

• 基础研究 •

抗生素相关性腹泻与脾阳虚证的代谢组学研究

霍巧玲¹ 温彬宇² 杨成城¹ 张少辉¹ 王玉涛¹ 门斯烨¹
李 权¹ 张 涛¹ 张圭珍¹ 周春宇³

摘要 **目的** 探究抗生素相关性腹泻(AAD)与脾阳虚证的相关性及内在联系。**方法** 将30只6周龄雄性SD大鼠随机分为空白对照组、AAD组及脾阳虚证组,每组10只,分别予生理盐水、25 mg/mL 克林霉素、50%大黄水煎液2 mL灌胃,每天1次,连续10天。观察3组大鼠一般情况、体重及2 h粪便总重的变化。运用超高液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF)检测大鼠血清中的代谢产物。代谢组学数据运用Markerlynx软件分析,采用主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)对组间代谢产物进行多元统计分析。选取VIP(Variable Importance in the Projection)>1筛选潜在生物标志物,并通过 $P<0.05$ 和fold change value>2来确定生物标志物。**结果** 一般情况:AAD组、脾阳虚证组与空白对照组比较,均出现大便次数增多、便稀溏、活动度减低、乏力、毛发枯槁等表现;体重:造模第10天,AAD组、脾阳虚证组与空白对照组比较均明显下降($P<0.05$);AAD组与脾阳虚证组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。2 h粪便总重:造模第5、10天,AAD组与空白对照组比较均明显增高($P<0.05$);脾阳虚证组与AAD组、空白对照组比较均差异无统计学意义($P>0.05$)。代谢组学:AAD组、脾阳虚证组和空白对照组大鼠血清质谱图的峰高、峰面积不同,说明某些物质的含量发生了变化。OPLS-DA分析得出空白组、AAD组、脾阳虚证组各组聚类明显,可以有效判别AAD组、脾阳虚证组与空白对照组。AAD组鉴定出22个生物标志物,脾阳虚证组鉴定出21个生物标志物。在AAD组、脾阳虚证组中筛选出7个相同的生物标志物:O-磷酸高丝氨酸、戊二酸甘氨酸、十二烷酰肉碱、VPGPR 肠抑素、DG(14:0/14:0/0:0)、D胆素、PI[16:0/18:2(9Z,12Z)]。**结论** 从中医证候及代谢水平上认为脾阳虚证与抗生素相关性腹泻存在一定的相似性与内在联系,二者可能均对氨基酸、脂肪酸的代谢途径产生了影响。

关键词 代谢组学; 抗生素相关性腹泻; 脾阳虚证; 大黄; 克林霉素

Metabonomics Study on Antibiotic Associated Diarrhea and Pi Yang Deficiency Syndrome

HUO Qiao-ling¹, WEN Bin-yu², YANG Cheng-cheng¹, ZHANG Shao-hui¹, WANG Yu-tao¹, MEN Si-ye¹, LI Quan¹, ZHANG Tao¹, ZHANG Gui-zhen¹, and ZHOU Chun-yu³ ¹ Department of General Surgery, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078); ² Experimental Center, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078); ³ Department of Hospital Management, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029)

ABSTRACT **Objective** To study the correlation and intrinsic relationship between antibiotic-associated diarrhea (AAD) and Pi yang deficiency syndrome (PYDS) at the metabolic level. **Methods** Thirty 6-week-old male SD rats were randomly divided into blank control group, AAD group, and PYDS group, 10 rats in each group. Rats in the three groups were respectively administered with normal saline, clindamycin (25 mg/mL), and 50% rhubarb decoction (2 mL), once a day for 10 successive days. The general situation, body weight, and total fecal weight (in 2 h) of the three groups were observed. The me-

基金项目:北京中医药大学在读研究生项目(No. 2018-JYBZZ-XS199)

作者单位:1. 北京中医药大学东方医院普外科(北京 100078); 2. 北京中医药大学东方医院实验中心(北京 100078); 3. 北京中医药大学医院管理处(北京 100029)

通讯作者:周春宇, Tel: 010-67689724, E-mail: 13601252798@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200806. 325

tabolites in serum were detected by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF). Metabolomics data were analyzed by Markerlynx Software, and principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to perform multivariate statistical analysis of metabolites between groups. VIP (variable importance in the project) >1 was selected to screen potential biomarkers, and the biomarkers were determined by $P < 0.05$ and fold change value >2. The general statistical data were analyzed by SPSS20.0, and P less than 0.05 was considered as statistically significant. **Results** General conditions: Compared with the blank control group, increased stool frequency, loose stools, reduced mobility, fatigue, and withered hair occurred in the AAD group and the PYDS group. Body weight: On the 10th day of modeling, body weight decreased more significantly in the AAD group and the PYDS group than in the blank control group ($P < 0.05$). There was no significant difference between the AAD group and the PYDS group ($P > 0.05$). Total fecal weight in 2 h: On the 5th and 10th day of modeling, it was significantly higher in the AAD group than in the blank control group ($P < 0.05$). There was no significant difference between the PYDS group/the AAD group and the blank control group ($P > 0.05$). Metabolomics: There were differences in peak height and peak area of serum mass spectrum among the AAD group, the PYDS group, and the blank control group, which indicated that the contents of some substances had changed. OPLS-DA analysis showed obvious clustering in the blank control group, AAD group, and PYDS group, which could be used to effectively distinguish the three groups. Totally 22 biomarkers were identified in the AAD group and 21 biomarkers were identified in the PYDS group. Seven identical endogenous biomarkers were screened out in the AAD group and the PSYD group: O-Phosphohomoserine, glutaryl-glycine, dodecanoylcarnitine, VPGPR enterostatin, DG (14:0/14:0/0:0), D-Urobilin, PI [16:0/18:2 (9Z, 12Z)]. **Conclusions** There is certain correlation between PYDS and antibiotic-related diarrhea at Chinese medicine symptoms and metabolic levels. Both might affect the metabolic pathways of amino acids and fatty acids.

KEYWORDS metabolomics; antibiotic-associated diarrhea; Pi yang deficiency syndrome; rhubarb; clindamycin

抗生素相关性腹泻 (antibiotic-associated diarrhea, AAD) 属于中医学的“泄泻”范畴,泄泻以脾虚为本。脾为后天之本,气血生化之源,具有运化、升清、统血之功能。而脾阳以其温煦、向上、向外的作用推动和维持着脾脏运化功能的正常运行,脾阳虚则无力运化水谷、不化精微反变湿浊,清气不升,浊液下沉而发生泄泻。如长期大量不合理使用抗生素,致药毒蓄积,脾胃之气耗伤,易损脾阳,脾运失职,升降失调,清气不升,浊气不降,水谷不化,湿浊内生,从而导致抗生素相关性腹泻发生。

诸多现代医家认为“脾阳虚”与 AAD 关系密切,并以温中健脾立法取得良好疗效^[1-4]。但关于它们之间的内在联系缺乏相应的数据支持。因此,本研究基于代谢组学的研究方法,构建运用抗生素致 AAD 模型与苦寒药物致脾阳虚证模型,运用超高压液相色谱-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,筛选出不同模型的内源性标志物,进而从代谢

水平上为探究 AAD 与脾阳虚证相关性及其内在联系提供相关依据与数据支持。

材料与方法

1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,鼠龄 6 周,体重 (150±10)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:11400700185238,许可证号:SCXK (京)2018-0079。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℃,相对湿度 40%~50%,自由饮水进食,适应性饲养 1 周。本实验经北京中医药大学东方医院动物实验伦理委员会批准 (No. 20180526)。

2 试剂、仪器及药物 乙腈 (质谱级,美国 Fisher 公司,批号:142146)、甲酸 (质谱级,美国 Fisher 公司,批号:140362)、蒸馏水 (屈臣氏)。美国 UPLC-Q-TOF 仪 (Waters, SYNAPT G2 UPLC-Q-TOF); VORTEX-5 涡旋混合器 (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 (LAB-WAY-SCIENCE, 德国)。实验用药:盐酸克林霉素 (CAS321462-39-5, UPS 级, 83%, 800 µg/mg); 大黄

(产地:甘肃)购于北京中医药大学东方医院中药房。

3 分组、模型建立 30 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为空白对照组、AAD 组、脾阳虚证组,每组 10 只。按文献[5,6]提供的方法造模: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^[5];脾阳虚证组予大黄酒煎液(50% 浓度)2 mL 灌胃^[6],每天 1 次,连续给药 10 天。

4 一般情况及腹泻指标 造模前以及造模期大鼠每天称量 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。

5 代谢组学检测

5.1 标本采集及样品处理 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,室温下静置 2 h。血样在 4 ℃ 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 ℃ 的低温冰箱冻藏,用于代谢组学分析。

5.2 样品制备 分析前,将冻存的血清于 37 ℃ 复融 2 min,各取 200 μ L 血清于 EP 管,加入 600 μ L 乙腈,涡旋 10 min。4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min 去除蛋白。吸取上清液 700 μ L 于新的 EP 管,氮气吹干,样品保存于-20 ℃ 冰箱冷藏,待检测。各血清样品分别抽取 40 μ L 混匀通过上述制备方法得到质量控制(QC)样品。氮气吹干的样品,分别加入 10% 乙腈 200 μ L 于 EP 管复溶,4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 150 μ L 于进样小管,等待进样。

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 1.8 μ m, 100 mm $\times$ 2.1 mm, Column. Part No. 186003533, Serial No. 013033219157)。色谱分离条件为:柱温为 40 ℃,流速 0.4 mL/min;流动相组成 A:水+0.1% 甲酸,B:乙腈+0.1% 甲酸;梯度洗脱程序见表 1。进样量为 4 μ L,自动进样器温度 10 ℃。

表 1 流动相梯度洗脱程序表

时间(min)	流量(mL/min)	A(%)	B(%)
0.0	0.4	90	10
1.5	0.4	80	20
4.0	0.4	60	40
14.0	0.4	10	90
17.0	0.4	90	10

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 ℃;脱溶剂气温度 500 ℃、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:毛细管电压 2.1 kV、锥孔电压 15 kV、离子源温度 120 ℃;脱溶剂气温度 500 ℃、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。

6 数据处理方法 对代谢组学数据采用 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)验证模型。

7 生物标记物的筛选 在 OPLS-DA 模型中选取 VIP(variable importance in the projection)>1 作为潜在标记物,并运用 SPSS 20.0 软件进行分析,将 P<0.05 和 fold change value>2 认为有统计学意义。差异性生物标记物的定性方法为:将搜索质量阈值设定为 25 ppm,根据精确分子量搜索 METLIN(<http://metlin.scripps.edu/>)和 HMDB(<http://www.hmdb.ca>)数据库来确定。

8 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件。3 组实验大鼠的一般情况、腹泻指标进行统计分析,计量资料符合正态分布采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布采用四分位数间距表示,符合正态分布且方差齐的采用 t 检验,否则采用非参数检验。组间比较采用独立样本 t 检验,非正态性分布或方差不齐采用秩和检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 大鼠一般情况比较 与空白对照组大鼠比较,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,便涂片示球菌/杆菌比异常;脾阳虚证组大鼠,神疲乏力,反应迟钝,行动缓慢,被毛蓬起无光泽,弓背、扎堆,肛温下降、便溏,肛周污秽,毛色枯槁无光泽。两组造模均成功。

2 各组大鼠造模前后体重比较(表 2) 造模前、造模第 5 天,各组体重比较差异无统计学意义(P>0.05);造模第 10 天,与空白对照组体重比较,AAD

组、脾阳虚证组体重减轻 ($P<0.05$); AAD 组与脾阳虚证组大鼠体重比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 各组大鼠造模前后体重比较 ($\text{g}, \bar{x} \pm s$)

组别	n	造模前	造模第 1 天	造模第 5 天	造模第 10 天
空白对照	10	155.67 $\pm$ 3.12	201.68 $\pm$ 7.71	237.7 $\pm$ 11.46	247.4 $\pm$ 29.98
AAD	10	156.49 $\pm$ 3.42	200.73 $\pm$ 6.12	231.0 $\pm$ 11.65	240.1 $\pm$ 16.43*
脾阳虚证	10	154.02 $\pm$ 3.67	199.38 $\pm$ 6.41	224.25 $\pm$ 9.13	239.4 $\pm$ 11.41*

注: 与空白对照组同期比较, * $P<0.05$

3 各组大鼠造模后 2 h 粪便总重比较 (表 3)
造模第 1、5、10 天, 脾阳虚证组与空白对照组、AAD 组 2 h 粪便总重比较, 差异无统计学意义 (均 $P>0.05$); 造模第 5、10 天, AAD 组与空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 3 各组大鼠造模后 2 h 粪便总重比较 ($\text{g}, \bar{x} \pm s$)

组别	n	造模第 1 天	造模第 5 天	造模第 10 天
空白对照	10	0.61 $\pm$ 0.43	1.20 $\pm$ 0.38	0.63 $\pm$ 0.68
AAD	10	0.85 $\pm$ 0.43	2.99 $\pm$ 1.25*	3.35 $\pm$ 1.38*
脾阳虚证	10	0.59 $\pm$ 0.19	2.22 $\pm$ 0.75	2.96 $\pm$ 0.71

注: 与空白对照组同期比较, * $P<0.05$

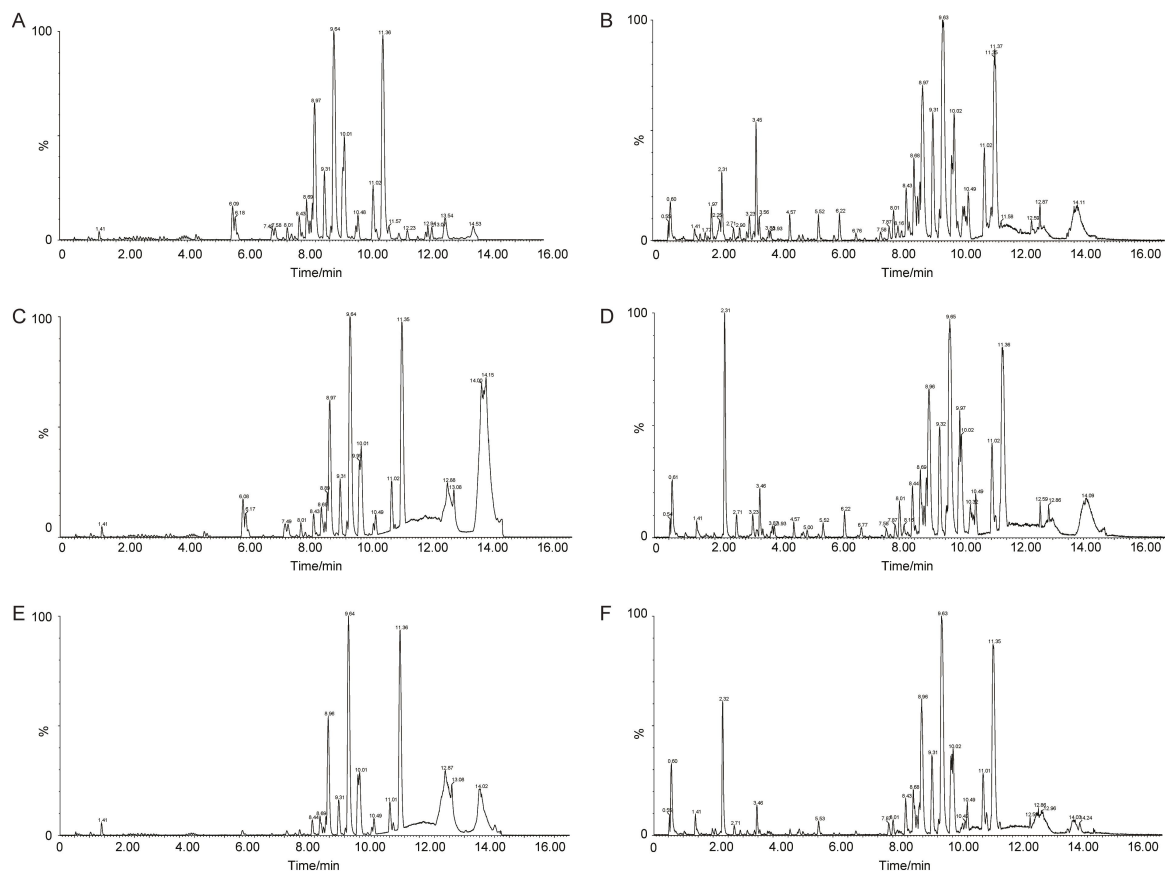
4 各组大鼠血清 UPLC-Q-TOF 质谱图 (图 1)
组间部分色谱峰峰高及峰面积不同, 说明某些物质的含量发生了变化。

5 各组大鼠多元数据分析结果

5.1 各组大鼠血清 OPLS-DA 得分图 (图 2、3)

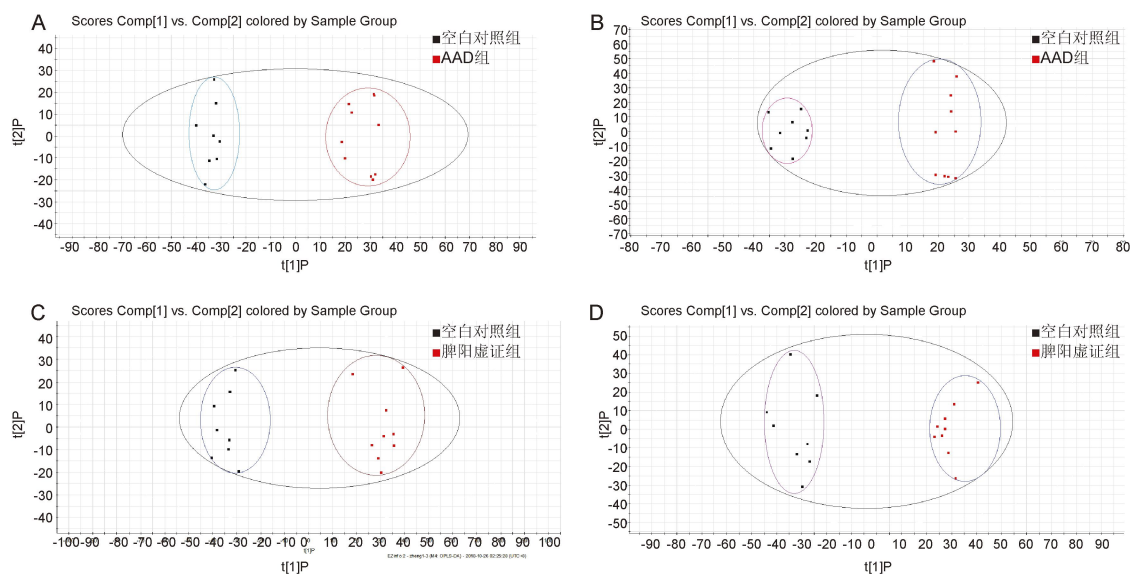
空白对照组与 AAD 组大鼠血清样本可以明显区分开来, 正离子模式下得到 3 个主成分, $R^2X=0.3346$, $R^2Y=0.9788$, $Q^2=0.8173$, 负离子模式下得到 3 个主成分, $R^2X=0.4112$, $R^2Y=0.9768$, $Q^2=0.8196$ 。空白对照组与脾阳虚证组大鼠的血清样本可以明显区分开来, 正离子模式下得到 3 个主成分, $R^2X=0.3649$, $R^2Y=0.9773$, $Q^2=0.8843$, 负离子模式下得到 3 个主成分, $R^2X=0.3531$, $R^2Y=0.9659$, $Q^2=0.8924$ 。从 OPLS-DA 得分图中可以看出空白组、AAD 组、脾阳虚证组聚类明显, 说明模型组样本有明显差异。

5.2 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记物。



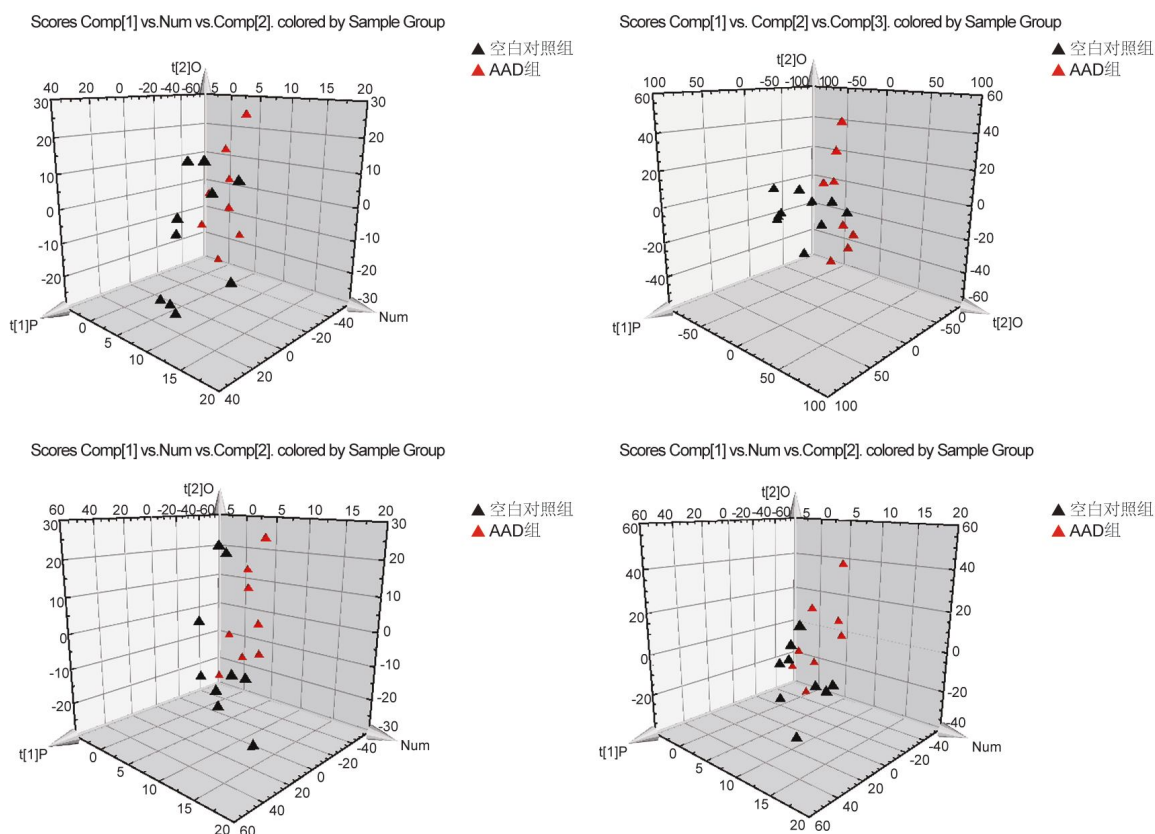
注: A 为空白对照组正离子模式下 TIC; B 为空白对照组负离子模式下 TIC; C 为 AAD 组正离子模式下 TIC; D 为 AAD 组负离子模式下 TIC; E 为脾阳虚证组正离子模式下 TIC; F 为脾阳虚证组负离子模式下 TIC

图 1 各组大鼠血清 UPLC-Q-TOF 质谱图



注:A 为正离子模式;B 为负离子模式;C 为正离子模式;D 为负离子模式

图2 OPLS-DA 分析的得分图二维图

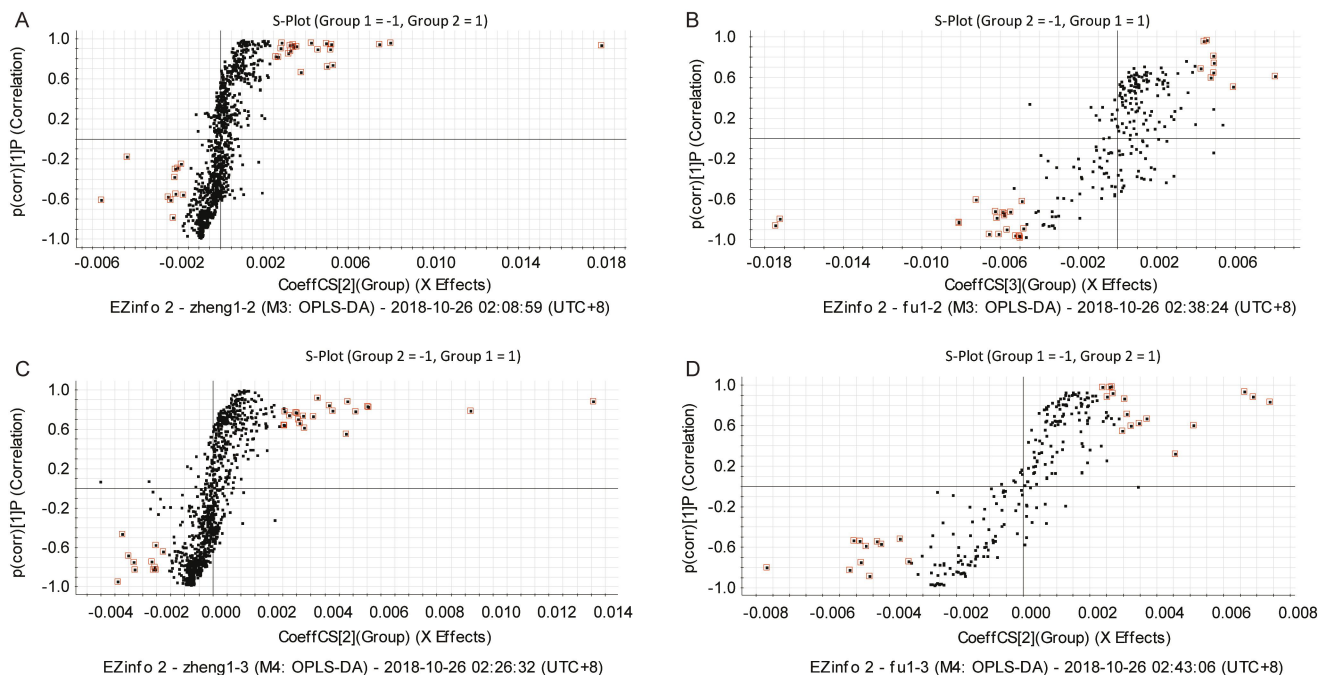


注:A 为正离子模式;B 为负离子模式;C 为正离子模式;D 为负离子模式

图3 OPLS-DA 分析的得分图三维图

6 差异性生物标记物的确定 AAD 组鉴定出了 22 个生物标志物,脾阳虚证组鉴定出了 21 个生物标志物(表 4、5)。其中在 AAD 组、脾阳虚证组中发现 7 个相同的差异性生物标志物,分别是: O-Phosphoserine (O-磷酸高丝氨酸)、Glutaryl-glycine (戊

二酸甘氨酸)、Dodecanoylcarnitine (十二烷酰肉碱)、VGPGR Enterostatin (VGPGR 肠抑素)、DG (14:0/14:0/0:0)、D-Urobilin (D 胆素)、PI[16:0/18:2(9Z,12Z)],这 7 种生物标志物的表达与空白对照组变化趋势相同。



注:A 为正离子模式,正常对照组与 AAD 组对比的 Loading 图;B 为负离子模式,正常对照组与 AAD 组对比的 Loading 图;C 为正离子模式,正常对照组与脾阳虚证组对比的 Loading 图;D 为负离子模式,正常对照组与脾阳虚证组对比的 Loading 图

图 4 OPLS-DA 分析下的载荷图

表 4 空白对照组与 AAD 组血清差异性代谢物分析结果

序号	Compound name	分子式	ESI 模式	Ret. Time(s)	m/z	与空白对照组比较变化趋势
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-	3.4560	201.0444	↓
3	O-Phosphohomoserine	C ₆ H ₇ N ₄ O ₂ S	ESI-	3.1723	199.0282	↓
4	Glutarylglycine	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-Dihydroxyetiocholan	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-	9.2420	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	564.3910	↓
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+	14.7070	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	↑

讨 论

大黄性苦寒,苦寒易伤脾阳,脾阳亏虚,中阳不健,

运化无权,清气下陷,寒湿之邪壅滞肠中,传导失司而发为泄泻。脾阳虚则无力运化水谷,不能濡养形体官窍,影响脏腑器官功能,故神疲乏力、活动度减低。脾胃

表 5 空白对照组与脾阳虚组血清差异性代谢物分析结果

序号	Compound name	分子式	ESI 模式	Ret. Time(s)	m/z	与空白对照组比较 变化趋势
1	O-Phosphohomoserine	C ₆ H ₇ N ₄ O ₂ S	ESI-	3.1714	199.0281	↓
2	Glutarylglutamine	C ₃ H ₉ O ₇ S	ESI-	1.5981	189.0067	↓
3	Isovalerylglutamic acid	C ₁₄ H ₁₅ O ₃	ESI-	2.9025	231.1022	↑
4	Anandamide	C ₂₃ H ₃₉ O ₂	ESI-	10.9926	347.2957	↓
5	Dodecanoylcarnitine	C ₂₃ H ₃₅ O ₂	ESI-	9.8060	343.2647	↓
6	Gamma-linolenyl carnitine	C ₂₀ H ₃₉ N ₃ O	ESI-	6.2157	407.3238	↑
7	Lithocholic acid glycine conjugate	C ₂₃ H ₃₇ N ₄ O ₄	ESI-	10.3794	433.2816	↓
8	Aripiprazole	C ₁₂ H ₂₃ N ₁₂ O ₇	ESI-	6.2162	447.1815	↓
9	LysoPE(0:0/16:0)	C ₂₆ H ₄₁ N ₆ O	ESI-	6.2147	453.3341	↑
10	11-Oxo-androsterone glucuronide	C ₁₈ H ₄₂ N ₉ O ₆	ESI-	11.2291	480.3247	↑
11	Arachidonyl carnitine	C ₂₄ H ₄₆ N ₃ O ₈	ESI-	10.1461	504.3267	↑
12	DG(14:0/14:0/0:0)	C ₂₃ H ₅₀ N ₃ O ₉	ESI-	8.0054	512.3538	↓
13	VPGPR Enterostatin	C ₉ H ₃₄ N ₂₅ O ₂	ESI-	8.8293	524.3340	↓
14	Desmosine	C ₂₄ H ₅₂ N ₃ O ₉	ESI-	8.8038	526.3714	↓
15	Neurosporene	C ₂₇ H ₄₄ N ₁₁ O	ESI-	8.1476	538.3726	↓
16	D-Urobilin	C ₂₃ H ₅₄ N ₇ O ₁₀	ESI-	8.9487	588.3935	↓
17	L-Urobilin	C ₂₄ H ₅₆ N ₁₁ O ₆	ESI-	11.5785	594.4407	↓
18	Cholestane-3,7,12,25-tetrol-3-glucuronide	C ₄₅ H ₄₂ NO	ESI-	9.6404	612.3264	↑
19	DG[14:0/14:1(9Z)/0:0]	C ₂₇ H ₄₈ N ₃ O ₆	ESI+	10.4870	510.3556	↓
20	Protoporphyrinogen IX	C ₃₃ H ₄₂ N ₇ O ₂	ESI+	8.8845	568.3403	↓
21	PI[16:0/18:2(9Z,12Z)]	C ₄₃ H ₈₄ N ₃ O ₁₂	ESI+	14.0356	834.6036	↑

为气血生化之源,脾阳虚则血脉失于充养,发为血之余,血虚则无力润泽毛发,故见毛发失去光泽。克林霉素,其抗菌活性强,抗菌谱广,在口服应用中易发生胃肠道反应,引起抗生素相关性腹泻。从一般情况来看,AAD 组与脾阳虚证 SD 大鼠均出现大便次数增多、大便稀薄,毛失去光泽,活动减少;从体重来看,AAD 与脾阳虚组均较正常对照组低;从 2 h 粪便总重来看,AAD 与脾阳虚组均较正常对照组高,且差异有统计学意义。说明 AAD 在中医证候上与脾阳虚证有一定的相关性。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标记物群^[7,8]。因为代谢组学是对最终代谢产物进行分析研究,而代谢产物能够准确地反映出机体整体的代谢水平,更有利于对整体复杂体系进行多靶点、多方位地认知^[9,10],这与中医学整体观念相契合、与“司外揣内”理论体系相类似^[11-13],因此更适合用于中医学方面的相关研究。本研究从 AAD 组与脾阳虚证组筛选出的 7 个共同的生物标记物包括:O-磷酸高丝氨酸、戊二酸甘氨酸、十二烷酰肉碱、VPGPR 肠抑素、DG(14:0/14:0/0:0)、D-胆素、PI[16:0/18:2(9Z,12Z)],主要涉及氨基酸代谢、脂肪酸代谢等。

AAD、脾阳虚证组大鼠各经过 10 天的暴露后,血清代谢组学分析显示:与空白对照组比较,甘氨酸、丝

氨酸以及氨基酸代谢产物的浓度降低,一方面表明这些氨基酸的生物利用度下降,而在肠道内积累^[14],另一方面,由于较少的细菌多糖降解,能量代谢在大鼠可能已切换到氨基酸和脂质代谢,这可以解释氨基酸及脂质浓度降低。抗生素到达肠道内会引起肠黏膜屏障损伤,对其肠道微生物群产生影响^[15]。大黄通过刺激肠道蠕动,对肠道微生物群亦能产生影响。有研究表明肠道微生物群不仅影响宿主氨基酸的生物利用度,而且改变游离氨基酸在胃肠道中的分布^[16]。本研究还观察到对于全身代谢至关重要的血浆甘氨酸水平降低。鉴于代谢途径的重要性和广泛性,例如涉及甘氨酸的谷氨酸系统,这种氨基酸浓度的变化可能对宿主的健康产生影响^[17]。丝氨酸的相对含量发生了显著变化,丝氨酸可由糖酵解经 3-磷酸甘油酸生成,研究发现丝氨酸在氨基酸代谢中发挥着重要的作用,可作为一碳单位参与嘌呤和嘧啶的合成^[18],一碳代谢又可提供重要的辅酶 NADH 和 NADPH 用于多种合成代谢反应^[19]。丝氨酸水平的降低表明多种合成代谢出现障碍,影响机体能量供给,故两组大鼠可出现活动减低的表现。

两组血清十二烷酰肉碱、DG 等多种脂质含量发生相对变化。有文献报道,肉碱及酰基肉碱作为能量转移,传递脂肪酸入线粒体工具,是转运脂肪酸的载体,影响脂类代谢^[20-22],其含量缺乏可能会阻碍脂代

谢通路,导致机体能量供应不足,致两组大鼠活动度减低。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。VPGPR 肠抑素在两组中均有明显变化,表明两者脂代谢均受到影响。甘油二酯(diglyceride, DG)是由丙三醇和两个脂肪酸酯化后得到的产物,为细胞内肌醇磷脂信号传递途径的中间物质。两组血清 DG 水平均呈下降趋势,说明脂代谢通路存在异常,故两组大鼠均出现体重减低的表现。

综上所述,应用代谢组学方法可以成功区分空白对照组和 AAD 组、脾阳虚证组大鼠,通过对各组别代谢产物分析、比较和归纳,发现了 AAD 与脾阳虚证部分相同的生物标志物,这些生物标志物的表达与空白对照组变化趋势相同,可以得出 AAD、脾阳虚证存在一定的相似性及内在联系。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,为更好的揭示其内在联系及相关性提供数据支持。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 何善明,袁海锋. 中西医结合治疗伪膜性肠炎 60 例临床观察[J]. 广西中医药, 2006, 29(6): 22-23.
- [2] 刘敬霞,李建生. 李建生教授健脾化湿治疗老年人肺炎继发抗生素相关性腹泻[C]. 中国中西医结合学会与康复医学专业委员会会议暨学术研讨会, 2011: 289-291.
- [3] 王天平. 参苓白术散加味治疗抗生素相关性腹泻疗效观察[J]. 实用中医药杂志, 2008, 24(3): 143.
- [4] 李春颖. 七味白术散加味治疗抗生素相关性腹泻疗效观察[J]. 中日友好医院学报, 2010, 24(5): 292-293.
- [5] 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.
- [6] 李芹,张会永,吴天石,等. 脾阳虚证动物模型造模方法与模型评价的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(8): 1721-1728.
- [7] 黄晓晨,宿树兰,郭建明,等. 代谢组学在中医药若干科学问题研究中的应用与思考[J]. 中草药, 2014, 45(2): 147-153.
- [8] 徐文丽,胡瑞雪,梁元昊,等. 中医中药代谢组学生物标记物的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(6): 756-760.
- [9] 李林. 中药治疗神经重大疾病的多靶点策略和实验研究[J]. 神经药理学, 2018, 8(3): 44.
- [10] 王忠,陈寅莹,张盈颖,等. 多组分多靶点中药药理作用机制研究中的问题和解决策略[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(5): 1-6.
- [11] Ma S, Chowdhury SK, Alton KB. Application of mass spectrometry for metabolite identification[J]. Curr Drug Metabolism, 2006, 7(5): 503-523.
- [12] Singh S, Prasad B, Garg A, et al. Metabolite identification by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Trends Analyt Chemistry, 2011, 30(2): 360-387.
- [13] Sumner LW, Bedair M. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics[J]. Trends Analyt Chemistry, 2008, 27(3): 238-250.
- [14] Walk T, Cameron HJ, Beekmann K, 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.
- [15] 秦卓,任爱民,王红. 抗生素相关性肠炎大鼠肠黏膜结构损伤变化和中药复方制剂通腑颗粒及其组分的保护作用[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(6): 467-470, 477.
- [16] Whitt DD, Demoss RD. Effect of microflora on the free amino acid distribution in various regions of the mouse gastrointestinal tract[J]. Appl Microbiol, 1975, 30: 609-615.
- [17] Lechner SM. Glutamate-based therapeutic approaches: inhibitors of glycine transport[J]. Curr Opin Pharmacol, 2005, 6(1): 75-81.
- [18] Amelio I, Cutruzzola F, Antonov A, et al. Serine and glycine metabolism in cancer[J]. Trends Biochem Sci, 2014, 39(4): 191-198.
- [19] Zhu QS, Jin LH, Casero RA, et al. Role of ornithine decarboxylase in regulation of estrogen receptor alpha expression and growth in human breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 136(1): 57-66.
- [20] Chen LX, Wang JJ, Li P. Catabolism of nutritionally essential amino acids in developing porcine enterocytes[J]. Amino Acids, 2009, 37(1): 143-152.
- [21] 冯宇,郭长江,高兰兴. 体内肉碱来源及其对脂类代谢的影响[J]. 氨基酸和生物资源, 1998, 20(4): 51-53.
- [22] 韩连书,高晓岚,叶军,等. 串联质谱分析干血滤纸片酰基肉碱方法的建立[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(1): 93-96.

(收稿: 2019-04-17 在线: 2020-09-16)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶