DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0494　　**文章编号** 1671-8852(2025)02-0166-10

参附注射液对脓毒症急性呼吸窘迫综合征患者肠肺菌群的影响

左小淑[1] 江贵军[1] 张 迪[1] 李 光[1] 詹丽英[1] 邹捍东[1] 夏文芳[1] 高文蔚[1] 宋振举[2] 张召才[3] 王 璐[1]

[1]武汉大学人民医院重症医学科 湖北 武汉 430060；

[2]复旦大学附属中山医院急诊科/复旦大学应急救援与急危重症研究所 上海 200032；

[3]浙江大学医学院附属第二医院重症医学科/浙江省急危重症临床医学研究中心 浙江 杭州 310009

摘要 目的：探讨参附注射液(SF)对脓毒症急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者肠、肺菌群的影响。方法：纳入2022年1—12月武汉大学人民医院22例脓毒症ARDS患者，随机分为常规治疗组(Control组)和SF治疗组(SF组)，收集两组患者的肺泡灌洗液(BALF)及粪便，通过16S rRNA及非靶向代谢组学技术，分析SF干预前、后肠道及肺部微生物菌群多样性及代谢产物的改变，寻找差异代谢产物及代谢通路。结果：(1)SF组BALF微生物Alpha多样性较Control组显著改善、Shannon指数变大($P<0.05$)，提示微生物物种丰富度增加；两组粪便Shannon指数和Beta多样性无显著差异。BALF微生物物种有29.97%来源于粪便，出现了粪便中常见的拟杆菌属。(2)液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)分析显示粪便及BALF在SF处理后，色氨酸代谢通路发生显著变化($P<0.05$)。粪便KEGG富集分析发现，色氨酸代谢和5-羟基吲哚乙酸盐均被下调($P<0.05$)。结论：对于脓毒症ARDS患者，SF可丰富其BALF及粪便中菌群多样性，并参与色氨酸代谢途径，本研究为后续深入研究SF参与ARDS肠肺轴的作用机制提供一定参考和依据。

关键词 脓毒症；急性呼吸窘迫综合征；肠道菌群；肺泡灌洗液；代谢组学

中图分类号 R453.9

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)：

Effect of *Shenfu* injection on intestinal and lung flora in patients with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome

ZUO Xiaoshu[1], JIANG Guijun[1], ZHANG Di[1], LI Guang[1], ZHAN Liying[1], ZOU Handong[1], XIA Wenfang[1], GAO Wenwei[1], SONG Zhenju[2], ZHANG Zhaocai[3], WANG Lu[1]

[1]Dept. of Critical Care Medicine, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China;

[2]Dept. of Emergency, Zhongshan Hospital Fudan University & Institute of Emergency Rescue and Critical Care Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China;

[3]Dept. of Critical Care Medicine, The Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine & Zhejiang Province Clinical Research Center for Emergency and Critical Care Medicine, Hangzhou 310009, Zhejiang, China

Abstract

Objective: To explore the effect of *Shenfu* injection(SF) on intestinal and lung flora in patients

课题来源：国家重点研发计划(编号：2021YFC2501800)；国家自然科学基金面上项目(编号：82272226)；武汉市知识创新专项项目(编号：2023020201010165)；武汉大学人民医院交叉创新人才项目(编号：JCRCZN-2022-017)；吴阶平医学基金会重症医学润泽基金

作者简介：左小淑，女，1984—，医学博士，副主任医师，主要从事脓毒症ARDS临床及分子机制研究，E-mail:zuoxiaoshu2016@whu.edu.cn

通信作者：王璐，女，1987—，医学博士，副主任医师，主要从事脓毒症心肌病临床及基础研究，E-mail:wanglu@whu.edu.cn

with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS). **Methods:** From January to December 2022, twenty-two patients with sepsis-induced ARDS were enrolled at Renmin Hospital of Wuhan University. The patients were randomly divided into the conventional treatment group (control group) and the *Shenfu* injection treatment group (SF group). Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and fecal samples were collected from both groups. 16S rRNA and non-targeted metabolomics technologies were used to analyze the changes in microbial flora diversity and metabolites in the intestine and lungs before and after SF intervention, and to identify differential metabolites and metabolic pathways. **Results:** (1) The BALF microbial Alpha diversity of the SF group was significantly improved as compared with that of the control group, and the Shannon index became larger ($P<0.05$), indicating that the richness of microbial species increased; there was no significant difference in fecal Shannon index and Beta diversity between the two groups. 29.97% of BALF microbial species originated from feces, and *Bacteroidetes*, which is common in feces, appeared in BALF. (2) LC-MS/MS showed that the tryptophan metabolism pathway in feces and BALF changed significantly after SF treatment ($P<0.05$). Fecal KEGG enrichment analysis found that the expression of metabolite tryptophan and 5-hydroxyindoleacetate were both down-regulated ($P<0.05$). **Conclusion:** *Shenfu* Injection has a tendency to enrich the diversity of BALF and fecal flora in patients with sepsis-induced ARDS, and participates in the tryptophan metabolic pathway, which provides a certain reference and basis for subsequent in-depth research on the mechanism of *Shenfu* Injection in the gut-lung axis of ARDS.

Key Words　Sepsis; Acute Respiratory Distress Syndrome; Intestinal Flora; Broncho-Alveolar Lavage Fluid; Metabolomics

脓毒症(sepsis)是机体对于感染的反应失调所导致的一种威胁生命的器官功能障碍综合征。全球每年约有数百万脓毒症患者，死亡率高达16.7%～33.3%。在没有特异性治疗的情况下，脓毒症导致的急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome，ARDS)是患者死亡的主要原因[1]，较高的发病率和病死率导致家庭和社会面临沉重的经济负担[2]。

随着对脓毒症基础研究的不断深入以及16S rRNA、高通量测序等技术的发展，许多实验和临床观察表明肠道微生物的多样性、动态性与脓毒症的发病机制有关[3]。Kullberg等[4]发现，在脓毒症期间肠道微生物的组成严重失衡，包括种群多样性急剧减少、共生菌消失、潜在病原菌(如肠球菌、葡萄球菌)过度生长。失衡的肠道微生物群参与调节炎症反应并增加肠道屏障通透性，使致病菌易位到体循环和远处器官。这些肠道微生物群的破坏与脓毒症发生的易感性以及不良预后的风险增加有关[4]。Dickson等[5]报告在脓毒症小鼠模型和ARDS患者中，肺部微生物组中富含肠道相关菌群。在ARDS患者的支气管肺泡灌洗液中检出肠道特异性细菌(如拟杆菌属)的富集，并与全身炎症反应的严重程度相关。但肠道微生物在脓毒症ARDS患者中的确切作用机制尚不清楚，目前临床上也没有针对脓毒症ARDS患者肠道菌群的特异性治疗。

参附注射液(*Shenfu* injection，SF)在临床上能够改善血流动力学，减少缺血再灌注损伤，减轻炎症反应，可用于脓毒性休克的治疗[6]。已有研究发现，SF可改善因心衰导致的大鼠肠道细菌结构紊乱，具有抑制致病菌生长、促进有益菌生长的作用[7]。近期研究还发现，肠道微生物介导的短链脂肪酸代谢途径，通过多种机制抑制炎症反应，在改善心衰发生发展方面起到重要作用[8-9]。然而，SF对脓毒症ARDS患者肠道及肺部菌群结构的调节作用尚未见报道。

本研究拟以肺部及肠道菌群为切入点，基于粪便微生物组学(16S rRNA)、非靶向代谢组学等检测手段，探讨SF对脓毒症ARDS患者的肺肠菌群构成的影响，并进一步寻找目标菌群及差异代谢产物，为研究SF治疗脓毒症ARDS患者的潜在作用机制提供参考。

1　资料与方法

1.1　纳入和排除标准　根据纳入、排除标准纳入研究病例，该临床研究通过了武汉大学人民医院伦

理审批(编号:WDRY2022-K105)。

1.1.1 脓毒症组纳入标准 ①年龄≥18岁且≤80岁;②符合Sepsis 3.0定义及诊断标准;③签署知情同意书[10]。

1.1.2 ARDS诊断标准 ①急性起病;②氧合指数(PaO_2/FiO_2)≤200 mmHg(不考虑呼吸末正压PEEP水平);③正位X线胸片显示双肺均有斑片状阴影;④肺动脉楔压≤18 mmHg,或无左心房压力增高的临床依据[11]。

1.1.3 排除标准 ①年龄<18岁或>80岁;②哺乳期或怀孕期;③中性粒细胞减少(外周血中性粒细胞绝对值低于2.0×10^9/L);④近1个月使用糖皮质激素及免疫抑制剂;⑤由于肺挫裂伤、误吸胃内容物、淹溺、烟雾吸入等因素导致的ARDS;⑥由于腹部外伤、胃肠穿孔、肠破裂等导致的ARDS;⑦不能签署知情同意书。

1.2 分组及给药 将符合纳排标准的脓毒症ARDS患者按照随机数字表法随机分为常规治疗组(Control组)和SF治疗组(SF组)。Control组按照脓毒症及ARDS指南[10]给予常规治疗,SF组在脓毒症常规治疗基础上加用SF 100 mL,qd治疗,连续5 d。

1.3 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)的获取 ①使用标准技术进行BALF:在灌洗肺段注射2%利多卡因1~2 mL进行局部麻醉,将160 mL无菌等渗盐水以每次20 mL/min注入支气管段或压断开口。②用合适的负压(一般低于100 mmHg)吸取肺泡灌洗液,并分装于离心管中。③离心分离细胞(11 g,10 min),留取上清,无细胞培养上清在-80 ℃冷冻,用于后续检测。④无细胞培养上清随后离心(22 500 g,30 min),所得颗粒用于DNA分离。

1.4 粪便样本的获取 末次给药后收集粪便,放入1.5 mL EP无菌试管,-80 ℃冰箱中保存备用。

1.5 16S rRNA多样性材料与方法 ①获取BALF及粪便样本;②分别进行DNA提取和PCR扩增;③2%琼脂糖凝胶电泳检测,纯化PCR产物;④建立文库,采用上海美吉生物医药科技有限公司提供的Illumina MiSeq PE300平台/NovaSeq PE250平台系统进行测序;⑤使用软件UPARSE 7.1,按照97%的相似度对序列进行OTU聚类并剔除嵌合体。⑥利用RDP classifier对每条序列进行物种分类注释,比对16S rRNA数据库,比对阈值是70%。⑥统计分析:分析脓毒症ARDS患者肠道及肺部主要细菌组成(乳酸杆菌、双歧杆菌、肠球菌、大肠杆菌、普拉梭菌等),包括菌落丰度OTUS,反映菌落多样性的Shannon指数和Simpson指数(Shannon指数越大,Simpson指数越小,代表物种越丰富),肺、肠菌群相对丰度(relative abundance)等。

1.6 液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)分析 ①采用赛默飞公司的超高效液相色谱串联傅里叶变换质谱UHPLC-Q Exactive HF-X系统对样本进行LC-MS/MS分析(上海美吉生物医药科技有限公司)。②物质鉴定及分析:上机完成之后,LC-MS原始数据导入代谢组学处理软件进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐,最终得到一个保留时间、质荷比和峰强度的数据矩阵,同时将MS和MS/MS信息与代谢公共数据库HMDB(http://www.hmdb.ca/)和Metlin(https://metlin.scripps.edu/)以及美吉自建库进行匹配,得到代谢物信息。③将搜库后的数据矩阵上传到美吉云平台(cloud.majorbio.com)进行分析。首先对数据矩阵进行预处理,得到最终用于后续分析的数据矩阵。其次采用R语言中的ropls包(Version 1.6.2)对预处理后的数据矩阵进行主成分分析(PCA)和正交最小偏二乘判别分析(OPLS-DA)。显著差异代谢物的选择基于OPLS-DA模型得到的变量权重值(VIP)和Student's t检验P值来确定,VIP>1,P<0.05的代谢物为显著差异代谢物。差异代谢物通过KEGG数据库(https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html)进行代谢通路注释,获得差异代谢物参与的通路。

1.7 统计学方法 通过Prism 8.0软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用两组独立样本t检验进行分析。P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 主要临床资料比较 共入组22例脓毒症ARDS患者,病因诊断主要包括重症肺炎、重症胰腺炎(severe acute pancreatitis,SAP)、糖尿病酮症酸中毒(diabetic ketoacidosis,DKA)、肝脓肿、血流感染、泌尿系感染、颅内感染等。包括Control组10例患者,其中男性5例,年龄(66.1±3.8)岁;SF组12例患者,其中男性6例,年龄(61.6±4.2)岁。两组患者在年龄、性别、入住ICU时间、入院APACHE Ⅱ评分方面比较差异无统计学意义(P>0.05)。Control组中接受机械通气患者5例、合并多器官功能障

碍综合征（multiple organ dysfunction syndrome，MODS）4 例，SF 组中共 7 例行机械通气治疗、合并 MODS 4 例，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。见表 1。

表 1　两组患者的临床资料比较[$\bar{x}\pm s$；例（%）]

项目	SF 组（$n=12$）	Control 组（$n=10$）	P
年龄（岁）	61.6±4.2	66.1±3.8	0.45
性别（男）	6（50.0）	5（50.0）	>0.99
入住 ICU 时间（d）	5.5±0.6	6.0±0.8	0.62
入院 APACHE Ⅱ（分）	13.4±0.9	13.6±0.9	0.89
机械通气	7（58.3）	5（50.0）	0.71
MODS	4（33.3）	4（40.0）	0.76

2.2　粪便及 BALF 微生物组学检测结果

2.2.1　*粪便及 BALF 样本的多样性数据分析*　通过对来自脓毒症 ARDS 患者使用 SF 前后粪便及下呼吸道 BALF 样本的微生物组测序分析，共完成 7 份粪便样本及 7 份 BALF 样本的多样性数据分析，样本基础结果统计见表 2。粪便及 BALF 标本门水平构成比排名前 5 名（TOP5）分类中，有 4 类物种重叠，分别是厚壁菌门（Firmicutes）、变形菌门（Proteobacteria）、放线菌门（Actinobacteriota）、拟杆菌门（Bacteroidota）。在两类标本的属水平分类中，均包含了克雷伯菌（*Klebsiella*）。

表 2　粪便及 BALF 样本的微生物多样性检测基础结果

检测项目	粪便	BALF
优化序列	380 109	357 100
bases	160 802 666	152 551 186
平均序列长度（bp）	423	427
物种注释结果	Domain: 1, Kingdom: 1, Phylum: 9, Class: 13, Order: 29, Family: 50, Genus: 104, Species: 157, OTU: 164	Domain: 1, Kingdom: 1, Phylum: 22, Class: 38, Order: 85, Family: 138, Genus: 250, Species: 369, OTU: 396
门水平 TOP5 物种	厚壁菌门、变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、梭杆菌门	变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门、螺旋体
属水平 TOP5 物种	肠球菌、克雷伯菌、双歧杆菌、厌氧细菌属、副拟杆菌属菌	克雷伯菌、伯克霍尔德菌、假单胞菌、巨型球菌、不动杆菌

Domain：域；Kingdom：界；Phylum：门；Class：纲；Order：目；Family：科；Genus：属；Species：种；OTU：Operational taxonomic units，操作分类单元，一般是在微生物多样性分析中，对序列以 97% 的相似度进行 Cluster 聚类

2.2.2　*两组样本的微生物多样性比较*　与用药前相比，SF 用药后脓毒症 ARDS 患者 BALF Shannon 指数较对照组有明显改善（图 1B，$P<0.05$），提示 SF 治疗可促进微生物物种丰富度增加；而 7 份粪便标本的微生物多样性指数组间比较，Shannon 指数差异无统计学意义（图 1A，$P>0.05$）。两组样本的微生物组 Beta 多样性分析（PCoA 分析）差异无统计学意义（图 1C、1D，$P>0.05$）。

2.2.3　*脓毒症 ARDS 患者粪便及 BALF 微生物组物种组成分析*　见图 2，从两组样本的群落组成比较，SF 处理组的物种组成更丰富，特别是 BALF 样本（图 2B）。且物种构成分析发现，BALF 中出现了粪便中常见的拟杆菌属（图 2C、2D）。

2.2.4　*物种差异分析*　组间差异分析主要用于寻找具有显著差异的微生物，这些差异的微生物是影响疾病发生发展、治疗及预后的潜在关键物种，有利于寻找健康组和疾病组的微生物生物标志物，帮助构建疾病诊断和预后评估模型。结果显示，两组粪便样本之间并无显著差异。BALF 样本在 SF 处理组与对照组之间，物种 OTU5、110、50、144、87、45、91 之间均存在显著差异（图 3，$P<0.05$）。

2.2.5　*肠肺菌群相关性分析*　通过 BALF 及粪便样本的相关性分析发现，BALF 组中的微生物物种有 29.97% 来源于粪便组。

2.3　粪便及 BALF 非靶向代谢组学结果

2.3.1　*粪便及 BALF 样本非靶向代谢组学检测*　分别对 12 份粪便及 BALF 样本进行 LC-MS/MS 分析，经过数据预处理后，粪便及 BALF 样本非靶向代谢组学初步检测结果如下：SF 处理后粪便组上调的差异物质 24 个，BALF 组 54 个；SF 处理后粪便组下调的差异物质 9 个，BALF 组 59 个；KEGG、HMDB 注释到的代谢物粪便组分别为 916、1 926，BALF 组分别为 958、2 142；KEGG 通路注释到的代谢物（有 map 号）粪便组 414 个，BALF 组 444 个。

2.3.2　*两组样本差异代谢物分析*　粪便组 SF 处理后代谢物表达明显上调的差异物质有 24 个，表达下调的差异物质有 9 个。BALF 组 SF 处理后代谢物表达明显上调的差异物质有 54 个，下调的有 59 个（图 4，$P<0.05$）。

2.3.3　*代谢集分析*　12 份粪便和 12 份 BALF 样本两组比较分析代谢物聚类热图（图 5A、5B），并对丰度高的前 30 个代谢物创建代谢集，进行代谢集分析（图 5C、5D）。发现粪便样本中，二羟基相酸、天冬酰胺苯丙氨酸、苯乙酰羟肟酰谷胱甘肽、异鼠李素 3-新

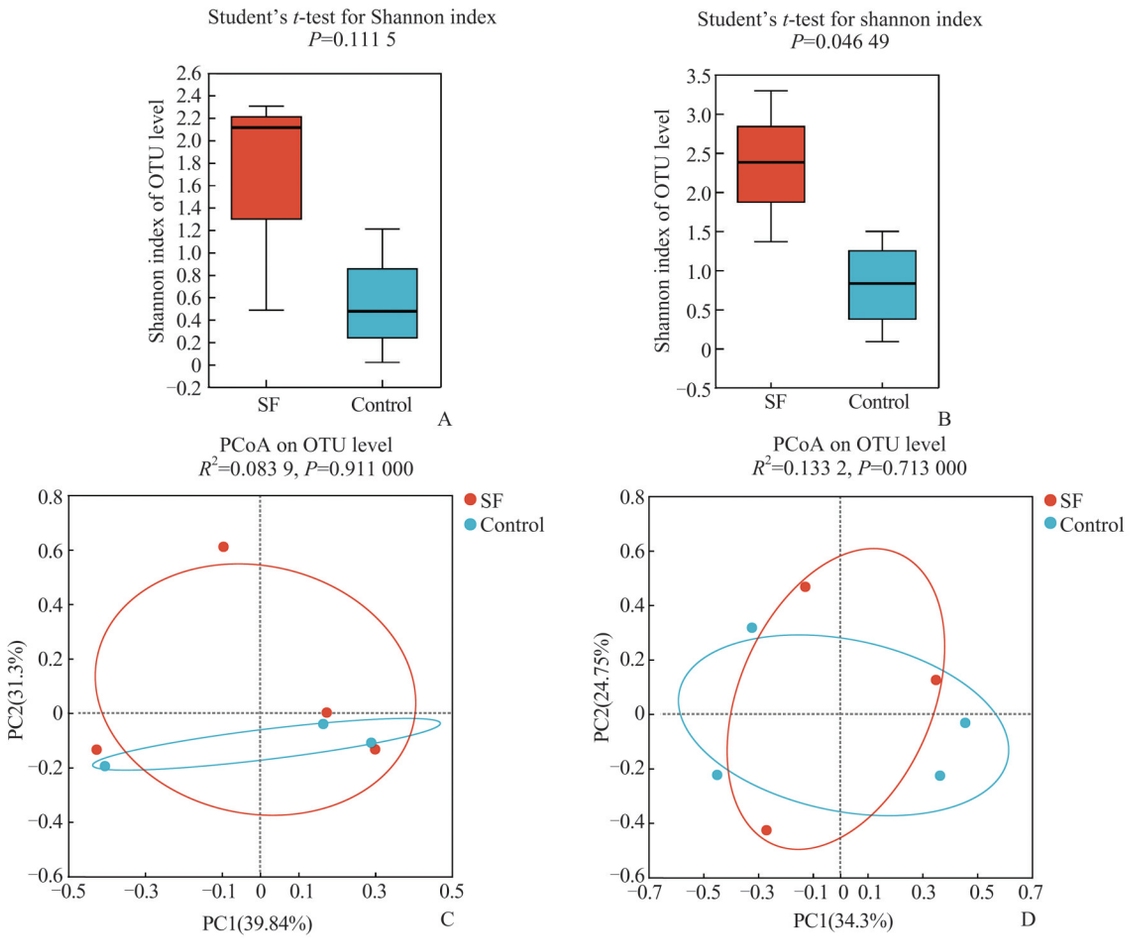


图1 脓毒症ARDS患者粪便及BALF微生物组多样性分析

A. 粪便微生物Alpha多样性分析结果(Shannon指数)(SF组包括:A33843、A26237_2、A41121、A40742,常规组包括:A26237_1、A40122、A51355);B. BALF微生物Alpha多样性分析结果(SF组包括:A35842、A26237_2、A40742;常规组包括:A26237_1、A36760、A42659、A53608);C、D. 粪便及BALF样本PCoA分析:*X*轴和*Y*轴表示两个选定的主坐标轴,百分比表示主坐标轴对样本组成差异的解释度值;不同颜色或形状的点代表不同分组的样本,两样本点越接近,表明两样本物种组成越相似

橙皮苷、反式-S-(1-丙烯基)-半胱氨酸二硫化物、谷氨酰谷氨酸、5-羟基吲哚乙酸盐等在SF组表达上调;BALF样本中,多种氨基酸(谷氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、赖氨酸)、溶菌酶、*L*-犬尿氨酸、大蒜素A、3-甲基黄嘌呤等代谢物表达有差异,SF组表达下调。

2.3.4 KEGG通路富集分析 将本项目鉴定到的差异代谢物进行KEGG通路富集分析(图6)。SF处理后的粪便样本差异富集通路包括甘油磷脂代谢、自噬、致病性大肠杆菌感染、糖基磷脂酰肌醇(GPI)-锚生物合成、色氨酸代谢、酪氨酸代谢、5-羟色胺能突触等(图6A)。BALF标本富集通路差异丰度得分中,色氨酸代谢、昼夜节律调节、长期抑郁、脂肪细胞脂肪分解的调节、胆汁分泌、催产素信号通路、血小板活化、色氨酸代谢、Th1和Th2细胞的分化、Th17细胞的分化等在SF处理后被富集(图6B)。

3 讨论

3.1 微生物多样性分析 本研究通过16S rRNA高通量测序技术,对脓毒症ARDS患者使用SF前后粪便及下呼吸道BALF标本的微生物多样性数据进行分析,结果显示,粪便标本及BALF标本门水平TOP5分类中,均包含厚壁菌门、变形菌门、放线菌门和拟杆菌门(表1)。这些菌种在粪便和BALF标本的微生物群落中占据重要地位,在维持人体内稳定的微生物平衡、促进消化代谢、调节免疫功能等方面发挥重要作用。如果这些细菌群落失衡,可能会导致多种疾病的发生。在这两类标本的属水平分类中,均包含了克雷伯菌,该菌是一种常见的革兰阴性杆菌,可以在医院环境中通过不同的途径引起院内感染,特别是在免疫力低下的患者中,如糖尿病患者、接受免疫抑制治疗的患者等。

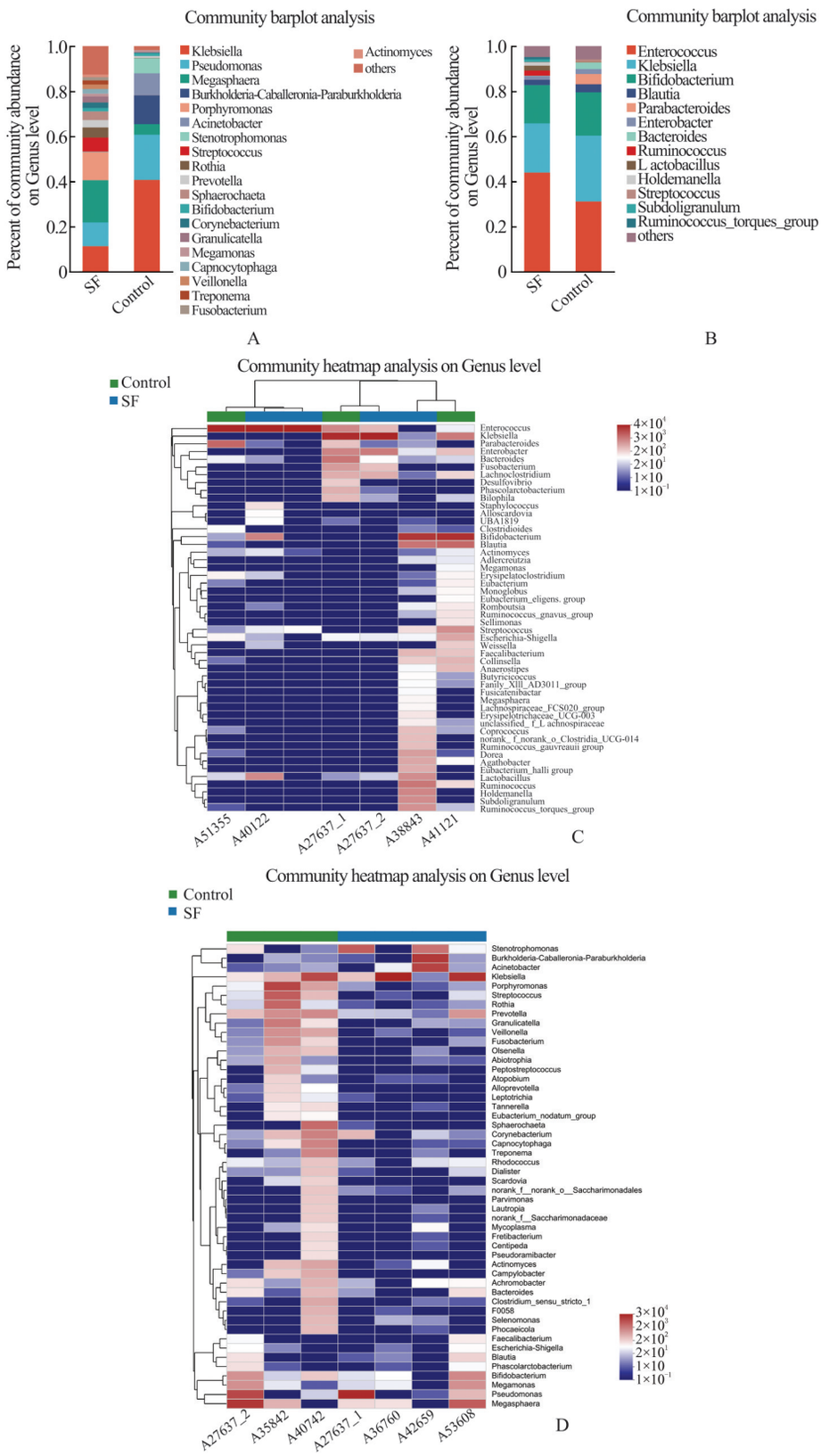


图 2　脓毒症 ARDS 患者粪便及 BALF 样本物种组成分析

A、B. 分别为 7 份粪便及 BALF 样本的群落组成条形图。不同色柱代表不同的物种，色柱的长短代表该物种所占比例的大小；C、D. 分别为粪便和 BALF 样本群落组成热图。横坐标为样本名，纵坐标为物种名，通过色块颜色梯度来展示样本中不同物种的丰度变化情况，图中右侧为颜色梯度代表的数值；样本来源及分组同图 1

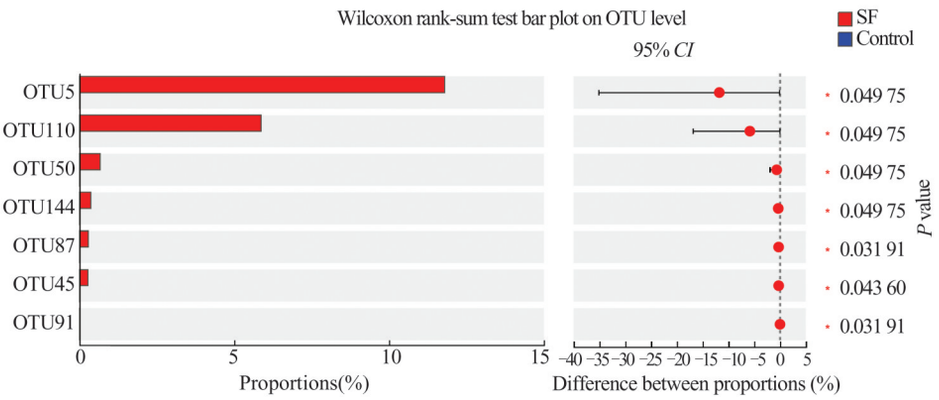


图3 脓毒症ARDS患者BALF样本物种间差异分析

*X*轴代表不同的分组,不同颜色的箱子表示不同的分组,*Y*轴代表某一物种在不同分组中的平均相对丰度。对照组的丰度太低,所以图中没有显示蓝色

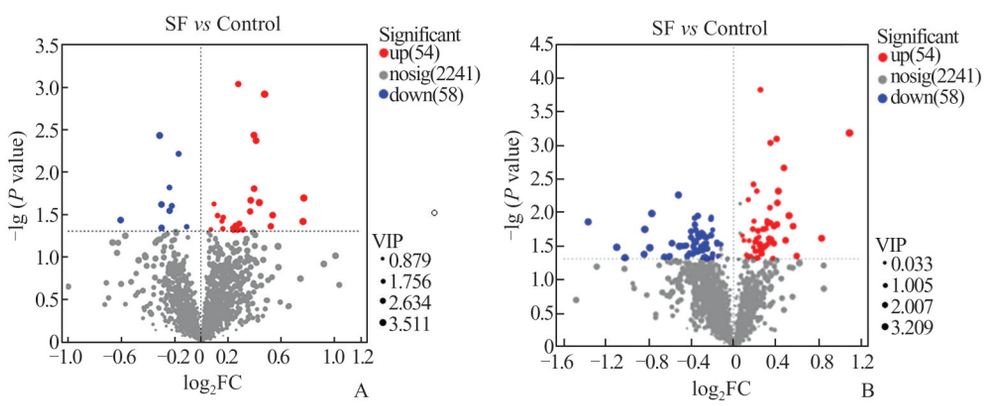


图4 脓毒症ARDS患者粪便与BALF样本差异代谢物分析

A. 12个粪便样本两组代谢物差异火山图,SF组包括:LYP、CJX、A41121、A38843、A27637_2、A40742;Control组包括:JNZ、CJH1、A42659、A40122、A51355、A26237_1;B. 12份BALF样本代谢物差异火山图,SF组包括:CXY、YZY、DZQ、JN、WQP、A35842;Control组包括:PQB、ZB、A26237_1、A53608、A42659、A50868。横坐标为代谢物在两组间表达差异的倍数变化值(FC),即$\log_2$FC,纵坐标为代谢物表达量变化差异的统计学检验值,即$-\lg(P\ \text{value})$值。图中每个点代表一个特定的代谢物,点的大小表示VIP值。红色点表示显著上调的代谢物,蓝色点表示显著下调的代谢物,灰色点为非显著差异代谢物

目前ARDS的发病率约为10%,病死率约为30%~40%[12]。近年来由于肠道微生物群被发现与肺部存在串扰,"肠-肺"轴的概念被提出[13],肠道微生物能通过其衍生物及代谢产物改变肺部免疫反应和气道稳态,在ARDS中肠道菌群起到重要的作用。ARDS改变肠道菌群的组成[14]。同时,ARDS还会改变肺部微生物的组成,ARDS患者肺内伴有肠道菌群的异常分布。Dickson等[5]的研究显示,ARDS患者肺部微生物组中富含肠道相关菌群,推测该现象可能与肺内肠道菌群的异常复制和移位有关。但目前国内外有关ARDS患者肠道菌群变化的报道较少,仍需进一步探索。本研究从SF干预肠肺微生物组的角度出发,进行了系列研究。从用药结果可见,SF用药后BALF的多样性与用药前相比,脓毒症ARDS患者BALF微生物Shannon指数较对照组差异有显著性($P<0.05$),提示SF处理后微生物丰富度增加;而粪便标本的Shannon指数以及两组样本的PCoA分析均无显著差异(图1),可能与样本量不足有关,拟扩大样本量进一步后续研究。两组样本的物种构成分析发现,BALF中出现了粪便中常见的拟杆菌属(图2);通过BALF及粪便样本的相关性分析发现,BALF组中的微生物物种有29.97%来源于粪便组。这也印证了部分研究结果,即脓毒症ARDS患者中存在肠-肺轴互作,部分肠道菌群可以移位到肺部[5]。

3.2 非靶向代谢分析 本研究通过对粪便样本及BALF样本的非靶向代谢组分析,寻找两组样本差异代谢物,粪便组及BALF组在SF处理后出现了部分代谢产物表达明显上调或下调(图4),进一步对这些的差异物质进行分析,通过对丰度高的前30

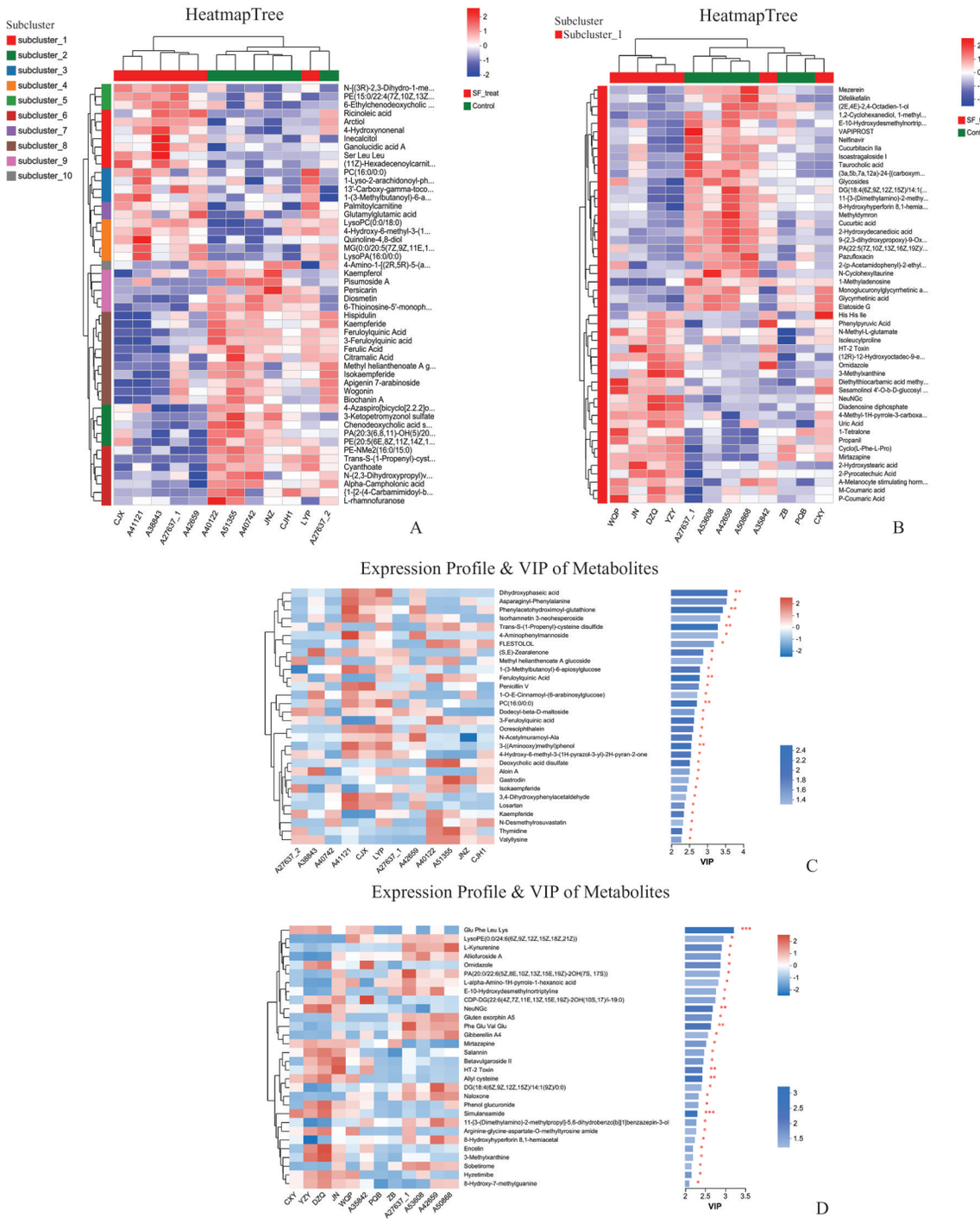


图 5　脓毒症 ARDS 患者粪便与 BALF 样本代谢物聚类分析

A、B. 分别为粪便和BALF样本两组代谢物聚类分析热图，样本名称及分组同图 4。左侧为代谢物聚类的树状图，右侧为代谢物的名称，两个代谢物分支离得越近，说明它们的表达量越接近；上方为样本聚类的树状图，下方为样本的名称，两个样本分支离得越近，说明这两个样本代谢物表达量变化趋势越接近。C、D. 分别为粪便与BALF样本代谢物VIP值分析结果，左侧为代谢物聚类树状图，分支越近，说明样本内所有代谢物的表达模式越接近；每列表示一个样本，下方为样本名称；每行表示一个代谢物，颜色表示该代谢物在该组样本中相对表达量的大小。右侧为代谢物VIP条形图，条形长度表示该代谢物对两组差异的贡献值，值越大表示该代谢物在两组间差异越大。条形颜色表示代谢物在两组样本中差异显著性，即 P 值，P 越小，$-\lg(P\ \text{value})$ 越大，颜色越深。$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

个代谢物进行代谢集分析（图 5），寻找可能的目标代谢物。发现粪便样本中，天冬酰胺苯丙氨酸、半胱氨酸二硫化物、谷氨酰谷氨酸等氨基酸及 5-羟基吲哚乙酸盐均为差异代谢物；BALF 样本中，多种氨基酸如谷氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、赖氨酸等表达有差异。对差异代谢集建立 KEGG 通路差异丰度

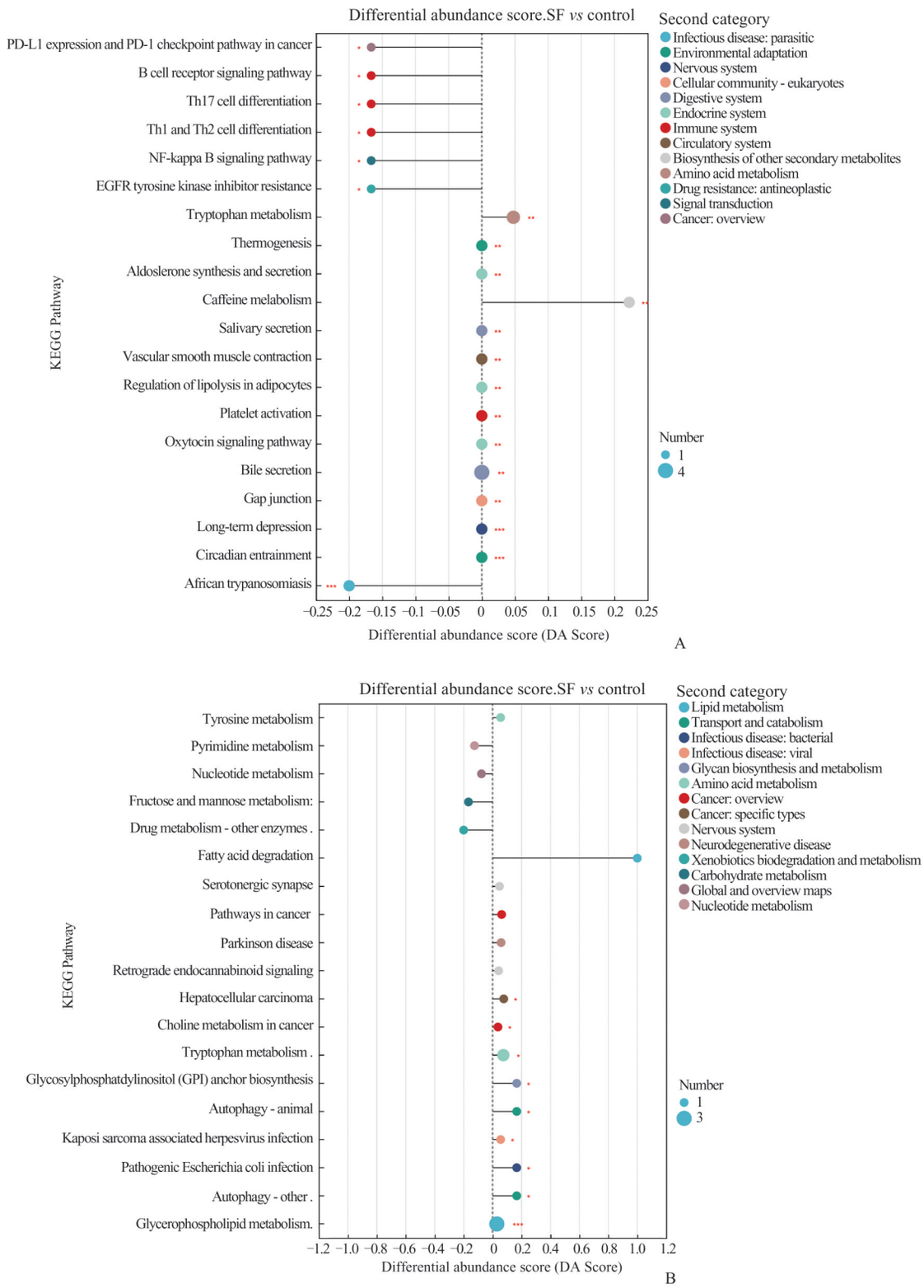


图 6 脓毒症 ARDS 患者粪便与 BALF 样本代谢物 KEGG 通路分析

A、B 分别为粪便和 BALF 样本代谢物 KEGG 通路差异丰度得分图。样本名称及分组同图 5。图中横坐标表示差异丰度得分(DA Score),纵坐标表示 KEGG 代谢通路名称。DA Score 反映代谢通路所有代谢物的整体变化,得分 1 表示该通路中所有注释到的差异代谢物表达趋势上调,−1 表示该通路中所有注释到的差异代谢物表达趋势下调,线段的长度表示 DA Score 的绝对值。圆点的大小表示该通路中注释到的差异代谢物数量,圆点越大表示该通路中差异代谢物数量越多。圆点分布在中轴右侧且线段越长,表示该通路整体表达情况越倾向于上调;圆点分布在中轴左侧且线段越长,表示该通路整体表达情况越倾向于下调

（图 6），发现 SF 处理后的粪便及 BALF 样本中，色氨酸代谢通路均受到了调控。粪便样本 KEGG 富集中，色氨酸代谢、5-羟色胺能突触通路均涉及到代谢物 5-羟基吲哚乙酸盐，有关肠道菌群代谢物研究发现，肠道乳杆菌衍生物色氨酸代谢产物吲哚-3-乳酸，可以通过正向调节 YAP 和 Nrf2 来关联肠道缺血/再灌注损伤[15]。肠道菌群代谢产物吲哚-3-丙酸可以部分激活芳基烃受体，促进噬菌体吞噬，减轻脓毒性损伤[16]。BALF 样本 KEGG 富集差异丰度得分中，色氨酸代谢途径也被显著富集。同时发现，Th1 和 Th2 细胞的分化、Th17 细胞的分化等免疫细胞均受到了调节。

后续拟进一步寻找可能的目标菌群及代谢产物，为研究 SF 治疗脓毒症 ARDS 患者的潜在作用机制提供参考，进一步探索脓毒症 ARDS 患者肺-肠菌群失衡中发挥关键作用的靶菌群及其关键代谢产物和机制。

参考文献

[1] Sheu C C, Gong M N, Zhai R H, et al. Clinical characteristics and outcomes of sepsis-related *vs* non-sepsis-related ARDS[J]. Chest, 2010, 138(3): 559-567.

[2] Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021[J]. Intensive Care Med, 2021, 47(11): 1181-1247.

[3] Dickson R P. The microbiome and critical illness[J]. Lancet Respir Med, 2016, 4(1): 59-72.

[4] Kullberg R F J, Wiersinga W J, Haak B W. Gut microbiota and sepsis: From pathogenesis to novel treatments [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2021, 37(6): 578-585.

[5] Dickson R P, Singer B H, Newstead M W, et al. Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome[J]. Nat Microbiol, 2016, 1(10): 16113.

[6] Fan K L, Wang J H, Kong L, et al. Effect of Shen-Fu injection on hemodynamics in early volume resuscitation treated septic shock patients[J]. Chin J Integr Med, 2019, 25(1): 59-63.

[7] 赵震宇，胡炎芝，董振华，等 . 参附注射液对阿霉素诱导的心力衰竭大鼠肠道细菌多样性的影响[J]. 中成药，2022，44(7):2334-2340.
Zhao Z Y, Hu Y Z, Dong Z H, et al. Effects of Shenfu injection on the diversity of intestinal bacteria in rats with doxorubicin-induced heart failure[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 44(7): 2334-2340.

[8] Jia Q J, Li H, Zhou H, et al. Role and effective therapeutic target of gut microbiota in heart failure[J]. Cardiovasc Ther, 2019, 2019: 5164298.

[9] Mamic P, Chaikijurajai T, Tang W H W. Gut microbiome — A potential mediator of pathogenesis in heart failure and its comorbidities: State-of-the-art review[J]. J Mol Cell Cardiol, 2021, 152: 105-117.

[10] Levy M M, Evans L E, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update[J]. Intensive Care Med, 2018, 44(6): 925-928.

[11] Ferguson N D, Fan E, Camporota L, et al. The Berlin definition of ARDS: An expanded rationale, justification, and supplementary material[J]. Intensive Care Med, 2012, 38(10): 1573-1582.

[12] Matthay M A, Zemans R L, Zimmerman G A, et al. Acute respiratory distress syndrome[J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 18.

[13] Marsland B J, Trompette A, Gollwitzer E S. The gut-lung axis in respiratory disease[J]. Ann Am Thorac Soc, 2015, 12(Suppl 2): S150-S156.

[14] 徐沿，张卓，蒲浩，等 . ARDS 与肠道菌群的相关性研究进展[J]. 中国中西医结合急救杂志 2022，29(5): 636-640.
Xu Y, Zhang Z, Pu H, et al. Research progress on the correlation between ARDS and intestinal microbiota[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine in Critical Care Medicine, 2022, 29(5): 636-640.

[15] Zhang F L, Chen X W, Wang Y F, et al. Microbiota-derived tryptophan metabolites indole-3-lactic acid is associated with intestinal ischemia/reperfusion injury via positive regulation of YAP and Nrf2[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 264.

[16] Huang Z B, Hu Z, Lu C X, et al. Gut microbiota-derived indole 3-propionic acid partially activates aryl hydrocarbon receptor to promote macrophage phagocytosis and attenuate septic injury[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 1015386.

（2024-07-03 收稿）
编辑　张　峻