

## · 临床论著 ·

# 基于肠道菌群和代谢组学探索糖尿病肾病 中医湿证生物学特征

张青<sup>1, 2, 3</sup> 陈国伟<sup>1, 2, 3</sup> 苏镜旭<sup>1, 2, 3</sup> 胡晓璇<sup>1, 2, 3</sup> 卢富华<sup>1, 2, 3</sup> 刘旭生<sup>1, 2, 3, 4</sup> 张蕾<sup>1, 2, 3, 4</sup>

**摘要** **目的** 探讨糖尿病肾脏病 (DKD) 中医湿证的差异肠道菌群、潜在生物标志物及代谢通路。**方法** 选择 2017 年 1 月—2019 年 12 月储存在广东省中医院生物资源库的中医诊断为湿证的 DKD 患者的粪便标本和血清标本, 应用 16s RNA 高通量测序和液相色谱-质谱法 (LC-MS) 检测 DKD 不同湿证亚型 (湿热证、水湿证、湿浊证) 患者之间的差异肠道菌群和血清代谢物, 探索与湿证亚型相关的代谢通路, 并将肠道微生物与代谢组学相结合, 探讨肠道菌群和血清代谢物的关联性。**结果** 研究共纳入 41 例 DKD 患者的粪便和血清标本, 其中湿热证 21 例, 水湿证 13 例, 湿浊证 7 例; 肠道微生物结果显示: 水湿证和湿浊证的差异肠道菌群有 7 种, 湿浊证和湿热证有 13 种, 水湿证和湿热证有 4 种。代谢组学结果提示: DKD 湿浊证和湿热证的差异血清代谢物有 8 种, 主要富集在苯丙氨酸代谢和泛醌和其他萜类醌生物合成通路 ( $P < 0.05$ ); 水湿证和湿热证有 27 种, 主要富集在嘌呤代谢通路和缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成通路; 水湿证和湿浊证有 16 种, 主要富集在  $\alpha$ -亚麻酸代谢通路 ( $P < 0.05$ )。肠道菌群与代谢组学关联分析显示: 共有 46 种差异血清代谢物与差异肠道菌群相关, 主要富集在苯丙氨酸代谢通路。**结论** DKD 中医湿证亚型 (湿浊证、湿热证、水湿证) 之间存在差异肠道菌群、血清代谢物, 与差异肠道菌群关联后, 这些差异血清代谢在苯丙氨酸代谢途径中富集。

**关键词** 糖尿病肾脏病; 湿热证; 水湿证; 湿浊证; 肠道微生物; 代谢组学; 中医

## Biological Characteristics of Diabetic Nephropathy with Dampness Syndrome Based on Intestinal Flora and Metabonomics

ZHANG Qing<sup>1, 2, 3</sup>, CHEN Guo-wei<sup>1, 2, 3</sup>, SU Jing-xu<sup>1, 2, 3</sup>, HU Xiao-xuan<sup>1, 2, 3</sup>, LU Fu-hua<sup>1, 2, 3</sup>, LIU Xu-sheng<sup>1, 2, 3, 4</sup>, and ZHANG Lei<sup>1, 2, 3, 4</sup> 1 State Key Laboratory of Dampness Syndrome in Chinese Medicine Co-sponsored by Province and Ministry, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510120); 2 The Second Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405); 3 Nephrology Departments, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510120); 4 Guangdong Key Laboratory of Chinese Medicine Syndrome Clinical Research, Guangzhou (510120)

**ABSTRACT Objective** To investigate the distinct intestinal microbiota and potential biomarkers associated with diabetic kidney disease (DKD). **Methods** Stool specimens and serum specimens from patients with DKD with Chinese medicine (CM) diagnosis of dampness syndrome stored in the biorepository of Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine from Jan 2017 to Dec 2019 were included, and 16s RNA high-throughput sequencing and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) were applied to detect the differential intestinal flora and serum metabolites among patients with different dampness syndrome subtypes of DKD (damp heat syndrome, water dampness syndrome, and dampness turbidity syndrome).

基金资助: 省部共建中医湿证国家重点实验室专项 (No. SZ2020ZZ22, No. SZ2021ZZ16, No. SZ2021ZZ43); 广东省中医证候临床研究重点实验室专项 (No. ZH2020KF02); 广州市科学技术局重点研发计划 (No. 202206010076)

作者单位: 1. 省部共建中医湿证国家重点实验室, 广州中医药大学第二附属医院 (广州 510120); 2. 广州中医药大学第二临床医学院 (广州 510405); 3. 广州中医药大学第二附属医院肾内科 (广州 510120); 4. 广东省中医证候临床研究重点实验室 (广州 510120)

通讯作者: 张蕾, Tel: 020-81887233, E-mail: zhanglei@gzucm.edu.cn

DOI: 10. 7661/j. cjm. 20230531.084

The metabolic pathways associated with dampness subtypes and the association between intestinal flora and serum metabolites by combining intestinal microbiology and metabolomics were explored. **Results** A total of 41 patients with DKD were included in the study, including 21 with damp heat syndrome, 13 with water dampness syndrome and 7 with dampness turbidity syndrome. The results of intestinal microorganism showed that there were 7 kinds of intestinal flora in the difference between water dampness syndrome and dampness turbidity syndrome. Similarly, there were 13 kinds of dampness turbidity syndrome and dampness heat syndrome, and 4 kinds of water dampness syndrome and dampness heat syndrome. The results of metabolomics showed that there were 8 kinds of metabolites in the blood of DKD with dampness turbidity syndrome and dampness heat syndrome, which were mainly concentrated in phenylalanine metabolism and ubiquinone and other terpenoid quinone biosynthesis pathway ( $P < 0.05$ ). There were 27 kinds of water dampness syndrome and damp heat syndrome, which were mainly concentrated in purine metabolism pathway and valine, leucine and isoleucine biosynthesis pathway. There were 16 kinds of water dampness syndrome and dampness turbidity syndrome, which were mainly concentrated in  $\alpha$ -Linolenic acid metabolism pathway ( $P < 0.05$ ). The correlation analysis between intestinal flora and metabolomics showed that there were 46 kinds of differential blood metabolites in CM dampness syndrome of DKD, which were mainly concentrated in phenylalanine metabolic pathway. **Conclusion** There are differential intestinal flora, serum metabolites between the damp subtypes of DKD (dampness and turbidity, dampheat, and waterdampness), and upon association with differential intestinal flora, these differential serum metabolites are enriched in the phenylalanine metabolic pathway.

**KEYWORDS** diabetic kidney diseases; dampheat syndrome; water dampness syndrome; dampness turbidity syndrome; intestinal microecology; metabolomics; Chinese medicine

糖尿病肾脏病 (diabetic kidney disease, DKD) 是糖尿病微血管并发症之一。前期研究证实, DKD 患者普遍存在湿证, 且加重疾病进展<sup>[1]</sup>。肠道菌群与肠道环境处于相互制约、相互依存的平衡状态, 共同组成了肠道微生态系统, 这与中医学整体观念是共通的<sup>[2]</sup>。既往研究证实湿邪内困的患者, 肠道微生态的平衡破坏, 菌群多样性下降<sup>[3, 4]</sup>。代谢组学可从系统生物学的角度研究疾病的中医证型特征, 寻找潜在的生物标志物<sup>[5]</sup>, 揭示中医证候的本质。但是目前尚无针对湿证亚型与 DKD 疾病相关的生物学基础研究。因此本研究基于 16s rRNA 高通量测序和非靶向代谢组学, 探讨不同湿证亚型的 DKD 患者肠道菌群和血清代谢物的差异, 进一步寻找中医湿证相关的代谢通路。

## 资料与方法

**1 诊断标准** DKD 的诊断依据《2016 中国成人糖尿病肾脏病临床诊断的专家共识》<sup>[6]</sup>: 至少具备以下 1 条: (1) 能够肯定高血糖与慢性肾脏病的因果关系或高血糖为慢性肾脏病的起始病因或排除了非 DKD; (2) 已有病理学诊断的支持: 对于已行肾穿刺病理检查的患者, 如存在糖尿病特征性的肾脏损害的病理学证据, DKD 诊断可确立。慢性肾脏病临床分期标准参考《美国肾脏病学会 (2002) 慢性肾脏病临床实践指南》<sup>[7]</sup>, 1 期: 肾损伤指标 (+)、肾小球滤

过率 (glomerular filtration rate, GFR) 正常或增加、GFR  $\geq 90$  mL/min; 2 期: 肾损伤指标 (+)、GFR 轻度下降、GFR 60~89.9 mL/min; 3 期: GFR 中度下降、GFR 30~59.9 mL/min; 4 期: GFR 严重下降、GFR 15~29.9 mL/min; 5 期: 肾衰竭、GFR  $< 15$  mL/min (或透析)。

DKD 中医湿证证候诊断<sup>[8]</sup>。湿证包括湿热证、水湿证、湿浊证 3 种亚型: 湿热证: (1) 头晕沉重, 或腰腿酸困, 或肢体沉重, 或脘腹痞闷, 或胀满, 或恶心食少; (2) 口中黏腻, 或口甜; (3) 大便黏滞不爽, 或小便黄赤、涩痛, 或妇女白带多、味重; (4) 舌质红, 舌苔黄腻, (5) 脉濡滑, 或滑数。具备 (1)(2)(3) 任 2 项, 或任 1 项加 (4)(5) 1 项, 即可判定。

水湿证: (1) 眼睑、足踝, 颜面、肢体甚至全身水肿, 或伴胸水、腹水; (2) 少尿无尿; (3) 舌苔水滑; (4) 脉沉。具备 (1) 项即可判定。

湿浊证: (1) 食少纳呆, 或伴恶心呕吐, 或伴脘腹痞满, 或表情淡漠, 或烦躁不安, 或皮肤瘙痒; (2) 口中黏腻, 口有尿味; (3) 大便不畅, 甚或数日不行, 伴夜尿频多, 或尿少; (4) 舌苔腻。具备 (1)(2)(3)(4) 任 2 项即可判定。

## 2 纳入及排除标准

**2.1 纳入标准** (1) 年龄 18~85 岁; (2) 符合中西医诊断标准; (3) 非肾脏替代治疗; (4) 签署知情同意书。

2.2 排除标准 病例资料不完整的患者;患有活动期恶性肿瘤;或肺部感染、急性冠心病等急性合并疾病者;患有严重肠道疾病,如肠易激综合征、溃疡性结肠炎、下消化道出血等;留取标本前 3 个月服用过抗生素或益生菌等影响肠道菌群的药物;留取标本前服用激素或免疫抑制剂治疗。

3 一般资料 纳入 2017 年 1 月 1 日—2019 年 12 月 31 日期间在广东省中医院,西医诊断为“糖尿病肾脏病”,非肾脏替代治疗,中医证候诊断为“湿证”患者 41 例。根据患者中医湿证的亚型诊断,其中水湿证 13 例,湿浊证 7 例,湿热证 21 例。各指标组间比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),详见表 1。

表 1 三组患者一般资料比较

项目	水湿证 (13 例)	湿浊证 (7 例)	湿热证 (21 例)	统计值	P 值
性别 [男 (%) ]	9 (64.28)	2 (28.57)	16 (76.19)	5.391	0.075
年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$ )	67.57 $\pm$ 14.54	63.29 $\pm$ 8.49	64.95 $\pm$ 9.85	0.294	0.648
BMI [kg/m <sup>2</sup> , $M (P25, P75)$ ]	25.78 (22.73, 27.34)	26.84 (20.85, 27.14)	24.23 (22.68, 27.60)	0.205	0.700
收缩压 (mmHg, $\bar{x} \pm s$ )	166.42 $\pm$ 27.23	161.14 $\pm$ 23.77	153.76 $\pm$ 18.04	1.019	0.265
舒张压 (mmHg, $\bar{x} \pm s$ )	83.64 $\pm$ 15.37	86.71 $\pm$ 11.72	79.95 $\pm$ 9.18	1.160	0.389
24h 尿蛋白定量 [mg/24h, $M (P25, P75)$ ]	4 025.00 (686.65, 5 056.50)	1 788.50 (836.80, 4 821.00)	3 334.00 (1 730.00, 5 659.50)	0.049	0.785
血肌酐 [mmol/L, $M (P25, P75)$ ]	229.80 (142.50, 337.40)	447.50 (136.00, 693.60)	449.50 (197.50, 566.00)	2.004	0.269
eGFR [mL / (min·1.73m <sup>2</sup> ), $M (P25, P75)$ ]	18.96 (11.18, 44.19)	9.01 (6.120, 43.07)	10.41 (6.830, 30.78)	0.752	0.249
尿酸 ( $\mu\text{mol/L}$ , $\bar{x} \pm s$ )	508.36 $\pm$ 117.27	420.43 $\pm$ 92.39	465.95 $\pm$ 113.23	1.422	0.232
尿素氮 ( $\mu\text{mol/L}$ , $\bar{x} \pm s$ )	16.40 $\pm$ 7.86	20.74 $\pm$ 10.26	18.67 $\pm$ 9.08	0.707	0.555
糖化血红蛋白 [% , $M (P25, P75)$ ]	6.20 (5.75, 7.00)	6.65 (5.60, 8.01)	6.40 (5.52, 7.43)	0.325	0.879
胆固醇 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$ )	5.14 $\pm$ 2.12	5.51 $\pm$ 2.14	5.15 $\pm$ 1.43	0.165	0.888
甘油三酯 [mmol/L, $M (P25, P75)$ ]	1.58 (1.06, 2.00)	1.64 (0.92, 2.62)	1.81 (1.44, 2.40)	0.879	0.421
低密度脂蛋白 [mmol/L, $M (P25, P75)$ ]	2.44 (1.87, 5.10)	3.25 (2.50, 4.81)	3.30 (2.49, 5.03)	0.243	0.787
高密度脂蛋白 [mmol/L, $M (P25, P75)$ ]	1.01 $\pm$ 0.33	1.33 $\pm$ 0.55	1.35 $\pm$ 0.51	0.239	0.290
血白蛋白 (g/L, $\bar{x} \pm s$ )	34.19 $\pm$ 7.43	35.0 $\pm$ 5.13	36.03 $\pm$ 4.15	0.406	0.656
谷草转氨酶 (U/L, $\bar{x} \pm s$ )	21.5 $\pm$ 9.15	15.5 $\pm$ 4.97	15.73 $\pm$ 5.66	0.165	0.214
谷丙转氨酶 (U/L, $\bar{x} \pm s$ )	13.50 (9.50, 26.50)	11.00 (6.00, 21.00)	12.00 (9.00, 20.00)	0.678	0.673
用药情况 [例 (%) ]					
二甲双胍	1 (7.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.640	0.317
阿卡波糖	2 (15.4)	0 (0.0)	4 (19.0)	1.533	0.448
非磺脲类胰岛素促泌剂	1 (7.7)	2 (28.6)	6 (28.1)	2.259	0.213
磺脲类	2 (15.4)	0 (0.0)	1 (4.8)	2.002	0.382
噻唑烷二酮类	1 (7.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	2.208	0.317
二肽基肽酶 -4 抑制剂	2 (15.4)	2 (28.6)	3 (14.3)	0.795	0.518
胰岛素	9 (69.2)	5 (71.4)	12 (63.4)	0.739	0.479
ACE1/ARB	6 (46.2)	1 (14.3)	7 (33.3)	2.068	0.586
钙通道阻断剂	13 (100.0)	5 (71.4)	21 (100.0)	1.212	0.753
其他降压药	8 (61.5)	3 (42.9)	13 (61.9)	0.855	0.524
慢性肾脏病分期 (例)					
1 期	0	0	0	-	-
2 期	1	0	2	0.706	0.538
3 期	4	2	3	1.489	0.298
4 期	5	1	4	2.108	0.315
5 期	3	4	12	4.143	0.081
合并证 (例)					
高血压病	13	7	21	-	-
心血管疾病	7	2	5	3.338	0.061
高尿酸血症	5	1	13	5.263	0.081
肾结石	1	2	3	1.592	0.448
多囊肾	0	0	1	0.976	0.512

注:估算肾小球过滤率 (estimated glomerular filtration rate, eGFR)

本研究通过广东省中医院伦理委员会审批 (No. ZE2020-193-01)。

#### 4 观察指标及方法

4.1 一般人口学资料及实验室指标 收集患者留取标本时的人口学资料、中医证型、实验室指标。

4.2 16s rRNA 检测 使用 E.Z.N.A.soil DNA kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.) 进行微生物群落 DNA 抽提。对 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增后建库。使用 Miseq PE300/NovaSeq PE250 平台进行测序 (上海美吉生物医药科技有限公司)。

4.3 血清非靶向代谢物检测 100 μL 血清样品中加入 400 μL 提取液, 涡旋混匀后低温超声提取, 复溶后移取上清液至进样小瓶中上机分析。使用 ExionLCTMAD (AB Sciex, USA) 系统进行液相色谱耦合质谱 (liquid chromatography coupled mass spectroscopy, LCMS) 检测。获得的原始数据导入 Progenesis QI 2.3 (Nonlinear Dynamics, Waters, USA) 软件中进行矩阵采集和数据降维处理, 与代谢数据库 (<http://www.hmdb.ca/>、<https://metlin.scripps.edu/> 等主流公共数据库) 进行匹配。

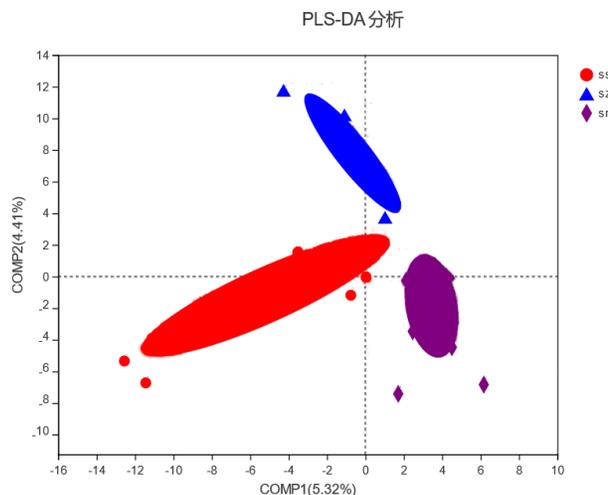
5 统计学方法 采用 SPSS 23.0 统计软件进行处理, 符合正态分布使用  $\bar{x} \pm s$  描述; 不符合使用中位数四分位数描述  $[M(P_{25}, P_{75})]$ , 组间比较符合正态分布且方差齐使用单因素方差分析  $t$  检验, 不符合正态分布使用 Wilcoxon (Mann-Whitney) 秩和检验。计数资料构成比使用卡方检,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 DKD 中医湿证不同亚型肠道菌群分析

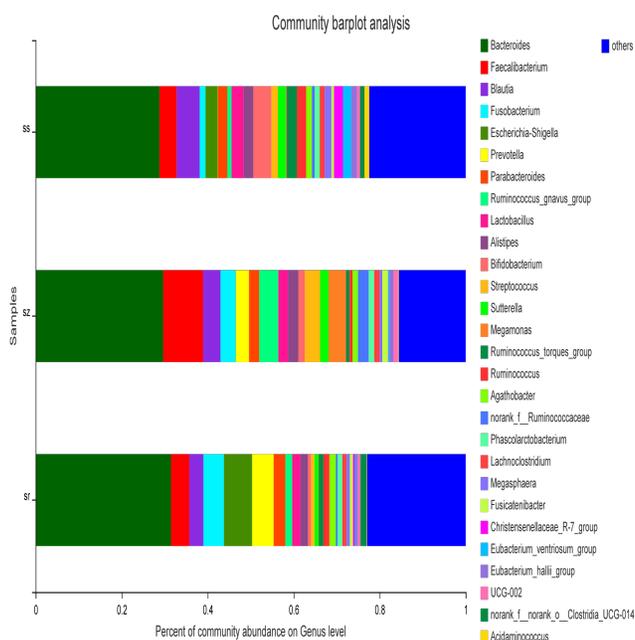
1.1 肠道菌群 PLS-DA 分析及肠道菌群群落组成分析结果 (图 1、2) PLS-DA 结果表明水湿证、湿浊证和湿热证的肠道菌群可以明显区分并聚成三个类群 (图 1)。在属水平上, 湿热证与其他两个湿证亚型 (湿浊、水湿证) 比较, 类杆菌 (*Bacteroides*)、梭杆菌 (*Fusobacterium*)、大肠杆菌志贺氏菌 (*Escherichia-Shigella*)、普雷沃菌属 (*Prevotella*) 增多, 布劳特氏菌 (*Blautia*)、双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 减少。湿浊证与其他两个湿证亚型 (湿热、水湿证) 相比, 粪杆菌 (*Faecalibacterium*)、瘤胃菌属 *gnavus* (*Ruminococcus\_gnavus\_group*)、链球菌 (*Streptococcus*)、巨单胞菌 (*Megamonas*) 明显增多, 大肠杆菌志贺氏菌 (*Escherichia-Shigella*) 明显

减少。水湿证与其他两个湿证亚型 (湿热、湿浊证) 相比, 双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 增多, 类杆菌 (*Bacteroides*)、梭杆菌 (*Fusobacterium*)、普雷沃菌属 (*Prevotella*) 减少 (图 2)。



注: ss 为水湿组; sr 为湿热组; sz 为湿浊组; 下图同

图 1 DKD 中医湿证亚型肠道菌群 PLS-DA 分析

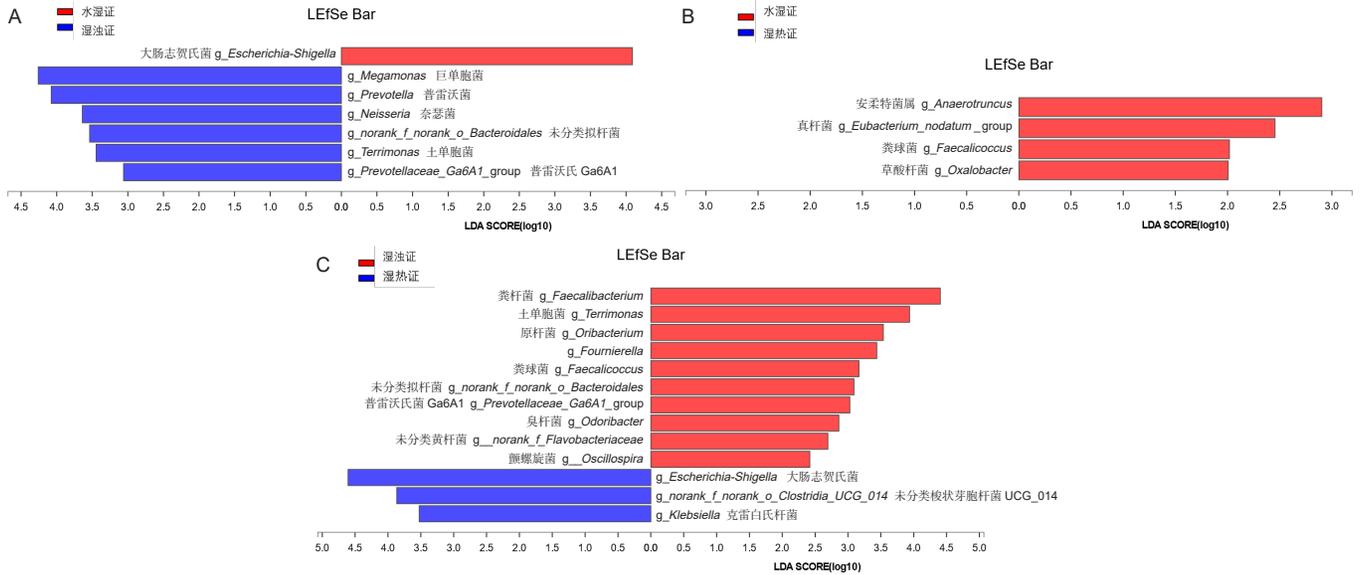


注: 图中不同颜色的柱子代表不同的物种, 柱子的长短代表该物种所占比例的大小

图 2 不同中医湿证 (湿热证、水湿证、湿浊证) 肠道菌群在属水平分布特征

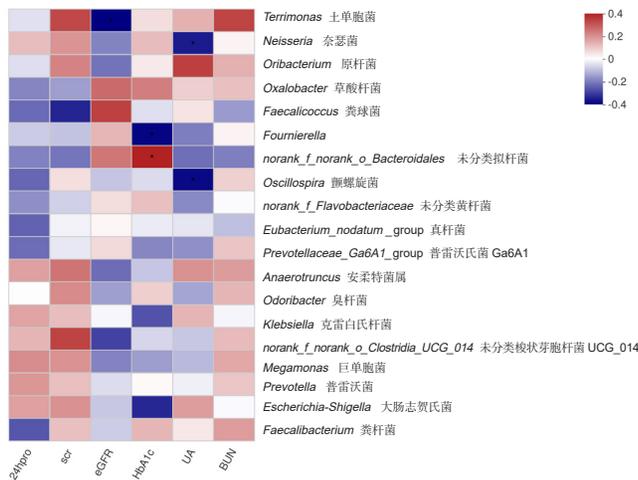
1.2 肠道菌群 LEfSe 多级物种差异判别分析 (图 3) LEfSe 分析表明: 水湿证和湿浊证比较, 有 7 种差异肠道菌群 ( $LDA > 2, P < 0.05$ ) (图 3A)。同理, 湿浊证和湿热证比较, 有 13 种差异菌群 ( $LDA > 2, P < 0.05$ ) (图 3B)。水湿证和湿热证比较, 有 4 种差异肠道菌群 ( $LDA > 2, P < 0.05$ ) (图 3C)。

### 1.3 差异肠道菌群与临床指标关联分析 (图 4)



注: A 为水湿证与湿浊证比较; B 为水湿证与湿热证比较; C 为湿浊证与湿热证比较

图 3 中医湿证亚型肠道菌群 LDA 判别柱形图



注: \* $P < 0.05$

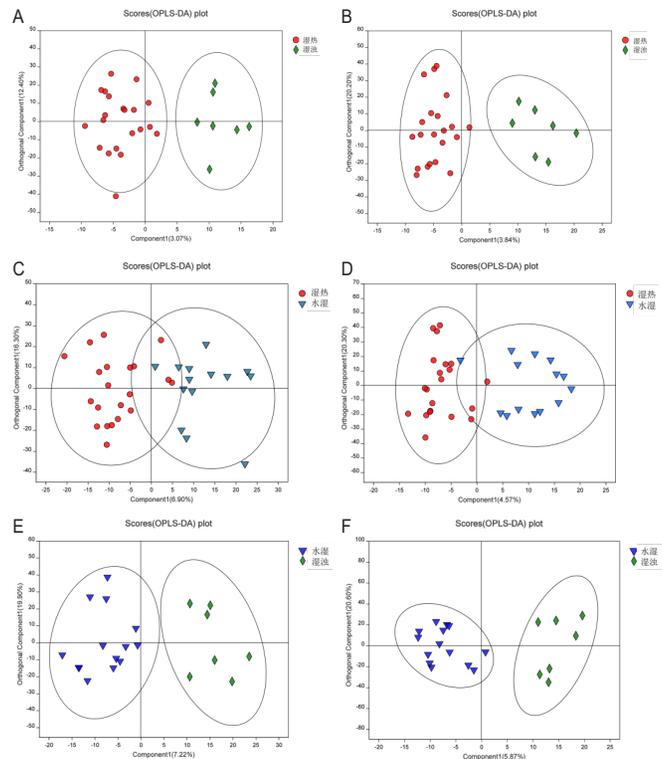
图 4 中医湿证亚型间的肠道菌群与临床指标关联图

将上述湿证亚型间的差异肠道菌群与临床指标进行关联分析,结果显示:土单胞菌与肾功能 eGFR 显著负相关 ( $P < 0.05$ )。奈瑟菌与尿酸显著负相关 ( $P < 0.05$ )。颤螺旋菌与尿酸显著负相关 ( $P < 0.05$ )。未分类拟杆菌与糖化血红蛋白显著正相关 ( $P < 0.05$ )。Fournierella 与糖化血红蛋白显著负相关 ( $P < 0.05$ )。

### 2 DKD 中医湿证不同亚型的代谢组学分析

2.1 代谢轮廓及不同湿证亚型的血清代谢物化合物分类分析(图 5、6) OPLS-DA 模型分析不同湿证亚型(湿浊证、湿热证、水湿证)的代谢谱分离明显(图 5),但甘油磷脂代谢是湿浊证、湿热证、水湿证的主要的血清代谢物(图 6)。

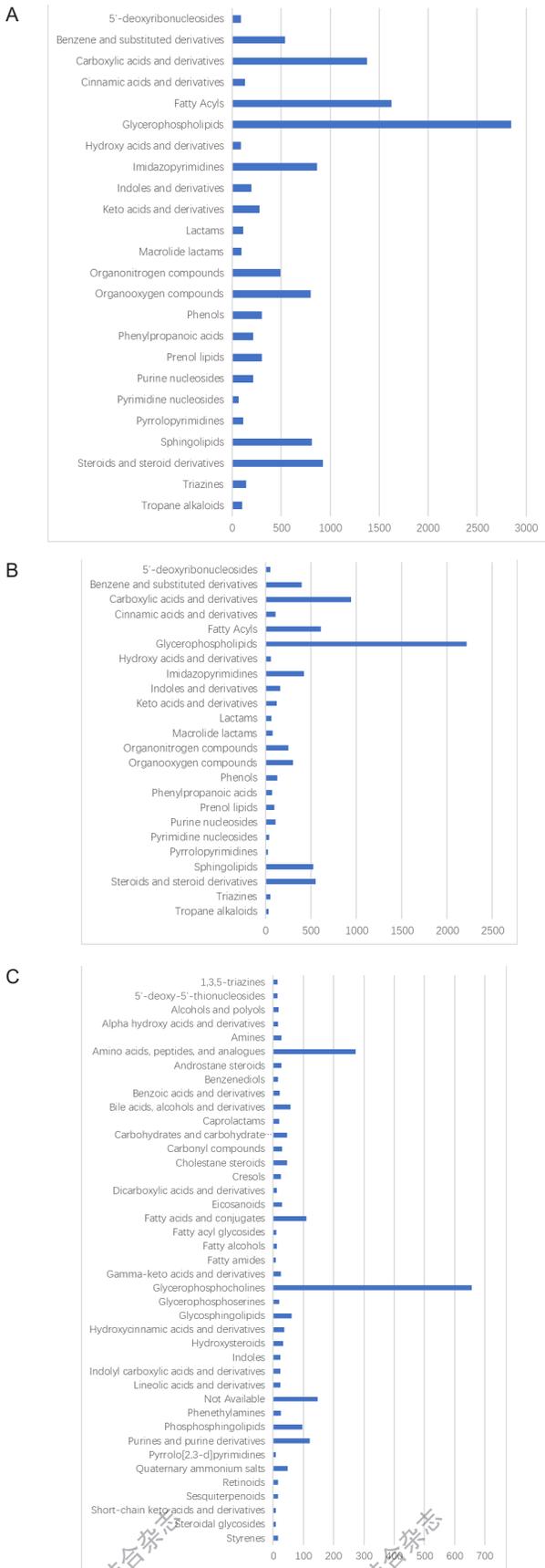
### 2.2 差异血清代谢物及富集通路分析(表



注: A 为湿热证与湿浊证阳离子 OPLS-DA 分析; B 为湿热证与湿浊证阴离子 OPLS-DA 分析; C 为湿热证与水湿证阳离子 OPLS-DA 分析; D 为湿热证与水湿证阴离子 OPLS-DA 分析; E 为水湿证与湿浊证阳离子 OPLS-DA 分析; F 为水湿证与湿浊证阴离子 OPLS-DA 分析

图 5 湿证亚型两两比较的代谢物 OPLS-DA 分析

2~4, 图 7) 根据 OPLS-DA 模型,湿热证和湿浊证相比较,共有 8 种差异血清代谢物 ( $P < 0.05$ ) (表 2),主要富集在苯丙氨酸代谢和泛醌和其他萜类醌生物合成通路上 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ) (图 7A)。湿热证和水湿证比较,共有 27 种差异血清代谢物

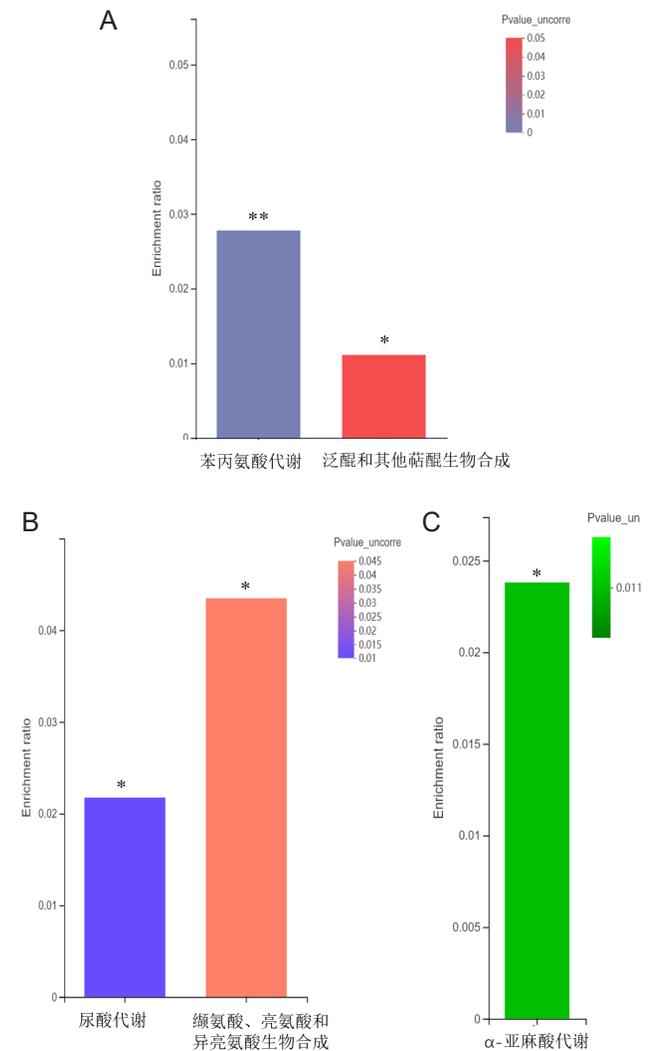


注：A 为湿热证血清代谢物的化合物分类；B 为水湿证血清代谢物的化合物分类；C 为水湿证血清代谢物的化合物分类

图 6 不同湿证亚型血清差异代谢物整体特征

( $P < 0.05$ ) (表 3)，主要富集在尿酸代谢通路和缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成通路上 ( $P < 0.05$ ) (图 7B)。水湿证和湿浊证比较，共有 16 种差异血清代谢物 ( $P < 0.05$ )，(表 4)。富集通路分析显示，主要富集在  $\alpha$ -亚麻酸代谢通路上 ( $P < 0.05$ ) (图 7C)。

3 差异肠道菌群与差异血清代谢物多组学分析 (图 8、9) 将上述湿热证、水湿证、湿浊证的血清差异代谢物与组间的差异代谢菌群进行关联分析，结果显示共有 49 种差异血清代谢物与差异肠道菌群关联有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。将上述 49 种与菌群关联的差异代谢物进行富集通路分析显示主要富集在苯丙氨酸代谢通路上 ( $P < 0.01$ )。



注：A 为湿热证与湿浊证差异血清代谢物富集通路图；B 为湿热证与水湿证差异血清代谢物富集通路图；C 为水湿证与湿浊证差异血清代谢物富集通路图；\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$

图 7 湿证亚型的富集通路图

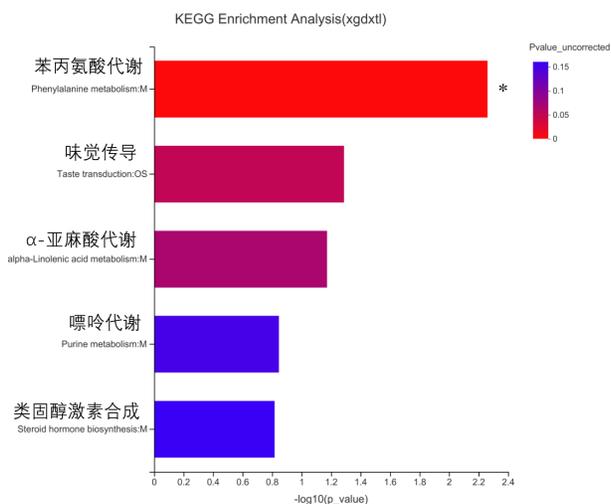
表 2 湿浊证和湿热证的血清差异代谢物

序号	代谢物	中文名称	质荷比	湿浊证变化趋势	FC	P 值
1	PE[22:4 (7Z, 10Z, 13Z, 16Z) /P-18:1 (11Z)]	磷脂酰乙醇胺	822.5677	↓	1.569	0.017
2	JanthitremB	萘并吡喃	630.3427	↑	0.783	0.027
3	P-Salicylicacid	对水杨酸	137.0245	↓	1.345	0.043
4	M-Coumaricacid	间香豆酸	209.0454	↑	0.619	0.036
5	Cholacalcioicacid	胆酸	373.2725	↓	1.428	0.032
6	3beta-Hydroxychola-5, 16-dien-24-oicAcid	3β-羟基胆酸-5, 16-二烯-24-油酸	373.2727	↓	1.297	0.040
7	LablabosideD	扁豆苷 D	632.3021	↓	1.202	0.028
8	Casuarine6-alpha-D-glucoside	木麻黄 6-α-D-葡萄糖苷	400.1828	↓	1.494	0.040

表 3 水湿证和湿热证血清差异代谢物

序号	代谢物	中文名称	质荷比	湿热证变化趋势	VIP 值	P 值
1	TraumaticAcid	创伤酸	265.107	↑	1.882	0.011
2	L-(-)-3-Phenyllacticacid	L-3-苯基乳酸	165.055	↑	1.801	0.015
3	6'-Hydroxyenterolactone	6'-羟基内酯	295.096	↓	1.806	0.034
4	MucronineD	粘蛋白 D	698.338	↓	1.765	0.017
5	Desmosine	锁链素	571.281	↑	2.040	0.013
6	2-Amino-4-oxo-6-(1',2',3'-trihydroxypropyl)-diquinoid-7, 8-dihydroxypterin	2-氨基-4-氧代-6-(1', 2', 3'-三羟丙基)-二喹啉-7, 8-二羟基蝶呤	577.199	↓	1.687	0.032
7	Symmetric dimethylarginine	对称二甲基精氨酸	239.089	↓	1.373	0.031
8	(5alpha, 8beta, 9beta)-5, 9-Epoxy-3, 6-megastigmadien-8-ol	(5α, 8β, 9β)-5, 9-环氧-3, 6-巨豆烯-8-醇	253.144	↑	2.252	0.009
9	Asteltoxin	星形曲霉毒素	417.191	↑	1.688	0.021
10	[(2Z)-3-oxo-2-(phenylmethylidene)propoxy]sulfonicacid	[(2Z)-3-氧代-2-(苯基亚甲基)丙氧基]磺酸	223.006	↑	2.190	0.011
11	LPA[18:2(9Z, 12Z)/0:0]	溶血磷脂酸	435.249	↓	1.350	0.017
12	Inosine	肌苷	269.088	↓	2.022	0.025
13	MulberrofuranS	桑呋喃 S	559.137	↓	1.656	0.001
14	Etiocholanolone	乙胆酚酮	273.220	↑	2.476	0.018
15	PE[20:1(11Z)/22:6(4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z)]	磷脂酰乙醇胺	420.779	↑	2.833	0.020
16	L-Isoleucine	L-异亮氨酸	132.102	↑	1.373	0.006
17	Hypoxanthine	次黄嘌呤	137.045	↓	1.552	0.022
18	Aspartame	阿斯巴甜	317.114	↑	1.459	0.049
19	N-Monodemethylroxithromycin	N-去甲基罗红霉素	405.254	↓	2.696	0.021
20	Butyl(S)-3-hydroxybutyrateglucoside	丁基(S)-3-羟基丁酸丁酯糖苷	287.148	↑	1.416	0.037
21	Monicacid	亚磺酸	343.211	↑	1.184	0.045
22	Vaccenylcarnitine	缩水甘油基肉碱	426.356	↓	1.056	0.042
23	Cibaricacid	胆酸	325.200	↑	2.357	0.003
24	4-Androstenediol	4-雄烯二醇	255.210	↑	2.028	0.028
25	2-[4-(6-dihydroxy-2-methoxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)phenyl)aceticacid	2-[4, 6-二羟基-2-甲氧基-3-(3-甲基丁-2-烯-1-基)苯基]乙酸	267.122	↑	2.421	0.041
26	4-formylindole	4-甲酰吲哚	146.059	↑	1.102	0.043
27	Gamma-Glu-Leu	γ-谷氨酰亮氨酸	261.144	↑	1.145	0.045





注: \* $P < 0.01$

图 9 DKD 中医湿证亚型中与肠道菌群关联的差异代谢物富集通路分析

表达的差异肠道菌群均包括粪球菌, 草酸杆菌, 安柔特菌属, 真杆菌。其中土单胞菌与肾功能 eGFR 显著负相关 ( $P < 0.05$ )。奈瑟菌与尿酸显著负相关 ( $P < 0.05$ )。颤螺旋菌与尿酸显著负相关 ( $P < 0.05$ )。未分类拟杆菌与糖化血红蛋白显著正相关 ( $P < 0.05$ )。Fournierella 与糖化血红蛋白显著负相关 ( $P < 0.05$ )。土单胞菌属、未分类拟杆菌属均属于拟杆菌门, 既往研究表明在慢性肾脏病患者中, 拟杆菌增多, 可导致肠源性内毒素硫酸吲哚酚 (indoxyl sulfate, IS), 对甲酚硫酸盐 (P-cresol sulfate, PCS) 和三甲胺氧化物 (trimethylamine oxide, TMAO) 的水平升高<sup>[9]</sup>。而高水平的 PCS、IS 和 TMAO 与肾功能受损程度密切相关<sup>[10-12]</sup>。拟杆菌与血糖浓度呈显著正相关<sup>[13]</sup>, 这与本研究结果一致, 可能通过内毒素诱导的炎症反应促进 2 型糖尿病<sup>[14]</sup>。土单胞菌属与 eGFR 负相关, 这可能与拟杆菌门产生尿毒症毒素增多, 通过肠腔进入循环, 引起机体炎症反应和氧化应激有关<sup>[15]</sup>。颤螺旋菌属和 g\_Fournierella 属均属于厚壁菌门下的梭状芽孢杆菌纲, 梭状芽孢杆菌既能产生 SCFA 并增加抗炎 Treg 的活性<sup>[16]</sup>, 起保护作用, 但也能产生尿毒症毒素<sup>[17]</sup>, 加重炎症反应和氧化应激, 本研究中梭状芽孢杆菌中的 Fournierella 属, 与糖化血红蛋白显著负相关, 颤螺旋菌与尿酸显著负相关, 可能在疾病发展过程中起保护作用, 但是相关机制尚需要进一步探讨。

在湿证不同亚型中, 多种差异血清代谢物与菌群相关, 提示不同中医证型中, 肠道菌群组成改变, 可引起多种代谢通路上的代谢物表达异常, 这可能与

DKD 的进展密切相关。本研究中, DKD 湿证中, 与肠道菌群相关的差异代谢物主要富集在苯丙氨酸代谢通路上, 既往研究中, 苯丙氨酸代谢在糖尿病患者<sup>[18]</sup>和 2 型糖尿病动物模型<sup>[19]</sup>中代谢异常, 且研究表明苯丙氨酸代谢途径是与 DKD 疾病进展最相关的代谢途径<sup>[20]</sup>。有研究报告了慢性肾脏疾病患者肠道微生物群与苯丙氨酸代谢关系密切<sup>[21-23]</sup>, 而中医湿证是促进 DKD 疾病进展的重要证候因素, 因此推测中医湿证可能是通过影响肠道菌群, 调控苯丙氨酸代谢通路, 加重了糖尿病肾病的进展。

本研究基于 16S rRNA 高通量测序和非靶向代谢组学, 首次探讨 DKD 中医湿证亚型的差异肠道菌群、代谢轮廓及代谢通路, 为 DKD 中医湿证的潜在生物标志物研究和诊治提供依据。本研究的局限主要有以下几个方面: 本研究是一项回顾性研究且部分患者未行肾穿刺活检术, 并缺乏药物、饮食和肾脏病理分级的记录, 上诉因素可能对本研究的结果造成影响。其次, 尚需在未来的研究中扩大样本量。最后, 尚需对菌群结果进行宏基因组的深入分析。

利益冲突: 无。

## 参 考 文 献

- [1] 谢绍锋, 黄莉吉, 余江毅. 湿热瘀血与糖尿病肾病蛋白尿关系探讨 [J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28 (6): 506-508.
- [2] 程成, 张军峰, 史丽云. 湿热证与肠道微生态 [J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34 (2): 210-213.
- [3] 宋佳培, 丛梦雨, 巫柳岑, 等. 16S rRNA 测序探讨岭南湿证人群肠道菌群结构变化 [J]. 中医药学报, 2020, 48 (3): 21-24.
- [4] 景彩, 肖宁, 张昕, 等. 基于 16S rDNA 测序技术研究痰湿质受试者肠道菌群的组成及丰度 [J]. 中医杂志, 2019, 60 (23): 2045-2049.
- [5] 杨德才, 徐玮斐, 顾巍杰, 等. 中医湿证的代谢组学研究述评 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38 (9): 1148-1151.
- [6] 中华医学会内分泌学分会. 中国成人糖尿病肾脏病临床诊断的专家共识 [J]. 糖尿病天地 (临床), 2016, 10 (6): 243-253.
- [7] National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification [J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39 (2 Suppl 1): S1-S266.

- [ 8 ] 赵进喜, 王世东, 李靖, 等. 糖尿病肾脏病分期辨证规范与疗效评定方案及其研究 [J]. 世界中医药, 2017, 12 ( 1 ): 1-4.
- [ 9 ] Kikuchi M, Ueno M, Itoh Y, et al. Uremic toxin-producing gut microbiota in rats with chronic kidney disease [J]. *Nephron*, 2017, 135 ( 1 ): 51-60.
- [ 10 ] Kikuchi K, Saigusa D, Kanemitsu Y, et al. Gut microbiome-derived phenyl sulfate contributes to albuminuria in diabetic kidney disease [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 ( 1 ): 1835.
- [ 11 ] van der Kloet FM, Tempels FW, Ismail N, et al. Discovery of early-stage biomarkers for diabetic kidney disease using ms-based metabolomics ( FinnDiane study ) [J]. *Metabolomics*, 2012, 8 ( 1 ): 109-119.
- [ 12 ] Niewczas MA, Sirich TL, Mathew AV, et al. Uremic solutes and risk of end-stage renal disease in type 2 diabetes: metabolomic study [J]. *Kidney Int*, 2014, 85 ( 5 ): 1214-1224.
- [ 13 ] Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults [J]. *PLoS One*, 2010, 5 ( 2 ): e9085.
- [ 14 ] Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, et al. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 4828.
- [ 15 ] 张青, 刘旭生, 张蕾. 糖尿病肾脏病患者肠道菌群紊乱的发生发展机制 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2020, 22 ( 9 ): 3235-3240.
- [ 16 ] Atarashi K, Tanoue T, Shima T, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species [J]. *Science*, 2011, 331 ( 6015 ): 337-341.
- [ 17 ] Wong J, Piceno YM, DeSantis TZ, et al. Expansion of urease- and uricase-containing, indole- and p-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD [J]. *Am J Nephrol*, 2014, 39 ( 3 ): 230-237.
- [ 18 ] Liu Y, Chen X, Liu Y, et al. Metabolomic study of the protective effect of Gandi capsule for diabetic nephropathy [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 314: 108815.
- [ 19 ] Pan L, Li Z, Wang Y, et al. Network pharmacology and metabolomics study on the intervention of traditional Chinese medicine Huanglian Decoction in rats with type 2 diabetes mellitus [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 258: 112842.
- [ 20 ] Zhang Q, Zhang Y, Zeng L, et al. The role of gut microbiota and microbiota-related serum metabolites in the progression of diabetic kidney disease [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 757508.
- [ 21 ] Hu X, Ouyang S, Xie Y, et al. Characterizing the gut microbiota in patients with chronic kidney disease [J]. *Postgrad Med*, 2020, 132 ( 6 ): 495-505.
- [ 22 ] Ren Z, Fan Y, Li A, et al. Alterations of the human gut microbiome in chronic kidney disease [J]. *Adv Sci ( Weinh )*, 2020, 7 ( 20 ): 2001936.
- [ 23 ] Wu IW, Lin CY, Chang LC, et al. Gut microbiota as diagnostic tools for mirroring disease progression and circulating nephrotoxin levels in chronic kidney disease: discovery and validation study [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16 ( 3 ): 420-434.

( 收稿: 2021-12-27 在线: 2023-07-03 )

责任编辑: 汤 静