

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.07.003

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.07.003

抗生素相关性腹泻的代谢组学

李东东, 霍巧玲, 刘宝清

(北京中医药大学东方医院普外科, 北京 100078)

[摘要] 目的: 从代谢水平上探究抗生素相关性腹泻(antibiotic associated diarrhea, AAD)。方法: 将SD大鼠分为空白对照组、AAD组进行造模, 观察一般情况变化并运用超高液相色谱-四极杆飞行时间质谱检测大鼠血清; 一般统计数据用SPSS 20.0分析, 代谢组学数据采用Markerlynx软件分析。结果: 造模第10天, 与空白对照组相比, AAD组鉴定出22个生物学标志物, 其中与AAD相关的代谢通路中影响因子较高的通路是缬氨酸, 亮氨酸和异亮氨酸降解。结论: 从代谢组学上认为AAD与氨基酸代谢密切相关。

[关键词] 代谢组学; 抗生素相关性腹泻; 支链氨基酸降解

Metabonomics on antibiotic associated diarrhea

LI Dongdong, HUO Qiaoling, LIU Baoqing

(Department of General Surgery, Dongfang Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

Abstract **Objective:** To explore the antibiotic associated diarrhea (AAD) from metabolic level. **Methods:** SD rats were divided into a blank control group and an AAD group to establish models, observe the general changes and detect rat serum by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry; general statistical data were analyzed by SPSS 20.0, and metabolomics data were analyzed by Markerlynx software. **Results:** On the 10th day of modeling, compared to the blank control group, twenty-two identical endogenous biomarkers were screened out in the AAD group. Among the metabolic pathways related to AAD, the ones with higher influencing factors are: valine, leucine and isoleucine degradation. **Conclusion:** Metabolomics suggests that AAD is closely related to amino acid metabolism.

Keywords metabonomics; antibiotic associated diarrhea; BCAAS degradation

抗生素相关性腹泻(antibiotic associated diarrhea, AAD)是指应用抗生素后发生的、与抗生素有关的腹泻, 即伴随抗生素的使用而发生的无法用其他原因解释的腹泻。几乎所有抗生素导致ADD, 其中广谱青霉素类、头孢菌素类及克林霉素等引起的腹泻发生率较高。目前尚无统一的AAD诊断标准。如果在近期或正在接受抗生素治

疗以及治疗后2个月内发生的腹泻, 每天 ≥ 3 次, 连续2 d以上, 均应考虑AAD的可能^[1]。本研究基于代谢组学的研究方法, 构建运用克林霉素致AAD模型, 运用超高液相色谱-四级杆飞行时间质谱(ultra high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF)检测SD大鼠的血清, 筛选出内源性标志

收稿日期 (Date of reception): 2019-01-08

通信作者 (Corresponding author): 刘宝清, Email: Liubaoqing315@sina.com

物, 进而确定可能相关的代谢通路, 为AAD的诊断与治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠20只, 体重(150±10) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司。大鼠在北京中医药大学东方医院实验动物中心饲养。室温21~23 °C, 相对湿度40%~50%, 自由饮水进食, 适应性饲养1周。

1.2 试剂与仪器

乙腈(质谱级)、甲酸(质谱级)购自美国Fisher公司; 蒸馏水购自屈臣氏。UPLC-Q-TOF仪(SYNAPT G2 UPLC-Q-TOF)购自美国Waters公司; VOR-TEX-5涡旋混合器购自江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司; MIKRO22R台式高速冷冻离心机购自德国Lab-Way Science公司。实验用药: 盐酸克林霉素(CAS321462-39-5, UPS级, 83%, 800 µg/mg)。

1.3 分组、模型建立及给药方法

20只SD大鼠随机分为空白对照组、AAD组, 每组10只。

按文献[2]的方法造模: 空白对照组予生理盐水2 mL灌胃; AAD组予克林霉素(剂量250 mg/kg, 浓度25 mg/mL, 用生理盐水配制)2 mL灌胃; 1次/d, 连续给药10 d。

1.4 一般情况及腹泻指标观察

造模前以及造模期每天称量1次体重及2 h粪便总重, 观察摄食量、饮水量、大便形态并观察动物的毛发变化、尾部肛口干净程度等。

1.5 UPLC-Q-TOF 检测分析

1.5.1 标本采集及样品处理

在大鼠造模成功之后, 采集血液样品。腹腔注射10%水合氯醛麻醉, 大鼠腹主动脉取血5 mL, 在室温下静置2 h。血样在4 °C下以3 000 r/min离心15 min, 分离得到上层血清。将分离的血清放置于-80 °C的低温冰箱冻藏, 用于代谢组学分析。

1.5.2 样品制备

分析前, 将冻存的血清于37 °C复融2 min, 各取200 µL血清于EP管, 加入600 µL乙腈, 涡旋10 min。4 °C下12 000 r/min离心10 min去除蛋白。吸取上清液700 µL于新的EP管, 氮气吹干, 样品

保存于-20 °C冰箱冷藏, 待检测。各血清样品分别抽取40 µL混匀通过上述制备方法得到质量控制样品。氮气吹干的样品, 分别加入10%乙腈200 µL于EP管复溶, 4 °C下12 000 r/min离心10 min, 取上清液150 µL于进样小管, 等待进样。

1.5.3 数据采集及样品分析

色谱分离采用Waters公司C18色谱柱(ACQUITY UPLC®HSS C18 1.8µm, 100 mm×2.1 mm, Column.Part NO.186003533, Serial No.013033219157)。色谱分离条件为柱温40 °C, 流速0.4 mL/min; 流动相A: 水+0.1%甲酸; 流动相B: 乙腈加0.1%甲酸; 梯度洗脱程序见表1。进样量为4 µL, 自动进样器温度10 °C。

质谱采用正负离子模式检测, 以氮气作为雾化、锥孔气; 飞行管检测模式V型。其中正离子模式条件为毛细管电压2.7 kV、锥孔电压40 kV、离子源温度120 °C; 脱溶剂气温度500 °C、反向锥孔气流50 L/h、脱溶剂气800 L/h; 负离子模式检测条件: 毛细管压2.1 kV、锥孔电压15 kV、离子源温度120 °C; 脱溶剂气温度500 °C、反向锥孔气流50 L/h、脱溶剂气流速800 L/h。离子扫描时间0.02 s。数据采集范围: 100~1 000 m/z。为确保质量的准确性和重复性, 应用亮氨酸-脑啡肽作为锁定质量, 正离子模式离子556.2771 Da。负离子模式离子554.2615 Da。

1.6 数据处理

对数据应用markerlynx软件分析统计。采用主成分分析(principal component analysis, PCA); 为强化组间差异, 采用正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least square discriminant analysis, OPLS-DA)。采用正交信号校正(Orthogonal Signal Calibration, OSC)滤噪, 排除非组间差别因素。以得分图(Scores plot)和载荷图(Loadings plot)的形式输出分析结果。参数R2X和R2Y作为模型质量评价指标。Q2(cum)为交叉验证结果评价模型的预测能力。置换检验(Permutation test, $n=20$)验证模型。在OPLS-DA模型中选取VIP(variable importance in the projection)>1作为潜在标志物, 并运用SPSS 20.0 软件进行分析, 将 $P<0.05$ (ANOVA and t -test)和fold change value >2认为差异有统计学意义。

1.7 生物标志物识别与代谢通路确定

差异性代谢物地识别方法: 根据精确分子量搜索METLIN(<http://metlin.scripps.edu/>)和HMDB(<http://www.hmdb.ca>)在线数据库(20 ppm

认为可接受的质量误差)。潜在生物标志物代谢通路的确定通过运用MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>)进行分析。

1.8 统计学处理

对2组实验大鼠的一般情况、腹泻指标进行

统计分析, 样本满足正态分布则采用独立 t 检验, 不满足正态分布的采用非参数检验。对于各组体重、粪便重量进行组间和组内比较。采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 流动相梯度洗脱程序表

Table 1 Gradient elution procedure of mobile phase

时间/min	流量/(mL·min ⁻¹)	流动相A/%	流动相B/%
0	0.4	90	10
1.5	0.4	80	20
4	0.4	60	40
14	0.4	10	90
17	0.4	90	10

2 结果

2.1 大鼠一般情况、体重、粪便比较

与空白对照组大鼠相比, AAD组大鼠大便次数增多、大便稀薄, 毛失去光泽, 活动减少, 肛周有污物, 便涂片示球/杆比异常。ADD组造模均成功。

从进动物房和适应性饲养1周后造模第1天大鼠体重差异无统计学意义($P > 0.05$, 表2), 基线水平齐。造模第5天, 两组大鼠间差异无统计学意义($P > 0.05$); 造模第10天, 两组大鼠体重差异有统计

学意义($P = 0.021$)。2 h粪便总重变化情况见表3。

造模第1天, 2 h粪便总重组间差异无统计学意义($P > 0.05$, 表3)。造模第5天两组差异有统计学意义($P = 0.012$); 造模第10天两组差异有统计学意义($P = 0.031$)。

2.2 3组大鼠血清 UPLC-Q-TOF 质谱图

各组大鼠血清代谢谱UPLC-Q-TOF典型的总离子流质谱图(图1)中可以看出, 组间部分色谱峰峰高及峰面积有一定的差异, 说明某些物质的含量发生了相对变化。

表2 体重变化($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Change of weight ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	体重/g			
	进动物房	第1天	第5天	第10天
空白对照组	155.67 ± 3.12	201.68 ± 7.71	237.7 ± 11.46	247.4 ± 29.98
ADD组	156.49 ± 3.42	200.73 ± 6.12	231.0 ± 11.65	240.1 ± 16.43*

与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

Compared with the control group, * $P < 0.05$.

表3 2 h粪便总重($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Total fecal weight in 2 hours ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	体重/g		
	第1天	第5天	第10天
对照组	0.61 ± 0.43	1.20 ± 0.38	0.63 ± 0.68
ADD组	0.85 ± 0.43	2.99 ± 1.25*	3.35 ± 1.38*

与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

Compared with the control group, * $P < 0.05$.

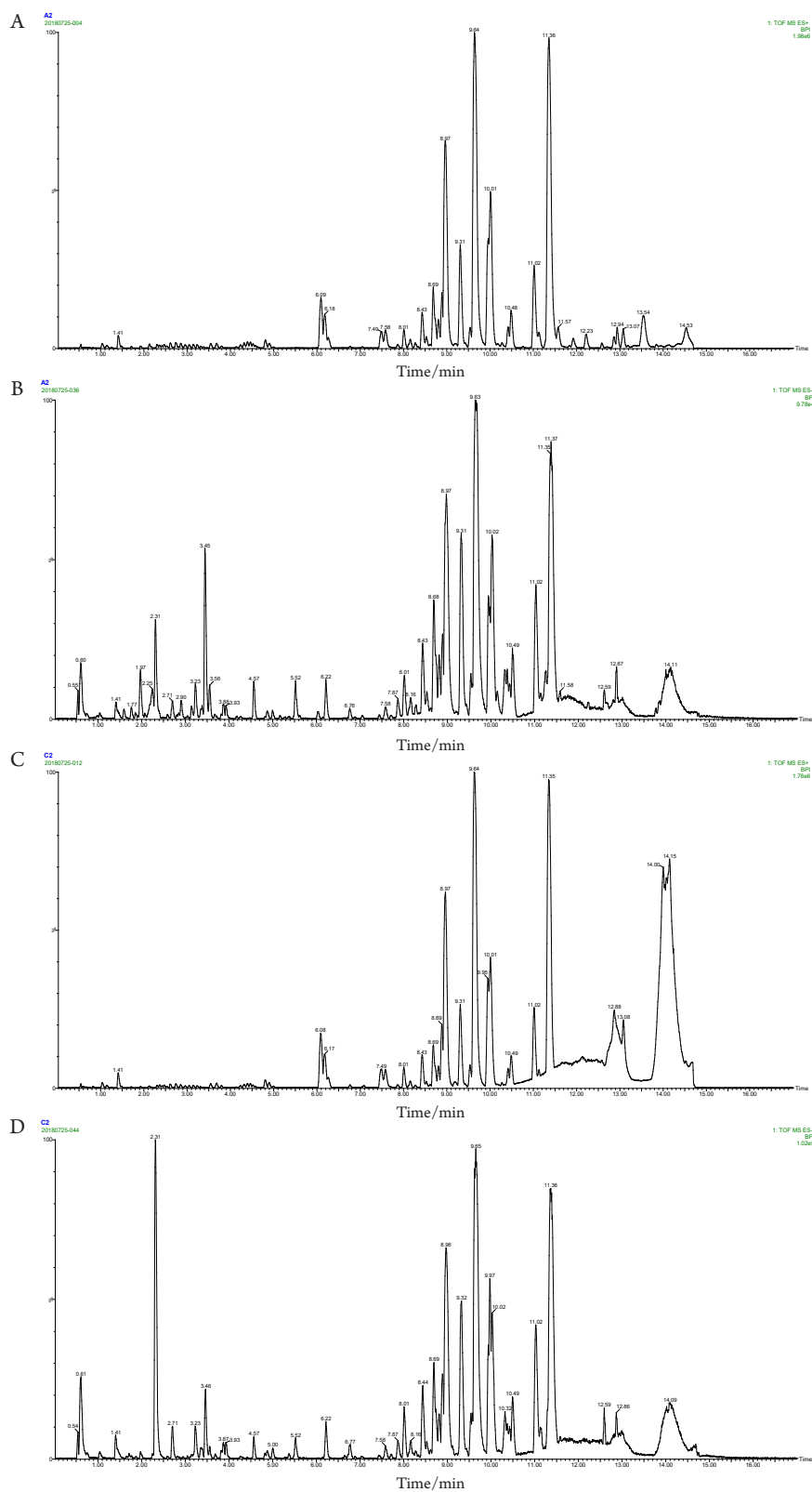


图1 大鼠血清UPLC-Q-TOF质谱图

Figure 1 Uplc-q-tof mass spectrometry of rat serum

(A)正常对照组正离子模式下TIC; (B)正常对照组负离子模式下TIC; (C)AAD组正离子模式下TIC; (D)AAD组负离子模式下TIC。

(A) Positive ion mode TIC in the normal control group; (B) TIC in the negative ion mode of the normal control group; (C) TIC in positive ion mode of AAD group; (D) TIC in negative ion mode of AAD group.

2.3 各组多元数据分析结果

大鼠血清的OPLS-DA得分图(图2, 3)显示: 正常对照组与AAD组大鼠的血清样本可以明显区分开来, 正离子模式下得到3个主成分, $R^2X=0.3346$, $R^2Y=0.9788$, $Q^2=0.8173$; 负离子模式下得到3个主成分, $R^2X=0.4112$, $R^2Y=0.9768$, $Q^2=0.8196$ 。从OPLS-DA得分图中可以看出正常组、AAD组聚类明显, 说明模型组样本有明显差异。进一步观察OPLS-DA分析的载荷图(图4), 在组间差异方向上, 距离中心越远的点对差异的贡献度越大, 选择这些点作为潜在生物标志物。

2.4 差异性代谢物的探索性寻找

本实验研究采用OPLS-DA模型第一主成分

VIP(Variable Importance in the Projection)的值(阈值 >1), 与Students's t 检验(t -test)的 P 值($P<0.05$)和 >2 -fold change相结合的方法, 来寻找差异性表达代谢物。差异性代谢物的定性方法为: 根据精确分子量搜索METLIN(<http://metlin.scripps.edu/>)和HMDB(<http://www.hmdb.ca>)数据库, 将搜索质量阈值设定为25 ppm, AAD组鉴定出了22个生物学标志物(表4, 5)。

2.5 代谢通路的确定

将潜在生物学标志物输入MetaboAnalyst 3.0进行分析, 初步确定了(表5)与AAD相关的代谢通路中影响因子(图5), 较高的通路是缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解。

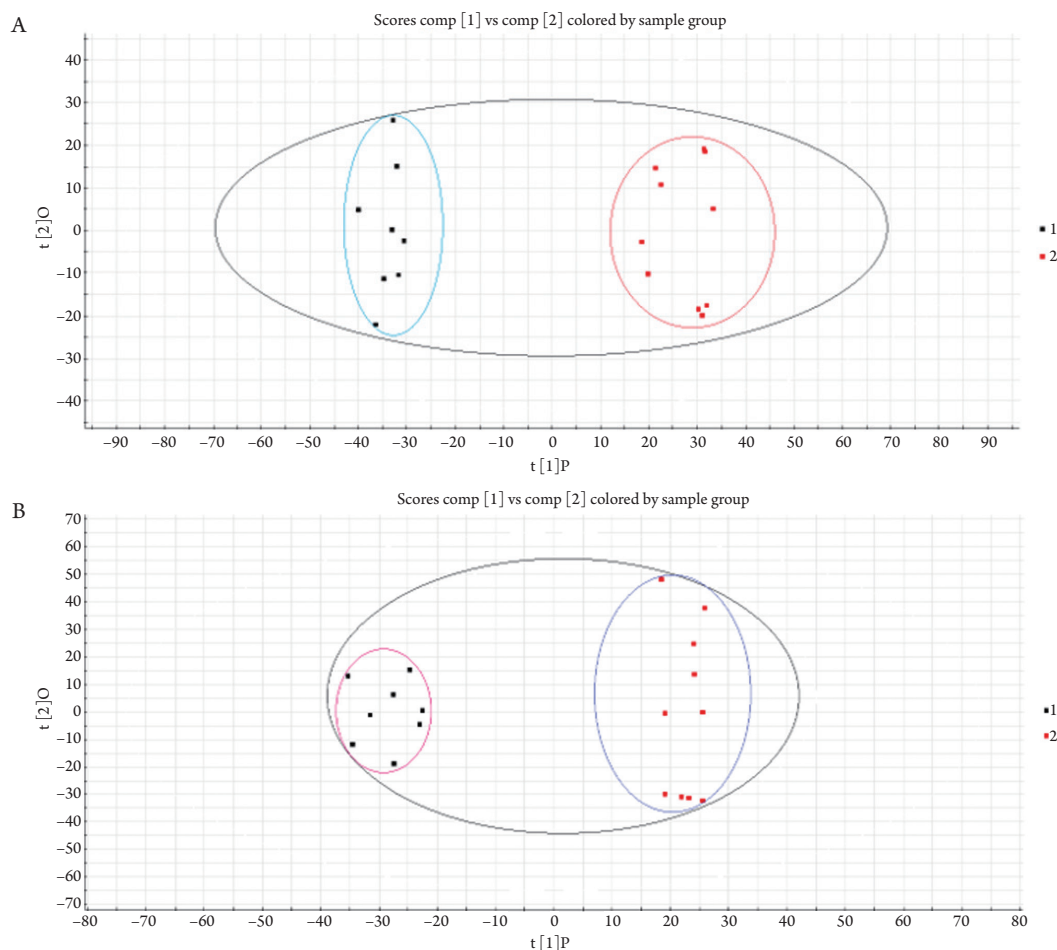


图2 OPLS-DA分析得分二维图

Figure 2 Two-dimensional diagram of OPLS-DA analysis

(A)正离子模式; (B)负离子模式。

(A) Positive ion mode; (B) Negative ion mode.

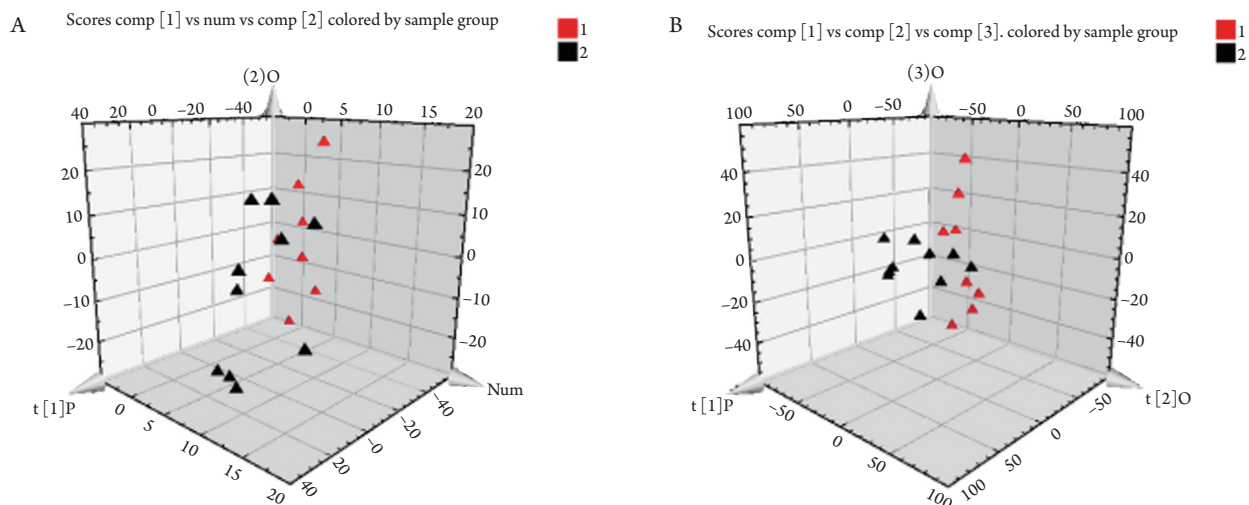


图3 OPLS-DA分析得分三维图

Figure 3 Three-dimensional diagram of OPLS-DA analysis

(A) 正离子模式; (B) 负离子模式。

(A) Positive ion mode; (B) Negative ion mode.

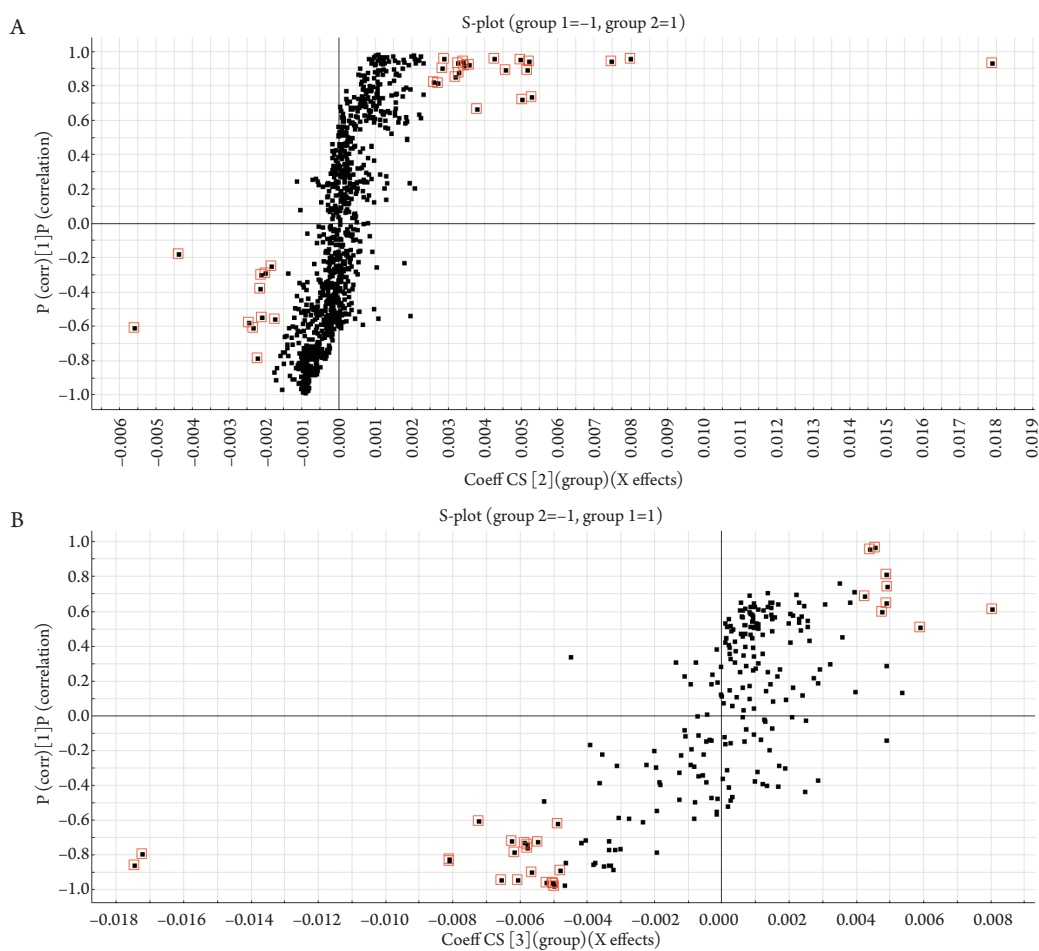


图4 OPLS-DA分析的载荷图

Figure 4 Load diagram under OPLS-DA analysis

(A) 正离子模式; (B) 负离子模式。

(A) Positive ion mode; (B) Negative ion mode.

表4 正常对照组与AAD组血清差异性代谢物分析结果

Table 4 Analysis results of serum metabolites of normal control group and AAD group

序号	组分名称	分子式	ESI模式	保留时间/s	M/z	与正常组比 变化趋势
1	Hexanoylglycine	C ₃ H ₉ O ₆ S	ESI-	1.7643	173.0102	↓
2	Cysteine-S-sulfate	C ₆ H ₉ N ₄ O ₂ S	ESI-	3.456	201.0444	↓
3	O-Phosphohomoserine	C ₆ H ₇ N ₄ O ₂ S	ESI-	3.1723	199.0282	↓
4	Glutaryl-glycine	C ₃ H ₉ O ₇ S	ESI-	1.5975	189.0066	↓
5	3-Hydroxysebacic acid	C ₇ H ₁₆ N ₅ O ₃	ESI-	1.0663	218.1267	↑
6	L-Cysteinylglycine disulfide	C ₁₁ H ₁₇ N ₆ O ₄	ESI-	3.3782	297.1308	↓
7	3b,17b-Dihydroxyetiocholane	C ₉ H ₂₂ N ₇ O ₄	ESI-	0.9192	292.1713	↑
8	Dodecanoylcarnitine	C ₁₇ H ₂₇ O ₇	ESI-	3.2289	343.1765	↓
9	5b-Cholestane-3a,7a,12a,23S,25-pentol	C ₂₄ H ₃₈ N ₉	ESI-	9.242	452.3259	↓
10	2-Methyl-1-hydroxypropyl-ThPP	C ₁₃ H ₁₃ N ₂₀ OS	ESI-	2.3127	497.1285	↓
11	VPGPR Enterostatin	C ₂₉ H ₄₆ N ₇ O ₂	ESI-	11.3551	524.3719	↑
12	DG(14:0/14:0/0:0)	C ₂₀ H ₄₂ N ₁₃ O ₃	ESI-	7.7099	512.3539	↓
13	E,e-Carotene-3,3'-dione	C ₃₃ H ₅₀ N ₅ O ₃	ESI-	8.9706	564.391	↓
14	D-Urobilin	C ₃₄ H ₆₄ N ₉ OS	ESI-	8.7188	588.3935	↓
15	DG(16:1(9Z)/22:2(13Z,16Z)/0:0)	C ₅₁ H ₈₄ N ₃ O ₄	ESI-	14.1474	646.4939	↓
16	Erucic acid	C ₂₂ H ₄₄ NO	ESI+	13.5401	338.3412	↓
17	Hexadecanedioic acid mono-L-carnitine ester	C ₂₉ H ₄₉ O ₂	ESI+	14.707	429.3723	↑
18	PG(16:1(9Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	C ₅₁ H ₇₈ NO ₄	ESI+	13.7593	768.5911	↑
19	PG(16:0/20:3(5Z,8Z,11Z))	C ₃₅ H ₇₄ N ₁₃ O ₆	ESI+	13.8349	772.5877	↑
20	PG(16:0/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z))	C ₃₇ H ₈₂ N ₉ O ₅ S ₂	ESI+	14.4593	796.5898	↑
21	PI(16:0/16:0)	C ₄₁ H ₈₄ N ₃ O ₁₂	ESI+	12.4036	810.6035	↑
22	PI(16:0/18:2(9Z,12Z))	C ₄₃ H ₈₄ N ₃ O ₁₂	ESI+	14.0183	834.6043	↑

表5 AAD相关的代谢通路

Table 5 AAD related metabolic pathways

通路	总化合物数	预期	Hits	Raw P	-log(p) Holm adjust	阳性发现 错误率	影响值
缬氨酸, 亮氨酸和异亮 氨酸降解	38	0.19	1	1.75E-01	1.74E+00, 1.00E+00	1.00E+00	0.03
不饱和脂肪酸的生物	42	0.21	1	1.92E-01	1.65E+00, 1.00E+00	1.00E+00	0.00

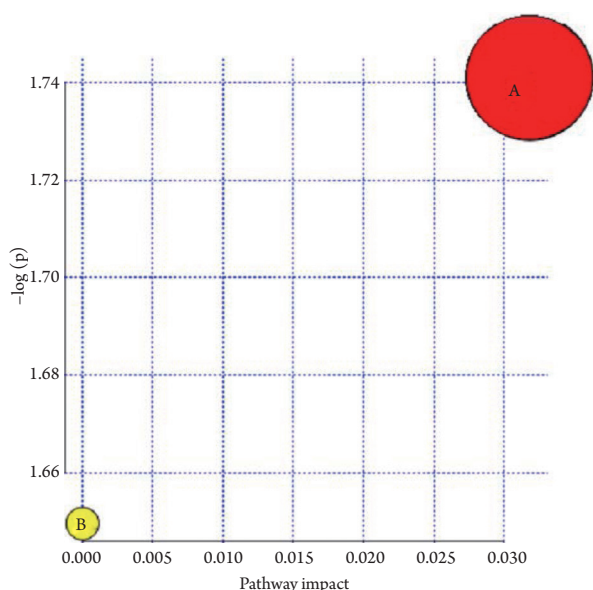


图5 缬氨酸, 亮氨酸和异亮氨酸降解(A)和不饱和脂肪酸的生物合成(B)代谢通路影响因子

Figure 5 Influence factors of valine, leucine and isoleucine degradation (A) and biosynthesis of unsaturated fatty acids (B)

3 讨论

代谢组学是利用现代分析技术定量测定生物体液中的内源性代谢产物, 通过对代谢物图谱的整体分析获得相应的生物学标志物群^[3]。代谢组学分析研究的是终末代谢产物, 所以它能够准确地反映出机体整体的代谢水平, 进而反映出疾病的病理状态, 为疾病的诊断及治疗提供新的思路。从AAD组与正常对照组筛选出的22个不同的生物学标志物, 涉及氨基酸代谢的有乙酰甘氨酸、半胱氨酸-s-硫酸盐、O-磷酸高丝氨酸、戊二酰甘氨酸等, 涉及脂肪酸代谢的有3b,17b-二羟基本胆烷、十二烷酰肉碱、VPGPR肠抑素、芥子酸等。从而确立了可能相关的代谢通路, 主要代谢通路为缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解, 次要代谢通路为不饱和脂肪酸的生物合成。

氨基酸和蛋白质作为饮食的重要组成部分到达肠道, 相当一部分到达结肠, 遇到细菌群落, 这些细菌利用氨基酸和蛋白质进行代谢过程^[3]。与空白对照组相比, 甘氨酸、丝氨酸以及氨基酸代谢产物的浓度降低, 表明这些氨基酸的生物利用度下降, 而在肠道内积累^[4]。亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸是重要的支链氨基酸(branched chain amino acid, BCAAs), 也是生糖氨基酸。缬氨酸和亮氨酸一起可以调节血清葡萄糖水平, 为机体活动提

供能量^[5]。ADD大鼠中这些代谢产物被降解, 提示机体糖异生途径被抑制, 糖代谢受影响, 故可见较正常对照组, ADD组大鼠体重减轻。BCAAs在降低中枢疲劳方面发挥重要作用。血浆中BCAAs浓度越高, 大脑对色氨酸的吸收越少, 5-HT合成越少, 从而延缓疲劳^[6], 故ADD组大鼠较对照组大鼠活动度减低。在其他消化系统疾病如胰腺癌、肝癌等中发现亮氨酸和异亮氨酸代谢异常^[7]。

左旋肉碱是一种参与脂肪代谢过程中必需的辅酶, 可促进脂肪酸进入线粒体氧化分解, 促进脂肪代谢转化为能量, 并除去机体内多余脂肪以及其他脂肪酸的残留物, 且不减少水分和肌肉, 可维持细胞内能量平衡^[8-9]。肠抑素是脂肪消化时释放自胰辅酯酶的五肽, 主要存在于近端小肠。二酰甘油(diacylglycerol, DG)作为细胞内肌醇磷脂信号传递途径的中间物质。ADD组大鼠血清左旋肉碱、肠抑素、DG及多种脂质上升, 含量结合上面结论, 说明ADD大鼠能量供应已由糖代谢途径逐渐转移到脂肪代谢途径。

综上所述, 应用代谢组学方法结合数理统计分析手段能够成功探究ADD发病机制, 通过多种方法相结合寻找到22个病理学标志物, 初步确定了与AAD相关的代谢通路中影响因子。在下一步工作中, 将对这些目标化合物进行跟踪并获得其二级质谱结构信息, 必要时结合标准品对照, 进行靶向代谢组学研究, 对其结构进行鉴定和确认, 为更好地揭示其病理过程提供数据支持。本研究未将大鼠的性别、月龄、不同抗生素引起的腹泻考虑在内, 具有一定的局限性, 后续学者可扩大样本量进行研究。

参考文献

1. 金淑芳. 抗生素相关性腹泻的发病机制及诊治原则[J]. 医学理论与实践, 2013, 26(23): 3112-3115.
JIN Shufang. Pathogenesis, diagnosis and treatment principles of antibiotic-associated diarrhea[J]. Medical Theory and Practice, 2013, 26(23): 3112-3115
2. 张文娣. 抗生素相关性腹泻模型的构建[D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
ZHANG Wendi. Establishment of antibiotic-associated diarrhea model[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2015.
3. Behr C, Ramírez-Hincapié S, Cameron HJ, et al. Impact of lincosamides antibiotics on the composition of the rat gut microbiota and the metabolite profile of plasma and feces[J]. Toxicol Lett, 2018,

- 296: 139-151.
4. Behr C, Ramírez-Hincapié S, Cameron HJ, et al. Impact of lincosamides antibiotics on the composition of the rat gutmicrobiota and the metabolite profile of plasma and feces[J]. *Toxicol Lett*, 2018, 296: 139-151.
 5. Yi L, Shi S, Wang Y, et al. Serum metabolic profiling reveals altered metabolic pathways in patients with post-traumatic cognitive impairments[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21320.
 6. Blomstrand E. A role for branched-chain amino acids in reducing central fatigue[J]. *J Nutr*, 2006, 136(2): 544S-547S.
 7. Nezami Ranjbar MR, Luo Y, Di Poto C, et al. GC-MS based plasma metabolomics for identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma in egyptian cohort[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0127299.
 8. Xu S, Waddell J, Zhu W, et al. In vivo longitudinal proton magnetic resonance spectroscopy on neonatal hypoxicischemic rat brain injury: Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine[J]. *Magn Reson Med*, 2015, 74(6): 1530-1542.
 9. 邹宇洁, 杨菁, 常硕, 等. 乙酰肉碱: 抗弱精子症人精子冷冻损伤的有效抗氧化剂[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2017, 37(6): 915-921.
ZOU Yujie, YANG Jing, CHANG Shuo, et al. Acetyl-L-carnitine: An effective antioxidant against cryo-damage on human spermatozoa with asthenospermia[J]. *Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong*, 2017, 37(6): 915-921.

本文引用: 李东东, 霍巧玲, 刘宝清. 抗生素相关性腹泻的代谢组学[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(7): 1396-1404. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.07.003

Cite this article as: LI Dongdong, HUO Qiaoling, LIU Baoqing. Metabonomics on antibiotic associated diarrhea[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(7): 1396-1404. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.07.003