动物营养学报 2021,33(8):4342-4352
Chinese Journal of Animal Nutrition

doi:10.3969/j.issn.1006-267x.2021.08.015

巴马香猪回肠、结肠消化特征研究

莫家远　路玉洁*　綦文晶　朱思燃　奉玲丽　高九昱　梁　靓
王　晖　兰干球**　梁　晶**
(广西大学动物科学技术学院,南宁 530004)

摘　要: 本试验旨在研究巴马香猪回肠、结肠的消化特征。采集了 9 头成年巴马香猪母猪回肠和结肠内容物,通过超高压液相色谱-串联质谱技术进行质谱检测。使用 Compound Discover 3.1软件进行代谢物检测,SMICA-P 软件和 SPSS 19.0 软件进行极显著差异代谢物筛选,Metabo-Analyst 5.0、HMDB 和 KEGG 网站进行代谢物性质和代谢途径分析。结果表明:本研究正、负离子模式分别获得了 26 119 和 16 265 个质谱峰,分别匹配了 6 403 和 1 912 种代谢物;无监督主成分分析中模型对 *X* 变量的解释率超过 0.6,且 9 个质量控制样本均集中分布在中心点;监督正交偏最小二乘判别分析中模型对 *Y* 变量的解释率和模型预测能力均超过为 0.93;200 次迭代验证的模型回归直线截距均小于 0.05;共检测到 42 种极显著差异代谢物,其中 10 个极显著差异代谢物与胆汁酸类物质有关,6 个差异代谢物为氨基酸;14 种差异代谢物参与了 19 条代谢途径;胆汁酸类物质在回肠内容物中含量比结肠高 90~20 574 倍,氨基酸类物质含量在回肠内容物中比结肠高 5~21 倍,十二烷二酸和 3-甲基二氧吲哚含量在结肠内容物中比回肠高约 1 000 倍。结果提示,高胆汁酸和高氨基酸吸收效率是回肠的消化特征;高微生物代谢产物是结肠消化特征。

关键词: 巴马香猪;肠道内容物;代谢组学;胆汁酸;氨基酸;微生物
中图分类号:S828　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1006-267X(2021)08-4342-11

巴马香猪由于在解剖学和生理学上与人类有很多共同之处,还具备体型小、容易控制等优势,可以被培育为试验动物用于人类研究[1-5]。食糜在动物不同肠段内吸收的物质并不一致,同时不同肠段内还存在着不同的微生物群落,其丰度也有很大的差异[6-7],这就导致了不同肠段内容物的构成具有很大的差异。因此,猪特别是与人生理状态更相似的广西巴马香猪的肠道内容物的变化引起了畜牧研究者还有医学研究者的关注,理解广西巴马香猪的消化特征不仅利于理解猪的消化特点,而且更有利于理解人的消化特点。目前对动物体内肠道内容物的研究通常是使用 16S RNA 测序或者宏基因组测序等方法,研究其微生物菌群差异和功能[8-10],但是对于肠道内容物本身组成成分的研究还比较缺乏。随着生物技术的发展,各种组学手段层出不穷,代谢组学是继转录组学和蛋白质组学之后的新兴组学技术,用于对生物样品(如血液、尿液、粪便等)中所有小分子代谢物(<1 ku)进行定性和定量分析,代表着机体已经发生过的改变,对研究动物机体的动态变化具有重要意义[11]。Sinha 等[12]同时使用宏基因组、微生物组、转录组和代谢组学技术研究小鼠结肠炎模型发现补充次级胆汁酸会减轻肠道炎症,这也提示我们在研究动物肠道内容物的过程之中不应

收稿日期:2021-01-31
基金项目:国家现代农业产业技术体系(nycytxgxcxtd-15-01);广西创新驱动发展专项(桂科 AA17204029);广西科技重大专项(桂科 AA17292002)
作者简介:莫家远(1995—),男,广东阳春人,博士研究生,从事畜牧学研究。E-mail: 1757355155@qq.com
* **同等贡献作者**
** **通信作者:**兰干球,教授,博士生导师,E-mail: gqlan@gxu.edu.cn;梁　晶,讲师,硕士生导师,E-mail: liangjing@gxu.edu.cn

该只研究肠道内的菌群组成,其内容物的物质组成的研究同样具有很重要的意义。因此,本研究通过采集巴马香猪成年母猪回肠和结肠中段内容物,利用代谢组学方法、无监督主成分(PCA)分析和监督正交偏最小二乘判别(OPLS-DA)分析等方法,探讨巴马香猪回肠和结肠内容物的组成差异,以期筛选、鉴定其差异代谢物及其代谢途径,了解巴马香猪回肠和结肠的消化特征,为更深入理解机体的营养吸收过程和肠道微生物的作用机制提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　试验样品采集

随机屠宰来自于广西壮族自治区巴瑶族自治县巴马原种香猪农牧实业有限公司 9 头 10 月龄巴马香猪母猪,体重为(33.72±2.05) kg,采集其回肠中段和结肠中段内容物,分为回肠组和结肠组,立即放入液氮中冷冻后转移到-80 ℃冰箱保存。

1.2　主要试剂和仪器

色谱级甲醇购自美国默克公司;色谱纯甲酸购自美国西格玛奥德里奇公司;UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪和 Ultimate 3 000超高效液相色谱系统购自美国赛默飞世尔科技公司;高速冷冻离心机购自 Eppendorf 公司。

1.3　试验样品处理

将回肠和结肠内容物放入 1.5 mL 离心管中,加入 3 倍体积的甲醇,涡旋混合溶解 30 s 后 4 ℃、13 000 r/min 离心 10 min 并通过 0.22 μm 的膜过滤。

1.4　超高压液相色谱-串联质谱分析条件

色谱条件:色谱柱为 Hypersil GOLD C18(50 mm×2.1 mm,1.9 μm),流动相为 0.1%甲酸水(A)-甲醇(B),洗脱梯度,洗脱液配比见表 1。流速为 0.3 mL/min,进样体积 2 μL,进样室温度为 4 ℃,柱温为 30 ℃。

质谱条件:离子源为 ESI 源,正、负离子检测模式,鞘气(N_2)压力 40 psi;辅助气体(N_2)压力 10 psi;喷雾电压 3.5 kV;离子传输管温度 320 ℃;辅助气温度 350 ℃;质谱扫描范围为 100~1 000 m/z,扫描模式为 Full MS/dd-MS2。

1.5　数据分析

利用 Compound Discover 3.1 软件采用精确质量匹配(<25 mg/L)和二级光谱匹配对原始数据进行处理,对代谢物进行峰对齐,校正代谢物的保留时间,提取代谢物的峰面积。将所有代谢物的峰面积输入 SIMCA-P 软件(14.1 版本,Umetrics)进行多变量分析,包括 PCA、OPLS-DA。基于模型对 *Y* 变量的解释率(R2Y)对 OPLS-DA 模型进行了验证,并通过 200 次迭代对交叉验证和排列检验中基于模型预测能力(Q2)进行了验证。使用 SPSS 19.0 对不同肠段的代谢物进行独立样本 *t* 检验和倍数变化分析。采用 OPLS-DA 模型的变量重要性投影(VIP)评分(VIP>2)、*t* 检验的 *P* 值(P<0.01)和组间差异倍数(FC,FC>2 或 FC<0.5)三重标准筛选差异显著的代谢物。使用代谢途径分析网络工具 MetaboAnalyst 5.0(http://metpa.metabolomics.ca)以及 HMDB 网站(https://hmdb.ca/metabolites/)KEGG 网站(http://www.genome.jp/kegg/)分析差异物性质和代谢路径。

表 1　UPLC-MS/MS 分析洗脱梯度变化

Tale 1　Changes of solvents in gradient elution of UPLC-MS/MS analysis　%

时间 Time/min	溶液 A Solution A	溶液 B Solution B
0~2	95	5
2~6	95~80	5~20
6~20	80~0	20~100
20~23	0	100
23.0~23.1	0~95	100~5
23.1~25.0	95	5

2　结果与分析

为了研究巴马香猪回肠和结肠内容物的组成差异,本研究通过 UPLC-MS/MS 方法进行了非靶向代谢谱分析,正、负离子模式分别获得了26 119 和 16 265 个质谱峰。使用 Compound Discover 3.1软件去除 RSD 大于 30%的质谱峰,经过代谢物结构鉴定、准确的质量匹配和二级光谱搜索 mzCloud 和 HMBD 数据库,正、负离子模式分别匹配了 6 403 和 1 912 种不同的代谢物。

2.1　不同肠段内容物 PCA 分析

使用 SMICA-P 软件比较正、负离子模式下各代谢物的峰面积,并进行主成分分析结果显示,在正、负离子模式下模型对 X 的解释率(R2X)分别

为 0.630 和 0.665。9 个质量控制(QC)样均集中分布在中心点,各样品分布位于中心点左右,说明本研究使用的仪器稳定性可靠,具有很好的重复性(图 1)。

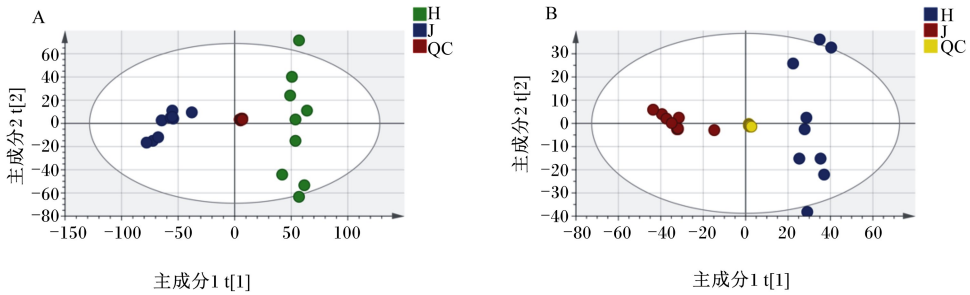


图 A:正离子模式;图 B:负离子模式;H:回肠;J:结肠;QC:质量控制样品。图 2、图 3 同。

Figure A: the model of positive ion; figure B: the model of negative ion; H: ileum; J: colon; QC: the quality control sample. The same as Fig.2 and Fig.3.

图 1 PCA 得分图

Fig.1 PCA score plot

2.2 不同肠段内容物 OPLS-DA 分析

使用 OPLS-DA 模式分析 2 组间代谢物的差异,结果显示,2 组代谢物的分离度好,在正离子模式下 R2Y 为 0.989,Q2 为 0.947;在负离子模式下 R2Y 为 0.971,Q2 为 0.939(图 2),表明 OPLS-DA 模式下的模型稳定、可靠,得到的差异代谢物可以反映不同肠段内容物之间的差异。

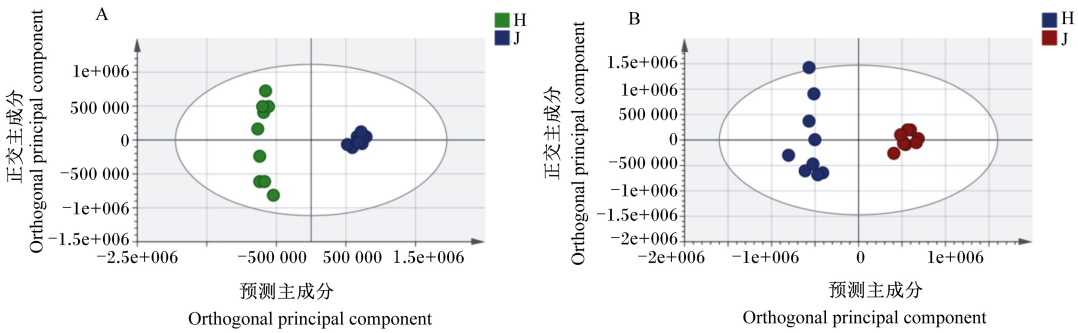


图 2 OPLS-DA 得分图

Fig.2 OPLS-DA score plot

2.3 不同肠道内容物迭代验证

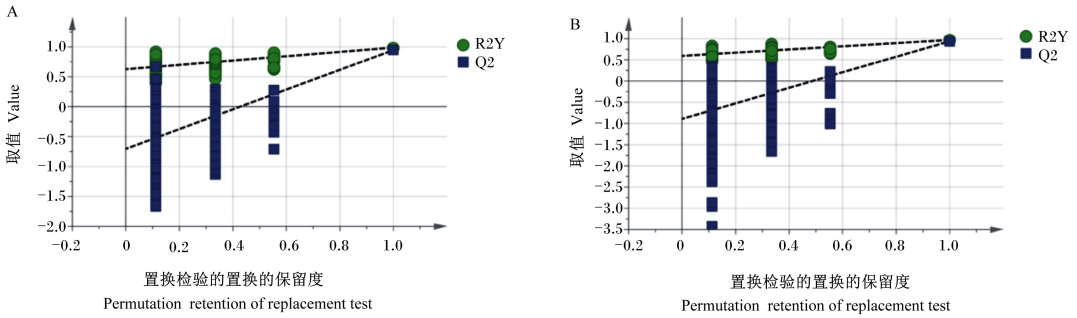
对交叉验证和排列检验中基于模型的预测能力进行 200 次迭代验证,结果显示,正、负离子模式下的预测能力回归直线截距分别为-0.705 和-0.892(图 3),说明本研究的模型拟合良好,没有出现过度拟合的现象。

2.4 极显著差异代谢物筛选

采用 VIP>2(图 4)、$P<0.01$ 和 FC>2 或 FC<0.5三重标准筛选极显著差异代谢物,结果显示,共有 42 种极显著差异代谢物被筛选出来(表 2),正离子模式 35 种,负离子模式 8 种,其中十二烷二酸在 2 种模式下均被鉴定为极显著差异代谢物。

2.5 代谢途径分析

使用 Metaboanalyst 5.0 对极显著差异代谢物进行富集分析发现,*L*-苯丙氨酸、甘鹅去胆酸、苯丙氨酸、缬氨酸、牛磺胆酸、酪氨酸、烟酸盐、sn-甘油-3-磷酸胆碱、肌酸、蛋氨酸、花生酮、4,4-二甲基-5α-胆固醇-8,14,24-三烯-3β-醇、*L*-酪氨酸和甘胆酸共 14 种代谢物共参与了 19 条代谢途径(表 3 和图 5)。



R2Y:模型对 *Y* 变量的解释率;Q2:模型预测能力。

R2Y: the interpretation rate of the model to the *Y* variable; Q2: the prediction ability of the model.

图 3　OPLS-DA 排列测试图

Fig.3　OPLS-DA permutation test plot

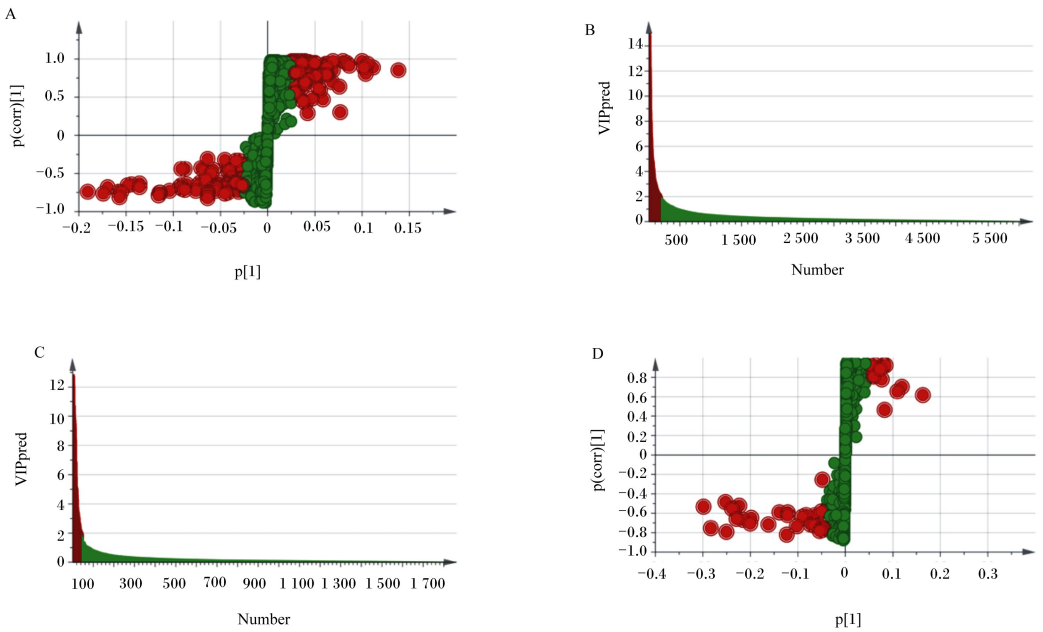


图 A、图 B:正离子模式;图 C、图 D:负离子模式。Figures A and B: the model of positive ion; figures C and D: the model of negative ion.

图 A、图 D:*x* 轴表示每种物质在第一主成分下的载荷;*y* 轴表示每种物质和第一主成分的相关关系;图 B、图 C:*x* 轴表示代谢物数量;*y* 轴表示变量重要投影度评分预测。Figures A and D: *x*-axis mean the load of each substance under the first principal component; *y*-axis mean correlation between each substance and the first principal component. Figures B and C: *x*-axis mean the number of metabolits; *y*-axis mean the variable importance projection score of prediction.

图 4　VIP 得分图

Fig.4　VIP score plot

表 2　极显著差异代谢物性质

Table 2　Properties of significant difference metabolites

名称 Names	离子模式 Ion model	分子质量 Molecular weight/ku	出峰时间 RT/min	HMDB 登录号 HMDB accession number	变量重要性投影 VIP	组间差异倍数 FC
牛磺胆酸 Taurocholic acid	P	515.290 29	14.793	HMDB0000036	5.24	1 897.21
牛去氧胆酸 Taurodeoxycholic acid	P	499.295 61	14.226	HMDB0000896	6.78	776.58

续表 2

名称 Names	离子模式 Ion model	分子质量 Molecular weight/ku	出峰时间 RT/min	HMDB 登录号 HMDB accession number	变量重要性投影 VIP	组间差异倍数 FC
牛磺酰脱氧胆酸 Taurochenodesoxycholic acid	P	499.295 64	16.497	HMDB0000951	4.95	225.52
弗斯特罗定 Fesoterodine	P	411.276 24	15.310	HMDB0015648	2.45	209.05
L-α-甘油磷酸胆碱 *L*-α-glycerophosphocholine	P	257.102 41	0.509	HMDB0000086	2.29	135.07
甘鹅去氧胆酸 Chenodeoxycholic acid glycine conjugate	P	449.312 85	15.606	HMDB0000637	15.02	112.52
猪去氧胆酸 Hyodeoxycholic acid	P	392.291 60	17.870	HMDB0000733	10.72	110.50
葫芦巴碱 Trigonelline	P	137.047 59	4.111	HMDB0000875	2.42	34.18
DL-色氨酸 *DL*-tryptophan	P	204.089 80	3.890	HMDB0013609	9.04	21.96
吲哚乙酸 Indoleacrylic acid	P	187.063 06	3.874	HMDB0000734	8.99	21.74
肌酸 Creatine	P	131.069 42	0.519	HMDB0000064	4.99	13.58
花生四烯酸甲酯 Arachidonic acid methyl ester	P	318.255 24	20.081	HMDB0062594	2.43	13.46
L-蛋氨酸 *L*-methionine	P	149.050 85	0.663	HMDB0000696	4.42	12.44
L-苯丙氨酸 *L*-phenylalanine	P	165.078 81	1.721	HMDB0000159	12.40	10.84
L-酪氨酸 *L*-tyrosine	P	181.073 66	0.839	HMDB0000158	6.89	8.71
2,4,6-辛三烯-1-醇 2,4,6-octatriyn-1-ol	P	118.041 74	0.705	HMDB0030968	2.01	8.52
L-缬氨酸 *L*-valine	P	117.079 08	0.572	HMDB0000883	5.02	5.62
L-正亮氨酸 *L*-norleucine	P	131.094 56	0.964	HMDB0001645	12.20	5.27
烟酸 Nicotinic acid	P	123.032 04	0.648	HMDB0001488	2.29	0.35
邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	P	278.151 17	16.919	HMDB0033244	2.27	0.33
十八酰胺 Octadecanamide	P	283.286 94	19.821	HMDB0034146	2.08	0.27
棕榈油酸 Palmitoleic acid	P	254.224 16	18.631	HMDB0003229	3.09	0.14
2-脱氧虾甾酮 2-deoxycastasterone	P	448.353 91	19.298	HMDB0034423	2.89	0.09
18-β-甘草次酸 18-beta-glycyrrhetinic acid	P	470.336 00	19.295	HMDB0034517	2.53	0.09
蓖麻油酸 Ricinoleic acid	P	298.250 02	18.410	HMDB0034297	8.03	0.08
9,10-二羟基硬脂酸 9,10-dihydroxystearic acid	P	316.260 59	19.156	HMDB0059633	2.61	0.06
齐墩果酸 Oleanolic acid	P	456.358 92	17.777	HMDB0002364	2.07	0.05
13-羟基-α-生育酚 13-hydroxy-alpha-tocopherol	P	446.374 97	20.256	HMDB0012559	2.19	0.04
壬二酸 Azelaic acid	P	188.104 39	11.191	HMDB0000784	3.12	0.03
西酞普兰 Citalopram	P	324.167 99	7.719	HMDB0005038	3.13	0.01
4,4-二甲基胆甾-8,14,24-三醇 4,4-dimethylcholesta-8,14,24-trienol	P	410.353 91	19.137	HMDB0001023	5.42	0.01
醋丁洛尔 Acebutolol	P	336.204 29	13.754	HMDB0015324	2.58	0.00
十二烷二酸 Dodecanedioic acid	P	230.151 37	9.509	HMDB0000623	2.83	0.00
丁苯 Butylbenzene	P	134.109 38	9.504	HMDB0059812	2.02	0.00
3-甲基二氧吲哚 3-methyldioxyindole	P	163.063 06	8.196	HMDB0004186	3.11	0.00
牛磺胆酸 Taurohyocholate	N	515.290 88	14.782	HMDB0011637	9.34	20 574.89
牛磺酰脱氧胆酸(钠盐) Taurochenodesoxycholic acid (sodium salt)	N	499.296 90	14.238	HMDB0000951	3.90	2 009.35

续表 2

名称 Names	离子模式 Ion model	分子质量 Molecular weight/ku	出峰时间 RT/min	HMDB 登录号 HMDB accession number	变量重要性投影 VIP	组间差异倍数 FC
甘胆酸 Glycocholic acid	N	465.307 96	15.317	HMDB0000138	10.83	245.93
甘鹅去氧胆酸(钠盐) Hyodeoxycholic acid (sodium salt)	N	449.313 58	15.605	HMDB0000637	12.23	95.80
脱氧胆酸 Deoxycholic acid	N	392.292 09	17.865	HMDB0000626	8.53	90.27
花生四烯酸 Arachidonic acid	N	304.239 89	19.557	HMDB0001043	2.32	8.35
前庭醇 2′-甲醚 Vestibular alcohol 2′-methyl ether	N	286.119 89	11.198	HMDB0030521	2.32	0.01
十二烷二酸 Dodecanedioic acid	N	230.150 97	14.566	HMDB0000623	3.63	0.00

P:正离子模式 ;N:负离子模式。P: the mode of positive ion; N: the mode of negative ion.

表 3　差异代谢物参与的代谢途径

Table 3　Metabolic pathway of difference metabolites

名称 Names	匹配数 Match status	*P* 值 *P*-value	FDR 值 FDR value	代谢物 Metabolites
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	4/2	0.003 35	0.281	*L*-苯丙氨酸、*L*-酪氨酸
苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism	10/2	0.022 9	0.562	*L*-苯丙氨酸、*L*-酪氨酸
初级胆汁酸生物合成 Primary bile acid biosynthesis	46/4	0.023 3	0.562	甘鹅去氧胆酸、牛磺胆酸、甘胆酸、牛磺胆酸
氨酰 tRNA 生物合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	48/4	0.026 8	0.562	苯丙氨酸、蛋氨酸、缬氨酸、酪氨酸
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成 Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	8/1	0.179	1	缬氨酸
牛磺酸和低牛磺酸代谢 Taurine and hypotaurine metabolism	8/1	0.179	1	牛磺胆酸
泛醌和其他萜醌生物合成 Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	9/1	0.199	1	酪氨酸
烟酸和烟酰胺代谢 Nicotinate and nicotinamide metabolism	15/1	0.31	1	烟酸盐
泛酸和辅酶 A 生物合成 Pantothenate and CoA biosynthesis	19/1	0.375	1	缬氨酸
乙醚脂质代谢 Ether lipid metabolism	20/1	0.391	1	sn-甘油-3-磷酸胆碱
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	33/1	0.56	1	肌酸
半胱氨酸和蛋氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	33/1	0.56	1	蛋氨酸
甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism	36/1	0.592	1	sn-甘油-3-磷酸胆碱
花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism	36/1	0.592	1	花生酮
不饱和脂肪酸的生物合成 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	36/1	0.592	1	花生酮

续表 3

名称 Names	匹配数 Match status	*P* 值 *P*-value	FDR 值 FDR value	代谢物 Metabolites
精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	38/1	0.612	1	肌酸
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 Valine, leucine and isoleucine degradation	40/1	0.631	1	缬氨酸
类固醇生物合成 Steroid biosynthesis	42/1	0.649	1	4,4-二甲基-5α-胆固醇-8,14,24-三烯-3β-醇 4
酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	42/1	0.649	1	酪氨酸

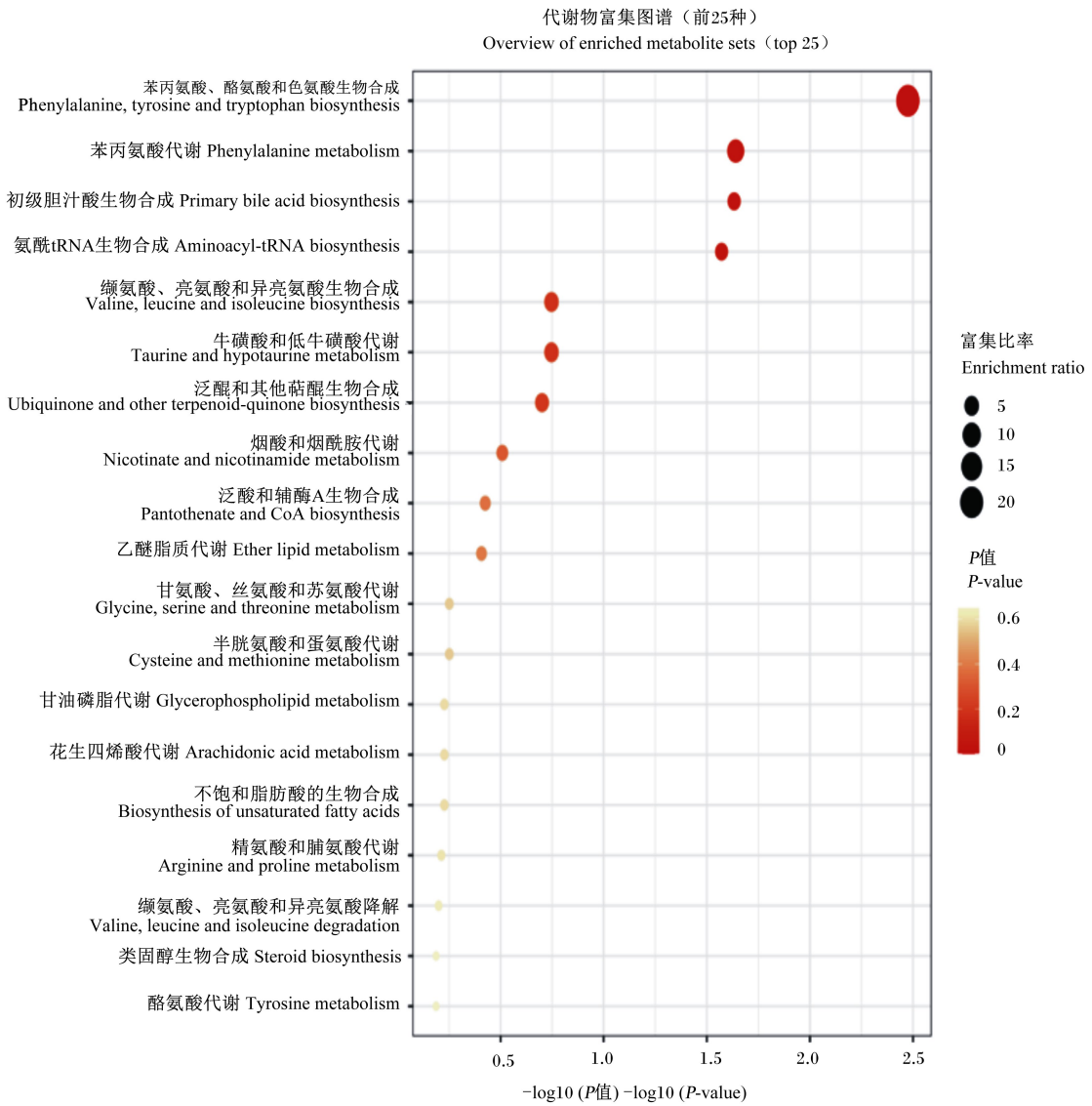


图 5 KEGG 通路图

Fig.5 Pathway of KEGG

3 讨　论

肠道是动物的消化吸收器官分为小肠与大肠2个部分,食糜在动物体内先后经过十二指肠、空肠和回肠被吸收大量营养物质后到达结肠、直肠,进一步被重吸收水分和无机盐等物质,最终成为粪便排出体内。脂肪、蛋白质和碳水化合物等营养物质都需要在肠道内分解成为小分子物质才能被吸收进入体内,提供动物生命活动所需要的能量。食糜在经过不同肠段后其组成成分均会有所差异,主要是因为肠道的消化吸收作用和肠道微生物的分解分泌作用。代谢组学在1999年出现后逐渐被研究者关注[13],但是主要集中在人类的研究上面[14-16]。由于代谢组学本身是研究物质的组成的一种技术,可以对组成复杂的物质进行定性和定量分析,因此利用代谢组学可以充分地分析动物肠道内不同肠段的内容物组成,从而研究猪肠道内容物组成的差异,能为研究者更深入理解机体的营养吸收过程和肠道微生物的作用机制提供新的见解,以期更进一步理解机体的生命变化过程。

3.1 巴马香猪回肠、结肠代谢组学质控

本研究使用SMICA-P软件进行PCA和OPLS-DA分析,结果显示PCA分析R2X模型解释率超过0.6,且9个QC样均集中分布在中心点;OPLS-DA分析R2Y和Q2均超过为0.93;200次迭代验证的Q2截距均小于0.05,说明本研究的仪器稳定性和分析模式稳定性均良好,没有出现过度拟合现象,分析得到的结果可以代表巴马香猪回肠、结肠内容物的差异。本研究将极显著差异代谢物的标准设置为同时满足VIP>2、$P<0.01$和FC>2或FC<0.5 3个条件,比一般的代谢组学研究标准更严格[17-19],因此筛选得到的42种极差异代谢物更能代表回肠内容物和结肠内容物的真实差异,并有可能作为回肠和结肠内容物的生物标志物。

3.2 高胆汁酸吸收效率是回肠的消化特征

本研究筛选到了42种差异代谢物,并进行代谢途径分析发现。42种差异代谢物包含了甘鹅去氧胆酸、甘鹅去氧胆酸(钠盐)、甘胆酸、猪去氧胆酸、牛磺胆酸、脱氧胆酸、牛去氧胆酸、牛磺胆酸、牛磺酰脱氧胆酸和牛磺酰脱氧胆酸(钠盐)共10种不同种类的与胆酸相关的代谢物,均在回肠内容物中的含量高于结肠内容物90~20 574倍。同时VIP值超过10的6种代谢物有4种是与胆酸相关的代谢物,分别为甘鹅去氧胆酸、甘鹅去氧胆酸(钠盐)、甘胆酸和猪去氧胆酸,说明胆汁酸在回肠内容物和结肠内容物的含量差异巨大。而甘鹅去氧胆酸、牛磺胆酸和甘胆酸3种胆酸相关的代谢物参与了初级胆汁酸生物合成以及牛磺酸和低牛磺酸代谢2条代谢途径,其中胆汁酸在肠道主要起到分解脂肪等作用,已经在各种脂肪相关的疾病中被广泛报道[20-22]。胆汁酸从肝脏中分泌到胆囊储存后输入肠道内促进脂肪的乳化,到达回肠后段被重吸收到胆囊池中进行储存,只有5%被排出体内[23-25],与本研究中发现回肠内容物的各类胆汁酸相关的物质均高于结肠内容物的结果一致。同时胆汁酸的合成还是胆固醇分解的主要途径[20,26],本研究中4,4-二甲基胆甾-8,14,24-三醇作为胆固醇的衍生物在结肠内容物中的含量比回肠内容物高137倍,这也符合回肠、结肠的生理特性。因此可以证明胆汁酸在小肠中消化脂肪类物质之后,在回肠末端被吸收回肝脏储存,只有小部分会进入结肠中,被结肠中的微生物利用或者排除体内,高胆汁酸吸收效率是回肠的消化特征。

3.3 高氨基酸吸收效率是回肠的消化特征

在42种差异代谢物中存在苯丙氨酸、正亮氨酸、*DL*-色氨酸、*L*-酪氨酸、*L*-缬氨酸和*L*-蛋氨酸6种氨基酸,其中苯丙氨酸、*DL*-色氨酸和*L*-缬氨酸3种氨基酸为必需氨基酸,6种氨基酸在回肠内容中含量均高于结肠内容物5~21倍。*L*-苯丙氨酸、*L*-酪氨酸、蛋氨酸、缬氨酸和肌酸5种代谢物参与了苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成通路、苯丙氨酸代谢通路、氨酰tRNA生物合成通路、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成通路、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路、半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路、精氨酸和脯氨酸代谢通路、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解通路以及酪氨酸代谢通路共9条与氨基酸合成与代谢相关的通路。研究表明,部分氨基酸如苯丙氨酸、色氨酸等能逃过小肠的吸收作用到达结肠等大肠肠段被微生物利用,产生吲哚等物质[27-29]。同样地,肌酸作为精氨酸、甘氨酸和蛋氨酸合成的氨基酸衍生物[30-31]也与苯丙氨酸等6种氨基酸一样在回肠内容物中的含量高于结肠内容物,这也充分说明了大量的苯丙氨酸、正亮氨酸、*DL*-色氨酸、*L*-酪氨酸、*L*-缬氨酸、*L*-蛋

氨酸和肌酸在回肠被吸收进入机体内,以供机体的生命活动使用,但是还有部分氨基酸进入结肠等肠段,高氨基酸吸收效率是回肠的消化特征。

3.4 高微生物代谢产物是结肠消化特征

十二烷二酸在正、负离子模式中均被鉴定为差异代谢物,且 2 种模式下在结肠内容物中的含量比回肠内容物分别高 404 和 1 327 倍,研究发现十二烷二酸是一种水溶性的脂类和碳水化合物代谢的中间产物[32],可以通过微生物方法合成[33-34],这提示结肠内十二烷二酸含量的升高可能是由于脂类和碳水化合物代谢与微生物合成的双重原因导致的。同时,3-甲基二氧吲哚作为结肠内细菌产生的色氨酸代谢产物 3-甲基吲哚的体内氧化产物[35],在本研究中其在结肠内容物中的含量比回肠中高 970 倍。十二烷二酸和 3-甲基二氧吲哚都在结肠内容物中含量比回肠高约 1 000 倍,且 2 种物质为回肠、结肠含量差异最大的 2 种差异代谢物,因此认为高微生物代谢产物是结肠消化特征。

4 结 论

本研究通过非靶向代谢组学技术分析了巴马香猪回肠和结肠的消化特征,PCA 分析发现仪器稳定、可靠;OPLS-DA 分析发现模型稳定性良好,没有出现过度拟合现象;共有 42 种极显著差异代谢物被筛选出来,正离子模式 35 种,负离子模式 8 种;共 14 种代谢物参与了 19 条代谢途径;高胆汁酸和氨基酸吸收效率是回肠的消化特征;高微生物代谢产物是结肠消化特征。

参考文献:

[1] 王爱德,兰干球,郭亚芬.广西巴马小型猪的培育[J].实验动物科学,2010,27(1):60-63.
WANG A D,LAN G Q,GUO Y F.Genetic breeding of *Guangxi Bama* mini-pig[J].Laboratory Animal Science,2010,27(1):60-63.(in Chinese)

[2] ZHAI X R,HAN W Z,WANG M,et al.Exogenous supplemental NAD^+ protect myocardium against myocardial ischemic/reperfusion injury in swine model[J].American Journal of Translational Research,2019,11(9):6066-6074.

[3] NING X Y,YANG K,SHI W,et al.Comparison of hypertrophic scarring on a red Duroc pig and a *Guangxi mini Bama* pig[J].Scars,Burns & Healing,2020,6:2059513120930903.

[4] GUO M,LIU J G,GUO F F,et al.Panax quinquefolium saponins attenuate myocardial dysfunction induced by chronic ischemia[J].Cellular Physiology and Biochemistry,2018,49(4):1277-1288.

[5] ZHU T Y,AI J,NIE C H,et al.Feasibility of computed tomography-guided irreversible electroporation for porcine kidney ablation[J].Journal of Cancer Research and Therapeutics,2020,16(5):1125-1128.

[6] 朱春红,陶志云,刘宏祥,等.鸭不同肠段内菌群结构分析与拟杆菌分布研究[J].畜牧兽医学报,2020,51(12):3001-3012.
ZHU C H,TAO Z Y,LIU H X,et al.Analysis of microbiota structure and bacteroides distribution in different intestinal segments in duck[J].Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica,2020,51(12):3001-3012.(in Chinese)

[7] 董博,王志林,魏文康,等.哺乳仔猪断奶前后肠道微生物培养组学研究[J].动物营养学报,2021,33(1):175-189.
DONG B,WANG Z L,WEI W K,et al.Study on intestinal microbial culturomics of piglets before and after weaning[J].Chinese Journal of Animal Nutrition,2021,33(1):175-189.(in Chinese)

[8] LIU W X,ZHANG R,SHU R,et al.Study of the relationship between microbiome and colorectal cancer susceptibility using 16SrRNA sequencing[J].BioMed Research International,2020,2020:7828392.

[9] LI Z,ZHU H,GUO Y X,et al.Gut microbiota regulate cognitive deficits and amyloid deposition in a model of Alzheimer's disease[J].Journal of Neurochemistry,2020,155(4):448-461.

[10] ZUO T,ZHAN H,ZHANG F,et al.Alterations in fecal fungal microbiome of patients with COVID-19 during time of hospitalization until discharge[J].Gastroenterology,2020,159(4):1302-1310.e5.

[11] PATTI G J,YANES O,SIUZDAK G.Innovation:metabolomics:the apogee of the omics trilogy[J].Nature Reviews Molecular Cell Biology,2012,13(4):263-269.

[12] SINHA S R,HAILESELASSIE Y,NGUYEN L P,et al.Dysbiosis-induced secondary bile acid deficiency promotes intestinal inflammation[J].Cell Host & Microbe,2020,27(4):659-670.e5.

[13] NICHOLSON J K,LINDON J C,HOLMES E.'Metabonomics':understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli

via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. Xenobiotica, 1999, 29(11): 1181-1189.

[14] GABAZANA Z, SITOLE L. Raman-based metabonomics unravels metabolic changes related to a first-line tenofovir-based treatment in a small cohort of South African HIV-infected patients[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2021, 248: 119256.

[15] COELHO M O C, MONTEYNE A J, DIRKS M L, et al. Dailymycoprotein consumption for 1 week does not affect insulin sensitivity or glycaemic control but modulates the plasma lipidome in healthy adults: a randomised controlled trial[J]. British Journal of Nutrition, 2021, 125(2): 147-160.

[16] AKHBARI P, JAGGARD M K, BOULANGÉ C L, et al. Differences between infected and noninfected synovial fluid[J]. Bone & Joint Research, 2021, 10(1): 85-95.

[17] JI H N, SONG N N, REN J, et al. Metabonomics reveals bisphenol A affects fatty acid and glucose metabolism through activation of LXR in the liver of male mice[J]. The Science of the Total Environment, 2020, 703: 134681.

[18] HUO T G, FANG Y, ZHANG Y H, et al. Liver metabonomics study on the protective effect of glycyrrhetinic acid against realgar-induced liver injury[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2020, 18(2): 138-147.

[19] LIU Y, ZHANG X, GUAN T, et al. Effects of quercetin on cadmium-induced toxicity in rat urine using metabonomics techniques[J]. Human & Experimental Toxicology, 2020, 39(4): 524-536.

[20] CHIANG J Y L, FERRELL J M. Bile acid receptors FXR and TGR5 signaling in fatty liver diseases and therapy[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2020, 318(3): G554-G573.

[21] LI T G, CHIANG J Y L. Bile acid-based therapies for non-alcoholic steatohepatitis and alcoholic liver disease[J]. Hepatobiliary Surgery and Nutrition, 2020, 9(2): 152-169.

[22] ZHENG X J, CHEN T L, JIANG R Q, et al. Hyocholic acid species improve glucose homeostasis through a distinct TGR5 and FXR signaling mechanism[J]. Cell Metabolism, 2021, 33(4): 791-803.e7.

[23] CHANDRA R, LIDDLE R A. Cholecystokinin[J]. Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity, 2007, 14(1): 63-67.

[24] HOFMANN A F. The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions[J]. Frontiers in Bioscience, 2009, 14: 2584-2598.

[25] DAWSON P A, KARPEN S J. Intestinal transport and metabolism of bile acids[J]. Journal of Lipid Research, 2015, 56(6): 1085-1099.

[26] THOMAS C, PELLICCIARI R, PRUZANSKI M, et al. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2008, 7(8): 678-693.

[27] YANG Y X, DAI Z L, ZHU W Y. Important impacts of intestinal bacteria on utilization of dietary amino acids in pigs[J]. Amino Acids, 2014, 46(11): 2489-2501.

[28] 慕春龙,马梅蕾,何香玉,等. 体外法探究果寡糖对猪后肠微生物代谢苯丙氨酸和色氨酸的影响[J]. 畜牧兽医学报,2018,49(3):559-564.
MU C L, MA M L, HE X Y, et al. Effect of FOS on metabolism of phenylalanine and tryptophan in pig hindgut bacteria fermentation broths *in vitro*[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2018, 49(3): 559-564. (in Chinese).

[29] 朱艳芝,马文锋,陈晓晨,等. 色氨酸分解代谢及其在猪饲粮中的应用进展[J]. 动物营养学报,2020,32(3):1019-1024.
ZHU Y Z, MA W F, CHEN X C, etal. Tryptophan catabolism and its application in pig diets[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(3): 1019-1024. (in Chinese).

[30] PHILIP M, SNOW R J, GATTA P A D, et al. Creatine metabolism in the uterus: potential implications for reproductive biology[J]. Amino Acids, 2020, 52(9): 1275-1283.

[31] KAZAK L, COHEN P. Creatine metabolism: energy homeostasis, immunity and cancer biology[J]. Nature Reviews Endocrinology, 2020, 16(8): 421-436.

[32] GRECO A V, MINGRONE G, CAPRISTO E, et al. The metabolic effect of dodecanedioic acid infusion in non-insulin-dependent diabetic patients[J]. Nutrition, 1998, 14(4): 351-357.

[33] FUNK I, RIMMEL N, SCHORSCH C, et al. Production of dodecanedioic acid via biotransformation of low cost plant-oil derivatives using *Candida tropicalis*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2017, 44(10): 1491-1502.

[34] CAO W F, WANG Y J, LUO J Q, et al. Improving α, ω-dodecanedioic acid productivity from n-dodecane and hydrolysate of *Candida* cells by membrane integrated repeated batch fermentation [J]. Bioresource Technology, 2018, 260: 9-15.

[35] ALBRECHT C F, CHORN D J, WESSELS P L. Detection of 3-hydroxy-3-methyloxindole in human urine [J]. Life Sciences, 1989, 45(12): 1119-1126.

Digestive Characteristics of Ileum and Colon in *Bama Xiang* Pigs

MO Jiayuan LU Yujie* QI Wenjing ZHU Siran FENG Lingli GAO Jiuyu LIANG Liang WANG Hui LAN Ganqiu** LIANG Jing**

(*College of Animal Science & Technology, Guangxi University, Nanning* 530004, *China*)

Abstract: This experiment was conducted to investigate the digestive characteristics of ileum and colon in *Bama Xiang* pigs. The ileum and colon contents of nine adult *Bama Xiang* sows were collected and detected by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Compund Disover 3.1 software was used for metabolite detection, and the significant difference metabolites were screen by SIMCA-P and SPSS 19.0 software. MetaboAnalyst 5.0, HMDB and KEGG websites were used to analyze the metabolite properties and metabolic pathways. The results showed that a total of 26 119 and 16 265 peaks were obtained in positive and negative ion modes, and 6 403 and 1 912 metabolites were matched, respectively. The R2X model interpretation of PCA analysis was more than 0.6 and all the nine QC samples were concentrated in the center. The R2Y and Q2 of OPLS-DA analysis were more than 0.93 and the intercepts of Q2 verified by 200 iterations were all less than 0.05. A total of 42 metabolites with extremely significant difference were detected, of which 10 were related to bile acids and 6 were amino acids, and 14 different metabolites were involved in 19 metabolic pathways. The content of bile acids in ileum contents was 90 to 20 574 times higher than that in colon, and the content of amino acids in ileum contents was 5 to 21 times higher than that in colon. Instead, both dodecanedioic acid and 3-methyldioxyindole were about 1 000 times higher in colonic contents than in ileal contents. The results indicate that the high absorption efficiency of bile acids and amino acids are the digestive characteristics of ileum, and high microbial metabolites is the characteristic of colon digestion. [***Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(8): 4342-4352**]

Key words: *Bama Xiang* pigs; intestinal contents; metabonomics; bile acids; amino acids; microbe

* Contributed equally

** Corresponding authors: LAN Ganqiu, professor, E-mail: gqlan@gxu.exu.cn; LIANG Jing, lecturer, E-mail: liangjing@gxu.edu.cn

(责任编辑 陈 鑫)