

论著 · 实验研究

合胞病毒肺部感染对小鼠大肠黏膜组织 内源性代谢物的影响

孟欣 汪受传 单进军 谢彤 徐建亚 沈存思

(南京中医药大学中医儿科学研究所 / 江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] **目的** 通过气相色谱-质谱联用(GC-MS)的代谢组学技术检测 BALB/c 小鼠合胞病毒(RSV)肺部感染对大肠黏膜组织内源性代谢物的影响。**方法** 将小鼠随机分为对照组和 RSV 肺炎模型组, 每组 16 只。采用 RSV ($100 \times \text{TCID}_{50}$, 50 μL /只, 每日 1 次)滴鼻感染法建立小鼠 RSV 肺炎模型。于滴鼻 7 d 后处死各组小鼠, 运用 GC-MS 检测大肠组织内源性代谢物及其相对含量的变化; 使用 SMCA-P12.0 软件对大肠组织中内源性代谢物进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA); 将大肠组织中的差异性代谢物导入代谢通路平台 Metaboanalyst, 以进一步分析相关代谢通路。**结果** PCA 和 OPLS-DA 分析均显示对照组和 RSV 肺炎模型组可显著区分。RSV 肺炎小鼠的大肠黏膜组织中共测得 32 种代谢产物, 与对照组比较, 其中亮氨酸、异亮氨酸、甘氨酸、丙氨酸、花生四烯酸、乳酸等含量均显著增高($P < 0.05$), 主要与缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸代谢、花生四烯酸代谢和丙酮酸代谢通路有关。**结论** RSV 肺炎可能引起小鼠大肠黏膜组织的代谢紊乱。

[中国当代儿科杂志, 2016, 18(11): 1166-1173]

[关键词] 代谢组学; 合胞病毒肺炎; 大肠损伤; 小鼠

Effect of respiratory syncytial virus-related pulmonary infection on endogenous metabolites in large intestinal mucosa in mice

MENG Xin, WANG Shou-Chuan, SHAN Jin-Jun, XIE Tong, XU Jian-Ya, SHEN Cun-Si. Institute of Pediatrics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China (Wang S-C, Email: Wscnj@126.com)

Abstract: Objective To investigate the effect of respiratory syncytial virus (RSV)-related pulmonary infection on endogenous metabolites in large intestinal mucosa in BALB/c mice using metabolomics technology based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Methods** Mice were randomly divided into a control group and a RSV pneumonia model group ($n=16$ each). The mouse model of RSV pneumonia was established using intranasal RSV infection ($100 \times \text{TCID}_{50}$, 50 μL /mouse, once a day). After 7 days of intranasal RSV infection, the mice were sacrificed and GC-MS was used to identify endogenous metabolites and measure the changes in their relative content in colon tissue. SMCA-P12.0 software was used to perform principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) for endogenous metabolites in colon tissue. The differentially expressed metabolites in colon tissue were imported into the metabolic pathway platform Metaboanalyst to analyze related metabolic pathways. **Results** PCA and OPLS-DA showed significant differences between the control and RSV pneumonia model groups. A total of 32 metabolites were identified in the colon tissue of the mice with RSV pneumonia. The RSV pneumonia model group had significant increases in the content of leucine, isoleucine, glycine, alanine, arachidonic acid, and lactic acid, which were related to the valine, leucine, isoleucine, arachidonic acid, and pyruvic acid metabolic pathways. **Conclusions** RSV pneumonia might cause metabolic disorders in the large intestinal tissue in mice.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(11): 1166-1173]

Key words: Metabolomics; Respiratory syncytial virus pneumonia; Colonic injury; Mice

[收稿日期] 2016-05-31; [接受日期] 2016-08-18

[基金项目] 国家自然科学基金(81373688; 81303295); 江苏省研究生培养创新工程(SJZZ15_0120)。

[作者简介] 孟欣, 男, 博士研究生。

[通信作者] 汪受传, 男, 主任医师, 教授。

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是导致婴幼儿急性下呼吸道感染最重要的病原体,多见于1岁以内的婴儿。RSV感染主要表现为喘息、咳嗽、发热和呼吸困难,重症病例还可造成多系统损伤。临床和实验研究发现,除呼吸道感染外,RSV尚可导致哮喘^[1]、急性中耳炎^[2]、神经系统受累^[3]、心脏损害^[4]、肝损害^[5]、窒息或死亡^[6]等,而肠道损伤鲜有报道。

肺部感染可能导致肠道损伤^[7]。多种呼吸道病毒侵害机体后,均可导致肠道组织发生病理改变。Punyadarsaniya等^[8]运用精密肠切片技术研究禽流感病毒侵袭鸡的肠道上皮细胞,发现其上皮绒毛也受到明显感染;Wang等^[9]发现流感病毒引起肠道损伤,并非由于直接肠道病毒感染,而是与肠道菌群失调及Th17细胞显著增高有关;Matsumoto等^[10]报道巨细胞病毒和EB病毒可能加重结肠炎患者肠黏膜的损伤。RSV肺炎患儿常伴随有大便性状和/或次数改变,但是否会导致肠道黏膜组织发生病理改变尚不得而知,亦未见相关报道。

代谢组学(metabonomics)作为系统生物学的重要组成部分,是生物体对病理生理刺激或者基因修饰产生的代谢物的质和量的动态变化研究。气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术灵敏度较高,有较强的分离能力,操作简便,且具备较完善的质谱数据库,已成为代谢组学研究的重要工具。RSV感染小鼠后,机体内环境发生变化,肠道黏膜组织内的代谢物也可能随之发生改变。因此,本研究运用GC/MS代谢组学技术和多维统计分析技术,研究RSV感染后小鼠大肠黏膜组织的内源性代谢物的相对含量变化,以初步探究RSV感染是否损伤大肠黏膜组织及其可能的相关机制。

1 材料与方法

1.1 病毒与细胞

RSV A亚型(Long株)由武汉国家典型培养物保藏中心提供,然后进行体外培养人喉癌上皮细胞(human laryngeal epithelial cells, HEP-2)(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)以扩增RSV,具体方法参照文献^[11]。病毒滴度则采用Reed-Muench公式测定,本次实验病毒的半数

组织细胞感染量(TCID₅₀)为 $10^{-4.038}/100\mu\text{L}$ 。

1.2 主要试剂与仪器

甲醇(批号1774807513)购自德国Merck公司,正己烷(批号SZBE1070V)、甲氧铵盐(批号BCBN2932V)、吡啶(批号STBD3575V)、含1%三甲基一氯硅烷(TMCS)的N,O-双三甲基硅基三氟乙酰胺(BSTFA,批号BCBN4326V)、C8-C40烷烃混标(批号1408653V)、1,2-¹³C肉蔻酸(批号SH2326V,内标准品)均购自德国SIGMA-ALORCH公司,标准品如L-谷氨酸(批号LT90M31,纯度99%)、甘氨酸(批号L410N21,纯度98%)、L-天冬氨酸(批号LCA0M32,纯度98%)等均购自中国J&K百灵威公司。DMIL型倒置显微镜(德国Leica公司),MCO-20型CO₂培养箱(日本Sanyo公司),Airstream[®]A2型二级生物安全柜(新加坡ESCO公司),Allegra64R高速冷冻离心机(美国BECKMAN公司),MiniSpin面包式离心机(德国Eppendorf公司),Savant SPD1010真空离心浓缩仪、Trace1310/TSQ8000 GC-MS仪、TG-5MS毛细管色谱柱(0.25 $\mu\text{m} \times 0.25\text{ mm} \times 30\text{ m}$)均购自美国Thermo公司。

1.3 实验动物分组、模型建立及样本采集

SPF级雌性4~6周龄BALB/c小鼠32只,体重16~18 g,购自北京维通利华动物实验有限责任公司,使用许可证号:SCXK(苏)2012-0004。将小鼠常规饲养于南京中医药大学实验动物中心,置于12 h光照、12 h黑暗环境下自由饮食。实验期间饲养室相对湿度为50%~60%,相对温度设定为18~22℃。将小鼠随机分为对照组、RSV肺炎模型组,每组16只。参照文献^[12],RSV肺炎模型组小鼠在乙醚浅麻醉后,鼻腔滴注 $100 \times \text{TCID}_{50}$ 的RSV悬液(50 $\mu\text{L}/\text{只}$),每日滴鼻1次;对照组给予同剂量的DMEM高糖培养基滴鼻,待全部吸入鼻腔后放回笼中并记录时间。连续滴鼻3 d,于第6天禁食24 h后(即第7天)处死各组小鼠,剪取大肠,用生理盐水反复冲洗3遍以除去粪便,吸干水分后称重,置于-80℃保存,待测。同时取右肺下叶和部分大肠黏膜组织用10%的甲醛溶液固定,石蜡包埋、切片,采用常规的苏木精-伊红(HE)染色,置于光学显微镜下观察。

1.4 GC-MS 分析条件

气相色谱条件：采用石英毛细管色谱柱（ $0.25\text{ }\mu\text{m}\times 0.25\text{ mm}\times 30\text{ m}$ ），程序升温条件设定为初始柱温 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，保留 1 min 后，以 $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 逐渐升温至 $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，保留 4 min 。进样口温度为 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，载气为高纯氦气，流量为 $1.2\text{ L}/\text{min}$ ，柱前压为 100 kPa ，进样量为 $1\text{ }\mu\text{L}$ ，采用分流模式进样（分流比为 $20:1$ ）。

质谱条件：采用 EI 源进行电离，碰撞能量为 70 eV ，离子源温度为 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，离子传输线温度为 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，溶剂延迟时间设定为 4 min ，扫描方式：全扫描， $60\sim 600\text{ m}/\text{z}$ 。

1.5 样品预处理与衍生化

将小鼠的大肠组织置于冰上，每个样本准确称量 20 mg ，置于相应编号的冻存管内，加入 1 mL 甲醇，然后用球磨仪研磨 15 min ，吸取 $600\text{ }\mu\text{L}$ 大肠组织匀浆液，加入含 $10\text{ }\mu\text{g}$ 内标 $1,2\text{-}^{13}\text{C}$ 肉蔻酸的甲醇 $20\text{ }\mu\text{L}$ ，涡旋 2 min ， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $10000\text{ 转}/\text{min}$ 离心 10 min ，取 $300\text{ }\mu\text{L}$ 上清液，置于离心浓缩仪中挥干 2 h 。加入 $15\text{ mg}/\text{mL}$ 甲氧胺吡啶溶液 $50\text{ }\mu\text{L}$ ，混匀 5 min ，室温下静置 16 h 后再加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 的 BSTFA（含 $1\%\text{ TMCS}$ 为催化剂），混匀后静置 1 h 。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3000\text{ 转}/\text{min}$ 离心分离后，吸取上清液 $60\text{ }\mu\text{L}$ 于玻璃内插管中，供 GC-MS 进样分析。根据 GC-MS 所获取的总离子流图（TIC）中各峰的保留时间以分离共有峰，获取相对峰面积比值（各峰面积/内标峰面积）表示代谢物的含量。利用美国国家标准与技术研究院（NIST）质谱数据库及标准品比对以鉴定共有的内源性代谢物。

1.6 统计学分析

使用 SPSS 19.0 对数据进行统计学分析，计量资料以均数 $\pm$ 标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，两组间比较采用独立样本 t 检验， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。共有峰的挑选、分离、峰对齐、计算相对峰面积使用 Xcalibur2.0.7 数据处理系统。使用 SMCA-PI2.0 软件（Umetrics 公司，瑞典）对大肠组织中内源性代谢物进行主成分分析（principal components analysis, PCA）、正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA）和 S-plot 分析。将筛选出的大肠组织中的差异性代谢物导入代谢通路平台 Metaboanalyst，以进一步分析相关代谢通路。

2 结果

2.1 肺组织病理学观察

对照组小鼠肺泡上皮完整，结构清晰，肺泡壁毛细血管无扩张充血，肺间隔及支气管结构完好。与对照组相比，RSV 肺炎模型组小鼠肺组织病变主要在间质部位，可见多灶性炎性细胞浸润（ $2+$ ），多为淋巴细胞及单核细胞，并有少量中性粒细胞；肺内支气管上皮细胞排列轻度紊乱，有轻度变性；肺泡壁轻度或中度充血、水肿，以致肺泡壁增厚。见图 1。

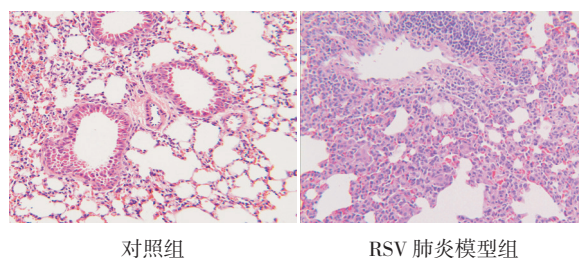


图 1 肺组织病理学观察（HE 染色， $\times 200$ ） 对照组肺泡壁结构完整，毛细血管无扩张充血；RSV 肺炎模型组间质部位可见多灶性炎性细胞浸润。

2.2 大肠组织病理学观察

本研究随机选取对照组和 RSV 肺炎模型组各 5 份大肠组织样本进行组织病理学观察，对照组 5 份样本均未见明显异常；而其中 2 份 RSV 肺炎模型组样本的结肠黏膜层上皮可见轻度（ $+$ ）变性坏死脱落，余 3 份样本则均未见明显异常，见图 2。

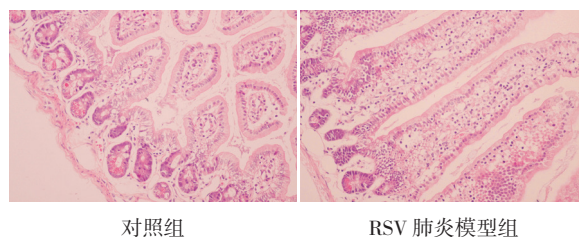


图 2 大肠组织病理学观察（HE 染色， $\times 200$ ） 对照组大肠组织细胞结构完整清晰；RSV 肺炎模型组结肠黏膜层上皮细胞可见轻度（ $+$ ）变性坏死脱落。

2.3 GC-MS 分析及代谢物鉴定

GC-MS 分析大肠组织 TIC 结果显示（图 3），对照组和 RSV 肺炎模型组之间的 TIC 有较明显的差异，其中保留时间为 10.23 min 的色谱峰在两组

间的差异最显著。峰挑选后发现大肠组织中具有32个共有峰。利用NIST质谱数据库鉴定共有的内源性代谢物,通常匹配度高于800且可能性高于80%的鉴定结果可信度比较高^[13],鉴定结果中某些离子峰的匹配度很高而可能性较低,主要与裂解规律相似及同分异构现象有关。此外,本实验还通过标准品比对以鉴定某些代谢物,共鉴定出32种内源性代谢物(表1)。为了检测仪器及方法的稳定性和可靠性,对同一组织样品连续进样6次,计算各相对峰面积的相对标准差(RSD)发现,其共有峰的RSD为2.46%~3.78%,提示本研究具有良好的重复性。

2.4 PCA 分析结果

如图4所示,图中每一个点代表一个样本,模型参数 $R^2X=0.876$, $Q^2=0.697$,由主成分1和主成分2构建的得分散点图显示对照组和RSV肺炎模型组具有明显的分离趋势。

2.5 OPLS-DA 分析

如图5所示,图中每一个点代表一个样本,模型参数 $R^2X=0.867$, $R^2Y=0.934$, $Q^2=0.889$,说明该模型的建模能力和预测能力均较好,对照组、RSV肺炎模型组可显著区分,无交叉和重叠,提示RSV肺炎干扰了小鼠大肠组织中某些内源性物质的代谢,造成小鼠大肠组织的代谢指纹图谱发

生显著变化。与对照组相比,RSV肺炎可能导致大肠黏膜组织受到损伤。

2.6 S-plot 分析

在可视化的OPLS-DA图下,设定变量权重VIP>1的代谢物为大肠组织中潜在与RSV肺炎损伤相关的代谢物。为进一步筛选,本研究分析了基于OPLS-DA的S-plot图,如图6示,乳酸、丙氨酸、尿素、磷酸、亮氨酸、异亮氨酸、甘氨酸、丝氨酸、花生四烯酸等代谢物可能与大肠组织的代谢指纹图谱变化有关。

2.7 代谢物含量的差异表达

与对照组相比,RSV肺炎模型组大肠组织代谢物中亮氨酸($P=0.006$)、异亮氨酸($P=0.013$)、丙氨酸($P=0.001$)、甘氨酸($P=0.01$)、花生四烯酸($P=0.001$)和乳酸($P=0.008$)的含量均升高,见表2。

2.8 代谢通路分析

将上述大肠组织中的差异性代谢物导入代谢通路平台Metaboanalyst分析,代谢通路的重要值(pathway impact, PI)界定为0.1,结果见图7。由此可知,与大肠损伤最为相关的是缬氨酸、亮氨酸与异亮氨酸代谢($PI=0.32601$),花生四烯酸代谢($PI=0.14979$)和丙酮酸代谢($PI=0.10625$)通路。

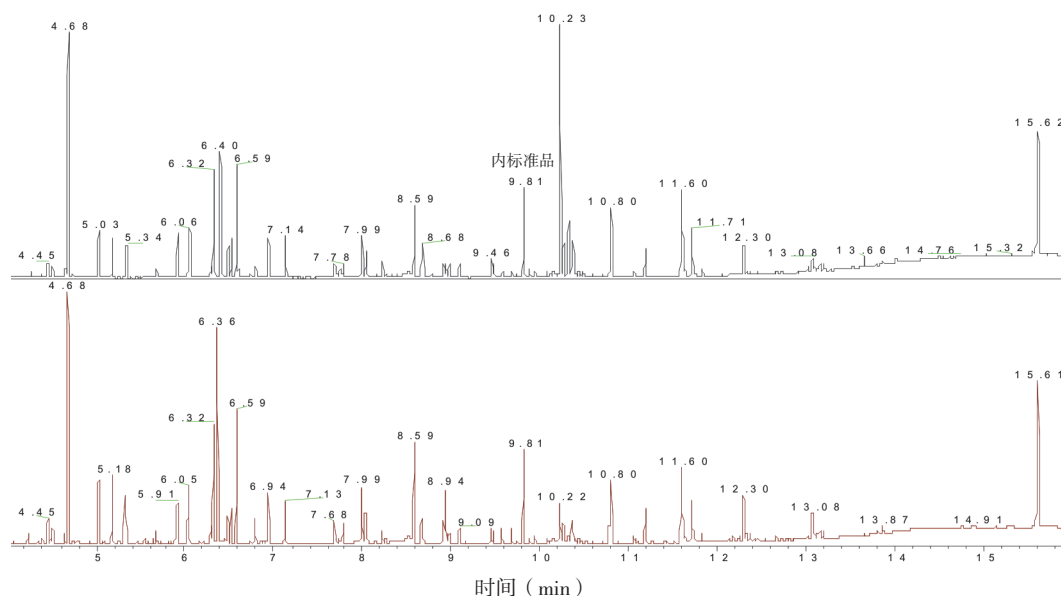


图3 大肠组织匀浆的TIC图 上图为对照组;下图为RSV肺炎模型组。与对照组相比,RSV肺炎模型组的TIC图显著不同,其中保留时间为10.23 min的色谱峰在两组间的差异最显著。

表 1 大肠组织内所鉴定的代谢物

保留时间 (min)	匹配度	反向匹配度	可能性 (%)	NIST 谱库中最匹配的物质	代谢物
4.74	928	929	37.06	D- 乳酸、三甲基硅醚、三甲基硅酯	乳酸 *
5.08	911	925	80.56	L- 丙氨酸、N- 三甲基基 -、三甲基硅酯	丙氨酸
5.96	912	916	83.92	L- 缬氨酸、N- 三甲基基 -、三甲基硅酯	缬氨酸
6.12	896	898	94.06	尿素、N,N'- 二 (三甲基基) -	尿素 *
6.36	826	890	58.91	L- 亮氨酸、N- 三甲基基 -、三甲基硅酯	亮氨酸 *
6.50	930	932	93.77	硅醇、三甲基 -、磷酸 (3:1)	磷酸
6.54	892	932	69.12	L- 异亮氨酸、N- 三甲基基 -、三甲基硅酯	异亮氨酸 *
6.65	873	935	83.46	甘氨酸、N,N'- 二 (三甲基基) -、三甲基硅酯	甘氨酸 *
6.80	727	846	50.12	甘油酸、2,3- 二 [(三甲基基) 氧] -、三甲基硅酯	甘油酸
7.00	926	927	94.29	丝氨酸、N,O- 二 (三甲基基) -、三甲基硅酯	丝氨酸 *
7.19	935	938	96.00	N,O,O- 三 (三甲基基) -L- 苏氨酸	苏氨酸 *
7.75	886	928	96.24	氨基丙氨酸、三 (三甲基基) -	氨基丙氨酸
7.84	863	889	94.15	苹果酸、[(三甲基基) 氧] -、二 (三甲基基) 酯	苹果酸
8.06	863	909	90.67	L- 天冬氨酸、N- 三甲基基 -、三甲基硅酯	天冬氨酸 *
8.11	833	852	72.23	L- 脯氨酸、5- 氧 -L- 三甲基基 -、三甲基硅酯	脯氨酸 *
8.29	882	930	57.50	胱氨酸、N,S- 二 (三甲基基) -、三甲基硅酯	胱氨酸 *
8.65	933	936	94.30	L- 谷氨酸、N-N- 三甲基基 -、二 (三甲基基) 酯	谷氨酸
8.74	917	919	56.56	N,O- 二 (三甲基基) - 苯丙氨酸	苯丙氨酸 *
8.97	859	895	89.23	L- 天冬酰胺、N,N2- 二 (三甲基基) -、三甲基硅酯	天冬酰胺
9.54	716	883	42.58	L- 谷氨酰胺、三 (三甲基基) 派生物	谷氨酰胺 *
9.66	757	851	75.87	磷酸、2-[二 (三甲基基) 氨基] 乙基、二 (三甲基基) 酯	磷酸
9.76	890	899	91.68	次黄嘌呤、9-(三甲基基)-6-[(三甲基基) 氧] -	次黄嘌呤
9.81	813	868	80.67	DL- 鸟氨酸、N,N,N'- 三 (三甲基基) -、三甲基硅酯	鸟氨酸 *
9.95	909	916	97.33	D- 松醇、五 (三甲基基) 醚	D- 松醇
10.29	900	903	20.15	D- 葡萄糖	葡萄糖 *
10.33	790	872	88.65	L- 赖氨酸、N2,N6,N6- 三 (三甲基基) -、三甲基硅酯	赖氨酸
10.43	849	853	59.54	L- 酪氨酸、N,O- 二 (三甲基基) -、三甲基硅酯	酪氨酸 *
10.87	887	908	96.16	棕榈酸、三甲基硅酯	棕榈酸 *
11.27	909	913	85.31	肌醇、1,2,3,4,5,6-O-(三甲基基)-	肌醇 *
11.66	788	937	73.75	9,12- 亚油酸 (Z,Z)-、三甲基硅酯	亚油酸
11.78	833	857	94.76	硬脂酸、三甲基硅酯	硬脂酸 *
12.36	843	860	45.27	花生四烯酸、三甲基硅酯	花生四烯酸
15.73	813	840	73.62	胆固醇、三甲基硅酯	胆固醇 *

注：* 为标准品鉴定的代谢物。

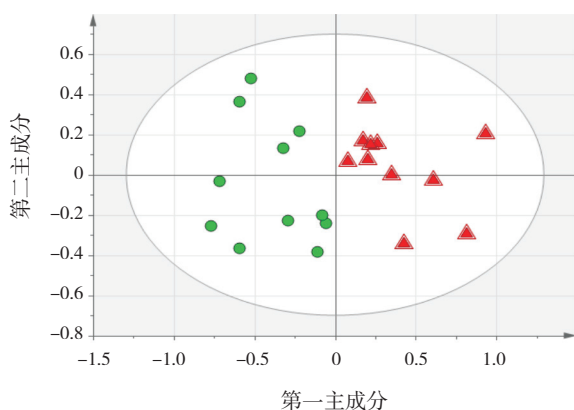


图 4 大肠组织的 PCA 分析 (n=11) ● 为对照组, ▲ 为 RSV 肺炎模型组。两组在 PCA 的第一主成分即可显著区分。

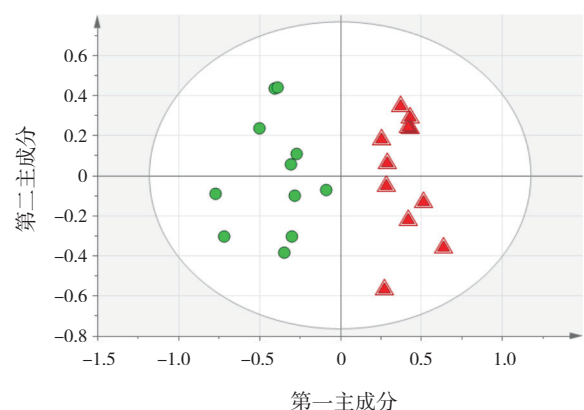


图 5 大肠组织的 OPLS-DA 分析 (n=11) ● 为对照组, ▲ 为 RSV 肺炎模型组。两组在 OPLS-DA 分析上可显著区分。

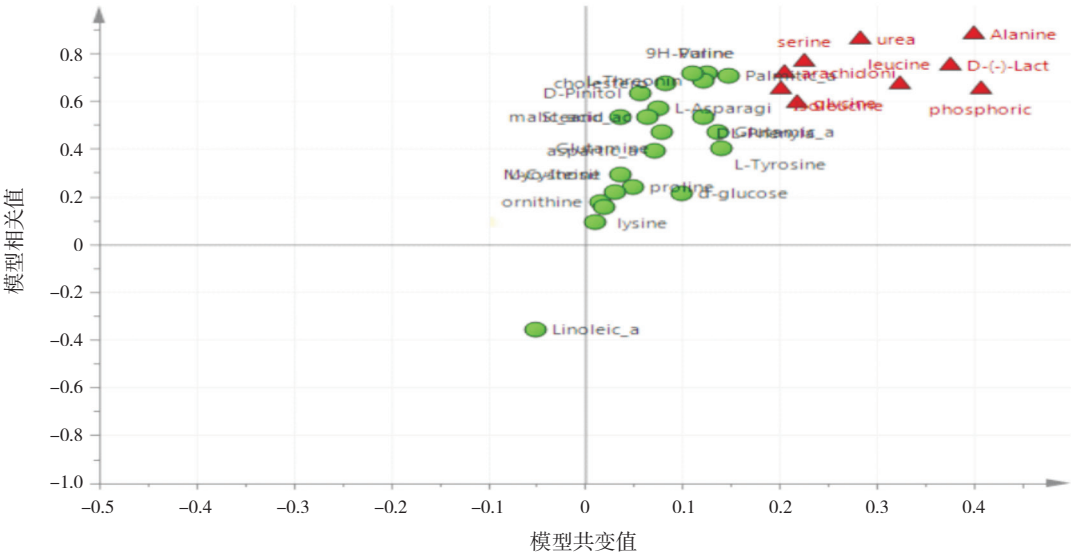


图 6 大肠组织的 S-plot 分析 (n=11) S-plot 显示代谢物的分布情况。▲代表离中心较远的代谢物,可能与大肠组织的代谢指纹图谱变化有关。●代表离中心较近的代谢物,与大肠组织的代谢指纹图谱变化无显著联系。[Alanine] 丙氨酸; [Aminoalanine] 氨基丙氨酸; [Arachidonic acid] 花生四烯酸; [Asparagine] 天冬酰胺; [Aspartic acid] 天冬氨酸; [Cholesterol] 胆固醇; [Cysteine] 胱氨酸; [D-(-)-Lactic acid] 乳酸; [D-glucose] 葡萄糖; [D-Sorbitol] D- 松醇; [Glutamic acid] 谷氨酸; [Glutamine] 谷氨酰胺; [Glyceric acid] 甘油酸; [Glycine] 甘氨酸; [9H-Purine] 次黄嘌呤; [Isoleucine] 异亮氨酸; [Leucine] 亮氨酸; [Linoleic acid] 亚油酸; [L-Tyrosine] 酪氨酸; [Lysine] 赖氨酸; [Malic acid] 苹果酸; [Myo-Inositol] 肌醇; [Ornithine] 鸟氨酸; [Palmitic Acid] 棕榈酸; [Phenylalanine] 苯丙氨酸; [Phosphoric acid] 磷酸; [Proline] 脯氨酸; [Serine] 丝氨酸; [Stearic acid] 硬脂酸; [Threonine] 苏氨酸; [Urea] 尿素; [Valine] 缬氨酸。

表 2 大肠组织中代谢物相对含量比较 (x̄±s)

组别	n	亮氨酸	异亮氨酸	丙氨酸	甘氨酸	花生四烯酸	乳酸
对照组	11	2.4±0.8	1.2±0.4	1.9±0.6	3.7±0.4	0.13±0.04	3.3±1.1
RSV 肺炎模型组	11	3.2±0.9	1.5±0.4	2.9±0.6	4.3±0.8	0.22±0.05	4.2±0.8
t 值		-2.943	-2.616	-5.888	-2.824	-5.779	-2.866
P 值		0.006	0.013	0.001	0.01	0.001	0.008

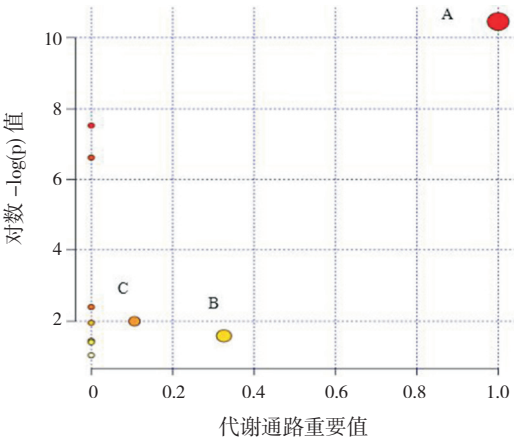


图 7 与大肠损伤可能相关的代谢通路 A: 缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸代谢; B: 花生四烯酸代谢; C: 丙酮酸代谢。

3 讨论

RSV 属于肺炎病毒属副粘病毒科,为有包膜的单链负链 RNA 病毒,是婴幼儿病毒性肺炎的最常见病因。RSV 肺炎可能并发多系统损伤,原因可能是肺炎导致的低氧血症和 RSV 病毒的毒素作用。临床观察发现,RSV 肺炎患儿多有排便性状或次数改变,推测可能是 RSV 肺炎状态下大肠的功能受到影响所致。

作为一类特异性抗原,病毒侵袭人体后,常引起机体代谢物及相关代谢通路的变化。Munger 等^[14]研究发现在人巨细胞病毒感染时,细胞内糖酵解、三羧酸循环、嘧啶合成的相关代谢物呈动

态变化; Semmo 等^[15]报道丙型肝炎病人血浆内葡萄糖、甘露糖、油酸酰胺和乳酸等代谢物的含量发生显著变化。本研究表明, RSV 肺炎可能导致小鼠大肠黏膜组织受损伤, 影响大肠细胞的代谢功能。与对照组相比, RSV 肺炎的小鼠大肠中亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸、花生四烯酸、乳酸等物质的含量均上调, 提示大肠细胞内的代谢紊乱, 推测 RSV 肺炎可能干扰大肠中的缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸通路、花生四烯酸通路与丙酮酸通路。

支链氨基酸 (branched-chain amino acids, BCAA) 如亮氨酸和异亮氨酸是机体的必需氨基酸, 对维持生物体的机能具有重要意义。BCAA 主要通过肠道吸收, 成人摄入的亮氨酸有 20%~30% 可被肠黏膜利用^[16-17], 婴儿摄入的亮氨酸中, 肠道组织利用量可达 42%~48%^[18]。在肠道细胞内, 除用于蛋白质合成外, 大部分 BCAA 通过转氨基和脱羧两条途径进行分解代谢^[19]。Chen 等^[20]研究发现, 大量 BCAA 在猪肠道上皮细胞内通过氨基转移途径进行代谢。与转氨基作用相比, 支链氨基酸 A- 酮酸氧化脱羧作用有限, 仅有 30% 左右的支链 A- 酮酸发生羧基氧化反应。肠上皮细胞中支链 A- 酮酸氧化量很低, 因此 BCAA 不是其主要能量物质^[21]。本研究发现 RSV 肺炎模型组中的支链氨基酸较正常组上升, 可能是 RSV 肺炎状态下机体缺氧, 细胞内无氧代谢增强, 乳酸含量升高, 大肠组织细胞能量供应不足, 导致氨基转移酶活性下降, 因此亮氨酸、异亮氨酸在细胞内累积。此外, 异亮氨酸可以促进 β - 防御素的表达, 提高肠道免疫防御功能, 抵御小鼠肠道沙门氏菌感染^[22]。因此, 异亮氨酸在大肠细胞内浓度增高, 可能还与 RSV 感染后大肠免疫紊乱有关。

花生四烯酸作为机体内的一种必需脂肪酸, 其代谢衍生物具有重要的生物活性。花生四烯酸在生物体内主要是以磷脂的形式存在于细胞膜上, 在磷脂酶 A2 和磷脂酶 C 的作用下分解成游离的花生四烯酸。虽然游离的花生四烯酸在正常的生理状态下水平很低, 但当细胞膜受到各种刺激时, 花生四烯酸便从细胞膜的磷脂池中释放出来并转变为具有生物活性的代谢产物。前列腺素可以增加肠液的分泌, 白三烯 C4 与白三烯 D4 则可以收缩肠道尤其是回肠平滑肌。本研究发现 RSV 肺炎

模型组大肠组织内花生四烯酸含量增高, 可能是机体患 RSV 肺炎时, 大肠组织细胞受到刺激, 因此可能导致其花生四烯酸含量增高, 肠液分泌增加及肠道平滑肌收缩, 从而引起大便性状和 / 或次数的改变。此外, 前列腺素 E2 减少可能与烫伤后大鼠肠黏膜损伤有关^[23], 而本研究发现 RSV 肺炎后花生四烯酸增加, 这还可能与机体的防御性反应有关, 通过花生四烯酸代偿性增加以减轻大肠黏膜损伤。

甘氨酸在机体内参与蛋白质和多种与代谢相关的生物活性分子的合成, 作为天然调节剂, 具有显著生物活性。研究发现, 甘氨酸能抑制肠黏膜肥大细胞脱颗粒, 降低肠黏膜及肠血管通透性, 减少肠源性内毒素的吸收^[24]; 促进肠碱性磷酸酶的表达, 减轻肠黏膜屏障损伤, 可明显改善肠源性内毒素血症^[25]; 降低脂多糖和缺氧诱导的大鼠血清 TNF- α 水平和过量的 NO 水平, 减轻病理损伤^[26]。RSV 肺炎时, 大肠黏膜组织缺氧, 能量供应不足, 可能会引起大肠病理损伤, 而大肠黏膜具有自体修复功能。本研究发现 RSV 肺炎模型组大肠组织内甘氨酸含量较对照组上升, 推测是机体在大肠病理损伤时自体修复, 导致甘氨酸可能在大肠组织中蓄积, 从而改善大肠血管通透性, 减少内毒素吸收, 减轻黏膜损伤。

丙氨酸是体内的一种非必需氨基酸, 胡森等^[27-28]发现丙氨酸可以减少肠黏膜血流量, 加重肠黏膜的代谢应激, 使肠黏膜吸收能力下降, ATP 含量降低, 从而加重肠道缺血再灌注损伤。本研究发现, RSV 肺炎模型组小鼠的大肠组织中丙氨酸含量较高, 可能会导致肠黏膜血流量减少和肠组织吸收能力下降。

本研究通过 GC/MS 代谢组学和多维统计分析方法研究 RSV 肺炎小鼠大肠组织代谢物的变化, 发现 RSV 肺炎可能引起大肠黏膜组织损伤, RSV 肺炎小鼠大肠组织中亮氨酸、异亮氨酸、甘氨酸、丙氨酸、花生四烯酸、乳酸等代谢物含量均较对照组增高, 可能涉及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸代谢, 花生四烯酸代谢和丙酮酸代谢通路。因此, RSV 肺炎导致大肠黏膜损伤可能与 RSV 产生的毒素及机体缺氧有关。但是, 大肠黏膜损伤程度以及具体的损伤机制, 仍有待深入探究。

[参 考 文 献]

- [1] Torgerson DG, Giri T, Druley TE, et al. Pooled sequencing of candidate genes implicates rare variants in the development of asthma following severe RSV bronchiolitis in infancy[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142649.
- [2] Chonmaitree T, Alvarez-Fernandez P, Jennings K, et al. Symptomatic and asymptomatic respiratory viral infections in the first year of life: association with acute otitis media development[J]. *Clin Infect Dis*, 2015, 60(1): 1-9.
- [3] Park A, Suh SI, Son GR, et al. Respiratory syncytial virus-related encephalitis: magnetic resonance imaging findings with diffusion-weighted study[J]. *Neuroradiology*, 2014, 56(2): 163-168.
- [4] Chiu SN, Shao PL, Chen HC, et al. Risk of respiratory syncytial virus infection in cyanotic congenital heart disease in a subtropical area[J]. *J Pediatr*, 2016, 171: 25-30.e1.
- [5] 郑季彦, 李海峰, 汤宏峰. 小儿呼吸道合胞病毒感染的肝脏损害[J]. *浙江预防医学*, 2005, 17(1): 48-50.
- [6] Fernández-Rodríguez A, Ballesteros S, de Ory F, et al. Virological analysis in the diagnosis of sudden children death: a medico-legal approach[J]. *Forensic Sci Int*, 2006, 161(1): 8-14.
- [7] Wang J, Tian Z. How lung infection leads to gut injury[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(40): 42394-42395.
- [8] Punyadarsaniya D, Winter C, Mork AK, et al. Precision-cut intestinal slices as a culture system to analyze the infection of differentiated intestinal epithelial cells by avian influenza viruses[J]. *J Virol Methods*, 2015, 212: 71-75.
- [9] Wang J, Li F, Wei H, et al. Respiratory influenza virus infection induces intestinal immune injury via microbiota-mediated Th17 cell-dependent inflammation[J]. *J Exp Med*, 2014, 211(12): 2397-2410.
- [10] Matsumoto H, Kimura Y, Murao T, et al. Severe colitis associated with both epstein-barr virus and cytomegalovirus reactivation in a patient with severe aplastic anemia[J]. *Case Rep Gastroenterol*, 2014, 8(2): 240-244.
- [11] 李佳曦, 汪受传, 徐建亚, 等. 金欣口服液含药血清及其有效单体白藜芦醇对 RSV 的 RNA 聚合酶转录活性的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2011, 27(1): 36-39.
- [12] Chen ZG, Luo H, Wang SC, et al. Antiviral effects of Jinxin oral liquid against respiratory syncytial virus infection in the BALB/c mice model[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 287-295.
- [13] Major HJ, Williams R, Wilson AJ, et al. A metabonomic analysis of plasma from Zucker rat strains using gas chromatography/mass spectrometry and pattern recognition[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(22): 3295-3302.
- [14] Munger J, Bajad SU, Collier HA, et al. Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection[J]. *PLoS Pathog*, 2006, 2(12): e132.
- [15] Semmo N, Weber T, Idle JR, et al. Metabolomics reveals that aldose reductase activity due to AKR1B10 is upregulated in hepatitis C virus infection[J]. *J Viral Hepat*, 2015, 22(7): 617-624.
- [16] Biolo G, Tessari P, Inchiostro S, et al. Leucine and phenylalanine kinetics during mixed meal ingestion: a multiple tracer approach[J]. *Am J Physiol*, 1992, 262(4 Pt 1): E455-E463.
- [17] Hoerr RA, Matthews DE, Bier DM, et al. Effects of protein restriction and acute refeeding on leucine and lysine kinetics in young men[J]. *Am J Physiol*, 1993, 264(4 Pt 1): E567-E575.
- [18] Riedijk MA, van Goudoever JB. Splanchnic metabolism of ingested amino acids in neonates[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2007, 10(1): 58-62.
- [19] Wu G. Intestinal mucosal amino acid catabolism[J]. *J Nutr*, 1998, 128(8): 1249-1252.
- [20] Chen LX, Yin YL, Jobgen WS, et al. In vitro oxidation of essential amino acids by jejunal mucosal cells of growing pigs[J]. *Livest Sci*, 2007, 109: 19-23.
- [21] Chen L, Li P, Wang J, et al. Catabolism of nutritionally essential amino acids in developing porcine enterocytes[J]. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 143-152.
- [22] Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, et al. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense[J]. *Science*, 1999, 286(5437): 113-117.
- [23] 孟德胜, 汪仕良. 烫伤对大鼠肠黏膜内生四烯酸代谢物的影响[J]. *第三军医大学学报*, 1999, 21(11): 817, 820.
- [24] 张巍, 员克明, 韩德五. 甘氨酸防治大鼠肠源性内毒素血症机制研究[J]. *山西医科大学学报*, 2003, 34(2): 97-98.
- [25] 吴惠文, 姚心琪, 鲁静浩, 等. 甘氨酸对果糖饮食诱导大鼠肠源性内毒素血症的保护作用[J]. *现代预防医学*, 2015, 42(16): 2917-2919.
- [26] 柳国胜, 康举龄, 陆大祥, 等. 甘氨酸对脂多糖和缺氧诱导鼠坏死性肠炎的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(4): 402-405.
- [27] 胡森, 盛志勇. 肠缺血再灌注时肠内给予不同营养物质对肠黏膜 ATP 含量的影响[J]. *氨基酸和生物资源*, 2002, 24(3): 63-65.
- [28] 胡森, 盛志勇, 柳琪林, 等. 大鼠小肠缺血再灌注时肠内给予不同营养物质对肠黏膜吸收功能和能量代谢的影响[J]. *中华医学杂志*, 2002, 82(10): 689-691.

(本文编辑: 万静)