代表 CE 模型组,红色代表健康对照组。

图 2 小鼠血清代谢物 PCA 分析

Notes: The horizontal axis PC1 and the vertical axis PC2 represent the first and second ranked principal component scores, respectively. The blue scatter points represent the CE model group, and the red represents the healthy control sample.

Fig. 2 PCA diagram of CE group and control group

3 PLS-DA 分析

为建立代谢物表达量与样品分组之间的关系模型,对血清代谢物 3 个预测主成分建立 PLS-DA 模型来实现对样品类别的预测。X 轴累积解释率(R2X)为 0.654, Y 轴累积解释率(R2Y)为 0.993, PLS-DA 模型累积预测率为 0.968, R2Y 与累积预测率两者越接近 1,表明该模型更好地将 CE 组与对照组分离,代谢产物存在显著差异(图 3)。

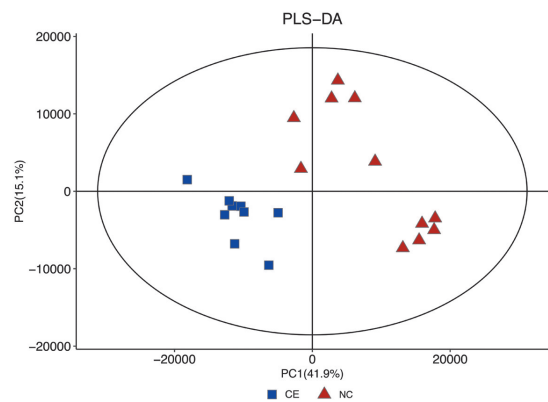


图 3 小鼠血清代谢物 PLS-DA 分析

Fig. 3 PLS-DA diagram of CE group and control group

4 OPLS-DA 分析

为了提高模型的解析能力和有效性,最大化凸显模型内部两组血清之间的差异,对血清代谢物 1 个预测主成分和 2 个正交主成分建立 OPLS-DA 模型。结果显示,CE 组小鼠和健康组小鼠血清样品在 OPLS-DA 得分图上具有显著的差异,所有样品均分布在 95% 的置信区间内, R2X 为 0.654, R2Y 为 0.993, 累积预测率为 0.949, 表明 OPLS-DA 方法模型具有稳健性和预测能力(图 4A)。采用 7 次循环交互验证和 200 次响应排序检验的方法考察模型的准确性,所建模型与真实模型的 Y 轴累积解释率(R2)共同构成的回归线截距为 0.77, 所建模型与真实模型的 Y 轴平均预测率(Q2)共同构成的回归线截距为 -0.557(图 4B)。

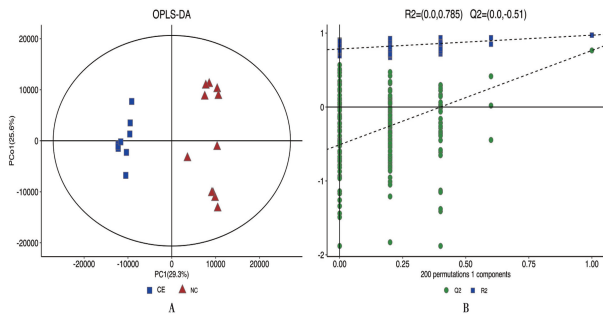


图 4 小鼠血清代谢物 OPLS-DA 分析(A)及 OPLS-DA 模型 200 次响应排序检验(B)
Fig. 4 OPLS-DA diagram of mice(A) and OPLS-DA model 200 response ranking test(B)

5 差异代谢物提取和解析

为了筛选两组血清组间差异代谢产物,采用 OPLS-DA 模型结合变量权重值(Variable importance

of projection, VIP)与单变量统计分析。两组血清中筛选出 5 880 个差异代谢产物,其中 3 492 个代谢产物上调,2 388 个代谢产物下调。其中,显著上调的代谢产物有 88 个,显著下调的代谢产物有 110 个。对显著差异代谢物含量进行层次聚类,更直观地展示两组血清样品之间代谢物的表达差异(图 5)。正离子检测模式下有 141 个差异代谢产物,负离子检测模式下有 57 个差异代谢产物($P < 0.05$, $VIP > 1$)。在正离子模式下与对照组比较,CE 组小鼠血清中辅酶 Q8、磷脂酸、肾上腺素、肉碱、4-胍基丁酸、L-缬氨酸、肌酸和 γ -氨基丁酸等含量显著增多,生物碱、甲基异戊酮、L-精氨酸和花生四烯酸等含量显著减少(均 $P < 0.01$);在负离子模式下,CE 组小鼠血清中尿囊素、5-氟苯基二氢吡喃酮等含量显著增多,D-甘油酸、胆碱磷酸、谷胱甘肽、前列腺素、白三烯和溶血磷脂酰胆碱等含量显著减少(均 $P < 0.01$)(图 6)。通过 ROC 分析主要差异代谢产物在 CE 诊断中的特异性与敏感性(表 1),代谢物的重要程度依次为胆碱(AUC = 1, $P < 0.01$)、肌酸(AUC = 0.97, $P < 0.01$)、L-缬氨酸(AUC = 0.902, $P < 0.01$)、溶血磷脂酰胆碱(AUC = 0.899, $P < 0.01$)和花生四烯酸(AUC = 0.838, $P < 0.01$)。ROC 曲线下面积越大,该代谢产物的诊断性能越好(图 7)。

6 差异代谢物代谢通路富集分析

对 198 个差异代谢产物在 KEGG 数据库中进行注释,得到 45 个有注释的代谢产物的 KEGG ID,富集后将排序前 20 的代谢通路制作气泡图。CE 组与对照组之间的差异代谢产物涉及多种途径,包括能量代谢、物质运输和信号传导。精氨酸和脯氨酸代谢、脂肪细胞脂解的调节和醛固酮的合成与分泌代谢途径与包虫

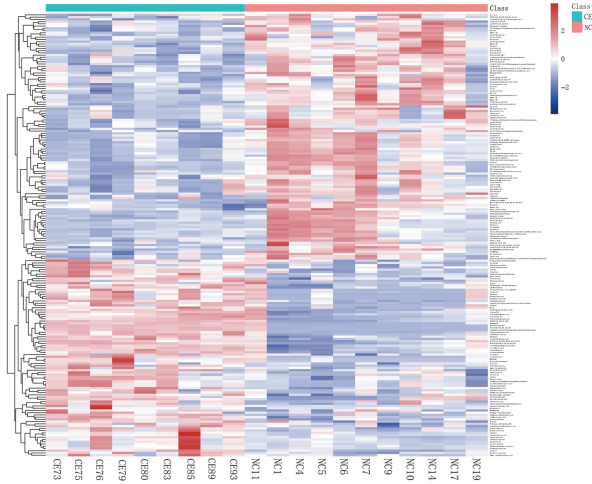
表 1 血清主要差异代谢物峰值强度及 AUC(95% CI)
Table 1 Serum peak intensity and AUC(95% CI) of major differences in metabolites

序号 No.	代谢产物 Metabolite	VIP	P	差异倍数(CE/NC) Fold change(CE/NC)	变化趋势 Variation trend	灵敏度(%) Sensitivity	特异度(%) Specificity	AUC
1	溶血磷脂酰胆碱	6.73	<0.01	0.77	↓	88.89	81.82	89.90
2	L-缬氨酸	4.36	<0.01	1.30	↑	77.78	90.91	90.90
3	肌酸	3.71	<0.01	1.35	↑	100.00	81.82	97.00
4	L-异亮氨酸	3.47	<0.05	1.38	↑	66.67	81.82	77.80
5	L-精氨酸	3.24	<0.01	0.36	↓	66.67	100.00	89.90
6	胆碱	3.23	<0.01	4.32	↑	100.00	100.00	100.00
7	花生四烯酸	3.03	<0.01	0.64	↓	88.89	81.82	83.80
8	磷脂酸	2.07	<0.01	0.69	↓	88.89	81.82	85.90
9	肾上腺酮	1.70	<0.01	1.40	↑	100.00	63.63	86.89
10	5-氨基喹草酸	1.65	<0.01	1.47	↑	66.67	100.00	86.90
11	N-氨基甲酰肌氨酸	1.62	<0.01	2.21	↑	100.00	90.91	99.00
12	牛磺酸	1.36	<0.05	1.23	↑	88.89	81.82	85.90
13	谷胱甘肽	1.31	<0.01	1.60	↑	88.89	81.82	84.80
14	三乙醇胺	1.21	<0.01	5.43	↑	100.00	72.73	92.90
15	瓜氨酸	1.17	<0.05	1.25	↑	88.89	81.82	85.90

注: ↓ 表示代谢产物含量降低; ↑ 表示代谢产物含量增加。

Notes: ↓ indicates that the content of metabolites decreases; ↑ indicates that the content of metabolites increased.

病的发生发展显著相关,代谢通路主要为 GnRH 信号通路、mTOR 信号通路,并富集到的疾病种类为病毒感染性或寄生虫疾病(图 8)。CE 组与对照组之间代谢途径差异越显著,参与某一途径的代谢分子数量越多,主要有花生四烯酸、肌酸、谷胱甘肽、L-精氨酸、L-异亮氨酸、L-缬氨酸、胆碱等差异代谢产物(表 1)。

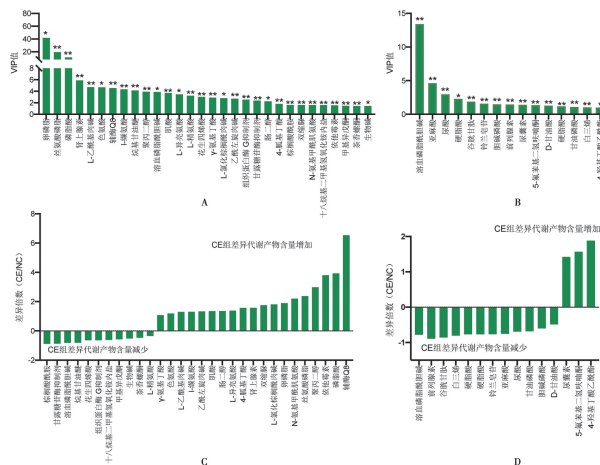


注:横坐标表示 CE 模型组(CE)和健康对照组(NC)血清样品名称,纵坐标表示差异代谢物,颜色越红表示两组血清差异代谢物的表达丰度越高,越蓝表示两组血清差异代谢物的表达丰度越低。

图 5 小鼠血清差异代谢物热图

Notes: The horizontal axis represents the names of serum samples of CE model group(CE) and healthy control group(NC), and the vertical axis represents the differential metabolites. The redder color indicates the higher expression abundance of differential metabolites in serum of the two groups, and the bluer color indicates the lower expression abundance of differential metabolites in serum of the two groups.

Fig. 5 Differential metabolite heat map between CE group and healthy control group



注:LC-MS 正离子模式下 CE 组和 NC 组小鼠血清主要差异代谢产物的 VIP 值(图 A)与差异倍数(图 C)组间比较;LC-MS 负离子模式下主要差异代谢产物的 VIP 值(图 B)与差异倍数(图 D)组间比较。(* P<0.05; * * P<0.01)。

图 6 小鼠血清差异代谢产物筛选

Notes: VIP values (A) and Fold Change (C) of the main differential metabolites in the positive ion mode of LC-MS; VIP values (B) and Fold Change (D) of major differential metabolites in LC-MS anion mode. (* P<0.05; * * P<0.01)。

Fig. 6 Screening of serum differential metabolites in mice

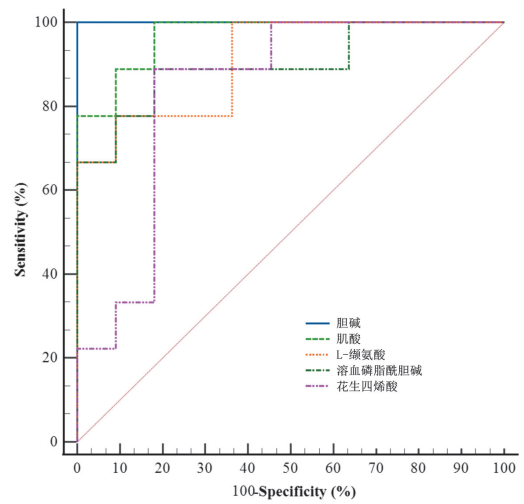
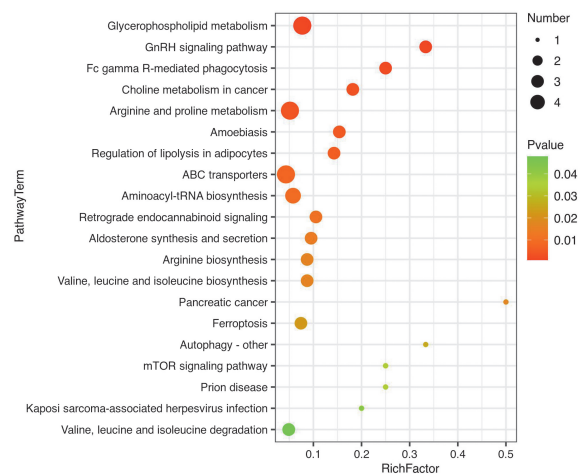


图 7 ROC 分析差异代谢产物对疾病的预测能力
Fig.7 ROC analysis to test the prediction power of differential metabolites



注:纵轴为代谢通路名称,横轴为富集因子。富集因子越大,富集程度越大;颜色由绿到红表示 P 值依次降低;点直径越大,代谢物数量越多。

图 8 差异代谢产物的代谢通路富集气泡图

Notes: The vertical axis is the name of metabolic pathway, and the horizontal axis is the enrichment factor. The larger the enrichment factor, the greater the enrichment degree. Color from green to red indicates a decreasing P-value; The larger the dot diameter, the greater the number of metabolites.

Fig. 8 Bubble diagram of metabolic pathway enrichment of differential metabolites

讨论

手术切除和药物治疗是 CE 主要的治疗方式^[20],早期诊断 CE 可使患者能及时得到治疗,并能改善预后和生存率。本研究采用 LC-MS/MS 技术结合多变量统计方法分析 Eg 早期感染小鼠血清中代谢产物的显著变化,结果显示该变化与氨基酸代谢(精氨酸、L-异亮氨酸、L-缬氨酸)、脂肪酸代谢(胆碱、溶血磷脂胆碱、磷脂酸、硬脂酸)途径密切相关,差异代谢产物富集至 mTOR 信号通路, Eg 感染过程中宿主能量代谢可能受到干扰。这些代谢差异可能为 CE 早期感染过程

中生物学机制和诊断生物标志物提供参考。

肝脏器官是机体合成代谢和发挥免疫功能的重要场所,临床上 CE 患者的囊泡病灶 70% 在肝脏^[21]。以往研究中,通过腹腔注射 Eg 方式建立的继发感染 CE 小鼠模型常用于筛选潜在化合物治疗 CE 的药效学研究^[22-23]。本研究采用小鼠肝门静脉注射 Eg 方式建立的原发感染 CE 模型与 CE 患者的临床病理特征一致,能够更好地展现 Eg 寄生肝脏后宿主血清中代谢物改变。与对照组对比,CE 组小鼠血清中胆碱含量显著增加,1H 核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)光谱显示 CE 患者囊泡病灶液体中胆碱产生高强度共振,可能是寄生虫的细胞壁分泌的胆碱化合物^[24],在棘球绦虫胆碱能神经系统中发挥生长发育重要作用^[25]。另外,溶血磷脂酰胆碱作为生物标志物在肝癌和肝硬化疾病中具有特异性诊断潜力^[26],且白三烯和花生四烯酸含量均降低,与嗜酸性粒细胞抗寄生虫作用相关^[27],可能作为早期 CE 潜在生物标志物。

从宿主体内获取能量来源对寄生虫的生长发育十分重要,阻断寄生虫的能量获取是抑制寄生虫生长的有效手段。世界卫生组织推荐治疗 CE 的阿苯达唑通过抑制细胞骨架微管蛋白合成^[28-29],破坏囊泡的代谢导致寄生虫死亡^[30-31]。与对照组对比,CE 组小鼠血清中磷脂胆碱、磷脂酸等脂质代谢中主要代谢产物含量降低,可能是由于 Eg 自身不能合成胆固醇,需从宿主体内获取胆固醇并在酶的作用下参与脂质代谢、氨基酸代谢与糖代谢途径^[14]。谷胱甘肽由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸组成。CE 组小鼠血清中谷胱甘肽含量升高,且在泡型包虫病患者血清经 1H NMR 血清代谢组学研究中谷氨酸和甘氨酸含量也升高^[32]。另外,CE 组小鼠血清中精氨酸、L-异亮氨酸、L-缬氨酸含量发生显著变化,可能是由于 CE 病灶寄生在肝脏器官造成肝脏损伤,导致机体氨基酸代谢平衡被破坏。

LC-MS 分析可用于药物潜在作用靶点和机制研究^[33]。本研究通过 LC-MS 分析表明 CE 小鼠与健康对照鼠血清差异代谢产物富集至 mTOR 信号通路,该信号通路在寄生虫能量代谢生长发育中发挥关键作用。mTOR 信号通路靶点抑制剂在 Eg 体外培养实验中能够显著抑制其活性^[34],其中,他克莫司可能通过 mTOR 信号通路影响宿主体内的能量代谢,降低囊泡中葡萄糖和 ATP 含量以抑制小鼠体内囊泡生长^[35]。另外,已经克隆获得 EgPI3K^[36]、EgAMPK^[23,24]、EgAKT^[37]等与 mTOR 信号通路相关的关键蛋白基因,生物信息学分析显示上述相关蛋白具有的保守结构域是抗寄生虫的潜在靶点,可进一步结合宿主与 Eg 本身代谢特点来促进 CE 治疗方法的改进。

LC-MS 非靶向代谢组学结合多变量分析方法能

够分析 Eg 感染后小鼠血清中的差异代谢产物。关于靶向脂质代谢和氨基酸代谢产物在 CE 致病性中的分子机制需进一步研究。

【参考文献】

- [1] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st Century[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2): e00075-18.
- [2] Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, et al. Global distribution of alveolar and cystic Echinococcosis[J]. Adv Parasitol, 2017, 95: 315-493.
- [3] Benazzouz S, Amri M, Wang J, et al. In vitro immunoregulatory activity and anti-inflammatory effect of *Echinococcus granulosus* laminated layer[J]. Acta Trop, 2021, 218: 105886.
- [4] Frider B, Larrieu E, Odriozola M. Long-term outcome of asymptomatic liver hydatidosis[J]. J Hepatol, 1999, 30(2): 228-231.
- [5] Stojkovic M, Weber TF, Junghans T. Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art and perspectives[J]. Curr Opin Infect Dis, 2018, 31(5): 383-392.
- [6] Zhang W, Li J, Mcmanus DP. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease[J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(1): 18-36.
- [7] Tamarozzi F, Silva R, Fittipaldo VA, et al. Serology for the diagnosis of human hepatic cystic echinococcosis and its relation with cyst staging: A systematic review of the literature with meta-analysis[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2021, 15(4): e0009370.
- [8] Stojkovic M, Adt HM, Rosenberger K, et al. Follow-up of surgically treated patients with cystic echinococcosis: Can novel recombinant antigens compete with imaging? Analysis of a patient cohort[J]. Trop Med Int Health, 2017, 22(5): 614-621.
- [9] Siles-Lucas M, Casulli A, Conraths FJ, et al. Laboratory diagnosis of *Echinococcus* spp. in human patients and infected animals[J]. Adv Parasitol, 2017, 96: 159-257.
- [10] Fiehn O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes[J]. Functional Genomics, 2002: 155-171.
- [11] 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.
- [12] Tsai TH, Song E, Zhu R, et al. LC-MS/MS-based serum proteomics for identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. Proteomics, 2015, 15(13): 2369-2381.
- [13] Pan HY, Wu QQ, Yin QQ, et al. LC/MS-based global metabolomic identification of serum biomarkers differentiating hepatocellular carcinoma from chronic hepatitis B and liver cirrhosis[J]. ACS Omega, 2021, 6(2): 1160-1170.
- [14] Zheng H, Zhang W, Zhang L, et al. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus* [J]. Nat Genet, 2013, 45(10): 1168-1175.
- [15] Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism[J]. Nature, 2013, 496(7443): 57-63.
- [16] Celik C, Amanvermez R, Ozkan K. Free amino acid concentra-

- tion in hydatid cyst fluids from fertile and infertile human and animal *Echinococcus granulosus* [J]. Parasite, 2001, 8(4): 343-348.
- [17] 姚民一, 肖树华, 冯建军, 等. 甲苯达唑对小鼠细粒棘球蚴囊壁与囊液的游离氨基酸成分的影响(英文)[J]. 中国药理学报, 1994, 15(6): 43-46.
- [18] Novak M, Modha A, Blackburn BJ. Metabolic alterations in organs of *Meriones unguiculatus* infected with *Echinococcus multilocularis* [J]. Comp Biochem Physiol B, 1993, 105(3-4): 517-521.
- [19] Zhu M, Du X, Xu H, et al. Metabolic profiling of liver and faeces in mice infected with echinococcosis [J]. Parasit Vectors, 2021, 14(1): 324.
- [20] Hemphill A, Stadelmann B, Rufener R, et al. Treatment of echinococcosis; albendazole and mebendazole—what else? [J]. Parasite, 2014, 21: 70.
- [21] Ahmadnia S, Moazeni M, Mohammadi-Samani S, et al. *In vivo* evaluation of the efficacy of albendazole sulfoxide and albendazole sulfoxide loaded solid lipid nanoparticles against hydatid cyst [J]. Exp Parasitol, 2013, 135(2): 314-319.
- [22] Gottstein B, Soboslay P, Ortona E, et al. Immunology of Alveolar and Cystic Echinococcosis (AE and CE) [J]. Adv Parasitol, 2017, 96: 1-54.
- [23] Stettler M, Rossignol JF, Fink R, et al. Secondary and primary murine alveolar echinococcosis; combined albendazole/nitazoxanide chemotherapy exhibits profound anti-parasitic activity [J]. Int J Parasitol, 2004, 34(5): 615-624.
- [24] Garg M, Chawla S, Prasad K N, et al. Differentiation of hydatid cyst from cysticercus cyst by proton MR spectroscopy [J]. NMR Biomed, 2002, 15(5): 320-326.
- [25] 刘川川, 樊海宁, 马兰, 等. 棘球绦虫和其它寄生性绦虫乙酰胆碱酯酶和烟碱型乙酰胆碱受体作为潜在药物靶点的研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(12): 1122-1129.
- [26] 宋丹军, 潘家琪, 李鹏旭, 等. 溶血磷脂酰胆碱在肝脏疾病中的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(12): 1642-1646.
- [27] 郑梦凝, 叶贤伟. 血嗜酸性粒细胞增多症与寄生虫感染 [J]. 中国实用内科杂志, 2021, 41(12): 1007-1011.
- [28] Garcia-Llamazares JL, Alvarez-De-Felipe AI, Redondo-Carda PA, et al. *Echinococcus granulosus*: membrane permeability of secondary hydatid cysts to albendazole sulfoxide [J]. Parasitol Res, 1998, 84(5): 417-420.
- [29] Lacey E. Mode of action of benzimidazoles [J]. Parasitol Today, 1990, 6(4): 112-115.
- [30] Perez-Serrano J, Denegri G, Casado N, et al. *In vivo* effect of oral albendazole and albendazole sulphoxide on development of secondary echinococcosis in mice [J]. Int J Parasitol, 1997, 27(11): 1341-1345.
- [31] Naguleswaran A, Spicher M, Vonlaufen N, et al. *In vitro* meta-cestodocidal activities of genistein and other isoflavones against *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus granulosus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(11): 3770-3778.
- [32] 宋戈. 肝包虫病患者血清代谢组学研究 [D]. 青海大学, 2017.
- [33] Griffin JL. Twenty years of metabonomics; so what has metabonomics done for toxicology? [J]. Xenobiotica, 2020, 50(1): 110-114.
- [34] Muzhabaier M, Zheng HY, Ya FL, et al. *In vitro* effects of the mammalian target of rapamycin inhibitor deforolimus on *Echinococcus granulosus* protoscoleces [J]. J Pathogen Biol, 2017.
- [35] Muhedier M, Li J, Liu H, et al. Tacrolimus, a rapamycin target protein inhibitor, exerts anti-cystic echinococcosis effects both *in vitro* and *in vivo* [J]. Acta Trop, 2020, 212: 105708.
- [36] 赵辉, 刘辉. 细粒棘球绦虫 PI3K P110 亚基酪氨酸激酶区蛋白原核表达及其多克隆抗体制备 [J]. 新疆医科大学学报, 2016, 39(05): 569-572.
- [37] 李锦田, 马瑞丽, 吕国栋, 等. 细粒棘球绦虫蛋白激酶 B AKT2 的生物信息学及系统发育树分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(12): 1411-1416, 1421.

【收稿日期】 2023-01-11 【修回日期】 2023-03-25

(上接 769 页)

- [15] Saha S, Raghava GP. Prediction of continuous B-cell epitopes using recurrent neural network [J]. Proteins, 2006, 65(1): 40-48.
- [16] 杨晶雪, 倪孟颖, 吴长德. 艰难梭菌毒素功能区的免疫原性及其疫苗应用的研究进展 [J]. 现代畜牧兽医, 2014, 312(11): 46-50.
- [17] 刘俊枫, 李刚, 臧一铭, 等. 宁夏地区临床腹泻患者艰难梭菌感染及危险因素 [J/OL]. 中华医院感染学杂志, 2022(24): 3687-3691.
- [18] Rahmati A, Gal M, Northey G, et al. Subtyping of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction (PCR) ribotype 001 by repetitive extragenic palindromic PCR genomic finger-printing [J]. J Hosp Infect, 2005, 60: 56-60.
- [19] 惠亮亮. 腹泻患者艰难梭菌 TPI 蛋白表达的临床研究及机制初探 [D]. 南京: 南京医科大学, 2017.
- [20] 王姝懿, 李建云, 胡艳红, 等. 鼠疫耶尔森菌 Chro392 基因的生物信息学分析及抗原表位预测 [J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(3): 303-307.
- [21] 肖静, 曲晨, 赵嘉庆. 细粒棘球绦虫抗原 Fis1 的生物信息学分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(2): 191-194.
- [22] Jahangiri F, Jalallou N. Analysis of Apical Membrane Antigen (AMA)-1 characteristics using bioinformatics tools in order to vaccine design against *Plasmodium vivax* [J]. Infect Gene Evol, 2019(71): 224-231.

【收稿日期】 2023-02-13 【修回日期】 2023-05-03