

·基础研究·

宏基因组联合UPLC-Q-TOF-MS/MS探讨地塞米松对大鼠肺炎的作用机制

李四菊¹, 张倩¹, 冷云¹, 潘碧妍², 谢智勇¹, 陈红英^{2,3}

(1. 中山大学药学院(深圳), 广东深圳 518107; 2. 广州白云山明兴制药有限公司, 广东广州 510000; 3. 中南大学湘雅医院临床药理研究所, 湖南长沙 410008)

摘要:【目的】基于多组学技术,探讨地塞米松(Dex)能否通过调节肠道菌群及代谢物治疗肺炎。【方法】将18只Sprague-Dawley大鼠随机均分为对照(Control)组、模型(Model)组和地塞米松(Dex)组,每组6只,除Control组外,余下两组持续使用4 mg/kg的脂多糖(LPS)腹腔注射7 d建立大鼠肺炎模型。然后Dex组给予2 mg/kg的Dex灌胃治疗12 d,余下两组均连续灌胃等量的无菌PBS缓冲液12 d。第19 d时收集大鼠的肺组织、血浆、粪便和肠道内容物。苏木精-伊红(H&E)染色和Bio-plex悬浮芯片系统评价Dex的药效。宏基因组测序和超高效液相色谱串联四极杆飞行时间高分辨率质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)技术分别测定大鼠的肠道菌群和代谢物。【结果】H&E染色结果显示Model组大鼠肺组织炎症细胞浸润增加,肺泡间隔增大,肺泡出血,给予Dex治疗后肺组织病变得以缓解。与Control组相比,Model组中的3种炎症因子TNF- α ($P < 0.0001$)、IL-1 α ($P = 0.0096$)和IL-6($P < 0.0001$)含量升高,Dex治疗后能降低3种炎症因子水平。综上所述,Dex给药能有效的缓解肺炎大鼠的症状。宏基因组分析表明3组大鼠的肠道菌群结构改变,与Model组相比,Dex组厚壁菌门的相对丰度升高,厚壁菌门/拟杆菌门比例增加,双歧杆菌科、毛螺菌科和乳酸杆菌科积累。多变量统计分析显示Model组和Dex组极大的分离,揭示代谢轮廓改变。此外,Model组与Dex组筛选出69个($P < 0.05$)差异代谢物,包括Model组中上调的38个代谢物和Dex组上调的31个代谢物,这些差异代谢物主要参与了亚油酸代谢、色氨酸代谢和初级胆汁酸生物合成这3条代谢通路。【结论】我们证明了Dex对肺炎大鼠的有益作用,与此同时,宏基因组学联合UPLC-Q-TOF-MS/MS非靶标代谢组学,揭示了Dex通过调节肠道菌群和宿主代谢物治疗LPS诱导的大鼠肺炎,本研究可能为Dex治疗大鼠肺炎的作用机制提供新见解。

关键词:肺炎;地塞米松;肠道菌群;代谢组学;超高效液相色谱串联四极杆飞行时间高分辨率质谱

中图分类号:R563.1;R-332 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2023)02-0232-12

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ.(med.sci).2023.0207

Integrated Metagenomics and UPLC-Q-TOF-MS/MS to Explore the Mechanism of Dexamethasone on Pneumonia in Rats

LI Si-ju¹, ZHANG Qian¹, LENG Yun¹, PAN Bi-yan², XIE Zhi-yong¹, CHEN Hong-ying^{2,3}

(1. School of Pharmaceutical Sciences (Shenzhen), Shenzhen Campus of Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China;

2. Guangzhou Baiyunshan Mingxing Pharmaceutical Co., Ltd. Guangzhou 510000, China; 3. Department of Clinical Pharmacology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Correspondence to: XIE Zhi-yong, E-mail: xiezhy@mail.sysu.edu.cn; CHEN Hong-ying, E-mail: 2215183393@qq.com

Abstract: 【Objective】 Using multi-omics technology, we conducted the present study to determine whether dexa-

收稿日期:2022-11-01

基金项目:国家自然科学基金(U1903211,82174104)

作者简介:李四菊,硕士生,研究方向:肠道微生物生态学,非靶标代谢组学,E-mail: lisj39@mail2.sysu.edu.cn;谢智勇,通信作者,博士,教授,研究方向:代谢组学、肠道微生物生态学,E-mail: xiezhy@mail.sysu.edu.cn;陈红英,通信作者,高级工程师,研究方向:中药产品开发与中药药理,E-mail: 2215183393@qq.com

methasone has therapeutic effect on pneumonia rats through the regulation of intestinal flora and metabolites.【Methods】Totally 18 Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups ($n = 6$ each): Control group, Model group and Dexamethasone (Dex) group. Lipopolysaccharide (LPS) was continuously injected intraperitoneally into rats at a dose of 4 mg/kg for 7 days to induce pneumonia except the Control group. Then the Dex group was given Dex at a dose of 2 mg/kg via oral gavage for 12 days, and both the other two groups received continuously equal volume of sterile PBS buffer for 12 days. On the 19th day, lung, plasma, feces and intestinal contents of rat were collected. Hematoxylin-eosin (H&E) staining and Bio-plex suspension chip system were applied to evaluate the effect of Dex on pneumonia. Furthermore, metagenomic sequencing and UPLC-Q-TOF-MS/MS technology were employed to determine the intestinal flora and metabolites of rats, respectively.【Results】H&E staining results showed that the lung tissue of the Model group was infiltrated with inflammatory cells, the alveolar septum was increased, alveolar hemorrhage, and histological lesions were less severe in Dex group than in the model group. The levels of 3 inflammatory cytokines including TNF- α ($P < 0.000 1$), IL-1 α ($P = 0.009 6$) and IL-6 ($P < 0.000 1$) in the Model group were increased compared with the Control group, while Dex treatment reduced the levels of the three inflammatory factors. Taken together, Dex treatment effectively reversed the features of pneumonia in rats. Metagenomic analysis revealed that the intestinal flora structure of the three groups of rats was changed. In contrast with the Model group, an increasing level of the Firmicutes and an elevated proportion of Firmicutes/Bacteroidetes were observed after Dex treatment. Dex-treated rats possessed notably enrichment of Bifidobacterium, Lachnospiraceae and Lactobacillus. Multivariate statistical analysis showed a great separation between Model group and Dex group, indicating metabolic profile changes. In addition, 69 metabolites ($P < 0.05$) were screened, including 38 up-regulated in the Model group and 31 elevated in the Dex group, all of which were mainly involved in 3 metabolic pathways: linoleic acid metabolism, tryptophan metabolism and primary bile acid biosynthesis.【Conclusions】In summary, we demonstrate the beneficial effects of Dex on the symptoms of pneumonia. Meanwhile, integrated microbiome-metabolome analysis reveals that Dex improves LPS-induced pneumonia in rats through regulating intestinal flora and host metabolites. This study may provide new insights into the mechanism of Dex treatment of pneumonia in rats.

Key words: pneumonia; dexamethasone; intestinal flora; metabolomics; UPLC-Q-TOF-MS/MS

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(2): 232-243]

肺炎是一类由多种因素引起的呼吸道感染疾病,作为全球第四大致死疾病^[1],引起人们广泛的关注。地塞米松(dexamethasone, Dex)具有抗炎、抗内毒素和抑制免疫等广泛的药理作用^[2],已被用于治疗包括肺炎在内的多种呼吸系统的疾病^[3],但Dex治疗肺炎的机制暂不明确。“肺-肠”轴在肺部疾病的发生与发展中起重要作用,研究证实,大鼠肺部疾病与肠道菌群失调有关^[4],表现为肠道菌群的结构紊乱,包括有益菌丰度的降低和致病菌丰度的升高。在脓毒症和急性呼吸窘迫综合征中观察到,细菌从胃肠道向肺部的移位,屏障完整性受到损害^[5],而益生菌致力于保护肠道屏障,可减少细菌的移位从而预防感染^[6]。因此,对肠道微生物的干预将是预防和治疗肺炎的新思路之一。使用宏基因组研究Dex治疗大鼠肺炎时肠道菌群的变化,获得的差异菌群可能为影响大鼠肺炎发生与发展

的关键菌群,通过调节菌群的结构可能会缓解大鼠肺炎。除肠道菌群紊乱外,肺炎患者体内还观察到代谢紊乱。一研究表明,与健康儿童相比,患有肺炎的儿童中发现代谢异常,尤其甘油磷脂和脂肪酰基类代谢物升高,这些关键差异代谢物有助于反映机体的生理及病理状态^[7]。本研究基于代谢组学鉴定肺炎治疗前后的差异代谢物,可为肺炎的治疗寻找到潜在的代谢标志物。宏基因组结合代谢组学,可克服单一组学的局限性,为肠道微生物和代谢物在肺炎的发生与进展关系提供更全面的信息。目前关于Dex在体内治疗肺炎的分析主要集中在其免疫调节作用^[8],忽视了肠道菌群和宿主代谢物的影响。基于此,我们首次从肠道菌群及代谢物的角度出发,探讨Dex治疗大鼠肺炎的潜在作用机制。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

大肠杆菌 055:B5 的脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS, 美国 Sigma-Aldrich 公司), Bio-Rad 3 炎症因子试剂盒(美国 Bio-Rad 公司), ACQUITY HSS T3 色谱柱(美国 waters 公司), 超高效液相色谱串联四极杆飞行时间高分辨率质谱仪(Ultra Performance Liquid Chromatography-Quadrupole-Time Of Flight-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS/MS, 美国 waters 公司)。

1.2 实验动物和样本收集

成年的 SPF 级 SD 雄性大鼠, 体质量 170 g~200 g(珠海百试通生物科技有限公司), 动物生产许可证号为 SCXK(粤)2020-0051, 将动物置于环境温度(21 ± 1) °C, 相对湿度 35%~75%, 光照 12 h, 黑暗 12 h 的动物房中, 整个实验操作遵循中山大学动物实验中心的伦理要求(伦理批准号: SYSU-IACUC-2021-000511)。大鼠适应性喂养 7 d 后, 18 只大鼠随机均分为 3 组: 对照(Control)组、模型(Model)组和地塞米松(Dex)组, 每组 $n = 6$, 除 Control 组外, 余下两组持续使用 4 mg/kg 的 LPS 腹腔注射 7 d 建立大鼠肺炎模型, Dex 组给予 2 mg/kg 的 Dex 灌胃治疗 12 d, Control 组和 Model 组均连续灌胃等量的无菌 PBS 缓冲液处理 12 d。第 19 d 时, 使用 2% 的戊巴比妥钠腹腔注射大鼠, 麻醉后处死, 同时收集大鼠的肺组织、血浆样本、粪便和肠道内容物。

1.3 生理指标的测定

收集右上肺组织, 放入 40 g/L 的多聚甲醛溶液中固定, 使用 H&E 染色并对肺组织完成病理学检查。血浆样本 IL-6、TNF- α 和 IL-1 α 的定量检测使用 Bio-Rad 3 炎症因子试剂盒, 按照说明书完成操作。

1.4 宏基因组测序

随机选取大鼠粪便(每组 3 只), CTAB 法提取 Control 组、Model 组和 Dex 组的粪便 DNA, 使用 Illumina HiSeq 测序平台对合格的 PCR 产物测序分析(广州基迪奥生物科技有限公司), 测序后的原始 reads 过滤掉接头序列、低质量 reads 和不清楚的碱基, 基于大鼠的参考基因组消除大鼠的 DNA, 得到高质量的序列, 得到的高质量序列经过 SOAP2 拼

接后, 与基因目录对比, 确定基因的丰度, 依据得到的数据完成各层次上物种水平的注释、物种的丰富度和均匀度分析, 使用 KEGG 数据库搜索预测基因的蛋白序列, 使用 KEGG 同源物对基因进行注释。

1.5 UPLC-Q-TOF-MS/MS 代谢组学检测

1.5.1 样本前处理 称取第 19 d 收集的大鼠肠道内容物(100 ± 2) mg, 加入 1 mL 乙腈-水(4:1, v/v), 涡旋 5 min, 反复冻融 3 次(-80 °C 冻存 30 min, 4 °C 放置 10 min), 超声 10 个循环(超声 20 s, 涡旋 10 s, 冰上静置 30 s), 于 4 °C 条件下 16 000 \times g 离心 10 min, 取 200 μ L 的上清液检测。

1.5.2 色谱与质谱条件 色谱柱为 ACQUITY HSS T3 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m); 柱温为 40 °C; 流速为 0.4 mL/min; 进样体积为 1.0 μ L; 流动相 A 相为 0.1%(v/v)甲酸水, B 相为 0.1%(v/v)甲酸乙腈; 自动进样器温度为 4 °C; 梯度洗脱(0~1.0 min, 1%B; 1.0~3.5 min, 1%~15%B; 3.5~7.5 min, 15%~25%B; 7.5~9.0 min, 25%~35%B; 9.0~11.5 min, 35%~99.9%B; 11.5~17.0 min, 99.9%B; 17.0~20.0 min, 99.9%~1%B)。质谱条件为 ESI 离子源; 正、负离子模式的毛细管电压分别为 2.5 KV、2.0 KV; 干燥气为氮气, 温度为 350 °C; 锥孔电压为 40.0 V。

1.5.3 数据处理 使用 SIMCA-P 软件(V 14.0)对三维矩阵数据进行多变量统计分析, 包括: 偏最小二乘法判别分析(Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA)和正交偏最小二乘法判别分析(Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA)分析。生成的谱图通过 Waters Progenesis Q1 V2.0 软件处理, 包括: 归一化、校正保留时间和选取离子峰, 对采集模式为 MS² 的数据结合数据库 HMDB 比对, 将 ESI 正负离子模式下的数据分组分析, 筛选得到 VIP > 1 且 $P < 0.05$ 的差异代谢物^[9], 并将得到的有差异的化合物上传至 Metaboanalyst 网站完成 KEGG 通路富集分析, 所有的 P 值均已经过 t 检验。

1.6 统计学处理

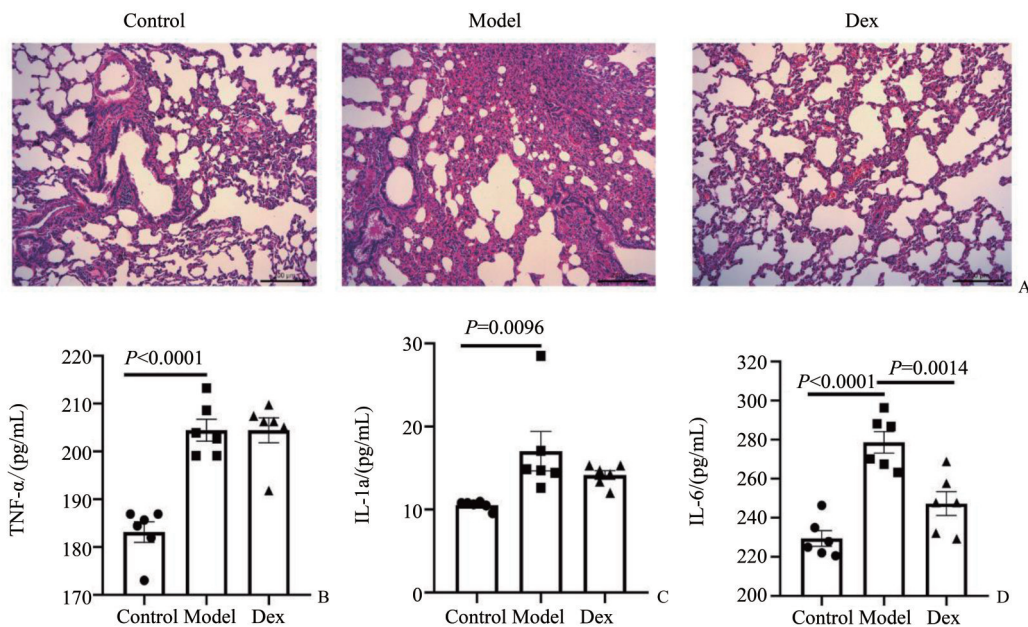
使用 GraphPad Prism 8.0 完成差异统计分析, 数值表示为均值 \pm 标准误差, 满足正态分布且方差齐的数据, 3 组间比较使用单因素方差分析, 2 组间比较使用 t 检验分析, 否则使用秩和检验做统计学分析, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肺组织病理学与生理结果

与Control组相比,LPS诱导的肺炎组大鼠肺组织炎症细胞的浸润增加、肺泡间隔增宽和局部肺泡出血,经Dex治疗后,大鼠肺组织的炎症细胞浸润减少,无肺泡出血现象(图1A)。此外,使用Bio-plex悬浮芯片系统对大鼠血浆中的3种关键炎症因子TNF- α 、IL-1 α 和IL-6定量检测,经单因素方差分析,三组间总的比较,差异有统计学意义,其中

TNF- α ($F = 27.26, P < 0.0001$)、IL-1 α ($F = 5.374, P = 0.0174$)和IL-6 ($F = 22.34, P < 0.0001$),采用Dunnett-t检验法进一步作两两比较,检测结果表明,与Control组相比,Model组大鼠血浆的促炎因子TNF- α ($P < 0.0001$)、IL-1 α ($P = 0.0096$)和IL-6 ($P < 0.0001$)的含量均升高且具有统计学意义,给予Dex后,可下调TNF- α 、IL-1 α 和IL-6 ($P = 0.0014$)的含量(图1B-D)。上述结果表明LPS诱导的大鼠肺炎模型构建成功,且提示Dex能缓解LPS诱导的大鼠肺部炎症。



A: HE staining of lung tissue (scale bar = 200 μ m); B-D: contents of TNF- α , IL-1 α and IL-6 in plasma of rats. $n = 6$.

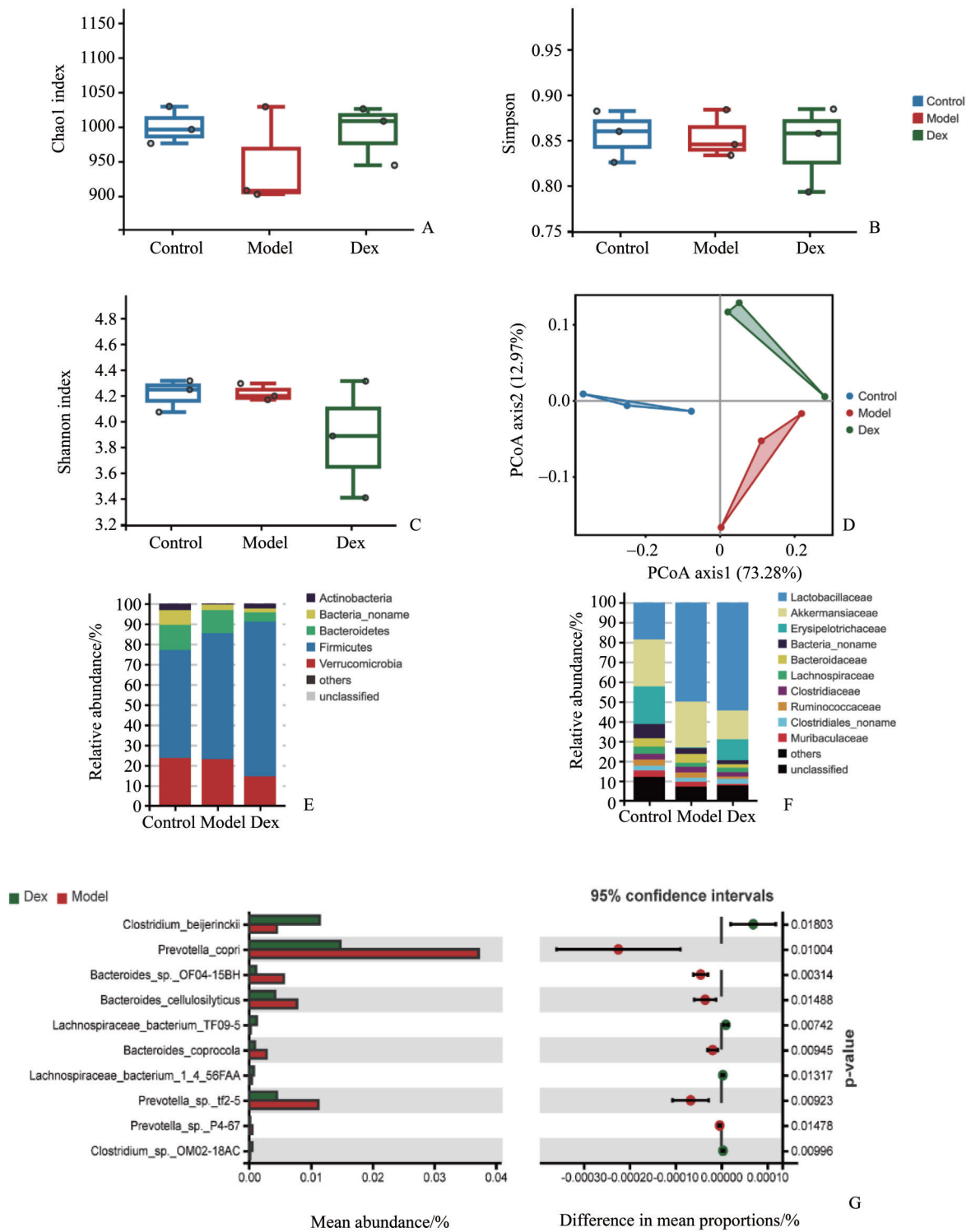
图1 Dex对LPS诱导的肺炎大鼠的影响

Fig. 1 Effects of Dex against LPS-induced pneumonia on rats

2.2 宏基因组测序分析结果

我们分析了 α 多样性指数(Chao1指数、Simpson指数和Shannon指数)。与Model组相比,Dex组的Chao1指数和Simpson指数升高但均无统计学意义,Shannon指数降低,同样无明显的变化(图2A-C),表明Model组和Dex组的肠道菌群的多样性和丰富度无统计学意义。基于距离矩阵的PCoA结果表明,3个组的样本存在明显的分离(图2D)。比较不同组别的微生物,发现厚壁菌门和疣微菌门为优势菌群(图2E)。门水平上,与Model组相比,Dex组的厚壁菌门含量升高,拟杆菌门含量降低,其中Dex组的厚壁菌门/拟杆菌门比值最高,为16.58%,远高于Model组中的5.48%。科水平

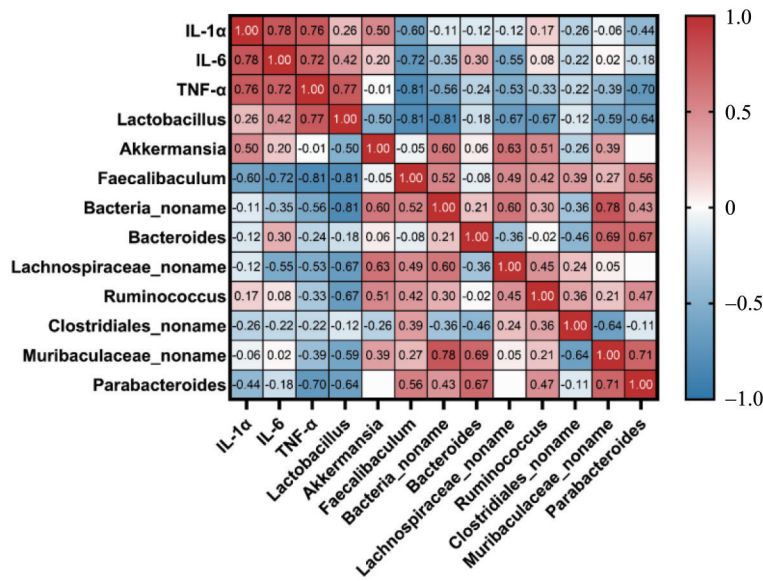
上,与Model组相比,Dex组处理升高了双歧杆菌科、毛螺菌科和乳酸杆菌科的相对丰度,同时减少了Muribaculaceae科和瘤胃菌科(图2F)。种水平上,与Model组相比,Dex处理上调了梭菌科的*Clostridium beijerinckii*和*Clostridium_sp._OM02-18AC*,毛螺菌科的*Lachnospiraceae_bacterium_TF09-5*和*Lachnospiraceae_bacterium_I_4_56FAA*,同时下调了普氏菌科的*Prevotella_copri*、*Prevotella_sp._tf2-5*和*Prevotella_sp._P4-67*,拟杆菌科的*Bacteroides_sp._OF04-15BH*、*Bacteroides_cellulosilyticus*和*Bacteroides_coprocola*(图2G)。总之,Dex处理能在不同水平调整大鼠肺炎中肠道菌群的组成。



A-C: alpha diversity indices: including Chao1 index, Simpson index and Shannon index; D: principal coordinate analysis; E-F: bacterial classification spectrum in the phylum and family levels of intestinal flora among groups; G: column graph of 10 significantly altered intestinal flora after Dex treatment in the species level. $n = 3$.

图2 各组间粪便微生物群的结构比较

Fig. 2 Structure comparison of fecal microbiota among groups



Numbers in the heatmap represent values of the correlation coefficient.

图3 10种差异菌和生理指标的皮尔森相关性分析热图

Fig. 3 Heat map of Pearson correlation analysis between 10 different bacteria and physiological parameters

为确定大鼠肺炎与肠道菌群的相关性,对Dex处理后的10个相关菌属与炎症参数包括IL-1 α 、IL-6和TNF- α 进行了皮尔森相关性分析(图3)。结果发现,与Model组相比,Dex组中乳酸杆菌属,*Faecalibaculum*属和毛螺菌属的相对丰度升高。其中*Faecalibaculum*属与IL-1 α ($r = -0.60$, $P = 0.090$)、IL-6 ($r = -0.72$, $P = 0.027$)和TNF- α ($r = -0.81$, $P = 0.008$)这3个促炎因子均观察到很强的负相关性,毛螺菌属与IL-6 ($r = -0.55$, $P = 0.125$)和TNF- α ($r = -0.53$, $P = 0.145$)有较强的负相关性,揭示*Faecalibaculum*属的存在可能有利于减少IL-1 α 、IL-6和TNF- α 的含量,毛螺菌属的存在可能降低IL-6和TNF- α 的含量。综上所述,LPS诱导的大鼠肺部炎症状态的改变可能部分受肠道微生物群的调节。

使用宏基因组的KO(KEGG Orthology)数据库预测代谢通路的功能分析,阐释不同组间肠道微生物的功能机制,不同组别间的差异显著性采用秩和检验。结果发现,与Control组相比,Model组中与氨基酸代谢和生物合成相关的基因降低,包括:色氨酸代谢($P = 0.02972$)和氨基酸的生物合成($P = 0.04880$);Model组中的丁酸盐代谢($P = 0.02415$)降低,表明SCFAs可能潜在降低,这可能与产SCFAs的双歧杆菌科、乳酸杆菌科和毛螺菌科的减少有关;此外,一些其他相关的代谢也降低,如基础转

录因子代谢($P = 0.03811$;图4A)。给予Dex治疗后,能回调Model组中降低的氨基酸代谢通路,包括:色氨酸代谢($P = 0.00617$),赖氨酸生物合成($P = 0.02332$);提高了脂肪酸的分解代谢($P = 0.02047$),为机体提供更多能量;同时可降低细菌分泌系统代谢($P = 0.02143$)、N-聚糖生物合成代谢($P = 0.02629$),其它代谢通路也呈现一定的变化(图4B)。综上所述,肺炎引起大鼠的肠道菌群功能失调,给予Dex治疗可调节肺炎大鼠的肠道微生物功能。

2.3 UPLC-Q-TOF-MS/MS代谢组学分析结果

本研究关注Dex如何调节肺炎大鼠的代谢紊乱,使用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术分析检测到Model组和Dex组中的69种粪便差异代谢物主要集中于脂肪酸、氨基酸、胆汁酸、脂类和酰基肉碱等其它小分子物质中(表1)。多变量数据分析的PLS-DA图和OPLS-DA图的得分图结果表明,Model组和Dex组的大鼠代谢轮廓极大的分离,且均符合各自的置换检验的要求(图5A-D)。根据 $P < 0.05$ 和 $\log_2(FC) > 1$ 的选择标准,火山图呈现了Model组和Dex组的部分化合物(图6A)。将Model组和Dex组的差异代谢物输入至MetaboAnalyst网站生成拓扑图,描述代谢物在不同通路中的影响,从拓扑图中发现3条 $\text{impact} > 0.01$ 的与大鼠肺炎相关的代谢通路,包括:亚油酸代谢、色氨酸代谢和初

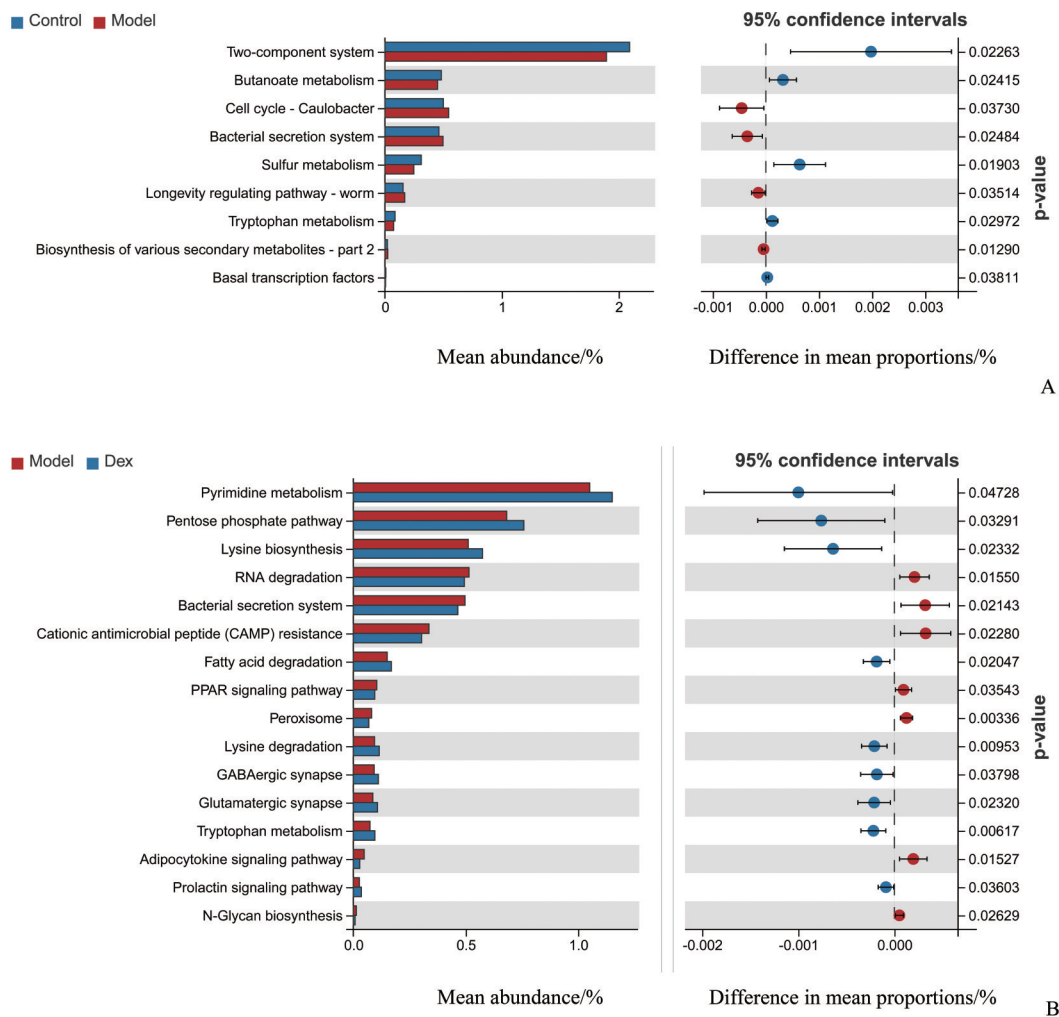


图4 通过宏基因组测序的KEGG分析推测肠道菌群功能柱形图

Fig. 4 Column graph of inferred intestinal flora functions by KEGG from Metagenome sequencing

级胆汁酸生物合成(图6B),与之相关的代谢物包括:亚油酸、L-色氨酸、胆酸和熊脱氧胆酸等多种化合物,这些代谢物的变化可能会影响大鼠体内对

Dex的代谢、吸收和利用,影响Dex治疗肺炎的效果。

表1 Model组和Dex组的差异代谢物

Table 1 Differential metabolites between Model and Dex groups

Compound	P value	Trend (Dex/Model)	HMDB ID
Nutriacholic acid	5.01E-05	up	HMDB0000467
L-Tryptophan	8.13E-05	down	HMDB0000929
Taurocholic acid	6.03E-04	down	HMDB0000036
MG(0:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/0:0)	9.12E-04	down	HMDB0011554
Ursodeoxycholic acid	1.18E-03	down	HMDB0000946
Cholic acid	1.28E-03	down	HMDB0000619
2-Arachidonylglycerol	1.35E-03	down	HMDB0004666
Tetrahydrocorticosterone	1.53E-03	down	HMDB0000879
Vaccenic acid	1.81E-03	down	HMDB0003231

续表

Compound	<i>P</i> value	Trend (Dex/Model)	HMDB ID
PC(16:1(9Z)/14:1(9Z))	2.75E-03	down	HMDB0007999
Bisnorcholic acid	4.03E-03	down	HMDB0002082
15(S)-HETE	5.13E-03	down	HMDB0003876
7-Ketodeoxycholic acid	5.24E-03	down	HMDB0000391
Cortol	5.27E-03	down	HMDB0003180
7-Sulfocholic acid	5.39E-03	down	HMDB0002421
Gamma-Linolenic acid	6.39E-03	down	HMDB0003073
Hexadecyl Benzoic acid	8.83E-03	down	HMDB0094685
Cer(t18:0/16:0)	1.27E-02	down	HMDB0010697
Deoxycytidine	1.77E-02	down	HMDB0000014
Linoleic acid	1.95E-02	down	HMDB0000673
8,11,14-Eicosatrienoic acid	2.12E-02	down	HMDB0002925
PS(14:0/18:1(9Z))	2.39E-02	down	HMDB0012335
12-Ketodeoxycholic acid	2.42E-02	down	HMDB0000328
Ursodeoxycholic acid 3-sulfate	2.54E-02	down	HMDB0002642
13S-hydroxyoctadecadienoic acid	2.98E-02	down	HMDB0004667
Dodecanoylcarnitine	3.59E-02	down	HMDB0002250
L-Urobilin	3.63E-02	down	HMDB0004159
Chenodeoxyglycocholic acid	3.65E-02	down	HMDB0006898
Docosanamide	2.99E-04	down	HMDB0000583
Cholesteryl acetate	4.18E-04	down	HMDB0003822
7a,12a-Dihydroxy-3-oxo-4-cholenoic acid	6.22E-04	down	HMDB0000447
Dehydroepiandrosterone	6.59E-04	down	HMDB0000077
Cervonoyl ethanolamide	7.75E-04	down	HMDB0013627
Heptadecanoyl carnitine	7.82E-04	down	HMDB0006210
12-Oxo-2,3-dinor-10,15-phytodienoic acid	9.28E-04	down	HMDB0032090
3b-Hydroxy-5-cholenoic acid	9.80E-04	down	HMDB0000308
7-Ketodeoxycholic acid	1.01E-03	down	HMDB0000391
Styrene	1.07E-03	down	HMDB0034240
PS(18:0/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	1.55E-03	down	HMDB0010165
Deoxycholic acid	3.67E-03	down	HMDB0000626
Latanoprost	4.47E-03	down	HMDB0014792
3b-Hydroxy-5-cholenoic acid	5.20E-03	down	HMDB0000308
Vaccenic acid	5.49E-03	down	HMDB0003231
Palmitic acid	5.60E-03	down	HMDB0000220
MG(0:0/15:0/0:0)	6.11E-03	down	HMDB0011532
Eicosapentaenoic acid	6.67E-03	down	HMDB0001999
Cervonoyl ethanolamide	7.05E-03	down	HMDB0013627
Gamma-Linolenic acid	7.37E-03	down	HMDB0003073
Phytosphingosine	7.66E-03	down	HMDB0004610

续表

Compound	<i>P</i> value	Trend (Dex/Model)	HMDB ID
Docosapentaenoic acid (22n-3)	1.03E-02	down	HMDB0006528
Vaccenic acid	1.08E-02	down	HMDB0003231
Tetrahydrocorticosterone	1.13E-02	down	HMDB0000268
PS(20:4/22:6)	1.16E-02	down	HMDB0012439
MG(0:0/18:1(11Z)/0:0)	1.91E-02	down	HMDB0011536
L-Urobilinogen	1.98E-02	down	HMDB0004157
Docosapentaenoic acid (22n-3)	2.03E-02	down	HMDB0006528
3b-Hydroxy-5-cholenoic acid	2.24E-02	down	HMDB0000308
Epi-coprostanol	2.26E-02	down	HMDB0001569
Tryptophanol	2.77E-02	down	HMDB0003447
7-Dehydrodesmosterol	3.05E-02	down	HMDB0003896
MG(0:0/18:3(9Z,12Z,15Z)/0:0)	3.05E-02	down	HMDB0011540
12-Ketodeoxycholic acid	3.15E-02	down	HMDB0000328
Ribothymidine	3.19E-02	down	HMDB0000884
Adrenic acid	3.53E-02	down	HMDB0002226
Stigmastanol	3.60E-02	down	HMDB0000494
Nicotinic acid	3.81E-02	down	HMDB0001488
Deoxycholic acid glycine conjugate	4.26E-02	down	HMDB0000631
N-Oleylethanolamine	4.45E-02	down	HMDB0002088
PC(14:0/16:1(9Z))	4.61E-02	down	HMDB0007870

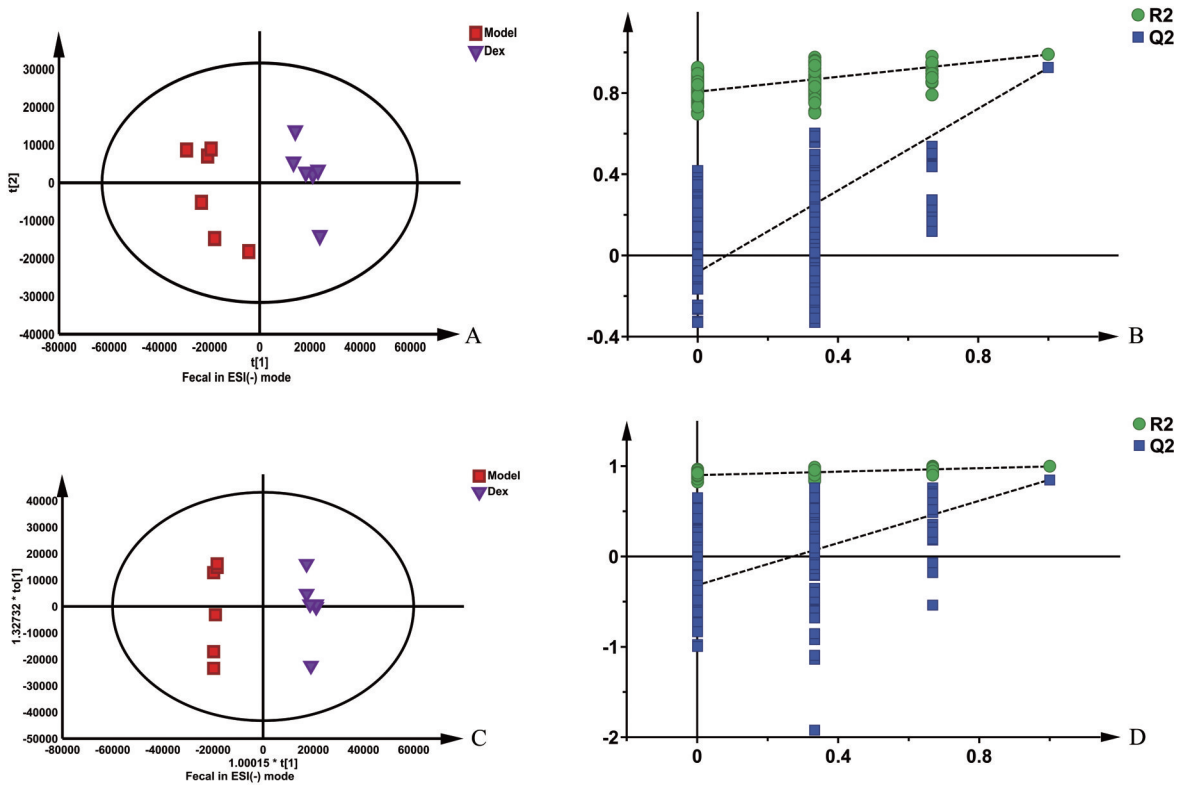
The comparison of the peak area between Dex and Model groups by Student's *t*-test; up: indicates up-regulated trend in Dex group compared with Model group, down indicates down-regulated trend in Dex group compared with Model group; PS(20:4/22:6):PS[20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)].

3 讨论

鉴于胃肠道和呼吸道的密切联系,肠道菌群可能在肺炎的发生与发展中起重要作用。肺部感染引起的炎症会破坏肠道屏障的完整性,增加肠道微生物和代谢物的渗透性,进而加剧肺部的炎症^[10]。Dex 给药能缓解 LPS 诱导的大鼠肺炎症状,但是较少从肠道菌群及宿主代谢物的角度探讨 Dex 治疗肺炎的作用机制。基于此,我们研究了 Dex 通过如何调节肠道菌群及代谢物阐明其潜在的机制。

肠道菌群会影响机体代谢,能量平衡和炎症,在机体健康和疾病中起着举足轻重的作用^[11-12]。Dex 给药能调节肺炎大鼠肠道菌群的组成。门水平上,与 Model 组相比,Dex 处理后厚壁菌门相对丰度增加,拟杆菌门相对丰度降低,这可能与影响了

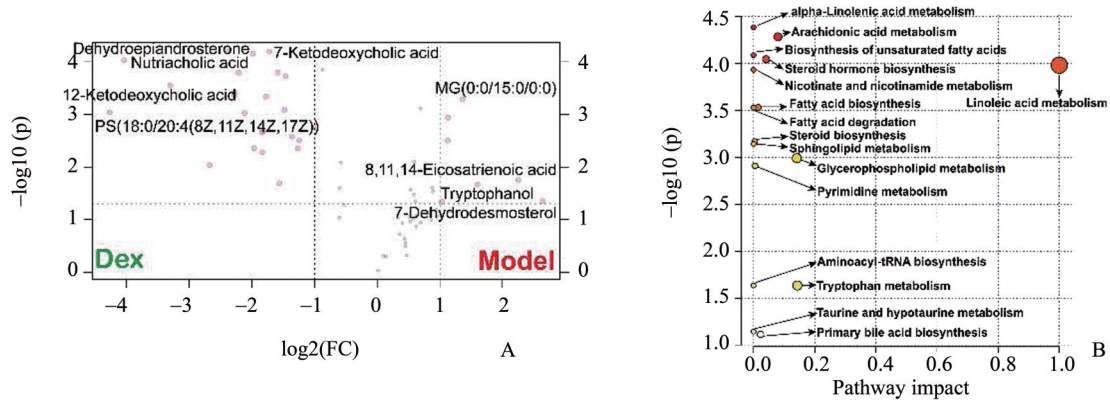
宿主体质量的能量代谢效率有关^[13]。科水平上,与 Model 组相比,Dex 给药后增加了乳酸杆菌科和双歧杆菌科的相对丰度。已有研究报道乳酸杆菌科和双歧杆菌科分别通过降低炎症基因(*IL-1β*、*IL-6* 和 *TNF-α*)的 mRNA 表达和增加紧密连接蛋白来改善系统性炎症和肠屏障完整性^[14]。此外,这两种菌可在肠腔内通过发酵底物-不可消化糖,可生成具有维持肠道微生物的稳态,抑制细菌易位和炎症等多种生理功能的 SCFAs^[15-16]。本研究中,这两类益生菌丰度的增加或许有助于减轻肺炎。此外,属水平上,*Faecalibaculum* 属和毛螺菌属在 Dex 组中含量更高,Pearson 相关性分析也表明了这两个属与 *IL-1α*、*IL-6* 和 *TNF-α* 这 3 个促炎因子的含量观察到很强的负相关性。一研究报道粪便样本中缺乏 *Faecalibaculum* 属和毛螺菌属的婴儿会在 1



A: PLS-DA plot; B: PLS-DA permutation test plot; C: OPLS-DA plot; D: OPLS-DA permutation test plot. n = 6.

图5 Model组和Dex组的多元变量分析

Fig. 5 Multivariate analysis between Model and Dex groups



A:Volcano plot of some metabolites in Model and Dex groups; B:Altered metabolic pathway of fecal metabolites after Dex treatment.

图6 大鼠体内显著变化的宿主代谢物

Fig. 6 Significant altered host metabolites in rats

岁时显示早期哮喘的症状^[17],表明了 *Faecalibaculum* 属和毛螺菌属可能与肺部疾病存在密切的联系。针对本研究观察到的肺炎大鼠体内肠道菌群的变化,后续可使用无菌或抗生素治疗的动物模型与微生物移植相结合,以进一步证实肺炎和肠道微生物之间的相互作用。

除肠道菌群外,调节代谢物的变化也能影响肺

炎的发生与发展进程。与 Model 组相比, Dex 组中 69 种化合物改变且具有统计学意义,这些差异代谢物的 KEGG 通路集中在亚油酸、色氨酸和初级胆汁酸合成代谢通路。亚油酸为多不饱和脂肪酸,本研究中, Model 组中的亚油酸含量升高,给予 Dex 能降低亚油酸水平,这可能与毛螺菌科的相对丰度有关,一研究表明毛螺菌科中的部分菌属具有把亚油

酸转化为共轭亚油酸的能力^[18],而共轭亚油酸被吸收后将转化为其他物质,与 Model 组相比,Dex 组毛螺菌科相对丰度升高,可能转化亚油酸的能力更强,因此亚油酸的含量降低。色氨酸代谢通路影响的主要为 L-色氨酸。色氨酸在肠道免疫耐受和肠道稳态中起关键作用,色氨酸可被小肠黏膜细胞用作合成蛋白质和其它活性分子的必需前体,可以抑制炎症或降低促炎细胞因子的水平^[19],在结肠中被肠道微生物分解代谢,生成多种吲哚类化合物,如:吲哚、吲哚丙酸、吲哚乙酸和色胺等物质调节炎症^[20]。此外,儿童重症肺炎患者血浆样本的 L-色氨酸含量降低^[21],本研究中,Dex 给药后回调了 Model 组中的 L-色氨酸的含量,可能是增加了色氨酸在小肠处的吸收和/或在结肠处被肠道菌群分解代谢的水平,分泌吲哚类物质以减弱肺部炎症。研究报告乳酸杆菌编码的色氨酸酶能将色氨酸转化为吲哚类物质^[22],与 Model 组相比,Dex 组相对丰度升高的乳酸杆菌,能编码色氨酸酶,可能促进色氨酸转化为吲哚类物质,激活芳香烃受体,保护肠粘膜屏障的完整性,有利于缓解肺炎。与 Model 组相比,Dex 给药引起大鼠体内 11 种胆汁酸类化合物含量改变且均具有统计学意义,上调了 9 种胆汁酸类物质,包括:脱氧胆酸、熊脱氧胆酸、胆酸、Nutriacholic acid、牛磺胆酸、甘氨酸脱氧胆酸、12-酮脱氧胆酸、熊脱氧胆酸 3-硫酸盐和 7-酮脱氧胆酸,同时

下调 2 种胆汁酸类化合物:胆酸 7-硫酸盐和甘氨酸脱氧胆酸。据报道,与 COVID-19 阴性患者相比,COVID-19 阳性患者中脱氧胆酸的浓度降低^[23];熊脱氧胆酸具有抗炎和免疫调节等特性,研究证明熊脱氧胆酸可通过 ALX/cAMP/PI3K 途径缓解 LPS 诱导的肺水肿,为潜在的治疗药物^[24];胆酸通过抑制 NF- κ B 信号通路激活进而降低 TNF- α 和 IL-1 β 的含量发挥抗炎作用^[25]。总之,Dex 给药能调节大鼠肺炎的胆汁酸代谢,这些干预的胆汁酸共同作用,可能有助于抵御肺部炎症。此外,已有研究证实含有胆汁酸饮食喂养的大鼠,厚壁菌门相对丰度升高,拟杆菌门相对丰度降低,揭示胆汁酸调节肠道菌群的组成^[26]。本研究中,Dex 给药组富集厚壁菌门,下调拟杆菌门,可能与 Dex 组中累积的胆汁酸有关。综上所述,LPS 诱导的大鼠肺炎影响了大鼠体内代谢,Dex 给药后主要调节了亚油酸、色氨酸和初级胆汁酸合成等代谢通路,这些通路中的代谢物可能与 Dex 中富集的菌群相互作用,治疗肺部炎症。

多组学研究已被证明能更好的理解疾病的研究,结合宏基因组和非靶标代谢组学,证实 Dex 可能通过重塑肠道菌群及改变宿主代谢物来改善 LPS 诱导的大鼠肺炎。从肠道菌群-代谢物-表型的角度诠释了 Dex 治疗大鼠肺炎的潜在机制。

参考文献

- [1] Zhang Y, Li Y, Sun N, et al. NETosis is critical in patients with severe community-acquired pneumonia [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1051140.
- [2] 颜妍,肖伟利,钟明月,等.蒙古黄芪多糖通过调控 Nrf-2 信号通路缓解地塞米松诱导的糖脂代谢紊乱 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(3): 289-293.
Yan Y, Xiao WL, Zhong MY, et al. Mitigating effect of Mongolia astragalus polysaccharide against dexamethasone-induced glucose and lipid metabolism disorder through regulation on Nrf-2 signaling pathway [J]. *Chin J Immunol*, 2020, 36(3): 289-293.
- [3] Wittermans E, Vestjens SMT, Spoorenberg SMC, et al. Adjunctive treatment with oral dexamethasone in non-ICU patients hospitalised with community-acquired pneumonia: a randomised clinical trial [J]. *Eur Respir J*, 2021, 58(2): 2002535.
- [4] Rastogi S, Mohanty S, Sharma S, et al. Possible role of gut microbes and host's immune response in gut-lung homeostasis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 954339.
- [5] Dickson RP, Singer BH, Newstead MW, et al. Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome [J]. *Nat Microbiol*, 2016, 1(10): 16113.
- [6] Manzanares W, Lemieux M, Langlois PL, et al. Probiotic and synbiotic therapy in critical illness: a systematic review and meta-analysis [J]. *Crit Care*, 2016, 19: 262.
- [7] Li J, Luu LDW, Wang X, et al. Metabolomic analysis reveals potential biomarkers and the underlying pathogenesis involved in *Mycoplasma pneumoniae* pneumo-

- nia [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2022, 11 (1) : 593-605.
- [8] Wang Y, Li N, Li Q, et al. Xuanbai Chengqi Decoction ameliorates pulmonary inflammation via reshaping gut microbiota and rectifying Th17/Treg imbalance in a murine model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2021, 16: 3317-3335.
- [9] Wang M, Xie Z, Li L, et al. Supplementation with compound polysaccharides contributes to the development and metabolic activity of young rat intestinal microbiota [J]. *Food Funct*, 2019, 10(5): 2658-2675.
- [10] 高磊, 张英剑, 刘晓敏, 等. 不同发病状态的溃疡性结肠炎患者血清炎症因子和免疫球蛋白变化及与肠道菌群变化的相关性 [J]. *广东医学*, 2021, 42 (11): 1342-1346.
- Gao L, Zhang YJ, Liu XM, et al. Changes in serum inflammatory factors and immunoglobulins in patients with ulcerative colitis of different morbidity states and correlation with changes in intestinal flora [J]. *Guangdong Med J*, 2021, 42(11): 1342-1346.
- [11] Wang Y, Wang B, Wu J, et al. Modulation of gut microbiota in pathological states [J]. *Engineering*, 2017, 3(1): 83-89.
- [12] 龚文斌, 陈军, 顾国胜, 等. 肠内营养治疗克罗恩病的机制探讨 [J]. *中华炎症肠病杂志*, 2021, 5 (4): 356-359.
- Gong WB, Chen J, Gu GS, et al. Exploring the mechanism of enteral nutrition for the treatment of Crohn's disease [J]. *Chin J Inflamm Bowel Dis*, 2021, 5(4): 356-359.
- [13] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Human gut microbes associated with obesity [J]. *Nature*, 2006, 444 (21): 1022-1023.
- [14] Ni Y, Yang X, Zheng L, et al. Lactobacillus and bifidobacterium improves physiological function and cognitive ability in aged mice by the regulation of gut microbiota [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63 (22) : e1900603.
- [15] Layden BT, Angueira AR, Brodsky M, et al. Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets [J]. *Transl Res*, 2013, 161(3): 131-140.
- [16] Yao Y, Cai X, Fei W, et al. The role of short-chain fatty acids in immunity, inflammation and metabolism [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 62(1): 1-12.
- [17] Arrieta MC, Stiemsma LT, Dimitriu PA, et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7 (307): 307ra152.
- [18] Chen Y, Wang J, Yu L, et al. Microbiota and metabolome responses in the cecum and serum of broiler chickens fed with plant essential oils or virginiamycin [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 5382.
- [19] Liu Y, Wang X, Hu CA. Therapeutic potential of amino acids in inflammatory bowel disease [J]. *Nutrients*, 2017, 9(9): 920.
- [20] Platten M, EaANollen, Rohrig UF, et al. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(5): 379-401.
- [21] Laiakis EC, Morris GA, Fornace AJ, et al. Metabolomic analysis in severe childhood pneumonia in the Gambia, West Africa: findings from a pilot study [J]. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12655.
- [22] Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(6): 716-724.
- [23] Castane H, Itimie S, Baiges-Gaya G, et al. Machine learning and semi-targeted lipidomics identify distinct serum lipid signatures in hospitalized COVID-19-positive and COVID-19-negative patients [J]. *Metabolism*, 2022, 131: 155197.
- [24] Niu F, Xu X, Zhang R, et al. Ursodeoxycholic acid stimulates alveolar fluid clearance in LPS-induced pulmonary edema via ALX/cAMP/PI3K pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 20057-20065.
- [25] Hou Y, Nie Y, Cheng B, et al. Qingfei Xiaoyan Wan, a traditional Chinese medicine formula, ameliorates pseudomonas aeruginosa-induced acute lung inflammation by regulation of PI3K/AKT and Ras/MAPK pathways [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6(3): 212-221.
- [26] Islam KB, Fukiya S, Hagio M, et al. Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141 (5): 1773-1781.