

藜麦皂苷灌胃后大鼠尿液代谢及肠道菌变化

张若愚¹, 闫菲², 李雪宁³, 曹雨晴¹, 余远¹, 冯静⁴, 薛鹏^{1*}

(1. 潍坊医学院公共卫生学院, 山东潍坊 261200) (2. 潍坊医学院附属医院儿科, 山东潍坊 261200)

(3. 潍坊医学院临床医学院, 山东潍坊 261200) (4. 潍坊医学院康复学院, 山东潍坊 261200)

摘要:以藜麦皂苷为材料,对成年健康 Sprague Dawley 大鼠进行 90 d 经口暴露后结合肠道菌群及尿液代谢组学研究,探究其对肾脏的影响。实验分别将雌雄大鼠(n=48)分为高剂量(500 mg/kg)皂苷灌胃组、中剂量(50 mg/kg)皂苷灌胃组、低剂量(5 mg/kg)皂苷灌胃组与空白对照组,经口灌胃处理后,对肠道内容物进行 16S rDNA 分析,对尿液代谢物采用 UPLC-MS 分析,探究皂苷对大鼠的肠道菌群及代谢组学的影响。在雌雄大鼠中高剂量组大鼠肾脏切片均发生部分炎性变化。代谢组学结果显示,中低剂量组与空白对照组相比无明显差异,高剂量组大鼠在藜麦皂苷灌胃后,雌性大鼠尿液中发现差异代谢物 101 种,雄性大鼠尿液中发现差异代谢物 29 种,影响了维生素 B6 代谢、氨循环、色氨酸代谢等代谢过程。肠道菌群分析显示,藜麦皂苷灌胃组与对照组大鼠肠道菌群多样性差异明显。综上所述,藜麦皂苷在低剂量下无明显的毒性反应,然而在不可接触的中高剂量下有潜在的肾毒性。

关键词:藜麦皂苷; Sprague Dawley 大鼠; 肠道菌群; 代谢组学; 肾脏

文章篇号: 1673-9078(2022)08-1-9

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.8.0999

Changes of Urine Metabolism and Gut Microbiome in Rats after Intra-gastric Administration of Quinoa Saponins

ZHANG Ruoyu¹, YAN Fei², LI Xuening³, CAO Yuqing¹, YU Yuan¹, FENG Jing⁴, XUE Peng^{1*}

(1.School of Public Health, Weifang Medical University, Weifang 261200, China) (2.Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang 261200, China) (3.School of Clinical Medicine, Weifang Medical University, Weifang 261200, China) (4.School of Recure, Weifang Medical University, Weifang 261200, China)

Abstract: The saponins from *Chenopodium quinoa* were used as the material for 90-day oral exposure to healthy adult Sprague Dawley rats to evaluate the effects of the saponins on rats' kidneys in combination of gut microbiome with urine metabolomics studies. Rats (n = 48, half male and female) were divided into the high-dose (500 mg/kg saponin) treatment group, medium-dose (50 mg/kg saponin) treatment group, low-dose (5 mg/kg saponin) treatment group and blank control group. After oral gavage, the intestinal fluids were collected from the rats for examining the effects of saponins on intestinal flora by 16S rDNA, and analyzing rats' urine metabolomics by UPLC-MS. Partial inflammatory changes were observed in the kidney slices of male and female rats in both the medium- and high-dose groups. The results of metabolomics showed that there was insignificant difference between the medium- and low-dose groups. 101 kinds of differential metabolites were found in the urine of female rats while 29 kinds of differential metabolites were found in the urine of male rats after administration of the high dose of quinoa saponins, with metabolic processes such as vitamin B6 metabolism, ammonia cycle and tryptophan metabolism being affected. The gut microbiome analysis revealed the significant differences in the diversity of gut microbiome between the treatment group and the control. In summary, quinoa saponins at a low dose had insignificant toxicity, but exhibited potential non-contact nephrotoxicity at medium-high doses.

Key words: quinoa saponins; Sprague Dawley rats; gut microbiome; metabolomics; kidney

引文格式:

张若愚,闫菲,李雪宁,等.藜麦皂苷灌胃后大鼠尿液代谢及肠道菌变化[J].现代食品科技,2022,38(8):1-9

ZHANG Ruoyu, YAN Fei, LI Xuening, et al. Changes of urine metabolism and gut microbiome in rats after intra-gastric administration of quinoa saponins [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(8): 1-9

收稿日期: 2021-09-07

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2019PH043); 国家自然科学基金项目(32102106)

作者简介: 张若愚(1996-),男,硕士研究生,研究方向:食品毒理学,E-mail: ruoyu168@126.com

通讯作者: 薛鹏(1989-),男,博士,副教授,研究方向:食品营养与安全性评价,中药化学,E-mail: jplxp26@126.com

藜麦是具有较高营养价值的双子叶伪谷物植物,具有耐寒、耐旱,易于种植等优点,已作为粮食作物在世界范围广泛种植^[1],在我国云南省、山西省、甘肃省、四川省以及新疆省都有广泛种植,目前藜麦麸皮中已测得 87 种皂苷化合物^[2]。藜麦皂苷具有抗虫抑菌、抗氧化、抗肿瘤等多种生物活性^[3]。虽然藜麦皂苷已作为生物农药用于抑制福寿螺的繁殖^[4]。市场上也有了含有藜麦皂苷的全谷物产品。一般剂量下的藜麦皂苷的高食用安全性也得到了证实^[5]。然而,过量的皂苷对正常细胞及机体可能存在毒性效应^[6],但其毒作用机制尚未发现。更无关于藜麦麸皮或藜麦麸皮皂苷使用的相关指南或推荐摄入量等。因此,近年来课题组开展了对藜麦皂苷的毒性研究,前期研究证实,经甲醇提取,正丁醇萃取的藜麦皂苷(含量>60%)急性毒性试验下 LD₅₀ 大于 10 g/kg,且不具致畸致突变毒性^[5],本次研究基于皂苷亚慢性毒性研究的 90 d 灌胃干预,评价藜麦皂苷的口服安全性。摄入过高剂量植物皂苷可能会对肾脏及消化道造成损伤^[7]。尿液可以直观的反应出肾脏的健康情况,通过采用液相质谱联用技术可以实现对动物尿液成分的高通量及高分辨率分析^[8]。然而尿液中水溶性成分居多,多数采用亲水系统。目前常用的 HILIC 色谱分析柱与 Amide 色谱分析柱的分离分析能力各有偏重。因此,本项研究在藜麦皂苷对 SD 大鼠进行 90 d 经口灌胃处理后,使用亲水色谱柱-质谱(HILIC-Q Exactive ESI & Amide-Q Exactive ESI)对尿液进行全面分析^[9]。同时,肠道菌群多样性可反映机体健康状况^[10],两者具有很大的相关性^[11]。综上深入探究皂苷食用的安全性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

藜麦麸皮购自内蒙古益稷生物科技有限公司;无特定病原体(SPF)级别的雄性 SD 大鼠(6~8 周龄),购自山东朋悦实验动物繁育有限公司(SCXK(鲁)20190003);甲醇、正己烷、乙酸乙酯、正丁醇,优级纯,国药集团化学试剂有限公司;RNA 提取试剂盒,德国默克;甲醇、乙腈、甲酸、乙酸铵,色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司;4%多聚甲醛,白鲨生物科技有限公司。藜麦皂苷由潍坊医学院公共卫生实验室参考 Lin 等^[5]研究从藜麦麸皮中提取(含量>60%)。

1.2 主要仪器

旋转蒸发仪,东京理化器械株式会社;QuantStudio 5 ABI PCR 仪,赛默飞世尔科技有限公司;

NovaSeq 6000 系统,因美纳科学器材有限公司;UPLC-Q-Exactive 型超高效液相质谱联用仪,赛默飞世尔科技有限公司;Micro 21 型台式离心机,赛默飞世尔科技有限公司;IX73 光学显微镜,奥林巴斯;SCIENTZ-48L 型高通量组织研磨器,宁波新芝生物科技股份有限公司。液相色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH HILIC 柱(3.0 mm×100 mm, 1.7 μm)和 Waters Acquity UPLC BEH Amide 柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)。

1.3 方法

1.3.1 动物饲养

在通过动物实验伦理申请(2019SDL097)后根据良好实验室规范原则(GB/T 22278-2008)将大鼠饲养于潍坊医学院公共卫生学院实验动物房的 IVC 大鼠笼盒内。并将 48 只雌雄大鼠各随机分为四组:高剂量(500 mg/kg)皂苷灌胃组、中剂量(50 mg/kg)皂苷灌胃组、低剂量(5 mg/kg)皂苷灌胃组与空白(溶媒)灌胃对照组,每组 6 只。连续 90 d 经口灌胃暴露后,采集大鼠尿液后处死,解剖取肾脏,使用 4%的多聚甲醛固定大鼠肾脏,石蜡包埋切块后 HE 染色于光学显微镜下观察。

1.3.2 肠道菌群

大鼠解剖时,采集大鼠结肠内容物,使用 RNA 试剂盒提取大鼠结肠内容物中 RNA。对提取的 RNA 进行 PCR 扩增回收,采用 TruSeq Nano DNA LT Library Prep 试剂盒制备测序文库,并进一步纯化文库富集所得产物,在对 RNA 进行高通量测序后所得的结果与数据库进行比对分析。

1.3.3 代谢组学

1.3.3.1 尿液分析

在大鼠灌胃 90 d 后,使用代谢笼采集大鼠尿液,使用冷甲醇将大鼠尿液原液去蛋白,涡旋 1 min 混匀,离心取上清,氮吹干,1 mL 甲醇复溶,稀释 100 倍,过 0.45 μm 滤膜备用^[12]。

1.3.3.2 液相色谱质谱联用条件

UPLC-Q-Exactive 液相质谱仪进行分析配合 HILIC 柱。根据 Tang 等^[13]方法:流动相 A 为 0.1%甲酸加 10 mmol/L 的乙酸铵 95/5%乙酸/水溶液,流动相 B 为 0.1%甲酸加 10 mmol/L 的乙酸铵为 50/50%乙腈/水。线性 UPLC 梯度洗脱为:0 min 为 2%的 B;1 min 为 2%的 B;10 min 为 22%的 B;15 min 为 30%的 B;21 min 为 50%的 B;22 min 为 2%的 B;30 min 为 2%的 B。在速率下进行分离为 0.3 mL/min 和进样体积为 4 μL。质谱方法为:电喷雾离子源(ESI);离子源电

压为 3.2 kV, 鞘气体积流量为 40 L/min; 离子源温度为 320 °C; 饱和辅助气体流量为 2 L/min; 裂解电压为 300 V; 雾化气为氮气; 数据采集范围 m/z 50~1200, 采用 Full MS-ddMS 模式在正负离子模式下扫描。

另配合 Amide 柱。根据 Ke 等^[14]方法: 流动相 A 为 100 mmol/L 的乙酸铵水溶液, 流动相 B 为乙腈。线性 UPLC 梯度洗脱为: 0 min 为 99% 的 B; 10 min 为 99% 的 B; 15 min 为 40% 的 B; 20 min 为 99% 的 B; 30 min 为 1% 的 B。在速率下进行分离为 0.3 mL/min 和进样体积为 4 μ L。质谱方法同上述质谱方法。

1.3.4 统计方法

使用 Compounds Discover 3.1.1 对液相质谱联用系统导出的 raw 文件分析处理, 进行峰对齐, 峰过滤, 峰提取和自动积分。最终创建了一个包含相对分子质量、保留时间 (Rt)、峰面积、等信息的多维峰表。并采用 mzCloud, Chemspide (包含 BioCyc、Bovine Metabolome Database、Bovine Rumen Metabolome Database、CSF Metabolome database、Fecal Metabolome database、Golm Metabolome Database、Human Metabolome Database、KEGG、Saliva Metabolome Database、Serum Metabolome Database、Urine Metabolome Database、Yeast Metabolome Database 等数据库), 进行定性并获取相应峰面积, 后使用 SIMCA-P 14.1 对肠道菌群及代谢组学数据进行分析, 通过主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), 检验 R^2 、 Q^2 值, 得 Folding Change 值及 P 值后由 Graph-pad 8.0 制得差异代谢物火山图。取差异代谢物 (绝对值 > 1, $p < 0.05$), 使用 MetaboAnalyst 5.0 进行代谢通路富集分析^[15]。

初步筛查肠道菌群分析中的高通量测序数据; 重测、补测问题样本。通过质量初筛的原始序列按照 index 和 Barcode 信息, 进行文库和样本预分析, 并去

除 barcode 序列。使用 Vsearch 2.9.1 软件分析序列去噪或 OTU 聚类。对各样本 (组) 在不同物种分类学水平的具体组成进行展示, 了解整体概况。

2 结果与讨论

2.1 大鼠生命状态及解剖后观察

大鼠在饲养期间无明显不良状况, 灌饲结束后由 HE 染色切片观察大鼠肾脏 (图 1)。雌性高剂量藜麦皂苷灌胃组肾小球部分空泡变性, 肾小球肥大, 部分肾小管中细胞核数目增加, 细胞核排列紊乱, 与慢性肾损伤大鼠的病理表征一致^[16]。在雄性大鼠及雌性中低剂量组大鼠与空白对照组大鼠无显著差异。

2.2 代谢组学研究

对藜麦皂苷 90 d 灌胃大鼠的尿液进行液质联用仪分析后, 使用 Compound Discover 3.1.1 对源文件处理得 Fold Change 值、VIP 值、 p 值等, 并做出火山图, PCA 分析, OPLS-DA 分析等, 重点对差异明显的高剂量组大鼠与空白对照组大鼠进行分析。

2.2.1 差异代谢物主成分分析

对代谢物进行 PCA 分析, 雌性大鼠 $R^2=0.7$, 雄性大鼠 $R^2=0.6$, 均大于 0.5, 拟合优度较好, 具有较高的解释力。质量控制 (Quality Control, QC) 样本重合度均较好, 证实实验采用的方法具有较高重复度且机器具有较高稳定性, 结果可信度高。在 PCA 图 (图 2) 中可见雌性大鼠组间差异较为明显, 高中低剂量组与空白对照组均能较好区分; 虽然雄性大鼠中剂量组与中剂量组区分不明显, 但雄性大鼠高剂量组与空白对照组仍有明显差异, 对照组散点分布于横轴之下, 高剂量组分布于横轴之上。OPLS-DA 模型下组间差异更为明显, 表明皂苷灌胃对大鼠尿液代谢物影响明显 (图 3)。

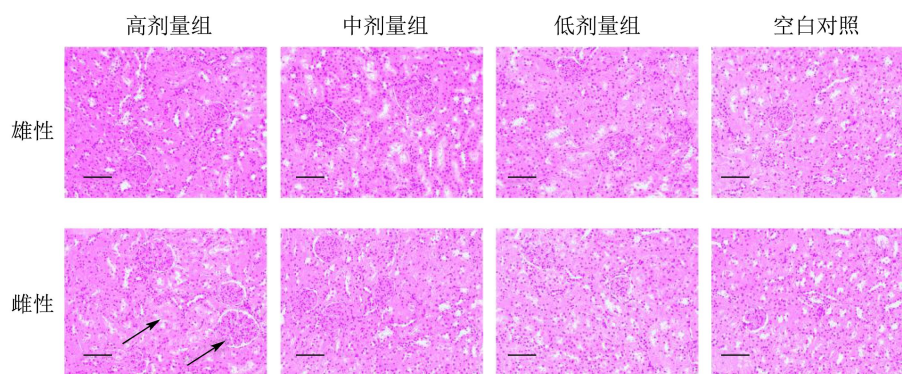


图 1 雌雄大鼠肾脏 HE 染色切片 (200 \times , 比例尺: 50 μ m)

Fig.1 HE staining sections of male and female rat kidneys (200 \times , scale: 50 μ m)

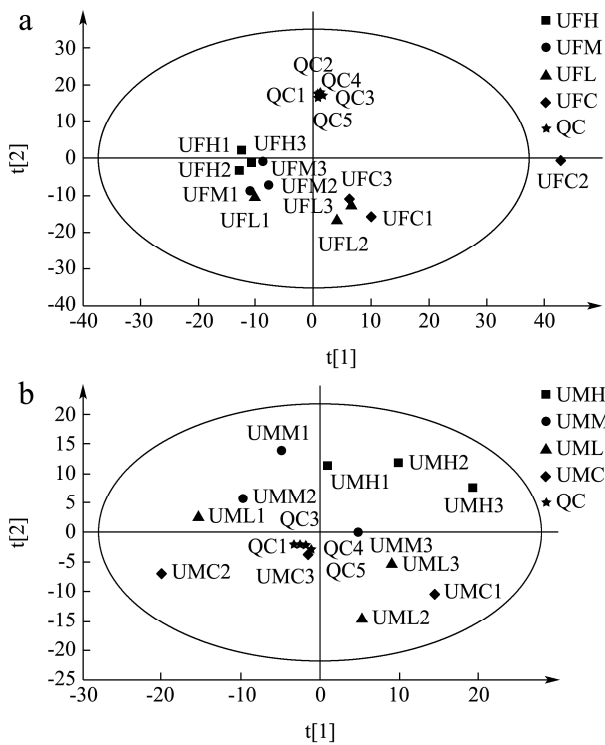


图2 雌雄大鼠尿液代谢物PCA-X图

Fig.2 PCA-X figure of urine metabolites of male and female rats

注: a为雌性大鼠; b为雄性大鼠。UFH为雌性高剂量组; UFM为雌性中剂量组; UFL为雌性低剂量组; UFC为雌性对照组; QC为雌雄质量控制组; UMH为雄性高剂量组; UMM为雄性中剂量组; UML为雄性低剂量组; UMC为雄性对照组; 图3同。

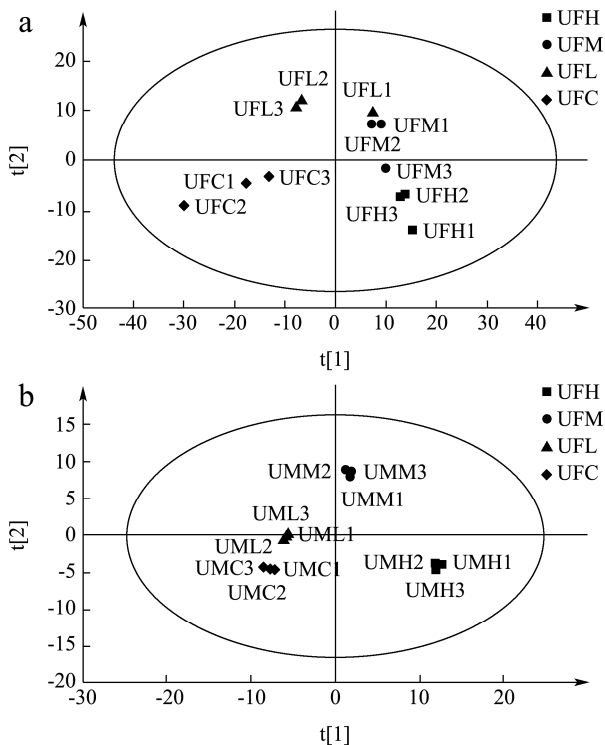


图3 雌雄大鼠尿液代谢物OPLS-DA图

Fig.3 OPLS-DA figure of urine metabolites of male and female rats

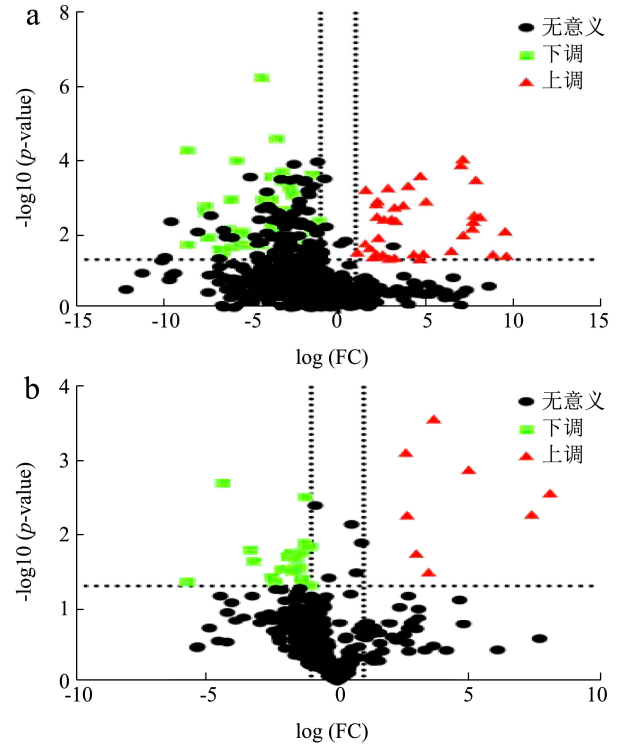


图4 高剂量组与空白对照组比较后的雌雄大鼠尿液代谢物火山图

Fig.4 The urine metabolite volcano map of male and female rats in the high-dose group compared with the blank control group

注: a为雌性大鼠; b为雄性大鼠。

2.2.2 差异代谢物数量分析

高剂量藜麦皂苷灌胃对雌雄大鼠均可产生显著影响,而在中低剂量下影响相对较小。通过火山图(图4)可见经500 mg/kg 藜麦皂苷灌胃后,雌性大鼠尿液中发现可鉴别的代谢物596种,其中差异代谢物($|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$, $\text{VIP} > 1$, $p < 0.05$)101种,上调38种,下调63种(由于数目过多,表1仅展示 $\log_2(\text{FC})$ 大于4,且VIP大于1的部分),雌性中剂量组与对照组相比之下仅有76中差异化合物,雌性低剂量组与对照组相比之下仅有53中差异化合物;雄性大鼠尿液中共发现可见别的代谢物358种,其中差异代谢物29种,上调7种,下调22种(表1、表2仅展示可命名的化合物)雄性中剂量组与对照组相比之下仅有15中差异化合物,雄性低剂量组与对照组相比之下仅有2中差异化合物,且在雌雄中低剂量组与对照组差异代谢物均被高剂量组与对照组差异代谢物所包含。包括在雌性大鼠代谢物中发现的L-组氨酸(L-Histidine)、L-丝氨酸(L-Serine)、吡哆醇(pyridoxine)、甲酰-5-羟基犬尿胺(Formyl-5-hydroxykynurenamine)、黄尿酸(Xanthurenic acid)、犬尿喹啉酸(Kynurenic acid)等化合物的变化均提示

了皂苷对肾脏的影响,而 Helene 等^[17]的研究亦证实了 未水解的皂苷可能对肾脏具有一定毒性。

表 1 雌性大鼠代谢物差异

Table 1 Metabolite differences in female rats

化合物	分子式	精确分子量	RT/min	log(FC)	P 值	VIP 值
Trigonelline	C ₇ H ₇ NO ₂	137.04751	15.52	9.64	0.04	1.06
Lactamide	C ₃ H ₇ NO ₂	89.04807	14.19	9.55	0.01	1.30
Betaine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.07894	15.96	8.85	0.04	1.01
Proline	C ₅ H ₉ NO ₂	115.06340	14.93	8.11	0.00	1.08
Kynurenic acid	C ₁₀ H ₇ NO ₃	189.04233	4.82	7.89	0.00	1.03
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)formamide	C ₈ H ₁₁ NO ₃	133.07391	14.94	7.78	0.00	1.07
6-Aminocaproic acid	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.09455	16.20	7.73	0.00	1.13
Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.09448	9.55	7.70	0.01	1.05
2-Aminobutyric acid	C ₄ H ₉ NO ₂	103.06365	15.62	7.17	0.01	1.01
2-morpholinoacetic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₃	145.07361	15.66	7.13	0.00	1.01
P-DMEA	C ₄ H ₁₂ NO ₄ P	169.05023	16.22	7.03	0.00	1.15
4-Piol	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂	168.08960	14.90	6.48	0.03	1.18
L-(+)-Citrulline	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	175.09566	16.96	5.04	0.00	1.12
1-(4-Aminobutyl)urea	C ₅ H ₁₃ N ₃ O	131.10588	14.50	4.89	0.03	1.04
δ-Valerolactam	C ₅ H ₉ NO	99.06867	15.66	4.72	0.00	1.01
L-Serine	C ₃ H ₇ NO ₃	105.04276	14.81	4.70	0.05	1.04
N-Acetylmethionine	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	174.10038	16.46	4.33	0.03	1.05
Pyridoxine	C ₈ H ₁₁ NO ₃	169.07373	12.60	4.01	0.00	1.26
2-Pyrrolidone	C ₄ H ₇ NO	85.05280	13.13	-4.27	0.04	1.06
(2-Hexyl-3-phenyl-2-oxiranyl)methanol	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	234.16158	2.39	-4.28	0.00	1.00
Ganciclovir	C ₉ H ₁₃ N ₅ O ₄	255.09637	15.13	-4.34	0.00	1.02
(betaR)-beta-Hydroxy-L-tyrosine	C ₉ H ₁₁ NO ₄	197.06863	2.40	-4.44	0.02	1.02
N-furfurylformamide	C ₆ H ₇ NO ₂	125.04758	13.11	-4.81	0.02	1.07
Xanthurenic acid	C ₁₀ H ₇ NO ₄	205.03738	3.06	-5.05	0.02	1.07
(2R,3R)-2,3-Indolinediol	C ₈ H ₉ NO ₂	151.06328	3.02	-5.46	0.01	1.00
Formyl-5-hydroxykynurenamine	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	208.08458	2.39	-5.51	0.02	1.00
NP-000465	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.07860	2.32	-5.59	0.01	1.01
sphinganine	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	301.29768	2.58	-5.79	0.00	1.07
(+/-)-nicotine	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	162.11555	13.31	-5.82	0.01	1.06
2-amino-2,3,7-trideoxy-D-lyxo-hept-6-ulosonic acid	C ₇ H ₁₃ NO ₅	191.07916	13.15	-6.03	0.02	1.07
N,N-Dimethylaniline	C ₈ H ₁₁ N	121.08919	2.44	-6.11	0.00	1.01
Glycitein	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.06787	2.31	-6.14	0.01	1.00
hydroxygenkwanin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.06293	2.34	-6.27	0.01	1.04
1-(4-Aminobutyl)urea	C ₅ H ₁₃ N ₃ O	131.10579	13.44	-6.57	0.03	1.07
L-Histidine	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.06932	13.45	-6.65	0.04	1.06
2-morpholinoacetic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₃	145.07361	15.08	-6.76	0.02	1.08
LNK	C ₁₆ H ₃₁ N ₅ O ₅	188.11589	13.10	-7.42	0.01	1.12
ACPC	C ₄ H ₇ NO ₂	101.04802	13.22	-7.55	0.00	1.12
muramic acid	C ₉ H ₁₇ NO ₇	251.10066	13.18	-7.60	0.00	1.09
(S)-(+)-allantoin	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	158.04382	3.38	-8.59	0.02	1.16
2-Aminobutyric acid	C ₄ H ₉ NO ₂	103.06365	14.61	-8.59	0.00	1.14

表 2 雄性大鼠代谢物差异

Table 2 Metabolite differences in male rats

化合物	分子式	精确分子量	RT/min	log(FC)	P 值	VIP 值
Kynurenic acid	C ₁₀ H ₇ NO ₃	189.04242	5.09	3.68	0.00	1.09
trans-4-Hydroxy-L-proline	C ₅ H ₉ NO ₃	131.05827	15.27	5.00	0.00	0.98
Allysine	C ₆ H ₁₁ NO ₃	145.07366	15.55	7.41	0.01	1.19
L-Histidine	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.06938	13.60	3.00	0.02	1.06
8-Azabicyclo[3.2.1]octane-1,2,3-triol	C ₇ H ₁₃ NO ₃	159.08935	14.64	3.47	0.03	1.11
DL-Citrulline	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	175.09529	14.70	-4.38	0.00	0.98
trans-4-Hydroxy-L-proline	C ₅ H ₉ NO ₃	131.05827	15.09	-1.21	0.00	1.20
N-Acetyl-L-glutamic acid	C ₇ H ₁₁ NO ₅	189.06352	16.84	-1.24	0.01	1.17
6-Hydroxyniacin	C ₆ H ₅ NO ₃	139.02689	4.58	-1.04	0.01	1.02
2,4-Quinolinediol	C ₉ H ₇ NO ₂	161.04752	2.43	-3.32	0.02	1.14
Betaine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.07911	15.51	-1.36	0.02	1.25
Aminosalicic Acid	C ₇ H ₇ NO ₃	153.04249	2.06	-1.76	0.02	0.82
N-Acetylvaline	C ₇ H ₁₃ NO ₃	159.08955	14.43	-1.86	0.02	1.20
Niacin	C ₆ H ₅ NO ₂	123.03208	14.79	-1.55	0.02	1.25
Norspermidine-2,3-dihydroxybenzoate	C ₁₃ H ₂₁ N ₃ O ₃	267.15822	12.20	-3.20	0.02	1.12
6-Aminocaproic acid	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.09465	15.77	-1.53	0.03	1.33
L-Theanine	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	174.10037	4.49	-1.44	0.03	1.07
DL-Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.08986	10.14	-2.11	0.03	1.12
2-Aminobutyric acid	C ₄ H ₉ NO ₂	103.06356	15.19	-1.70	0.03	1.31
Genistein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.05252	2.00	-2.49	0.04	1.15
g-Glutamylcysteine	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₅ S	250.06139	2.02	-1.35	0.04	1.04
AminoDHQ	C ₇ H ₁₁ NO ₅	189.06366	14.81	-5.73	0.04	1.04
Acetyl-N-formyl-5-methoxykynurenamine	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₄	264.11060	2.81	-2.37	0.04	1.26
PYRIDOXAMINE	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂	168.09009	14.16	-1.34	0.05	0.93
1,2,3,4-Tetrahydro-4,6,7-isoquinolinetriol	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.07380	2.13	-1.16	0.05	1.20
6-Aminocaproic acid	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.09455	6.26	-1.04	0.05	1.07

2.2.3 差异代谢物代谢物通路富集分析

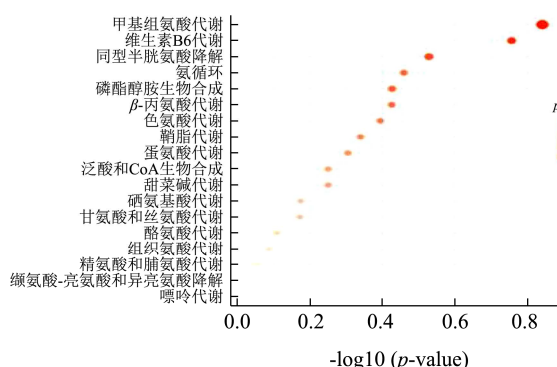


图 5 雌性大鼠通路富集分析图

Fig.5 Diagram of female rat pathway enrichment analysis

将差异代谢物带入 MetaboAnalyst 5.0 进行通路富集分析, 各代谢通路中, 维生素 B6 代谢、色氨酸代谢、氨循环、丙氨酸代谢的改变明显 (图 5)。其中, 维生素 B6 代谢与众多辅酶的合成息息相关, 藜麦皂

昔通过提高吡哆醇 (pyridoxine) 水平, 调节维生素 B6 代谢, 参与辅酶合成, 进而影响各种氨基酸的代谢 (图 6)。其中色氨酸又是肠胃微生物的重要代谢产物 [18]。藜麦皂昔通过促进色氨酸代谢下调了甲酰-5-羟基犬尿胺 (Formyl-5-hydroxykynurenamine)、黄尿酸 (Xanthurenic acid) 水平, 上调了犬尿喹啉酸 (Kynurenic acid) 水平。而肠道中色氨酸代谢作为肠道相关疾病的重要相关因素与特定乳酸杆菌等益生菌关系密切, 色氨酸代谢减弱可能与拮抗皂昔抗营养作用, 改善大鼠肠道损伤, 增强大鼠的自身免疫水平有关 [19-21], 亦可以此为依据将皂昔作为免疫佐剂激发皂昔干预后大鼠的免疫能力 [22]。同时, 维生素 B6 代谢还与固醇类激素具有相关性, 维生素 B6 水平上调可增加机体对固醇类激素及维生素 D 的敏感性, 而维生素 D 可促进钙吸收预防骨质疏松, 这极有可能是皂昔治疗骨质疏松以及发挥部分激素作用的重要机制 [23]。

不仅如此，随着维生素 B6 的增加，同型半胱氨酸降解减缓可危害大鼠心血管健康^[24]，L-丝氨酸(L-Serine)上调也可与同型半胱氨酸降解减缓的结论相互佐证。

值得注意的是 L-组氨酸(L-Histidine)水平下降与甲基组氨酸代谢增强相关较大，而甲基组氨酸代谢的加快则表示肌源纤维蛋白分解加快，说明摄入藜麦皂苷可致肌肉代谢加强^[25]。然而在藜麦皂苷高剂量灌胃组中的代谢产物中未见肌酐等急性肾损伤生物标志物水平的变化，这说明摄入藜麦皂苷未造成肾脏功

能性改变^[26]。但是通路富集分析却发现高剂量的藜麦皂苷经口灌胃造成了氨循环变化，藜麦皂苷通过下调 L-组氨酸(L-Histidine)、上调 L-丝氨酸(L-Serine)改变了氨循环。这一改变提示长期高剂量摄入藜麦皂苷会造成大鼠肾脏代偿性损伤^[27]。HE 染色切片也证实，高剂量藜麦皂苷对雌性大鼠肾脏产生损伤，这一影响在低中剂量范围下不明显，而日常所接触的藜麦皂苷均在中剂量范围以下^[28]，因此推测藜麦皂苷在环境与食品中的适量添加不会对肾脏产生不良影响。

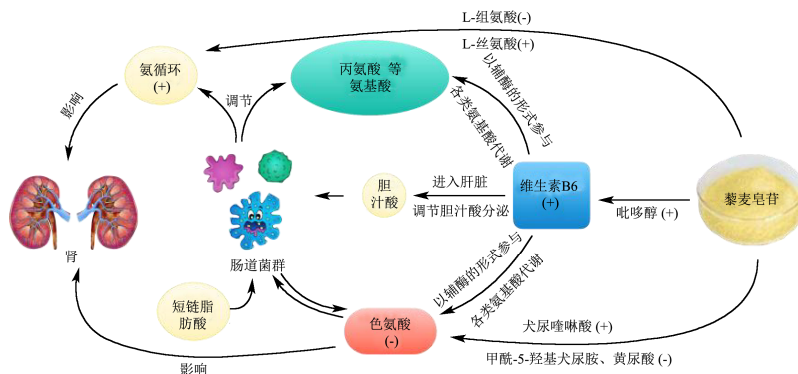


图 6 雌性大鼠通路富集分析图

Fig.6 In the pathway enrichment analysis diagram of female rats

注：图中 (-) 表示下调，(+) 表示上调。

2.3 肠道菌群

肠道菌群作为一种机体健康不可忽视的重要因素，与肠道疾病、肾脏损伤、心血管疾病息息相关^[29]。由 Alpha 多样性的 Observed Species 指数 (图 7a) 可见，仅有雌性对照组与高中剂量之间存在显著的统计学差异，表示雌性高中剂量组大鼠体内肠道菌群丰度大于雌性空白对照组，这一现象在雄性大鼠及雌性低剂量组中未发现。Simpson 指数 (图 7b) 中则未发现显著差异。而本研究中，由于肠道菌群自身变异大，故使用 OPLS-DA 对肠道菌群种属进行分析。雌雄大鼠，对照组与藜麦皂苷灌胃各组均存在差异 (图 8)。其中，雌性大鼠 R^2X 为 0.756， R^2Y 为 0.602；雄大鼠 R^2X 为 0.956， R^2Y 为 0.607，均大于 0.5，模型拟合优度较好。高剂量藜麦皂苷经口灌胃组与空白组相比，肠道菌群种类分布具有显著性差异。将代谢组学与肠道菌群多样性交叉分析显示，在各个差异代谢物相关的代谢通路中，色氨酸代谢与大鼠肠道菌群变化息息相关，而其他常见的肠道菌群相关代谢物未发现明显改变。结合目前研究，影响肠道菌群分布的主要代谢物为色氨酸、短链脂肪酸及胆汁酸等^[30]。藜麦皂苷通过下调大鼠体内的色氨酸代谢，影响其肠道菌群分布，但其具体机制尚不清楚。而藜麦皂苷对大鼠肠道菌群的变化也反馈式地影响了机体本身代谢，在长期藜麦

皂苷灌饲过程中，代谢产物与肠道菌群相互作用，改变了肠道微环境。

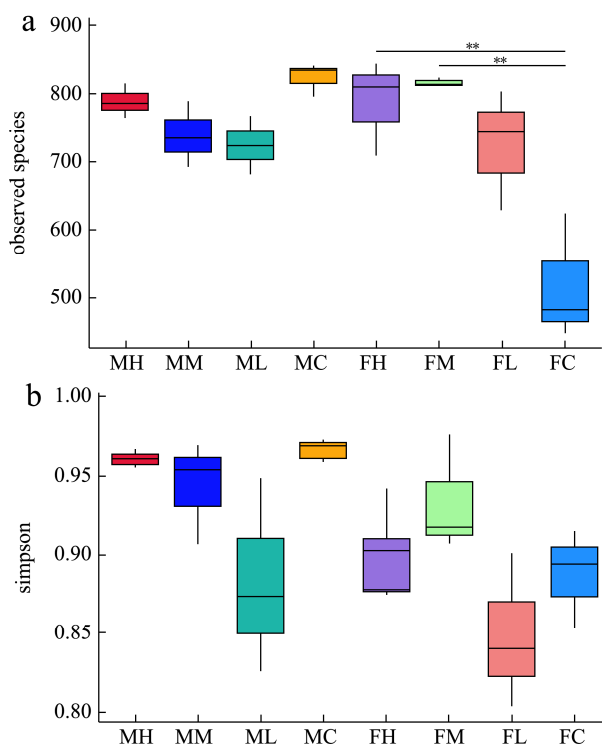


图 7 雌雄大鼠肠道菌群 Alpha 多样性

Fig.7 Alpha diversity of intestinal flora in rats

注：a 为 Observed Species 图；b 为 Simpson 图。FH 为雌性高剂量组；FM 为雌性中剂量组；FL 为雌性低剂量组；FC

为雌性对照组; MH 为雄性高剂量组; MM 为雄性中剂量组; ML 为雄性低剂量组; MC 为雄性对照组; 图 8 同。

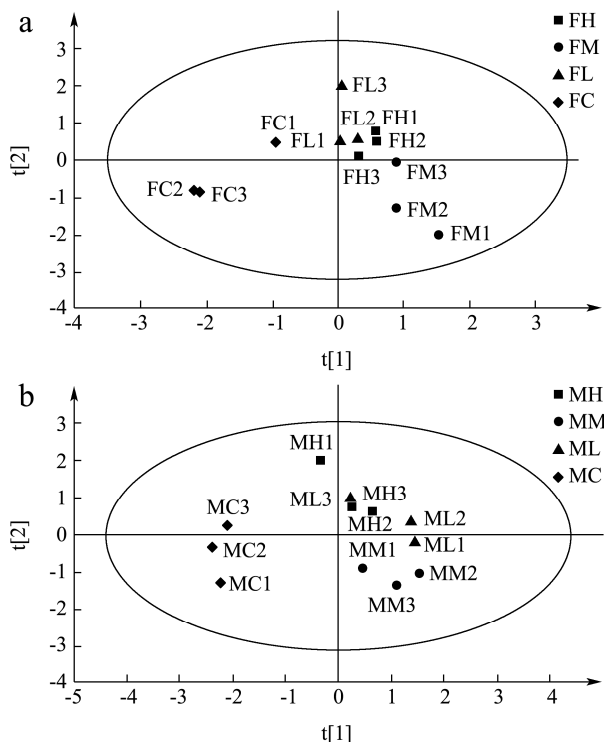


图 8 雌雄大鼠肠道菌群 OPLS-DA 图

Fig.8 OPLS-DA diagram of intestinal flora of male and female rats

注: a 为雌性大鼠; b 为雄性大鼠。

3 结论

综上, 通过代谢组学及肠道菌群结合分析证实, 高剂量藜麦皂苷使大鼠尿液中 L-脯氨酸、甜菜碱、犬尿喹啉酸等能量代谢物质及氨基酸类物质水平发生改变, 并影响了维生素 B6 代谢、氨循环、色氨酸代谢等通路, 从而调节机体代谢, 影响大鼠肠道菌群分布, 改变其肠道微环境。低中剂量下藜麦皂苷对大鼠并未造成明显伤害, 虽在高剂量下可能会对肾脏造成损伤, 但通常饮食与生活中所接触的藜麦皂苷含量难以达到实验设定的高剂量。本研究为藜麦皂苷对肾脏的作用提供了理论依据, 但对整体及其他脏器的毒性研究仍有待探究。

参考文献

[1] Paterson A, Kolata A. Keen insights from quinoa [J]. Nature, 2017, 542: 300-302
 [2] 林冰洁, 荆金金, 张若愚, 等. 藜麦皂苷生物活性与化学结构研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24): 300-306
 LIN Bingjie, JING Jinjin, ZHANG Ruoyu, et al. Research progress of biological activity and chemical structure of

saponins (*Chenopodium quinoa* Willd) [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(24): 300-306
 [3] Dong S X, Hou Z, Xue P, et al. Antibacterial activity and mechanism of action saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. husks against foodborne pathogenic bacteria [J]. Industrial Crops and Products, 2020, 149: 112350
 [4] Jiang X, Cao Y, Jorgensen L V G, et al. Where does the toxicity come from in saponin extract? [J]. Chemosphere, 2018, 204: 243-250
 [5] Lin B, Qi X, Fang L, et al. *In vivo* acute toxicity and mutagenic analysis of crude saponins from *Chenopodium quinoa* Willd husks [J]. RSC Advances, 2021, 11(8): 4829-4841
 [6] 周倩, 姚广涛, 金若敏, 等. 商陆皂苷甲致肾细胞毒性的研究 [J]. 世界中医药, 2014, 9(2): 151-154
 ZHOU Qian, YAO Guangtao, JIN Ruomin, et al. Study on renal cell toxicity induced by esculentoside A [J]. World Chinese Medicine, 2014, 9(2): 151-154
 [7] 杨雪, 刘传鑫, 袁付丽, 等. 基于网络毒理学商陆致大鼠肾损伤作用机制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 4974-4984
 YANG Xue, LIU Chuanxin, YUAN Fuli, et al. Mechanism of renal injury in rats induced by *Phytolaccae radix* based on network toxicology [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(20): 4974-4984
 [8] Saleh A, Alisdair R. Fernie. Metabolomics 20 years on: what have we learned and what hurdles remain? [J]. The Plant Journal, 2018, 94(6): 933-942
 [9] Theodoridis G A, Gika H G, Want E J, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: A review [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 711: 7-16
 [10] Kim S, Jazwinski S M. The gut microbiota and healthy aging: a mini - review [J]. Gerontology, 2018, 64(6): 513-520
 [11] Hsu C N, Hou C Y, Chang G P, et al. Perinatal resveratrol therapy prevents hypertension programmed by maternal chronic kidney disease in adult male offspring: implications of the gut microbiome and their metabolites [J]. Biomedicine, 2020, 8(12): 567
 [12] Want E J, Masson P, Michopoulos F, et al. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS [J]. Nature Protocols, 2013, 8(1): 17-32
 [13] Tang D K, Zou L, Yin X L, et al. HILIC-MS for metabolomics: an attractive and complementary approach to RPLC-MS [J]. Mass Spectrometry Reviews, 2016, 35(5): 574-600

- [14] Ke Y, Li S L, Chang L D, et al. A novel ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of sucrose octasulfate in dog plasma [J]. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences*, 2015, 978: 151-156
- [15] Pang Z, Chong J, Zhou G, et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights [J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49: 388-396
- [16] 徐保振,武美娟,胡秀红,等.雷公藤多苷对慢性肾脏病大鼠血管内皮损伤的保护作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*,2021,47(2):377-383
- XU Baozhen, WU Meijuan, HU Xiuhong, et al. Protective effect of multiglycoside of *Tripterygium wilfordii* on vascular endothelial injury in rats with chronic kidney disease and its mechanism [J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2021, 47(2): 377-383
- [17] Wisloff Helene, Uhlig Silvio, Scheie Eldri, et al. Toxicity testing of saponin-containing *Yucca schidigera* Roetzl. juice in relation to hepato- and nephrotoxicity of *Nartheceum ossifragum* (L.) Huds [J]. *Toxicon Official Journal of the International Society on Toxinology*, 2008, 51(1): 140-150
- [18] Jing G, Kang X, Liu H, et al. Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism [J]. *Frontiers in Cellular & Infection Microbiology*, 2018, 8: 13
- [19] Nikolaus S, Schulte B, Al-massad N, et al. Increased tryptophan metabolism is associated with activity of inflammatory bowel diseases [J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(6): 1504-1516
- [20] Michael, Platten, Ellen, et al. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2019, 18: 379-401
- [21] Magnusson M K, Isaksson S, Öhamn L. The anti-inflammatory immune regulation Induced by butyrate is impaired in inflamed intestinal mucosa from patients with ulcerative colitis [J]. *Inflammation*, 202, 43(2): 507-517
- [22] Jing J J, Zhang R Y, Wang Y H, et al. Less polar ginsenosides have better protective effects on mice infected by *Listeria monocytogenes* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 213(1): 112065
- [23] Li J, Yin L, Wang L, et al. Effects of vitamin B6 on growth, diarrhea rate, intestinal morphology, function, and inflammatory factors expression in a high-protein diet fed to weaned piglets1 [J]. *Journal of Animal Science*, 2019, 12: 12
- [24] Lee M E, Hong W. Homocysteine and hypomethylation. A novel link to vascular disease [J]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 1999, 9(1-2): 49-54
- [25] Rathmacher J A, Flakoll P J, Nissen S L. A compartmental model of 3-methylhistidine metabolism in humans [J]. *The American Journal of Physiology*, 1995, 269(1): E193
- [26] Hocher B, Adamski J. Metabolomics for clinical use and research in chronic kidney disease [J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2017, 13(5): 269
- [27] Glenda C G, Jeff S C, Robert G F, et al. Biomarkers of drug-induced acute kidney injury in the adult [J]. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2015, 11(11): 1683-1694
- [28] Simnadis T G, Tapsell L C, Beck E J. Physiological effects associated with quinoa consumption and implications for research involving humans: a review [J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2015, 70(3): 1-12
- [29] Lozupone C A, Stombaugh J I, Gordon J I, et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota [J]. *Nature*, 2012, 489(7415): 220-230
- [30] Wu Y, Wan J, Choe U, et al. Interactions between food and gut microbiota: impact on human health [J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2019, 10(1): 389-408

(上接第 301 页)

- [16] 章志超,龙慧,吴鑫,等.食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌分离鉴定方法研究进展[J].*食品安全质量检测学报*,2020,11(2): 121-127
- ZHANG Zhichao, LONG Hui, WU Xin, et al. Research progress on isolation and identification methods of *Yersinia enterocolitica* in food [J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2020, 11(2): 121-127
- [17] GB 4789.8-2016,食品安全国家标准 食品微生物学检验 小肠结肠炎耶尔森氏菌检验[S]
- GB 4789.2-2016, National Food Safety Standard Food Microbiological Examination *Yersinia enterocolitica* Examination [S]