长期缺氧对婴幼儿肠道菌群代谢的影响

文仁国,孙国林,彭晓波,马瑞岩,肖颖彬 (第三军医大学新桥医院心血管外科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 探讨长期缺氧对紫绀先天性心脏病婴幼儿肠道菌群代谢的影响。**方法** 将我院住院治疗的法洛四联症患儿 10 例设为缺氧组,健康同龄儿童 10 例为对照组。核磁共振波谱仪(^{1}H-NMR)检测禁食后清晨尿液马尿酸含量。**结果** 缺氧组与对照组的马尿酸含量分别为(47.15 ± 32.88) mg/L 和(346.698 ± 13.555) mg/L,有显著性差异,$P = 0.002$。**结论** 长期慢性缺氧会影响婴幼儿肠道菌群代谢。

[关键词] 长期缺氧;婴幼儿;肠道菌群;马尿酸;代谢
[中图分类号] R378.2;R364.4 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)02-0121-02

Chronic hypoxia in altering metabolism of intestinal flora of infants

WEN Ren-guo, SUN Guo-lin, PENG Xiao-bo, MA Rui-yan, XIAO Ying-bin (Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the metabolism change of intestinal flora due to chronic hypoxia in infants. **Methods** Ten infants with tetralogy of fallot were considered as the chronic hypoxia group, 10 healthy infants were regarded as the control group. The urine concentration of hippurate in the morning with fasting was detected by ^{1}H nuclear magnetic resonance. **Results** The concentration of hippurate was decreased in hypoxia group compared with the control group, (47.15 ± 32.88) mg/L vs (346.698 ± 13.555) mg/L, with significant difference, $P = 0.002$. **Conclusion** Chronic hypoxia alters metabolism of intestinal flora in infants.

Keywords: chronic hypoxia; infants; intestinal flora; hippurate; metabolism

马尿酸是甲苯、苯甲酸等的代谢产物,分子式为 $C_9H_9NO_3$,分子量 179。饮食中的芳香族化合物由肠道微生物代谢成苯甲酸,随后肝肾结合苯甲酸和甘氨酸,形成马尿酸。尿液中代谢物的差异反应出肠道微生物代谢变化引起的整体结果,尽管也可能包括宿主代谢途径的变化。肠道环境的改变导致了马尿酸的减少[1-2]。为了研究长期低氧暴露对婴幼儿体内肠道菌群代谢的影响,我院采用核磁共振波谱仪(^{1}H-NMR)检测紫绀型先天性心脏病婴幼儿和同龄健康儿童尿液马尿酸含量,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本研究经过第三军医大学附属新桥医院伦理委员会批准。将法洛四联症患儿 10 例设为缺氧组,其中男 6 例,女 4 例,年龄 21 ~ 25 个月,体质量 7.5 ~ 11 kg,动脉血氧饱和度 70% ~ 86%。10 例健康儿童作为对照组,男 6 例,女 4 例,年龄 20 ~ 24 个月,体质量 12 ~ 15 kg,动脉血氧饱和度 100%。采集清晨空腹尿液,3 000 r/min 离心 10 min 后,置于 -20 °C 冰箱保存待测。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 仪器:德国 Bruker Avance Ⅲ 600 MHz 超导核磁共振波谱仪,配 TCI 三共振反式超低温探头。离心机德国 Eppendorf MiniSpin Plus。试剂:重水美国 NORELL 公司,99.8%;三甲基硅丙磺酸钠(DSS)为青岛腾龙微波公司进口分装;K_2HPO_4,NaH_2PO_4 为广东光华化学厂有限公司产品。

1.2.2 一维^{1}H-NMR 波谱 配制尿液样品时,尿样 12 000 r/min,离心 10 min,取 500 μl 尿样,加入 250 μl 磷酸缓冲液(0.1 mol/L K_2HPO_4/NaH_2PO_4,pH = 7.4,30% D2O)混合,以消除因 pH 变化所引起谱图化学位移漂移,静置 10 min,离心 10 min后,取上层液 500 μl 移入 5 mm NMR 样品管。加入50 μl D2O(用于锁场),振荡混匀。采用预饱和的 1D CPMG 脉冲序列。谱宽 20 ppm,采用 600.13 MHz 的质子共振频率,298 K 的实验温度。采样时间为 0.1 s,弛豫延迟时间为 2 s。采样点数 32 K,累加次数 64 次,谱仪偏置设在水峰的位置,自由感应衰减信号经过填 0 为 64 K 点之后,再加 1.00 Hz 的线宽因子,经傅里叶变换转换为 NMR 谱图。每张 NMR 谱记录 48 个 FID,采用线宽为 1.0 Hz 的指数窗函数,进行傅立叶变换。参照 DSS 作为化学位移内标,对^{1}H-NMR 谱的化学位移进行定标。磁共振波谱仪样品管内 DSS 浓度 40 μg/mL。1 维氢谱重要采样参数:CPMG:TD = 32 K,SW = 20 ppm,NS = 64,DS = 4,D1 = 2 s,D2O = 350 μs,L4 = 100(2nt = 70 ms)。其余采样参数如 90 度脉宽值(P1)及其所对应的功率值(PL1),压水功率值(PL9),压水频率(O1),增益值(RG)根据具体样品进行测定,P1 值以接近 10 μs 为佳。重要处理参数:SI = 64 K,WDW EM,LB = 1 Hz,PH_mod pk,Tdeff = 0。

1.3 数据处理

马尿酸定量峰的选择:采用磁共振波谱仪进行定量时应首

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201402004
[收稿日期] 2014-02-15 [修回日期] 2014-02-28

先对样品的各个质子峰进行归属,明确每个质子峰所对应的质子数。选 7.82 ppm 含 2 个氢质子的双峰用于定量。测定选定峰与 DSS 面积的相对比值,计算含量。

马尿酸样品的绝对重量(Wx)由下式求得:Wx = Ws × (Ax/As) × (E/Es)(Ws 为内标物重量;Ax 为样品峰面积;As 为内标物峰面积;E 为样品在该化学位移处的质子当量,即 E = 样品分子量/产生该共振峰的基团中的质子数;Es 为内标物在该化学位移处的质子当量,即 Es = 内标物分子量/产生该共振峰的基团中的质子数。)

1.4 统计学方法

采用 SSPS 13.0 软件,进行 t 检验,$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

患儿与健康儿童尿液^{1}H-NMR 谱图见图 1。患儿与健康儿童尿液马尿酸浓度分别为(47.15 ± 32.88) mg/L,(346.69 ± 13.55) mg/L,$P = 0.002$。

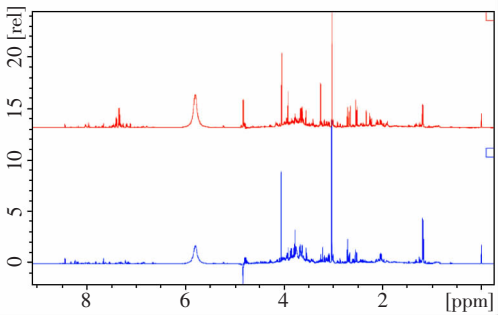


图 1 患儿与健康儿童尿液^{1}H-NMR 谱图(红色:健康儿童;蓝色:长期缺氧儿童)

3 讨论

肠道微生态系统是机体最庞大、最重要的微生态系统。肠道微生态系统经常处于动态平衡稳定之中,同时又容易受到肠道内外许多因素影响,导致肠道微生态紊乱。年龄越小,特别是婴幼儿肠道微生态平衡稳定非常脆弱,越容易受到各种因素影响,导致严重的肠道微生态紊乱。

肠道微生菌在胆红质代谢的肠肝循环中起到十分重要的作用。当肠道微生态平衡稳定,胆红质代谢的肠肝循环得以正常进行;相反,若肠道微生态紊乱,肠道菌丛发生变化就会干扰胆红质的肠肝循环,影响肝脏的胆红质代谢,从而影响到肝脏功能。此外,肠道菌群是否平衡稳定对肠道上皮细胞功能也有明显的影响。肠壁的完整和肠上皮细胞的正常,对肝脏的营养、物质代谢无疑起到良好作用。相反,则肝脏、肝功会受到损伤或加重已发生的肝损害及肝功能障碍[3]。人体维生素 K 主要由肠道正常菌群产生和食物供给,其中大多数维生素由肠道菌合成。肠道菌群紊乱和破坏可引起维生素 K 依赖性因子缺乏,因而表明肠道正常菌群对维生素 K 的产生具有重要的作用,是人体维生素 K 的主要来源[4]。肠道微生物组学对健康人的重要性,提供新的理解,能够描绘种属、个体和群体之间的微生物组学变化。已经明确了肠道微生物组学在许多疾病病理发展过程中的重要性,如肥胖、心血管疾病以及炎性肠道疾病。

自从 Liebig[5] 在 1829 年第一次确定尿液里的马尿酸以来,就一直在研究马尿酸的起源。在 20 世纪早期确定人类的马尿酸是苯甲酸和甘氨酸结合的产物[6],即由肠道微生物将饮食中的芳香族化合物代谢成苯甲酸,随后肝肾结合苯甲酸和甘氨酸,形成马尿酸。后期的研究揭示,这是通过一种在肝脏和肾脏线粒体中的苯甲酸辅酶 A 结合而成的[7-9]。动物实验证实,尿液马尿酸排泄由肠道微生物组成调节[10-11]。肠道菌群直接分解苯甲酸产生马尿酸也是其来源之一[12]。关于人尿液中排泄浓度,邱晓岩等[13]检测 33 名职工尿中马尿酸值的变化范围为 0 ~ 1 250.75 mg/L,呈正态分布,平均值为 479.54 mg/L,标准差为 257.07 mg/L。本次研究健康儿童尿液马尿酸浓度为(346.69 ± 13.55) mg/L,与成人接近。

近年来对健康人群的研究,更深入地了解了肠道细菌对人体代谢表型的巨大影响[14]。Li 等[14] 发现梭状芽孢杆菌和马尿酸水平呈正相关,可能与本研究中马尿酸减少有关。与长期缺氧有关的尿液代谢研究分析了肠道微生物菌群的分子机制,提示将是更宽广的研究方向。尿液代谢物水平受到肠道微生物差异的显著影响,即肠道细菌代谢、宿主和细菌分享代谢(共生代谢)产生特异的代谢物[15]。这样的代谢物可以用作微生物代谢反应的标志物,反应系统功能的差异。利用基于核磁共振的代谢组技术分析尿液中代谢物的组成,以反映人体整体代谢状况,可避免技术困难、方法学的差异。

苯甲酸是简单的羧酸,由肠道微生物降解食物中的芳香酸产生,如多酚、嘌呤、芳香有机酸和氨基酸等。在摄入黑茶、绿茶和红茶,以及水果、蔬菜丰富的食物后,马尿酸排泄增加。苯甲酸存在于大量的食物和饮料里,也存在大部分浆果、水果和发酵的奶产品里,因此患儿及健康儿童均正常进食就不会存在苯甲酸摄入不足。

研究长期缺氧婴幼儿和健康幼儿马尿酸的尿液排泄,提示肠道菌群在马尿酸排泄的过程中起关键的作

(下转第 124 页)

组织病理特点推测,该病的发生可能与遗传和免疫有关,好发于耳垂、胸骨前区、三角肌区等,由皮肤损害后大量结缔组织过度增生和透明变性引起的皮肤病变[1-3]。耳垂瘢痕疙瘩常由穿耳洞导致,也可能因耳部创伤、烧伤后愈合过程中瘢痕过度生长呈瘤样所致,常伴有瘙痒、疼痛等不适症状。单纯行手术切除复发率高,且有随手术损伤刺激而使病变进一步扩展的倾向[4]。采用手术切除加局部放射治疗可以取得一定疗效,但局部损伤大、放射治疗会产生全身不良反应,且术后较易复发,疗效仍欠满意[5],大量的临床研究均提倡应用多种方法复合治疗耳垂瘢痕疙瘩。

研究证实,激素能通过抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖及Ⅰ、Ⅲ胶原的合成,促进细胞凋亡使瘢痕变平变薄,其代表药物有被广泛应用的中长效激素曲安奈德[6]。我们通过局部注射曲安奈德,减轻患者瘙痒及疼痛症状,且瘢痕疙瘩表面皮肤充血症状好转,瘢痕质地得到一定程度的软化。

手术切除是本治疗的重要环节,而手术方式的选择及术中操作是减少瘢痕疙瘩切除后复发的重要因素[7-8]。基于整形外科手术中要求“无创、无张力、无死腔”的原则,我们对瘢痕组织采取锐性分离的方法,有效降低了对周围组织的损伤,同时保留部分瘢痕疙瘩表面皮肤组织并于皮下适当固定数针,从而达到切口位置的无张力缝合;术后妥当加压包扎能有效消灭术区死腔,通过以上操作,大部分患者都得到了良好的治疗。

[参考文献]

[1] 蔡景龙. 现代瘢痕学[M]. 人民卫生出版社,2008:106 - 161.

[2] Marneros AG, Norris JE, Olsen BR, et al. Clinical genetics of familial keloids[J]. Arch Dermatol, 2001, 137(11): 1429 - 1434.

[3] Datubo-Brown DD. Keloids: a review of the literature[J]. Br J Plast Surg, 1990, 43(1): 70 - 77.

[4] Stucker FJ, Shaw GY. An approach to management of keloids[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1992, 118(1): 63 - 67.

[5] Al-Attar A, Mess S, Thomassen JM, et al. Keloid pathogenesis and treatment[J]. Plast Reconstr Surg, 2006, 117(1): 286 - 300.

[6] 鲍卫汉,徐少骏. 激素治疗瘢痕的机理研究[J]. 中华外科杂志, 2000, 38(5): 378 - 381.

[7] 王春梅,张 继,归 来,等. 耳部瘢痕疙瘩的个性化治疗[J]. 中国临床康复, 2006, 10(16): 23 - 25.

[8] Kim DY, Kim ES, Eo SR, et al. A surgical approach for earlobe keloid: keloid fillet flap[J]. Plast Reconstr Surg, 2004, 113(6): 1668 - 1674.

(编辑:杨 颖)

(上接第 122 页)

用。研究发现马尿酸水平减少,提示长期缺氧婴幼儿肠道菌群组成发生变化,肠道微生物组成及其代谢仍需进一步研究。

[参考文献]

[1] Delaney J, Neville WA, Swain A, et al. Phenylacetylglycine, a putative biomarker of phospholipidosis: its origins and relevance to phospholipid accumulation using amiodarone treated rats as a model[J]. Biomarkers, 2004, 9(3): 271 - 90.

[2] Waters NJ, Waterfield CJ, Farrant RD, et al. Integrated metabonomic analysis of bromobenzene-induced hepatotoxicity: novel induction of 5-oxoprolinosis[J]. J Proteome Res, 2006, 5(6): 1448 - 1459.

[3] 刘作义. 肝功能障碍与肠道微生态[J]. 小儿急救医学 2004, 11(6): 356 - 357.

[4] 魏 星. 肠道菌群紊乱所致维生素 K 依赖性因子缺乏 1 例报告[J]. 局解手术学杂志, 2006, 15(5): 347.

[5] Liebig J. Ueber die Säure welche in dem Harn der grasfressenden vierfüssigen Thiere enthalten ist [J]. Poggendorfs Ann Phys Chem, 1829, 93: 389 - 399.

[6] Lewis HB. Studies in the synthesis of hippuric acid in the animal organism. II. The synthesis and rate of elimination of hippuric acid after benzoate ingestion in man[J]. J Biol Chem, 1914, 18: 225 - 231.

[7] Schachter D, Taggart JV. Benzoyl coenzyme A and hippurate synthesis [J]. J Biol Chem, 1953, 203(2): 925 - 934.

[8] Caldwell J, Moffatt JR, Smith RL. Post-mortem survival of hippuric acid formation in rat and human cadaver tissue samples[J]. Xenobiotica, 1976, 6(5): 275 - 280.

[9] Gatley SJ, Sherratt HS. The synthesis of hippurate from benzoate and glycine by rat liver mitochondria. Submitochondrial localization and kinetics [J]. Biochem J, 1977, 166(1): 39 - 47.

[10] Williams RE, Eyton-Jones HW, Farnworth MJ, et al. Effect of intestinal microflora on the urinary metabolic profile of rats: a (1)H-nuclear magnetic resonance spectroscopy study[J]. Xenobiotica, 2002, 32(9): 783 - 794.

[11] Nicholls AW, Mortishire-Smith RJ, Nicholson JK. NMR spectroscopic-based metabonomic studies of urinary metabolite variation in acclimatizing germ-free rats[J]. Chem Res Toxicol, 2003, 16(11): 1395 - 1404.

[12] Farrell PC, Gotch FA, Peters JH, et al. Binding of hippurate in normal plasma and in uremic plasma pre and postdialysis[J]. Nephron, 1978, 20(1): 40 - 46.

[13] 邱晓岩,胡富荣. 尿中马尿酸值的高效液相色谱法及正常值的探讨[J]. 化工劳动保护(工业卫生与职业病分册), 1997, 18(6): 251 - 252.

[14] Li M, Wang B, Zhang M, et al. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(6): 2117 - 2122.

[15] Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care[J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(5): 431 - 438.

(编辑:杨 颖)