代谢组学在反刍动物营养过程研究中应用进展

翁玉楠

（扬州大学动物科学与技术学院，扬州 225009）

摘要：代谢组学是研究机体生命活动过程中代谢产物的一门学科。当前主要通过GC-MS、LC-MS以及NMR等技术手段实现样品中代谢产物的分离与鉴定。动物的营养过程在保障动物机体健康、调控正常生命活动、改善动物生产性能等生命过程中具有不可替代的作用。代谢组学技术的应用使得能够从更加全面、微观的角度揭示动物的营养过程中的机制研究以及相应生物标志物的筛选。本文从代谢组学技术流程进行概述及其在反刍动物营养过程研究应用予以综述；

关键词：代谢组学；反刍动物；营养过程；

中图分类号：S852.2 文献标识码：A 文章编号：

Advance in the Application of Metabolomics to Process Research of Ruminant Nutrition

Weng Yunan

(*Collage of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009,China*)

Abstract: Metabolomics is a discipline that studies metabolites in the process of life activities. At present, GC-MS, LC-MS and NMR are mainly used to separate and identify metabolites in samples. Animal nutrition process plays an irreplaceable role in ensuring animal health, regulating normal life activities, improving animal production performance and other life processes. The application of metabolomics technology makes it possible to reveal the mechanism of animal nutrition process and the screening of corresponding biomarkers from a more comprehensive and microscopic perspective. In this paper, the technological process of metabolomics and its application in ruminant nutrition were reviewed;

Key words: metabolomics; Ruminants; Nutritional process;

代谢组学技术最早由Jeremy Nicholsonrs在1999年提出，可用于对机体内代谢产生的分子量小于1500 Da的小分子进行定性、定量的一种分析方法[1, 2]。相比较于先前研究中针对于特定代谢物的检测，代谢组学技术的应用，增加了对机体内可检测的代谢物质覆盖度，丰富了对机体所经历的生物学事件的认识。代谢组学研究的分析平台主要包括分离和检测两部分，如用于对代谢物进行分离的气相色谱（Gas Chromatography，GC）、液相色谱（Liquid Chromatography，LC）和毛细管电泳（CE）以及用于检测的质谱（Mass Spectrometry，MS）和核磁共振波谱（Nuclear Magnetic Resonance，NMR）[3]。气相色谱通常用于热稳定性、挥发性或衍生后具有挥发性的样品的分离，液相色谱用于极性高、相对分子量大的代谢物的分离。此外，通过代谢物提取条件优化、色谱柱选择、色谱条件优化、GC×GC、超高效液相色谱（Ultra Performance Liquid Chromatography，UHPLC）等可实现代谢物较好的分离效果；MS/MS、2D NMR、3D NMR等技术的应用也为代谢物鉴定中提供了高的分辨率。

当前的动物营养调控会影响包括采食、消化、吸收、代谢、排泄在内的动物营养过程的变化。代谢组学技术已广泛的应用于反刍动物营养过程的研究中，可用于生物标志物的筛选以及机制研究[4]。从而增进反刍动物营养过程网络化的认识。

1 代谢组学概述

代谢组学技术是研究机体细胞代谢过程中代谢物质变化的技术。能够鉴定机体内分子量小于1500 Da的小分子化合物；当前代谢组学的分析流程主要包括：实验样品采集、样品制备、代谢物提取、代谢物分析、数据处理等过程[1, 5]。

1.1 实验样品采集

用于代谢组学分析的动物源样品主要有机体组织、体液以及机体排泄物所构成。常用于代谢组学研究的机体组织常为特定机体状况下代谢比较旺盛的器官，如肝脏、肾脏、脂肪组织、肌肉组织等[6-8]；体液通常包括唾液、血液等[8, 9]；机体排泄物如粪便、尿液、眼泪等[8]。

1.2 实验样品预处理

为实现最大程度的获得实验样品中的代谢组学信息，不同来源的样品或使用不同检测方法对实验样品的预处理要求不同，但所使用的应具有良好的重现性和提取效率[5]。但首先应及时淬灭其生物活性，如液氮、冷冻、加热、加酸固定等途径，以中止其仍在进行的新陈代谢活动，以减少仍在进行的代谢活动对代谢物组成的影响[10, 11]。

1.3 实验样品提取

样品经过预处理后，可用于代谢组样品的提取。通常会按照所要提取代谢物的理化性质选择相应试剂进行萃取，以最大限度提高所检测代谢物的种类与丰度[5, 12]。常见的萃取方式有基于代谢物极性强、亲水性好或可电离代谢物的酸碱萃取法和基于样品极性差、疏水性差的有机溶剂萃取法；通常使用的有机溶剂萃取方式中，两相的萃取体系可以同时获得样品中的极性亲水性代谢物以及非极性代谢物[12]。

在代谢物样品提取过程中添加稳定的同位素标记物以纠正代谢物提取过程中因降解造成的损失[13]。对于使用气相色谱进行分离的样品，可采用衍生化技术以改善其化学性质对样品分离及检测的影响，常用的衍生化技术有硅烷化、酰基化、烷基化、氧基化、酯化等[11]。对于样品中丰度较低的代谢物，可以采用冻干、氮吹、固相萃取、固相微萃取等途径对提取液进行浓缩。

1.4 实验样品分析

代谢物的分析主要通过分离技术和高通量检测技术结合予以实现。当前使用的分离方法主要有气相色谱（Gas Chromatography， GC）、液相色谱（Liquid Chromatography， LC）和毛细管电泳（Capillary Electrophoresis， CE），高通量检测技术主要有质谱（Mass Spectrometry，MS）和核磁共振波谱（Nuclear Magnetic Resonance，NMR）[14]。

1.4.1 实验样品分离

由于提取的代谢物组成上是性质比较接近的混合物，在短时间内同时进入检测阶段，存在的离子抑制问题会影响检测的准确性[14]。因而在样品进入检测阶段前，会对其进行分离，样品中组分的分子量大小以及其在固定相与流动相之间的分配系数会影响样品的分离速率。通常气相色谱会用于具有热稳定性、挥发性或衍生后具有挥发性的样品的分离，但在次级代谢产物的分离中分离效果不佳[15]。相比较于气相色谱，液相色谱对于样品的处理比较简单，用于极性高、相对分子量大的代谢物的分离。毛细管电泳（CE）可根据待测物的质荷比以分离极性化合物或带电化合物[16]。

当前的应用中，多以色谱分离为主，为提高色谱的分辨率，在GC 基础上延伸出二维GC×GC，使用调节器将具有不同性质的色谱柱相连，可以同时实现样品中不同性质的化合物的分离[11]。在LC基础上， UHPLC的应用也表现出更高的分辨率[15]。

1.4.2 实验样品检测

经分离后的样品，可通过MS或者NMR进行检测。

在质谱检测中，质谱仪由样品导入系统、电离源、质量分析仪、离子检测器等构成。由色谱分离的样品首先被电离以形成离子源，在此之前，来自于液相色谱分离的样品首先会被雾化。离子源经过质量分析仪部分进行分离后被离子检测器捕获[14]。由于气相色谱和液相色谱分离出样品性质上的差别。通常经气相色谱分离出的组分在电子轰击（EI）或反应气体（CI）作用下产生分子碎片和碎片离子，液相色谱分离出的组分使用ESI作为电离源，使用正离子模式和负离子模式对同一样品扫描，可以增加对样品中代谢物检测的覆盖度。质量分析仪部分通常使用三重四级杆、轨道阱、飞行时间等。此外，串联质谱（MS/MS）可增加对代谢物分析的灵敏度[3]。

NMR是基于在核外强磁场作用下，具有自旋性质的原子核吸收射频辐射而产生跃迁的共振谱的技术。可用于分析分析中某些原子的数目、类型和相对位置，其波谱信号可以与检测到的代谢物的实际浓度成正比例关系，使得无需校准单个分析物曲线即可对所有检测到的代谢物进行绝对定量。通常会使用一维波谱用于代谢物的定性。如氢谱 NMR（1H-NMR）、碳谱NMR（13C-NMR）和磷谱NMR（31P-NMR），与MS相比，NMR样品制备简单，分析时间短，适用于高通量的非靶向代谢组学，但其灵敏度低，不适合分析低丰度代谢产物[14]。此外，二维、三维波谱的应用可减少由于频谱拥塞造成的分辨率降低[3]。

1.5 数据处理与分析

样品经MS检测后会获得的包含质荷比、保留时间、总离子流量等信息在内的原始质谱数据；NMR图谱结果中包含化学位移、积分值和耦合常数等信息。减少原始数据中溶剂、仪器因素、流动相或载气等背景噪声，可获得较为准确的代谢物组成信息，MS原始数据预处理过程包括噪音过滤、目标峰提取、峰对齐和归一化处理等，NMR原始数据预处理结果包括基线校正、对齐、分箱、归一化处理等[3, 17]。预处理后的质谱数据可通过与数据库比对从而实现对代谢物的鉴定。Goldansaz等人[18]发布的家畜代谢数据库（LDMB, http://www.lmdb.ca）中整合了1202种在牛、山羊、绵羊在内的血清、血浆等不同体液中代谢物MS、NMR信息以及参考范围。预处理后形成的数据矩阵可通过PCA、PLS-DA和OPLS-DA软件平台进行降维分析。

2 代谢组学在反刍动物营养过程研究中的应用

包括采食、消化、吸收、代谢、排泄在内的营养过程在维持动物生命活动、保证动物健康、改善动物生产性能中具有重要作用。当前基于多组学联合分析的研究表明，动物营养过程具有联动性[19, 20]。

2.1 代谢组学在反刍动物采食调控研究中的应用

饲料中的风味物质会影响动物的采食行为。此外，由饲料刺激或采食行为在一定程度上会对唾液的代谢组造成影响。

青贮饲料作为反刍动物重要的饲料来源，其在制作加工过程中容易受微生物活动影响，继而影响其风味及适口性。一项基于GC-TOF-MS平台研究的乳酸菌添加剂对全株青贮玉米在青贮过程中代谢组的影响结果表明，乳酸菌的接种使得青贮中含有更多的有机酸、氨基酸和酚酸代谢物，具有生物活性的儿茶酚、邻苯三酚、阿魏酸、4-羟基丁酸、亚油酸、肉豆蔻酸、苯乙胺等影响了青贮的风味物质的形成[21] 。Du等人[22] 使用UHPLC/TOF-MS研究构树青贮代谢组的研究表明，构树青贮中的氨基酸、不饱和脂肪酸、柠檬酸、L-苹果酸和风味物质的含量，改善了构树青贮饲料的风味和品质。Wang等人[23] 使用UHPLC/TOF-MS平台证实果糖和果胶添加引起三萜苷积累的减少影响了苜蓿青贮品质。因而，代谢组学技术的应用有助于探究影响反刍动物采食行为的风味物质形成机理研究。

动物的采食行为会引起唾液分泌的变化。一项针对山羊和绵羊唾液组分的研究表明，山羊、绵羊唾液中蛋白质组成较为复杂，如免疫球蛋白、细胞因子、抗菌肽等；并可从中鉴定到39中代谢物，其中四乙二醇、L-异亮氨酸、胆碱阳离子是其中最为丰富的代谢物[24]。当前针对反刍动物唾液代谢组的研究中侧重于诊断标志物的筛选[25]。目前尚缺少营养调控对反刍动物唾液代谢组影响的研究。Contreras等人[26] 的研究指出在体外使用不同的饲料原料与牛唾液共同孵育影响了唾液中抗氧化物质、应激标志物、酶等含量的变化。由于反刍行为的存在，针对于反刍动物唾液代谢组的研究，应避免由反刍行为对唾液的影响。

2.2 代谢组学在反刍动物消化过程研究中的应用

利用代谢组学技术研究反刍动物消化过程中，主要侧重于微生物消化。先前的研究中已优化出可以获得更高的分辨率的消化道内容物提取方法[8, 27]。在前消化道中，体现为瘤胃内微生物对饲料发酵；在后消化道中主要为回肠和结肠中微生物发酵产物。

日粮结构的改变引起瘤胃内微生物代谢上的差异，一项基于宏基因组技术的研究指出，日粮碳水化合物的增加会重塑奶山羊瘤胃中碳水化合物酶系[28]。在瘤胃代谢上，不同物种表现出相似的代谢活动。Ma等人 [29] 的研究中，高精料日粮会引起奶山羊瘤胃中在碳水化合物、氨基酸、生物胺、脂肪酸、有机酸上代谢上的差异；Wang等人[30]在奶牛日粮中使用发酵豆粕代替豆粕对奶牛瘤胃液代谢组的影响中鉴定出28种差异代谢物，并可归类于氨基酸、肽和类似物、甘油磷酸乙醇胺或脂肪醇。Zhang等人[31] 研究指出日粮精粗比引起了奶牛瘤胃内微生物物在氨基酸、脂肪酸、有机酸和碳水化合物代谢上的差异。Yi和Pang等人[32, 33] 使用比较了不同精粗比条件下牦牛瘤胃液代谢组的差异同样体现在氨基酸、蛋白质、碳水化合物、脂质和嘌呤代谢等过程。此外，植物提取物、维生素、矿物质元素等饲料添加剂的应用同样会改变上述生物过程[29, 34-37]。以上内容提示，瘤胃内微生物通过相应的代谢途径以适应日粮的改变。但在相同精粗比条件下Pang的研究中，富集到的瘤胃内代谢物与Yi存在差异[32, 33]。在不同的生理阶段下，藏羊瘤胃中表现不同的代谢谱[38]。此外，日粮中碳水化合物的增加会导致瘤胃液中具有毒性、炎性等化合物的蓄积[39-42]。一项针对奶牛瘤胃液代谢组的调查指出瘤胃液中的代谢组可用于奶牛的代谢性疾病监控[43]。因而，通过代谢组学技术增进瘤胃内的代谢的认识有助于日粮结构与组成的优化调整。

在同一日粮结构下，宿主与微生物的互作会影响宿主对饲料的利用，并表现出对动物生产性能的影响。Xue等人[44] 基于GC-TOF-MS平台的研究表明，高乳蛋白产量的奶牛瘤胃氨基酸、羧酸、中长链脂肪酸的相对浓度和挥发性脂肪酸的绝对浓度较高，该种差异是由于瘤胃中特定微生物在对饲料中谷胱甘肽、苯丙氨酸、淀粉、蔗糖和半乳糖代谢所造成。Artegoitia等人[45] 基于LC-MS平台研究杂交牛饲料转化效率瘤胃液代谢组，高/低平均日增重的杂交牛的瘤胃液中共有33种代谢物存在差异，高ADG组下调了亚油酸和α-亚麻酸代谢过程。Clemmons等人[46] 基于LC-MS平台比较具有高/低饲料转化效率牛的瘤胃代谢物种，高饲料转化效率牛瘤胃液中呈现出3,4-二羟基苯乙酸盐、4-吡啶甲酸盐、柠檬酸盐、次黄嘌呤、琥珀酸、胸腺嘧啶、尿嘧啶和木糖的富集；不同生产目的下高产动物表现出独特的瘤胃代谢特点。改善瘤胃内微生物组成有助于瘤胃内微生物代谢模式的塑造继而改善动物生产性能。Kim等人通过粪菌移植的途径，改善了犊牛腹泻情况[47]。

后消化道中营养物质的代谢在动物营养物质获得以及健康中具有重要作用。Tao等人[48]的研究中比较了奶山羊摄入高精料日粮的长短对后消化道中食糜代谢组的影响中，在盲肠中短期高精料摄入增加了盲肠食糜中LPS、乳酸、丙酸盐、丁酸盐和总SCFA含量，长时间精料摄入增加了盲肠食糜中LPS、乳酸的含量；在结肠中，短期的高精料摄入增加了结肠食糜中的乳酸、乙酸盐、丙酸盐、异丁酸盐、丁酸盐、戊酸盐和总SCFA增加，长期的高精料摄入增加了结肠食糜中乙酸盐、丙酸盐和总SCFA含量。当前对后消化道代谢组的研究主要通过粪便代谢组获得。Chen等人[49]使用LC-MS平台的研究指出，粪便中SM（d18:0/16:1（9Z））、PC（15:0/18:2（9Z，12Z）），ADP，PC（16:0/16:0）和3-O-磺基乳糖神经酰胺等6种代谢物与牛肉大理石花纹相关。Elolimy等人[50] 基于平台研究母体日粮甲硫氨酸的添加对后代粪便代谢组的研究中表明，在母体添加过瘤胃甲硫氨酸的刚出生和断奶的犊牛粪便中共鉴定出30种代谢产物，并表现出促进机体能量代谢、维生素合成、抗氧化能力的改善。反刍动物粪便代谢组与瘤胃液代谢组表现出相似性[51]，相比较于瘤胃液，粪便更容易获得，通过对粪便的中特定代谢物监控，在一定程度上可预测动物生产性能与健康状况[52] 。

2.3 代谢组学在反刍动物营养物质吸收过程研究中的应用

一项基于单细胞测序的结果表明，不同的肠段具有不同的在营养物质吸收功能[53]。先前的研究中，从消化器官形态结构、膜蛋白、转录组等角度阐述了营养物质的吸收过程。在小肠的沿隐窝绒毛轴中，代谢组学技术表征绒毛细胞和隐窝细胞之间脂肪酸、氨基酸、葡萄糖和其他代谢物的代谢存在显着差异[54]。代谢组学技术的应用，有助于进一步认识营养物质吸收过程。

反刍动物的瘤胃上皮、小肠段、大肠段对不同类型的营养物质吸收表现出偏好性。在营养物质吸收前，消化道内容物在微生物、化学酶等作用，被处理成适宜的吸收状态。Liu等人[55] 比较了不同剩余采食量条件（RFI）下，肉牛不同小肠段呈现出不同的代谢谱差异，并表征到影响小肠蛋白质消化和吸收以及甘油磷脂代谢过程，进而影响了机体营养物质的获得。Guo等人[56] 使用GC-MS平台研究了高谷物日粮对瘤胃组织代谢组的研究中，共鉴定出101种代谢物，其中甘油酸、尿素、草酸盐、2-酮基葡萄糖酸、葡萄糖、苯乙醇胺、阿洛糖酸和麦芽糖在瘤胃组织中上调，α-氨基丁酸、己酸、肌苷、乳酸、十二烷二酸、氢化肉桂酸和苯甲酸盐在瘤胃组织中下调，主要影响瘤胃上皮中的淀粉和蔗糖代谢、嘌呤代谢、乙醛酸和二羧酸代谢、甘油脂代谢、丙酮酸代谢、糖酵解或糖异生、半乳糖代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢以及精氨酸和脯氨酸代谢过程。Mu等人[57]使用LC-MS平台研究花青素缓解结肠炎指出，高精料日粮引起结肠组织中代谢物花生四烯酸代谢、柠檬酸循环、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢以及过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路途径。前述指出，不恰当的日粮结构会引起消化道内容物中炎性物质的累积，尽管消化道上皮会通过不同层面的调节以满足机体营养物质所需。但消化道内容物中炎性物质的积累会对消化道造成炎症、免疫、抗氧化上的负担，并在一定程度上损害消化道上皮[48, 58]。Wang等人[59] 的研究指出，L-精氨酸能够缓解玉米赤霉烯酮对小肠上皮的在氧化应激、自噬凋亡的影响。Mu等人[57]研究中，花青素可通过调节结肠组织中能量代谢、氨基酸代谢、抗氧化代谢和抑制花生四烯酸代谢途径来改善高浓度饮食诱导的结肠上皮炎症。

2.4 代谢组学在反刍动物营养物质代谢过程研究中的应用

经消化器官吸收后的营养物质会通过循环系统进入肝脏、肌肉、脂肪等组织中代谢。先前的研究中，会通过有限的血清生理生化指标、体况、乳品质等对机体的代谢状况进行监控评价，进而调整营养策略；代谢组学的应用，有助于增进对机体或靶向组织营养物质代谢网络的了解。

肝脏承担了循环系统递送的营养物质中主要的代谢过程。Wang等人[60] 基于肝脏代谢组学的研究指出藏羊摄入膜荚黄芪后影响肝脏组氨酸、烟酸、蛋氨酸、脂肪酸、谷氨酸、戊糖、谷胱甘肽、嘌呤和嘧啶的代谢途径，并改善肝脏中能量代谢状况。Wei等人[36] 使用GS-TOF-MS平台比较在产后和围产期补充烟酰胺对子代犊牛肝脏代谢组影响的研究中，产后烟酰胺的补充变现出半胱氨酸和蛋氨酸代谢特异性，围产期烟酰胺补充具有嘌呤、泛酸盐和CoA生物合成、乙醛酸盐和二羧酸盐、β-丙氨酸、甘油磷脂以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的特异性。Wang等人[61]的一项研究中，在动、静脉血液中共鉴定出的144种代谢产物中，动、静脉血液中差异代谢物占比在7%左右，动、静脉血液中代谢物的差异与乳腺对柠檬酸、硬脂酸、油酸、果糖、β-甘露糖基甘氨酸、4-羟基丁酸酯和D-塔洛糖的摄取相关。Sun等人[62] 对奶牛肝脏和乳腺的代谢组的比较研究中，在两个组织中共鉴定出179种共同代谢物，分别占肝脏代谢组的66.30%和乳腺代谢组的65.57%； 在乳腺和牛乳中可鉴定到118中共有代谢物，分别占乳腺中代谢物的43.07%和牛乳总代谢物的63.78%[20]。提示机体中除肝脏外的组织器官不同程度的参与循环系统中营养物质的代谢，并用于对动物产品塑造。在乳品质的塑造中，Sun等人[62]研究指出玉米秸秆为主的日粮会导致奶牛乳腺中丙酮、葡萄糖和氨基酸浓度下降，且马尿酸是乳品质降低的生物标志物。 Rocchetti等人[63]的研究中指出日粮中玉米青贮饲料中的水分会引起牛乳中148种代谢物的差异，并影响乳腺中嘧啶代谢过程。Wang等人[30]在奶牛日粮中使用发酵豆粕代替豆粕对奶牛牛乳代谢组的影响中鉴定出26种差异代谢物，并影响机体碳水化合物、脂肪酸，甘油磷酸乙醇胺或甘油磷酸甘油酯代谢过程。此外，乳中的代谢标志物也反映了乳腺或机体的代谢状况[64, 65]。在肉品质塑造方面，Wu等人[66]基于GC-MS平台研究草料纤维和蛋白水平对绵羊背最长肌代谢组的影响中，共鉴定到30中不同的脂肪酸，当羔羊喂食HFLP时，肌肉的必需脂肪酸（亚油酸和花生四烯酸）含量增加。Li等人[37]使用LC-MS平台比较中草药茶渣对牛肉代谢组的研究中，共检测到774种代谢产物，中草药茶渣饲喂的牛肉肌肉中的胆碱、亚麻酸和D-葡萄糖-6-磷酸水平显著降低，而腺苷5′-单磷酸（AMP）、雄烯二酮、花生四烯酸、辛酸、皮质醇、可的松、二十二碳六烯酸、二十二碳五烯酸、D-葡聚糖、组胺、月桂酸、孕酮水平显著升高。Wang等人[7] 基于UHPLC-TOF-MS平台研究不同饲喂方式下，放牧条件下增加了滩羊肌肉风味氨基酸形成。Behan等人[67] 研究使用过瘤胃脂肪改善了羊肉中的脂肪酸组成。肌肉中的代谢产物表明肌肉发育过程中葡萄糖和脂质代谢途径具有重要的作用。

循环系统中代谢产物承载机体众多器官信息。Zhang等人[68] 研究高谷物日粮对奶牛代谢的影响中，仅有15种可鉴定的代谢物在血清和肝脏中所共有，分别占血清代谢组的21.74%和肝脏代谢组的18.07%。在Wang等人[61] 的研究中，动、静脉血液中共鉴定出的144种代谢产物中，动、静脉血液中差异代谢物占比在7%左右。表明静脉血液代谢组表征营养调控途径下机体整体代谢状况。Zhao等人[35] 在犊牛日粮中补充硫酸钠增加了血浆中L-精氨酸，L-蛋氨酸，L-半胱氨酸和L-赖氨酸黄嘌呤和次黄嘌呤、硫胺素和生物素乙酰肉碱和左旋肉碱浓度。Xue等人[44] 基于GC-TOF-MS平台的研究高低乳蛋白产量奶牛的血清代谢组的结果表明，高、低乳蛋白产量的奶牛在甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸和甲硫氨酸的代谢中存在差异。在放牧肉牛的生长速率的研究中，生长速度较快的时期显示出对缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、乙酸盐和 3-羟基丁酸酯的高效利用[69]。You等人[42] 基于UHPLC-QTOF/MS平台研究日粮中玉米含量的增加对肉牛血浆代谢组的研究中，共鉴定到386种代谢产物，高玉米日粮的使用增加了血浆中二羟丙酮、L-岩藻糖、D-甘露糖、蔗糖、异麦芽糖和除L-赖氨酸、L-瓜氨酸和L-胱氨酸外的氨基酸含量；在上述Zhang等人[68] 的研究中，奶牛高谷物日粮的摄入使得血清中三碳烯丙基酸、2-乙基甲基丙烯酸、氨基丙二酸、甘氨酸、脯氨酸、酪氨酸、D-果糖、胆固醇、次黄嘌呤、磷酸含量上调。在上述两项相近的研究中，不同物种的血清代谢谱表现出一定的相似性。

2.5 代谢组学在反刍动物废弃物排泄研究中的应用

在动物营养过程中，不能被动物利用的物质以废物的形式进行排泄。在反刍动物中，主要包括粪便、尿液、甲烷等；动物废物的排放不仅是对摄入的营养物质的浪费，同样会对环境造成污染。

瘤胃发酵过程中产生的H2、CO2、甲酸等底物在瘤胃微生物区系的协同作用下生成甲烷。反刍动物贡献了畜牧业甲烷排放量的40%[70]。由于甲烷的测定条件受限，通过乳代谢产物、建立了甲烷生成预测模型[71]。当前的研究中，已明确了甲烷的生成途径，通过调整消化道内微生物结构改变利用氢汇的能力以降低甲烷的生成，并表现出不同的瘤胃液代谢组特点。Bica等人[72] 比较不同精粗比日粮对牛甲烷排放的影响的研究中，高精料的采食降低了牛消化道中甲烷的生成，并在瘤胃液代谢组中表现出更高的丙氨酸、戊酸盐、丙酸盐、葡萄糖、酪氨酸、脯氨酸和异亮氨酸含量。Li等人[73]的研究中胆碱的使用可以提高瘤胃液中乙醇的含量从而减少甲烷的生成。Jense等人[74]基于LC-MS平台研究在体外使用大麻提取物对甲烷生成的影响中指出，培养液中的黄酮类化合物降低了甲烷生成，培养液中丁酸含量增加了甲烷生成。Yanibada等人[75]对比抗甲烷添加剂使用效果的研究中，抗甲烷添加剂使奶牛肠道中甲烷产量的降低了23%，且并未影响奶牛生产性能，牛乳中的二甲基亚砜、二甲基砜和柠檬酸可能与瘤胃微生物参与下的甲烷生成相关。尽管不同研究中，通过代谢组学鉴定出代谢标志物有所差异，但不同的代谢产物充当了氢汇，减少了氢向甲烷中的生成。

粪污排放是畜牧生产中主要污染源。前述中指出代谢组在粪便中的应用常用于后消化道微生物发酵的研究中，且在一定程度上可预测动物生产性能与健康状况。在尿液代谢组的研究中，尿液中的代谢物可用于对机体代谢、健康状况的监控[76]。Wang等人[30]在奶牛日粮中使用发酵豆粕代替豆粕对奶牛尿液代谢组的影响中鉴定出28种差异代谢物，并与碳水化合物、氨基酸、肽和类似物或嘌呤核苷组成的代谢物途径相关。在生长绵羊的日粮中补充过瘤胃胆碱降低了尿丙酮酸浓度，但提高了尿液中三甲胺氧化物、对甲酚、苯乙酰甘氨酸和马尿酸的浓度[77]

3 小结

代谢组学在反刍动物营养过程中的研究中，通过对不同组织、体液、排泄物的研究，可获得不同组织、器官在动物营养调控过程中的联动认识。还缺少在动物营养过程中各组织、器官节律特征以及时空特征认识。由于反刍动物营养过程的复杂，对动物营养机理认识仍需要结合转录组、蛋白组、微生物组等高通量检测技术获得的数据进行联合分析。当前，通过单细胞测序技术，细化了参与生命过程中不同种类的细胞的参与程度，随着代谢组学检测技术的发展，细胞中低丰度、微量的代谢物检测成为可能，有助于增进对于同一组织不同种类细胞代谢偏好的认识。

参考文献：

[1] Miggiels P, Wouters B, van Westen G J P, et al. Novel technologies for metabolomics: More for less[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019,120:115323.

[2] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems topathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biologicalNMR spectroscopic data[J]. Xenobiotica, 1999,29(11):1181-1189.

[3] Sussulini A. Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications, 2017.

[4] Johnson C H, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2016,17(7):451-459.

[5] Hu S, Liu C, Liu X. Innovative Application of Metabolomics on Bioactive Ingredients of Foods[J]. Foods, 2022,11(19).

[6] Dubin R F, Rhee E P. Proteomics and Metabolomics in Kidney Disease, including Insights into Etiology,Treatment, and Prevention[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2020,15(3):404-411.

[7] Wang B, Wang Y, Zuo S, et al. Untargeted and Targeted Metabolomics Profiling of Muscle Reveals Enhanced Meat Quality in Artificial Pasture Grazing Tan Lambs via Rescheduling the Rumen Bacterial Community[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021,69(2):846-858.

[8] Foroutan A, Goldansaz S A, Lipfert M, et al. Protocols for NMR Analysis in Livestock Metabolomics[J]. Methods Mol Biol, 2019,1996:311-324.

[9] Babu A F, Csader S, Männistö V, et al. Effects of exercise on NAFLD using non-targeted metabolomics in adipose tissue,plasma, urine, and stool[J]. Sci Rep, 2022,12(1):6485.

[10] Vuckovic D. Chapter 4 - Sample Preparation in Global Metabolomics of Biological Fluids and Tissues[M]//Issaq H J, Veenstra T D. Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery. Boston: Academic Press, 2013:51-75.

[11] Beale D J, Pinu F R, Kouremenos K A, et al. Review of recent developments in GC-MS approaches to metabolomics-based research[J]. Metabolomics, 2018,14(11):152.

[12] Mushtaq M Y, Choi Y H, Verpoorte R, et al. Extraction for metabolomics: access to the metabolome[J]. Phytochem Anal, 2014,25(4):291-306.

[13] Villas-Boas S G, Roessner-Tunali U, Hansen M, et al. Metabolome Analysis: An Introduction[M]. Metabolome Analysis: An Introduction, 2007.

[14] Segers K, Declerck S, Mangelings D, et al. Analytical techniques for metabolomic studies: a review[J]. Bioanalysis, 2019,11(24):2297-2318.

[15] Salem M A, Perez De Souza L, Serag A, et al. Metabolomics in the Context of Plant Natural Products Research: From Sample Preparation to Metabolite Analysis: Metabolites[Z]. 2020: 10.

[16] Obata T, Fernie A. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses[J]. Cellular and Molecular Life ences, 2012,69(19):3225-3243.

[17] Katajamaa M, Orešič M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics[J]. Journal of Chromatography A, 2007,1158(1):318-328.

[18] Goldansaz S A, Guo A C, Sajed T, et al. Livestock metabolomics and the livestock metabolome: A systematic review[J]. PLoS One, 2017,12(5):e177675.

[19] Wang B, Zhang B, Zhou L, et al. Multi-omics reveals diet-induced metabolic disorders and liver inflammation viamicrobiota-gut-liver axis[J]. J Nutr Biochem, 2023,111:109183.

[20] Sun H Z, Shi K, Wu X H, et al. Lactation-related metabolic mechanism investigated based on mammary glandmetabolomics and 4 biofluids' metabolomics relationships in dairy cows[J]. BMC Genomics, 2017,18(1):936.

[21] Xu D, Ding W, Ke W, et al. Modulation of Metabolome and Bacterial Community in Whole Crop Corn Silage byInoculating Homofermentative Lactobacillus plantarum and HeterofermentativeLactobacillus buchneri[J]. Front Microbiol, 2018,9:3299.

[22] Du Z, Sun L, Lin Y, et al. Using PacBio SMRT Sequencing Technology and Metabolomics to Explore theMicrobiota-Metabolome Interaction Related to Silage Fermentation of Woody Plant[J]. Front Microbiol, 2022,13:857431.

[23] Wang B, Gao R, Wu Z, et al. Functional Analysis of Sugars in Modulating Bacterial Communities andMetabolomics Profiles of Medicago sativa Silage[J]. Front Microbiol, 2020,11:641.

[24] Palma-Hidalgo J, Belanche A, Jiménez E, et al. Multi-Omics Study of The Salivary Modulation of The Rumen Microbiome[M]. 2021.

[25] Franco-Martínez L, Muñoz-Prieto A, Contreras-Aguilar M D, et al. Changes in saliva proteins in cows with mastitis: A proteomic approach[J]. Research in Veterinary Science, 2021,140:91-99.

[26] Contreras-Aguilar M D, Vallejo-Mateo P J, Lamy E, et al. Changes in salivary analytes in cows due to the in vitro presence of feed[J]. BMC Veterinary Research, 2022,18(1):1-10.

[27] de Almeida R T R, Do Prado R M, Porto C, et al. Exploring the rumen fluid metabolome using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry and Molecular Networking[J]. Scientific Reports, 2018,8(1):17971.

[28] Zhang Y, Wang C, Peng A, et al. Metagenomic Insight: Dietary Thiamine Supplementation Promoted the Growth ofCarbohydrate-Associated Microorganisms and Enzymes in the Rumen of Saanen GoatsFed High-Concentrate Diets[J]. Microorganisms, 2021,9(3).

[29] Ma Y, Wang C, Zhang H, et al. Illumina Sequencing and Metabolomics Analysis Reveal Thiamine Modulation ofRuminal Microbiota and Metabolome Characteristics in Goats Fed a High-ConcentrateDiet[J]. Front Microbiol, 2021,12:653283.

[30] Wang Z, Yu Y, Shen W, et al. Metabolomics Analysis Across Multiple Biofluids Reveals the Metabolic Responses of Lactating Holstein Dairy Cows to Fermented Soybean Meal Replacement[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2022,9.

[31] Zhang J, Shi H, Wang Y, et al. Effect of Dietary Forage to Concentrate Ratios on Dynamic Profile Changes andInteractions of Ruminal Microbiota and Metabolites in Holstein Heifers[J]. Front Microbiol, 2017,8:2206.

[32] Pang K, Chai S, Yang Y, et al. Dietary forage to concentrate ratios impact on yak ruminal microbiota andmetabolites[J]. Front Microbiol, 2022,13:964564.

[33] Yi S, Dai D, Wu H, et al. Dietary Concentrate-to-Forage Ratio Affects Rumen Bacterial Community Compositionand Metabolome of Yaks[J]. Front Nutr, 2022,9:927206.

[34] Wang B, Ma M P, Diao Q Y, et al. Saponin-Induced Shifts in the Rumen Microbiome and Metabolome of Young Cattle[J]. Front Microbiol, 2019,10:356.

[35] Zhao Y, Xie B, Gao J, et al. Dietary Supplementation with Sodium Sulfate Improves Rumen Fermentation, Fiber Digestibility, and the Plasma Metabolome through Modulation of Rumen Bacterial Communities in Steers[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020,86(22):e1412-e1420.

[36] Wei X, Yin Q, Zhao H, et al. Regulation of Nutritional Metabolism in Different Perinatal Period of Does: Energy Metabolism Efficiency, Lipid Metabolism, Oxidative Stress and Liver Metabolomics Profile in Response to Nicotinamide Supplementation, 2020.

[37] Li L, Sun X, Luo J, et al. Effects of Herbal Tea Residue on Growth Performance, Meat Quality, Muscle Metabolome, and Rumen Microbiota Characteristics in Finishing Steers[J]. Frontiers in Microbiology, 2022.

[38] Li H, Yu Q, Li T, et al. Rumen Microbiome and Metabolome of Tibetan Sheep (Ovis aries) Reflect Animal Ageand Nutritional Requirement[J]. Front Vet Sci, 2020,7:609.

[39] Saleem F, Ametaj B N, Bouatra S, et al. A metabolomics approach to uncover the effects of grain diets on rumen health in dairy cows[J]. Journal of Dairy Science, 2012,95(11):6606-6623.

[40] Ametaj B N, Zebeli Q, Saleem F, et al. Metabolomics reveals unhealthy alterations in rumen metabolism with increased proportion of cereal grain in the diet of dairy cows[J]. Metabolomics, 2010,6(4):583-594.

[41] Mao S Y, Huo W J, Zhu W Y. Microbiome-metabolome analysis reveals unhealthy alterations in the compositionand metabolism of ruminal microbiota with increasing dietary grain in a goatmodel[J]. Environ Microbiol, 2016,18(2):525-541.

[42] Yang Y, Dong G, Wang Z, et al. Rumen and plasma metabolomics profiling by UHPLC-QTOF/MS revealed metabolicalterations associated with a high-corn diet in beef steers[J]. PLoS One, 2018,13(11):e208031.

[43] Eom J S, Kim E T, Kim H S, et al. Metabolomics comparison of rumen fluid and milk in dairy cattle using protonnuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. Anim Biosci, 2021,34(2):213-222.

[44] Xue M Y, Sun H Z, Wu X H, et al. Multi-omics reveals that the rumen microbiome and its metabolome together withthe host metabolome contribute to individualized dairy cow performance[J]. Microbiome, 2020,8(1):64.

[45] Artegoitia V M, Foote A P, Lewis R M, et al. Rumen Fluid Metabolomics Analysis Associated with Feed Efficiency on CrossbredSteers[J]. Sci Rep, 2017,7(1):2864.

[46] Clemmons B A, Martino C, Powers J B, et al. Rumen Bacteria and Serum Metabolites Predictive of Feed Efficiency Phenotypes inBeef Cattle[J]. Sci Rep, 2019,9(1):19265.

[47] Kim H S, Whon T W, Sung H, et al. Longitudinal evaluation of fecal microbiota transplantation for ameliorating calf diarrhea and improving growth performance[J]. Nature Communications, 2021,12(1):161.

[48] Tao S, Tian P, Luo Y, et al. Microbiome-Metabolome Responses to a High-Grain Diet Associated with the Hind-Gut Health of Goats[J]. Frontiers in Microbiology, 2017,8.

[49] Chen D, Su M, Zhu H, et al. Using Untargeted LC-MS Metabolomics to Identify the Association of Biomarkers in Cattle Feces with Marbling Standard Longissimus Lumborum: Animals[Z]. 2022: 12.

[50] Elolimy A, Alharthi A, Zeineldin M, et al. Supply of Methionine During Late-Pregnancy Alters Fecal Microbiota and Metabolomein Neonatal Dairy Calves Without Changes in Daily Feed Intake[J]. Front Microbiol, 2019,10:2159.

[51] Malheiros J M, Correia B S B, Ceribeli C, et al. Comparative untargeted metabolome analysis of ruminal fluid and feces of Nelore steers (Bos indicus)[J]. Scientific Reports, 2021,11(1):12752.

[52] Valerio A, Casadei L, Giuliani A, et al. Fecal Metabolomics as a Novel Noninvasive Method for Short-Term Stress Monitoringin Beef Cattle[J]. J Proteome Res, 2020,19(2):845-853.

[53] Wang Y, Song W, Wang J, et al. Single-cell transcriptome analysis reveals differential nutrient absorptionfunctions in human intestine[J]. J Exp Med, 2020,217(2).

[54] Yang H, Xia X, Yin Y. Metabolomic analysis of intestinal epithelial cell maturation along the crypt–villus axis[J]. RSC Advances, 2016,6.

[55] Liu Y, Liu C, Wu H, et al. Small Intestine Microbiome and Metabolome of High and Low Residual Feed Intake Angus Heifers[J]. Frontiers in Microbiology, 2022,13.

[56] Guo C, Sun D, Wang X, et al. A Combined Metabolomic and Proteomic Study Revealed the Difference in Metabolite and Protein Expression Profiles in Ruminal Tissue From Goats Fed Hay or High-Grain Diets[J]. Frontiers in Physiology, 2019,10.

[57] Mu C, Zhang X, Zhang J, et al. Procyanidins regulate colonic metabolome, inflammatory response and antioxidant capacity in lambs fed a high‐concentrate diet[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2022.

[58] Mu Y, Qi W, Zhang T, et al. Multi-omics Analysis Revealed Coordinated Responses of Rumen Microbiome and Epithelium to High-Grain-Induced Subacute Rumen Acidosis in Lactating Dairy Cows[J]. mSystems, 2022,7(1):e1421-e1490.

[59] Wang H, Xiao Y, Xu C, et al. Integrated Metabolomics and Transcriptomics Analyses Reveal Metabolic Mechanisms in Porcine Intestinal Epithelial Cells under Zearalenone Stress[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022,70(21):6561-6572.

[60] Wang X, Hu C, Ding L, et al. Astragalus membranaceus Alters Rumen Bacteria to Enhance Fiber Digestion,Improves Antioxidant Capacity and Immunity Indices of Small Intestinal Mucosa,and Enhances Liver Metabolites for Energy Synthesis in Tibetan Sheep[J]. Animals (Basel), 2021,11(11).

[61] Wang B, Sun H, Wu X, et al. Arteriovenous blood metabolomics: An efficient method to determine the key metabolic pathway for milk synthesis in the intra-mammary gland[J]. Scientific Reports, 2018,8.

[62] Sun H Z, Zhou M, Wang O, et al. Multi-omics reveals functional genomic and metabolic mechanisms of milkproduction and quality in dairy cows[J]. Bioinformatics, 2020,36(8):2530-2537.

[63] Rocchetti G, Ghilardelli F, Carboni E, et al. Milk metabolome reveals pyrimidine and its degradation products as thediscriminant markers of different corn silage-based nutritional strategies[J]. J Dairy Sci, 2022,105(11):8650-8663.

[64] Xu W, van Knegsel A, Saccenti E, et al. Metabolomics of Milk Reflects a Negative Energy Balance in Cows[J]. J Proteome Res, 2020,19(8):2942-2949.

[65] Xi X, Kwok L, Wang Y, et al. Ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry MSE-based untargeted milk metabolomics in dairy cows with subclinical or clinical mastitis.[J]. Journal of dairy science, 2017,100 6:4884-4896.

[66] Wu J, Yang D, Gong H, et al. Multiple omics analysis reveals that high fiber diets promote gluconeogenesis andinhibit glycolysis in muscle[J]. BMC Genomics, 2020,21(1):660.

[67] Behan A A, Akhtar M T, Loh T C, et al. Meat Quality, Fatty Acid Content and NMR Metabolic Profile of Dorper Sheep Supplemented with Bypass Fats: Foods[Z]. 2021: 10.

[68] Zhang R Y, Liu Y J, Yin Y Y, et al. Response of rumen microbiota, and metabolic profiles of rumen fluid, liver and serum of goats to high-grain diets[J]. Animal, 2019,13(9):1855-1864.

[69] Imaz J A, García S, González L A. The metabolomics profile of growth rate in grazing beef cattle[J]. Sci Rep, 2022,12(1):2554.

[70] Asselstine V, Lam S, Miglior F, et al. The potential for mitigation of methane emissions in ruminants through theapplication of metagenomics, metabolomics, and other -OMICS technologies[J]. J Anim Sci, 2021,99(10).

[71] van Gastelen S, Antunes-Fernandes E C, Hettinga K A, et al. The relationship between milk metabolome and methane emission of Holstein Friesian dairy cows: Metabolic interpretation and prediction potential[J]. Journal of Dairy Science, 2018,101(3):2110-2126.

[72] Bica R, Palarea-Albaladejo J, Kew W, et al. Nuclear Magnetic Resonance to Detect Rumen Metabolites Associated with Enteric Methane Emissions from Beef Cattle[J]. Scientific Reports, 2020,10(1):5578.

[73] Li Y, Kreuzer M, Clayssen Q, et al. The rumen microbiome inhibits methane formation through dietary choline supplementation[J]. Scientific Reports, 2021,11(1):21761.

[74] Jensen R H, Rønn M, Thorsteinsson M, et al. Untargeted Metabolomics Combined with Solid Phase Fractionation for Systematic Characterization of Bioactive Compounds in Hemp with Methane Mitigation Potential: Metabolites[Z]. 2022: 12.

[75] Yanibada B, Hohenester U, Pétéra M, et al. Milk metabolome reveals variations on enteric methane emissions from dairy cows fed a specific inhibitor of the methanogenesis pathway[J]. Journal of Dairy Science, 2021,104(12):12553-12566.

[76] Bruzzone C, Gil-Redondo R, Seco M, et al. A molecular signature for the metabolic syndrome by urine metabolomics[J]. Cardiovascular Diabetology, 2021,20(1):155.

[77] Jin Y, Li H, Wang H. Dietary rumen-protected choline supplementation regulates blood biochemicalprofiles and urinary metabolome and improves growth performance of growing lambs[J]. Anim Biotechnol, 2021:1-11.