

代谢组学方法在生态毒理学中的应用进展

梁宇杰, 伍一军*

中国科学院动物研究所分子毒理学实验室 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101

摘要: 代谢组学方法越来越多地用于研究有机体与生态环境的相互作用。近年来, 该方法已被应用于化学物风险评价和野生动物的疾病诊断, 成为环境科学, 特别是生态毒理学中充满活力的研究方向之一。本文介绍了应用于代谢组学研究的核磁共振波谱和质谱 2 种检测技术, 着重讨论了生态毒理学研究中代谢组学方法在生物标志物的发掘和毒性评价, 以及有机体对环境影响因子的代谢响应、野生水生动物疾病的诊断和监测等方面的应用。这些代谢组学在生态毒理学领域的应用将促进对有机体与环境相互作用的认识。

关键词: 代谢组学; 生态毒理学; 毒性评价; 环境胁迫因素; 疾病监测

文章编号: 1673-5897(2011)6-459-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Progress in Application of Metabonomic Approaches in Ecotoxicology

Liang Yujie, Wu Yijun*

Laboratory of Molecular Toxicology, State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Received 13 July 2010 accepted 21 July 2011

Abstract: Metabonomics methodology is increasingly being applied to investigate the interactions of organisms with their natural ecological environment. Recently, this method has been applied to chemical risk assessment and diagnosis of diseases in wild animals, becoming one of the vibrant research areas in environmental science and ecological toxicology in particular. This article introduced two detecting and measuring technologies, i. e., nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry, which are commonly used in metabonomics. This review focused on the application of metabonomics approach in biomarker development and risk assessment of toxicants exposure, metabonomic responses to environmental stressors, and disease diagnosis and monitoring of wild aquatic animals. This growing application of metabonomics in ecotoxicology is believed to shed new light on understanding of important questions related to organism-environment interactions.

Keywords: metabonomics; ecotoxicology; toxicity assessment; environmental stressors; disease monitoring

继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后, 代谢组学作为系统生物学的重要组成部分, 近年来迅速崛起, 已成为目前组学研究领域中的热点, 在短短 6 年的发展时间内, 引起了众多研究者的高度关注。代谢组学方法被定义为生物体系因生理和病理以及

基因改变等刺激所致的动态多参数代谢响应的定量测定与分析^[1], 该方法通过特定的仪器测定小分子量的内源性代谢物质, 定量描述机体内源性代谢物质的整体状态及变化规律, 从而反映出生物机体的生理状况。作为物理学、分析化学和生物学交叉的

收稿日期: 2010-07-13 录用日期: 2011-07-21

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA06Z423); 中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KZCX2-EW-404)

作者简介: 梁宇杰(1983), 男, 硕士, 研究方向为代谢组学, E-mail: liangyjie@gmail.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: wuyj@ioz.ac.cn

一门学科,代谢组学涉及光谱学、统计学和数学等领域。近年来随着各种学科的交叉融合,代谢组学方法已经开始应用到植物生物学、生物医学和环境科学等众多学科的研究中。这种方法与蛋白质组学和基因组学方法互补,广泛用于各种复杂问题的研究,如疾病诊断、外源化合物毒性的评价、功能基因组学和营养学研究等。如今的代谢组学技术,可为毒性作用生物标志物的筛选和毒物作用机理的探讨提供有力的分析工具。

环境代谢组学是代谢组学的一个分支,是利用当代代谢组学技术探讨生物有机体与生态环境之间相互作用的一门学科,着重于研究生物体应对环境影响因素的代谢变化^[2,3]。因为代谢组学技术不依赖于生物体的基因组,这种方法很适合研究生态系统中的多个物种;该法通过测定机体的生物体液或组织中所有新陈代谢物质的组成成分,可被用于确定新的生物标志物和胁迫作用模式的研究中。

1 代谢组学分析技术

仪器和分析技术的创新与发展是代谢组学不断深入发展的动力,新的仪器的产生和新分析方法的建立为代谢组学在环境科学领域中的发展和应用提供了更加广阔的空间,同时也带来了更多的挑战和机遇。目前,应用于代谢组学研究的主要分析技术包括核磁共振和质谱技术。

1.1 核磁共振波谱

基于核磁共振(NMR)的代谢组学和代谢图谱分析已在毒物毒性评价、生物标志物的发现和毒性机制的研究中发挥了重要的作用。自20世纪80年代起,Nicholson等^[4]就开始利用¹H NMR分析生物体液以诊断疾病。迄今,核磁共振技术已被广泛用于检测分析多种生物体液、整体器官和组织提取液的代谢组学研究中。虽然NMR的灵敏度比质谱(MS)低一些,但NMR可通过加入外标完全定量,且重复性好,样品前处理简便,所需样品量少,通过使用不同的检测探头,既可分析液体样品也可分析固体样品。目前,通过高分辨魔角旋转核磁共振技术,能很好地消除核磁共振实验中由于磁化率不均匀、分子运动受限等因素引起的谱线增宽的现象。核磁共振波谱分析技术作为一种对生物活体组织的无损伤研究方法,非常适用于整体器官代谢组分析。随着这项技术的发展,代谢组的变化可以定位到机体的特定器官,从而能阐明毒物对靶组织或靶器官的具体作用机制。

此外,通过¹³C、³¹P和¹⁵N同位素标记的核磁共振还可检测更多组分,这种标记方法不仅可以提供代谢途径的信息,还可用于监测代谢物的时间和空间变化^[5]。大分子样品如脂蛋白和脂类会造成¹H NMR谱上产生许多重叠峰和异常的高峰。然而利用一些特殊的核磁共振技术,如自旋回波^[6,7]、弛豫扩散^[8]、二维J-分解谱就能够很好地解决这些检测中遇到异常谱峰的问题^[9]。核磁共振的主要缺点是灵敏度相对不高,然而,低温冷却探头和毛细管探针在增加灵敏度方面有着潜在的应用前景^[10,11]。特别是,最近高场核磁共振(900 MHz)、液相色谱-核磁共振联用(LG-NMR)和液相色谱-核磁共振/质谱联用(LG-NMR/MS)也开始用于代谢组学的研究中,使基于核磁共振波谱的代谢组学研究焕发出了新的生机^[12]。

1.2 质谱

大多数代谢组学研究都是利用核磁共振进行检测分析的,尽管其在技术和数据统计方法上不断地得到改进,但低灵敏度一直是核磁共振的限制因素,因而该法可检测的代谢物数量较为有限^[7,13],而生物样品成分相当复杂,NMR不能满足定性测定生物体内所有代谢物的需要。而质谱具有敏感度高、速度快、可选择性地定量和定性分析一些代谢成分等特点,若先使用液相或气相色谱法进行代谢物的分离,再通过质谱进行定性和定量分析,则可用于更多的代谢物质的检测^[14]。研究者将这种组合性的全二维气相色谱-飞行时间质谱(GC×GC-TOF/MS)技术用于无脊椎动物的代谢组学研究,获得了理想的实验结果^[15,16]。

自1970年起,高效液相色谱法(HPLC)就开始应用于生物代谢物方面的检测,而HPLC与质谱联用技术则具有更高的灵敏度和强大的可识别性。最近开发出的超高效液相色谱(UPLC)大大提高了液相色谱的灵敏度,UPLC能分离的色谱峰是HPLC的1倍以上,分离速度也提高了10倍,灵敏度提高了3~5倍,UPLC-MS的应用大大拓展了代谢组学的发展空间。其次,基于液相色谱-质谱联用法(LG-MS)和液相色谱-飞行时间质谱法(LG-TOF/MS)的代谢组学技术已成为应用于药理学和毒理学研究领域中的最前沿的代谢组学方法^[17]。

2 代谢组学在生态毒理学研究中的应用

虽然代谢组学方法在一些领域表现出了巨大的应用潜力,但在生态毒理学领域的应用仍处于起步

阶段。在生态毒理学研究中, 代谢组学方法可以用来描述和理解生物有机体对环境污染物的代谢或生化响应, 这些信息对于环境中化学污染物的风险评估具有特殊的价值。此外, 通过代谢组学方法能够更为深入地了解有机体对自然环境影响因子包括热、冷或饥饿的代谢响应机制。代谢组学方法还可用于野生动物健康诊断及疾病预防的相关指标的测定。近年来, 研究者已利用代谢组学方法对多个模式动物和非模式物种, 包括水生脊椎动物、陆生脊椎动物、植物和微生物进行了生态毒理学方面的研究。迄今为止, 代谢组学在生态毒理学领域中的应用主要涉及以下 3 个方面: 污染物暴露和生态毒理学评价^[18-19]、环境胁迫因子的代谢响应^[20]和野生动物疾病监测^[21]。

2.1 污染物暴露和生态毒理学评价

通过动物模型的代谢组学研究, 大量外源性有毒物质的毒性已得到详细的分析, 如氯化汞、*p*-氨基苯酚和硝酸酯产生的肾皮质毒性, 丙烯亚胺和 2-溴乙胺溴酸盐产生的肾乳头和肾髓质毒性。此外, 胍、丙烯醇、硫代乙酰胺、苯基异氰酸酯、丙烯酸丙酯、半乳糖胺、溴苯、对乙酰氨基酚、四氯化碳、多氯联苯和二噁英等化合物的肝毒性也得到了深入的研究^[22-23]。

环境代谢组学从全局角度评价环境中各种化学污染物对机体的影响, 并发掘出相应的生物标志物用于风险评估。越来越多的研究都应用基于核磁共振的代谢组学方法进行环境毒理学和生态毒理学的研究。目前, 代谢组学方法已成功应用于环境毒物暴露对陆生和水生动物影响的研究中。关于环境代谢组学的研究大部分都涉及蚯蚓这种生物。蚯蚓在促进土壤中微生物活动、分解土壤中的有机质和改善土壤的物理性状等方面起着举足轻重的作用。蚯蚓直接与土壤中各种污染物接触, 因而被广泛用于生态毒理学实验以及评价土壤污染的程度。蚯蚓作为土壤污染的敏感指示生物, 被认为是反映生态系统健康的一种敏感性指标物种。

生态毒理学研究者结合基于核磁共振的代谢组学技术和模式识别方法, 研究了多种蚯蚓 (*Lumbricus rubellus*、*Lumbricus terrestris* 和 *Eisenia andrei*) 暴露于金属污染的土壤^[24], 以及暴露于 3-三氟甲基苯胺 (3-trifluoromethylaniline)、3-氟-4-硝基苯酚 (3-fluoro-4-nitrophenol)、3,5-二氟苯胺 (3,5-difluoroaniline)、2-氟-4-甲基苯胺 (2-fluoro-4-methylaniline) 等^[25-26] 环境污染物的毒性效应。对蚯蚓组

织提取物的代谢组学研究, 可以确定一系列代谢产物的变化, 并以此作为潜在的生物标志物用于生态毒理学评价。例如, 利用代谢组学方法捕捉到的信息有: 正蚓科蚯蚓 (*Lumbricus rubellus*) 暴露于金属污染的土壤后, 体内麦芽糖含量显著升高^[24]; 蚯蚓暴露于 3-三氟甲基苯胺后, 其代谢谱中出现的主要代谢物质 (如丙氨酸、甘氨酸、天冬酰胺和葡萄糖) 含量升高, 其他代谢产物 (如柠檬酸循环中间体和琥珀酸) 含量也发生了变化, 这些代谢产物都被认为是 3-三氟甲基苯胺毒性作用的潜在的生物标志物^[26]; 暴露于 3-氟-4-硝基苯酚后, 正蚓科蚯蚓 (*Lumbricus rubellus*) 体内乙酸和丙二酸含量降低, 3,5-二氟苯胺和 2-氟-4-甲基苯胺也会引起正蚓科蚯蚓 (*Lumbricus rubellus*) 相应的代谢组变化, 并且, 这些代谢物含量的变化与毒物剂量呈现出相应的剂量-效应关系^[25]。应用基于核磁共振波谱的代谢组学方法对蚯蚓进行毒理学研究发现, 游离组氨酸是铜对其毒性的生物标志物; 并且对 7 个金属污染地区的土壤中的蚯蚓的组织抽提物进行代谢组学检测, 对数据进行了模式识别分析后发现, 锌是引起不同地区的蚯蚓代谢谱之间差别的主要污染物^[27]。上述这些研究均表明, 基于核磁共振的代谢组学已成功应用于污染地区土壤的生态毒理学研究中。此外, 不同种类的蚯蚓的代谢谱也不尽相同。例如, 蚯蚓 (*Lumbricus rubellus*) 接触金属离子后, 体内组氨酸的含量略有升高, 而蚯蚓 (*Lumbricus terrestris*) 暴露后, 体内的组氨酸含量大幅降低^[27]。Bundy 等利用代谢组学方法研究蚯蚓的表型时发现, 几种形态上并无差别的蚯蚓, 其体腔液和组织的代谢谱却有明显的不同^[28-29]。基于核磁共振波谱的代谢组学也被用于持久性有机污染物的研究中, Whitfield Åslund 等^[30] 将蚯蚓 (*Eisenia fetida*) 暴露于亚致死剂量的多氯联苯 2 d 后, 发现蚯蚓的代谢谱中的 ATP 含量显著升高, 代谢物质的变化与土壤中的多氯联苯的含量相关。多氯联苯和二噁英混用时会产生复合毒性, 通过对代谢谱的分析可以了解这 2 种环境内分泌干扰物的复合作用所引发的肝毒性。可见, 代谢组学方法在以蚯蚓为指示性生物的毒理学研究中已得到了较为广泛的应用, 并表现出了较高的灵敏性, 这些研究所取得的成果可为今后的生态毒理学研究提供非常有意义的信息。

代谢组学的方法也可用于陆地哺乳动物的毒理学研究。如通过考察肾脏代谢谱的变化, 研究神

(As³⁺)对浅滩田鼠(*Clethrionomys glareolus*)的毒性作用,利用魔角旋转核磁共振技术对完整肾脏的代谢谱进行检测发现,浅滩田鼠在砷染毒后,体内脂类物质出现异常,相对于浅滩田鼠,小林姬鼠(*Apodemus sivatius*)对As³⁺不敏感^[31]。通过将浅滩田鼠(*Clethrionomys glareolus*)、木鼠(*Apodemus sylvaticus*)和中麝鼠(*Crocidura suaveolens*)3种小型野生哺乳动物的尿液、血浆以及完整肾脏组织的代谢谱与实验动物Sprague Dawley大鼠的代谢谱进行比较,发现,浅滩田鼠所有组织和体液中芳香族氨基酸的含量最高;此外,野生动物和SD大鼠的血脂浓度和肾脏的代谢物组成成分均不同,这些结果也提示实验动物模型并不一定适用于野生物种的研究^[32]。

基于核磁共振的代谢组学方法还可应用于评价化学杀虫剂和其他外源性化合物对鱼类和水生无脊椎动物的毒性。例如,在考察小鲑鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)暴露于地乐酚、二嗪农和顺式氰戊菊酯后的代谢谱的变化时发现,核磁共振法在鉴定代谢物的变化上比高效液相色谱法更加灵敏;小鲑鱼提取物的代谢指纹图谱显示杀虫剂可引起剂量依赖性的代谢谱变化,且不同杀虫剂的具体毒性作用机制不同^[33]。类似的研究也发现,当日本青鳉(*Oryzias latipes*)的胚胎暴露于地乐酚时,代谢谱的变化与传统的毒性终点,如增长抑制、心率降低和发育异常,甚至死亡率都有很好的相关性;这些核磁共振代谢组学的研究结果与体内³¹P NMR和HPLG-UV的测试结果一致,其中,磷酸肌酸(phosphocreatine)利用率可作为一项指标反映地乐酚的胚胎毒性^[34]。Pincetich等^[35]利用青鳉胚胎进行代谢时间轨迹的分析,确定了正常胚胎发育过程中代谢物的变化,并发现三氯乙烯在青鳉胚胎发育期间表现出了代谢扰动。这些代谢轨迹不仅让我们掌握了整个胚胎发育期间代谢谱的变化,而且还为三氯乙烯的胚胎发育毒性提供了一个良好的研究模型。Samuelsson等^[36]将基于核磁共振的代谢组学方法与多元数据分析结合,研究环境中化学品对水生生物的毒性,测定了暴露于人工合成的雌激素避孕药炔雌醇(EE2)中的虹鳟鱼体内血浆和血浆脂质提取物的代谢产物谱,发现代谢产物如卵黄蛋白原、丙氨酸、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、多不饱和脂肪酸和胆固醇的含量发生了明显的变化,这些物质含量的变化与之前的研究所发现的雌激素对鱼的影响结果一致。研究者利用核磁共振的代谢组学的方法对低剂量环境污染物氯

化镉的慢性肾毒性和急性睾丸毒性进行了系统的研究,发现大鼠尿液代谢物中柠檬酸和肌酸的含量增加;此外,利用高分辨率魔角旋转核磁共振技术对整体肾脏组织的代谢谱进行研究,发现当实验动物接触镉时,肾脏组织中脂肪含量也发生相应的改变^[37]。

环境代谢组学方法也进一步扩展到比较正常人群和接触高硒环境的高危人群的尿液代谢谱的变化^[38]:与健康人群相比,过度硒接触会引起尿液中与肾和肝脏病变有关的代谢物(如甲酸、乳酸、乙酸、马尿酸和丙氨酸)含量的升高,同时柠檬酸、肌酸和氧化三甲胺的含量降低。这些研究表明,代谢组学在生态毒理学领域的应用将更加多样化,并具有更大的发展潜力。

2.2 环境因素胁迫的代谢响应

生态环境中的一些胁迫因素,如热、冷或饥饿等对代谢组的影响已经以果蝇、鱼类和蚯蚓等动物为对象开展了一系列的研究。利用代谢组学方法可以实时监测这些环境胁迫因素所导致的生物体生理状况的改变及代谢谱的变化。研究发现,黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)热应激的代谢谱变化与其他生理生化反应一致,其中,与能量代谢相关的葡萄糖类物质的减少可能因温度升高所致,且代谢物浓度的变化与转录水平密切相关^[39]。结合代谢组学和蛋白质组学技术的研究发现,鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)在长期处于热应激的情况下,热激蛋白(hsp 72和hsp 89)的诱导表达水平与能量代谢物质(磷酸肌酸、三磷酸腺苷和糖原)含量的降低呈正相关关系^[40]。对耐冷冻的蚯蚓(*Dendrobaena octaedra*)和不耐冷冻的蚯蚓进行霜冻胁迫的比较研究发现,在冷冻胁迫下,耐冷冻的蚯蚓体内糖原含量急骤减少,葡萄糖含量的上升幅度较大,琥珀酸和乳酸含量降低,而不耐冷冻的蚯蚓的代谢谱的变化在温度降低时与耐冻蚯蚓的代谢谱的变化显著不同,如表现为血糖降低,琥珀酸和乳酸含量增加^[41]。这些热应激或冷应激的研究提供了生物体受到环境胁迫时关键酶活性及代谢途径的相关信息。

代谢组学方法也用于发育中的鱼卵对极度缺氧耐受性的研究:Podrabsky等^[42]采用基于GG-MS分析的代谢组学方法,检测到将科小鱼(*Austrofundulus limnaeus*)胚胎早期发育中缺氧耐受期的许多代谢变化,包括为保护神经系统,出现了 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyrate)的大量积累。

关于环境胁迫因素“饥饿”对生物体造成的影响

也可通过蚯蚓的代谢组学研究进行。由于毒理学研究中,在毒物暴露实验前,需要让蚯蚓在一段较短的特定时间内保持饥饿,因此,为与毒物暴露所致的代谢变化进行区分,首先有必要阐明蚯蚓在短期饥饿胁迫下所产生的代谢响应。研究发现,不同种类蚯蚓对短期饥饿的代谢响应不尽相同。连续6~7 d的饥饿可导致蚯蚓(*Eisenia veneta*)代谢谱发生明显的变化,而蚯蚓(*Lumbricus terrestris*)的代谢谱则无明显变化;研究结果表明,蚯蚓(*Lumbricus terrestris*)更适于进行毒性实验和环境监测^[43]。

2.3 野生水生动物疾病监测

代谢组学方法已成功应用于野生水生动物疾病的诊断,对于水产养殖业的发展将起到重要的推动作用。代谢组学方法在诊断比目鱼的肝脏肿瘤和红鲱鱼的消瘦综合症中显示出突出的优势。一些学者将代谢组学技术与病理组织切片和蛋白质组学方法结合,用于诊断野生比目鱼的肝肿瘤,已鉴定出一些与肝肿瘤相关的蛋白质和代谢物,并将有可能成为该疾病诊断的潜在的生物标志物^[44]。代谢组学方法还可以帮助诊断由于环境因素所导致的疾病,如诊断加利福尼亚州红鲱鱼的萎缩综合症(withering syndrome)^[20],研究发现,类立克次氏体原核生物(rickettsiales-like prokaryote, RLP)感染的单独作用并不足以引起这种鱼的萎缩综合症,而其他的环境胁迫因素(如水温升高)与RLP感染一同作用则会加重病变程度;实验证实,组织病理学结果与代谢谱的变化相符,而足肌中葡萄糖和龙虾肌碱2种代谢物质的比例则是判断RLP感染引发的疾病状况的潜在标志性指标。Solanky等^[45]的研究显示,大西洋鲑鱼感染杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)后会产生明显的特征性的代谢变化;另外,通过监测寄主血浆代谢组的变化可以确诊鲑鱼的健康状况^[46]。上述这些研究结果表明,代谢组学方法在监测和诊断实验动物和水产养殖动物的健康状况方面,将发挥常规动物医学技术不可替代的作用。随着研究的不断深入,以及诊断专家系统的进一步完善,期待代谢组学分析技术成为野生动物疾病诊断的常用手段。

3 问题与展望

近年来,代谢组学作为一个新兴学科在生态毒理学中的应用得到了快速的发展,为人们更加清楚地认识机体应对环境因素变化的机理提供了一种有效的手段。虽然已经建立了许多高通量的生物分析

技术和统计方法,但由于非实验因素如样本提取和数据采集方法、动物性别、昼夜变化、年龄和肠道菌群等因素也会对代谢组分析结果产生影响,代谢组学在环境方面的应用仍面临着诸多挑战。代谢组学在生态毒理学中真正的应用潜力尚未得到完全发挥,这主要源于技术方面的复杂性。因为迄今为止,大部分的环境代谢组学研究工作都是由化学家开创的,也主要由化学家掌握着代谢组学分析测定的关键技术,所以代谢组学在生态毒理学和环境科学研究中的应用范围还不够广泛。随着检测技术的突破和分析方法的完善,代谢组学的优势必将得到更好的展示,它将更广泛地用于野生动物的疾病检测和诊断以及相关毒性问题的研究(如相关生物标记物的寻找等),从而为预测野生动物潜在的危险因素和了解疾病发生的过程提供新视角,使代谢组学方法在生态毒理学和环境科学中的应用潜力得以充分的发挥。

通讯作者简介: 伍一军(1963—),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向为分子毒理学,主要研究环境化学物质对健康影响的分子机理。

参考文献:

- [1] Nicholson J K, Lindon J C, 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
- [2] Viant M R. Recent developments in environmental metabolomics [J]. *Molecular BioSystems*, 2008, 4(10): 980–986
- [3] Viant M R, Bearden D W, Bundy J G, et al. International NMR-based environmental metabolomics inter-comparison exercise [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(1): 219–225
- [4] Nicholson J K, Timbrell J A, Sadler P J. Proton NMR spectra of urine as indicators of renal damage. Mercury-induced nephrotoxicity in rats [J]. *Molecular Pharmacology*, 1985, 27(6): 644–651
- [5] Kikuchi J, Shinozaki K, Hirayama T. Stable isotope labeling of *Arabidopsis thaliana* for an NMR-based metabolomics approach [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2004, 45(8): 1099–1104
- [6] Van Q N, Chmurny G N, Veenstra T D. The depletion of protein signals in metabolomics analysis with the WET CPMG pulse sequence [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 301(4): 952–959
- [7] Wang Y L, Bollard M E, Keun H, et al. Spectral

- editing and pattern recognition methods applied to high-resolution magic-angle spinning ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of liver tissues [J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, 323(1): 26–32
- [8] Tang H R, Wang Y L, Nicholson J K, et al. Use of relaxation-edited one-dimensional and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to improve detection of small metabolites in blood plasma [J]. *Analytical Biochemistry*, 2004, 325(2): 260–272
- [9] Schulte R F, Lange T, Beck J, et al. Improved two-dimensional ^1H resolved spectroscopy [J]. *NMR in Biomedicine*, 2006, 19(2): 264–270
- [10] Griffin J L, Walker L A, Garrod S, et al. NMR spectroscopy based metabonomic studies on the comparative biochemistry of the kidney and urine of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*), wood mouse (*Apodemus sylvaticus*), white toothed shrew (*Crocidura suaveolens*) and the laboratory rat [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 127(3): 357–367
- [11] Griffin J L, Keun H C, Richter C, et al. Compartmentation of metabolism probed by $[2-^{13}\text{C}]$ alanine: Improved ^{13}C NMR sensitivity using a cryoProbe detects evidence of a glial metabolite [J]. *Neurochemistry International*, 2003, 42(1): 93–99
- [12] Aliferis K A, Chrysafi Tokousbalides M. Metabolomics in pesticide research and development: Review and future perspectives [J]. *Metabolomics*, 2011, 7(1): 35–53
- [13] Keun H C, Beckonert O, Griffin J L, et al. Cryogenic probe ^{13}C NMR spectroscopy of urine for metabonomic studies [J]. *Analytical Biochemistry*, 2002, 317(17): 4588–4593
- [14] Mohler R E, Dombek K M, Hoggard J C, et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry analysis of metabolites in fermenting and respiring yeast cells [J]. *Analytical Biochemistry*, 2006, 358(8): 2700–2709
- [15] Hope J L, Sinha A E, Prazen B J, et al. Evaluation of the DotMap algorithm for locating analytes of interest based on mass spectral similarity in data collected using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1086(1–2): 185–192
- [16] Ralston-Hooper K, Hopf A, Oh C, et al. Development of GC/TOF-MS metabolomics for use in ecotoxicological studies with invertebrates [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 88(1): 48–52
- [17] Ni Y, Su M M, Qiu Y P, et al. Metabolic profiling using combined GC-MS and LC-MS provides a systems understanding of aristolochic acid-induced nephrotoxicity in rat [J]. *FEBS Letters*, 2007, 581(4): 707–711
- [18] Ekman D R, Teng Q, Jensen K M, et al. NMR analysis of male fathead minnow urinary metabolites: A potential approach for studying impacts of chemical exposures [J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 85(2): 104–112
- [19] Viant M R. Metabolomics of aquatic organisms: The new 'omics' on the block [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2007, 332: 301–306
- [20] Rosenblum E S, Viant M R, Braid B M, et al. Characterizing the metabolic actions of natural stresses in the California red abalone, *Haliotis rufescens* using ^1H NMR metabolomics [J]. *Metabolomics*, 2005, 2(1): 199–209
- [21] Moalemiyan M, Vikram A, Kushalappa A C, et al. Volatile metabolite profiling to detect and discriminate stem-end rot and anthracnose diseases of mango fruits [J]. *Plant Pathology*, 2006, 55(6): 792–802
- [22] Coen M, Holmes E, Lindon J C, et al. NMR-Based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2008, 21(1): 9–27
- [23] Lu C, Wang Y, Sheng Z, et al. NMR-based metabonomic analysis of the hepatotoxicity induced by combined exposure to PCBs and TCDD in rats [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010, 248(3): 178–184
- [24] Bundy J G, Spurgeon D J, Svendsen C, et al. Environmental metabonomics: Applying combination biomarker analysis in earthworms at a metal contaminated site [J]. *Ecotoxicology*, 2004, 13(8): 797–806
- [25] Bundy J G, Lenz E M, Bailey N J, et al. Metabonomic assessment of toxicity of 4-fluoroaniline, 3,5-difluoroaniline and 2-fluoro-4-methylaniline to the earthworm *Eisenia veneta* (rosae): Identification of new endogenous biomarkers [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2002, 21(9): 1966–1972
- [26] Lenz E M, Weeks J M, Lindon J C, et al. Qualitative high field ^1H -NMR spectroscopy for the characterization of endogenous metabolites in earthworms with biochemical biomarker potential [J]. *Metabolomics*, 2005, 1(2): 123–136
- [27] Gibb J O T, Svendsen C, Weeks J M, et al. ^1H NMR spectroscopic investigations of tissue metabolite biomarker response to Cu(II) exposure in terrestrial invertebrates: Identification of free histidine as a novel biomarker of exposure to copper in earthworms [J]. *Biomarkers*, 1997, 2(5): 295–302
- [28] Bundy J G, Keun H C, Sidhu J K, et al. Metabolic profile biomarkers of metal contamination in a sentinel terrestrial species are applicable across multiple sites [J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(2): 4458–4464

- [29] Bundy J G, Spurgeon D J, Svendsen C, et al. Earthworm species of the genus *Eisenia* can be phenotypically differentiated by metabolic profiling [J]. *FEBS Letters*, 2002, 521(1-3): 115-120
- [30] Whitfield Åslund M L, Simpson A J, Simpson M J. ^1H NMR metabolomics of earthworm responses to polychlorinated biphenyl (PCB) exposure in soil [J]. *Ecotoxicology*, 2011, 20(4): 836-846
- [31] Griffin J L, Walker L, Shore R F, et al. High-resolution magic angle spinning ^1H -NMR spectroscopy studies on the renal biochemistry in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and the effects of arsenic (As^{3+}) toxicity [J]. *Xenobiotica*, 2001, 31(6): 377-385
- [32] Griffin J L, Nicholls A W, Keun H C, et al. Metabolic profiling of rodent biological fluids via ^1H NMR spectroscopy using a 1 mm micro litre probe [J]. *Analyst*, 2002, 127(5): 582-584
- [33] Viant M R, Pincetich C A, Tjeerdema R S. Metabolic effects of dinoseb, diazinon and esfenvalerate in eyed eggs and alevins of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) determined by ^1H NMR metabolomics [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 77(4): 359-371
- [34] Viant M R, Pincetich C A, Hinton D E, et al. Toxic actions of dinoseb in medaka (*Oryzias latipes*) embryos as determined by in vivo ^{31}P NMR, HPLC-UV and ^1H NMR metabolomics [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 76(3-4): 329-342
- [35] Pincetich C A, Viant M R, Hinton D E, et al. Metabolic changes in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) during embryogenesis and hypoxia as determined by in vivo ^{31}P NMR [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2005, 140(1): 103-113
- [36] Samuelsson L M, Frlin L, Karlsson G, et al. Using NMR metabolomics to identify responses of an environmental estrogen in blood plasma of fish [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 78(4): 341-349
- [37] Griffin J L, Walker L A, Shore R F, et al. Metabolic profiling of chronic cadmium exposure in the rat [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2001, 14(10): 1428-1434
- [38] Zhu Y S, Xu H B, Huang K X, et al. A study on human urine in a high-selenium area of China by ^1H -NMR spectroscopy [J]. *Biological Trace Element Research*, 2002, 89(2): 155-163
- [39] Malmendal A, Overgaard J, Bundy J G, et al. Metabolomic profiling of heat stress: Hardening and recovery of homeostasis in *Drosophila* [J]. *American Journal of Physiology*, 2006, 291(1): 205-212
- [40] Viant M R, Werner I, Rosenblum E S, et al. Correlation between heat-shock protein induction and reduced metabolic condition in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) chronically exposed to elevated temperature [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 29(2): 159-171
- [41] Bundy J G, Raml v H, Holmstrup M. Multivariate metabolic profiling using ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of freeze-tolerant and freeze-intolerant earthworms exposed to frost [J]. *Cryoletters*, 2003, 24(6): 347-358
- [42] Podrabsky J E, Lopez J P, Fan T W M, et al. Extreme anoxia tolerance in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*: Insights from a metabolomics analysis [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2007, 210(13): 2253-2266
- [43] Warne M A, Lenz E M, Osborn D, et al. Comparative biochemistry and short-term starvation effects on the earthworms *Eisenia veneta* and *Lumbricus terrestris* studied by ^1H NMR spectroscopy and pattern recognition [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(9): 1171-1180
- [44] Stentiford G D, Viant M R, Ward D G, et al. Liver tumors in wild flatfish: A histopathological, proteomic, and metabolomic study [J]. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 2005, 9(3): 281-299
- [45] Solanky K S, Burton I W, MacKinnon S L, et al. Metabolic changes in Atlantic salmon exposed to *Aeromonas salmonicida* detected by ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy of plasma [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 65(2): 107-114
- [46] Dacanay A, Knickle L, Solanky K S, et al. Contribution of the type III secretion system (TTSS) to virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* [J]. *Microbiology*, 2006, 152(6): 1847-1856 ◆