

高氧导致小鼠肠道代谢紊乱

张文 陈涛 付豹 陈华军 傅小云 邢周雄

遵义医科大学附属医院重症医学教研室, 重症医学科, 贵州遵义 563003

通信作者: 邢周雄, Email: xingzhouxiong111@126.com

【摘要】 目的 探讨高氧对小鼠肠道代谢组的影响。**方法** 将 16 只 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为高氧组和对照组, 每组 8 只。高氧组暴露在 80% O₂ 中 14 d; 对照组在室内空气中条件饲养 14 d。将小鼠麻醉并安乐死, 收集盲肠内容物, 通过液相色谱-质谱 (LC-MS) 联合检测进行非靶向代谢组学分析。采用正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)、火山图分析、热图分析及京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 分析高氧对代谢的影响。**结果** ① OPLS-DA 分析显示, R²Y 为 0.967, Q² 为 0.796, 表示该模型为可靠模型。② 火山图及热图分析显示, 两组中代谢物表达水平差异具有统计学意义, 其中上调代谢物 541 个, 下调代谢物 64 个, 907 个无差异, 而升高的 5-羟基-L-赖氨酸是高氧诱导的最显著的差异代谢物。③ KEGG 通路富集分析表明, 卟啉和叶绿素代谢 ($P=0.005$)、赖氨酸降解 ($P=0.047$) 及芳香族化合物降解 ($P=0.024$) 是受高氧影响的靶点。④ 通过 KEGG 富集代谢途径对代谢产物进行差异分析显示, 高氧对卟啉和叶绿素、赖氨酸以及苯、邻甲酚等芳香族化合物的代谢具有显著影响。**结论** 高氧显著诱导了小鼠肠道代谢紊乱, 其增强了卟啉和叶绿素的代谢, 抑制了赖氨酸的降解, 并延缓了苯、邻甲酚等芳香族化合物的降解。

【关键词】 氧疗; 高氧; 肠道代谢组

基金项目: 贵州省卫生健康委科学技术基金项目 (gzwkj2023-009); 贵州省科技计划项目 (2022-179)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230607-00427

Hyperoxia caused intestinal metabolism disorder in mice

Zhang Wen, Chen Tao, Fu Bao, Chen Huajun, Fu Xiaoyun, Xing Zhouxiong

Intensive Care Medicine Teaching and Research Office, Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou, China

Corresponding author: Xing Zhouxiong, Email: xingzhouxiong111@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of hyperoxia on intestinal metabolomics in mice. **Methods** Sixteen 8-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into hyperoxia group and control group, with 8 mice in each group. The hyperoxia group was exposed to 80% oxygen for 14 days. Mice were anesthetized and euthanized, and cecal contents were collected for untargeted metabolomics analysis by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) combined detection. Orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA), volcano plot analysis, heat map analysis, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) were used to analyze the effects of hyperoxia on metabolism. **Results** ① OPLS-DA analysis showed that R²Y was 0.967 and Q² was 0.796, indicating that the model was reliable. ② Volcano plot and heat map analysis showed significant statistical differences in the expression levels of metabolites between the two groups, with 541 up-regulated metabolites, 64 down-regulated metabolites, and 907 no differences, while the elevated 5-hydroxy-L-lysine was the most significant differential metabolite induced by high oxygen. ③ KEGG pathway enrichment analysis showed that porphyrin and chlorophyll metabolism ($P=0.005$), lysine degradation ($P=0.047$), and aromatic compound degradation ($P=0.024$) were the targets affected by hyperoxia. ④ Differential analysis of metabolic products through KEGG enrichment pathway showed that hyperoxia had a significant impact on the metabolism of porphyrin and chlorophyll, lysine, and aromatic compounds such as benzene and o-cresol. **Conclusions** Hyperoxia significantly induces intestinal metabolic disorders. Hyperoxia enhances the metabolism of porphyrins and chlorophyll, inhibits the degradation of lysine, and delays the degradation of aromatic compounds such as benzene and o-cresol.

【Key words】 Oxygen therapy; Hyperoxia; Intestinal metabolomics

Fund program: Guizhou Provincial Health Commission Science and Technology Fund Project (gzwkj2023-009); Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project (2022-179)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230607-00427

氧疗是重症监护医学的基石, 患者通常暴露于高氧状态, 而高氧可导致肺部、心脏和大脑损伤, 并且增加患者的病死率。肠道及其微生物组在危重疾病中发挥着关键作用, 但高氧对肠道及其微生物群的影响尚不清楚。肠道菌群亦是人体肠道的功能屏障。赵赫等^[1]研究表明, 脓毒症模型小鼠存在肠道

菌群紊乱、菌群多样性及优势菌减少, 并随疾病进展而发生变化。近年来, 肠道菌群通过微生物-肠-脑轴的研究越来越多, 肠道菌群与疾病发生发展密切相关^[2-3]。并有研究证据强调了高氧对肠道微生物群的影响^[4-6]。共生肠道微生物通过消化营养物质和提供血液循环中的必需代谢物, 对宿主的生理

功能作出贡献^[5]。肠道稳态在危重症中起着关键作用,与肠道屏障衰竭相关的肠道损伤在重症监护病房中很常见,氧疗也对细菌的生理和生态发挥作用^[6-7]。小鼠肠腔内氧浓度极低;在吸入高氧后,肠腔内的氧浓度也相应升高^[8-9]。绝大部分肠道菌群由严格厌氧菌组成,因此高氧会改变肠道菌群的结构和功能^[7]。此外有研究显示,高压氧治疗(2个标准大气压、每日2 h、持续9 d)可引起小鼠肠道菌群紊乱,使严格厌氧菌显著减少^[10-11]。然而,高氧对肠道代谢组的影响尚不清楚。本研究旨在探讨高氧对小鼠肠道代谢组的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物:8周龄雄性C57BL/6小鼠购自南京集萃药康生物科技公司,动物合格证号:SYXK(苏)2018-0027。所有小鼠在特定无病原体条件下饲养。

1.2 动物分组与制模:按随机数字表法将小鼠分为高氧组 and 对照组,每组8只。高氧组小鼠暴露于充满80% O₂的氧箱中饲养14 d;对照组则在室内空气中饲养14 d。麻醉小鼠并处以安乐死,取盲肠内容物进行非靶向代谢组学分析。本实验中动物处置方法符合动物伦理学要求,研究方案得到遵义医科大学动物护理和使用委员会的批准(审批号:2021418)。

1.3 液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)联合检测方法

1.3.1 代谢物提取:称取50 mg样本离心15 min,取上清置于小离心管中,在真空浓缩器中干燥提取物,加入160 μL提取液复溶,于4℃下离心15 min,提取样本于正、负离子模式下上机检测。

1.3.2 质谱条件:沃特世Xevo G2-XS QTof高分辨质谱仪能够在采集软件(MassLynx V4.2)控制下的MSe模式进行一级、二级质谱数据采集。在每个数据采集循环中,能够同时对低碰撞能量2 V及高碰撞能量10~40 V进行双通道数据采集。

1.3.3 数据处理:将MassLynx V4.2软件采集的原始数据通过Progenesis QI软件进行峰提取、峰对齐等数据处理操作,基于Progenesis QI软件于在线METLIN数据库及百迈客自建库进行鉴定,同时进

行理论碎片识别。

1.4 统计学分析:采用正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least square discriminant analysis, OPLS-DA)获取差异代谢物的组间差异信息,利用R软件包ropls进行OPLS-DA模型计算,并评估模型的可靠性;火山图分析可以快速查看代谢物在两组中表达水平的差异,以及差异的显著性;热图可比较分析各组之间差异代谢物的关系;京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库有助于将基因、表达信息以及代谢物含量作为一个整体网络进行研究,并在生物体内进行差异代谢物的相互作用,形成不同的通路,利用KEGG数据库对差异代谢物进行注释,使用R版本3.8.0软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用Student *t*检验分析标志物KEGG通路中的差异代谢产物。

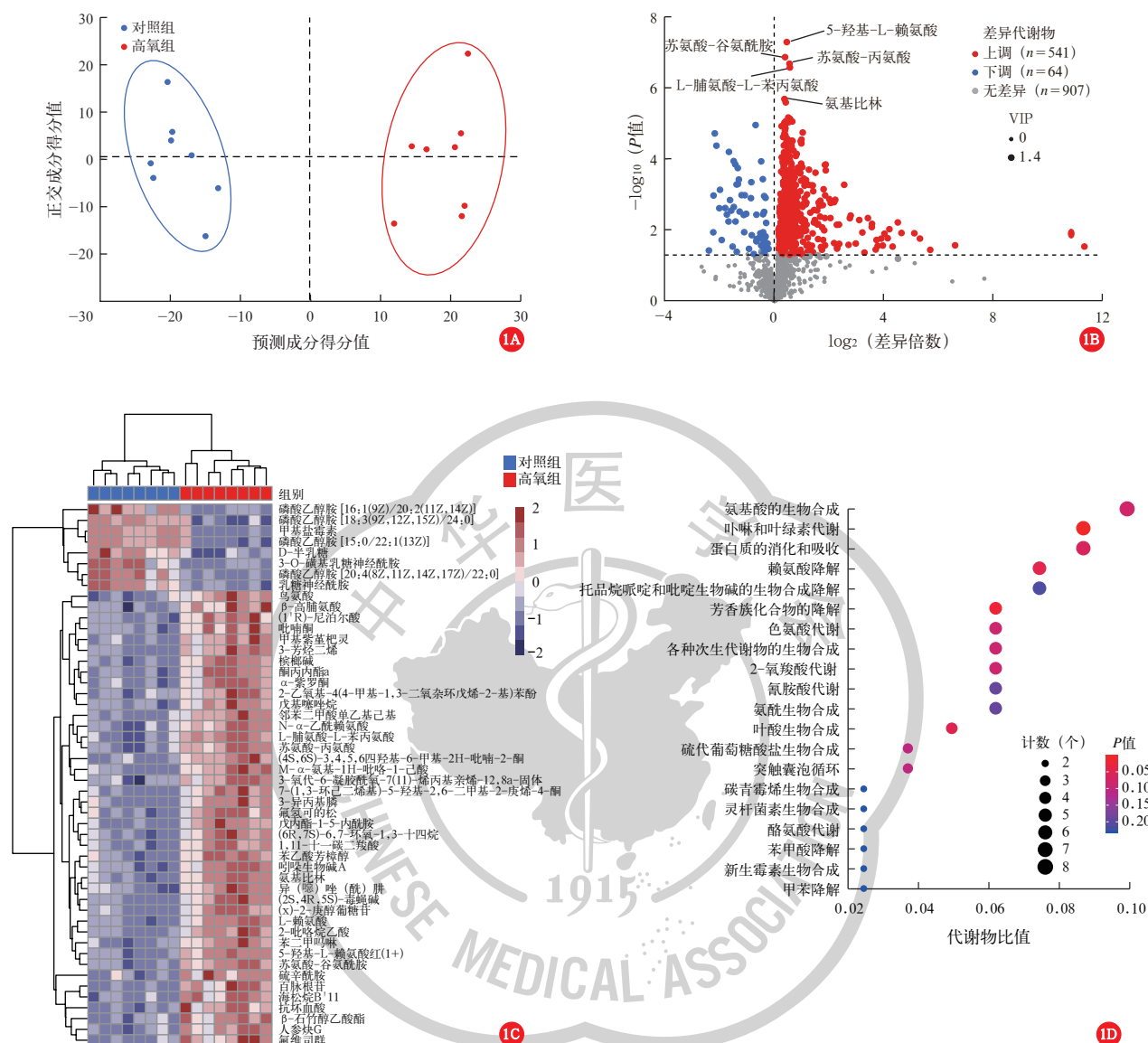
2 结果

2.1 高氧组与对照组的聚类分离与差异分析:基于代谢物的筛选,通过OPLS-DA分析去掉代谢物中与分类变量不相关的正交变量,并对非正交变量和正交变量分别进行分析,从而获取差异代谢物的组间差异,结果显示, R^2Y 为0.967, Q^2 为0.796,表示该模型为可靠模型(图1A)。通过火山图可以快速查看两组中差异代谢物,其中升高的5-羟基-L-赖氨酸是高氧诱导最显著的差异代谢物(图1B)。热图分析显示了高氧诱导投影(variable importance of projection, VIP)值前50种潜在的差异代谢物(图1C)。再通过KEGG通路富集分析表明,卟啉和叶绿素代谢($P=0.005$)、赖氨酸降解($P=0.047$)及芳香族化合物降解($P=0.024$)是受高氧影响的靶点(图1D)。

2.2 3种差异代谢物分析:通过KEGG富集代谢途径对代谢物进行差异分析显示,高氧增强了卟啉和叶绿素的代谢,并富集了胆红素和D-尿胆红素等代谢产物(表1)。高氧钝化了赖氨酸降解,富集了代谢底物如L-赖氨酸和N6-乙酰-L-赖氨酸(表2)。高氧延缓了苯、邻甲酚等芳香族化合物的降解(表3)。

表1 对照组与高氧组小鼠盲肠卟啉和叶绿素代谢过程中差异代谢物丰度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	胆红素 ($\times 10^{-4}$)	D-尿胆原 ($\times 10^{-4}$)	胆红素葡萄糖 醛酸($\times 10^{-5}$)	四氢中胆红素原 ($\times 10^{-2}$)	D-尿胆红素 ($\times 10^{-5}$)	L-谷氨酸 ($\times 10^{-3}$)	甘氨酸 ($\times 10^{-5}$)
对照组	8	1.140±0.867	0.795±0.307	0.647±0.638	2.000±4.200	0.906±0.723	1.310±0.394	1.660±0.199
高氧组	8	2.700±1.340	1.670±0.523	2.280±0.986	3.570±0.950	2.760±1.190	2.090±0.397	2.050±0.276
<i>t</i> 值		2.777	4.024	3.930	4.279	3.762	3.897	3.241
<i>P</i> 值		0.015	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.006



注: A 为正向偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 显示两组间的簇分离; B 为两组间差异代谢物的火山图; C 为热图分析两组高氧诱导投影 (VIP) 值前 50 种差异代谢物的变化; D 为两组差异代谢物的京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路分析

图 1 高氧组与对照组非靶向盲肠代谢组学分析

表 2 对照组与高氧组小鼠盲肠赖氨酸降解过程中差异代谢物丰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	L- 哌可酸 ($\times 10^{-4}$)	哌可酸 ($\times 10^{-4}$)	5- 氨基戊醛 ($\times 10^{-4}$)	N6- 乙酰 -L- 赖氨酸 ($\times 10^{-5}$)	L- 赖氨酸 ($\times 10^{-5}$)	甘氨酸 ($\times 10^{-5}$)
对照组	8	3.350 $\pm$ 0.988	1.510 $\pm$ 0.266	0.811 $\pm$ 0.175	1.440 $\pm$ 0.295	5.350 $\pm$ 0.322	1.660 $\pm$ 0.199
高氧组	8	5.750 $\pm$ 1.580	2.080 $\pm$ 0.367	1.350 $\pm$ 0.335	1.840 $\pm$ 0.223	7.120 $\pm$ 0.511	2.050 $\pm$ 0.276
t 值		3.721	3.522	3.995	3.038	8.302	3.241
P 值		0.002	0.003	0.001	0.009	<0.001	0.006

表 3 对照组与高氧组小鼠盲肠芳香族化合物降解过程中差异代谢物丰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	邻苯二甲酸 ($\times 10^{-4}$)	4- 羟基苯甲酸 ($\times 10^{-5}$)	邻甲酚 ($\times 10^{-6}$)	间二甲苯 ($\times 10^{-6}$)	苯 ($\times 10^{-5}$)
对照组	8	4.850 $\pm$ 0.437	1.700 $\pm$ 0.121	7.360 $\pm$ 0.689	7.850 $\pm$ 0.895	1.230 $\pm$ 0.165
高氧组	8	5.430 $\pm$ 0.499	1.900 $\pm$ 0.166	9.210 $\pm$ 0.921	9.640 $\pm$ 1.300	1.810 $\pm$ 0.453
t 值		2.511	2.872	4.559	3.207	3.000
P 值		0.025	0.012	<0.001	0.006	0.005

3 讨论

氧疗广泛应用于重症患者中。然而,氧疗会增加患者吸入氧浓度的比例,过度氧疗会对患者预后造成严重且不可逆的影响。因此,氧疗也成为重症患者治疗措施中的一把“双刃剑”^[12-13]。氧气可以通过多种设备输送给患者,包括鼻插管、文丘里面罩、再呼吸和非再呼吸面罩、Ambu 袋、机械通气机以及体外膜肺氧合(extracorporeal membrane oxygenation, ECMO),通常会导致 3 种类型的高氧,即肺泡高氧(肺高氧)、全身高氧和局部高氧(如下半身高氧,静脉-动脉 ECMO 时)^[14-15]。氧中毒曾经被认为是肺部特有的^[16-17]。但本课题组前期研究表明,高氧会迅速引发肠道损伤和肠道生态失调,其标志是耐氧病原体(肠杆菌科)增加和有益的专性厌氧菌减少^[18]。本研究中通过 OPLS-DA 分析显示,将小鼠置于 80% O₂ 中 14 d 诱导高氧模型为可靠模型;火山图及热图分析显示,高氧组与对照组中代谢物表达水平差异具有统计学意义。

卟啉和叶绿素是地球上生命的关键色素,在动物血红素代谢和氧化光细菌的叶绿素代谢中起关键作用^[7]。本研究中非靶向盲肠代谢组学分析显示高氧组与对照组之间的簇分离。火山图确定了高氧组与对照组之间的差异代谢物,并提示 5-羟基-L-赖氨酸、苏氨酸-谷氨酰胺、苏氨酸-丙氨酸、L-脯氨酸-L-苯丙氨酸、氨基比林 5 种代谢物。热图分析显示高氧诱导 VIP 值前 50 种差异代谢物的变化。KEGG 通路分析显示高氧改变的显著标志通路,即卟啉和叶绿素代谢。高氧会改变小鼠的肠道代谢组,在高氧条件下,卟啉和叶绿素代谢途径的增强可能会影响宿主和肠道微生物的生理功能。赖氨酸是一种不可缺少的必需氨基酸,大多数高等动物自身都不能合成赖氨酸^[5]。本研究显示,高氧可能通过毒性芳香族化合物在胃肠道的积累而对宿主产生负面影响。最后通过 KEGG 通路富集分析表明,卟啉和叶绿素代谢、赖氨酸降解及芳香族化合物降解是受高氧影响的靶点。高氧可能通过钝化肠道赖氨酸的降解而影响宿主对蛋白的吸收和合成,肠道菌群参与了环境污染物的降解,尤其是芳香化合物的降解^[19]。

4 结论

本研究强调了高氧对小鼠肠道代谢组的显著影响。高氧显著诱导肠道代谢紊乱,增强了卟啉和叶绿素的代谢,钝化了赖氨酸的降解,延缓了苯、邻甲

酚等芳香族化合物的降解。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵赫,匡重伸,李芳,等. 脓毒症模型小鼠的肠道菌群组成与变化[J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (1): 10-16. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200814-00579.
- [2] 廖宏森,李浩甲,斯妍娜,等. 肠道菌群通过胞葬影响脓毒症相关性脑病的研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2022, 34 (2): 194-197. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210525-00779.
- [3] 李素彦,许宁,花然亮,等. 粪菌移植通过肠道菌群调节脓毒症大鼠脑皮层胆碱能抗炎通路[J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31 (9): 1102-1107. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.09.009.
- [4] Ashley SL, Sjoding MW, Popova AP, et al. Lung and gut microbiota are altered by hyperoxia and contribute to oxygen-induced lung injury in mice[J]. Sci Transl Med, 2020, 12 (556): eaa9959. DOI: 10.1126/scitranslmed.aau9959.
- [5] 汪娟,黄栋,莫连芹,等. 高氧环境下肺细胞形态及功能变化[J]. 中华危重病急救医学, 2018, 30 (8): 737-742. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.08.005.
- [6] 张小晓,庄苗,陈苏衡,等. 富氧水对高氧环境小鼠肠道屏障和菌群的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34 (4): 388-393, 399. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.202204003.
- [7] Briat F, Le Lay A, Dumas ME, et al. Implication of gut microbiota metabolites in cardiovascular and metabolic diseases[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75 (21): 3977-3990. DOI: 10.1007/s00018-018-2901-1.
- [8] Schmidt TM, Kao JY. A little O₂ may go a long way in structuring the GI microbiome[J]. Gastroenterology, 2014, 147 (5): 956-959. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.09.025.
- [9] Albenberg L, Esipova TV, Judge CP, et al. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota[J]. Gastroenterology, 2014, 147 (5): 1055-1063. e8. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.07.020.
- [10] Bonkovsky HL, Guo JT, Hou WH, et al. Porphyrin and heme metabolism and the porphyrias[J]. Compr Physiol, 2013, 3 (1): 365-401. DOI: 10.1002/ephy.c120006.
- [11] Matthews DE. Review of lysine metabolism with a focus on humans[J]. J Nutr, 2020, 150 (Suppl 1): 2548S-2555S. DOI: 10.1093/jn/nxaa224.
- [12] Hafner S, Beloncle F, Koch A, et al. Hyperoxia in intensive care, emergency, and peri-operative medicine: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? A 2015 update[J]. Ann Intensive Care, 2015, 5 (1): 42. DOI: 10.1186/s13613-015-0084-6.
- [13] 郭海凌,孙丹丹,隆云. 重症患者高氧血症研究进展[J]. 中国实用内科杂志, 2017, 37 (2): 155-158. DOI: 10.19538/j.nk2017020118.
- [14] Cousins JL, Wark PAB, McDonald VM. Acute oxygen therapy: a review of prescribing and delivery practices[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2016, 11: 1067-1075. DOI: 10.2147/COPD.S103607.
- [15] Brodie D, Bacchetta M. Extracorporeal membrane oxygenation for ARDS in adults[J]. N Engl J Med, 2011, 365 (20): 1905-1914. DOI: 10.1056/NEJMed1103720.
- [16] 汪璠,雷小平,康兰,等. 高氧抑制 SIRT1 和 PGC-1 α 表达引起肺泡上皮细胞线粒体功能障碍[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2020, 36 (9): 788-793. DOI: 10.13423/j.cnki.cjmi.009064.
- [17] 梁木林,刘成军,党红星. 高氧肺损伤相关信号通路研究[J]. 医学研究学报, 2018, 31 (12): 1333-1339. DOI: 10.16571/j.cnki.1008-8199.2018.12.023.
- [18] Li YH, Tao YF, Xu JY, et al. Hyperoxia provokes time- and dose-dependent gut injury and endotoxemia and alters gut microbiome and transcriptome in mice[J]. Front Med (Lausanne), 2021, 8: 732039. DOI: 10.3389/fmed.2021.732039.
- [19] Wang DL, Ren JB, Tan ZY, et al. Gut microbial profiles in *Nereis succinea* and their contribution to the degradation of organic pollutants[J]. Environ Sci Technol, 2020, 54 (10): 6235-6243. DOI: 10.1021/acs.est.9b07854.

(收稿日期: 2023-06-07)

(责任编辑: 保健媛 张耘菲 李银平)