

快速老化小鼠 SAMP8 模型粪便代谢物和肠道菌群改变的研究

李佳琪^{1,2}, 高 丽^{1*}, 王珂欣^{1,2}, 周玉枝¹, 秦雪梅^{1*}, 杜冠华³

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

3. 中国医学科学院 北京协和医学院药物研究所, 北京 100050

摘要: **目的** 研究快速老化小鼠 SAMP8 模型老化过程中粪便代谢物和肠道菌群的变化。**方法** 采用 ¹H-NMR 代谢组学和宏基因组学技术, 探索衰老相关的代谢标志物和肠道菌群, 并对代谢物与肠道菌群进行 Pearson 关联分析。**结果** SAMP8 小鼠粪便中识别出 31 种内源性代谢物, 与 SAMR1 小鼠相比, 13 种代谢物发生显著改变。差异代谢物主要富集在 4 条代谢途径: 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成, 苯丙氨酸代谢, 组氨酸代谢。肠道菌群分析发现 10 月龄快速老化小鼠 SAMP8 肠道菌群多样性明显改变, 10 种菌群的相对丰度显著改变。相关性分析结果表明, Christensenellaceae 菌科与苯丙氨酸、组氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和尿苷酸均呈正相关; *Dehalobacterium* 菌属与酪氨酸, Planococcaceae 动球菌科与缬氨酸均呈负相关。**结论** 通过研究快速老化小鼠 SAMP8 模型粪便代谢物和菌群的变化规律, 为衰老机制及抗衰老药物研究提供实验依据。

关键词: 快速老化小鼠; SAMP8; 肠道菌群; 代谢组学; 宏基因组学

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)10-2265-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.006

Fecal metabolome and gut microbiome alterations in a mouse model of senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8)

LI Jia-qi^{1,2}, GAO Li¹, WANG Ke-xin^{1,2}, ZHOU Yu-zhi¹, QIN Xue-mei¹, DU Guan-hua³

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: **Objective** To investigate the alterations of fecal metabolites and intestinal flora during the aging in a mouse model of senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8). **Methods** The ¹H-NMR metabonomics and metagenomics were applied to investigate the aging-related metabolic markers and intestinal flora, and Pearson correlation analysis was performed between metabolites and gut flora. **Results** Thirty-one endogenous metabolites were identified in the faeces of SAMP8 mice, of which 13 metabolites changed significantly compared with SAMR1 mice. Differential metabolites were mainly enriched in four metabolic pathways: phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; valine, leucine and isoleucine biosynthesis; phenylalanine metabolism; histidine metabolism. The results showed that the diversity of intestinal flora was significantly changed and the relative abundances of 10 kinds of intestinal flora were significantly changed in 10-month-old SAMP8 mice. Correlation analysis showed that Christensenellaceae was positively correlated with phenylalanine, histidine, valine, isoleucine, and uridylic acid; *Dehalobacterium* was negatively correlated with tyrosine, and Planococcaceae was negatively correlated with valine. **Conclusion** This paper reveals the changes of fecal metabolites and gut flora in SAMP8 mice, which provides experimental evidence for the study of aging progress and anti-aging actions of drugs.

Key words: senescence accelerated mouse; SAMP8; gut microbiome; metabolomics; metagenomics

收稿日期: 2018-01-14

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81603319); 山西省高等学校科技创新项目 (2015118); 山西省科技创新重点团队支柱项目 (201605D131045-18); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室项目 (201605D111004)

作者简介: 李佳琪 (1990—), 女, 河北秦皇岛人, 研究生在读, 生药学专业, 主要从事中药药理学研究。E-mail: lijia1223@126.com

***通信作者** 高 丽 Tel: (0351)7018379 E-mail: gaoli87@sxu.edu.cn

秦雪梅 Tel: (0351)7011501 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

截至 2017 年底,我国 60 岁以上老年人口达 2.4 亿,我国已经全面进入老龄化社会。人口老龄化引发的健康问题给家庭和社会带来了巨大的负担。衰老是各种器官随着时间的推移不断衰退的一个复杂生物过程。在生物学上衰老又称为细胞衰老,表现为 DNA 损伤、蛋白质错误折叠和氧化应激增加等异常改变^[1],但衰老机制在很大程度上依然难以阐明。随着生物医学的不断进步,人们迫切希望进一步揭开衰老的神秘面纱。

快速老化小鼠 (senescence accelerated mouse, SAM) 是从普通的遗传群 AKR/J 系小鼠中通过表型选择培育出的一种快速老化模型,包括快速老化的 P 系和抗快速老化的 R 系^[2]。P 系具有寿命短、老化快和衰老相关病理改变的特点;R 系具有正常的衰老进程和特征。研究发现,快速老化小鼠从 6 月龄开始衰老,并且 P 系较 R 系表现出明显加速老化^[3]。SAMP8 (senescence accelerated mouse prone 8) 是 P 系中的一种,除了表现为快速老化的特征外,还表现出衰老相关的学习记忆功能障碍的特点,是目前较理想的研究衰老性认知障碍的模型^[4]。此外,也常用作衰老性肝损伤模型^[5]。同属 SAMR1 (senescence accelerated mouse resistant 1) 的各项生理指标及生存寿命与正常小鼠相似,常用作 SAMP8 的正常对照。

代谢组学是一种定量测定生命体系在受到病理生理学刺激时代谢物变化的技术,用于表征细胞、体液或组织中内源代谢物的变化,在药物研究和疾病诊断,尤其是生物标志物的发现等方面具有巨大的应用价值。¹H-NMR 代谢组学具有快速、无损和高度可靠的特点,提供了代谢物结构信息^[6-7],已逐渐成为寻找病理生理代谢标志物的常用手段。

随着宏基因组学的发展,肠道菌群的作用逐渐引起人们的关注。越来越多的研究发现,肠道菌群参与机体营养代谢和免疫调节,拮抗致病菌以及调节肠-脑轴等,在维持机体健康中发挥着重要作用^[8],甚至被称作虚拟器官^[9]。肠道菌群的结构和功能在衰老的过程中逐渐改变,进而影响宿主健康,如升高血糖水平、增加肠道通透性、增加炎症水平等^[10]。越来越多的药物作用机制研究中也把肠道菌群作为靶点进行深入探讨^[11]。

本研究采用基于核磁共振 (¹H-NMR) 的代谢组学技术和宏基因组学技术考察快速老化小鼠 SAMP8 模型粪便代谢物和肠道菌群的变化,旨在发现与衰老相关的潜在代谢标志物和菌群,为衰老机

制及抗衰老药物研究提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

8 月龄雄性 SAMP8 和 SAMR1 小鼠由天津中医药大学第一附属医院提供。小鼠在清洁环境下单笼饲养,自由饮食和饮水,控制饲养环境温度 (22±2) °C,相对湿度 (50±10) %,以及 12 h 的光照/黑暗周期。

1.2 仪器与试剂

Bruker 600 MHz Avance III NMR Spectrometer (600.13 MHz, 德国 Bruker 公司); Sartorius BSA124S 分析天平 (德国 Sartorius 公司); TGL-16 高速台式冷冻离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司); UP-250 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

核磁试剂重水、2,3,3-三甲基甲硅烷基丙酸 (TSP) 购自美国 Norell 公司; Fast DNA SPIN 提取试剂盒购自美国 MP Biomedicals 公司; Agencourt AMPure Beads 购自印度 Beckman Coulter 公司; PicoGreen dsDNA 测定试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

2 方法

2.1 粪便收集

正常老化小鼠 SAMR1 作为对照组,快速老化小鼠 SAMP8 作为模型组,每组各 6 只小鼠。饲养 2 个月,在正常饮食和饮水状态下,收集 12 h 内的累积粪便,收集到的粪便样本于 -80 °C 冻存,待 ¹H-NMR 检测。随后将每只小鼠分别置于铺有灭菌纸的洁净饲养笼中,待其排便后,迅速将新鲜粪便收集于灭菌冻存管中,于液氮中冻存,待高通量测序。

2.2 ¹H-NMR 测定样品的制备

参考文献方法^[12],粪便样本从 -80 °C 取出后,待其自然解冻,称量 50 mg 粪便样本,将 800 μL PBS 缓冲液 (NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, 0.2 mmol/L, pH 7.4) 加入已称量的样本中,用涡旋振荡器充分混匀后再用液氮反复冻融 3 次。接着对冻融物进行超声破碎 (5 s, 间隔 5 s, 运行 15 min)。4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,将上清液用移液枪吸出。剩余粪便样本残留物须按照上述实验步骤再次提取上清液。经 2 轮操作提取所得全部上清液用涡旋振荡器充分混匀后,4 °C、13 000 r/min 离心 15 min。取 500 μL 上清液加入 50 μL TSP/D₂O 溶液 (1 g/L) 混匀,转移至 5 mm NMR 管中,待测。

2.3 ¹H-NMR 测定与图谱处理

样品于 Bruker 600 MHz Avance III NMR 仪上

测定 (25 °C), 采用 1D CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) 脉冲序列, 检测谱宽 12 345.7 Hz, 扫描次数为 64, FID 分辨率 0.188 Hz, 脉冲时间 14 s, 采样时间 2.654 s, 延迟时间 1.0 s, 采样间隔 40.5 s, 采样点为 65 536。

所有谱图采用 MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostella, 西班牙) 核磁图谱专业处理软件对 ¹H-NMR 图谱进行傅里叶转换, 并进行手动相位、基线调整。谱图中以 TSP 校准化学位移, 以 δ 0.01 对化学位移区间 δ 0.50~9.00 进行分段积分, 排除 δ 4.7~5.0 区域的水峰不进行积分, 并将积分数据进行归一化。将上述数据保存在 Excel 文档中, 用于多元统计分析。

运用 SIMCA-P 13.0 (Umetrics, 瑞典) 将积分数据进行中心化, 主成分分析 (PCA) 使用 UV 格式化 (UV variable scaling) 处理的数据标度换算方式及正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 使用 Par 格式化 (Par scaling) 处理的数据标度换算方式对数据进行建模分析, 并应用交叉验证和方差分析 (CV-ANOVA) 验证 OPLS-DA 模型。根据 $P < 0.05$, VIP (variable importance for projection) 值 > 1 筛选出差异代谢产物。将差异代谢物通过 MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst>) 进行通路富集分析。

2.4 粪便菌群基因组 DNA 提取与检测

利用 Fast DNA SPIN 试剂盒, 参照说明书步骤提取小鼠粪便 cDNA。使用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')、806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 进行细菌 16 S rRNA 基因 V3-V4 区域 PCR 扩增。扩增条件: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 25 次循环; 72 °C 再延伸 5 min。对于每个样本, 分别加上 7 bp 的标签序列。PCR 反应体系包括 5×Q5 reaction buffer 5 μ L, 5×Q5 High-Fidelity GC buffer 5 μ L, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.25 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, 引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L 和 ddH₂O 8.75 μ L。Illumina MiSeq 测序: 依照 Agencourt AMPure Beads 说明书对 PCR 扩增子进行纯化, 并使用 PicoGreen dsDNA 试剂盒进行定量。将纯化后的扩增子等量混合, 根据 Illumina MiSeq 测序平台的标准流程进行 2×300-pb 双末端测序。

测序得到的原始数据经过 Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, v1.8.0) [13] 对疑问序列进行剔除。利用 FLASH 软件 (v1.2.7) [14] 对通过质量初筛的双端序列根据重叠碱基进行配对连接, 最后, 根据每个样本所对应的 Index 信息 (即 Barcode 序列, 为序列起始处用于识别样本的一小段碱基序列), 将连接后的序列识别分配入对应样本 (要求 Index 序列完全匹配), 从而获得每个样本的有效序列。使用 QIIME 软件, 调用 UCLUST [15] 这一序列比对工具对获得的序列按 97% 的序列相似度进行归并和 OTU 划分, 并选取每个 OTU 中丰度最高的序列作为该 OTU 的代表序列。对于每个 OTU 的代表序列, 在 QIIME 软件中使用默认参数, 通过将 OTU 代表序列与对应数据库的模板序列相比对, 获取每个 OTU 所对应的分类学信息。

2.5 网络构建

根据菌-菌、菌-代谢物 Pearson 相关系数 (r), 在 Cytoscape 软件 (v3.5.1) 中构建可视化关系网络。

2.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行 t 检验比较组间差异, 并制图; 应用 SPSS 16.0 软件计算 Pearson 相关系数。

3 结果

3.1 模型评价

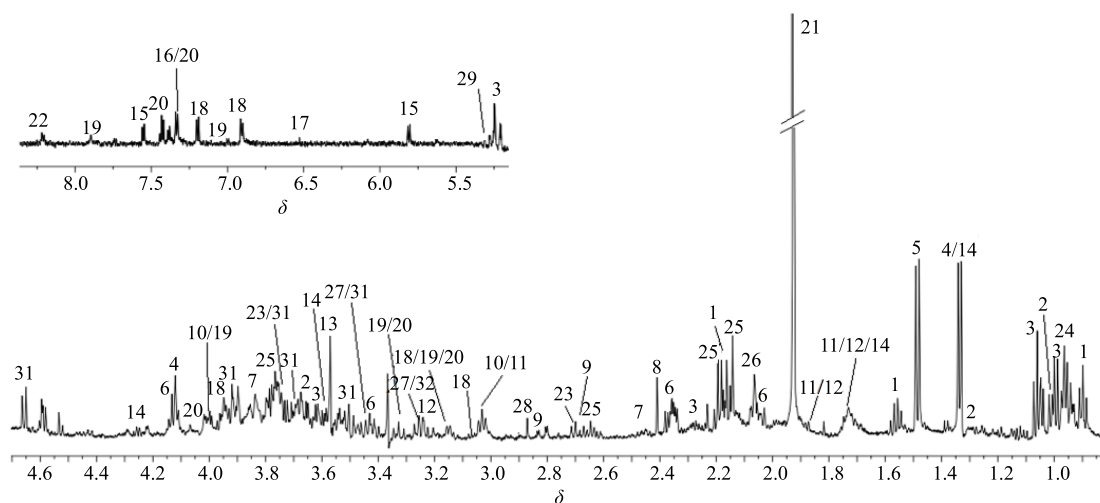
10 月龄的快速老化小鼠 SAMP8 出现皮毛大面积脱落, 光泽度消失, 皮肤及眼睑出现多处溃疡, 眼周卡他性病变明显; 行动敏捷度明显降低, 按压背部逃避反应消失或者明显降低。SAMR1 正常老化小鼠皮毛光泽度正常, 稍见脱毛现象, 无溃疡及敏捷度降低表现, 表明 10 月龄 SAMP8 小鼠较同月龄 SAMR1 小鼠表现出明显老化, 与文献报道一致 [16-17]。

3.2 图谱指认与分析

参照文献报道 [18-19] 并结合公共数据库 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)、BMRB (<http://www.bmrbl.wisc.edu/>) 及软件 Chenomx NMR Suite (Chenomx Inc. 公司), 对图谱中的主要化合物进行指认, 图 1 为小鼠粪便样本的 ¹H-NMR 图谱, 从该图谱中共指认出 31 种化合物, 见表 1。

3.3 多元统计分析差异代谢物通路分析

采用 PCA 对所有小鼠粪便样本的 ¹H-NMR 代谢轮廓进行分析 (PCA 模型参数: $R^2_X = 0.382$, $Q^2 = 0.158$)。由图 2-A 可见, 对照组与模型组的散点可

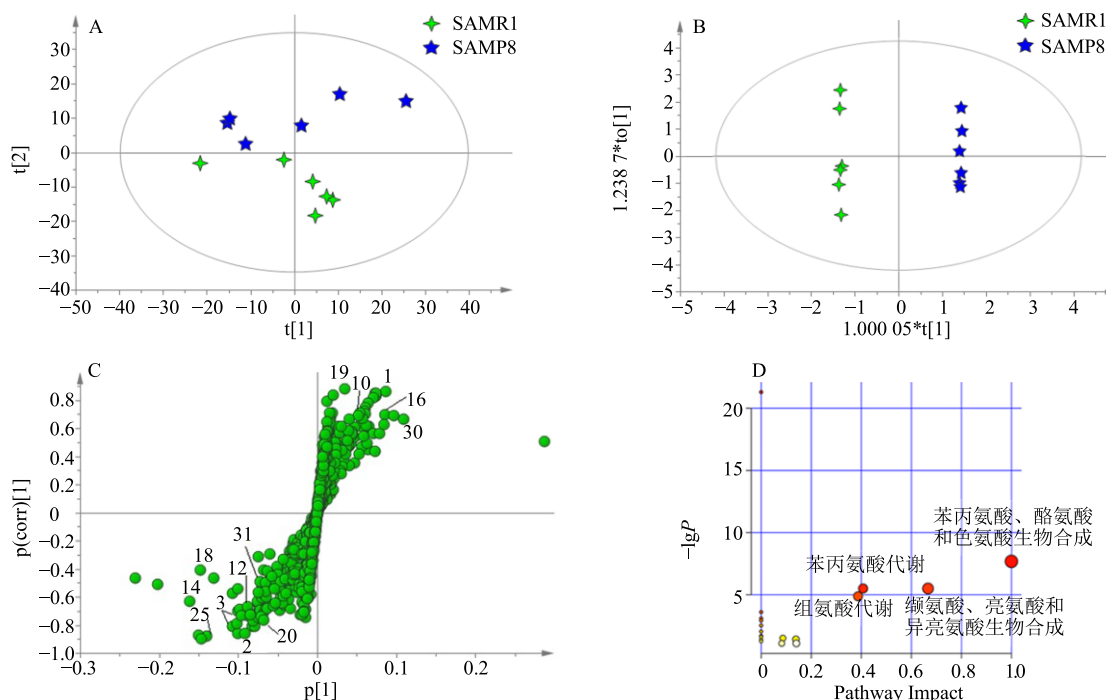
图1 小鼠粪便样本 ^1H -NMR 图谱Fig. 1 Typical ^1H -NMR spectra for faeces of mice表1 小鼠粪便 ^1H -NMR 图谱中主要代谢物峰归属Table 1 Peak attribution in ^1H -NMR spectra in faeces of mice

峰号	代谢物	基团	δ_{H}
1	丁酸盐	$\alpha\text{-CH}_2$, $\beta\text{-CH}_2$, CH_3	2.16 (t, $J = 7.2$ Hz), 1.55 (m), 0.90 (t, $J = 7.2$ Hz)
2	异亮氨酸	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}_3$, $\gamma\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_3$	3.65 (d, $J = 3.6$ Hz), 1.01 (d, $J = 6.6$ Hz), 1.27 (m), 0.96 (t, $J = 6.6$ Hz)
3	缬氨酸	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}$, $\gamma\text{-CH}_3$, $\gamma'\text{-CH}_3$	3.62 (d, $J = 4.2$ Hz), 2.27 (m), 0.99 (d, $J = 7.2$ Hz), 1.04 (d, $J = 5.4$ Hz)
4	乳酸	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}_3$	1.33 (d, $J = 6.6$ Hz), 4.13 (q, $J = 6.6$ Hz)
5	丙氨酸	$\beta\text{-CH}_2$	1.48 (d, $J = 7.2$ Hz)
6	脯氨酸	$\alpha\text{-CH}$, half $\beta\text{-CH}_2$, half $\beta\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_2$	4.12 (m), 2.05 (m), 2.36 (m), 3.35 (t, $J = 5.4$ Hz), 3.42 (t, $J = 8.4$ Hz)
7	谷氨酰胺	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}_2$	3.79 (t, $J = 6.6$ Hz), 2.13 (m), 2.45 (m)
8	琥珀酸盐	CH_2	2.41 (s)
9	天冬氨酸	half $\alpha\text{-CH}$, half $\alpha\text{-CH}$	2.68 (dd, $J = 9.0$, 17.4 Hz), 2.81 (dd, $J = 4.2$, 15.6 Hz)
10	天冬酰胺	$\alpha\text{-CH}$, half $\beta\text{-CH}_2$, half $\beta\text{-CH}_2$	4.00 (m), 2.87 (m), 3.03 (m)
11	赖氨酸	$\beta\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_2$, $\epsilon\text{-CH}_2$	1.89 (m), 1.72 (m), 3.02 (t, $J = 7.8$ Hz)
12	精氨酸	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_2$	3.76 (m), 1.90 (m), 1.72 (m), 3.25 (m)
13	甘氨酸	$\alpha\text{-CH}$	3.57 (s)
14	苏氨酸	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}$, $\gamma\text{-CH}_3$	3.59 (d, $J = 4.8$ Hz), 4.26 (m), 1.33 (d, $J = 6.6$ Hz)
15	尿嘧啶	5-CH, 6-CH	5.81 (d, $J = 7.2$ Hz), 7.55 (d, $J = 7.2$ Hz)
16	尿苷酸	$\beta\text{-CH}$	7.34 (d, $J = 7.8$ Hz)
17	延胡索酸	CH	6.53 (s)
18	酪氨酸	$\alpha\text{-CH}$, half $\beta\text{-CH}_2$, half $\beta\text{-CH}_2$, 3 or 5 CH, 2 or 6 CH	3.94 (m), 3.06 (m), 3.20 (m), 6.91 (d, $J = 8.4$ Hz), 7.20 (d, $J = 8.4$ Hz)
19	组氨酸	$\alpha\text{-CH}$, half $\beta\text{-CH}_2$, half $\beta\text{-CH}_2$, 4-CH, 2-CH	4.01 (m), 3.14 (m), 3.28 (m), 7.08 (s), 7.89 (m)
20	苯丙氨酸	$\alpha\text{-CH}$, half $\beta\text{-CH}_2$, half $\beta\text{-CH}_2$, 2 or 6 CH, 3 or 5 CH, 4-CH	4.02 (dd, $J = 1.8$, 13.2 Hz), 3.14 (m), 3.30 (m), 7.33 (d, $J = 7.8$ Hz), 7.43 (t, $J = 7.8$ Hz), 7.38 (m)
21	醋酸盐	CH_3	1.92 (s)
22	次黄嘌呤	$N(2)\text{CH} = N$, $N(7)\text{CH} = N$	8.20 (s), 8.22 (s)
23	二甲胺	CH_3	2.71 (s)
24	亮氨酸	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}$, $\delta\text{-CH}_3$, $\delta\text{-CH}_3$	3.74 (m), 1.69 (m), 1.72 (m), 0.96 (d, $J = 6.0$ Hz), 0.99 (d, $J = 6.6$ Hz)
25	甲硫氨酸	$\alpha\text{-CH}$, $\beta\text{-CH}_2$, $\gamma\text{-CH}_2$, $\delta\text{-CH}_3$	3.77 (m), 2.17 (m), 2.64 (t, $J = 7.2$ Hz), 2.14 (s)
26	N-乙酰糖蛋白	CH_3	2.06 (s)
27	牛磺酸	SCH_2 , $N\text{-CH}_2$	3.27 (t, $J = 9$ Hz), 3.43 (t, $J = 9$ Hz)
28	三甲胺	CH_3	2.87 (s)
29	α -葡萄糖	1-CH, 2-CH	5.25 (d, $J = 4.2$ Hz), 3.55 (dd, $J = 3.6$, 9.6 Hz)
30	α -木糖	1-CH, 2, 4-CH, 3, 5-CH	5.21 (t, $J = 3.6$ Hz), 3.55 (dd, $J = 3.6$, 9.6 Hz), 3.67 (m)
31	β -葡萄糖	1-CH, 2-CH, 4-CH, 5-CH, half 6-CH, half 6-CH	4.65 (d, $J = 7.8$ Hz), 3.25 (t, $J = 9.0$ Hz), 3.42 (dd, $J = 3.0$, 9.6 Hz), 3.47 (dd, $J = 1.8$, 6.6 Hz), 3.75 (m), 3.91 (dd, $J = 2.4$, 12.6 Hz)

以明显区分开,表明与 10 月龄 SAMR1 小鼠相比,同月龄 SAMP8 小鼠粪便代谢轮廓发生明显改变。

为了探寻 SAMP8 小鼠和 SAMR1 小鼠显著变化的生物标志物,进一步对数据进行 OPLS-DA 分析(OPLS-DA 模型参数: $R^2_X=0.724$, $R^2_Y=0.998$, $Q^2=0.839$),经 CV-ANOVA 验证($P=0.033\ 8$)提示 OPLS-DA 模型具有统计学意义(图 2-B、C),得到 VIP 值,筛选出 $VIP>1$ 的代谢产物,并结合独立样本 t 检验 $P<0.05$ 筛选出差异代谢物。结果显示, SAMP8 小鼠与 SAMR1 小鼠之间存在 13 个差异代谢物(表 2)。

将这些差异代谢物导入至 metaboanalyst 中选择超几何分布(hypergeometric test)和相对中心性(relative-betweenness centrality)对通路进行富集分析,结合 P 值和 Impact 值寻找显著变化的代谢途径。MetPA 通路分析结果显示,与对照组相比, SAMP8 小鼠粪便中的 4 条代谢途径发生显著变化:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成,苯丙氨酸代谢,组氨酸代谢(图 2-D)。这 4 条途径中包含 6 种差异代谢物:苯丙氨酸、酪氨酸、组氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和尿苷酸。



C 图中的代谢物编号与表 1 中代谢物编号相对应

The number of metabolites in Fig. C corresponds to the number of metabolites in table 1

图 2 SAMR1 和 SAMP8 小鼠 $^1\text{H-NMR}$ 粪便样本 PCA 得分图 (A)、OPLS-DA 散点图 (B)、对应的 S-plot 图 (C) 和 MetPA 通路分析图 (D)

Fig. 2 PCA score plots (A), OPLS-DA score plots (B), S-plots (C), and MetPA analysis of metabolic pathways (D) in $^1\text{H-NMR}$ spectra in faeces of SAMR1 and SAMP8 mice

表 2 SAMR1 和 SAMP8 小鼠粪便样本中的差异代谢物

Table 2 Differential metabolites in faeces of SAMR1 and SAMP8 mice

编号	代谢物	改变趋势	编号	代谢物	改变趋势	编号	代谢物	改变趋势
1	丁酸盐	↓ *	6	苏氨酸	↑ *	11	甲硫氨酸	↑ ***
2	异亮氨酸	↑ **	7	尿苷酸	↑ *	12	β -葡萄糖	↑ *
3	缬氨酸	↑ ***	8	酪氨酸	↑ **	13	α -木糖	↑ *
4	天冬酰胺	↑ *	9	组氨酸	↑ ***			
5	精氨酸	↑ *	10	苯丙氨酸	↑ **			

与 SAMR1 对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; ↑-上调 ↓-下调

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs SAMR1 control group; ↑-up-regulation ↓-down-regulation

3.4 菌群多样性分析

获得 OTU 丰度矩阵之后, 采用 α 和 β 多样性分析来描述和评价菌群的整体结构 (图 3)。首先绘制稀疏曲线 (rarefaction curve), 以评判每个样本的当前测序深度是否足以反映该群落样本所包含的微生物多样性。曲线越平缓, 表明测序结果已足够反映当前样本所包含的多样性。结果显示, 曲线已趋于平缓, 说明测序结果已足够反映当前样本所包含的多样性, 继续增加测序深度已无法检测到大量的尚未发现的新的 OTU。

α 多样性反映单个样品内部的物种多样性, 通过

群落多样性指数与群落丰度指数来衡量, 群落多样性指数包括 Shannon 与 Simpson, 此指数值越大, 说明样品的物种多样性越高; 群落丰度指数包括 Chao1 和 ACE, 此指数值越大说明群落的丰富度越高。结果表明, 由 Shannon 和 Simpson 指数可以看出模型组与对照组有统计学差异 ($P < 0.05$); Chao1 与 ACE 指数不具有统计学意义。由此可见与同月龄 SAMR1 小鼠相比, 10 月龄 SAMP8 小鼠肠道菌群多样性显著增加。 β 多样性主要是利用各样本的物种组成及丰富信息来反映样本间关系。PCA 结果显示 SAMP8 和 SAMR1 小鼠菌群结构组成差异明显。结果见图 3。

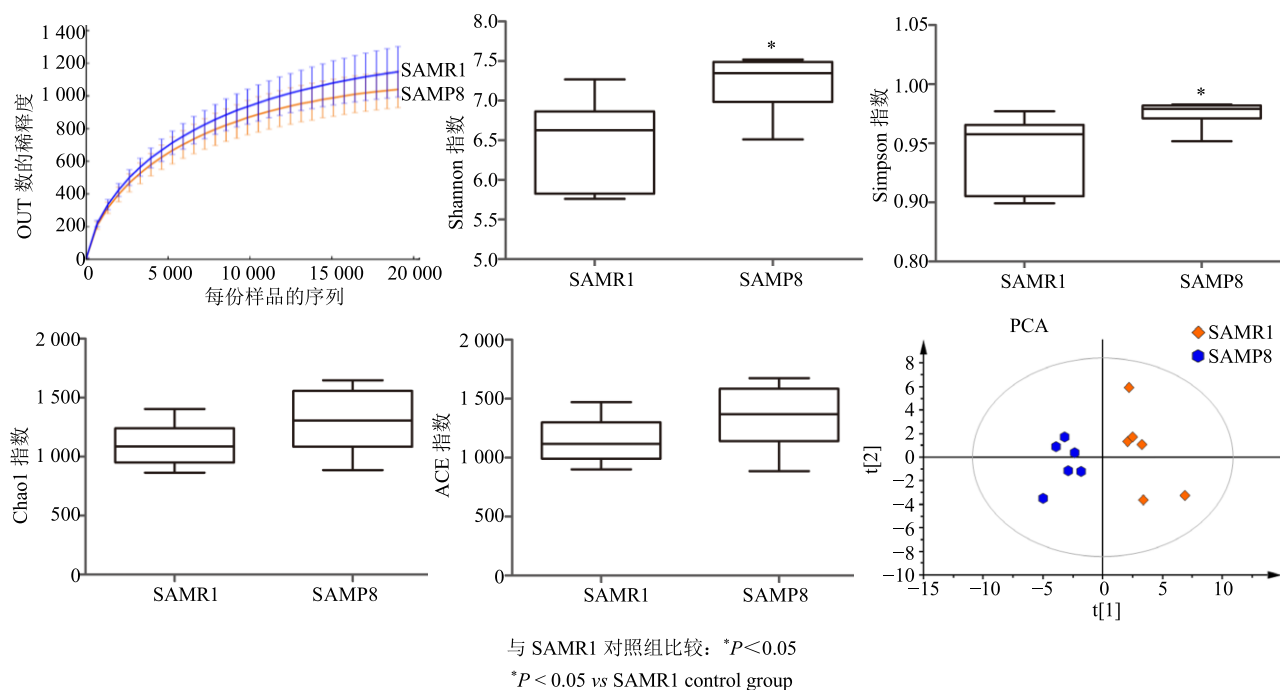


图 3 SAMR1 和 SAMP8 小鼠菌群多样性分析

Fig. 3 Microbiota diversity analysis of SAMR1 and SAMP8 mice

3.5 差异菌群的相关分析

为了进一步筛选差异菌群, 根据各菌群在样本中的相对丰度, 进行多元统计分析, 得到 VIP 值, 筛选出 VIP > 1 的菌群, 并结合独立样本 t 检验 $P < 0.05$ [20], 筛选得到 10 种差异菌。如图 4 所示, 与 SAMR1 对照组相比, SAMP8 模型组肠道菌群中, 厚壁菌门 Christensenellaceae 菌科、Mogibacteriaceae 菌科、Christensenella 菌属相对丰度降低, Dehalobacterium 菌属、毛螺菌科 Lachnospiraceae、动球菌科 Planococcaceae 相对丰度升高; 变形菌门 RF32、 α -变形杆菌纲 Alphaproteobacteria 相对丰度降低; 拟杆菌门 Odoribacter 菌属、拟杆菌目 Bacteroidales 相对丰度升高。

为了进一步考察不同群落成员之间的相互作用, 通过计算 Pearson 相关系数, 寻找群落成员共同出现 (co-occurrence) 或彼此排斥 (co-exclusion) 的相互作用模式, 从而推断不同微生物群落之间可能的相互作用或竞争关系。结果显示, Christensenella 与 RF32、Bacteroidales 与 Odoribacter、Bacteroidales 与 Lachnospiraceae、Lachnospiraceae 与 Dehalobacterium、Planococcaceae 与 Dehalobacterium 均呈正相关 ($r > 0.6$); Planococcaceae 与 Mogibacteriaceae、Planococcaceae 与 Christensenellaceae、Christensenella 与 Dehalobacterium、Christensenella 与 Lachnospiraceae、Bacteroidales 与 Christensenellaceae、Bacteroidales 与 Mogibacteriaceae、Bacteroidales 与

Christensenella、*Lachnospiraceae* 与 RF32 均呈负相关 ($r < -0.6$)。其中 *Christensenella* 与 RF32 呈现显著的正相关 ($r = 0.89$)，*Planococcaceae* 与 *Mogibacteriaceae* 呈显著负相关 ($r = -0.78$)。见图 5。

3.6 差异菌群与代谢物的相关分析

基于肠道菌群参与宿主的营养代谢功能，进一步计算 10 种差异菌群与 6 种差异代谢物之间的 Pearson 相关系数。对其中相关系数大于 0.6 或小于 -0.6 的相关菌群和差异代谢物构建关联网络，结果见图 6。

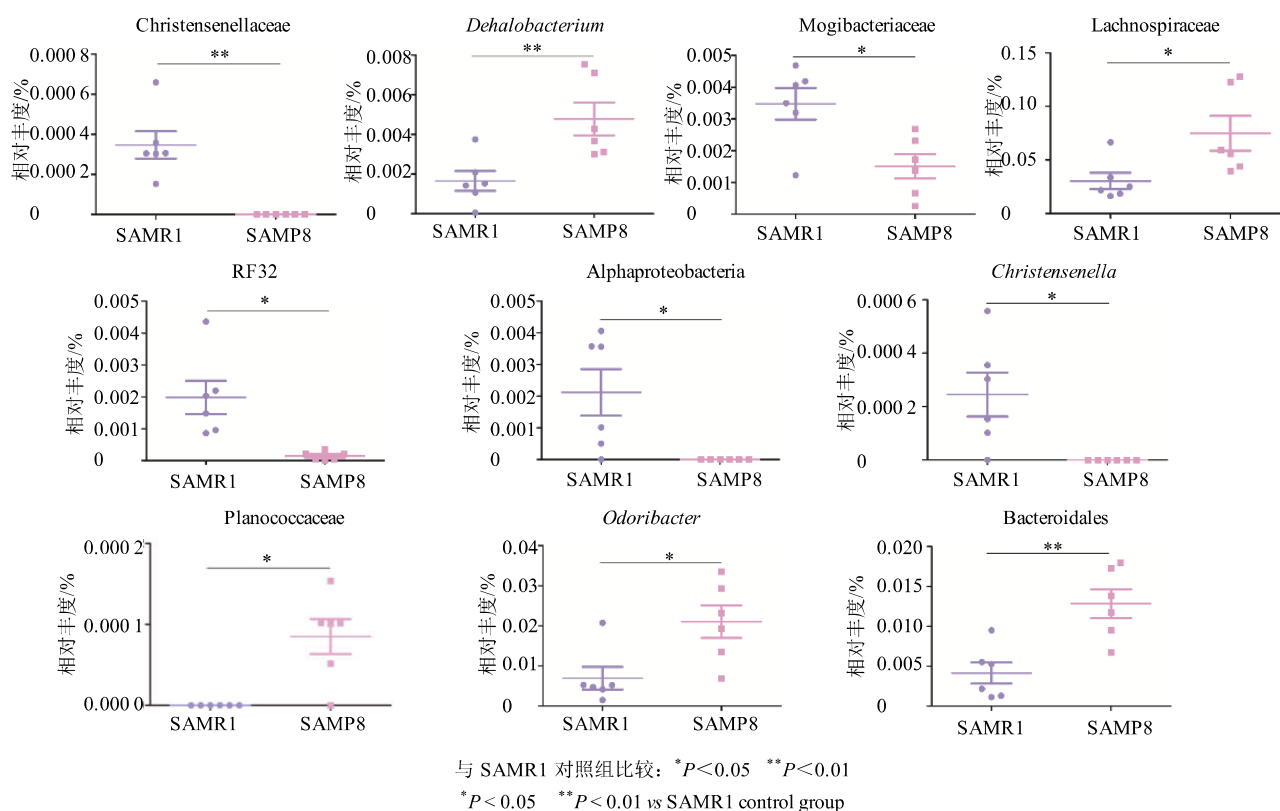
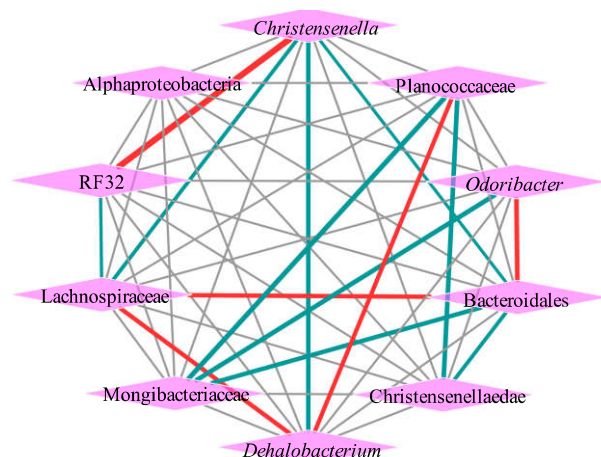


图 4 SAMR1 和 SAMP8 小鼠粪便样本中差异菌群平均相对丰度

Fig. 4 Average relative abundance of characteristic flora in faeces of SAMR1 and SAMP8 mice

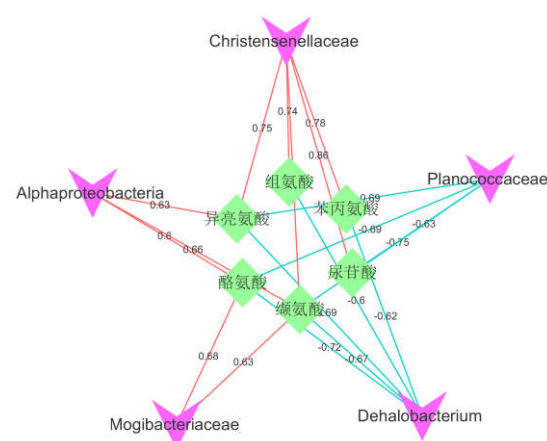


红色/绿色边代表菌群之间呈正相关/负相关，边的宽度代表相关性的强弱

the red/green edge represents a positive/negative correlation between the floras, the width of the edge represents the correlation coefficient

图 5 差异菌群交互 Pearson 关联网络

Fig. 5 Interaction network of characteristic floras based on Pearson correlation coefficient



紫色/绿色节点代表菌/代谢物；红色/绿色边代表菌群之间呈正相关/负相关，数字为相关系数

the purple/green node represents flora/metabolite, the red/green edge represents a positive/negative correlation between the flora and metabolite, the label of edge is Pearson correlation coefficient

图 6 差异菌群和代谢物交互 Pearson 关联网络

Fig. 6 Interaction network of characteristic floras and metabolites based on Pearson correlation coefficient

4 讨论

衰老往往伴随机体代谢的改变,并且与多种衰老疾病的发生有关。肠道菌群在维持宿主生理功能和代谢稳态中发挥着重要作用,例如,一些细菌可以通过合成某些短链氨基酸,为宿主提供能量^[21];一些细菌可以通过激活宿主的免疫系统或者竞争性拮抗外来致病菌,为宿主提供保护作用等^[22]。研究表明,与宿主代谢功能有关的肠道菌群组成随宿主年龄而异,且不同的菌群在维持宿主健康中扮演不同的角色^[23]。粪便是机体整体代谢终产物输出的主要途径之一,粪便中代谢物的变化不仅能够反映机体整体代谢的特征,还可能是局部组织或器官功能异常的外在表现。本研究针对 10 月龄快速老化小鼠模型 SAMP8,采用 ¹H-NMR 代谢组学技术发现 13 种差异代谢物,同时采用宏基因组学技术发现 10 种肠道菌群发生改变,并进一步分析了代谢物和菌群之间的潜在关系。

对 13 种差异代谢物进行通路富集分析,结果表明在快速老化小鼠 SAMP8 生物代谢过程中,苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成,苯丙氨酸代谢,组氨酸代谢这 4 条代谢途径受衰老影响显著。其中包含 6 种差异代谢物:苯丙氨酸、酪氨酸、组氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和尿苷酸。

缬氨酸和异亮氨酸是机体必需氨基酸,属于支链氨基酸,研究表明外周支链氨基酸水平升高与多种老年病如心血管疾病、2 型糖尿病和胰岛素抵抗的发生有关^[24]。苯丙氨酸和甲硫氨酸也属于必需氨基酸。苯丙氨酸主要在肝脏中代谢成酪氨酸,用于神经系统和肾上腺髓质的多巴胺、去甲肾上腺素及肾上腺素的合成^[25],并且这些神经化学物质的合成与衰老性学习记忆障碍密切相关^[26]。甲硫氨酸在体内为 DNA、RNA 和脂质甲基化提供甲基,从而调节机体生物功能^[27]。研究发现,甲硫氨酸在氧化应激反应中充当着活性氧清除剂进而保护细胞免受氧化应激损伤,暗示甲硫氨酸与衰老密切相关^[28]。衰老伴随免疫功能的降低。精氨酸被认为是一种免疫调节剂,不仅可以通过直接抑制蛋白磷酸酶 2A (PP2A) 进而抑制细丝裂原活化的细胞外信号调节激酶-胞外调节蛋白激酶信号通路 (MEK-ERK) 而抑制促炎基因的表达,还可以间接通过影响巨噬细胞功能而降低细胞因子的产生^[29]。本实验结果显示,与 SAMR1 小鼠相比,快速老化小鼠 SAMP8

粪便中的缬氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸和精氨酸含量均显著升高,提示可能与机体衰老有关。

通过对肠道菌群的多样性分析,揭示快速老化小鼠 SAMP8 肠道菌群结构发生明显改变。进一步分析,发现 10 种菌群相对丰度发生显著改变,其中 *Christensenella* 与 RF32 呈现显著的正相关,提示二者可能为协作关系;动球菌科与 *Mogibacteriaceae* 呈显著负相关提示二者可能为竞争关系。Yang 等^[30]发现,中老年的 BALB/C 小鼠 (11 月龄~15 月龄) 肠道中 RF32 和 *Mogibacteriaceae* 伴随衰老过程相对丰度降低;Biagi 等^[31]发现拟杆菌门的 *Odoribacter* 和拟杆菌目 *Bacteroidales* 伴随人的衰老进程相对丰度增加。此外, *Christensenellaceae* 被认为与健康密切相关的菌群,并且在百岁老人的肠道菌群中的丰度明显增加。SAMP8 小鼠粪便菌群改变趋势与这些研究结果一致,说明这些菌属在衰老过程中可能发挥着重要的作用。

对菌群和关键代谢途径中的代谢物进行 Pearson 相关分析发现, *Christensenellaceae* 与苯丙氨酸、组氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和尿苷酸均呈现较高的正相关 (相关系数大于 0.7); *Dehalobacterium* 与酪氨酸,动球菌科 *Planococcaceae* 与缬氨酸均呈现较高的负相关 (r 小于 -0.7)。肠道菌群与代谢物之间的相关性提示肠道菌群在维持机体健康中发挥着重要的作用。

综上,本研究从整体代谢物及肠道菌群两个方面筛选与衰老相关的生物标志物和菌群,有助于解释衰老的机制,并为抗衰老药物作用机制的研究提供实验依据。

参考文献

- [1] Childs B G, Durik M, Baker D J, *et al.* Cellular senescence in aging and age-related disease: From mechanisms to therapy [J]. *Nat Med*, 2015, 21(12): 1424-1435.
- [2] Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, *et al.* A new murine model of accelerated senescence [J]. *Mech Ageing Dev*, 1981, 17(2): 183-194.
- [3] Hosokawa M, Kasai R, Higuchi K, *et al.* Grading score system: A method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM) [J]. *Mech Ageing Dev*, 1984, 26(1): 91-102.
- [4] 周伟勤, 毕明刚, 杜冠华. 快速老化小鼠 SAMP8 研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(5): 565-568.

- [5] Ye X, Meeker H C, Kozlowski P B, *et al.* Pathological changes in the liver of a senescence accelerated mouse strain (SAMP8): A mouse model for the study of liver diseases [J]. *Histol Histopathol*, 2004, 19(4): 1141-1151.
- [6] Zhao Y Y, Cheng X L, Vaziri N D, *et al.* UPLC-based metabonomic applications for discovering biomarkers of diseases in clinical chemistry [J]. *Clin Biochem*, 2014, 47(15): 16-26.
- [7] 张王宁, 李爱平, 刘少博, 等. 基于代谢组学的阿霉素肾病大鼠模型损伤程度评价 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 360-367.
- [8] Kumar M, Babaei P, Ji B, *et al.* Human gut microbiota and healthy aging: Recent developments and future prospective [J]. *Nutr Healthy Aging*, 2016, 4(1): 3-16.
- [9] O'Hara A M, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ [J]. *Embo Rep*, 2006, 7(7): 688-693.
- [10] Thevaranjan N, Puchta A, Schulz C, *et al.* Age-associated microbial dysbiosis promotes intestinal permeability, systemic inflammation, and macrophage dysfunction [J]. *Cell Host Microb*, 2017, 21(4): 455-466.
- [11] 汤 齐, 高 霞, 耿 婷, 等. 肠道菌群与中药相互作用的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3629-3635.
- [12] 武 冬. 基于代谢组学的抑郁症患者粪便研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2016.
- [13] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [14] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [15] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [16] Kang L, Li S, Xing Z, *et al.* Dihydrotestosterone treatment delays the conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease in SAMP8 mice [J]. *Horm Behav*, 2014, 65(5): 505-515.
- [17] 王健辉. LW-AFC 对阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆功能的作用及作用机理研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2016.
- [18] 赵 滢. 抗生素诱导小鼠菌群变化与宿主代谢组相关性的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [19] 田俊生, 史碧云, 冯光明, 等. 慢性温和不可预知应激抑郁模型大鼠粪便 ¹H-NMR 代谢组学研究 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3170-3176.
- [20] Wang J, Ye F, Cheng X, *et al.* The effects of LW-AFC on intestinal microbiome in senescence-accelerated mouse prone 8 strain, a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 53(3): 907-919.
- [21] Gill S R, Pop M, Deboy R T, *et al.* Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome [J]. *Science*, 2006, 312(5778): 1355-1359.
- [22] Wu H J, Ivanov I I, Darce J, *et al.* Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells [J]. *Immunity*, 2010, 32(6): 815-827.
- [23] Langille M G, Meehan C J, Koenig J E, *et al.* Microbial shifts in the aging mouse gut [J]. *Microbiome*, 2014, 2(1): 50.
- [24] Batch B C, Hyland K, Svetkey L P. Branch chain amino acids: biomarkers of health and disease [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2014, 17(1): 86-89.
- [25] Zhang S, Huang T, Ilango U, *et al.* The solution structure of the regulatory domain of tyrosine hydroxylase [J]. *J Mol Biol*, 2014, 426(7): 1483-1497.
- [26] 李佳琪, 高 丽, 周玉枝, 等. 衰老性学习记忆减退相关的脑内单胺类神经递质研究进展 [J]. 药学报, 2017, 52(11): 1639-1646.
- [27] Maddocks O D, Labuschagne C F, Adams P D, *et al.* Serine metabolism supports the methionine cycle and DNA/RNA methylation through de novo ATP synthesis in cancer cells [J]. *Mol Cell*, 2016, 61(2): 210-221.
- [28] Campbell K, Vowinckel J, Keller M A, *et al.* Methionine metabolism alters oxidative stress resistance via the pentose phosphate pathway [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 24(10): 543-547.
- [29] Breuillard C, Moinard C, Farges M C. *L-Arginine in Clinical Nutrition* [M]. New York: Springer, 2017.
- [30] Yang Z, Huang S, Zou D, *et al.* Metabolic shifts and structural changes in the gut microbiota upon branched-chain amino acid supplementation in middle-aged mice [J]. *Amin Acids*, 2016, 48(12): 1-15.
- [31] Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, *et al.* Gut microbiota and extreme longevity [J]. *Curr Biol*, 2016, 26(11): 1480-1485.