研究论文

基于代谢组方法筛选蜜蜂副伤寒相关差异代谢物的研究*

龙登隆** 牛庆生 杜亚丽 刘玉玲 王 志 常志光*** 徐 凯***

（吉林省养蜂科学研究所，吉林 132108）

摘 要 【**目的**】蜜蜂副伤寒是西方蜜蜂 *Apis mellifera* 越冬期的主要易感疾病。本研究旨在探究蜜蜂副伤寒疾病相关的代谢物和代谢通路。【**方法**】以越冬末期的西方蜜蜂为研究对象，利用基于高效液相质谱联用的非靶向代谢组学方法检测副伤寒患病群和正常越冬群工蜂肠道中代谢物的变化。【**结果**】蜜蜂副伤寒患病个体和正常蜜蜂个体在正、负离子模式下分别获得 626 个和 518 个差异代谢物，在正、负离子模式下最显著差异的 10 种代谢物中筛选到镰刀菌氧萘满酮、奎尼丁、褪黑素、去氧紫草素等与蜜蜂物质代谢障碍、细胞凋亡和抗氧化应激相关的差异代谢物。此外，差异代谢物显著富集于与氨基酸代谢密切相关的氨酰-tRNA 合成、蛋白质消化吸收、谷胱甘肽代谢、矿物质代谢、多种氨基酸代谢等 7 个代谢通路。【**结论**】蜜蜂患副伤寒后肠道中代谢物水平发生显著变化，其中氨基酸和蛋白质的代谢异常可能是蜜蜂副伤寒发病的主要原因。

关键词 蜜蜂；越冬期；副伤寒；代谢组学；差异代谢物

Using metabolomic methods to screen metabolites associated with paratyphoid disease in honeybees

LONG Deng-Long** NIU Qing-Sheng DU Ya-Li LIU Yu-Ling
WANG Zhi CHANG Zhi-Guang*** XU Kai***

(Apiculturte Science Institute of Jilin Province, Jilin 132108, China)

Abstract **[Objectives]** To investigate metabolites and metabolic pathways related to paratyphoid disease in the Western honeybee. **[Methods]** Changes in metabolites in the guts of bees from diseased and healthy colonies at the end of the overwintering stage were detected using a non-targeted metabolomics method based on liquid chromatography mass spectrometry. **[Results]** 626 and 518 different metabolites in the positive and negative ion mode, respectively, were detected in diseased and healthy colonies. Many metabolites related to substance metabolism disorder, apoptosis and antioxidant stress, such as fusarochromanone, quinidine, melatonin and deoxyshikonin, were identified in the ten most significant differences among the positive and negative ion modes. In addition, differential metabolites were significantly enriched in 7 pathways related to amino acid metabolism, including aminoacyl tRNA synthesis, protein digestion and absorption, glutathione metabolism, mineral metabolism and amino acid metabolism. **[Conclusion]** Metabolite levels in the guts of honeybees are significantly altered by paratyphoid disease and metabolic abnormalities in amino acids and proteins could be the main cause of paratyphoid disease symptoms.

Key words honeybee; overwinter stages; paratyphoid disease; metabolomics methods; differential metabolites

*资助项目 Supported projects：国家蜂产业技术体系专项（CARS-44-SYZ 4）；吉林省科研院所引进高层次科技创新人才资助项目；吉林市科技创新发展计划项目（20190104214）；吉林省科技发展计划项目（20200703002ZP）

**第一作者 First author，E-mail：18503483531@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors，E-mail：xukaiyuzhong@126.com；jlbee2005@aliyun.com

收稿日期 Received：2020-06-17；接受日期 Accepted：2020-08-18

蜜蜂养殖是绿色生态农业的一个重要组成部分，其不仅为人类提供营养价值丰富的蜂产品，而且在植物多样性保护及生态系统平衡维护方面发挥着极为重要的作用（肖云丽等，2019；曾志将，2020）。我国西方蜜蜂 *Apis mellifera* 饲养总量超过 600 万群，占我国养蜂总规模的 65%以上，是我国养蜂产业的主要应用蜂种，在我国蜂产品生产和提高农民经济效益等方面发挥着重要作用（Liu *et al.*，2016；刘俊峰等，2020）。与我国本地蜂种中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 相比较，西方蜜蜂具有易维持强群、采集力强、性情温顺、分蜂性差等生产优势，但在抗寒性和抗病力等方面存在明显劣势。尤其在抗寒性方面，西方蜜蜂越冬难、死亡率高以及春季无法复壮等现象已成为制约我国北方地区养蜂业发展的主要因素（Liu *et al.*，2016；秦明等，2017）。造成蜜蜂越冬死亡的原因主要包括越冬饲料不充足、防寒保温条件不完善、鼠害等外在因素和蜂螨寄生、越冬饲料农药残留以及副伤寒疾病发生等内在因素（李永胜和金月华，2011；Desai and Currie，2016；Baines *et al.*，2017；Beyer *et al.*，2018）。在诸多蜜蜂越冬死亡原因中，大部分可以通过提高饲养管理水平来改善，唯有蜜蜂副伤寒的发生，由于其发生机制和相关防治机制不明确，导致至今无法有效解决。

蜜蜂副伤寒疾病是我国北方地区蜜蜂越冬后期常见疾病。发病初期蜂群骚动不安、散团，打开蜂箱后可发现蜜蜂腹部膨大，发病后期蜂群骚动声音提高，开箱后在巢脾上及蜂箱各处看到蜜蜂稀粪，并在箱底存有大量死蜂（关振英，2001；王希彦，2012）。越冬副伤寒发病后轻者经室外排泄后可逐渐恢复，但仍会缩短越冬蜂寿命，引发蜂群春衰，重则全群死亡（关振英，2001）。蜜蜂副伤寒是由蜜蜂哈夫尼肠杆菌 *Enterobacter hafniaealvei* 所引起的，被病蜂粪便所污染的饲料和巢脾是副伤寒的主要传染源（何旭，2017）。迄今为止，蜜蜂副伤寒疾病防治的相关研究较少，仅有的少数文献推荐通过加强饲养管理和饲喂磺胺类抗菌药或抗生素来进行治疗，但具体的防治效果还暂无报道（王希彦，2012；何旭，2017）。鉴于蜜蜂副伤寒危害大且无有效防治方法的现状，本研究基于高效液相质谱联用（Liquid chromatography-mass spectrometry，LC-MS）的代谢组技术对患副伤寒蜜蜂进行肠道的非靶向代谢组学研究，从营养物质代谢角度探究副伤寒发病后的蜜蜂肠道小分子代谢物的差异，为揭示蜜蜂副伤寒的发病机制以及为西方蜜蜂越冬期饲养管理提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 样本采集

试验蜂群选自吉林省养蜂科学研究所示范蜂场所饲养的卡尼鄂拉蜂的杂交蜂群。于 2018 年 10 月 1 日开始，用越冬饲料（糖：水=5：3）饲喂试验蜂场所有蜂群，持续饲喂 7-10 d，直至越冬饲料 2/3 封盖。蜂群于 11 月 15 日进入地上越冬室进行越冬，越冬室内保持安静且黑暗状态，温度为（0±2）℃。于 2019 年 3 月 5 日进入越冬室进行蜂群检查，挑选群势相近的正常蜂群与副伤寒患病蜂群各 6 群，每群采集 50 只蜜蜂，在采集蜜蜂样本时，正常蜜蜂个体选取体色鲜明，体型正常，动作敏捷的越冬工蜂，而患病蜜蜂个体则选择体色偏暗，腹部膨大，行动迟缓的越冬工蜂，将采集到的样本进行快速解剖并将取出的蜜蜂肠道投入液氮，随后于 - 80 ℃冰箱中保存。

1.2 试剂与仪器

甲醇、水、甲酸及醋酸铵（均为色谱级，Thermo 公司）；QE-HF-X 型质谱仪、Vanquish UHPLC 型色谱仪、Hyperil Gold column 型色谱柱、ST16R 型低温离心机（均为美国 Thermo 公司）。

1.3 代谢物提取

取 100 mg 液氮研磨的组织样本，加入 500 μL 含 0.1%甲酸的 80%甲醇水溶液，涡旋震荡后冰浴静置 5 min，15 000 r/min、4 ℃离心 10 min，取一定量的上清加质谱级水稀释至甲醇含量为 60%，并置于带有 0.22 μm 滤膜的离心管中 15 000 g、4 ℃离心 10 min，收集滤液，进样

LC-MS 进行分析。

1.4　色谱条件

色谱柱：Hyperil Gold column（C18），柱温：40 ℃，流速：0.2 mL/min；正模式：流动相 A：0.1%甲酸，流动相 B：甲醇。负模式：流动相 A：5 mmol·L^{-1} 醋酸铵，pH=9.0，流动相 B：甲醇。

表 1　色谱梯度洗脱程序

Table 1　Chromatographic gradient elution program

时间（min）Time	流动相 A Mobile phase A (%)	流动相 B Mobile phase B (%)
0.0	98	2
1.5	98	2
12.0	0	100
14.0	0	100
14.1	98	2
16.0	98	2

1.5　质谱条件

扫描范围选择 m/z 100-1 500；ESI 源的设置如下：喷雾电压：3.2 kV；鞘气体流速：35 arb；辅助气体流速：10 arb；毛细管温度：320 ℃。MS/MS 二级扫描为数据依赖性扫描。

1.6　数据分析

利用 CD（Compound discoverer）搜库软件进行主成分分析（Principal component analysis, PCA）、偏最小二乘判别分析（Partial least squares discrimination analysis, PLS-DA）。模型的质量由 R^2X 或 R^2Y 和 Q^2 值来描述。用变量投影重要度（Variable importance in the projection, VIP）结合 *t*-检验筛选差异代谢物。最后通过代谢通路等功能分析解释代谢物相关的生物学意义。

2　结果与分析

2.1　副伤寒发病群与正常群越冬损耗率比较

本研究对示范蜂场进行副伤寒发病率进行统计，结果表明该蜂场共有蜂群 189 群，副伤寒发病（巢脾或蜂箱内部出现大量稀粪）的蜂群有 15 箱，发病率为 7.94%，其中蜂群死亡和频临死亡的有 6 群，死亡率为 3.17%。对本研究中所挑选的 6 群副伤寒发病群与正常群的越冬损耗率分析后发现，正常蜂群的越冬损耗率为 7.14%-21.43%，平均越冬损耗率为 15.48%。而副伤寒发病群的越冬损耗率为 42.86%-71.43%，平均越冬损耗率为 53.57%，显著高于正常蜂群的越冬损耗率（$P < 0.05$）。

2.2　分析方法验证

代谢组分析具有易受外界因素干扰且变化迅速的特点，因此需要利用数据质量控制（Quality control，QC）测定加样前仪器状态、平衡色谱-质谱系统以及评价整个实验过程中系统的稳定。本研究中正负离子 2 个模式下 QC 样本的相关性 R^2 均大于 0.984（图 1：A， B），表明本研究使用检测方法稳定，结论可靠。为判定模型构建的准确性，利用偏最小二乘法判别 PLS-DA 分析经 7 次循环交互验证得到的模型评价参数 R^2 和 Q^2（图 1：C，D）。由图 1 可知，正离子模式下 R^2=0.77，Q^2=0.76，负离子模式下 R^2=0.77，Q^2=0.72，表明本研究所建模型未“过拟合”，模型构建稳定，数据可靠。

2.3　主成分分析

主成分分析的得分散点图能直观地显示不同样品之间的整体差异（图 2）。由图 2 可知，蜜蜂副伤寒患病组和正常组在正离子模式（图 2：A）及负离子模式下（图 2：B）均能各聚一类，具有明显差异，表明蜜蜂发生副伤寒后肠道内物质代谢与正常蜜蜂间存在明显的差异。

2.4　差异代谢物分析

采用 PLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度 VIP 值表示不同组别中代谢物差异的贡献率。结合差异倍数（Fold change，FC）和 *t*-test 的 *P* 值筛选蜜蜂副伤寒相关的差异性代谢产物。本研究在阈值（VIP > 1.0，差异倍数 FC > 2.0 或 FC < 0.5 且 *P* value< 0.05）条件下，在正离子模式下筛选出 626 个差异代谢物，其中 363 种上调，263 种下调（图 3：A）；负离子模式下筛选出 518

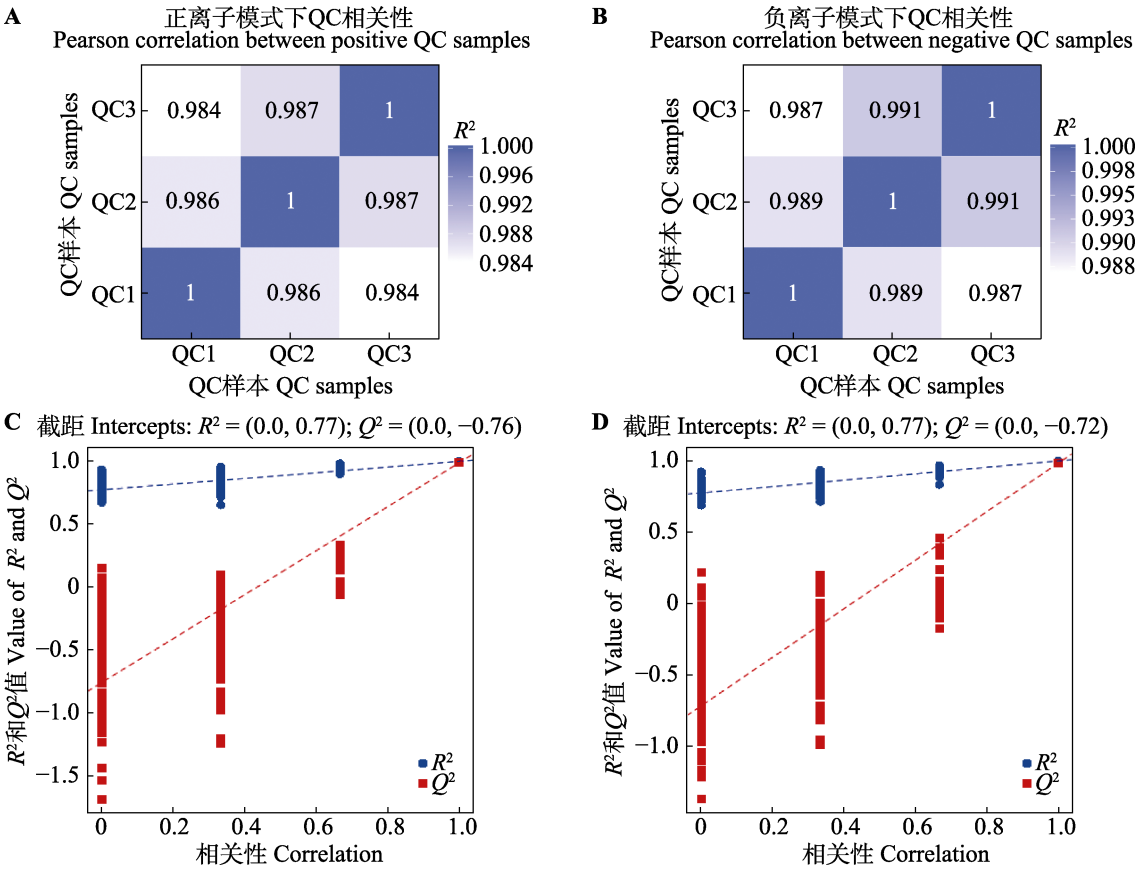

图 1　QC 样本相关性及模型准确性评估

Fig. 1　Results of QC sample correlation analysis and evaluation of metabolic mode

A. 正离子模式下 QC 样本相关性；B. 负离子模式下 QC 样本相关性；
C. 正离子模式下模型评估；D. 负离子模式下模型评估。

A. Results of QC sample correlation analysis of positive ion mode; B. Results of QC sample correlation analysis of negative ion mode; C. Evaluation parameters of positive metabolic mode; D. Evaluation parameters of negative metabolic mode.

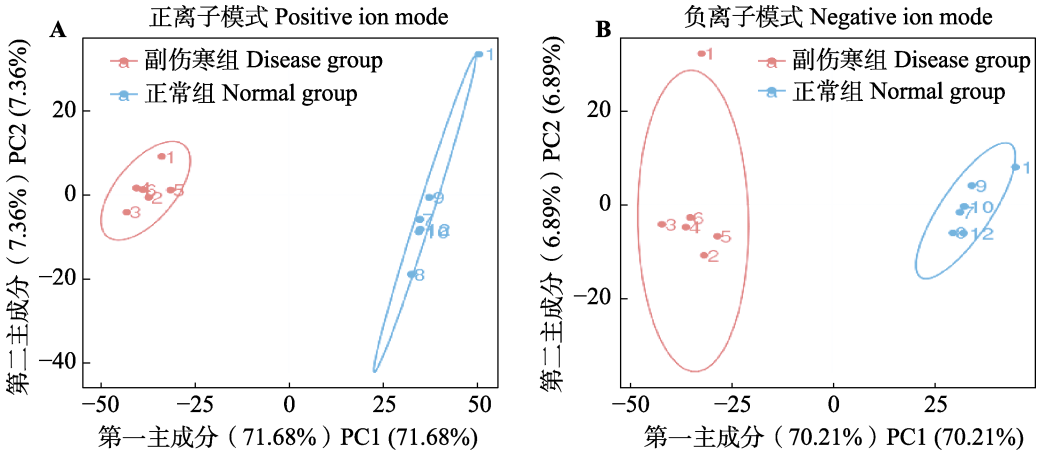

图 2　正、负离子模式下主成分分析示意图

Fig. 2　Principal component analysis scoer scatter of different groups of positive and negative ion mode

A. 正离子模式下主成分分析示意图；B. 负离子模式下主成分分析示意图。

A. Principal component analysis scoer scatter of different groups of positive ion mode;
B. Principal component analysis scoer scatter of different groups of negative ion mode.

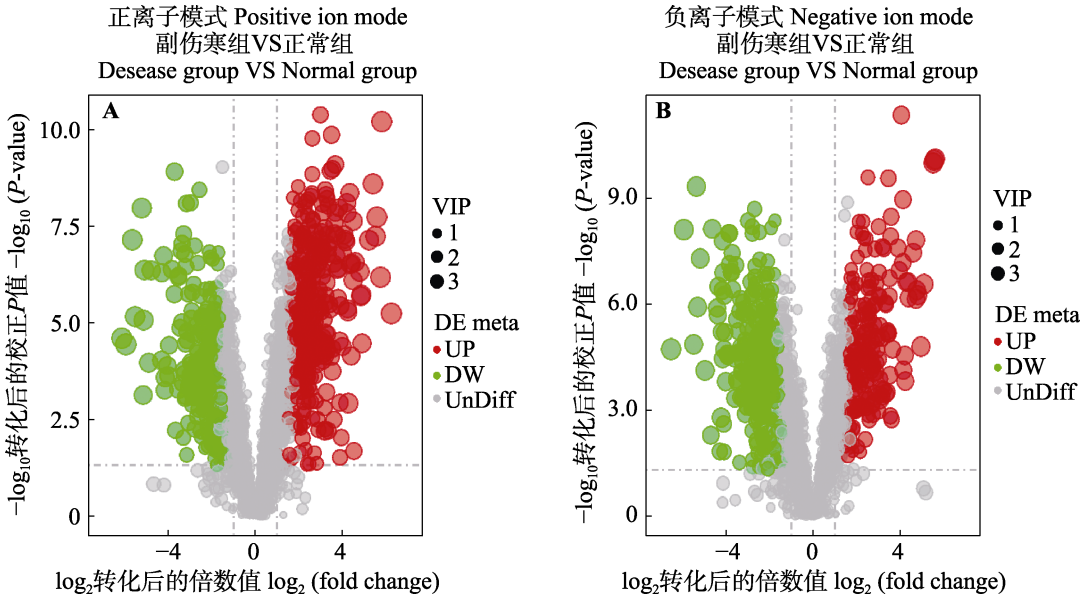

图 3　正、负离子模式下差异代谢物火山图

Fig. 3　Volcano plot of differential metabolites of positive and negative ion mode

A. 正离子模式下差异代谢物火山图；B. 负离子模式下差异代谢物火山图。VIP 为变量投影重要度，圆圈大小代表 VIP 值；DE meta：差异代谢物，UP：显著上调代谢物（红色），DW：显著下调代谢物（绿色），UnDiff：无显著差异的代谢物（灰色）。

A. Volcanic map of differential metabolites of positive ion mode; B. Volcanic map of differential metabolites of negative ion mode. VIP represents variable importance in the projection; the circle size represents the VIP value. DE meta: Differential metabolies, UP: Up-regulated metabolies, DW: Down- regulated metabolies, UnDiff: Undifferentiated metabolites. Red, green and gray represents up-regulated, down-regulated and indifference respectively.

个差异代谢物，其中 204 种上调，314 种下调（图 3：B）。本研究对正、负离子模式下差异最显著的 10 个代谢物进行注释分析后，发现 20 个最显著的代谢物均为蜜蜂副伤寒患病蜂群显著上调的代谢物，其中包括镰刀菌氧萘满酮、奎尼丁、褪黑素、去氧紫草素等与蜜蜂抗氧化应激、毒素沉积和细胞凋亡密切相关的代谢物，具体见表 2。

2.5　代谢通路分析

为探究蜜蜂副伤寒疾病相关差异代谢物参与的主要生化代谢途径和信号转导途径，本研究分别对正、负离子模式下的差异代谢物进行了 KEGG 功能富集。由 KEGG 功能富集结果可知，蜜蜂副伤寒疾病相关的差异代谢物与蜜蜂营养物质（糖类、氨基酸、脂肪酸）的合成代谢以及 HIF1 信号通路、鞘磷脂信号通路、甾类激素合成、机体震颤性麻痹等生化代谢途径和信号转导途径密切相关。但经过显著性富集分析后发现，正离子模式下存在氨酰-tRNA 合成、谷胱甘肽代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、β-丙氨酸代谢以及矿物质吸收 5 个显著富集的 KEGG 通路。负离子模式下包括氨酰-tRNA 合成、蛋白质消化吸收、矿物质吸收、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢以及半胱氨酸与蛋氨酸代谢 5 个显著富集的 KEGG 通路。各显著富集的 KEGG 通路注释到的差异代谢物多为显著下调的蛋氨酸、L-苏氨酸、L-组氨酸、L-天冬氨酸、甘氨酸、L-丝氨酸、L-脯氨酸、L-苯丙氨酸等氨基酸，具体见表 3。

3　结论与讨论

代谢组学是继基因组学、转录组学、蛋白质组学后出现的新兴组学技术，其通过分析细胞（组织）受遗传和环境效应后小分子代谢物的变化趋势，探究不同生理状态下的差异代谢产物，揭示非正常状态下（疾病、环境胁迫等）机体代

表 2　正、负离子模式下差异最显著的 10 种差异代谢物

Table 2　The top 10 most signifcant differential metabolites of different ion modes

编号 Number	离子模式 Ion mode	代谢物名称 Metabolite name	分子式 Formula	保留时间 RT (min)	差异倍数 FC	*P* 值 *P* value	变量投影重要度 VIP	上调/下调 Up/Down
1	Com_3451_pos	2-十八烷基-1H-吲哚-3-醇 2-Octadecyl-1H-indol-3-ol	$C_{26}H_{43}NO$	15.637	76.607 93	5.80×10^{-6}	3.574 071	up
2	Com_1824_pos	镰刀菌氧萘满酮 Fusarochromanone	$C_{15}H_{20}N_2O_4$	9.629	56.376 06	6.23×10^{-11}	3.481 972	up
3	Com_536_pos	奎尼丁 Quinidine	$C_{20}H_{24}N_2O_2$	8.430	54.350 69	6.64×10^{-7}	3.391 281	up
4	Com_3431_pos	3-（1H－吲哚-3-基）-N-甲基丙酰胺 3-(1H-Indol-3-yl)-N-methylpropanamide	$C_{12}H_{14}N_2O$	6.293	48.381 26	1.85×10^{-8}	3.389 731	up
5	Com_1084_pos	N,N,N′N′-四甲基-4,4′-二氨基二苯甲烷 N,N,N′,N′-Tetramethyl-4,4′-methylenedianiline	$C_{17}H_{22}N_2$	8.577	46.356 84	5.83×10^{-8}	3.272 061	up
6	Com_948_pos	黑化菌素 Nigrifactin	$C_{12}H_{17}N$	7.067	42.659 69	2.54×10^{-9}	3.263 335	up
7	Com_3262_pos	3β-（1-吡咯烷基）-5 烷基孕烷-11,20-二酮 3beta-(1-Pyrrolidinyl)-5alpha-pregnane-11,20-dione	$C_{25}H_{39}NO_2$	13.985	37.623 32	7.26×10^{-8}	3.098 193	up
8	Com_1136_pos	米替福星 Miltefosine	$C_{21}H_{46}NO_4P$	15.640	30.072 48	3.44×10^{-5}	2.756 739	up
9	Com_3139_pos	4,5-二羟基-3,4,5-三甲基-4,5,8,10,12,13,13a，13b-八氢-2H-[1,6]二氧酰基氯丁炔[2,3,4-gh]吡咯烷-2,6（3H）-二酮 4,5-Dihydroxy-3,4,5-trimethyl-4,5,8,10,12,13,13a,13b-octahydro-2H-[1,6]dioxacycloundecino[2,3,4-gh]pyrrolizine-2,6(3H)-dione	$C_{16}H_{23}NO_6$	9.365	29.586 22	1.91×10^{-6}	3.011 213	up
10	Com_2974_pos	5om 麦角甾-7,22-二烯-3,，5-二醇 5alpha-ergosta-7,22-diene-3beta,5-diol 5al	$C_{28}H_{46}O_2$	14.872	28.914 75	2.07×10^{-6}	2.839 695	up
11	Com_1278_neg	镰刀菌氧萘满酮 Fusarochromanone	$C_{15}H_{20}N_2O_4$	8.781	49.160 84	7.82×10^{-11}	3.429 717	up
12	Com_2127_neg	4-甲氧基苯胺 4-Methoxyaniline	C_7H_9NO	8.783	47.518 28	8.58×10^{-11}	3.399 259	up
13	Com_891_neg	褪黑素 Melatonin	$C_{13}H_{16}N_2O_2$	8.779	46.103 96	1.01×10^{-10}	3.370 434	up
14	Com_3524_neg	（2S）-1-羟基-3-（十五烷氧基）-2-丙二醇（9Z，12Z）-9,12-十八二烯酸酯 (2S)-1-Hydroxy-3-(pentadecanoyloxy)-2-propanyl (9Z,12Z)-9,12-octadecadienoate	$C_{36}H_{66}O_5$	15.692	34.341 78	2.73×10^{-7}	3.195 919	up
15	Com_3525_neg	（2S）-1-羟基-3-（十五烷氧基）-2-丙二醇（9Z）-9-十六碳酸酯 (2S)-1-Hydroxy-3-(pentadecanoyloxy)-2-propanyl (9Z)-9-hexadecenoate	$C_{34}H_{64}O_5$	15.597	31.117 17	1.60×10^{-5}	3.231 980	up
16	Com_709_neg	N-[1-羧基-3-（甲基亚磺酰基）丙基]谷氨酰胺 N-[1-Carboxy-3-(methylsulfinyl)propyl]glutamine	$C_{10}H_{18}N_2O_6S$	5.473	28.349 25	5.65×10^{-7}	2.938 708	up

续表 2（Table 2 continued）

编号 Number	离子模式 Ion mode	代谢物名称 Metabolite name	分子式 Formula	保留时间 RT (min)	差异倍数 FC	*P* 值 *P* value	变量投影重要度 VIP	上调/下调 Up/Down
17	Com_2199_neg	4,5-二羟基-3,4,5-三甲基-4,5,8,10,12,13,13a，13b-八氢-2H-[1,6]二氧酰基氯丁炔[2,3,4-gh]吡咯烷-2,6（3H）-二酮 4,5-Dihydroxy-3,4,5-trimethyl-4,5,8,10,12,13,13a,13b-octahydro-2H-[1,6]dioxacycloundecino[2,3,4-gh]pyrrolizine-2,6(3H)-dione	$C_{16}H_{23}NO_6$	9.431	27.212 93	4.12×10^{-7}	2.968 453	up
18	Com_10_neg	N-苄氧羰基-L-亮氨酸 Z-Leu-OH	$C_{14}H_{19}NO_4$	9.441	26.620 79	7.16×10^{-7}	2.956 043	up
19	Com_1734_neg	比沙可啶 Bisacodyl	$C_{22}H_{19}NO_4$	9.449	26.575 11	1.55×10^{-8}	2.896 633	up
20	Com_1552_neg	去氧紫草素 Deoxyshikonin	$C_{16}H_{16}O_4$	5.462	20.935 50	6.70×10^{-7}	2.686 486	up

pos 表示正离子模式，neg 表示负离子模式。up 代表副伤寒患病蜜蜂体内显著上调，down 代表显著下调。RT：保留时间；FC：差异倍数；VIP：变量投影重要度。
pos and neg represent positive metabolic mode and negative metabolic mode, respectively. up and down represents up-regulated and down-regulated in paratyphoid disease colonies, respectively. RT: Retention time of metabolites; FC: Fold change of differential metabolites in different colonies; VIP: Variable importance in the projection.

表 3　不同离子状态下的差异代谢物通路分析

Table 3　Pathway analysis of the differential metabolites in different ion modes

离子模式 Ion mode	代谢通路 Metabolic pathway	代谢通路 *P* 值 *P*-value	差异表达代谢物 Differentially expressed metabolites	代谢物 *P* 值 *P*-value	趋势 Trend
正离子模式 Positive ion mode	氨酰-tRNA 合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	0.008	蛋氨酸 Methionine	0.012 10	down
			L-苏氨酸 L-Threonine	0.005 60	down
			L-组氨酸 L-Histidine	0.001 30	down
			L-天冬氨酸 L-Aspartic acid	0.010 30	down
			甘氨酸 Glycine	0.000 20	down
	谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	0.018	L-焦谷氨酸 L-Pyroglutamic acid	0.000 01	down
			甘氨酸 Glycine	0.000 20	down
			还原型谷胱甘肽 Glutathionylspermidine	0.000 50	down
			双谷胱甘肽精胺 Bis(glutathionyl)spermine	0.000 50	down
			抗坏血酸 Ascorbic acid	0.000 03	up
	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	0.027	L-苏氨酸 L-Threonine	0.005 60	down
			L-天冬氨酸 L-Aspartic acid	0.010 30	down
			甘氨酸 Glycine	0.000 20	down
			肌酸 Creatine	0.001 10	up
	β-丙氨酸代谢 Beta-Alanine metabolism	0.040	L-组氨酸 L-Histidine	0.001 30	down
			L-天冬氨酸 L-Aspartic acid	0.010 30	down
			丙炔酸 Propiolic acid	0.000 01	up

续表 3（Table 3 continued）

离子模式 Ion mode	代谢通路 Metabolic pathway	代谢通路 *P* 值 *P*-value	差异表达代谢物 Differentially expressed metabolites	代谢物 *P* 值 *P*-value	趋势 Trend
负离子模式 Negative ion mode	矿物质吸收 Mineral absorption	0.040	L-苏氨酸 L-Threonine	0.005 60	down
			磷酸 Phosphoric acid	0.000 20	down
	氨酰-tRNA 合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	0.002	L-天冬氨酸 L-Aspartic acid	0.001 00	down
			甘氨酸 Glycine	0.000 10	down
			酪氨酸 L-Tyrosine	0.013 00	down
			L-丝氨酸 L-Serine	0.000 80	down
			L-脯氨酸 L-Proline	0.000 40	down
			L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine	0.004 30	down
			L-组氨酸 L-Histidine	0.005 30	down
	蛋白质消化吸收 Protein digestion and absorption	0.005	4-甲基苯酚 4-Methylphenol	0.006 80	up
			苯酚 Phenol	0.000 04	up
			L-丝氨酸 L-Serine	0.000 80	down
			L-脯氨酸 L-Proline	0.000 40	down
			L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine	0.004 30	down
			L-组氨酸 L-Histidine	0.005 30	down
	矿物质吸收 Mineral absorption	0.033	磷酸 Phosphoric acid	0.000 20	down
			L-脯氨酸 L-Proline	0.000 40	down
			L-苯丙氨酸 L-Phenylalanine	0.004 30	down
	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	0.039	L-天冬氨酸 L-Aspartic acid	0.001 00	down
			乙醛酸 Glyoxylic acid	0.000 04	down
			甘氨酸 Glycine	0.000 10	down
			2-氧代丁酸 2-Oxobutyric acid	0.000 01	down
			L-丝氨酸 L-Serine	0.000 80	down
	半胱氨酸与蛋氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	0.039	L-天冬氨酸 L-Aspartic acid	0.001 00	down
			5'-S-甲基-5'-硫代肌苷 5'-S-Methyl-5'-thioinosine	0.000 10	up
			3-巯基丙酮酸 3-Mercaptopyruvic acid	0.001 50	down
			2-氧代丁酸 2-Oxobutyric acid	0.000 01	down
			L-丝氨酸 L-Serine	0.000 80	down

up 代表副伤寒患病蜜蜂体内显著上调，down 代表显著下调。

up and down represent up-regulated and down-regulated in paratyphoid disease colonies, respectively.

谢的生理或病理机制（Hollywood *et al.*，2006；Johnson and Gonzalez，2012）。本研究利用基于高效液相质谱联用的代谢组技术对副伤寒蜂群和正常蜂群工蜂肠道代谢物水平进行分析，于正离子模式和负离子模式模式下分别获得 626 个和 518 个差异代谢物质，对差异代谢物质进行功能富集后获得与蜜蜂副伤寒相关的显著富集的 KEGG 通路。本研究证明利用代谢组学筛选差异代谢物质进而探究疾病的发病机制可为蜜蜂疾病防控提供科学有效的技术方法，与诸多研究结果相一致（Du Rand *et al.*, 2017；Wu *et al.*, 2017；Shi *et al.*，2018）。

本研究对正、负离子模式筛选到的差异最显著的 10 个代谢物进行注释后发现多个与蜜蜂抗氧化应激、抑菌、细胞凋亡以及代谢障碍相关的代谢物质，其中包括镰刀菌氧萘满酮、奎尼丁、褪黑素、去氧紫草素等代谢物。镰刀菌氧萘满酮 Fusarochromanone 是由食源性真菌产生的真菌毒素，它在多种类型的细胞中具有抑制细胞增殖和分化以及诱导细胞凋亡的作用（Furmanski *et al.*，2009；Mahdavian *et al.*，2014）。此外，镰刀菌氧萘满酮还可通过抑制丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶 2A 和丝氨酸/苏氨酸蛋白质磷酸酶 5 的活性激活 JNK 信号通路，进而导致细胞凋亡（Gu *et al.*，2015）。奎尼丁 Quinidine 是一种化学品，临床上主要用于心房颤动或心房扑动经电转复后的维持治疗。有研究发现奎尼丁能够减缓蜜蜂嗅觉神经元的瞬间外向钾电流，进而对蜜蜂嗅觉灵敏度造成一定影响（Laurent *et al.*, 2002）。去氧紫草素 Deoxyshikonin 具有抗菌消炎、抗病毒、镇痛和抗肿瘤的作用，并且在伤口恢复中发挥着重要的作用（Park *et al.*，2018）。褪黑素 Melatonin 是一种具有多功能的生物信号物质，在机体昼夜节律和糖类物质代谢等生理过程中发挥调节作用（Bähr *et al.*，2011；Amaral and Cipolla-Neto，2018）。Li 等（2018）研究表明褪黑素受体 1A 型基因在中华蜜蜂抵御低温胁迫方面发挥着重要作用。以上差异代谢物的显著上调表明蜜蜂副伤寒发病后体内将出现细胞凋亡速率增加，嗅觉灵敏度降低的现象，进一步导致蜜蜂抗病力和抗寒性的下降。

为了进一步从营养物质代谢的角度阐释蜜蜂副伤寒的发病机理，本研究对差异代谢物质进行 KEGG 功能富集。研究表明蜜蜂副伤寒与氨酰-tRNA 合成、蛋白质消化吸收、矿物质吸收、谷胱甘肽代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢以及半胱氨酸与蛋氨酸代谢代谢通路显著相关（$P < 0.05$）。氨酰-tRNA 合成的作用是将氨基酸与含有相应反密码子的 tRNA 精确匹配，其中氨酰-tRNA 合成酶会催化氨基酸与其同源 tRNA 的连接，其催化活性决定了遗传密码，对蛋白质合成和细胞活力至关重要（Mirande，2010）。氨酰-tRNA 合成代谢通路的显著富集表明蜜蜂副伤寒与体内氨基酸代谢紊乱密切相关，随后甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、β -丙氨酸代谢以及半胱氨酸与蛋氨酸代谢通路的显著富集证实这一推测。对以上代谢通路富集的代谢物进行注释分析后可发现蜜蜂副伤寒个体与正常蜜蜂间蛋氨酸、L-苏氨酸、L-组氨酸、L-天冬氨酸、甘氨酸、L-丝氨酸、L-脯氨酸、L-苯丙氨酸的含量存在显著差异（$P < 0.05$），而且以上氨基酸代谢水平均为显著下调。该结果表明，氨基酸为蜜蜂越冬的必需营养元素，氨基酸缺乏将对蜜蜂抗寒力造成一定影响，易引发副伤寒等疾病，与本课题组前期比较低温胁迫前后蜜蜂体内氨基酸水平变化的研究结果相一致（徐凯等，2018）。因此，本研究也提出越冬饲料中添加适量的复合氨基酸可提高蜜蜂的抗寒性并降低副伤寒发生率的假设，但仍需要进一步的研究进行验证。

蛋白质不仅是机体的主要成分，也是发挥生命功能的基本物质。本研究中在蛋白质消化吸收代谢通路中发现 4-甲基苯酚、苯酚、L-丝氨酸、L-脯氨酸、L-苯丙氨酸以及 L-组氨酸 6 种差异代谢物，除 4 种显著下调的氨基酸外，还包括 4-甲基苯酚和苯酚两种显著上调的代谢物。宋志刚等（2001）研究表明动物肠道中 4-甲基苯酚和苯酚的含量不仅与饲料蛋白质含量密切相关，也极大程度上反映了肠道细菌产生的内源性物质的代谢情况。蜜蜂副伤寒患病工蜂体内蛋白质消化吸收通路的显著富集以及 4-甲基苯酚和苯酚 2

种差异代谢物的显著上调表明蜜蜂副伤寒疾病的发生可能与蜜蜂肠道内微生物的失衡密切相关，推测蜜蜂体内蛋白质和氨基酸被肠道腐败菌分解发酵后影响蜜蜂物自身物质代谢进而引发蜜蜂副伤寒（Ramezani *et al.*，2016）。

谷胱甘肽是由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸组成的一种三肽，具有防御氧化应激的作用，也是氧化还原信号的关键决定因素，在外源性生物毒素的解毒、调节细胞增殖、凋亡和免疫功能等方面起重要作用（Prussick *et al.*，2013；Lu *et al.*，2016；Sonthalia *et al.*，2016）。谷胱甘肽代谢通路所富集的差异代谢物包括 L-焦谷氨酸、甘氨酸、还原型谷胱甘肽、双谷胱甘肽精胺和抗坏血酸。L-焦谷氨酸、甘氨酸、还原型谷胱甘肽、双谷胱甘肽精胺等代谢物的下调表明蜜蜂副伤寒时机体处于氧化应激过程，强抗氧化物褪黑素的显著上调也可验证该论点，而且该过程可能是由蛋白质和氨基酸代谢紊乱直接导致的（Tan *et al.*，2018）。抗坏血酸即维生素 C，是一种有效的自由基清除剂。蜜蜂副伤寒状态下抗坏血酸的显著上调可能与高水平的抗坏血酸减缓谷胱甘肽在应激条件下的消耗，保障机体维持长时间的抗氧化状态有关（Gould and Pazdro，2019）。

参考文献 (References)

Amaral FD, Cipolla-Neto J, 2018. A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 62(4): 472–479.

Bähr I, Mühlbauer E, Schucht H, Peschke E, 2011. Melatonin stimulates glucagon secretion in *vitro* and in *vivo*. *Journal of Pineal Research*, 50(3): 336–344.

Baines D, Wilton E, Pawluk A, Degorter M, Chomistek N, 2017. Neonicotinoids act like endocrine disrupting chemicals in newly-emerged bees and winter bees. *Scientific Reports*, 7(1): 10979.

Beyer M, Junk J, Eickermann M, Clermont A, Kraus F, Georges C, Reichart A, Hoffmann L, 2018. Winter honey bee colony losses, *Varroa destructor* control strategies, and the role of weather conditions: Results from a survey among beekeepers. *Research in Veterinary Science*, 118: 52–60.

Desai SD, Currie RW, 2016. Effects of wintering environment and parasite-pathogen interactions on honey bee colony loss in north temperate regions. *PLoS ONE,* 11(7): e0159615

Du Rand EE, Human H, Smit S, Beukes M, Apostolides Z, Nicolson SW, Pirk CW, 2017. Proteomic and metabolomic analysis reveals rapid and extensive nicotine detoxification ability in honey bee larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 82: 41–51.

Furmanski BD, Dréau D, Wuthier RE, Fuseler JW, 2009. Differential uptake and selective permeability of fusarochromanone (FC101), a novel membrane permeable anticancer naturally fluorescent compound in tumor and normal cells. *Microscopy and Microanalysis,* 15(6): 545–557.

Gould RL, Pazdro R, 2019. Impact of supplementary amino acids, micronutrients, and overall diet on glutathione homeostasis. *Nutrients*, 11(5): 1056.

Gu Y, Barzegar M, Chen X, Wu Y, Shang C, Mahdavian E, Salvatore BA, Jiang S, Huang S, 2015. Fusarochromanone-induced reactive oxygen species results in activation of JNK cascade and cell death by inhibiting protein phosphatases 2A and 5. *Oncotarget*, 6(39): 42322–42333.

Guan ZY, 2001. Causes and prevention of paratyphoid disease of honeybee during overwintering period in alpine-cold region of China. *Journal of Bee*, (10): 20. [关振英, 2001. 高寒地区越冬期蜂群下痢病多发原因及其预防. 蜜蜂杂志, (10): 20.]

He X, 2017. Diagnosis and pest control of disease in western honeybee. *Gansu Animal Husbandry and Veterinary*, 47(7): 87–91. [何旭, 2017. 西方蜜蜂病敌害的诊断与防治. 甘肃畜牧兽医, 47(7): 87–91.]

Hollywood K, Brison DR, Goodacre R, 2006. Metabolomics: Current technologies and future trends. *Proteomics*, 6(17): 4716–4723.

Johnson CH, Gonzalez FJ, 2012. Challenges and opportunities of metabolomics. *Journal of Cellular Physiology*, 227(8): 2975–2981.

Laurent S, Masson C, Jakob I, 2002. Whole-cell recording from honeybee olfactory receptor neurons: Ionic currents, membrane excitability and odourant response in developing workerbee and drone. *The European Journal of Neuroscience*, 15(7): 1139–1152.

Li G, Zhang Y, Ni Y, Wang Y, Xu B, Guo X, 2018. Identification of a melatonin receptor type 1A gene (AccMTNR1A) in *Apis cerana cerana* and its possible involvement in the response to low temperature stress. *Naturwissenschaften,* 105(3/4): 24.

Li YS, Jin YH, 2011. Causes and prevention of death of honeybees in winter. *Apiculture of China*, 62(1): 22. [李永胜, 金月华, 2011. 蜜蜂越冬死亡的原因及预防. 中国蜂业, 62(1): 22.]

Liu JF, He YZ, Liao R, Xie CL, He XJ, Zeng ZJ, 2020. Effects of queen mandibular pheromone on the behavioral responses of

Apis cerana cerana and *Apis mellifera ligustica* drones. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(2): 321–328. [刘俊峰, 何玉珠, 廖蓉, 谢昌林, 何旭江, 曾志将, 2020. 蜂王上颚腺信息素对中华蜜蜂、意大利蜜蜂雄蜂选择行为的影响. 应用昆虫学报, 57(2): 321–328.]

Liu ZG, Chen C, Niu QS, Qi WZ, Yuan CY, Su SK, Liu SD, Zhang YS, Zhang XW, Ji T, Dai RG, Zhang ZY, Wang SH, Gao FC, Guo HK, Lv LP, Ding GL, Shi W, 2016. Survey results of honey bee (*Apis mellifera*) colony losses in China (2010-2013). *Journal of Apicultural Research*, 55(1): 29–37.

Lu SC, Mato JM, Espinosa-Diez C, Lamas S, 2016. MicroRNA-mediated regulation of glutathione and methionine metabolism and its relevance for liver disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 100: 66–72.

Mahdavian E, Marshall M, Martin PM, Cagle P, Salvatore BA, Quick QA, 2014. Caspase-dependent signaling underlies glioblastoma cell death in response to the fungal metabolite, fusarochromanone. *International Journal of Molecular Medicine*, 34(3): 880–885.

Mirande M, 2010. Processivity of translation in the eukaryote cell: Role of aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Letters*, 584(2): 443–447.

Park JY, Shin MS, Hwang GS, Yamabe N, Yoo JE, Kang KS, Kim JC, Lee JG, Ham J, Lee HL, 2018. Beneficial effects of deoxyshikonin on delayed wound healing in diabetic mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11): 3660.

Prussick R, Prussick L, Gutman J, 2013. Psoriasis improvement in patients using glutathione enhancing nondenatured whey protein isolate: A pilot study. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 6(10): 23–26.

Qin M, Wang HF, Liu ZG, Wang Y, Wang S, Chi XP, Liu CL, Zhang WX, Xu BH, 2017. Comparison of different cold resistance between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. *Scientia Agricultura Sinica*, 50(12): 2380–2388. [秦明, 王红芳, 刘振国, 王颖, 王帅, 郗学鹏, 刘春蕾, 张卫星, 胥保华, 2017. 中华蜜蜂和意大利蜜蜂耐寒性能差异比较. 中国农业科学, 50(12): 2380–2388.]

Ramezani A, Massy ZA, Meijers B, Evenepoel P, Vanholder R, Raj DS, 2016. Role of the gut microbiome in uremia: A potential therapeutic target. *American Journal of Kidney Diseases*, 67(3): 483–498.

Shi T, Burton S, Wang Y, Xu S, Zhang W, Yu L, 2018. Metabolomic analysis of honey bee, *Apis mellifera* L. response to thiacloprid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 152: 17–23.

Song ZG, Liu HF, Yuan L, 2001. Intestinal microbiology and growth promotion of antibiotics in pigs. *Veterinary Phaaceuticals & Feed Additives*, 6(2): 25–28. [宋志刚, 刘惠芳, 袁磊, 2001. 猪肠道微生物学和抗生素的生长促进作用. 兽药与饲料添加剂, 6(2): 25–28.]

Sonthalia S, Daulatabad D, Sarkar R, 2016. Glutathione as a skin whitening agent: Facts, myths, evidence and controversies. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 82(3): 262–272.

Tan BL, Norhaizan ME, Liew WP, 2018. Nutrients and oxidative stress: Friend or foe? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018(6): 9719584.

Wang XY, 2012. Identification and prevention of paratyphoid disease of honeybee. *Apiculture of China*, 63(34): 18. [王希彦, 2012. 蜜蜂副伤寒病的识别与防治. 中国蜂业, 63(34): 18.]

Wu JL, Zhou CX, Wu PJ, Xu J, Guo YQ, Xue F, Getachew A, Xu SF, 2017. Brain metabolomic profiling of eastern honey bee (*Apis cerana*) infested with the mite *Varroa destructor*. *PLoS ONE*, 12(4): e0175573.

Xiao YL, Tang WY, Liu CH, Yu K, Gong Y, Yang QM, Zhang YG, Qu CH, Wang LP, Guo D, Yu LY, 2019. Analysis of the pollinating services provided by *Osmia cornifrous* (Rodoszkouski) and *Apis mellifera ligustica* Spin in apple and cherry orchards. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(6): 1235–1242. [肖云丽, 唐文颖, 刘存辉, 于凯, 公义, 杨勤民, 张玉国, 曲诚怀, 王利平, 国栋, 于玲雅, 2019. 壁蜂及蜜蜂授粉对苹果和大樱桃授粉服务功能分析. 应用昆虫学报, 56(6): 1235–1242.]

Xu K, Niu QS, Liu YL, Chen DH, Du YL, Guo LN, Zhao HT, Jiang YS, 2018. Effects of temperature on major physiological indicators of cold tolerance in *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55(5): 889–895. [徐凯, 牛庆生, 刘玉玲, 陈东海, 杜亚丽, 郭丽娜, 赵慧婷, 姜玉锁, 2018. 温度对中华蜜蜂和意大利蜜蜂个体主要抗寒生理指标的影响. 应用昆虫学报, 55(5): 889–895.]

Zeng ZJ, 2020. Advances in honeybee biology in China over the past 70 years. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(2): 259–264. [曾志将, 2020. 中国 70 年来蜜蜂生物学研究进展. 应用昆虫学报, 57(2): 259–264.]