网络出版时间:2022-04-1913:21 网络出版地址: https://kns. cnki. net/kcms/detail/34.1065. R. 20220415.1512.006. html

# 基于 UPLC-QTOF-MS 的呼吸道合胞病毒 感染鼠盲肠内容物代谢组研究

桂红芽,王姝妹,张晓燕,章孝成,黄升海,何茂章

摘要 目的 构建呼吸道合胞病毒(RSV)感染 Balb/c 鼠模型,分析肺部病毒感染是否会造成盲肠内容物代谢组发生显著改变。方法 13 只雌性 Balb/c 鼠随机分为实验(Case)组(n=7)和对照(Ctrl)组(n=6),Case 组以 RSV 滴鼻,Ctrl 组用 DMEM 滴鼻。在感染后第3天以10%水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠,处死小鼠后采集盲肠内容物,利用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱(UPLC-QTOF/MS)检测代谢物组成及其相对含量的变化,结合单变量统计分析(组间差异分析)和多元统计分析[主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)]鉴定在两组间有显著差异的代谢物;采用随机森林模型筛选预测 RSV 感染的代谢物标志物;通过代谢通路分析确定与 RSV 感染相关的代谢通路。结果

Case 组盲肠内容物代谢物基峰强度色谱图与 Cul 组有明 显差别;PCA 和 OPLS-DA 分析均提示 Case 组和 Cul 组代谢 物组成存在显著分离。Case 组显著富集的代谢物有 L-丝氨 酸、2-丁酮酸、油酸和甘氨酸鹅去氧胆酸,显著降低的有 L-甲 硫氨酸、L-酪氨酸和烟酸等(*P* < 0.05, VIP > 1);主要与赖氨 酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢和丙酸盐代谢通路相关。结 论 RSV 感染引起的肺部损伤可能引起盲肠内容物内源性 代谢失调。

关键词 呼吸道合胞病毒;盲肠;UPLC-QTOF/MS;代谢组 学;代谢失调

中图分类号 R 373.1

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2022)05 - 0702 - 06 doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2022.05.006

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)感染所诱发的下呼吸道疾病是导致婴幼儿死 亡的重要因素之一,目前 RSV 致病机制尚未阐明, 且无商品化疫苗<sup>[1-2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>表明肠道微生物平衡 对肺部健康至关重要,肠道与肺之间的相互联系,现 称之为"肠 – 肺轴"。肠道微生物种类和代谢产物

基金项目:国家自然科学基金(编号:81974306);安徽医科大学校基金(编号:2019xkj001)

作者单位:安徽医科大学微生物学教研室,合肥 230032 作者简介:桂红芽,女,硕士研究生:

> 何茂章,男,博士,讲师,责任作者,E-mail:hmz91@ahmu. edu.cn

的改变与免疫反应、炎症以及肺部疾病的发展有 关<sup>[4]</sup>。肠道菌群代谢产物可影响肺部稳态,如短链 脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)被证明可通 过增加调节性T细胞促进白介素-10产生,抑制组 蛋白脱乙酰化和一型干扰素从而缓解上、下呼吸道 炎症<sup>[5]</sup>。除此之外,菌群产生的其他代谢物产物如 组胺、12,13-diHOME 可通过影响免疫细胞数量及 细胞因子水平促进肺部炎症。研究<sup>[6]</sup>表明,RSV 感 染后血清胆汁酸谱发生改变。孟欣等<sup>[7]</sup>通过 GC-MS 代谢组学分析发现尿液和粪便中乳酸和氨基酸 类代谢物在 Case 组与 Ctrl 组间差异显著。不同肠 道部位菌群数量和种类具有明显差异,关于 RSV 感 染后盲肠代谢物组成研究尚少。因此研究 RSV 感 染后盲肠代谢物的变化可为后期靶向调控或治疗肺 部炎症性疾病提供靶点。

## 1 材料与方法

#### 1.1 材料

 1.1.1 主要试剂 DMEM 细胞培养基(美国 Gibco 公司);水合氯醛(上海 MACKLIN 公司);色谱级甲 醇、乙腈(美国 Thermo 公司);2-氯苯丙氨酸(上海 Aladdin 公司);甲酸(美国 Merck 公司);甲酸铵(美 国 Sigma 公司)。

1.1.2 主要仪器 UltiMate 3000 高效液相色谱仪、 Q Exactive Focus 质谱仪(美国 Thermo 公司),H1650-W 冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司),QL-866 混匀仪(郑州南北仪器有限公司),KW-100TDV 超声波清洗器(昆山舒美公司),SCIENTZ-48 组织研 磨器(宁波新芝公司)。

1.1.3 病毒和动物模型构建 RSV-Long 株由笔者 单位保存。SPF级6~7周龄 Balb/c鼠(雌性)购自 安徽医科大学实验动物中心并饲养在安徽医科大学 基础医学院 P2动物房。实验(Case)组小鼠经10% 水合氯醛(200μl/只)腹腔注射麻醉后经鼻滴入50 μl 无菌 RSV-Long 株病毒悬液(n=7),对照(Ctrl) 组小鼠采用同体积的无菌 DMEM 液滴鼻(n=6)。 感染3d后,腹腔注射水合氯醛深度麻醉 Balb/c小

<sup>2022-03-17</sup> 接收

鼠。行 75% 乙醇溶液擦拭腹部, 在超净工作台对小 鼠进行解剖, 取下盲肠组织(含内容物)装入无菌冻 存管后放入液氮速冻, 保存于-80℃冰箱。

#### 1.2 方法

1.2.1 盲肠内容物代谢物提取 快速称取 100 mg 盲肠内容物(±1%)于2 ml EP 管中(置于冰上), 加入提前预冷的 0.6 ml 2-氯苯丙氨酸(0.004 g/L) 甲醇(-20 ℃),涡旋振荡 30 s;此外,向之前的管子 中加入 100 mg 玻璃珠,在高通量组织研磨仪中以 60 Hz 频率研磨 90 s;随即进行室温超声 10 min;样 品以 12 000 r/min 离心 10 min(4 ℃)。用 0.22  $\mu$ m 膜对 300  $\mu$ l 上清液进行过滤并加入到色谱进样瓶 中;QC(quality control,用来校正样品分析结果的偏 差以及由于分析仪器自身原因所造成的失误)样品 为每个样本各取 10  $\mu$ l 混合而成;剩余待测样本将 根据每 6 个样本穿插一个 QC 样本的顺序进行液相 色谱 – 质谱(liquid chromatography – mass spectrometry, LC-MS)检测,进样体积为 3  $\mu$ l。

1.2.2 液相色谱质谱联用分析

**1.2.2.1** 色谱条件 超高效液相色谱分析采用 Thermo Ultimate 3000 系统,色谱柱为 ACQUITY UP-LC ® HSS T3 1.8  $\mu$ m(2.1 mm×150 mm),自动进 样器和色谱柱温度分别维持在4 ℃和40 ℃,流速为 0.25 ml/min,进样体积设定为2  $\mu$ l 并进行梯度洗 脱,正离子流动相为0.1%甲酸水(C)-0.1%甲酸 乙腈(D);负离子流动相为5 mmol/L甲酸铵水(A) -乙腈(B)。样品的梯度洗脱程序设定为:0~1 min,2% B/D;1~9 min,2%~50% B/D;9~12 min,50%~98% B/D;12~13.5 min,98% B/D; 13.5~14 min,98%~2% B/D;14~20 min,2% D-正模式(14~17 min,2% B-负模式)。

1.2.2.2 质谱条件 质谱采集系统使用 Thermo Q Exactive Focus,配备电喷雾离子源(ESI),具有正负离子扫描模式。电喷雾源参数设定如下:毛细管电压正、负离子条件下分别设定为 3.50 kV 和 2.50 kV;样本和萃取锥孔电压分别为 40 V 和 4.0 V。脱溶剂气流量为 800 L/h,温度为 400 ℃,锥孔气流量为 40 L/h,温度为 100 ℃。分辨率为 70 000 进行数据全扫描,数据采集范围为 0.08 ~ 1 ku,并采用HCD 进行二级裂解,碰撞电压为 30 eV,同时采用动态排除去除不必要的质谱二级碎片信息。

1.2.2.3 质谱采集数据处理 采用 Proteowizard 软件(v3.0.8789)将质谱下机原始数据格式 raw 转换为 mzXML 格式(此为 XCMS 软件的输入文件格

式);基于 R 软件(v3.3.2)的 XCMS 程序包进行如 下数据处理:峰识别(peaks identification)、峰过滤 (peaks filtration)、峰对齐(peaks alignment);主要参 数设定如下:bw = 2, ppm = 15, peakwidth = c(5, 30), mzwid = 0.015, mzdiff = 0.01, method = cent-Wave;得到包括质荷比(mass to charge ratio, m/z)、 保留时间(retention time, rt)、峰面积(intensity)等 信息的三维数据矩阵用于后续生物信息学统计分 析。

1.3 统计学处理 首先对离子强度数据表进行基 于峰面积的批次归一化处理(batch normalization)。 采用 SIMCA-P 软件(14.1 版本, Umetrics 公司) 对经 过归一化的数据进行多元统计分析:如主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二 乘法判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)数据分析。单变量统 计分析采用 R 软件 Wilcoxon Mann-Whitney 组间差 异检验。初步筛选符合 P < 0.05、OPLS-DA 第一主 成分变量重要性投影(variable important in the projection, VIP) >1, 两个条件的代谢物用于进一步构 建二元逻辑回归模型,筛选能够预测 RSV 感染的代 谢物标志物,通过受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)并计算曲线线下面 积(area under the curve, AUC)来表征模型预测的准 确性。利用 MetaboAnalyst(https://www.metaboanalyst.ca)网站对鉴定出的差异代谢物进行代谢通路 分析。

## 2 结果

2.1 小鼠盲肠内容物代谢轮廓 基于 UPLC-QT-OF-MS 平台所采集的正、负离子模式基峰色谱 (BPC)图(图1), Case 组小鼠盲肠内容物图谱与 Ctrl 组小鼠有明显差别。

QC 样本质谱峰变异系数统计见图 2,可以看到 离子特征峰相对标准偏差(RSD) < 30%的比例能达 到 80% 左右,而且 PCA 图显示 QC 样本分布集中, 说明数据稳定性和可重复性良好。

2.2 差异代谢物筛选与鉴定 正、负离子模式分别 得到 33 200、28 405 个前体分子。利用 OPLS-DA 对 Case 组和 Ctrl 组盲肠内容物代谢组学特征值进行 差异分析,见图 3。正离子和负离子模式下 Case 组 和 Ctrl 组均显示明显的分离。

RSV 小鼠模型建立后盲肠内容物差异代谢物 以组间P < 0.05、VIP > 1为过滤标准,分别在正离



子模式和负离子模式下筛选到3310和2714个组间差异代谢物特征值。合并正负离子后进行代谢物的定性分析,代谢物的鉴定首先需获得精确的代谢物分子量(分子量误差 <15 ppm),再根据代谢物的MS/MS模式所得碎片信息在HMDB数据库(http://www.hmdb.ca)、Metlin数据库(http://metlin.scripps.edu)和 massbank(http://www.massbank.jp/)等商业数据库及自建标准品数据库中进一步匹配注释获得代谢物准确信息。根据注释结果得到33个有确定名称的组间差异代谢物生物标志物并通过热图进行展示,见图4。

#### 2.3 随机森林筛选预测 RSV 感染的代谢物标志物

为进一步解析盲肠内容物代谢物变化与 RSV 感染 的关系,对 33 个组间差异代谢物进一步构建随机森 林分类模型,筛选能用于准确预测 RSV 感染的代谢 物标志物。随机森林分类模型鉴定到 16 个对模型分 32 类最重要的代谢物,按照"MeanDecreaseAccuracy" 参数排序后主要有:鹅去氧胆酸甘氨酸耦合物、还原 核 黄素、dAMP等。ROC曲线分析结果显示16个代



A:正离子模式;B:负离子模式









谢物能以高稳定性和高准确率将 Case 组和 Ctrl 组区 分开来,其中 ROC 曲线线下面积 AUC 值为 100%,灵 敏度为 100%,特异性为 100%。见图 5。

2.4 代谢通路分析 将随机森林分析鉴定到的 16 个代谢物上传到 Metaboanalyst 网站进行通路分析。 KEGG 数据库以编码代谢物的基因和基因组的功能 信息为基础,以代谢反应为线索,将可能的代谢途径 及对应的调控蛋白进行串联,以图形化的方式展示细 胞生理生化过程。代谢物的富集分析结果显示(图 6),Case 组和 Ctrl 组盲肠内容物的差异代谢物主要 富集到赖氨酸分解、半胱氨酸和蛋氨酸代谢和丙酸盐 代谢通路。



图 5 随机森林分类模型筛选与 RSV 感染相关代谢物标志物 A:采用随机森林法对代谢物进行平均精确度下降系数排序;B:利用随机森林模型预测 Case 组和 Ctrl 组的受试者操作特征曲线



# 3 讨论

机体微生物组对宿主免疫至关重要,RSV 感染刺激机体抗病毒免疫会导致肠道菌群紊乱。呼吸道病毒与肠道菌群关系密切,病毒感染诱导肠道菌群失调后,改变了固有细菌代谢能力,此种情况下肠腔内代谢产物的数量和种类与正常稳态情况下差异巨大。 盲肠菌群是发酵宿主难消化膳食纤维的主要场所,产 生大量的短链脂肪酸如乙酸、丙酸和丁酸,短链脂肪 酸可发挥局部和系统影响。研究<sup>[8]</sup>表明短链脂肪酸 可以通过激活 G – 蛋白偶联受体发挥调控免疫细胞 的激活和功能,此外还可以抑制组蛋白去乙酰化酶活 性,维持肠道稳态。已有研究<sup>[9]</sup>显示孕妇摄入足量的 水果和蔬菜(膳食纤维来源用于产生短链脂肪酸)可 保护后代抵御 RSV 感染。有研究<sup>[10]</sup>证明给小鼠补充 高膳食纤维饮食可通过降低病毒载量和炎症抵御 RSV 疾病,该保护方式依赖于肠道菌群及其产生的短 链脂肪酸,其中小鼠和细胞实验表明,乙酸可诱导肺 部的β干扰素(interferon, IFN-β)生成、促进I型 IFN 应答,IFN-I受体介导了乙酸对 RSV 感染的抵抗作用, 该作用还依赖于G蛋白偶联受体 Gpr43 和核因子 κB (NF-κB)的活化。

本研究中 PCA 和 OPLS-DA 均显示 Case 组和 Ctrl 组小鼠的盲肠内容物样本能够完全分离,说明两 组盲肠内容物代谢谱有明显差异,提示小鼠感染 RSV 后盲肠内容物代谢发生紊乱。结果显示,Case 组小鼠 盲肠显著富集 L-丝氨酸、油酸等代谢物和脂质分子。 Yan et al<sup>[11]</sup>采用人冠状病毒 229E(HCoV-229E)为 模型冠状病毒研究冠状病毒感染后宿主细胞脂质的 变化,发现24种脂类包括油酸、亚油酸和花生四烯酸 等在细胞感染后显著上调。病毒复制需要特定的细 胞脂质成分,任何脂质组分的破坏都可能降低病毒复 制的效率。甘氨酸鹅去氧胆酸在 Case 组显著富集, 而且随机森林模型鉴定出甘氨酸鹅去氧胆酸是预测 RSV 感染最重要的代谢物标志物(图 5A),甘氨酸鹅 去氧胆酸去耦合作用需要肠道菌群的参与以及 RSV 感染后甘氨酸鹅去氧胆酸的升高说明胆汁酸的正常 "肝肠循环"发生失调<sup>[12]</sup>。上述结果初步说明 RSV 感染会影响盲肠胆汁酸代谢发生改变。研究表明甲 硫氨酸是抗氧化物质谷胱甘肽和牛磺酸的前体物 质<sup>[13]</sup>,谷胱甘肽可以通过清除羟自由基及超氧化物 来保护机体<sup>[14]</sup>,所以盲肠中甲硫氨酸含量的降低可 能是 RSV 病毒通过"肺 – 肠轴"诱发肠道损伤及菌群 代谢的潜在原因之一。本研究显示,随机森林分析筛 选出 16 种可将 RSV 和正常鼠区分的差异代谢物,说 明它们可能是潜在的代谢物标志物。代谢物标志物 的筛选可为 RSV 的诊断和开发靶向 RSV 感染的小分 子药物研究提供线索。

#### 参考文献

- [1] Mammas I N, Drysdale S B, Rath B, et al. Update on current views and advances on RSV infection (Review) [J]. Int J Mol Med, 2020, 46(2): 509-20.
- [2] 孙 涛,程茂胜,袁晓玲,等. 999 感冒灵颗粒抗呼吸道合胞病 毒的初步研究[J]. 安徽医科大学学报,2018,53(6):938-42.
- [3] Budden K F, Gellatly S L, Wood D L, et al. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis[J]. Nat Rev Microbiol, 2017, 15(1): 55-63.
- [4] Mendez R, Banerjee S, Bhattacharya S K, et al. Lung inflammation and disease: a perspective on microbial homeostasis and metabolism
  [J]. IUBMB Life, 2019, 71(2): 152-65.
- [5] Arpaia N, Campbell C, Fan X, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation
  [J]. Nature, 2013, 504(7480): 451 - 5.
- [6] 崔振泽,徐 超,迟 磊.基于"肺肠理论"和胆汁酸代谢网络 探讨定喘汤对呼吸道合胞病毒感染大鼠肠道菌群调节的研究

[J]. 中国中西医结合儿科学, 2018, 10(6): 461-5,553.

- [7] 孟 欣,汪受传,单进军,等.基于 GC-MS 的金欣口服液对 RSV 肺炎小鼠脾脏代谢物的调控作用[J].中草药,2016,47 (24):4408-15.
- [8] Postler T S, Ghosh S. Understanding the holobiont: How microbial metabolites affect human health and shape the immune system[J]. Cell Metab, 2017, 26(1): 110 30.
- [9] Ferolla F M, Hijano D R, Acosta P L, et al. Macronutrients during pregnancy and life-threatening respiratory syncytial virus infections in children[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 187(9): 983 -90.
- [10] Antunes K H, Fachi J L, De Paula R, et al. Microbiota-derived acetate protects against respiratory syncytial virus infection through a GPR43-type 1 interferon response [J]. Nat Commun, 2019, 10 (1): 3273.
- [11] Yan B, Chu H, Yang D, et al. Characterization of the lipidomic profile of human coronavirus-infected cells: implications for lipid metabolism remodeling upon coronavirus replication [J]. Viruses, 2019, 11(1):73.
- [12] Wahlstrom A, Sayin S I, Marschall H U, et al. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism [J]. Cell Metab, 2016, 24(1): 41 – 50.
- [13] Dash P K, Hergenroeder G W, Jeter C B, et al. Traumatic brain injury alters methionine metabolism: implications for pathophysiology[J]. Front Syst Neurosci, 2016, 10: 36.
- [14] Chen Y, Dong H, Thompson D C, et al. Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 60: 38 - 44.

# UPLC-QTOF/MS based investigation on metabolomics of cecal luminal contents in Balb/c mice infected with respiratory syncytial virus

Gui Hongya, Wang Shumei, Zhang Xiaoyan, Zhang Xiaocheng, Huang Shenghai, He Maozhang (Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract** *Objective* Balb/c mice infected with respiratory syncytial virus (RSV) were used to investigate the metabolic changes in cecal luminal content. *Methods* A total of 13 female Balb/c mice were randomly divided into Case group (n = 7) and control (Ctrl) group (n = 6). Animals in Case group were infected with RSV by using intranasal method, while mice in Ctrl group were treated with DMEM medium. Mice were anesthetized with intraperitoneal administration of 10% chloral hydrate and the cecal luminal contents were harvested under sterile conditions. Metabolite concentrations were measured by UPLC-QTOF/MS system. Univariate and multivariate statistical analysis were used to identify differential metabolites between Case and Ctrl groups. *Results* The overall base peak chromatogram between Case and Ctrl groups had a clear disparity, and PCA and OPLS-DA analysis showed obviously discrepancy based overall metabolomic profile. L-serine, 2-ketobutyric acid, Oleic acid and Chenodeoxycholic acid glycine conjugate were enriched in Case group, whereas L-methionine, L-tyrosine and Nicotinic acid were depleted. Pathway analysis showed lysine degradation, Cysteine and methionine metabolism were enriched. *Conclusion* Lung injury induced by RSV infection may cause the endogenous metabolism disorder of cecal contents.

Key words respiratory syncytial virus; cecum; UPLC-QTOF/MS; metabolomics; metabolic disorder