

DOI:10.13350/j.cjpb.230723

• 综述 •

代谢组学在人体寄生虫病研究中的应用进展

赵云景, 申艳梅*

(山东第一医科大学(山东省医学科学院), 山东省寄生虫病防治研究所, 山东第一医科大学附属消化病医院, 山东济宁 272033)

【摘要】 全世界有超过 30 亿人患有 一种或多种寄生虫病, 在大多数热带或亚热带国家, 这些疾病很普遍, 是人口发病和死亡的主要原因。人体寄生虫的多样性非常大, 在大多数情况下, 迫切需要更有效的新药。代谢组学包含各种蛋白质分离和鉴定技术, 有助于识别代谢物(低分子质量生化化合物)以表征及生物体中生物途径, 分析蛋白质之间的各种类型的相互作用及其进化谱系, 是探索寄生虫与人体之间相互关系的有效工具。本文通过对代谢组学研究方法及其在人体寄生虫病的应用进行综述, 为从代谢角度进行人体寄生虫病的早期诊断和治疗提供理论基础。

【关键词】 人体寄生虫共患病; 代谢组学; 应用进展; 诊断标志物; 综述

【中图分类号】 R38 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2023)07-0860-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Jul;18(7):860-863.]

Advances in the application of metabolomics in the study of Human parasitic diseases

ZHAO Yunjing, SHEN Yanmei (*Shandong Institute of Parasitic Diseases, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical, Jining 272033, Shandong, China*)

【Abstract】 More than 3 billion people worldwide suffer from one or more parasitic diseases, and in most tropical or subtropical countries, these diseases are prevalent and are a major cause of population morbidity and mortality. The diversity of human parasites is enormous, In most cases, new and more effective drugs are urgently needed. Metabolomics encompasses various protein isolation and identification techniques that help to identify metabolites (low molecular weight biochemical compounds) to characterize and biological pathways in organisms, to analyze various types of interactions between proteins and their evolutionary lineages, is An effective tool for exploring the interrelationship between parasites and the human body. This paper reviews the research methods of metabolomics and its application in human parasitic diseases, and provides a theoretical basis for the early diagnosis and treatment of human parasitic diseases from the perspective of metabolism.

【Key words】 Human parasitic diseases; metabolomics; current applications; diagnostic biomarker; review

* 全球有近 30 亿人遭受一种或多种寄生虫感染, 每年有近 100 万人死亡^[1]。60 年来, 我国人体寄生虫病防治通过开展健康教育工作, 对寄生虫感染患者进行定期药物治疗, 分别于 1990 年、2001-2004 年和 2014-2016 年对人类寄生虫患病率进行了 3 次全国调查, 预防再感染, 大大降低了发病率^[2]。2021 年 6 月 30 日, 世界卫生组织宣布, 疟疾已在中国消除, 但寄生虫病仍然是世界上最严重的公共卫生问题之一^[3], 尽管在医学领域进行了广泛的研究和进步, 寄生虫病仍然是一个主要的人类健康问题, 不同地理区域的部分人口中仍可引起多种疾病, 发病率和死亡率均较高, 目前还没有有效的疫苗可用于对抗突出的人类寄生虫病。

寄生虫病是世界范围内的主要公共卫生问题, 特别是在热带和亚热带地区。人类寄生虫的多样性非常大, 从原生动到蠕虫, 常见的人类寄生虫病, 如疟疾、利什曼病、阿米巴病、南美锥虫病、血吸虫病、弓形虫病、隐孢子虫病和棘球虫病是全球主要的死亡原因之一^[4]。在大多数情况下, 迫切需要更有效的新药。病原体检测是寄生虫感染的金标准, 检测方法包括盐水直接涂片法、碘染色涂片法、饱和盐水漂浮法、加藤厚涂片法、血涂片法、骨髓涂片法等。而更好地了解宿主与寄生虫的相互作用是有效控制和最终根除这些疾病的关键^[5], 最近, 通过应用

基因组学、表观基因组学、蛋白质组学和代谢组学研究中开发的新工具和方法, 寄生虫病控制取得了重大进展。代谢组学涉及内源性和外源性代谢物的鉴定, 定量和表征, 它基于内源性代谢物可以准确地指示新陈代谢的微小变化的想法^[6]。由于其高灵敏度和特异性, 代谢组学可以被认为是探索人体寄生虫病与人体之间相互关系的有效工具。本文通过对代谢组学研究方法及其在人体寄生虫病的应用进行综述, 为从代谢角度进行人体寄生虫病的早期诊断和治疗提供理论基础。

1 代谢组学概况

代谢组学起源于代谢分析, Nicholson 等^[7]提出了代谢组学的概念, 作为一项新兴技术高通量“组学”技术, 它补充了基因组学, 转录组学和蛋白质组学的的数据, 可提供代谢物的全面定量分析, 可解释对基因组、转录组、蛋白质组或环境变化的最终反应, 广泛应用于医学, 合成生物学, 植物代谢组学和微生物系统等各个领域^[8]。代谢组学是研究宿主对寄生虫感染的代谢反应的有力的工具, 提供了生物体细胞或组织内已鉴定的代

* **【通讯作者】** 申艳梅, E-mail: Sysym1995@163.com

【作者简介】 赵云景(1976-), 女, 山东济宁人, 本科, 主治医师, 主要从事医学影像诊断。E-mail: zyjjdxc@163.com

代谢物的定量信息,它是生物系统中的最终“组学”水平,可用于了解寄生虫的细胞代谢,并确定新的潜在靶点、作用模式和抗性机制^[9]。随着基因组学的出现和快速发展,其研究用于疾病诊断和药物筛选,但细胞内寄生虫的生活方式对实施传统的代谢组学方案提出了挑战,主要是由于宿主代谢物污染和寄生虫物质数量的限制,代谢组学方法主要与可靠的分析技术相关,例如 NMR 和质谱法^[10]。

代谢组学是参与新陈代谢的小分子化学实体的集合,对生物体液、细胞和组织中代谢物的分析,通常用作生物标志物发现的工具^[11]。由于信息学和分析技术的创新发展,以及正交生物学方法的整合,现在可以扩展代谢组学分析以了解代谢物的系统级影响。此外,由于代谢组学固有的敏感性,可以检测到生物途径的细微变化,以深入了解各种生理条件和异常过程(包括疾病)的机制。代谢组学分析以筛选识别疾病诊断和预测中的代谢生物标志物,其显示出新的潜在有利特征,例如更准确的诊断,动态疾病评估,非侵入性取样或个性化治疗评估^[10]。通过使用高分辨率质谱法提供细胞、组织或体液中存在的数千种代谢物的化学指纹,已用于研究各种生物过程和疾病状态^[12]。

高分辨率代谢组学可以揭示寄生虫生命周期每个阶段宿主-寄生虫相互作用的复杂性以及对宿主代谢、发病机制和疾病的下游影响,与使用自上而下的系统生物学方法生成的其他大型数据集集成,并被计算生物学家用来开发和增强与识别新药物靶点或干预策略相关的疟疾发病机制模型^[13]。代谢组学通量可以通过代谢途径测量和追踪分析物,稳定同位素(²H, ¹³C, ¹⁵N)标记的初级代谢物(例如,葡萄糖或氨基酸)被添加到模型系统(例如,寄生虫培养物或受感染的动物)中,并且由于代谢产物中重同位素掺入的可测量质量差异和可量化比率而在整个下游途径中鉴定,并用于寄生虫感染的机制研究,以假设标记的代谢物可以在宿主和寄生虫之间追踪以阐明基本的代谢关系^[14-15]。

2 代谢组学研究的主要技术方法

代谢组研究包括鉴定代谢物,测量代谢物的丰度,揭示生物活动的动力学,并最终说明代谢机制。迄今为止,代谢组学研究技术包括代谢物化学分析及数据分析两部分,目前的方法主要有核磁共振(NMR)、质谱(MS)、红外光谱(IR)、气相色谱-质谱(GC-MS)、液相色谱-质谱(LC-MS)和毛细管电泳质谱(CE-MS)等谱学技术^[16]。NMR能够在较短的采集时间内同时测量多种代谢物,研究具有无损检测和高再现性,用于代谢组学的主要局限性是其低灵敏度^[17-18];MS平台为测量各种生物样品中的一系列细胞代谢物提供了更高的灵敏度和选择性,基于MS阐述“非靶向”和“目标”使用液相色谱-MS(LC-MS)可分析来自不同来源的代谢物并进一步鉴定和定量,作为代谢组学的一个子集,脂质组学在使用 LC-MS 分析不同类别的代谢物并进行定性和定量分析^[19],优点为可检测具有不同化学性质的代谢物,不需要样品衍生化,能够更好地分离和检测代谢脂质,在人体寄生虫病的研究中具有重大意义。

气相色谱(GC)-MS采用快速、高灵敏度、高选择性的定性和定量分析方法来鉴别代谢物,应用广泛^[20]。其基本原理是利用离子源电离样品组分,生成不同荷质比的带电荷的离子,经加速电场、质量分析器(包含电场和磁场)使得色散的离子束

分别聚焦而得到质谱图,从而确定其荷质比,再根据其强度进行定量和半定量分析^[21]。对挥发性代谢物的分离和检测具有高灵敏度和特异性,化合物的光谱模式和保留时间具有高度可重复性,并允许使用已建立的化合物库,局限性是仪器间的可变性较低^[22]。然而,基于 GC-MS 的代谢组学通常保留用于低极性的热稳定挥发性化合物和适合衍生化的化合物;毛细管电泳质谱(CE-MS)是高溶解性的色谱分离技术和高灵敏度的检测方法,能检测到多种代谢物^[23]。基质辅助激光解吸离子源(MALDI)和解吸电喷雾电离离子源(ESI)直接使样品离子化,进入质谱分析^[24],缩减样品制备时间,可应用于制药领域、微生物和疾病诊断等领域。

3 代谢组学技术在人体寄生虫病研究领域的应用

随着代谢组学研究的不断深入,人体寄生虫病发病机制以及机体代谢变化逐渐被揭示出来,新的方法技术手段不断出现,为从代谢角度进行人体寄生虫病的诊断和治疗打下了坚实的基础。近年来,代谢组学应用主要在血吸虫、疟原虫、棘球蚴、弓形虫、华支睾吸虫等感染,被认为是开发用于人体寄生虫病早期诊断的生物标志物的新型有前途的工具。

3.1 代谢组学技术在血吸虫病的应用 血吸虫感染诱导了涉及包括氨基酸代谢、DNA 和 RNA 生物合成、磷脂代谢、能量代谢抑制、葡萄糖摄取和代谢以及肠道微生物群代谢的破坏等多种代谢途径的代谢变化^[25]。作为形成细胞膜的主要结构脂质,参与信号传导和一系列炎症过程,磷脂参与营养运输以及有毒宿主-细胞效应分子的调节,它们被合成以支持感染过程中细胞的生长,磷脂生物合成途径是药物的靶标,大多数改变的脂质属于甘油磷脂,对感染反应显著降低,例如磷脂酰胆碱(PC),磷脂酰乙醇胺(PE),磷脂酰丝氨酸,磷脂酰肌醇等^[26]。通过基于代谢组学数据研发,可在感染后 1 周成功检测血吸虫病,这比“金标准”血液查找虫体和虫卵的检测方法早 3 周。

3.2 代谢组学技术在疟疾的应用 疟疾是一种蚊媒疾病,发病率高,死亡率高,诊断金标准为血涂片中直接观察疟原虫。Lakshmanan 等^[27]对恶性疟原虫感染和恶性疟原虫非感染个体的血浆样本进行了 LC-MS 分析,发现具有统计学意义的代谢物如氨基酸,氨基酸衍生化合物,脂质和中枢代谢的代谢物。Surowiec 等^[28]采用 GC-MS 分析比较患有轻度和重度疟疾和健康对照的儿科患者的血浆谱,发现不同的代谢物在疾病组的二元比较之间发生了变化,ROC 曲线的 OPLS-DA 模型显示轻度疟疾与重症疟疾患者 ROC 值分别为 0.8442、0.9165 和 0.7637,显著改变的代谢物包括尿素、葡萄糖醛酸、组氨酸、 β -羟丁酸、半胱氨酸、色氨酸、棕榈油酸和十八碳烯酸。Sengupta 等^[29]区分疟疾患者和对照组的代谢物是脂蛋白(LDL/VLDL)、乳酸盐和糖蛋白,鉴别恶性疟原虫感染患者和脓毒症/脑炎患者的代谢物包括 LDL/VLDL、乳酸和异亮氨酸。这些异常代谢产物可以作为疟原虫感染临床诊断和鉴别的生物标志物。

3.3 代谢组学技术在棘球蚴病的应用 棘球蚴病的诊断主要取决于影像学检查,早期症状多不明显,患者就诊时多处于疾病的晚期,从而限制了棘球蚴病的早期诊断。囊性棘球蚴病(CE)和肺泡棘球蚴病(AE)是两种严重的人畜共患寄生虫病,它是由细粒棘球蚴(s1)种的绦虫引起的人畜共患寄生虫病。CE 的治疗选择从简单的“观察和等待”方法到侵入性治疗,取

决于囊肿的类型,尤其是性质(活动/非活动)。血清学检测难以区分活动性和非活动性 CE。Larrieu 等^[30]在测试基于气相色谱-质谱(GC-MS)和液相色谱-四极杆飞行时间质谱(LC-qT-OF-MS)的代谢组学建立 CE 患者的血浆代谢指纹,并确定诊断参考以区分活动性和非活动性 CE 囊肿,在 36 名活动性 CE 患者、17 名非活动性 CE 患者和 31 名健康对照的血浆样本中测量代谢物浓度。通过使用主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)方法对从 2 个分析平台获得的 232 种已鉴定代谢物进行多变量统计分析,组合数据集的 PLS-DA 分数图显示了组之间的良好分离,与健康对照组相比 CE 患者的角鲨烯水平降低,甘油酸、3-磷酸甘油酸、谷氨酸、棕榈油酸和油酸水平升高,与非活动性 CE 患者相比,活动性 CE 患者的 3-磷酸甘油酸水平降低和 4-羟基苯乙酰谷氨酰胺、二十二碳六烯酸水平升高^[31-33]。代谢物差异的可用来鉴别活动性和非活动性 CE 患者。

3.4 代谢组学技术在弓形虫病的应用 弓形虫是世界上最常见的人类寄生虫之一,是一种无处不在的病原体^[34],为弓形虫病的病原体,可以感染包括人类在内的大量宿主。临床表现变化较大可从无症状到严重的脑和眼部感染。弓形虫对几种必须通过转运蛋白获得的代谢物具有自养作用,少数特征转运蛋白包括寄生虫的葡萄糖转运蛋白、腺苷转运蛋白、必需氨基酸酪氨酸和精氨酸以及叶酸,酪氨酸和精氨酸转运蛋白属于主要的促进超家族(MFS)其特征形成 12 个跨膜结构域的 2 个结构相似的结构域,通常携带小溶质,并在第二、三跨膜板手之间具有共同的基序^[35-36]。使用基于 UPLC-MS/MS 的代谢组学分析弓形虫感染期间小鼠感染和非感染大脑之间的代谢特征不同,2-溶血磷脂酰胆碱和卵磷脂 2 种代谢物均被改变,2-溶血磷脂酰胆碱在磷脂代谢和维持细胞膜完整性方面起作用,激活 T 淋巴细胞的 2-溶血磷脂酰胆碱的产生是由抗原刺激引发,且 2-溶血磷脂酰胆碱的产生呈时间依赖性,卵磷脂可以作为佐剂,以增强细胞对抗原刺激的免疫反应^[37]。

3.5 代谢组学技术在利什曼病的应用 利什曼原虫属于 1903 年首次被报道,利什曼原虫鞭毛虫通过受感染的雌性白蛉叮咬传播给脊椎动物,产生利什曼病,其症状从皮肤病变到致命的利什曼病^[38]。利什曼原虫可利用葡萄糖以 β -甘露聚糖的形式维持碳水化合物储备,当葡萄糖稀缺时,利什曼原虫可以调动甘露聚糖储备或调用糖异生来产生用于合成代谢途径的糖磷酸盐并维持 β 甘露聚糖,在巨噬细胞宿主细胞中,利什曼原虫可更有效地利用能量底物^[39]。比较代谢组学分析结果注解了 799 种代谢物,其中 79 种在寄生虫裂解物中有统计学上的差异。通过与真实标准的比较鉴定了 10 种细胞代谢物和 6 种分泌的代谢物。脂质和氨基酸代谢的代谢物以及具有未分配生化来源的代谢物,所有脂质均根据质量测量结果推测鉴定的,无任何结构分析来解析异构体,脂质组学比较揭示了利什曼原虫中相当数量的脂质代谢显著变化^[40]。

3.6 代谢组学技术在隐孢子虫感染的应用 隐孢子虫(*Cryptosporidium spp.*)是人类和动物中一种重要的人畜共患原生动物寄生虫,隐孢子虫感染源包括受污染的食物或水,通过粪-口途径传播,感染人和动物胃肠道上皮细胞和宿主的黏膜表面,分子致病机制尚不清楚^[41]。2012 年,Ng 等^[42]使用 GC-MS 的非靶向代谢组学方法,以比较隐孢子虫阳性和隐孢子虫

阴性患者粪便提取中存在的代谢物的差异,最终确定了 30 种可能对两组之间的差异贡献最大的化合物。

4 结语

代谢组学是通过现代化学的仪器分析技术例如核磁共振波谱(NMR)和质谱(MS)检测机体整个代谢产物谱的变化,并通过多元统计分析方法研究整体的生物学功能状况。代谢组学为寄生虫病诊断和控制措施的提供了新的方法。研究寄生虫感染代谢组学的主要重点领域包括在发病机制,药物设计和生物标志物发现的背景下理解和表征寄生虫衍生的小分子和代谢相互作用。代谢组学通过证明在内部和外部因素影响下的新陈代谢变化,反映了病理生理过程中的一系列生物反应,当生物体被病原体侵入时,细胞中代谢物通过定性定量分析,可以帮助寻找人体寄生虫病发展过程或治疗性干预的生物标志物,为寻找人体寄生虫病及早诊治提供了一种新的途径。

【参考文献】

- [1] Rainova I, Harizanov R, Kaftandjiev I, et al. Human parasitic diseases in bulgaria in between 2013-2014[J]. Balkan Med J, 2018, 35(1):61-67.
- [2] Liu X, Wu M, Liu Y, et al. Foodborne parasites dominate current parasitic infections in hunan province, China[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11:774980.
- [3] Feng L, Pomel S, Latre de Late P, et al. Repurposing auranofin and evaluation of a new gold(i) compound for the search of treatment of human and cattle parasitic diseases: from protozoa to helminth infections[J]. Molecules, 2020, 25(21):5075.
- [4] Fitzpatrick C, Engels D. Leaving no one behind: A neglected tropical disease indicator and tracers for the sustainable development goals[J]. Int Health, 2016, 8(1):i15-i18.
- [5] Paul S, Ruiz-Manriquez LM, Serrano-Cano FI, et al. Human microRNAs in host-parasite interaction: a review[J]. Biotech, 2020, 10(12):510.
- [6] Ghatak A, Chaturvedi P, Weckwerth W. Metabolomics in plant stress physiology[J]. Biotechnol, 2018, 164:187-236.
- [7] Nicholson JK, Lindon JC, 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, 29:1181-1189.
- [8] Putri SP, Nakayama Y, Matsuda F, et al. Current metabolomics: practical applications[J]. J Biosci Bioeng, 2013, 115:579-589.
- [9] Fukusaki E. Application of metabolomics for high resolution phenotype analysis[J]. Mass Spectrometry, 2014, 3:S0045-S0045.
- [10] Carey MA, Covelli V, Brown A, et al. Influential parameters for the analysis of intracellular parasite metabolomics[J]. mSphere, 2018, 3(2):e00097-18.
- [11] Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, et al. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial[J]. Metabolomics, 2013, 9(2):280-299.
- [12] Kumar S, Gupta S, Mohmad A, et al. Molecular tools-advances, opportunities and prospects for the control of parasites of veterinary importance[J]. Int J Trop Insect Sci, 2021, 41(1):3-42.
- [13] Srivastava A, Kowalski GM, Callahan DL, et al. Strategies for extending metabolomics studies with stable isotope labelling and fluxomics[J]. Metabolites, 2016, 6(4):32.

- [14] Zamboni N, Saghatelian A, Patti GJ. Defining the metabolome: size, flux, and regulation[J]. *Mol Cell*, 2015, 58(4):699-706.
- [15] Rinschen MM, Ivanisevic J, Giera M, et al. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(6):353-367.
- [16] Liu X, Locasale JW. Metabolomics: A Primer[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2017, 42(4):274-284.
- [17] Rinschen MM, Ivanisevic J, Giera M, et al. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics[J]. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(6):353-367.
- [18] Ren JL, Zhang AH, Kong L, et al. Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(40):22335-22350.
- [19] Liu R, Yang Z. Single cell metabolomics using mass spectrometry: Techniques and data analysis[J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1143:124-134.
- [20] Wilson I. Methods and techniques for metabolic phenotyping[J]. *Bioanalysis*, 2017, 9:1-3.
- [21] Adamko DJ, Saude E, Bear M, et al. Urine metabolomic profiling of children with respiratory tract infections in the emergency department: a pilot study[J]. *BMC Infect Dis*, 2016, 16:439.
- [22] Kofeler HC, Fauland A, Rechberger GN, et al. Mass spectrometry based lipidomics: an overview of technological platforms[J]. *Metabolites*, 2012, 2(1):19-38.
- [23] Monnerie S, Comte B, Ziegler D, et al. Metabolomic and lipidomic signatures of metabolic syndrome and its physiological components in adults: a systematic review[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):669.
- [24] Lu W, Su X, Klein MS, et al. Metabolite measurement: pitfalls to avoid and practices to follow[J]. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86:277-304.
- [25] Hu Y, Chen J, Xu Y, et al. Alterations of gut microbiome and metabolite profiling in mice infected by *Schistosoma japonicum* [J]. *Front Immunol*, 2020, 11:569727.
- [26] Huang Y, Wu Q, Zhao L, et al. UHPLC-MS-based metabolomics analysis reveals the process of schistosomiasis in mice[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11:1517.
- [27] Lakshmanan V, Rhee KY, Wang W, et al. Metabolomic analysis of patient plasma yields evidence of plant-like alpha-linolenic acid metabolism in *Plasmodium falciparum* [J]. *J Infect Dis*, 2012, 206(2):238-248.
- [28] Surowiec I, Orikiiriza J, Karlsson E, et al. Metabolic signature profiling as a diagnostic and prognostic tool in pediatric *Plasmodium falciparum* malaria[J]. *Open Forum Infect Dis*, 2015, 2(2):ofv062.
- [29] Sengupta A, Ghosh S, Das BK, et al. Host metabolic responses to *Plasmodium falciparum* infections evaluated by ¹H NMR metabolomics[J]. *Mol Biosyst*, 2016, 12(11):3324-3332.
- [30] Larrieu E, Gavidia CM, Lightowers MW. Control of cystic echinococcosis: background and prospects [J]. *Zoonoses Public Health*, 2019, 66(8):889-899.
- [31] Lin CG, Wei ZL, Cheng KK, et al. ¹H NMR-based investigation of metabolic response to electro-acupuncture stimulation[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:13.
- [32] VanDussen KL, Funkhouser-Jones LJ, Akey ME, et al. Neonatal mouse gut metabolites influence *Cryptosporidium parvum* infection in intestinal epithelial cells[J]. *MBio*, 2020, 11:e02582-20.
- [33] Wen H, Vuitton L, Tuxon T, et al. Echinococcosis: advances in the 21st century[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2019, 32:e00075-18.
- [34] Zwicker JD, Diaz NA, Guerra AJ, et al. Optimization of dipeptidic inhibitors of cathepsin L for improved *Toxoplasma gondii* selectivity and CNS permeability [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28:1972-1980.
- [35] Pittman KJ, Aliota MT, Knoll LJ. Dual transcriptional profiling of mice and *Toxoplasma gondii* during acute and chronic infection[J]. *BMC Genom*, 2014, 15:806.
- [36] Assolini JP, Concato VM, Gonçalves MD, et al. Nanomedicine advances in toxoplasmosis: diagnostic, treatment, and vaccine applications[J]. *Parasitol Res*, 2017, 116:1603-1615.
- [37] Kloehn J, Lunghi M, Varesio E, et al. Untargeted metabolomics uncovers the essential lysine transporter in *Toxoplasma gondii* [J]. *Metabolites*, 2021, 11(8):476.
- [38] Akhoundi M, Downing T, Votpyka J, et al. Leishmania infections: molecular targets and diagnosis[J]. *Mol Aspects Med*, 2017, 57:1-29.
- [39] Derici MK, Cansaran-Duman D, Taylan-Ozkan A. Usnic acid causes apoptotic-like death in *Leishmania major*, *L. infantum* and *L. tropica* [J]. *Biotech*, 2018, 8:384.
- [40] Arjmand M, Madrakian A, Khalili G, et al. Metabolomics-based study of logarithmic and stationary phases of promastigotes in leishmania major by ¹H NMR spectroscopy[J]. *Iran Biomed J*, 2016, 20(2):77-83.
- [41] Vanathy K, Parija SC, Mandal J, et al. Cryptosporidiosis: a mini review[J]. *Trop Parasitol*, 2017, 7:72-80.
- [42] Ng JS, Ryan U, Trengove RD, et al. Development of an untargeted metabolomics method for the analysis of human faecal samples using cryptosporidium infected samples[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2012, 185:145-150.