

基于微生物-代谢组学研究尿毒清颗粒改善大鼠慢性肾病的作用及机制

徐雅琴^{1,2}, 黄耀民^{1,2}, 和梦颖^{1,2}, 褚夫江^{1,2*}

(1. 广东省生物活性药物研究重点实验室, 广东 广州 510006;

2. 广东药科大学 生命科学与生物制药学院, 广东 广州 510006)

[摘要] 采用微生物组学结合代谢组学的方法, 研究尿毒清颗粒干预 SD 大鼠慢性肾脏疾病的作用, 并初步探究其作用机制。采用腺嘌呤诱导的方法制备 SD 大鼠慢性肾脏疾病模型, 模型构建成功后, 将动物随机分为阴性对照组和尿毒清颗粒处理组, 同时设立正常对照组, 每组 8 只。给药 4 周后, 分别收取动物粪便及血清, 采用 16S rDNA 测序分析肠道微生物丰度、多样性以及功能预测; 采用 LC-MS 进行高通量测序检测动物血清代谢物; 利用 MetPA 数据库筛选出慢性肾脏疾病大鼠潜在的生物学标志物, 并进行代谢通路的富集分析。Spearman 法分析 2 个组学之间的相关性。结果显示, 尿毒清颗粒可有效改善慢性肾脏疾病大鼠体质量减轻、肾脏功能相关生化及外观指标。16S rDNA 测序结果表明, 尿毒清颗粒可调节慢性肾脏疾病大鼠肠道菌群的多样性和组成; 肠道微生物群的变化, 影响了氨基酸生物合成和代谢、脂类代谢、碳水化合物代谢等功能代谢途径。LC-MS 检测结果显示, 相对于阴性对照组, 尿毒清颗粒处理组动物有 15 种代谢物发生逆转, 其中有 11 种潜在标志代谢物显著上调, 有 4 种潜在标志代谢物显著下调; 主要涉及 5 条氨基酸代谢通路, 且与肠道菌群的变化具有显著相关性。尿毒清颗粒可以改善慢性肾脏疾病大鼠的肾脏功能, 其机制可能是通过调节肠道菌群影响氨基酸代谢通路。

[关键词] 慢性肾脏疾病; 尿毒清颗粒; 肠道菌群; 代谢组学

Effect of Uremic Clearance Granules on improvement of chronic kidney disease in rats based on microbiome-metabolomics and its mechanism

XU Ya-qin^{1,2}, HUANG Yao-min^{1,2}, HE Meng-ying^{1,2}, CHU Fu-jiang^{1,2*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, Guangzhou 510006, China;

2. School of Life Science and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] This research aimed to study the effect of Uremic Clearance Granules on chronic kidney disease in SD rats by using the methods of microbial functional genomics combined with metabolomics, and to preliminarily explore its mechanism. The SD rat model of chronic kidney disease was established by the adenine-induced method. After the model was successfully induced, the animals were randomly divided into a negative control group, a Uremic Clearance Granule treatment group, and a normal control group, with 8 rats in each group. After 4 weeks of administration, animal feces and serum were collected, and 16S rDNA sequencing technology was used to analyze the abundance, diversity, and function prediction of intestinal microorganisms. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) technology was used to perform high-throughput sequencing to detect animal serum metabolites. The MetPA database was used to screen out potential biomarkers of chronic kidney disease in rats and conduct the enrichment analysis of metabolic pathways. Spearman's method was used to analyze the correlation between the two omics. The results showed that Uremic Clearance Granules effectively improved the body weight loss and renal function-related biochemical and appearance indicators in rats with chronic kidney disease. The results of 16S rDNA sequencing showed that Uremic Clearance Granules regulated the diversity and composition of the intestinal flora in

[收稿日期] 2022-07-05

[基金项目] 广东省科技计划项目(2014A020212416, 201707010132)

[通信作者] * 褚夫江, E-mail: Chufujiang8868@163.com

[作者简介] 徐雅琴, E-mail: 1308278581@qq.com

rats with chronic kidney disease. The changes in the intestinal flora affected functional metabolic pathways such as amino acid biosynthesis and metabolism, lipid metabolism, and carbohydrate metabolism. The results of LC-MS showed that as compared with the negative control group, 15 metabolites were reversed in the Uremic Clearance Granule treatment group, among which 11 potential marker metabolites were significantly up-regulated and 4 potential marker metabolites were significantly down-regulated. Five amino acid metabolic pathways were mainly involved, which were significantly correlated with changes in the intestinal flora. Therefore, Uremic Clearance Granules can improve the renal function of rats with chronic kidney disease, and the mechanism may be related to its effect on the amino acid metabolism pathway by regulating the intestinal flora.

[Key words] chronic kidney disease; Uremic Clearance Granules; intestinal flora; metabolomics

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20220901.401

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)是一种由各种原因引起的慢性肾脏结构和功能障碍的综合征^[1]。近年来研究发现 CKD 与肠道毒素密切相关,如结肠可有助于产生多种尿毒素,常见的包括目前研究较多的硫酸吲哚酚(indoxylsulfate, IS)、硫酸对甲酚等^[2]。目前靶向肠道治疗成为国内外肾病领域的研究热点,且越来越多的动物及临床研究显示肠道菌群在 CKD 的发生发展中起重要作用^[3]。目前现代医学尚无逆转或阻断 CKD 进展的特效药物和满意方法,糖皮质激素、免疫抑制药物及对症处理治疗尚存在棘手的并发症和副作用^[4]。近年来,中医药在辨证论治的基础上,克服了西药治疗的某些局限性,在治疗慢性肾病方面,取得了明显的疗效^[5]。

尿毒清颗粒(Uremic Clearance Granules)具有滋肾填精、健脾利湿、通腑降浊、活血化瘀之功效,在慢性肾脏病的防治过程中显示出良好疗效^[6]。目前,已有较多应用尿毒清颗粒治疗 CKD 肾功能不全阶段的临床应用^[7],但其具体的作用机制尚不明确。通过代谢组学研究发现肠道微生物影响机体代谢,进而影响机体对药物的吸收利用^[8]。肠道微生物和代谢图谱改变之间存在明显的相关性^[9],利用微生物组学和代谢组学的结合可提供可靠和全面的信息,加深对微生物组结构和功能及其与健康疾病关系的认识,克服单一组学研究的局限性,有助于更全面地理解疾病发生及药物作用机制,具有良好的应用前景^[10]。

基于肠道菌群和代谢与 CKD 之间的密切关系,本研究从 CKD 发生的肠道微环境出发,通过对肠道菌群以及血清代谢物进行高通量测序分析,明确与 CKD 相关的关键菌株以及尿毒清颗粒作用的肠道微生物靶点以及代谢物靶点,并借助多组学联合分析的方法,深入分析 CKD 及肠道菌群与人体代谢的

关系,为尿毒清颗粒治疗 CKD 提供初步的理论依据。

1 材料

5452 型高速离心机(德国 Eppendorf 公司),BSA123S-CW 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司),DHG-9055A 型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),MDF-U52V 型超低温冰箱(日本 SANYO 公司),ED50A 型高压蒸汽灭菌锅(厦门致微仪器有限公司),Model680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

腺嘌呤(上海生工生物工程股份有限公司,批号 A600013),无毒环保苏木素-伊红染色试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20210527),尿毒清颗粒(康臣药业有限责任公司,批号 20201221)。

SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只,8 周龄,体质量(200±20)g,购自广东省实验动物中心,生产许可证号 SCXK(粤)2018-0002。所有动物于广东药科大学动物实验中心饲养并取材[许可证号 SYXK(粤)2017-0125]。实验过程中均自由摄食、饮水。本实验取得广东药科大学实验动物伦理委员会的许可(编号 SPF2017311)。

2 方法

2.1 造模及分组

24 只 8 周龄雄性 SD 大鼠适应性饲养 1 周后,采用腺嘌呤诱导的方法^[11-12]制备 SD 大鼠慢性肾脏疾病模型,第 1~4 周每日定时给予 2.5%腺嘌呤混悬液按照 250 mg·kg⁻¹灌胃造模。模型构建成功后,将动物随机分为阴性对照组(生理盐水灌胃)和尿毒清颗粒组,同时设立正常对照组,给予同等体积的生理盐水灌胃,每组 8 只。第 5~8 周,正常对照组及阴性对照组给予同等体积的生理盐水灌胃,尿毒清颗粒组大鼠给予尿毒清颗粒混悬液灌胃,按照人和动物体表面积换算公式^[13]:大鼠给药剂量依据

人-大鼠体表面积换算(1:6.25)按照临床成人用药量的4倍给药,每日给予 $4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。所有大鼠均自由进食及饮水,光照时间明暗各半,室温 $18\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 生化指标检测

第8周大鼠给药结束后采用10%水合氯醛腹腔麻醉,经腹主动脉采血,室温下静置2 h,血液凝固后 $3\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min取上清收集,全自动生化仪测定肾功能指标(血清尿素氮、血肌酐)。

2.3 肾脏系数计算

取血后处死大鼠并摘取肾脏,按照公式计算大鼠肾脏系数。肾脏系数=双侧肾脏总质量/大鼠体质量 $\times 100\%$ 。

2.4 肾脏组织学病理检测

取血后处死大鼠并摘取肾脏,剥离表面筋膜后纵行对半切开,放置于10%中性福尔马林溶液中。固定后进行常规的石蜡包埋、切片、HE染色,镜下观察肾脏的组织病理学改变。

2.5 肠道微生物DNA的提取、测序及丰度和多样性分析

为了分析肠道微生物群,根据标准程序收集并处理大鼠的新鲜粪便样本。进一步进行模板DNA分离,然后在Illumina HiSeq 2500平台上进行测序。引物序列如下:341 F (5'-CCTAYGGGRBGCASCA-G-3')和806 R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3')。然后进行序列组装、质量控制和聚类。在无菌条件下,取大鼠粪便并收集置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存,委托苏州帕诺米克生物科技有限公司进行DNA提取以及16S rDNA高通量测序。

2.6 血清代谢组学测序及分析

将大鼠血清样本在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下解冻,解冻后样

本涡旋1 min,混合均匀;精确移取适量样本于2 mL离心管中;加入400 μL 甲醇溶液($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存),涡旋1 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取全部上清液,转移至新的2 mL离心管中,浓缩干燥;准确加入150 μL 80%甲醇水配制的2-氯-L-苯丙氨酸溶液($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存)复溶样品,取上清液过0.22 μm 滤膜过滤,过滤液加入到检测瓶中,用于LC-MS检测。委托苏州帕诺米克生物科技有限公司进行高通量测序。

2.7 微生物组学和代谢组学相关性分析

通过皮尔森相关性分析(Pearson correlation)或斯皮尔曼秩相关性分析(Spearman rank correlation)来计算2个组学数据的关联系数(r)及其 P ,以相关性 $r<-0.5$ 或 $r>0.5$ 、 $P<0.05$ 为标准,筛选标志微生物与代谢物并绘制相关性热图。

2.8 统计学处理

采用SPSS 23.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间两两比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况

正常对照组大鼠精神良好,活泼喜动,毛发亮泽,垫料干燥无明显异味;阴性对照组大鼠懒动,毛发杂乱无光泽,进食减少,饮水及排尿量增加,垫料湿润脏乱且有明显异味;尿毒清颗粒组较阴性对照组情况有改善。实验开始前,各组大鼠体质量之间差异无统计学意义;实验结束时,尿毒清颗粒组体质量与阴性对照组相比升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表1。

表1 3组大鼠体质量、肾脏系数、血清肌酐和尿素氮水平的比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 1 Comparison of body weight, kidney coefficient, serum creatinine and blood urea nitrogen levels among three groups of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	体质量/g			肾脏系数/%	肌酐/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	尿素氮/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
	造模前	给药前	给药后			
正常对照	216.47 $\pm$ 1.03	371.62 $\pm$ 9.02	548.37 $\pm$ 6.30	0.58 $\pm$ 0.01	5.81 $\pm$ 0.21	42.82 $\pm$ 0.62
阴性对照	221.95 $\pm$ 4.92	328.08 $\pm$ 9.11 ¹⁾	415.68 $\pm$ 17.32 ²⁾	1.79 $\pm$ 0.09 ¹⁾	20.39 $\pm$ 1.78 ²⁾	125.45 $\pm$ 11.67 ²⁾
尿毒清颗粒	224.22 $\pm$ 3.72	333.83 $\pm$ 7.74 ¹⁾	465.68 $\pm$ 10.70 ³⁾	1.44 $\pm$ 0.05 ³⁾	13.10 $\pm$ 0.49 ⁴⁾	76.15 $\pm$ 5.79 ⁴⁾

注:与正常对照组相比¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$;与阴性对照组相比³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ (表2同)。

3.2 生化指标

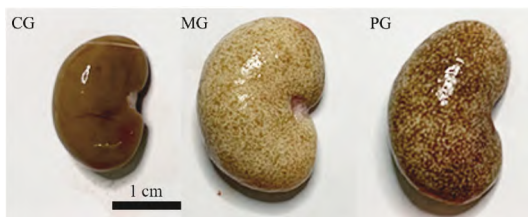
阴性对照组较正常对照组大鼠的尿素氮、肌酐

水平升高,其差异具有统计学意义($P<0.01$);尿毒清颗粒组较阴性对照组大鼠的尿素氮、肌酐水平降

低,其差异具有统计学意义($P<0.01$),见表1。

3.3 对CKD大鼠组织学的影响

3.3.1 肾脏外观及肾脏系数 正常对照组大鼠肾脏颜色红润,表面光滑;阴性对照组大鼠肾脏代偿性增大,颜色苍白表面呈颗粒感;尿毒清颗粒组较阴性对照组有所改善,颜色恢复为砖红,肿胀减轻,体积减小,见图1。经ANOVA单因素方差分析后发现各组肾脏质量中,阴性对照组与正常对照组、尿毒清颗粒组与阴性对照组差异均有统计学意义($P<0.05$),见表1。



CG:正常对照组; MG:阴性对照组; PG:尿毒症清颗粒组(图2~6、9,表2同)。

图1 3组大鼠肾脏外观

Fig.1 Appearance of kidneys in three groups of rats

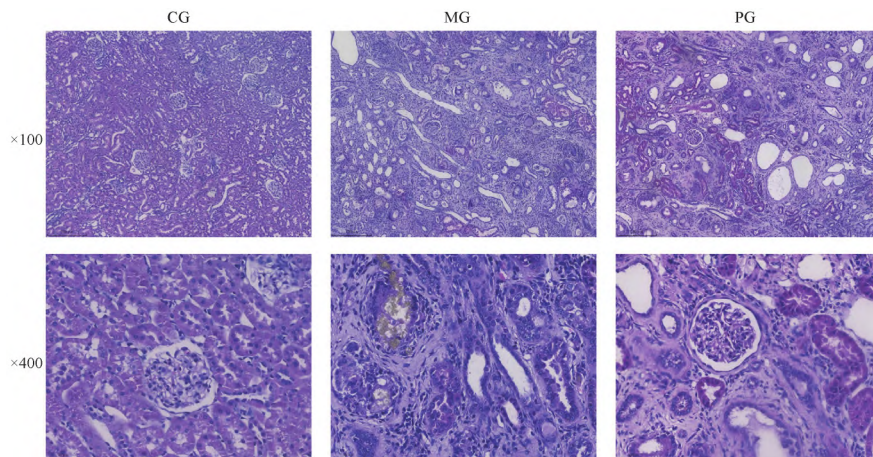


图2 各组大鼠肾脏病理切片(HE染色)

Fig.2 Pathological sections of rat kidneys in each group (HE staining)

存在明显差异;与阴性对照组相比,尿毒清颗粒组大鼠菌群结构更趋向于正常对照组,见图3。

3.4.2 物种差异分析与标志物种 各组大鼠在门水平上的构成处于前5位的依次均为厚壁菌门 Firmicutes、拟杆菌门 Bacteroidetes、放线菌门 Actinobacteria、变形菌门 Proteobacteria 和 Saccharibacteria

3.3.2 肾脏组织学病理检测 正常对照组大鼠肾脏组织结构无任何病理改变,结构正常,呈正常管型;阴性对照组大鼠高倍镜下可见肾小球萎缩硬化,肾小囊变大,肾小球血管团处可见大量灰白色腺嘌呤代谢产物聚集,炎症细胞大量广泛地聚集于各肾单位之中,肾小管明显萎缩,各段肾小管管腔壁细胞脱落,管腔明显扩大甚则细胞坏死;尿毒清颗粒组大鼠肾小管细胞坏死细胞减少,正常肾小管较阴性对照组增多,正常肾小管细胞数量显示增多,肾小球血管团处极少见腺嘌呤代谢产物聚集,炎症细胞分布量少,较阴性对照组明显改善,见图2。

3.4 肠道菌群的改变

3.4.1 物种多样性分析 根据16S rDNA测序结果进行 α 多样性分析,绘制大鼠肠道菌群Chao1丰富度、Simpson指数和Shannon多样性指数分析图。结果显示,阴性对照组和尿毒清颗粒组Chao1指数显著升高,阴性对照组的Simpson指数和Shannon指数较正常对照组显著下降,而尿毒清颗粒对慢性肾病大鼠的Simpson指数和Shannon指数有回调趋势,见图3。PCoA结果显示,各组别之间菌群构成

(TM7),与正常对照组相比,阴性对照组上调了厚壁菌门 Firmicutes 的丰度,下调了拟杆菌门 Bacteroidetes 的丰度,拟杆菌门/厚壁菌门比值(B/F)降低,给药组大鼠B/F有回调的趋势,见图4。

在属水平上,丰度在前20的菌属中,与正常对照组相比,阴性对照组大鼠肠道微生物的丰度发生

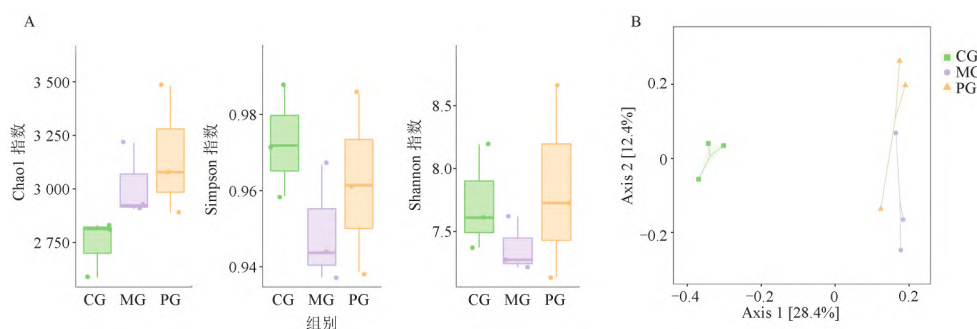
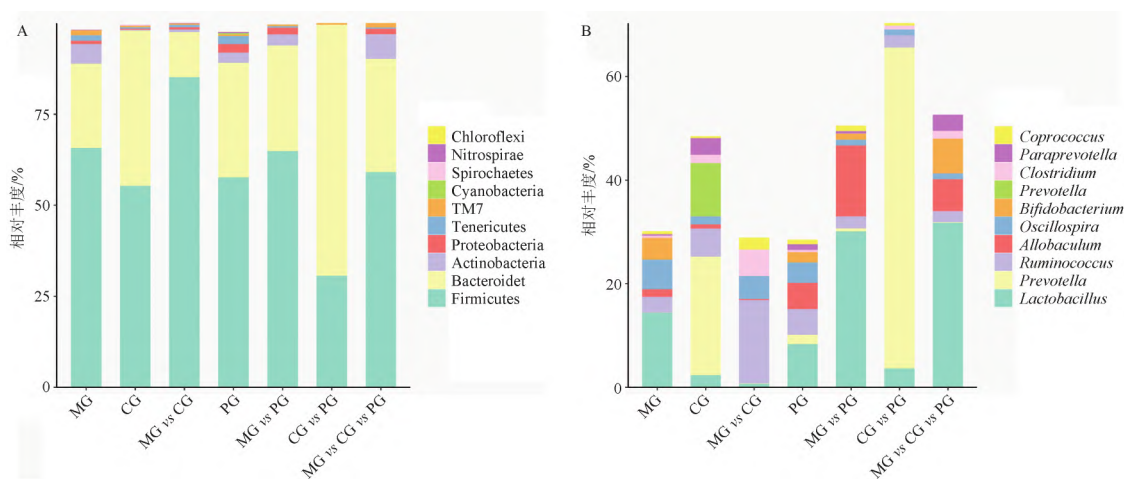
A. α -多样性; B. β -多样性。

图 3 肠道菌群的多样性分析

Fig.3 Diversity analysis of intestinal flora



A. 门水平; B. 属水平(图 5 同)。

图 4 物种在门和属水平上的相对丰度

Fig.4 Relative abundance of species at the phylum and genus levels

了显著的变化,表现在乳杆菌属 *Lactobacillus*、*Allobaculum*、双歧杆菌属 *Bifidobacterium*、帕拉普雷沃菌属 *Paraprevotella* 丰度显著上调,普雷沃菌属 *Prevotella*、瘤胃球菌属 *Ruminococcus* 丰度显著下调,见图 4、5。

3.4.3 LEfSe 分析 LEfSe 分析可以直接对所有分类水平同时进行差异分析;同时,LEfSe 更强调寻找分组之间稳健的差异物种,即标志物种(biomarker)。LEfSe 分析表明,阴性对照组大鼠肠道微生物的标志物种是 *c_Dehalobacterium*、*f_Rikenellaceae*,正常对照组大鼠肠道微生物标志物种是普雷沃菌、*Phascolarctobacterium*,尿毒清颗粒组肠道微生物标志物种是红环菌科 *Rhodocyclaceae*、*Olsenella*、*Betaproteobacteria*(LDA 评分 >2.0 , $P<0.05$),见图 6。

3.4.4 PICRUSt2 功能预测 KEGG 生物代谢通路分析数据库分析结果显示,45 种代谢通路子功能中各组间差异物种涉及到数据丰度较高的代谢通路主要与代谢途径相关,包括氨基酸代谢、次级代谢物的代谢和碳水化合物的代谢等。MetaCyc 代谢数据库结果显示,各组间差异物种涉及到数据丰度较高的代谢通路主要与生物合成途径相关,包括核苷酸和核苷生物合成以及氨基酸生物合成,见图 7。

3.5 血清代谢组学

3.5.1 质量控制(quality control, QC) 本实验在 LC-MS 检测时利用 QC 样本进行质控。理论上, QC 样本都是相同的,但是在样本提取、检测分析过程中会有系统误差,导致 QC 样本间会有差异,差异越小说明方法稳定性越高,数据质量越好,PCA 得分图上 QC 样本密集分布,说明数据可靠,见图 8。

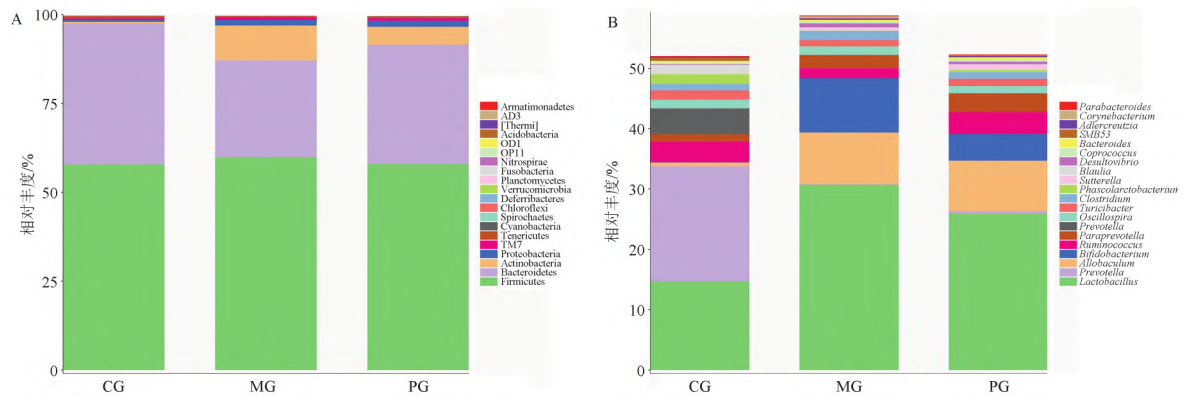


图5 各组大鼠肠道菌群在门和属水平上 top 20 丰度物种

Fig.5 Species of rat intestinal flora with top 20 abundance at the phylum and genus levels in each group

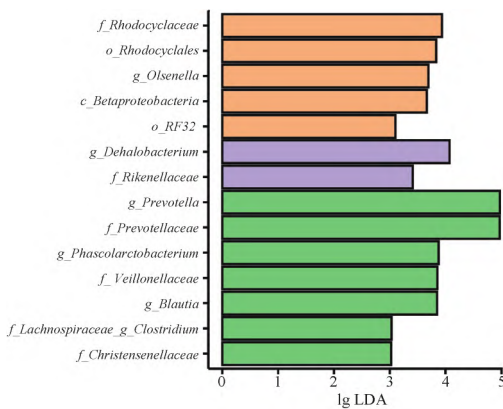


图6 标志物种的 LDA 效应值

Fig.6 LDA effect size of biomarker

3.5.2 正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)

OPLS-DA 结果显示, 各组之间均呈现明显的分离趋势, 且 CKD 大鼠在尿毒清颗粒干预后, 体内代谢物水平有向正常对照组大鼠代谢水平靠近的趋势, 见图 9。

3.5.3 差异代谢物筛选分析 从样本一级物质列表中寻找差异代谢物, 以统计检验中预设的 P 和变量重要性投影 (variable importance for the projection, VIP) 阈值进行筛选^[14-15], 以 $VIP > 1$ 、 $P < 0.05$ 为标准, 共筛选出 119 种与 CKD 相关的差异代谢物。通过尿毒清颗粒干预后有 15 种代谢物发生逆转, 其中 11 种潜在标志代谢物显著上调, 4 种潜在标志代谢

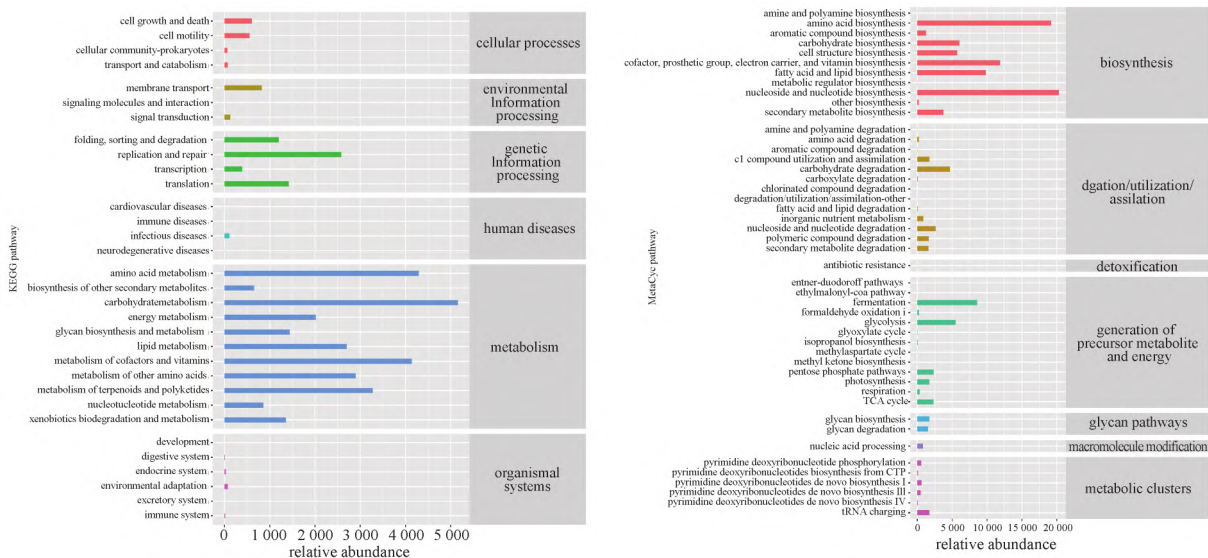
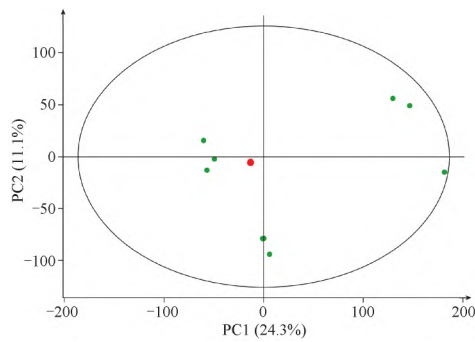


图7 PICRUSt2 功能预测

Fig.7 PICRUSt2 function prediction



红点代表 QC 样本, 绿点代表样本。

图 8 QC 样本 PCA 得分图

Fig.8 PCA score plot of QC sample

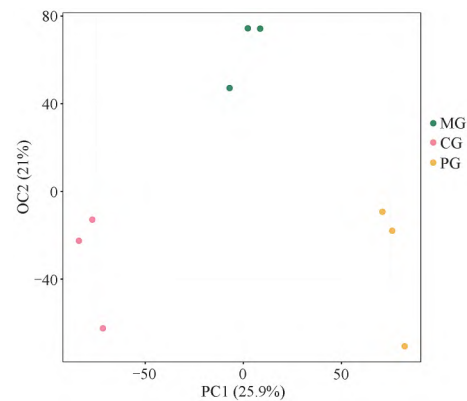


图 9 OPLS-DA 得分图

Fig.9 OPLS-DA score plot

物显著下调, 表现为 L-脯氨酸、1,2,3-三羟基苯、8-羟基喹啉、FAPy-腺嘌呤、L-甲硫氨酸-S-氧化物、5-胍基戊酸-3-甲基-2-氧戊酸钠、黄曲霉素 B1、2,3-二羟基苯甲酸、6-甲基嘌呤、2-巯苯噻唑钾盐、精氨酸

琥珀酸上调, D-别异亮氨酸、D-丙氨酸-D-丝氨酸、肠内酯、黄芩苷下调。与阴性对照组相比, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 慢性肾脏病大鼠的潜在生物学标志代谢物

Table 2 Potential biomarker metabolites in rats with chronic kidney disease

代谢物	类别	CG vs MG			MG vs PG		
		趋势	P	VIP	趋势	P	VIP
L-proline	氨基酸、肽和类似物	↓ ²⁾	0.002 025	1.675 533	↑ ⁴⁾	0.007 367	1.692 338
1,2,3-trihydroxybenzene	酚类和衍生物	↓ ¹⁾	0.014 417	1.566 129	↑ ³⁾	0.049 002	1.471 494
D-allo-isoleucine	氨基酸、肽和类似物	↑ ²⁾	0.002 411	1.628 698	↓ ⁴⁾	0.006 778	1.697 742
8-hydroxyquinoline	喹啉系及其衍生物	↓ ²⁾	0.004 317	1.622 518	↑ ³⁾	0.012 775	1.659 401
FAPy-adenine	嘧啶和嘧啶衍生物	↓ ²⁾	0.001 243	1.678 351	↑ ⁴⁾	0.007 572	1.695 884
D-alanine-D-serine	氨基酸、肽和类似物	↑ ²⁾	0.001 533	1.646 063	↓ ⁴⁾	0.002 200	1.749 972
L-methionine S-oxide	氨基酸、肽和类似物	↓ ²⁾	0.000 016	1.715 693	↑ ³⁾	0.032 711	1.712 595
5-guanidino-3-methyl-2-oxopentanoate	羧酸及其衍生物	↓ ²⁾	0.000 344	1.706 059	↑ ³⁾	0.013 123	1.617 814
enterolactone	酚类化合物	↑ ²⁾	0.001 610	1.669 530	↓ ³⁾	0.017 206	1.642 936
aflatoxin B1	香豆素及其衍生物	↓ ¹⁾	0.029 227	1.438 937	↑ ³⁾	0.013 687	1.629 760
2-pyrocatechuic acid	苯甲酸及其衍生物	↓ ²⁾	0.002 269	1.517 171	↑ ⁴⁾	0.006 270	1.874 252
6-methylmercaptopurine	嘌呤和嘌呤衍生物	↓ ²⁾	0.000 010	1.575 726	↑ ⁴⁾	0.004 480	1.896 755
2(3H)-benzothiazolethione	苯并噻唑类	↓ ²⁾	0.006 440	1.473 327	↑ ³⁾	0.017 419	1.791 172
baicalin	类黄酮苷类	↑ ²⁾	0.001 508	1.529 902	↓ ³⁾	0.043 963	1.662 641
argininosuccinic acid	氨基酸、肽和类似物	↓ ²⁾	0.003 768	1.496 795	↑ ³⁾	0.034 803	1.683 856

3.5.4 KEGG 功能预测 MetPA 数据库通过代谢通路浓缩和拓扑分析, 识别出可能的受生物扰动的代谢通路, 进而对代谢物的代谢通路进行分析。将在 OPLS-DA 模式下筛选出来的潜在生物标志物导入到 MetPA 数据库, 分析差异代谢物的相关代谢通路, 通过路径拓扑分析得到通路的影响值 (impact), 结合超几何分布检验的 P 绘制代谢产物富集结果,

筛选出来 5 条主要的代谢通路, 分别为 β -丙氨酸代谢、精氨酸生物合成、萜类化合物和聚酮化合物的代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢, 见图 10。

3.6 相关性分析

尿毒清颗粒干预后上调的 11 种代谢物与 CKD 大鼠的肠道标志差异菌 *f_Rikenellaceae* 呈显著的正

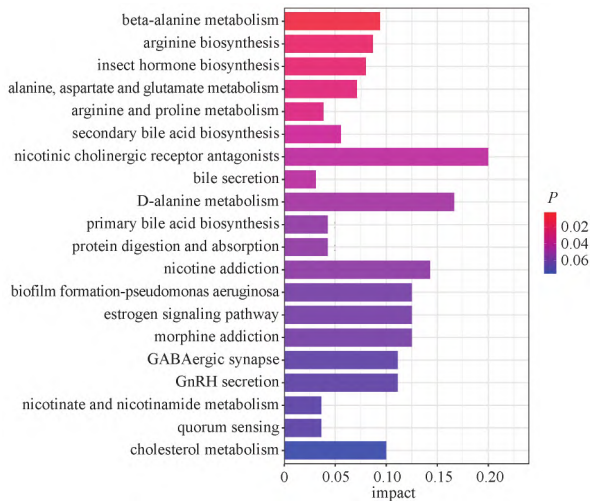


图 10 代谢通路 KEGG 分析

Fig.10 KEGG analysis of metabolic pathways

相关($P < 0.05$),与尿毒清颗粒组大鼠肠道标志差异菌 *Olsenella* 呈显著负相关($P < 0.05$);下调的 4 种差异代谢物呈相反趋势,见图 11。

4 讨论

本研究采用腺嘌呤诱导方法复制了 CKD 的模型,该方法模拟了人类 CKD 的大部分结构和功能变化,并且不需要手术或基因操作^[16]。CKD 增加血清尿素氮、血清肌酐浓度并诱导肾萎缩和纤维化,肾脏明显增大,颜色苍白,肾脏表面有颗粒感,符合临床上肾小球肾炎中“大白肾”的特征,伴有间质炎性浸润和结晶性小管间质沉积,这与人类 CKD 早期发病阶段代偿期症状相似,模拟了人类 CKD 的机制途径^[17]。尿素氮、血肌酐是反映肾脏功能的标志生化指标^[18],尿毒清颗粒的干预可以一定程度地降低尿

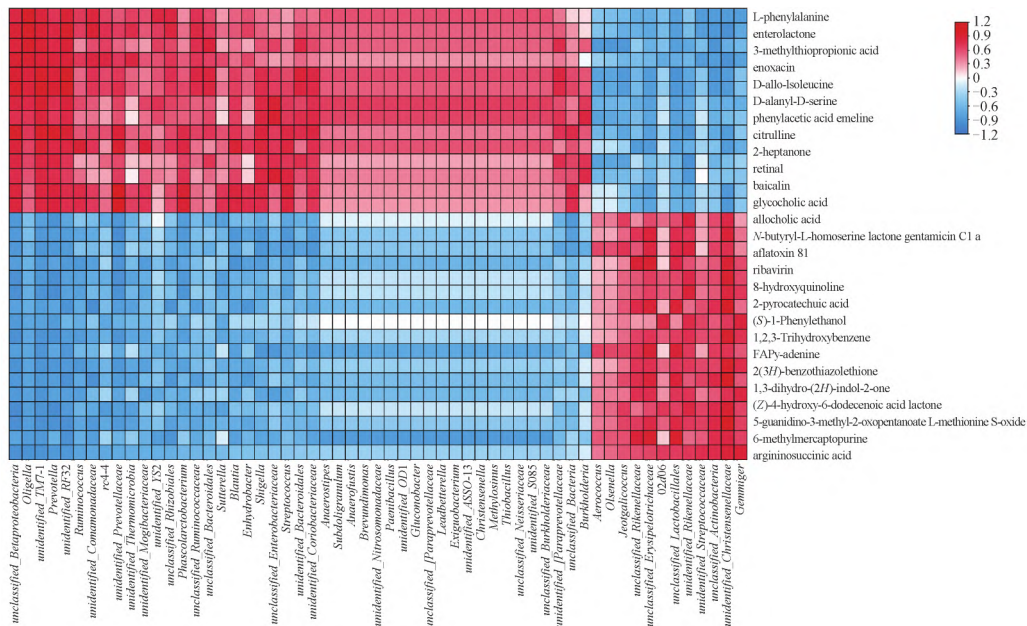


图 11 肠道菌群与差异代谢物 Spearman 相关性热图

Fig.11 Spearman's correlation heat map of intestinal flora and differential metabolites

素氮、血肌酐的水平,反映了尿毒清颗粒可以改善 CKD 大鼠的肾脏功能。

尿毒清颗粒是近年来能延缓 CKD 患者肾功能减退的中药复方制剂的代表。方中生大黄通腑泄浊,使湿浊之邪从大便而出,对肠道菌群结构具有调节作用^[19]。本课题组前期研究发现,白术、茯苓具有健脾利水功效,同样起到调节肠道微生态的作用^[20]。本研究在尿毒清颗粒的干预下,CKD 大鼠的

肠道菌群结构组成也发生了改变。在门水平上,厚壁菌门/拟杆菌门(F/B)是反映肠道菌群紊乱的重要指标,给药后大鼠较 CKD 大鼠 F/B 上升,笔者认为尿毒清颗粒在一定程度上有效缓解了 CKD 大鼠肠道菌群的结构紊乱。通过 LEfSe 分析,发现 CKD 大鼠肠道微生物标志物 *c_Dehalobacterium*,该微生物被报道与体内色氨酸代谢具有密切关系^[21]。肠道菌群在色氨酸代谢期间产生吲哚,由肝脏代谢生

成吡啶硫酸盐,导致肾脏损伤,氧化应激增加引起炎症反应^[22]。而另一标志物种 *Rikenellaceae* 作为拟杆菌门下的理克菌属,被研究证实与肠道屏障功能障碍、炎症反应、严重的肾小球肾炎和全身性自身免疫标志物增加有关^[23]。CKD 大鼠给药后的肠道标志微生物中的欧陆森菌 *Olsenella* 是重要的肠道菌,其产生的芳基乙酸脱羧酶涉及到挥发性化合物对甲酚和粪臭素的代谢过程,特别是对甲酚在 CKD 的发生发展中起到非常重要的作用^[24]。因此腺嘌呤诱导的 CKD 大鼠发病机制可能与肠道屏障破坏、色氨酸代谢失调和炎症反应相关。而尿毒清颗粒可能是在氨基酸代谢过程中起到了调控的作用达到缓解 CKD 的效果。

由于 CKD 肠道菌群相关的代谢物会通过破坏的肠道屏障入血,且相关代谢物相对分子质量太大无法被肾脏清除从而影响肾脏功能^[25-26],因此本研究选取了血清进行代谢组学的检测。采用 LC-MS 比较各组大鼠血清样品的代谢谱,各组间具有差异性,且在尿毒清颗粒的干预下,CKD 大鼠体内代谢水平趋近正常对照组大鼠,说明尿毒清颗粒可能是通过调节体内代谢缓解 CKD。差异代谢物显示通过尿毒清颗粒干预后有 15 种代谢物发生逆转,这些代谢物主要参与了氨基酸类的合成和代谢以及萜类化合物和聚酮化合物的代谢,提示这些通路可能是 CKD 导致改变的靶向通路,而尿毒清颗粒干预可以影响这些通路从而改善 CKD。结合 16S rDNA 检测结果,尿毒清颗粒对 CKD 的作用机制可能与肠道菌群的改善有关,肠道菌群通过调节氨基酸代谢的相关代谢物水平从而改善肾功能、肾脏病理变化、氧化应激和炎症反应。

综上所述,尿毒清颗粒可以改变 CKD 大鼠的肠道菌群,并改变 CKD 大鼠体内的代谢水平,主要涉及氨基酸代谢。而 CKD 大鼠代谢紊乱可能与其肠道菌群改变有关,后续本课题组会结合微生物组学和代谢组学分析联合应用等技术,找出肠道菌群和代谢水平的关联性,进一步阐明尿毒清颗粒改善 CKD 的作用机制。

[参考文献]

- [1] KIDNEY F N. K/doi clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification[J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39: S1.
- [2] SANKOWSKI B, KSIĘŻ ARCZYK K, RAĆKOWSKA E, et al. Higher cerebrospinal fluid to plasma ratio of p-cresol sulfate and

indoxyl sulfate in patients with Parkinson's disease[J]. Clin Chim Acta, 2020, 501: 165.

- [3] 彭印,徐雪君,李建萍,等.靶向肠道菌群调控肠源毒素代谢通路干预慢性肾病进展的治疗策略分析[J].药科学报, 2021, 56(1): 13.
- [4] SINHA A, BAGGA A. Nephrotic syndrome[J]. Indian J Pediatr, 2012, 79(8): 1045.
- [5] CHEN H Y, PAN H C, CHEN Y C, et al. Traditional Chinese medicine use is associated with lower end-stage renal disease and mortality rates among patients with diabetic nephropathy: a population-based cohort study[J]. BMC Complem Altern Med, 2019, 19(1): 1.
- [6] 赵磊,李琼.高效液相色谱法测定尿毒清颗粒中 3 种成分[J].中国医药导报, 2022, 19(12): 112.
- [7] 庄振起,周广宇,尹敏,等.尿毒清治疗慢性肾脏病的基础和临床研究进展[J].中成药, 2015, 37(11): 4.
- [8] LI L Y, HAN J, WU L, et al. Alterations of gut microbiota diversity, composition and metabolomics in testosterone-induced benign prostatic hyperplasia rats[J]. Mil Med Res Military Med Res, 2022, 9(1): 1.
- [9] 凌茜文,于洁琼,彭思远,等.肠道微生物基因组学与代谢组学分析联合应用的研究进展[J].微生物学通报, 2021, 48(4): 1292.
- [10] 侯璐文,吴长新,秦雪梅,等.肠道微生物功能宏基因组学与代谢组学关联分析方法研究进展[J].微生物学报, 2019, 59(9): 1813.
- [11] 郭德玉,敖平,孙淑玲,等.慢性肾功能不全小鼠动物模型的建立[J].中国比较医学杂志, 2001, 11(3): 142.
- [12] 周静,爱民,王朝阳,等.腺嘌呤制作慢性肾功能衰竭大鼠疾病模型[J].内蒙古医学院学报, 2004, 26(4): 248.
- [13] NAIR A, MORSY M A, JACOB S. Dose translation between laboratory animals and human in preclinical and clinical phases of drug development[J]. Drug Dev Res Drug Develop Res, 2018, 79(8): 373.
- [14] KIEFFER D A, PICCOLO B D, VAZIRI N D, et al. Resistant starch alters gut microbiome and metabolomic profiles concurrent with amelioration of chronic kidney disease in rats[J]. Am J Physiol-Renal, 2016, 310(9): F857.
- [15] 付明海,于红珍,包特日格乐,等.基于肠道菌群和代谢组学探讨苦地丁减肥降脂作用机制[J].中国中药杂志, 2022, 47(11): 3049.
- [16] YOKOZAWA T, ZHENG P D, OURA H, et al. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats[J]. Nephron, 1986, 44(3): 230.
- [17] LÓPEZ-NOVOA J M, RODRÍGUEZ-PEÑA A B, ORTIZ A, et al. Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: clinical implications[J]. J Transl Med, 2011, 9(1): 13.
- [18] 祝敏,吴云秋,寿张飞.基于尿液代谢组学技术研究尿毒清颗粒治疗慢性肾功能衰竭的机制[J].浙江大学学报(医学

- 版), 2018, 47(6): 628.
- [19] ZENG Y Q, DAI Z H, LU F H, et al. Emodin via colonic irrigation modulates gut microbiota and reduces uremic toxins in rats with chronic kidney disease [J]. *Oncotargets Ther*, 2016, 7(14): 17468.
- [20] 于洁琼, 彭思远, 凌茜文, 等. 参苓白术散对伴焦虑腹泻型肠易激综合征模型小鼠的改善作用及机制[J]. *中国药房*, 2021, 32(3): 314.
- [21] ZHANG C Y, SHAO H Q, LI D D, et al. Role of tryptophan-metabolizing microbiota in mice diarrhea caused by *Folium sennae* extracts [J]. *BMC Microbiol*, 2020, 20(1): 185.
- [22] HOBBS G P, KARADUTA O, DUSIO G F, et al. Chronic kidney disease and the gut microbiome [J]. *Physiol Med*, 2018, doi: 10.1152/ajprenal.00298.2018.
- [23] WANG H, WANG G D, BANERJEE N, et al. Aberrant gut microbiome contributes to intestinal oxidative stress, barrier dysfunction, inflammation and systemic autoimmune responses in MRL/lpr mice [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 981.
- [24] LU Q, WEI Y F, LIN L Y, et al. The glycyl radical enzyme arylacetate decarboxylase from *Olsenella scatoligenes* [J]. *ACS Catal*, 2021, 11(9): 5789.
- [25] YANG K, DU C H, WANG X M, et al. Indoxyl sulfate induces platelet hyperactivity and contributes to chronic kidney disease-associated thrombosis in mice [J]. *Blood*, 2017, 129(19): 2667.
- [26] 王英明, 李建省, 闫燕顺, 等. 肠道菌群与慢性肾衰竭的相互作用及中药干预研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(16): 261.

[责任编辑 马超一]