

· 药物代谢 ·

寒凝血瘀证大鼠的肠道菌群变化与粪便代谢特征分析

张宁, 李自辉, 赵洪伟, 庞牧, 刘树民*

(黑龙江中医药大学 药物安全性评价中心, 黑龙江省高等院校中药药性理论创新团队, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**探讨寒凝血瘀状态下大鼠肠道菌群多样性及粪便中内源性代谢物的变化,并考察与寒凝血瘀证密切相关的肠道菌群、代谢物、代谢通路。**方法:**采用冰水浴诱导的大鼠寒凝血瘀证模型,利用16S rRNA基因测序技术联合UPLC-TOF-MS的粪便代谢组学技术,将扰动的肠道菌群与内源性生物标记物进行关联分析。**结果:**基于Illumina MiSeq平台,发现与空白组大鼠相比,寒凝血瘀证模型组大鼠中 *Firmicutes* 显著上调($P < 0.05$), *Bacteroidetes* 显著下调($P < 0.01$),显著差异的属有23个。确定了7个与寒凝血瘀证相关的粪便代谢物,涉及到的3个相关性最强的代谢通路,分别为缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成,泛酸和辅酶A生物合成,组氨酸代谢。另外,肠道菌群的属与粪便代谢物有强相关性。**结论:**16S rRNA的高通量基因测序技术与代谢组学技术的联用可用于评价寒凝血瘀证的病理机制。

[关键词] 寒凝血瘀证; 肠道菌群; 粪便; 代谢组学; 16S rRNA; 高通量基因测序; 组氨酸

[中图分类号] R969.1;R945;R285.5;R284;R965.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)02-0079-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2018020079

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171102.1933.084.html>

[网络出版时间] 2017-11-02 19:33

Analysis of Intestinal Flora Diversity and Fecal Metabolic Characteristics in Rats with Cold Coagulation and Blood Stasis Syndrome

ZHANG Ning, LI Zi-hui, ZHAO Hong-wei, PANG Mu, LIU Shu-min*

(Innovation Team of Traditional Chinese Medicine Theory of Higher Educational Institutions in Heilongjiang Province, Center for Drug Safety Evaluation, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the intestinal flora diversity and endogenous metabolites in fecal of rats with cold coagulation and blood stasis syndrome, and to investigate gut flora, metabolites and metabolic pathways closely related to cold coagulation and blood stasis syndrome. **Method:** The rats model of cold coagulation and blood stasis syndrome induced by ice-water bath was established, 16S rRNA high-throughput gene sequencing coupled with UPLC-TOF-MS based on fecal metabonomics were used to analyze relativity between intestinal flora and endogenous biomarkers. **Result:** Based on Illumina MiSeq platform, V4 region was selected as the ideal variable regions. Compared with the blank group, it was found that *Firmicutes* was markedly up-regulated in model group ($P < 0.05$) with *Bacteroidetes* decreased ($P < 0.01$), there were 23 genus with significant differences. Based on fecal metabonomics technology, seven biomarkers were identified in model rats, of which 6 metabolites was markedly up-regulated except for docosapentaenoic acid. Three key metabolic pathways including histidine metabolism, biosynthesis of valine, leucine and isoleucine, biosynthesis of pantothenic acid and coenzyme A (CoA) were founded. There was a strong correlation between gut microbiota genera and fecal metabolites.

[收稿日期] 20170717(010)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2013CB531804)

[第一作者] 张宁,在读博士,从事中药药性理论及药效物质基础研究, Tel/Fax:0451-82193278, E-mail:634279190@qq.com

[通信作者] *刘树民,博士,教授,从事中药药性理论及药效物质基础研究, Tel/Fax:0451-82193278, E-mail:keji-liu@163.com

Conclusion: It is suggested that 16S rRNA high-throughput gene sequencing combined with metabolomics can be further applied to assess pathogenesis of cold coagulation and blood stasis syndrome.

[Key words] cold coagulation and blood stasis syndrome; intestinal flora; feces; metabolomics; 16S rRNA; high-throughput gene sequencing; histidine

寒凝血瘀证是临床常见病证之一,因寒邪凝滞气机,血行瘀阻所致^[1]。越来越多的证据表明肠道菌群的失调和宿主的代谢表型改变在疾病的发生与发展过程中起着至关重要的作用,肠道微生态与机体健康密切相关^[2]。但寒凝血瘀患者肠道菌群的结构和功能是否与健康个体的有所不同尚未见报道。另外,寒凝血瘀状态下,机体的肠道菌群是否会影响宿主的代谢表型也仍未可知。从宿主-肠道菌群-代谢角度,探讨寒凝血瘀证可能的微观机制,这为从肠道菌群角度研究人类健康事业提供了一个新方向。

本课题组首席科学家匡海学教授提出的中药性(气)味科学内涵新假说的内容中包括抑制机体能量代谢、物质代谢的中药具有寒(或凉)性,药性(气)可以通过动物实验以及系统生物学等方法予以评价归属。其中中医证候问题始终处于核心的地位,是连接临床和基础理论的桥梁,也是中医药现代化能够取得突破的关键点。建立与寒凝血瘀证病理相关的动物模型对于今后从“入腹方知性”角度评价中药药性(气)的关键科学问题研究具有十分重要的意义。Illumina MiSeq 是新一代高通量测序技术,为研究肠道菌群结构提供了更大的便利。因此,本课题组欲建立 16S rRNA 的基因测序与代谢组学的联合应用技术,揭示寒凝血瘀证与宿主-肠道菌群-代谢表型的关系。本实验拟利用基于 16S rRNA 的 MiSeq 高通量测序技术找出宿主肠道主要菌群变化,利用粪便上清代谢组学找到寒凝血瘀证的生物标志物,揭示该证候的生物学本质,最后将扰动的肠道菌群与内源性生物标记物进行关联分析,探讨冰水浴诱导的寒凝血瘀证模型大鼠中肠道菌群与代谢表型的相关性,有助于进一步理解寒凝血瘀证的病理机制以及肠道菌群在寒凝血瘀证发生发展过程中的作用。

1 材料

ACQUITY™ UPLC 超高效液相色谱仪和 Synapt™ 型 High Definition MS (HDMS/MS) 系统(美国 Waters 公司,含 MassLynx 4.1 工作站),KDC-160HR 型高速低温离心机(科大创新股份公司),RS232G 型紫外分光光度计(Eppendorf 公司),DYY-

6C 型电泳仪和 2720 型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 ABI 公司),gdsAUTO520 型凝胶成像系统和 32RL117950 型台式紫外分析仪(美国 BG 公司),Pico 17 型离心机(美国 Thermo 公司),FLx800 型多功能酶标仪(美国 BioTek 公司),QuantiFluor™ TBS380 型荧光计(美国 Promega 公司)。

TruSeq Nano DNA LT 样品制备试剂盒(批号 FC-121-4001, FC-121-4002),核酸纯化试剂盒(Agencourt AMPure XP Beads,批号 A63881)和 MiSeq 测序试剂盒(货号 MS-102-3003)均购自 Illumina 公司;甲酸和亮氨酸脑啡肽(美国 Sigma-Aldrich 公司),溴化乙锭(EB,上海生工,货号 EX328-5 mL),强力土壤® DNA 提取试剂盒(美国 MoBio,货号 12888),Q5 超保真 DNA 聚合酶(新英格兰生物有限公司),脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP,10 mmol·L⁻¹,上海派森诺生物科技有限公司),AP-GX-500G DNA 凝胶回收试剂盒(美国 Axygen 公司),文库检测及定量试剂盒、琼脂糖(Invitrogen 公司,批号分别为 P7589,75510-019),高灵敏度 DNA 检测试剂盒(Agilent 公司,批号 5067-4626),水为屈臣氏蒸馏水,乙腈为色谱级,其他试剂均为分析纯。

清洁级 SD 大鼠,雄性 20 只,体重(200 ± 20) g,由辽宁长生生物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(辽)2015-0001。动物饲养于黑龙江中医药大学动物实验中心的代谢笼中,室内温度 20 ~ 25 °C,相对湿度 40% ~ 60%,12 h 避光,12 h 光照,自由饮食。经黑龙江中医药大学实验动物管理和使用委员会审核,符合科技部《关于善待实验动物的指导性意见》和《实验动物使管理和使用委员会章程》的相关规定,实验动物伦理审查批准编号 DWLL20151108001。

2 方法与结果

2.1 动物分组 大鼠随机分为 2 组(空白组和寒凝血瘀模型组),每组 10 只。除空白组外,模型组大鼠置于 0 ~ 1 °C 冰水中 15 min,每日 1 次,连续 15 d,造成寒凝血瘀模型^[3]。

2.2 样本收集与处理 于第 15 天分别收集 24 h 粪便,液氮速冻,立即冻存于 -80 °C 冰箱中,用于代谢组学分析。末次给药 24 h 后,将大鼠麻醉后取

盲肠部位,将其置于无菌离心管中,液氮速冻,立即冻存于-80℃冰箱中,用于肠道菌群多样性分析。

2.3 16S rRNA 微生物多样性分析 选用长度约280 bp的细菌16S rRNA基因的高度可变的V4区用来测序。PCR扩增引物(520F:5'-AYTGGGYD TAAAGNG-3'和802R:5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3')。PCR程序为98℃预变性30 s,98℃变性15 s,50℃退火30 s,循环25~27次,72℃延伸30 s,72℃终延伸5 min,4℃保存。扩增结果进行2%琼脂糖凝胶电泳,切取目的片段,用AP-GX-500G DNA凝胶回收试剂盒回收目的片段。在Illumina MiSeq平台上进行测序,用文库检测及定量试剂盒对PCR产物在酶标仪上进行定量,用TruSeq Nano DNA LT样品制备试剂盒进行建库,用高灵敏度DNA检测试剂盒对文库做2100质检,利用文库检测及定量试剂盒在QuantiFluor™ TBS380型荧光计上对文库进行定量,用MiSeq测序试剂盒(600个循环)进行2×300 bp的双端测序。用Qiime软件和Greengenes数据库(Release 13.8, <http://greengenes.secondgenome.com/>)分析序列,用Uclust(<http://www.drive5.com/usearch>)对高质量序列按97%的序列相似度进行归并和可操作结构分类单元(OTU)划分。用R软件进行可视化统计。

2.4 粪便代谢组学

2.4.1 样品制备 将粪便样本冻干后,取粪便300 mg,加入甲醇2.7 mL,涡旋3 min,超声15 min,离心(转速15 000 r·min⁻¹,时间设置15 min,温度4℃),取上清液置于-80℃冰箱中保存备用。

2.4.2 检测条件 色谱条件为ACQUITY UPLC® BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm),进样量2 μL,流速0.4 mL·min⁻¹,流动相0.05%甲酸乙腈溶液(A)-0.05%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~15 min,2%~100% A;15~17 min,100% A;17~18 min,100%~2% A;18~20 min,2% A),柱温40℃。质谱条件为电喷雾离子源(ESI),采用正、负离子模式检测,锁定质量溶液,采用LockSpray™校正系统进行在线质量校正;亮氨酸脑啡肽准分子离子峰[M+H]⁺556.277 1;[M-H]⁻554.261 5,锁定质量浓度1 μg·L⁻¹,流速20 μL·min⁻¹,扫描方式为全扫描,质量扫描范围m/z 100~1 500,其他参数见表1。

2.4.3 数据处理及多元统计分析 将MS数据导入到Progenesis QI 3.0.3软件进行整合、归一化、峰校准等,得正、负离子模式下每个代谢物的m/z,保

表1 MS条件在不同模式下的设置

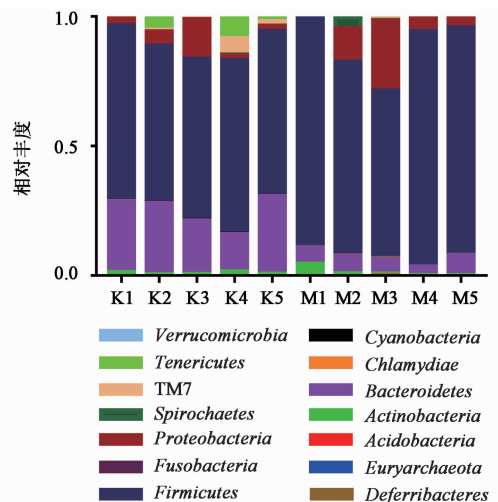
Table 1 MS conditions under different mode

条件	正离子	负离子
毛细管电压/V	1 300	1 500
样品锥孔电压/V	60	70
脱溶剂气温度/℃	350	350
离子源温度/℃	110	110
脱溶剂气流量/L·h ⁻¹	750	750
离子能量/V	35	34

留时间和离子强度^[4];继续导入到Ezinfo 3.0.1软件进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)。PCA用于检测是否每组样本能够显著分开,OPLS-DA用于表征冰水浴诱导的代谢扰动。其结果以S-plot图形式展现贡献度最大的变量。在OPLS-DA模式下,根据变量权重值(VIP),S-plot和P≤0.05选择冰水浴诱导的寒凝血瘀证的潜在生物标志物。

2.5 肠道微生态变化 通过基于16S rRNA基因测序的方法分析盲肠内容物中微生物群组成。共鉴定出14个门,见图1,主要的门有Firmicutes和Bacteroidetes,其中Firmicutes显著上调(P<0.05),Bacteroidetes显著下调(P<0.01),见图2。另外,与空白组相比,模型组中有显著差异的属有23个,见表2,其中8个属显著下调,15个属显著上调。

2.6 粪便代谢分析 在OPLS-DA模式下,空白组与模型组的代谢具有显著差异,表明冰水浴诱导的寒凝血瘀证产生了显著的生化改变,见图3。选择VIP>1(图4)和距S-plot(图5)原点较远的离子作



K. 空白组;M. 模型组(图2,3,6同)

图1 门水平的空白组和模型组肠道菌群的相对丰度

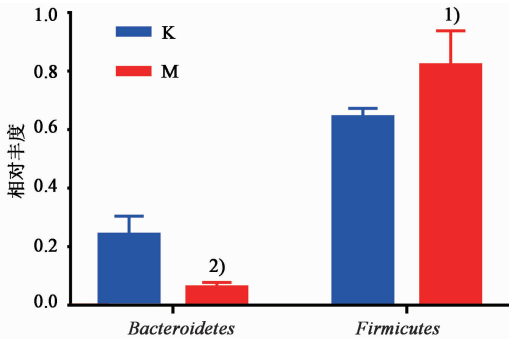
Fig.1 Relative abundance of intestinal flora in blank group and model group at phylum level

表 2 属水平上空白组和模型组肠道菌群的相对丰度

Table 2 Taxa abundances of intestinal flora in blank group and model group at genus level

No.	OTU	M 平均 丰度/%	K 平均 丰度/%	P	Q
C1	<i>Corynebacterium</i>	0.144 7	0.002 1	0.000 5	0.028 0
C2	<i>Rhodococcus</i>	0.045 1	0	0.000 9	0.028 0
C3	<i>Ruminococcus</i>	8.584 5	2.035 5	0.002 5	0.038 2
C4	<i>Prevotella</i>	12.178 2	0.431 8	0.003 0	0.038 2
C5	<i>Enhydrobacter</i>	0.031 2	0	0.003 6	0.038 2
C6	<i>Brevundimonas</i>	0.028 4	0.004 5	0.003 6	0.038 2
C7	<i>Zea</i>	0	0.018 3	0.006 2	0.056 6
C8	<i>Neisseria</i>	0.005 6	0	0.008 3	0.066 2
C9	<i>Burkholderia</i>	0.001 8	0.055 1	0.011 1	0.078 2
C10	<i>Roseburia</i>	2.291 5	0.243 3	0.014 8	0.094 0
C11	<i>Anaerobiospirillum</i>	0.042 8	0.000 9	0.017 4	0.096 0
C12	<i>Dehalobacterium</i>	0.080 6	0.035 5	0.018 2	0.096 0
C13	<i>Acinetobacter</i>	0.061 8	0.009 4	0.023 5	0.096 8
C14	<i>Klebsiella</i>	0.009 4	0	0.023 7	0.096 8
C15	<i>Oscillospira</i>	18.368 9	45.007 8	0.024 4	0.096 8
C16	<i>Ochrobactrum</i>	0.095 6	0.033 0	0.024 4	0.096 8
C17	<i>Flavobacterium</i>	0.012 6	0.001 5	0.034 1	0.119 3
C18	<i>Faecalibacterium</i>	0.075 1	0.007 1	0.038 6	0.119 3
C19	<i>Nesterenkonia</i>	0	0.004 5	0.039 5	0.119 3
C20	<i>Clostridium</i>	0	0.005 7	0.039 5	0.119 3
C21	<i>Vibrio</i>	0	0.005 1	0.039 5	0.119 3
C22	<i>Lactococcus</i>	0.003 5	0.009 0	0.043 5	0.124 5
C23	<i>Bilophila</i>	0.046 9	0.204 4	0.045 1	0.124 5

注: C. 盲肠; K. 空白组; M. 模型组; Q. P 的调整值。



与空白组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)

图 2 空白组和模型组大鼠中 Firmicutes 和 Bacteroidetes 的相对丰度

Fig. 2 Relative abundances of Firmicutes and Bacteroidetes in blank group and model group

为 2 组间显著的差异代谢物, 根据人类代谢组数据库 (HMDB, <http://www.hmdb.ca/>), 生物流体代谢物数据库 (<http://metlin.scripps.edu>) 和 MassBank (<http://www.massbank.jp/>) 等, 鉴定出 7 个化合物作为冰水浴诱导的寒凝血瘀证的潜在生物标志物, 见表 3 和图 6。结果与空白组相比, 除 F4 显著下调外, 其余 6 个化合物均显著上调。

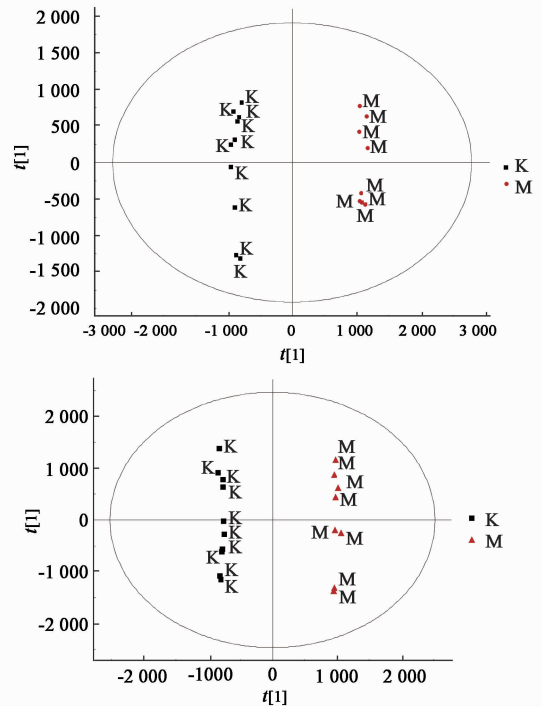


图 3 正、负离子模式下冰水浴诱导的寒凝血瘀证大鼠代谢物的 OPLS-DA

Fig. 3 OPLS-DA score plots of metabolites in cold coagulation and blood stasis syndrome model rats induced by ice-water bath under positive and negative ion mode

2.7 肠道微生物与粪便代谢相关分析 基于 Pearson 相关系数研究肠道微生物与粪便中扰动的代谢物之间的关系。 $r > 0.5$ 或 $r < -0.5$, $P < 0.05$, 确定为两者之间有显著相关性, 当 $|r| > 0.8$, 认为肠道微生物与粪便代谢物具有强相关性, 见图 7。 α -酮异戊酸与 *Bilophila* (C23) 呈显著的负相关。尿刊酸与 *Rhodococcus* (C2), *Ruminococcus* (C3), *Anaerobiospirillum* (C11) 呈显著正相关, 而与 *Oscillospira* (C15) 呈显著负相关。甘氨酸与 *Ochrobactrum* (C16) 呈显著负相关。二十二碳五烯酸与 *Neisseria* (C8) 呈显著负相关; 4-羟基肉桂酸 (F5) 与 *Klebsiella* (C14), *Lactococcus* (C22) 呈显著负相关; 海藻糖与 *Acinetobacter* (C13), *Klebsiella* (C14), *Lactococcus* (C22) 呈显著的负相关; D-核糖与 *Dehalobacterium* (C12), *Acinetobacter* (C13) 和 *Klebsiella* (C14) 呈显著负相关。因此, 由冰水浴诱导的寒凝血瘀证改变了正常大鼠盲肠肠道微生物的结构和组成, 同时也扰动了相应的粪便代谢物。

2.8 关键代谢通路分析 通过 MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 筛选已鉴定出的 7 个代谢物参与的代谢通路, 相关性最强的通路 (通

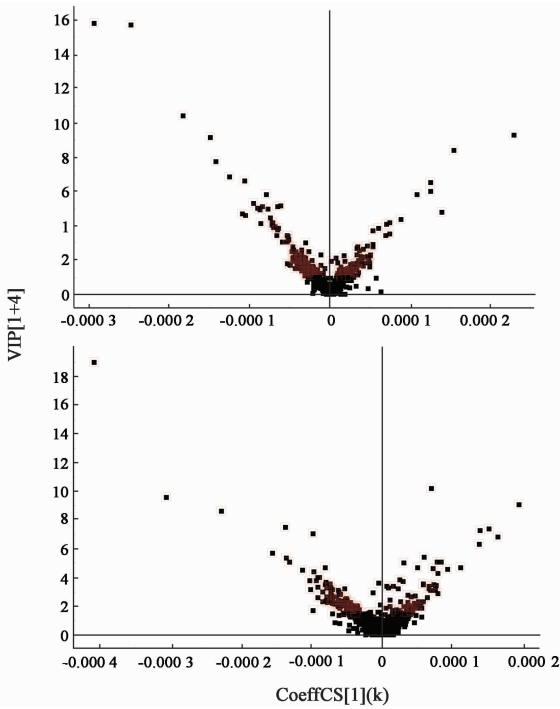


图 4 正、负离子模式下冰水浴诱导的寒凝血瘀证大鼠代谢物的 VIP
Fig. 4 VIP score plots of metabolites in cold coagulation and blood stasis syndrome model rats induced by ice-water bath under positive and negative ion mode

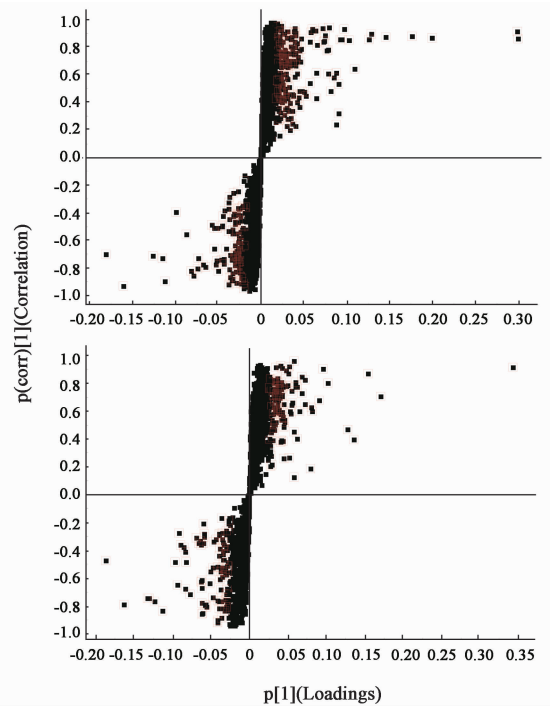


图 5 正、负离子模式下冰水浴诱导的寒凝血瘀证大鼠代谢物的 S-plot
Fig. 5 S-score plots of metabolites in cold coagulation and blood stasis syndrome model rats induced by ice-water bath under positive and negative ion mode

表 3 粪便中潜在生物标志物及其变化趋势

Table 3 Potential biomarkers and their trends in feces

标志物	t_R /min	m/z	离子模式	分子式	代谢物	VIP	M/K	通路
F1	11.53	183.0119	正	$C_6H_6N_2O_2$	尿刊酸	2.8159	↑ ²⁾	组氨酸代谢
F2	7.41	448.3079	正	$C_{26}H_{43}NO_6$	甘氨胆酸	2.2582	↑ ²⁾	初级胆汁酸生物合成
F3	5.8	271.0624	正	$C_5H_8O_3$	α -酮异戊酸	1.1726	↑ ²⁾	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成, 泛酸和辅酶 A 生物合成
F4	10.67	365.2316	负	$C_{22}H_{34}O_2$	二十二碳五烯酸	1.1036	↓ ¹⁾	不饱和脂肪酸生物合成
F5	0.63	387.1149	负	$C_9H_8O_3$	4-羟基肉桂酸	2.0461	↑ ²⁾	泛醌等萘醌生物合成, 苯丙氨酸代谢
F6	0.7	377.0867	负	$C_{12}H_{22}O_{11}$	海藻糖	2.5414	↑ ²⁾	淀粉和蔗糖代谢
F7	0.7	185.0229	负	$C_5H_{10}O_5$	D-核糖	1.1911	↑ ²⁾	戊糖磷酸途径

注: M/K. 模型组与空白组相比; ↑. 上调; ↓. 下调; ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

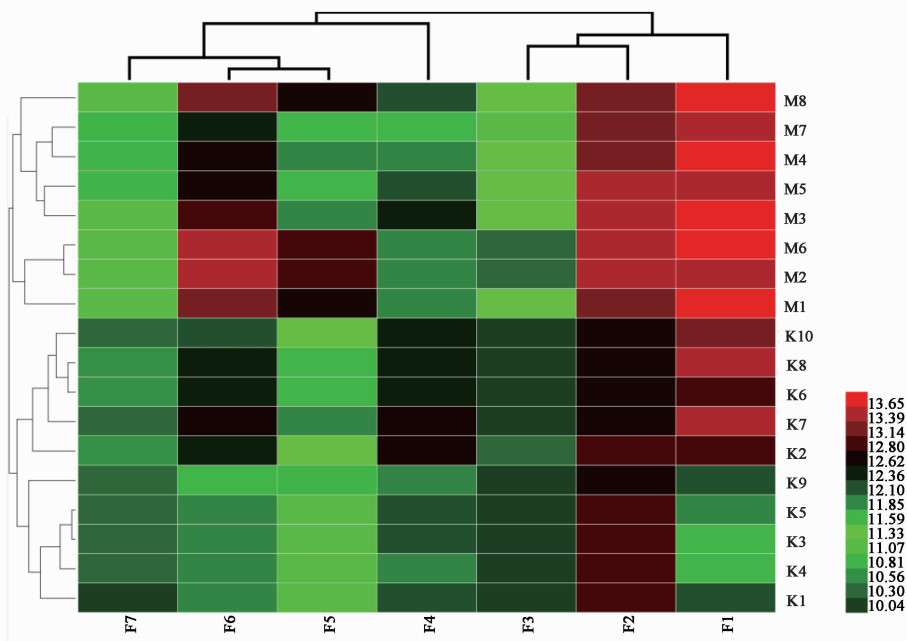
路影响值 > 0.05) 有缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成, 泛酸和辅酶 A 生物合成, 组氨酸代谢, 见图 8。结果表明寒凝血瘀证发生发展过程中缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成, 泛酸和辅酶 A 生物合成, 组氨酸代谢呈现高度活跃状态。

3 讨论

在门和属的水平上, 肠道微生物的菌群结构发生了显著的变化, 大鼠的粪便代谢轮廓也相应改变。改变的肠道微生物与粪便代谢物有显著的相关性, 表明寒凝血瘀证不仅改变肠道微生物结构, 而且改变大鼠代谢表型, 最终导致大鼠代谢紊乱。这为从调节肠道菌群角度治疗寒凝血瘀证提供了新方向。

在本研究中, 与空白组大鼠相比, 寒凝血瘀证模

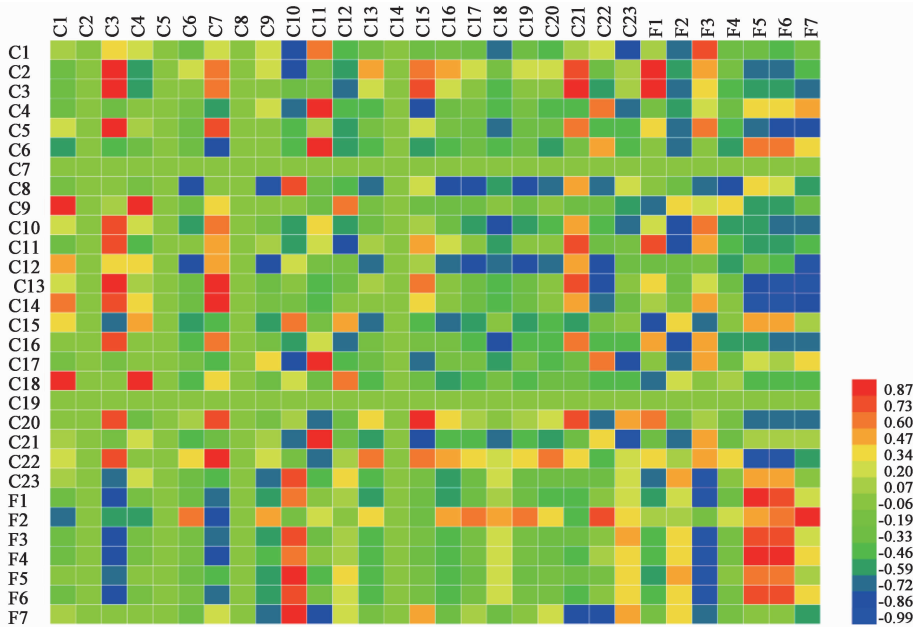
型组大鼠中 *Firmicutes* 显著上调, *Bacteroidetes* 显著下调, 显著差异的属有 23 个, 然而尚未有报道证明这些属与人类或动物的寒凝血瘀证模型相关, 需要进一步探讨这些菌群在寒凝血瘀证发生发展中的作用。寒凝血瘀证大鼠的粪便代谢表型与空白组的显著不同, 共鉴定出 7 个粪便代谢物, 可作为寒凝血瘀证的生物标志物。用 Pearson 相关系数法研究微生物属与粪便代谢物的相关性, 发现参与缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成, 泛酸和辅酶 A 生物合成的 α -酮异戊酸显著上调, 与 *Bilophila* (C23) 呈负相关。参与组氨酸代谢中显著上调的尿刊酸与 *Rhodococcus* (C2), *Ruminococcus* (C3) 和 *Anaerobiospirillum* (C11) 呈正相关, 而与 *Oscillospira*



F1 ~ F7. 粪便中差异代谢物

图 6 粪便样本中显著变化的代谢物的热分析

Fig. 6 Heatmaps of significantly changed metabolites in feces



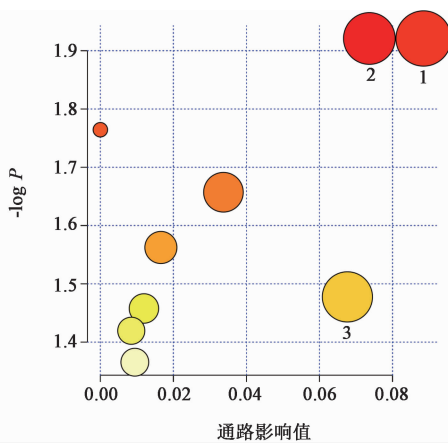
纵轴 C1 ~ C23. 空白组中显著差异的属; F1 ~ F7. 空白组粪便中差异代谢物; 横轴 C1 ~ C23. 模型组中显著差异的属; F1 ~ F7. 模型组粪便中差异代谢物

图 7 空白组和模型组中差异的属与扰动的粪便代谢物相关性的热分析

Fig. 7 Heatmaps of correlation between specific gut bacteria and perturbative fecal metabolites in blank group and model group

(C15)呈负相关,表明寒凝血瘀证发病过程中缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成,泛酸和辅酶 A 生物合成,组氨酸代谢异常,可能与 *Bilophila*, *Rhodococcus*, *Ruminococcus*, *Anaerobiospirillum* 和 *Oscillospira* 功能有关。

α -酮异戊酸既参与缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成途径,又参与泛酸和辅酶 A 生物合成途径^[5]。 α -酮异戊酸是一种支链有机酸,其是亮氨酸和缬氨酸合成的前体,也是缬氨酸的降解产物,亮氨酸与缬氨酸一起控制机体血糖,并给机体组织提供



1. 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成; 2. 泛酸和辅酶 A 生物合成; 3. 组氨酸代谢

图 8 寒凝血瘀证大鼠的 MetPA 通路分析
Fig. 8 MetPA pathway analysis of rats with cold coagulation and blood stasis syndrome

能量^[6]。泛酸是辅酶 A 的重要前体物质,参与生物体内碳水化合物、脂肪酸、蛋白质和能量代谢,机体中 α -酮异戊酸和 L-天冬氨酸经过四步酶促反应生成泛酸^[7]。饮食中约 85% 的泛酸用于构成辅酶 A 或磷酸戊酸;在肠腔中,他们水解成磷酸泛酸盐,终产物为泛酸碱;肠黏膜细胞具有高的泛酰胺磷酸酶活性,迅速水解泛解酸,产生游离的泛酸^[8]。在本研究中,模型组粪便中大量排泄 α -酮异戊酸, *Bilophila* 低表达,机体内 α -酮异戊酸水平减少,说明缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成及泛酸和辅酶 A 生物合成参与了冰水浴诱导的寒凝血瘀证大鼠微生物生态紊乱,提示冰水浴抑制了大鼠代谢。

组氨酸是机体一种非必需氨基酸,组氨酸的生物合成发生在肠道菌群中^[9]。尿刊酸是 L-组氨酸在组氨酸氨基裂解酶的作用下的分解(脱氨基)产物^[10]。尿刊酸^[11]在尿刊酸水合酶的作用下生成 4-咪唑啉酮-5-丙酸,最终生成谷氨酸,而谷氨酸进入三羧酸循环,沿谷氨酸的代谢途径可转变为糖,组氨酸是生糖氨基酸。本文模型组大鼠粪便中大量排泄尿刊酸, *Rhodococcus*, *Ruminococcus* 和 *Anaerobiospirillum* 高表达,而 *Oscillospira* 低表达,肠道中组氨酸水平减少,说明组氨酸代谢和糖代谢参与了寒凝血瘀证大鼠的肠道菌群失调。提示冰水浴抑制了正常大鼠的组氨酸代谢和糖代谢。

16S rRNA 基因测序技术和基于 UPLC-TOF-MS 的粪便代谢组学的联合可用于研究冰水浴诱导的寒凝血瘀证在肠道菌群和粪便代谢表型中的影响。冰水浴诱导的寒凝血瘀证不仅扰动肠道菌群的丰度水

平,还可改变宿主的代谢表型,最终导致宿主代谢稳态的失衡。与肠道菌群相关的代谢物可以作为寒凝血瘀证的潜在生物标志物,同时这些代谢物可作为寒凝血瘀证诊断、预防和治疗的工具。

[参考文献]

[1] 韩耀巍,王学岭. 寒凝血瘀证实验及临床研究近况[J]. 天津中医药大学学报,2009,28(3):167-168.
[2] Lee W J, Hase K. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease[J]. Nat Chem Biol,2014,10(6):416-424.
[3] 谢波,邓海山,喻斌,等. 寒凝血瘀证大鼠模型的优化筛选研究[J]. 南京中医药大学学报,2013,29(3):262-265.
[4] Paglia G, Astarita G. Metabolomics and lipidomics using traveling-wave ion mobility mass spectrometry[J]. Nat Protoc,2017,12(4):797-813.
[5] SONG Y, LI J, Shin H D, et al. Biotechnological production of alpha-keto acids: current status and perspectives [J]. Bioresour Technol, 2016, 219: 716-724.
[6] Churchward-Venne T A, Breen L, Di Donato D M, et al. Leucine supplementation of a low-protein mixed macronutrient beverage enhances myofibrillar protein synthesis in young men: a double-blind, randomized trial [J]. Am J Clin Nutr,2014,99(2):276-286.
[7] Subramanian C, YUN M K, YAO J, et al. Allosteric regulation of mammalian pantothenate kinase[J]. J Biol Chem,2016,291(42):22302-22314.
[8] LI L, FENG L, JIANG W D, et al. Dietary pantothenic acid deficiency and excess depress the growth, intestinal mucosal immune and physical functions by regulating NF- κ B, TOR, Nrf2 and MLCK signaling pathways in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Fish Shellfish Immunol,2015,45(2):399-413.
[9] DU S, SUN S, LIU L, et al. Effects of histidine supplementation on global serum and urine ¹H-NMR-based metabolomics and serum amino acid profiles in obese women from a randomized controlled study[J]. J Proteome Res,2017,16(6):2221-2230.
[10] WANG C, Yamniuk A, DAI J, et al. Investigation of a degradant in a biologics formulation buffer containing L-histidine[J]. Pharm Res,2015,32(8):2625-2635.
[11] Bruhs A, Eckhart L, Tschachler E, et al. Urocanic acid: an endogenous regulator of Langerhans cells[J]. J Invest Dermatol,2016,136(8):1735-1737.

[责任编辑 刘德文]