

奶牛酮病的血浆代谢组学分析

孙玲伟, 张洪友*, 夏成, 包凯, 李兰, 李影

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319)

摘要: 应用生物核磁共振技术结合主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析法(OPLS-DA)分别分析奶牛在患有临床酮病和亚临床酮病时内源性代谢产物的变化, 研究酮病对奶牛代谢过程的影响, 寻找差异表达的代谢物。运用 ^1H 核磁共振(^1H NMR)技术获得临床酮病组、亚临床酮病组与健康对照组3组奶牛血浆代谢组谱。所采集的数据经过模式分析获得差异代谢物。结果显示: 临床酮病组、亚临床酮病组与健康对照组相比, 差异性代谢物均为23个, 其中临床酮病组6个表达上调, 17个表达下调; 而亚临床酮病组13个表达上调, 10个表达下调。临床酮病组与亚临床酮病组相比, 差异性代谢物为28个, 其中4个表达上调, 24个表达下调。结果表明 ^1H NMR谱结合模式识别分析技术能有效获得区别奶牛临床酮病和亚临床酮病的差异代谢物, 并全景式地揭示了酮病发生过程中机体发生的广泛代谢紊乱, 为今后深入探究酮病发生机理和新的防治策略奠定了基础。

关键词: ^1H NMR; 代谢组学; 酮病; 多元统计分析

中图分类号: S856.5

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)10-1667-08

Serum Metabonomic Studies of Ketosis in Dairy Cows

SUN Ling-wei, ZHANG Hong-you*, XIA Cheng, BAO Kai, LI Lan, LI Ying

(College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: Through the application of biological NMR technique combines principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA), changes of endogenous metabolites with clinical and subclinical ketosis cows were analyzed, which may help to study the effects of ketosis on cow metabolic process, and find the differences metabolites. The plasma metabolic profiles of the three groups were obtained by ^1H nuclear magnetic resonance (^1H NMR). Differences in metabolites were acquired by analyzing the collected data with mode analysis. Results were as follows: compared with the healthy control group, 23 different metabolites were obtained in subclinical (13 were up-regulated, 10 were down-regulated) and clinical (6 were up-regulated, 17 were down-regulated) ketosis groups. By comparison, 28 different metabolites were obtained between clinical ketosis group (4 were up-regulated, 24 were down-regulated) and subclinical ketosis group. The results indicate that ^1H NMR spectra combined with pattern recognition technique can effectively get the different metabolites of diagnosing clinical and subclinical ketosis, and panoramic reveal that widely metabolic disorder on cows in the process of ketosis, which lays the foundation for the exploration of ketosis mechanism and obtaining new biomarkers in the future.

Key words: ^1H NMR; metabonomics; ketosis; multivariate statistical analysis

收稿日期: 2013-03-04

基金项目: 国家自然科学基金(31072181); 国家科技支撑计划课题(2012BAD12B03-2)

作者简介: 孙玲伟(1987-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士生, 主要从事临床兽医学研究, E-mail: 54243187@qq.com

* 通信作者: 张洪友, 男, 教授, 硕士生导师, E-mail: zhy478@163.com

奶牛酮病(ketosis)是一种原发性或继发性且多发于奶牛泌乳早期的营养代谢性紊乱疾病^[1,2]。通常是由于奶牛产后大量泌乳和/或能量物质摄入不足所致的能量负平衡不能有效缓解,而促发酮病^[3]。当奶牛血糖过低时,机体动员体脂以补充能量^[4]。部分分解的脂肪在肝脏中转化为酮体(即乙酰乙酸、 β -羟丁酸和丙酮),从而导致血液中酮体含量过多。一旦奶牛体内新陈代谢和内分泌系统不能调节能量负平衡,酮体则会加速产生且无法被机体清除,从而发生酮病^[5]。酮病最主要的临床特征是厌食、精神沉郁和机能障碍等^[2-5]。酮病因造成奶牛生产性能、繁殖性能下降^[4],给奶牛场带来巨大损失,而受到奶牛养殖业的高度重视。

代谢组学是研究机体内有关药物毒性、疾病发展进程和基因功能的代谢特征的系统分析方法。它可以对特定的生物样品进行全面的、低分子量的分子定量分析^[6]。目前,常用的代谢组学技术包括:核磁共振(NMR)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)、液相色谱-质谱联用(LC-MS)和代谢物芯片等^[7]。在这些技术中,NMR技术在临床研究中具有明显的优势。第一,它可以直接对血清、血浆或尿液进行检测,避免了样品的特别预处理;第二,NMR的数据库已经确定了许多小分子代谢物^[8]。通常应用¹H NMR光谱结合多元统计进行疾病分析,以便获得新的特征性生物标识物,为揭示发病机理和识别疾病提供了新方法^[9]。

尽管已有许多关于人、鼠的代谢病方面的代谢组学研究报道^[9-12],但是有关奶牛酮病的代谢组学相关研究很少^[13],并且将奶牛酮病分成临床酮病、

亚临床酮病血浆代谢组学的研究报道也尚未发现。因此,本试验首次应用¹H NMR技术探讨临床酮病、亚临床酮病血浆代谢组学的变化,为深入探究奶牛酮病发生的新机制和寻求新的生物标示物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物选择和分组

在黑龙江省密山市某千头奶牛场,选取产后7~21 d、2~3胎的80头奶牛。其中24头为临床酮病组(CK),33头为亚临床酮病组(SK),23头为对照组(C)。动物选取标准:CK组奶牛产后表现出明显的酮病临床症状和血浆 β -羟丁酸(BHBA)浓度 $>1.60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;SK组奶牛产后无明显酮病临床表现和血浆BHBA浓度 $>1.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;C组奶牛产后无任何临床症状和血浆BHBA浓度 $<1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[14-15]。奶牛饲喂围产期全混合日粮(TMR),其组成:精料8~9 kg,青贮17~20 kg,以优质干草为主、干草3.5~4 kg,脂肪300~400 g。其日粮营养水平:DM 55.60%、粗蛋白16%、产奶净能 $7.33 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$ DM、脂肪5.60%、NDF 39.10%、ADF 20.30%、钙180 g、磷116 g。

1.2 样品采集和检测指标

清晨空腹采集奶牛尾静脉血液样本10 mL,立即在室温下 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min。将上清液等分到EP管中(每管1 mL血浆),并贮存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。记录动物的临床参数和测定血浆理化指标。临床参数包括年龄、胎次、泌乳量、血糖、 β -羟丁酸,见表1。

表1 试验牛的临床资料和理化指标的状况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Clinical data and biochemical parameters in experimental cattle ($\bar{x} \pm s$)

因素 Parameters	临床酮病组 CK	亚临床酮病组 SK	对照组 C
数量 Number	24	33	23
产后时间/d Postpartum days	13 \pm 5	14 \pm 4	16 \pm 4
年龄 Age	3 \pm 2	3 \pm 1	3 \pm 2
胎次 Parity	2 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1
泌乳量/($\text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$) Average daily milk yield	24.82 \pm 6.12	24.12 \pm 5.41	23.09 \pm 5.08
血糖/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) Glucose	1.80 \pm 0.71 ^A	2.72 \pm 0.54 ^B	3.68 \pm 0.36 ^C
β -羟丁酸/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) BHBA	2.61 \pm 0.49 ^A	1.24 \pm 0.34 ^B	0.74 \pm 0.67 ^C

同行数据后所标字母相异表示差异显著($P<0.05$),所标字母相同表示差异不显著($P>0.05$)

Different superscript letters in the same row means significant difference between the treatments ($P<0.05$), same superscript letter in the same row means not significant difference between treatments ($P>0.05$)

1.3 ^1H NMR 的血浆代谢轮廓

取 3 组奶牛的血浆样本室温下解冻,每份血浆 400 μL 等分试样混合 170 μL 重水。血浆样品 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取 500 μL 上清液置于 5 mm 核磁共振管。在 Varian Unity Inova 600 MHz 超导核磁共振谱仪上记录所有的 ^1H NMR 谱。一维谱录使用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 序列^[16-17]与自旋弛豫延迟 2.1 s 和光谱宽度为 8 000 Hz。

1.4 统计分析

应用 SPSS 软件(SPSS 公司,芝加哥,IL,美国) One-way ANOVA(单因素方差分析)对奶牛血浆理化指标进行统计分析。整个研究过程中,阈值 P 值设定为 0.05。

所有谱图在进行傅立叶变换时均乘以增宽因子为 1 Hz 的指数窗函数以提高信噪比。所有的 ^1H -NMR 谱和基线校正均使用 TopSpin 软件(V3.0 BRUKER BIOSPIN, 德国)人工处理。根据文献[11],血浆样品的 ^1H NMR 谱图,以乳酸在 1.33 ppm(ppm 应为 $\times 10^{-6}$,本文仍按惯例保留)处的双峰定标。然后,积分区间为 9.0~0.5 ppm,积分间距为 0.002 ppm。去掉 6.50~5.40 ppm 处的尿素峰和 5.39~4.35 ppm 包含残余的水峰,以消除基线的影响。最后,集成和优化数据作进一步的分析。

标准化的数据导入 SIMCA-P+ 软件(V11.0 Umetrics AB,Umea, Sweden)进行多元统计分析。主要包括主成分分析法(Principal Component Analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal Partial Least-Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA)。

首先应用 PCA 分析 ^1H NMR 血浆代谢物信号,以比较的方式显示数据集的内部结构,并降低数据的维数,判断组间的差异性^[18-19]。根据 PCA 分析结果,将 3 组血浆 NMR 数据进行 OPLS-DA 分析。OPLS-DA 在代谢组学研究中的判别能力优于简单独立建模类推法等方法^[20]。其中 $R^2\text{X}$ 、 $R^2\text{Y}$ 和 Q^2 是所建模型的质量评价指标。分析模型的优化程度用 $R^2\text{X}$ 参数描述,表示 X 的总变异;用交叉核实参数 Q^2 描述模型的累积预测程度,表示预测结果的真实性。

之后,通过 OPLS-DA 获得的每一个积分段所代表的代谢物,确定不同组间差异性代谢成分。其次,根据皮尔森相关系数显著性差异检测(Pearson's

Product Manent Correlation Coefficient)确定相关系数 r 。最后,根据相关系数确定 3 组样品代谢物差异性表达变化。

2 结果

2.1 动物的临床信息分析

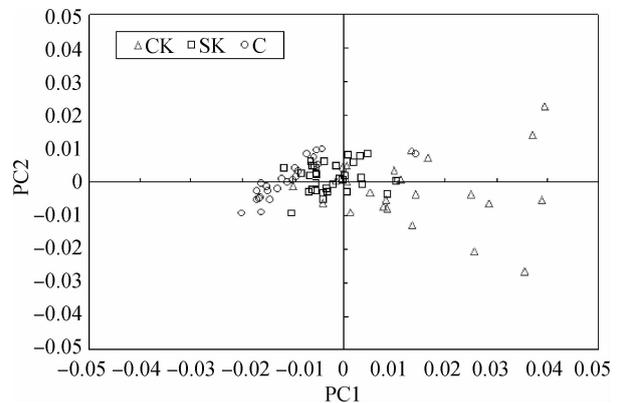
收集 CK、SK 和 C 组的临床数据,而揭示其中的某些生化差异(表 1)。3 组奶牛的年龄、胎次、泌乳量彼此间无显著性差异($P > 0.05$)。但 3 组之间血液中 BHBA 和血糖浓度彼此间有显著性差异($P < 0.05$)。

2.2 血浆样品的 ^1H NMR 谱

所有常见的代谢产物的 ^1H -NMR 信号,如酮体、氨基酸、有机酸和碳水化合物,根据以往的出版物进行分配^[16]。通过对比 3 组间差异峰的强度,鉴定的内源性化合物包括大量的酮体、氨基酸物质、有机酸、碳水化合物和脂蛋白等。提取有用的信息后进行多元统计分析,包括 PCA 和 OPLS-DA 分析。

2.3 多元统计分析

为了建立一个所有组间的全景比较,需要进一步分析所有的 NMR 光谱。首先进行主成分分析,从而获得 PCA 的 2 个主成分(PC1 与 PC2),对 ^1H 谱图贡献的总贡献率为 77.0%(PC1 与 PC2 分别为 60.4% 和 16.6%)。得分图每一个点代表一个样品。在图 1 中,所有组的 PCA 得分图显示 $R^2\text{X} = 0.771\%$, $Q^2 = 0.658$ 。



△, 临床酮病组(CK); □, 亚临床酮病组(SK); ○, 对照组(C)

△, Clinical ketosis group (CK); □, Subclinical ketosis group (SK); ○, Healthy control group (C)

图 1 基于 3 组的血浆 ^1H CPMG NMR 获得的 PCA 得分图

Fig. 1 PCA scores plot based on ^1H NMR spectra of serum obtained from different groups

PCA 聚集了 3 组样品,但表现出了一定程度的重叠,而后使用第一主要组分($t[1]P$)和第二正交组分($t[2]O$)构建模式识别技术的 OPLS-DA 模型。基于 OPLS-DA,临床酮病组(CK)和对照组(C)比较得到 $R^2X = 30.7\%$, $Q^2 = 0.706$;亚临床酮病组(SK)和对照组(C)比较得到 $R^2X = 25.1\%$, $Q^2 = 0.510$;临床酮病组(CK)和亚临床酮病组(SK)比较得到 $R^2X = 24.6\%$, $Q^2 = 0.462$ 。通过 OPLS-DA 分析,有助于分离不同组间的主要代谢产物,从而最大限度地显示组间的差异,寻找出具有特征性的差异代谢物^[19]。建立 OPLS-DA 模型确定特征性组之间的代谢物的变化,有可能找出组间潜在的标志性

代谢物。

2.4 差异代谢物的表达变化

表 2 根据相关系数值列出不同组间差异代谢物上调或下调的表达变化。临床酮病组与对照组相比有 23 个代谢物差异表达,其中 6 个表达上调,17 个表达下调;亚临床酮病组与对照组比较有 23 个差异性代谢物,其中 13 个表达上调,10 个表达下调;在临床酮病组和亚临床酮病组中寻找到的 28 个差异性代谢物中有 4 个表达上调,24 个表达下调。这些代谢物的差异表达,不仅体现出组间的差异性,也为寻找临床和亚临床酮病的特征性诊断标示物奠定了基础。

表 2 3 组间差异代谢物的表达变化

Table 2 Differential expression of metabolite changes between the three groups

编号 No.	代谢物 Metabolites	CK Vs C	SK Vs C	CK Vs SK
1	1-甲基组氨酸:7.06(s ^a), 7.78(s) 1-methylhistidine	↓ ^b	↓	↓
2	β-羟丁酸:1.20(d), 2.31(dd), 2.41(dd), 4.16(m) BHBA	↑	↑	↑
3	3-甲基组氨酸:6.99(s), 7.74(s) 3-methylhistidine	↓	↓	↓
4	乙酸:1.92(s) Acetate	↑	↑	-
5	乙酰乙酸:2.28(s) Acetoacetate	↑	↑	↑
6	丙酮:2.23(s) Acetone	↑	↑	↑
7	丙氨酸:1.48(d) Alanine	↓	-	↓
8	尿囊素:5.39(s) Allantoin	-	↑	-
9	胆碱:3.20(s) Choline	-	↑	↓
10	柠檬酸:2.54(d), 2.68(d) Citrate	↓	-	↓
11	肌酸:3.04(s), 3.93(s) Creatine	-	↑	↓
12	甲酸:8.46(s) Formate	↓	-	↓
13	谷氨酸:2.10(m), 2.35(m), 3.78(t) Glutamate	↓	↓	↓
14	谷氨酰胺:2.14(m), 2.45(m), 3.78(t) Glutamine	↓	↓	↓
15	甘氨酸:3.56(s) Glycine	-	↑	↓
16	异亮氨酸:0.94(t), 1.01(d) Isoleucine	↓	↑	↓
17	低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白:0.87(br) LDL & VLDL	↓	-	↓
18	乳酸:1.33(d), 4.12(q) Lactate	↓	↓	↓
19	亮氨酸:0.96(d) Leucine	-	↑	↓
20	赖氨酸:1.71(m), 1.90(m), 3.01(m), 3.76(t) Lysine	↓	↓	↓
21	肌醇:3.59(dd), 3.66(dd), 4.06(m) Inositol	↓	↑	↓
22	N-乙酰葡萄糖胺:2.04(s) N-acetyl glycoprotein	↑	↑	↓
23	苯丙氨酸:7.33(m), 7.38(m), 7.42(m) Phenylalanine	↓	↓	↓
24	脯氨酸:2.01(m), 2.08(m) Proline	↓	-	↓
25	酪氨酸:6.90(d), 7.19(d) Tyrosine	↓	-	↓
26	未知峰 1:1.17(d) Unassigned resonance 1	↑	↑	↑
27	未知峰 2:3.15(s) Unassigned resonance 2	-	-	↓
28	缬氨酸:0.99(d), 1.04(d) Valine	-	↑	↓
29	α-葡萄糖:3.42(t), 3.54(dd), 3.71(t), 3.73(m), 3.84(m), 5.23(d) α-Glucose	↓	↓	↓
30	β-葡萄糖:3.25(dd), 3.41(t), 3.46(m), 3.49(t), 3.90(dd), 4.65(d) β-Glucose	↓	↓	↓

^a峰的多重性:s.单峰;d.双峰;t.三重峰;q.四重峰;dd.二联的双重峰;m.多重峰;br.广泛的共鸣。^b“↓”表示前者相对于后者表达下调;“↑”表示前者相对于后者表达上调;“-”表示二组比较无明显变化

^aMultiplicity; s. singlet; d. doublet; t. triplet; q. quartet; dd. doublet of doublets; m. multiplet; br. broad resonance; ^b“↓” Compared to the latter, the former is downregulated expression; “↑” Compared to the latter, the former is up-regulated expression; “-” no obvious change

3 讨论

本研究是基于 NMR 代谢组学技术,分析临床和亚临床酮病奶牛血浆代谢物谱特性。结果显示,临床酮病、亚临床酮病与对照组比较,血浆中酮体含量均显著升高,而血糖含量下降。这不仅与本试验表 2 结果相一致,也证实了奶牛酮病高血酮和低血糖的生化特征^[21]。因此,代谢组学技术不仅能有效地验证以往的研究结果,还能了解机体整体代谢状况。本试验结果显示,在酮病发生时,奶牛体内酮体、氨基酸、有机酸和碳水化合物等含量均发生了改变。

3.1 碳水化合物代谢异常

临床和亚临床酮病组的血浆样本中葡萄糖含量与对照组相比均下降。有研究指出反刍动物酮病的发生与其机体对葡萄糖的需求有关^[22]。在高产奶牛泌乳早期,由于大量泌乳造成能量消耗和/或饲料摄入有限,常造成机体葡萄糖供应不足,发生能量负平衡(NEB)^[23],而促发酮病。

3.2 脂肪酸代谢异常

本试验中,酮体含量在对照组、亚临床酮病组和临床酮病组呈现渐进性上调。当奶牛发生酮病时,脂肪酸被动员生成乳脂或为机体供能^[24-25],也释放出大量游离脂肪酸(nonesterified fatty acids, NEFAs)进入血液和肝脏^[24-25]。而酮体是脂肪酸在肝脏进行分解代谢的中间产物^[26],若肝中合成酮体的量超过肝外组织利用酮体的能力,将导致酮血症和酮尿症。

与对照组相比,本试验中亚临床酮病组奶牛血液胆碱表达上调。胆碱可促进肝脏中脂肪酸以卵磷脂的形式被运输和氧化利用,以往的研究也表明脂类物质含量的升高伴随胆碱含量的降低^[27]。说明亚临床酮病奶牛机体内能量负平衡状态较弱,脂肪动员较少,未来可以通过进一步测定奶牛血浆中胆碱含量的阈值,而将其作为奶牛亚临床酮病诊断的新指标。

肌醇含量仅在临床酮病组中降低。肌醇在脂类代谢中不仅与胆碱结合形成卵磷脂,也能促进肝及其他组织中脂肪的代谢^[28]。临床酮病奶牛体脂大量分解,可能造成肌醇含量下降。未来可以考虑将血浆中总肌醇含量的测定作为奶牛临床酮病的敏感诊断指标。

3.3 脂蛋白代谢异常

本试验中,与亚临床酮病组和对照组相比,极低密度脂蛋白(very low-density lipoprotein, VLDL)和低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)含量仅在临床酮病组下降。NEFAs 在肝脏中被转化为 VLDL,或从肝中排出可转运至乳腺组织供泌乳需要,或进入血液转化为 LDL^[25]。以往研究曾指出在奶牛患有酮病时,体内脂肪动员增多,造成 LDL 和 VLDL 含量下降^[25-26],本试验结果说明脂蛋白的异常代谢一般发生在临床酮病奶牛,未来可以考虑将其作为诊断临床酮病的新指标。

3.4 氨基酸代谢异常

本试验中,生酮氨基酸(赖氨酸)、生糖氨基酸(组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺以及苯丙氨酸)在奶牛发生酮病时呈现渐进性下调,说明生糖氨基酸作为糖异生的基质被大量消耗^[32-33],而生酮氨基酸的减少也说明在奶牛发生酮病时生酮作用的增强,可加剧酮体产生;与对照组相比,生糖氨基酸(丙氨酸、脯氨酸、甘氨酸、缬氨酸和酪氨酸)仅在临床酮病组中有所降低,说明奶牛在体内葡萄糖极度缺乏的情况下,机体才将其作为生糖物质,可以考虑将其作为判断临床和亚临床酮病的新的差异性标示物;亮氨酸和异亮氨酸在亚临床酮病组中均比临床酮病组和对照组高,这表明在亚临床酮病组中,奶牛为了满足糖异生,大量氨基酸适应体内对葡萄糖的需求,同样会促进酮病发生。

3.5 其他物质代谢异常

本试验中也检测到一些其他物质代谢异常,如:柠檬酸、乙酸、乳酸、甲酸等。

与其他二组相比,柠檬酸含量仅在临床酮病组呈下调表达。说明临床酮病组奶牛生糖作用的减弱,造成作为三羧酸循环中间产物的柠檬酸含量下降。对柠檬酸的差异表达做进一步研究,为防治酮病提供新的思路。

试验中临床酮病组和亚临床酮病组中的乙酸含量均比对照组高。乙酸是 NEFAs 的分解产物,其主要新陈代谢作用是活化成为乙酰辅酶 A,进一步转化为酮体^[32]。说明在奶牛患酮病时,体内脂肪动员增强的同时,其分解产物也增多,从而间接加剧了酮病的发生。

检测结果显示乳酸含量在酮病 2 组中呈现渐进性下调。证明奶牛发生酮病时,糖异生作用逐渐增强,而乳酸作为糖异生基质被过度消耗^[33]。未来可

- [10] VERWAEST K A, VU T N, LAUKENS K, et al. ^1H NMR based metabolomics of CSF and blood serum: a metabolic profile for a transgenic rat model of Huntington disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(11): 1371-1379.
- [11] OUYANG X, DAI Y, WEN J L, et al. ^1H NMR-based metabolomic study of metabolic profiling for systemic lupus erythematosus[J]. *Lupus*, 2011, 20(13): 1411-1420.
- [12] MANTLE P G, NICHOLLS A W, SHOCKCOR J P. ^1H NMR spectroscopy-based metabolomic assessment of uremic toxicity, with toxicological outcomes, in male rats following an acute, mid-life insult from ochratoxin A[J]. *Toxins*, 2011, 3(6): 504-519.
- [13] KLEIN M S, BUTTCHEREIT N, MIEMCZYK S P, et al. NMR metabolomic analysis of dairy cows reveals milk glycerophosphocholine to phosphocholine ratio as prognostic biomarker for risk of ketosis[J]. *J Proteome Res*, 2011, 11(2): 1373-1381.
- [14] AL-RAWASHDEH O F. Prevalence of ketonemia and associations with herd size, lactation stage, parity, and postparturient diseases in Jordanian dairy cattle[J]. *Prev Vet Med*, 1999, 40(2): 117-125.
- [15] OETZEL G R. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease[J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2004, 20: 651-674.
- [16] NICHOLSON J K, FOXALL P J D, SPRAUL M, et al. 750 MHz ^1H and ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy of human blood plasma[J]. *Anal Chem*, 1995, 67(5): 793-811.
- [17] VIANT M R. Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 310(3): 943-948.
- [18] WOLD S, ESBENSEN K, GELADI P. Principal component analysis [J]. *Chemometr Intell Lab*, 1987, 2(1): 37-52.
- [19] TRYGG J, HOLMES E, LUNDSTEDT T. Chemometrics in metabolomics[J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(2): 469-479.
- [20] YIN P, MOHEMAITI P, CHEN J, et al. Serum metabolic profiling of abnormal savda by liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 871(2): 322-327.
- [21] GONZÁLEZ F D, MUIÑO R, PEREIRA V, et al. Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows[J]. *J Vet Sci*, 2011, 12(3): 251-255.
- [22] MARTENIUK J V, HERDT T H. Pregnancy toxemia and ketosis of ewes and does[J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 1988, 4(2): 307-315.
- [23] NIELEN M, AARTS M G, JONKERS A G, et al. Evaluation of two cowside tests for the detection of subclinical ketosis in dairy cows[J]. *Can Vet J*, 1994, 35(4): 229.
- [24] GRUMMER R R. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle [J]. *Vet J*, 2008, 176(1): 10-20.
- [25] XU C, WANG Z, LIU G, et al. Metabolic characteristic of the liver of dairy cows during ketosis based on comparative proteomics[J]. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2008, 21: 1003-1008.
- [26] DRACKLEY J K, RICHARD M J, BEITZ D C, et al. Metabolic changes in dairy cows with ketonemia in response to feed restriction and dietary 1, 3-butenediol[J]. *J Dairy Sci*, 1992, 75(6): 1622-1634.
- [27] GAO H, DONG B, LIU X, et al. Metabonomic profiling of renal cell carcinoma: high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of human serum with multivariate data analysis[J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 624(2): 269-277.
- [28] RAPIEJKO P J, NORTHUP J K, EVANS T, et al. G-proteins of fat-cells. Role in hormonal regulation of intracellular inositol 1, 4, 5-trisphosphate[J]. *Biochem J*, 1986, 240(1): 35-40.
- [29] GERICH J E, MEYER C, WOERLE H J, et al. Renal Gluconeogenesis Its importance in human glucose homeostasis[J]. *Diabetes Care*, 2001, 24(2): 382-391.
- [30] GARRETT R H, GRISHAM C M. Principles of biochemistry: with a human focus[M]. Harcourt College Publishers, 2002.
- [31] YUDKOFF M, DAIKHIN Y, NISSIM I, et al. Response of brain amino acid metabolism to ketosis[J]. *Neurochem Int*, 2005, 47(1): 119-128.
- [32] TAMMINGA S, LUTEIJN P A, MEIJER R G M. Changes in composition and energy content of live-weight loss in dairy cows with time after parturition [J]. *Livest Prod Sci*, 1997, 52(1): 31-38.
- [33] VAN SOEST P J. Nutritional ecology of the ruminant[M]. Cornell University Press, 1994.
- [34] LITSANOV B, BROCKER M, BOTT M. Toward

- homosuccinate fermentation: metabolic engineering of corynebacterium glutamicum for anaerobic production of succinate from glucose and formate[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(9): 3325-3337.
- [35] LIN Z, XU P, YAN S, et al. A metabonomic approach to early prognostic evaluation of experimental sepsis by ¹H NMR and pattern recognition[J]. *NMR Biomed*, 2009, 22(6): 601-608.
- [36] DUFFIELD T F, SANDALS D, LESLIE K E, et al. Efficacy of monensin for the prevention of subclinical ketosis in lactating dairy cows[J]. *J Dairy Sci*, 1998, 81(11): 2866-2873.
- [37] YOUNG E G, WENTWORTH H P, HAWKINS W W. The absorption and excretion of allantoin in mammals[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1944, 81(1): 1-9.
- [38] KANDÁR R, ŽÁKOVÁ P. Allantoin as a marker of oxidative stress in human erythrocytes[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2008, 46(9): 1270-1274.
- [39] ŽITŇANOVÁ I, KORYTÁR P, ARUOMA O I, et al. Uric acid and allantoin levels in Down syndrome: antioxidant and oxidative stress mechanisms? [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2004, 341(1): 139-146.
- [40] JAIN S K, MCVIE R, BOCCHINI J A. Hyperketonemia (ketosis), oxidative stress and type 1 diabetes[J]. *Pathophysiology*, 2006, 13(3): 163-170.
- [41] IRELAND Z, RUSSELL A P, WALLIMANN T, et al. Developmental changes in the expression of creatine synthesizing enzymes and creatine transporter in a precocial rodent, the spiny mouse[J]. *BMC Dev Biol*, 2009, 9(1): 39.

(编辑 白永平)