

阿里野血牦牛与家养牦牛血液代谢组比较分析

洛桑顿珠^{1,2}, 俄广鑫³, 张强^{1,2}, 平措占堆^{1,2}, 王洪壮^{1,2}, 次旦央吉^{1,2}, 巴桑旺堆^{1,2*}

(1. 省部共建青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室, 西藏 拉萨 850000; 2. 西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所, 西藏 拉萨 850000; 3. 西南大学动物科学技术学院, 重庆 400417)

摘要: 本研究旨在利用质谱技术鉴定野血牦牛与家养牦牛血清中化学衍生物的差异, 以明确长期受到高原生态环境自然选择下, 野血牦牛更优环境适应性的代谢机制。本研究利用串联质谱技术对西藏阿里改则县的5头野血牦牛和5头家养牦牛的血清进行代谢组功能分析, 共鉴定到574个代谢相关化学衍生物, 其中比例最高的是有机酸及其衍生物和氨基酸及其衍生物, 21种代谢物质差异显著, 较家养牦牛, 野血牦牛有7类化学代谢物(邻甲氧基苯甲酸、9,12-十八碳二烯酸、3,4,5-三甲氧基肉桂酸等)显著上调, 14类化学代谢物(前列腺素E2、氧化三甲胺、羧基二十碳五烯酸等)显著下调。其中7类化学衍生物(5-羟基吲哚-3-乙酸、鸟苷、尿素、前列腺素E2、皮质醇、5-甲氧基色胺、3-甲基吲哚)富集于31个KEGG信号通路, 包括组织系统(Organismal Systems)、代谢(Metabolism)、人类疾病(Human Disease)、环境信息过程(Environmental Information Processing)。本研究通过代谢组比较分析, 进一步明确了野血牦牛优异的环境适应性代谢基础, 同时鉴定到野血牦牛中富含一系列(鸟苷、5-甲基-2'-脱氧饱和糖苷、邻甲氧基苯甲酸等)已明确与心脑血管疾病相关药的化学衍生物, 为今后开发抗高原病相关药物开发提供借鉴参考。

关键词: 牦牛; 代谢组; 化学衍生物; 高原适应性; 质谱技术

中图分类号: S823.8⁺5

文献标志码: A

Comparative analysis blood metabolomes between Ali wild blood yak and domestic yak using mass spectrometry

Luosandunzhu^{1,2}, E Guangxin³, ZHANG Qiang^{1,2}, Pingcuozhandui^{1,2}, WANG Hongzhuang^{1,2}, Cidanyangji^{1,2}, Basangwangdui^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Barley and Yak Germplasm Resources and Genetic Improvement, Tibet Lhasa 850000, China; 2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Tibet Academy of Agricultural and Animal Sciences, Tibet Lhasa 850009, China; 3. School of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing, 400417, China)

Abstract: The purpose of this study was to identify differences of chemical derivatives in serum between wild blood yak and domestic yak by mass spectrometry, so as to clarify the metabolic mechanism of better environmental adaptability of wild blood yak under the long-term natural selection of plateau ecological environment. The study used tandem mass spectrometry technology to analyze the functional components in the serum of 5 wild blood yaks and 5 domestic yaks from Gaize County, Ali, Tibet. The results shown that a total of 574 metabolism-related chemical derivatives were identified, among which organic acids and their derivatives as well as amino acids and amino acid derivatives accounted for the largest proportion. 21 metabolites showed significant differences between groups. Compared with domestic yak, 7 kinds of chemical metabolites (such as o-methoxybenzoic acid, 9,12-octadecadienoic acid, 3,4,5-trimethoxyl cinnamic acid, etc.) were significantly up-regulated, and 14 kinds of chemical metabolites (such as prostaglandin E2, trimethylamine oxide, hydroxyeicosapentaenoic acid) were significantly down-regulated in wild blood yak. Among them, 7 chemical derivatives (5-hydroxyindole-3-acetic acid, guanosine, urea, prostaglandin E2, cortisol, 5-methoxytryptamine, 3-methylindole) were enriched in 31 KEGG signals pathways, including organismal systems, metabolism, human disease, and environmental information processing. The comparative analysis of serum metabolomes in this study not only further clarified the metabolic basis for the excellent environmental adaptation of wild blood yak, but also identified that wild blood yak is rich in a series of metabolic materials (guanosine, 5-methyl-2'-Deoxysaturated glycosides, o-toluic acid, etc.) which have been confirmed related to cardiovascular and cerebrovascular disease-related drugs, providing reference for the development of anti-altitude disease-related drugs in the future.

Key Words: Yak; metabolome; chemical derivatives; plateau adaptation; mass spectrometry

收稿日期: 2023-09-25

基金项目: 国家肉牦牛产业技术体系(CARS-37); 基于16S rRNA基因测序分析改则县野血牦牛与家养牦牛肠道微生物群落多样性研究项目(XZ202101ZR0080G); 阿里地区改则县野血牦牛健康养殖营养调控技术与示范项目(QYXTZX-AL2021-02); 牦牛种业创新与健康养殖项目(XZ202101ZD0002N); 藏区牦牛藏羊选育提高与高效健康养殖集成示范项目(2022YFD1302100)。

作者简介: 洛桑顿珠(1989-), 男, 本科, 助理研究员, 主要从事牦牛繁育研究, E-mail: 382665675@qq.com; *为通信作者: 巴桑旺堆(1968-), 男, 本科, 研究员, 主要从事牦牛饲养管理研究, E-mail: bw_0891@126.com。

代谢组学是指在特定条件下对细胞、组织或生物体中小分子代谢物进行定性和定量分析^[1]。代谢组学作为发展最快的“组学”技术分支之一,在农业上可用于研究非生物胁迫耐受性、植物化学成分分析、药物研发、作物辅助育种和发现潜在的肉质新型生物标志物^[2-5]。同时,代谢组学常用于确定参与复杂临床表型的生物标志物,从而检测出针对特定疾病或治疗、干预的细微代谢差异,获得疾病的特征性代谢谱^[6-8]。

野血牦牛经过自然选择而进化拥有的优良高寒逆境适应能力,在体格特征、抗逆性等方面均优于家牦牛^[9]。作为牦牛种业创新发展、产业提质增效的宝贵资源,野血牦牛对当地牧业经济和民生发展具有重要意义。近年来,通过引入野牦牛基因对家牦牛进行复壮改良的研究发现,含有野牦牛基因的野血牦牛在体型特征、生产性能、遗传特性等方面,与家牦牛相比均显著提高,显示了野血牦牛强大的遗传潜力^[10-12]。研究野血牦牛血液代谢物成分及其与家养牦牛的比较,有助于理解高原适应性机制,同时也有助于鉴定在自然选择压力下,高原物质长期适应性进化而形成的特殊药用价值及功能成分,为拓宽抗高原药物筛选提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物与样品制备

在西藏阿里市改则县收集家养母牦牛5头(J组)及具有25%~50%野血牦牛血统的母牦牛5头(Y组)。野血牦牛是家养牦牛与纯野血牦牛杂交的子一代,以及含有50%野血牦牛血统的母牦牛与家养公牦牛的子一代,野血牦牛样本为本项目组持续跟踪牦牛个体。采集静脉血5 mL,37℃静置2 h后,4 000 r/min,4℃条件下离心10 min,吸取上清液得到澄清血清,随即转置-80℃超低温冰箱。

1.2 试验样品测定

从-80℃冰箱中取出样品于冰上解冻至完全融化;涡旋振荡10 s混匀,取样本50 μL加入至离心管中,加入300 μL纯甲醇内标提取液;涡旋3 min并于12 000 r/min,4℃条件下离心10 min;吸取上清液200 μL到另一个离心管中,-20℃冰箱中静置30 min;12 000 r/min,4℃条件下再离心3 min;取150 μL上清液于对应进样瓶内衬管中,用于上机分析。数据采集仪器系统利用串联质谱(Tandem mass spectrometry, MS/MS) AB sciex qtrap 6500

(QTRAP®,美国)^[13-14]。数据测定及质控委托武汉迈特维尔生物科技有限公司(武汉)执行。

1.3 差异代谢物分析与功能注释

代谢组学数据采取fold change和OPLS-DA模型^[15-17]的VIP值相结合的方法来筛选差异代谢物。筛选标准,选取fold change≥2和fold change≤0.5的代谢物。代谢物在对照组和实验组中差异为2倍以上或0.5以下,且选取VIP≥1的代谢物。VIP值表示对应代谢物的组间差异在模型中各组样本分类判别中的影响强度,一般认为VIP≥1的代谢物则为差异显著。

2 结果与分析

在10个样本中,共鉴定到574个代谢相关化学衍生物,其中比例最高的是有机酸及其衍生物(98/574)、核苷酸及其代谢物(43/574)、酰基肉碱(55/574)、氨基酸及其衍生物(90/574)等,比例最低的为胆碱类(胆碱)、甘油二酯(亚油酸甘氨酸)、磷脂酰乙醇胺(磷脂酰肌醇)类等,且仅有单类物质检出。组间差异比较结果显示,共计21种代谢物质存在组间差异。野血牦牛较家养牦牛血清中有7类化学代谢物质显著上调,包括邻甲氧基苯甲酸、9,12-十八碳二烯酸、3,4,5-三甲氧基肉桂酸、皮质醇、1,2-十二烷酰PC、5-甲氧基色胺和L-亮氨酸-L-缬氨酸。14类显著下调,如5-羟基吡啶-3-乙酸、前列腺素E2、氧化三甲胺、羟基二十碳五烯酸等(表1)。

功能富集结果显示,共有7个化学衍生物(5-羟基吡啶-3-乙酸、鸟苷、尿素、前列腺素E2、皮质醇、5-甲氧基色胺、3-甲基吡啶)富集于31个KEGG信号通路,并归为组织系统(Organismal Systems)、代谢(Metabolism)、人类疾病(Human Disease)、环境信息过程(Environmental Information Processing)4类。其中值得注意的是大量与代谢相关通路被富集,如嘌呤代谢(Purine metabolism)、色氨酸代谢(Tryptophan metabolism)、花生四烯酸代谢(Arachidonic acid metabolism)、脂肪细胞中脂解的调节(Regulation of lipolysis in adipocytes)、精氨酸和脯氨酸代谢(Arginine and proline metabolism)及生物素代谢(Biotin metabolism)等。除此之外。还包括大量免疫类及疾病信号通路,如人类巨细胞病毒感染(Human cytomegalovirus infection)、人乳头状瘤病毒感染(Human papillomavirus infection)、癌症的

表1 野血牦牛F1代较家养牦牛血清中显著差异表达的
化学衍生物及活性物质

数据库代码	化学组成	中文名称	VIP值	Fold_Change 值	Log2FC 值	上/下调
MEDN0090	C8H8O3	邻甲氧基苯甲酸	1.636642	2.521118	1.334064	上调
MEDN0160	C10H13N5O5	鸟苷	1.167895	0.000174	-12.487	下调
MEDN0263	C10H9NO3	5-羟基吡咯-3-乙酸	1.020016	0.469818	-1.08982	下调
MEDN0793	C20H32O5	前列腺素 E2	1.645827	0.427904	-1.22464	下调
MEDN1069	C18H28O2	9,12-十八碳二烯酸	1.940988	2.32599	1.217845	上调
MEDN1077	C24H40O5	α -鼠胆酸	1.712088	0.230881	-2.11478	下调
MEDN1119	C19H28O2	反式脱氢松香酮	1.728962	0.481537	-1.05428	下调
MEDN1126	C24H40O5	γ -鼠胆酸	1.683561	0.439692	-1.18543	下调
MEDN1284	C23H42NO7P	溶血磷脂酰乙醇胺 18:3	1.884162	0.469765	-1.08999	下调
MEDP0084	C3H9NO	氧化三甲胺	2.114922	0.156897	-2.67211	下调
MEDP0086	CH4N2O	尿素	1.536303	0.35642	-1.48835	下调
MEDP0289	C12H14O5	3,4,5-三甲氧基肉桂酸	1.058157	4.178876	2.063115	上调
MEDP0575	C9H14N4O5	阿卡地新	1.32127	0.392002	-1.35107	下调
MEDP0831	C3H9NO	DL-1-氨基-2-丙醇	2.114922	0.156897	-2.67211	下调
MEDP0889	C21H30O5	皮质醇	1.531387	2.23302	1.158996	上调
MEDP1096	C28H56NO8P	1,2-十二烷酰 PC	1.445668	6.200989	2.632498	上调
MEDP1157	C9H9N	3-甲基吡咯	1.598617	0.396042	-1.33628	下调
MEDP1460	C20H28O3	羧基二十碳五烯酸	1.1689	0.000113	-13.1068	下调
MEDP1467	C10H15N3O4	5-甲基-2'-脱氧胞苷	1.446844	0.24618	-2.02221	下调
MEDP1476	C11H14N2O	5-甲氧基色胺	1.609424	2.19289	1.132833	上调
MEDP1506	C11H22N2O3	L-亮氨酸-L-缬氨酸	1.475196	4.392556	2.135061	上调

途径(Pathways in cancer)、类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis)、螺旋杆菌感染中的上皮细胞信号传导(Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection)等(图1)。

3 讨论

众所周知,5-甲氧基色胺作为褪黑素的前体物

质,对动物的繁殖性能具有显著的影响。Mura等^[18]对绵羊注射 MLT 处理,发现 MLT 可有效提高绵羊的生育率;张苗蕊^[19]在蛋鸡日粮中添加 1 mg/kg 褪黑素后,生殖激素相关基因表达量显著提高;宋超^[20]给母鼠补饲 MLT 后,发现母鼠的卵巢卵泡数、平均产仔数明显提高,闭锁卵泡的数量明显降低。Muratoğlu 等^[21]给雄性大鼠注射 MLT 后发现处于衰

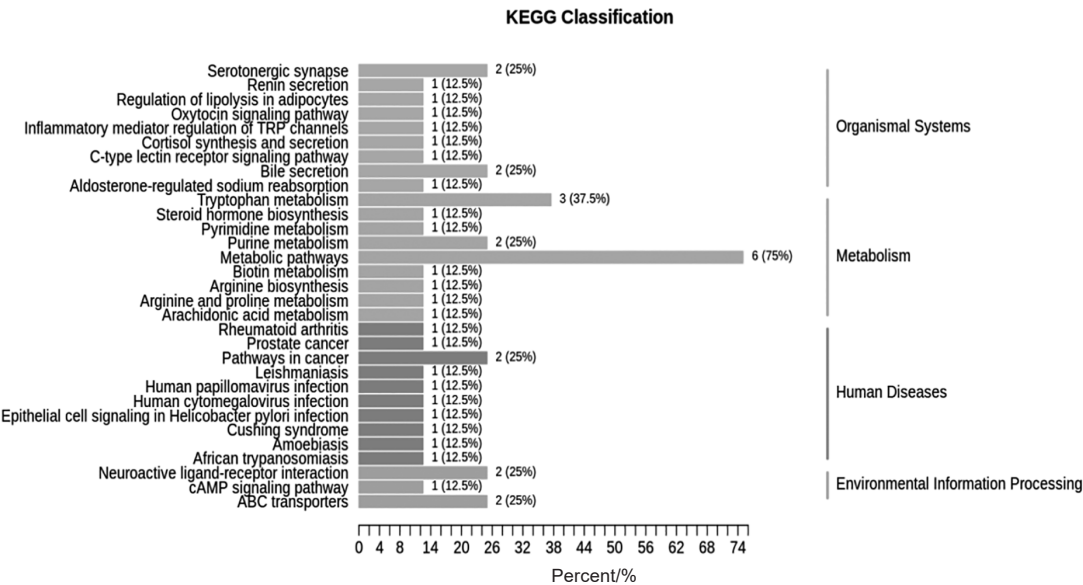


图1 野血牦牛较家养牦牛血清中显著差异表达的化学衍生物的KEGG功能富集

老期的雄性大鼠睾丸重量下降速度变缓,睾丸分泌睾酮水平显著升高。本试验结果发现,阿里野血牦牛中5-甲氧基色胺含量显著高于家养牦牛,表明野血牦牛可能比家养牦牛更具有理想的生殖能力。Wang等^[22]在短期高脂喂养(高脂喂养)的小鼠中发现,添加 ω -3多不饱和脂肪酸可逆转肝脏中脂质的积累,短期HFD降低了血浆中羧二十碳五烯酸(HEPEs)和环氧二十碳四烯酸(EEQs)的含量, ω 3HFD显著提高了血浆中HEPEs和环氧二EEQs的含量, ω 3HFD能显著减轻HFD诱导的脂肪组织炎症。HEPEs和EEQs可抑制巨噬细胞中棕榈酸诱导的促炎细胞因子的表达和JNK通路的激活。野血牦牛中HEPEs含量显著低于家养牦牛,表明野血牦牛有可能比家养牦牛更容易患上脂肪组织炎症,在野血牦牛的饲养工作中,可根据饲养情况,适量添加 ω -3多不饱和脂肪酸,防止野血牦牛脂肪炎症的发生。

3-甲基吲哚(3-methylindole, skatole)俗称臭粪素,是由动物肠道和环境厌氧菌产生的色氨酸。研究结果发现,粪臭素会造成山羊、绵羊、大鼠与某些品种小鼠的肺水肿^[23],其会选择性攻击Clara细胞,亦即肺中细胞色素P450酵素主要的集中处,这些酵素会将粪臭素转换为反应性中间体3-亚甲基假吲哚,此产物与蛋白质形成加合物而伤害细胞。野血牦牛中3-甲基吲哚含量明显低于家养牦牛群体,表明野血牦牛较家养牦牛可能更具有高原适应性。皮质醇又称氢化可地松,是从肾上腺皮质中提取出,对糖类具有最强作用的肾上腺皮质激素。皮质醇具有优秀的抗炎作用是可得松的1.25倍,在药理剂量时对感染性和非感染性炎症均具有抑制作用,并且皮质醇能增加血管的紧张性,减轻充血,降低毛细血管的通透性^[24]。对于高海拔阿里牦牛来说,高含量皮质醇的野血牦牛群体具有更明显的环境适应性。另外,皮质醇可扩张痉挛收缩的血管和兴奋心脏;抑制某些炎性因子的产生,减轻全身炎症反应综合征及组织损伤,使微循环血流动力学恢复正常,改善休克状态;稳定溶酶体膜,减少心肌抑制因子的形成;提高机体对细菌内毒素的耐受力;皮质醇能刺激骨髓的造血功能,使红细胞和血红蛋白含量增加,大剂量可能使血小板增多并提高纤维蛋白原浓度,缩短凝血时间^[25]。本试验结果表明,野血牦牛相比家养牦牛可能具有更加耐高海拔、耐低氧的优秀性能。阿卡地新(Acadesine)是腺苷蛋

白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)的激活剂,其作为AMP类似物具有细胞保护作用,在动物体内具有抗炎和抗血管渗出作用。相关研究表明,阿卡地新并不通过AMP转换和AMPK的激活发挥其作用,敲低AMPK- α 催化亚基并不影响阿卡地新对TNF- α 诱导的C3(RPE细胞)上调的抑制作用,本研究结果表明,阿卡地新抑制TNF- α 诱导的C3,可能是通过AMPK非依赖性途径实现的,在激活性疾病中具有潜在的参考价值^[26]。

瘤胃是反刍动物特有的消化器官,含有多种共生微生物。这些微生物可以帮助反刍动物将摄取的纤维素进行分解利用,也可以将反刍动物产生的尿素一部分分解为氨,再转化形成氨基酸或蛋白质供微生物使用。这一过程不仅能增加反刍动物的蛋白质合成量,也可以减少体内水分的消耗,有利于在干旱的环境中生存^[27]。家养牦牛群体中尿素含量明显高于野血牦牛,说明野血牦牛由于长期生活在野外地区,没有进行尿素补饲,其瘤胃转化蛋白质的能力可能低于家养牦牛,在饲养野血牦牛的过程中,应进行适量的尿素补饲,提高野血牦牛对蛋白质的合成能力。氧化三甲胺(trimethylamine oxide, TMAO)作为肠道微生物,可以在宿主体内产生生物活性代谢物,从而影响宿主的健康^[28]。有研究表明,TMA参与心力衰竭进展,血液中TMAO升高可以直接用来评估心衰患者的预后,肠道-TMAO-心衰轴可作为治疗心衰的新靶点^[29]。薛世姗等^[30]在研究TMAO在心力衰竭中的作用中发现,TMAO证实为很有前景的心血管危险指标,可通过食物干预等手段,改善肠道微生物群,以此降低TMAO的水平。在家养牦牛群体中,较高的TMAO水平意味着家养牦牛群体较野血牦牛群体可能更加容易患上心力衰竭、动脉血管粥样硬化等疾病,饲养家养牦牛时应注意饮食干预,增加谷类、豆类的摄入量,预防TMAO水平过高。

3,4,5-三甲氧基肉桂酸(3,4,5-Trimethoxycinnamic Acid, TMAC)被认为是远汉根的活性代谢产物,已被用作治疗失眠、头痛和癫痫^[31]。野血牦牛中高含量的TMAC可提取作为药理学研究重要前体物质,对药物开发具有重要参考作用。溶血磷脂酰乙醇胺18:3作为溶血卵磷脂前体物质,溶血卵磷脂具有高度细胞毒性,破坏细胞膜的磷脂层,野血牦牛群体中溶血磷脂酰乙醇胺18:3低于家养牦牛,说明野血牦牛个体素质可能较家养牦牛更强。

鼠胆酸(Muri cholic acid, MAC)是重要的胆汁酸之一,鼠胆酸具有多种重要的生物学功能及药学价值, α -鼠胆酸、牛磺胆酸与甘氨酸结合型三羟基胆汁酸可成为联合诊断妊娠肝内胆汁淤积症的潜在生物标志物^[32]。有研究发现, α -鼠胆酸能抑制艰难梭菌孢子的萌发和生长,可以用于治疗艰难梭菌引起的感染类疾病^[33]。肝内积聚疏水性胆汁酸可以诱导细胞损伤并可导致肝炎和黄疸等多种疾病,细胞色素P450(CYP450)对这些疏水性胆汁酸的羟基化修饰被认为是一种对抗胆汁酸毒性的防御机制,而 α -鼠胆酸是该解毒机制中的潜在代谢物^[34]。野血牦牛的 γ -鼠胆酸和 α -鼠胆酸均低于家养牦牛,表明家养牦牛在某些疾病防御方面可能比野血牦牛表现更好。前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)是花生四烯酸(arachidonic acid, AA)经环氧化代谢通路催化合成的主要产物,在肾脏中高效合成。前列腺素E2对肾脏集合管水转运具有调控作用,大量研究表明,PGE2以自分泌或旁分泌的形式在调节集合管水重吸收方面起着至关重要的作用。PGE2抑制AVP(精氨酸血管升压素)对集合管水重吸收的促进作用,这与PGE2的体内利尿作用相一致^[35]。有证据支持,在不依赖AVP的情况下,PGE2也能引起集合管水通透性的适度增加^[36-38]。在野血牦牛血液中,前列腺素E2含量明显低于家养牦牛,饲养野血牦牛,可能需要足量的水,以保证野血牦牛的需水量。

4 结论

综合分析野血牦牛与家养牦牛的血样代谢物,发现了21种具有显著差异的代谢物,其中有13种物质在现有的相关试验分析中被提及与生物适应性、抗病性和药物前体相关。野血牦牛群体中高含量的5-甲氧基色胺、皮质醇、氧化三甲胺等物质,有利于野血牦牛在高海拔低氧环境下生长发育。抗病性方面,野血群体与家养群体在相关代谢物含量方面存在显著差异,主要集中在炎症的发生以及蛋白质的转化过程中。

参考文献:

- [1] KIM H K, CHOI Y H, VERPOORTE R. NMR-Based Plant Metabolomics: Where do we Stand, where do we Go? [J]. Trends in Biotechnology, 2011, 29(6): 267-275.
- [2] VILLATE A, SAN NICOLAS M, GALLASTEGI M, et al. Review: Metabolomics as a Prediction Tool for Plants Performance under Environmental Stress [J]. Plant Science, 2021, 303: 110789.
- [3] ABDELHAFEZ O H, OTHMAN E M, FAHIM J R, et al. Metabolomics Analysis and Biological Investigation of Three Malvaceae Plants [J]. Phytochemical Analysis, 2020, 31(2): 204-214.
- [4] LITVINOV D Y, KARLOV G I, DIVASHUK M G. Metabolomics for Crop Breeding: General Considerations [J]. Genes, 2021, 12(10): 1602.
- [5] JEONG J Y, KIM M, JI S Y, et al. Metabolomics Analysis of the Beef Samples with Different Meat Qualities and Tastes [J]. Food Science of Animal Resources, 2020, 40(6): 924-937.
- [6] JACOB M, LOPATA A L, DASOUKI M, et al. Metabolomics Toward Personalized Medicine [J]. Mass Spectrometry Reviews, 2019, 38(3): 221-238.
- [7] KUMAR A, MISRA B B. Challenges and Opportunities in Cancer Metabolomics [J]. Proteomics, 2019, 19(21-22): e1900042.
- [8] KHAMIS M M, ADAMKO D J, EL-ANEED A. Mass Spectrometric Based Approaches in Urine Metabolomics and Biomarker Discovery [J]. Mass Spectrometry Reviews, 2017, 36(2): 115-134.
- [9] 尚有安, 杨安圈, 王照忠, 等. 野牦牛改良家牦牛的生产性能效果试验研究 [J]. 中国牛业科学, 2011, 37(5): 31-33.
- [10] 朱彦宾, 平措占堆, 洛桑顿珠, 等. 基于MHC遗传标记的改则县本地牦牛与半野血牦牛群体遗传多样性评估 [J]. 现代农业科技, 2019(21): 209-211.
- [11] 党万花, 李生芳, 赵青山. 含野血牦牛与家牦牛7项生化指标的比较 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(18): 121-122.
- [12] 扎西多吉, 次旦卓玛, 益西土登, 等. 半野血牦牛及普通家养牦牛鲜肉氨基酸成分分析 [J]. 现代农业科技, 2019(19): 216-218, 221.
- [13] CHEN W, GONG L, GUO Z L, et al. A Novel Integrated Method for Large-Scale Detection, Identification, and Quantification of Widely Targeted Metabolites: Application in the Study of Rice Metabolomics [J]. Molecular Plant, 2013, 6(6): 1769-1780.
- [14] FRAGA C G, CLOWERS B H, MOORE R J, et al. Signature-Discovery Approach for Sample Matching of a Nerve-Agent Precursor Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, XCMS, and Chemometrics [J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(10): 4165-4173.
- [15] ERIKSSON L, E J, KETTANEH-WOLD N, et al. Wold, Multi- and Megavariate Data Analysis Part I Basic Principles and Applications [M]. Sweden: Second edition Umetrics Academy, 2006.
- [16] CHEN Y H, ZHANG R P, SONG Y M, et al. RRLC-MS/MS-Based Metabonomics Combined with In-Depth Analysis of Metabolic Correlation Network: Finding Potential Biomarkers for Breast Cancer [J]. The Analyst, 2009, 134(10): 2003-2011.
- [17] THÉVENOT E A, ROUX A, XU Y, et al. Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses [J]. Journal of Proteome Research, 2015, 14(8): 3322-3335.
- [18] MURA M C, LURIDIANA S, PULINAS L, et al. Melatonin Treatment and Male Replacement every Week on the Reproductive Performance in Sarda Sheep Breed [J]. Theriogenology, 2019, 135: 80-84.

- [19] 张苗蕊. 褪黑素对蛋鸡产蛋性能的影响研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2019.
- [20] 宋超. 褪黑素在延缓昆明小鼠卵巢衰老中的作用研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [21] MURATOĞLU S, AKARCA DIZAKAR O S, KESKIN AKTAN A, et al. The Protective Role of Melatonin and Curcumin in the Testis of Young and Aged Rats [J]. *Andrologia*, 2019, 51(3): e13203.
- [22] WANG C J, LIU W L, YAO L, et al. Hydroxyeicosapentaenoic Acids and Epoxyeicosatetraenoic Acids Attenuate Early Occurrence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2017(174): 2358–2372.
- [23] RESMINI E, SANTOS A, WEBB S M. Cortisol Excess and the Brain [J]. *Frontiers of Hormone Research*, 2016, 46: 74–86.
- [24] EFSTATHIOU N E, MOUSTAFA G A, MAIDANA D E, et al. Acadesine Suppresses TNF- α Induced Complement Component 3 (C3), in Retinal Pigment Epithelial (RPE) Cells [J]. *PLoS One*, 2020, 15(12): e0244307.
- [25] 代 兵, 陈安国. 粪臭素在家畜养殖中的危害 [J]. *家畜生态*, 2004, 25(4): 205–206, 210.
- [26] WALCZEWSKA J, DZIEZA-GRUDNIK A, SIGA O, et al. The Role of Urocortins in the Cardiovascular System [J]. *Journal of Physiology and Pharmacology: an Official Journal of the Polish Physiological Society*, 2014, 65(6): 753–766.
- [27] 张 洁, 陈旭伟, 徐爱秋, 等. 瘤胃微生物氨基酸代谢的研究进展 [J]. *中国奶牛*, 2008(5): 18–21.
- [28] 张大海. 二氧化碳和尿素的生理作用 [J]. *生物学教学*, 2015, 40(9): 69–70.
- [29] BENNETT B J, DE AGUIAR VALLIM T Q, WANG Z N, et al. Trimethylamine-N-Oxide, a Metabolite Associated with Atherosclerosis, Exhibits Complex Genetic and Dietary Regulation [J]. *Cell Metabolism*, 2013, 17(1): 49–60.
- [30] 薛世姗, 禹文茜, 龙殿飞, 等. TMAO在心力衰竭中的作用 [J]. *生命的化学*, 2021, 41(5): 870–876.
- [31] DUARTE F S, MARDER M, HOELLER A A, et al. Anticonvulsant and Anxiolytic-Like Effects of Compounds Isolated from *Polygala Sabulosa* (Polygalaceae) in Rodents: In Vitro and in Vivo Interactions with Benzodiazepine Binding Sites [J]. *Psychopharmacology*, 2008, 197(3): 351–360.
- [32] ZHAO Z F, SONG H H, XIE J, et al. Research Progress in the Biological Activities of 3, 4, 5-Trimethoxycinnamic Acid (TMCA) Derivatives [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 173: 213–227.
- [33] FRANCIS M B, ALLEN C A, SORG J A. Muricholic Acids Inhibit *Clostridium Difficile* Spore Germination and Growth [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73653.
- [34] ZOLLNER G, TRAUNER M. Nuclear Receptors as Therapeutic Targets in Cholestatic Liver Diseases [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2009, 156(1): 7–27.
- [35] 李彧媛, 张晓燕. 前列腺素E2对肾脏集合管水转运的调控作用 [J]. *生理学报*, 2021, 73(4): 681–689.
- [36] JIA Z J, LIU G, DOWNTON M, et al. MPGES-1 Deletion Potentiates Urine Concentrating Capability after Water Deprivation [J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2012, 302(8): F1005–F1012.
- [37] BEK M, NUCOMBINING DIAERESSING R, KOWARK P, et al. Characterization of Prostanoid Receptors in Podocytes [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1999, 10(10): 2084–2093.
- [38] TAUB M, PARKER R, MATHIVANAN P, et al. Antagonism of the Prostaglandin E2 EP1 Receptor in MDCK Cells Increases Growth through Activation of Akt and the Epidermal Growth Factor Receptor [J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2014, 307(5): 539–550.