



大鼠酒精灌胃后肠系膜淋巴液的代谢组分析*

张媛^{1)**} 孟子焯^{1)**} 李文博¹⁾ 荆雨萌¹⁾ 刘桂辰¹⁾ 郝子瑶¹⁾ 许袖^{1,2)***} 赵振奥^{1,2)***}⁽¹⁾ 河北北方学院微循环研究所/基础医学院, 张家口 075000; ⁽²⁾ 河北省危急重症发病机制及干预重点实验室, 张家口 075000

摘要 **目的** 物质吸收入血主要基于肠-淋巴途径和门静脉途径, 门静脉途径具有肝脏的生物转化作用, 而肠-淋巴途径并不具备生物转化作用, 其转运的物质直接进入血液循环影响机体。本文拟探究饮酒后肠-淋巴途径所转运的物质变化及其危害性。**方法** 将雄性 Wistar 大鼠分为高、中、低剂量饮酒组和饮水组, 采用灌胃的方式, 分别灌胃 56、28、5.6 度白酒和水, $10\text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 共进行 10 d, 之后收集肠系膜淋巴液进行液相色谱-质谱法 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 非靶向代谢组学分析与生物信息学分析。**结果** 高剂量饮酒组肠系膜淋巴液中代谢物变化最大, 通过对差异代谢物进行代谢组-京都基因和基因组数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析发现: 高剂量饮酒组与对照组差异代谢物主要富集于癌症中的中心碳代谢、胆汁分泌、亚油酸代谢、不饱和脂肪酸的合成等通路; 差异代谢物主要关联疾病有精神分裂症、阿尔茨海默病、肺癌等。中剂量与对照组的差异代谢物主要富集于苯丙氨酸代谢, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成, 亚油酸代谢, 胆固醇代谢等通路; 差异代谢物主要关联疾病有精神分裂症、阿尔茨海默病、肺癌、帕金森病等。随着饮酒剂量的增加, 淋巴液中与疾病相关的代谢物胆固醇 (Cholesterol)、L-亮氨酸 (L-Leucine)、富马酸 (Fumaric acid)、甘露醇 (Mannitol) 含量增加, 与精神分裂症相关的代谢物数目也有增多趋势, 表明经肠-淋巴途径吸收的一些代谢物对酒精具有剂量依赖性。**结论** 饮酒后肠系膜淋巴液中大量代谢物发生了变化, 尤其是高剂量饮酒组; 饮酒可能与炎症反应、神经系统疾病、精神性疾病、癌症的发生密切相关。

关键词 肠系膜淋巴液, 酒精灌胃, 代谢组学, 脂肪酸**中图分类号** Q592.3**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0402

饮酒与全球健康问题密切相关^[1]。据 2018 年世界卫生组织报告, 目前全球的饮酒人数大约为 23 亿, 同时, 在超过 15 岁的人群中, 人均年饮用量也从 2005 年的 5.5 L 增长到了 2016 年的 6.4 L。2016 年, 与饮酒相关的死亡人数约 300 万, 占全球总死亡人数的 5.3%, 饮酒是造成全球人口死亡的第七大原因^[2]。此外, 饮酒还会增加神经性疾病、心血管疾病和癌症等疾病的风险^[3-5]。

Voutilainen 等^[6]总结了 2018 年以前 (含) 文献中所述的饮酒后代谢物, 主要分析了血浆、血清、尿液、肝脏和粪便中的代谢物变化, 发现饮酒后发生变化的代谢物大多是脂质和氨基酸。血液中脂肪酸、二酰磷脂酰胆碱和类固醇代谢物的水平趋于增加, 而磷脂酰胆碱酰烷类和羟基鞘磷脂的水平则下降。氨基酸类物质中, 谷氨酰胺水平在饮酒后血液中降低, 酪氨酸和丙氨酸等显著升高。另外, 血清中甘氨酸脱氧胆酸呈现上调趋势, 推测其增加可能与酒精诱导的肠道微生态失调有关^[7-9]。

物质吸收入血主要经由两条途径: 一条为门静脉途径, 物质需经过肝脏的生物转化作用入血; 另外一条为肠-淋巴途径, 物质由肠道黏膜上皮细胞吸收, 其中部分脂质与载脂蛋白等组装成乳糜微粒^[10], 由肠系膜淋巴液运输, 此过程中没有生物转化作用, 直接进入血液循环, 影响机体。目前, 已有对饮酒后血液及肝脏中代谢物的研究, 而饮酒之后, 肠-淋巴途径所转运物质的变化有待进一步研究。

田苗苗等^[11]以 56 度白酒 14 ml/kg, 每日一次灌胃 Wistar 大鼠, 连续 10 d; Qiao 等^[12]以 8 ml/kg

* 河北省自然科学基金 (H2022405054) 和河北北方学院博士科研启动基金资助项目 (BSJJ202410)。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

赵振奥 Tel: 18896957709, E-mail: zhao22840718@163.com

许袖 Tel: 13932324770, E-mail: xiu66328769@163.com

收稿日期: 2023-10-22, 接受日期: 2024-03-25

的剂量给予 Wistar 大鼠 50% 乙醇, 2 次/d, 持续 7 d; 陈世林等^[13]采用 60% 体积分数的酒精对雄性 SD 大鼠以 5 g/kg, 1 次/d, 连续灌胃 5 d。通过上述条件对大鼠进行灌胃酒精, 探究了肝脏各项指标和病理的变化。本文参考上述条件, 模拟春节期间连续饮酒以及当代频繁应酬的社会现状, 对大鼠进行连续 10 d 酒精灌胃, 检测肠系膜淋巴液中代谢物的变化, 分析饮酒后肠-淋巴途径对机体的影响。

1 材料与方法

1.1 动物、材料与仪器

雄性 Wistar 大鼠, 购买于维通利华(北京)实验动物技术有限公司, 体重 200~250 g。该研究符合河北北方学院实验动物福利伦理审查委员会要求(编号: HBNU202311012111)。本文使用的材料与仪器如下: 灌胃针、56 度白酒(实验中不同剂量的白酒是由 56 度白酒和蒸馏水稀释而成, 白酒: 水 1:1 稀释得到 28 度酒, 1:9 稀释得到 5.6 度酒)、一次性静脉采血针、采血管、甲醇($\geq 99.0\%$, Thermo)、 H_2O 、2-氯-L-苯丙氨酸(98%, 内标物质, Aladdin)、台式冷冻高速离心机、混匀仪、真空浓缩仪(Eppendorf, 5305)、滤膜(津腾, 0.22 μm PTFE)、液相色谱仪(Thermo, Vanquish)、质谱仪(Thermo, Orbitrap Exploris 120)。

1.2 酒精灌胃

选取同一批次体重相近的 12 只大鼠进行实验, 分为高剂量饮酒组(56 度白酒灌胃)、中剂量饮酒组(28 度白酒灌胃)、低剂量饮酒组(5.6 度白酒灌胃)和纯水组(饮用纯水)。分为 3 笼饲养, 每笼 4 只, 同时更换垫料和饲料, 以保证笼间饲养条件差异最小。同一笼内 4 只大鼠, 高、中、低剂量饮酒组及纯水组各一只, 以保证不同剂量组大鼠处于相同的菌群环境中, 消除外界菌群对淋巴液成分的影响。于每日清晨 8 点对各组大鼠分别以不同度数白酒进行灌胃, $10\text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 连续灌胃 10 d。

1.3 肠系膜淋巴液的收集

于第 10 天清晨灌胃 4 h 后进行肠系膜淋巴液的收集。使用 1% 戊巴比妥钠(5 ml/kg)肌肉注射麻醉后, 行股静脉插管, 输入肝素。之后进行腹部切口, 使用一次性静脉采血针和采血管对肠系膜淋巴管进行引流, 收集 1 h, 约 200 μl 。

1.4 样品处理

将收集的淋巴液离心(3 000 r/min) 5 min, 去

细胞, 保留上清液。放入 -80°C 冰箱保存。后续将同组 3 只大鼠淋巴液等体积均匀混合后, 取固定量 100 μl , 用于代谢组分析。在 4°C 解冻样本, 解冻后涡旋 1 min; 之后加入 400 μl 冷甲醇, 涡旋 1 min; 在 4°C 以 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液浓缩干燥; 然后溶解于 150 μl 2-氯-L-苯丙氨酸溶液(其为内标物质, 用于消除实验仪器等可能带来的误差), 过滤上清液进行液相色谱-质谱法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)非靶向代谢组学分析^[14]。以上操作及后续色谱分离和质谱检测均在苏州帕诺米克生物医药科技有限公司完成。

1.5 色谱分离

超高效液相系统 Thermo Vanquish (Thermo Fisher Scientific, USA) 使用 ACQUITY UPLC[®] HSS T3 色谱柱($2.1\times 150\text{ mm}^2$, 1.8 μm) (Waters, Milford, MA, USA), 40°C 柱温, 0.25 ml/min 的流速和 2 μl 进样量。在正离子模式下, 流动相为 0.1% 甲酸的乙腈溶液(B1)和 0.1% 甲酸水溶液(A1), 梯度洗脱程序为: 0~1 min, 2% B1, 1~9 min, 2%~50% B1, 9~12 min, 50%~98% B1, 12~13.5 min, 98% B1, 13.5~14 min, 98%~2% B1, 14~20 min, 2% B1。负离子模式, 流动相为乙腈(B2)和 5 mmol/L 甲酸铵水(A2), 梯度洗脱程序为: 0~1 min, 2% B2, 1~9 min, 2%~50% B2, 9~12 min, 50%~98% B2, 12~13.5 min, 98% B2, 13.5~14 min, 98%~2% B2, 14~17 min, 2% B2^[15]。

1.6 质谱检测

使用配备电喷雾离子源(ESI)质谱检测器(Thermo Orbitrap Exploris 120, Thermo Fisher Scientific, USA)获取质谱图, 正负离子模式分别采集数据。正离子喷雾电压为 3.50 kV, 负离子喷雾电压为 -2.50 kV , 鞘气 30 arb, 辅助气 10 arb。毛细管温度 325°C , 以分辨率 60 000 进行一级全扫描, 一级离子扫描范围 m/z 100~1 000, 并采用高能碰撞解离(higher energy collision induced dissociation, HCD)进行二级裂解, 碰撞能量为 30%, 二级分辨率为 15 000, 采集信号前 4 离子进行碎裂, 同时采用动态排除去除无必要的 MS/MS 信息^[16]。

1.7 数据分析

利用 R 的 XCMS 程序包进行峰识别、峰过滤、峰对齐; 得到包括质核比、保留时间及峰面积等信

息的数据矩阵;代谢物的鉴定首先根据精确分子量进行确认(分子量误差为 ≤ 30 ppm),后续根据MS/MS碎片模式在HMDB、LipidMaps、mzCloud以及苏州帕诺米克生物医药科技有限公司自建标准品数据库进行代谢物确认。代谢物含量用相对丰度表示,即以最强峰(基峰)为100,其他峰则以此为标准,确定其相对强度,代谢物含量为相对定量值。

1.8 生物信息学分析

通过LC-MS非靶向检测技术最终鉴定出了235种代谢物(表S1)。主成分分析(principal component analysis, PCA)是将高中低剂量饮酒组和对照组的代谢物对应的含量作为数据文件,然后将4组的样本名和其组别对应,并设置对应颜色作为组别文件,将数据文件和组别文件导入到Biodeep分析平台,使用多元统计分析工具进行分析,对于右侧参数,降维方法选择“PCA”,对数转换选择以2为底取对数,数据缩放为“pareto”,之后将对数据进行降维和归类分析。通过分析四组代谢物的变异系数,选取变异系数大于30%的前152种代谢物原始数据,上传到Biodeep网站聚类热图工具中,采用行聚类和列聚类,行聚类与列聚类算法均采用euclidean,聚类方式选取ward.D2,

使用聚类热图工具内部的归一化算法,将原始数据进行归一化,具体归一化公式为: $(x - \mu)/\sigma$,将原始数据归一化后,处理成均值为0,方差为1的数据,处理后的数据值范围集中在-1到1之间,根据值的大小一一映射到图上。饮酒组与对照组相比上调2倍(fold change, FC)及以上或下调至1/2及以下的代谢物定义为差异代谢物,利用Biodeep网站中代谢组-京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析工具,上传代谢物数据文件,包括代谢物名称、KEGG编号以及代谢物 $\log_2 FC$ 数值,进行差异代谢物的通路富集,可得到代谢通路富集图和KEGG通路的网址。最后利用MetaboAnalyst网站中Network analysis工具对差异代谢物与疾病之间的关联进行分析,得到关联图。

2 结 果

2.1 大鼠体重变化

经过10 d的酒精灌胃,饮水组大鼠体重增加显著,而其余组大鼠体重饮酒前后无显著差异,但体重有增加趋势,其中高剂量组体重增加最小,表明饮酒对体重有一定的影响(图1)。

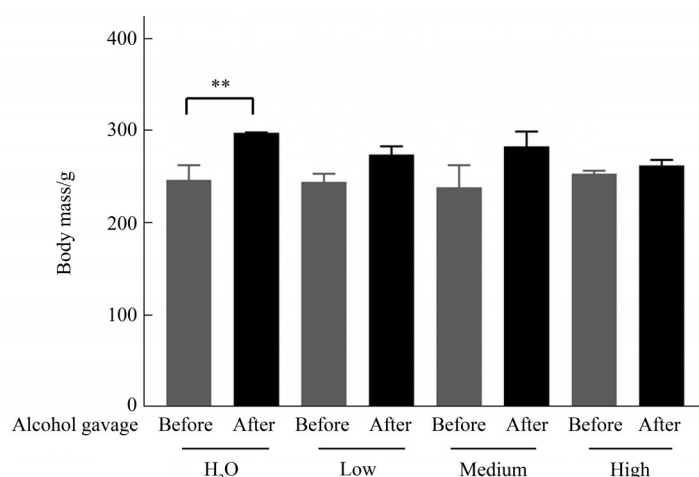


Fig. 1 Body mass changes before and after different dosages of alcohol intake

** $P < 0.01$.

2.2 高剂量饮酒组肠系膜淋巴液中代谢物变化最大

通过PCA发现(图2),第一主成分(PC1)的贡献率为43.6%,第二主成分(PC2)的贡献率为31.9%。图中低剂量饮酒组和饮水组呈现聚集趋

势,高剂量组与前两者呈分散趋势,高剂量饮酒组在PC1上与饮水组呈现较大差异,这表明高剂量饮酒组与饮水组中各代谢物存在差异。而中剂量饮酒组情况类似,同样与前两者呈离散趋势,在PC2方向上与饮水组呈现较明显差异。

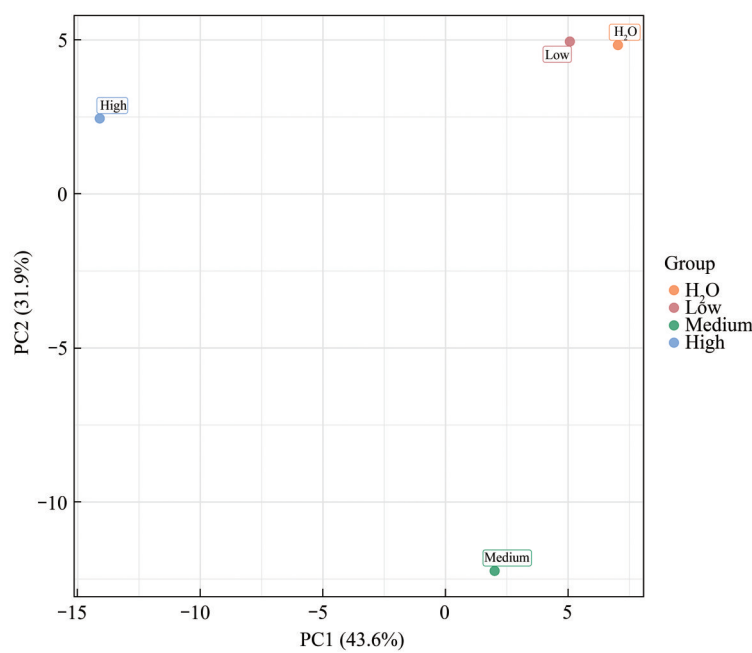


Fig. 2 Metabolites PCA in lymph fluid of each group
Blue dot: high-dosage alcohol group; green dot: medium-dosage alcohol group; pink dot: low-dosage alcohol group; yellow dot: control group.

通过代谢物聚类热图发现：从纵向组别聚类的角度看，饮水组与低剂量饮酒组距离较近，最先聚为一类，之后又同中剂量饮酒组聚为一类，最后与高剂量饮酒组聚到一起，可以看出高剂量饮酒组与饮水组距离较远；从横向差异代谢物的角度看，代谢物在高剂量饮酒组中的分布有明显差异（图3）。这说明高剂量饮酒组淋巴液中的代谢物相比于对照组变化最大，差异代谢物更多。表1数据为高剂量

饮酒组与对照组淋巴液中变化最大的前20种代谢物。

2.3 淋巴液中差异代谢物的KEGG富集分析

通过对差异代谢物进行代谢组-KEGG富集分析发现，高剂量与中剂量饮酒后，差异代谢物相关通路发生了显著变化。高剂量饮酒组与对照组差异代谢物的通路主要富集于：癌症中的中心碳代谢、植物次生代谢产物的生物合成、ABC转运蛋白、胆汁分泌、亚油酸代谢、不饱和脂肪酸的合成等（图4a）；中剂量与对照组的差异代谢物主要富集于：ABC转运蛋白通路，苯丙氨酸代谢，缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成，亚油酸代谢，磷酸转移酶系统（PTS）通路，PPAR信号通路，精氨酸和脯氨酸代谢，酪氨酸代谢，甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的代谢，果糖和甘露糖代谢，矿物质的吸收，胆固醇代谢，胆汁酸代谢等通路（图4b）。

其中高剂量饮酒组相比于对照组，不饱和脂肪酸的合成通路中富集到了花生四烯酸、油酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、芥酸，其中只有花生四烯酸上调（上调了7.25倍），其他代谢物均下调（表2）。

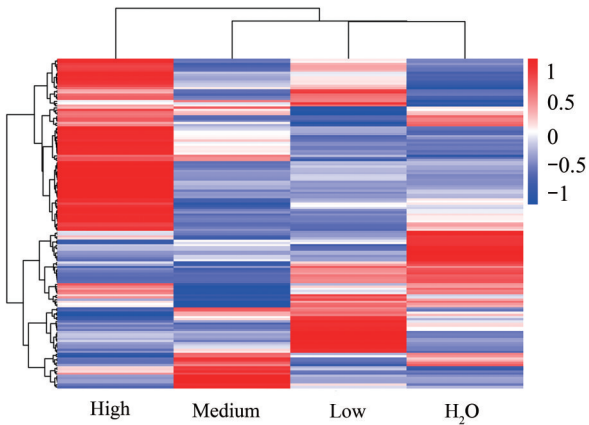
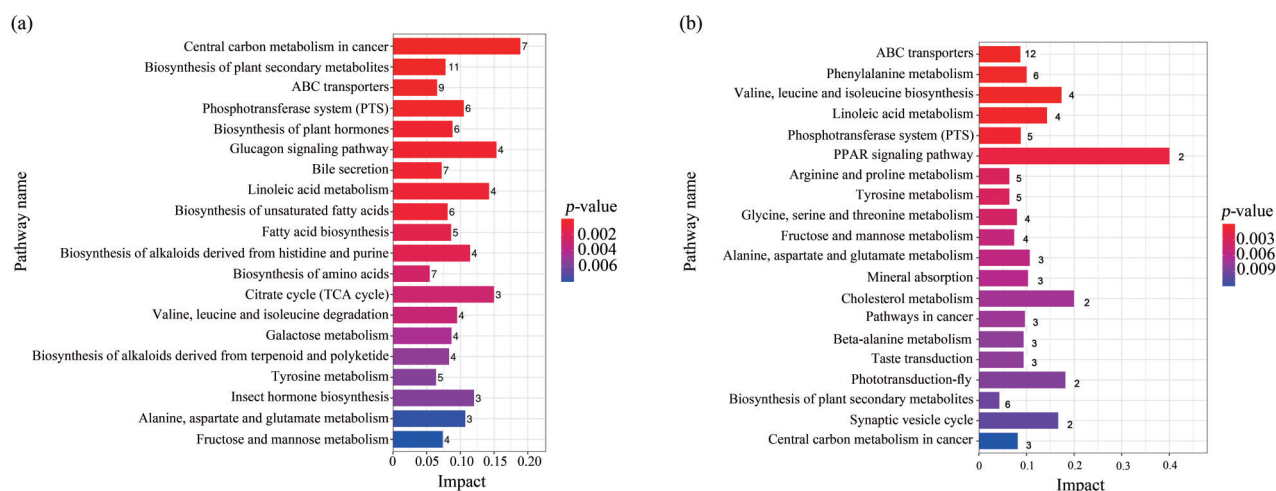


Fig. 3 Heatmap of differential metabolites
Red: up-regulated metabolites; blue: down-regulated metabolites.

Table 1 Comparison of metabolites in high-dosage alcohol group and control group

ID	Metabolites	High (content)	H ₂ O (content)	FC (High/H ₂ O)	Log ₂ FC
M240T483	Glucosamine 6-phosphate	1.16×10 ⁷	1.33×10 ⁵	86.850	6.440
M113T106	Glutaric acid	6.58×10 ⁷	9.07×10 ⁵	72.574	6.181
M369T955	5alpha-Cholestanone	3.94×10 ⁸	6.47×10 ⁶	60.910	5.929
M132T294	L-leucine	2.84×10 ⁹	9.81×10 ⁷	28.974	4.857
M369T789	Cholesterol	1.04×10 ⁸	4.75×10 ⁶	21.888	4.452
M313T825_2	13-L-hydroperoxylinoleic acid	2.23×10 ⁹	1.13×10 ⁸	19.755	4.304
M200T653	Dodecanoic acid	3.38×10 ⁷	2.76×10 ⁶	12.240	3.614
M183T308	Sorbitol	5.38×10 ⁷	4.43×10 ⁶	12.135	3.601
M180T104	D-fructose	4.15×10 ⁷	4.28×10 ⁶	9.692	3.277
M102T740	(S)-Methylmalonic acid semialdehyde	4.55×10 ⁷	5.28×10 ⁶	8.617	3.107
M170T333	Norepinephrine	1.39×10 ⁷	1.27×10 ⁸	0.109	-3.194
M293T702	Gingerol	7.46×10 ⁵	7.47×10 ⁶	0.100	-3.324
M482T810	Antibiotic JI-20A	3.15×10 ⁷	3.93×10 ⁸	0.080	-3.643
M282T822	Oleic acid	6.05×10 ⁷	8.34×10 ⁸	0.073	-3.783
M282T734	Oleamide	2.33×10 ⁷	3.91×10 ⁸	0.060	-4.069
M149T922	3-Methyladenine	1.15×10 ⁶	1.19×10 ⁸	0.010	-6.700
M170T422	Selenocysteine	1.89×10 ⁶	2.59×10 ⁸	0.007	-7.101
M319T960_1	Alloepipregnanolone	3.47×10 ⁵	1.50×10 ⁸	0.002	-8.749
M425T942	Alpha-tocotrienol	1.03×10 ⁵	7.37×10 ⁷	0.001	-9.479
M496T655	1-Palmitoylglycerophosphocholine	6.37×10 ⁵	6.99×10 ⁸	0.001	-10.101

**Fig. 4** Enriched KEGG pathways of differential metabolites in mesenteric lymph

(a) Enriched KEGG pathways of the differential metabolites (high-dosage alcohol group vs control group); (b) enriched KEGG pathways of differential metabolites (medium-dosage alcohol group vs control group).

Table 2 Contents of fatty acid in mesenteric lymph fluid between high-dosage alcohol group and control group			
Metabolites	High (content)	H ₂ O (content)	FC (High/H ₂ O)
Arachidonic acid	5.57×10 ⁹	7.68×10 ⁸	7.25
Palmitic acid	1.18×10 ⁸	8.05×10 ⁸	0.15
Oleic acid	6.05×10 ⁷	8.34×10 ⁸	0.07
Stearic acid	7.97×10 ⁶	3.48×10 ⁷	0.23
Arachidic acid	8.94×10 ⁷	2.38×10 ⁸	0.38
Erucic acid	3.05×10 ⁹	7.17×10 ⁹	0.43

各饮酒组与对照组相比, 胆汁酸相关代谢物均有变化 (表3~5)。高剂量饮酒组中上调变化最大的是胆固醇与甘氨酸鹅脱氧胆酸, 下调变化最大的为胆碱, 前两者属于胆汁分泌与初级胆汁酸代谢通路, 后者属于胆汁分泌代谢通路; 中剂量饮酒组中, 胆碱上调变化最大, 牛磺酸下调变化最大, 前者属于胆汁分泌代谢通路, 后者属于初级胆汁酸合成代谢通路; 低剂量饮酒组中, 胆固醇与左旋肉碱变化大, 二者均属于胆汁分泌代谢通路。

Table 3 Contents of bile acid in mesenteric lymph fluid (high-dosage vs control group)				
Metabolites	High (content)	H ₂ O (content)	FC (High/H ₂ O)	Pathway names
Cholesterol	1.04×10 ⁸	4.75×10 ⁶	21.89	Primary bile acid biosynthesis, bile secretion
Glycochenodeoxycholic acid	6.02×10 ⁶	2.02×10 ⁶	2.97	Primary bile acid biosynthesis, secondary bile acid biosynthesis, bile secretion
Allocholic acid	2.11×10 ⁸	8.60×10 ⁷	2.45	Primary bile acid biosynthesis, secondary bile acid biosynthesis, bile secretion
Deoxycholic acid	8.12×10 ⁶	3.51×10 ⁶	2.32	Secondary bile acid biosynthesis, bile secretion
Oxoglutaric acid	6.15×10 ⁶	1.55×10 ⁷	0.40	Bile secretion
Choline	1.35×10 ⁶	8.27×10 ⁶	0.16	Bile secretion

Table 4 Contents of bile acid in mesenteric lymph fluid (medium-dosage vs control group)				
Metabolites	Medium (content)	H ₂ O (content)	FC (Medium/H ₂ O)	Pathway names
Choline	1.36×10 ⁸	8.27×10 ⁶	16.40	Bile secretion
Cholesterol	3.17×10 ⁷	4.75×10 ⁶	6.68	Primary bile acid biosynthesis, Bile secretion
Taurochenodesoxycholic acid	2.08×10 ⁷	9.92×10 ⁶	2.10	Primary bile acid biosynthesis, Secondary bile acid biosynthesis, Bile secretion
Taurine	5.93×10 ⁶	2.80×10 ⁷	0.21	Primary bile acid biosynthesis

Table 5 Contents of bile acid in mesenteric lymph fluid (low-dosage vs control group)				
Metabolites	Low (content)	H ₂ O (content)	FC (Low/H ₂ O)	Pathway names
Cholesterol	2.13×10 ⁷	4.75×10 ⁶	4.48	Primary bile acid biosynthesis, bile secretion
L-carnitine	2.64×10 ⁷	9.85×10 ⁷	0.27	Bile secretion

2.4 酒后肠系膜淋巴液中代谢物与神经、精神、癌症等疾病密切相关

高剂量与对照组相比: 差异代谢物主要关联疾病有精神分裂症、阿尔茨海默病、肺癌、卡纳万病、高脂蛋白血症、丙二酰辅酶A脱羧酶缺乏等疾病。与精神分裂症相关的代谢物中上调变化最大的

为L-亮氨酸和胆固醇, 下调变化最大的是别孕烯醇酮和油酸; 与阿尔茨海默病相关的代谢物中上调变化最大的是L-亮氨酸和山梨糖醇, 下调变化最大的是甲基丙二酸以及胆碱; L-亮氨酸在以上两种疾病中均被富集到; 与肺癌相关的代谢物中, 富马酸和胆碱变化最大 (图5, 表6)。

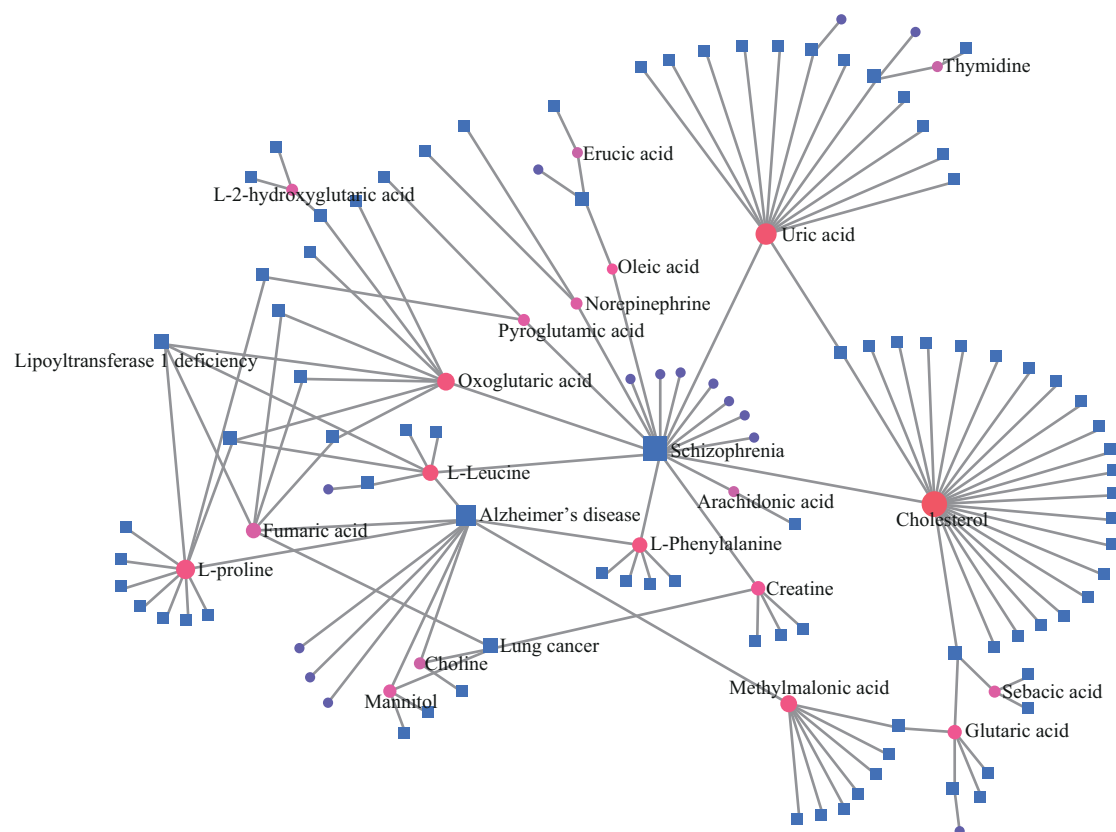


Fig. 5 Relationship of diseases and differential metabolites (high-dosage vs control group)

The blue squares represent diseases and the dots represent metabolites. The size of node corresponds to its node degree in the network. The color of dots corresponds to the betweenness centrality. The node with stronger color is more important in the network (The node degree refers to the number of links between the node and other nodes. Betweenness centrality represents the proportion of all the shortest paths that pass through a node in a complex network, reflecting the degree of centralization of the node).

Table 6 List of diseases and differential metabolites (high-dosage vs control group)

Disease	Metabolites	High (content)	H ₂ O (content)	FC (High/H ₂ O)
Schizophrenia	L-leucine	2.84×10 ⁹	9.81×10 ⁷	28.973
	Cholesterol	1.04×10 ⁸	4.75×10 ⁶	21.888
	Arachidonic acid	5.57×10 ⁹	7.68×10 ⁸	7.249
	N-acetylserotonin	6.45×10 ⁷	1.58×10 ⁷	4.087
	Uric acid	3.05×10 ⁸	7.91×10 ⁷	3.856
	L-phenylalanine	1.77×10 ⁷	8.64×10 ⁶	2.052
	13,14-dihydro-15-keto-PGE2	1.88×10 ⁷	9.28×10 ⁶	2.029
	Catechol	7.23×10 ⁵	1.76×10 ⁶	0.410
	Oxoglutaric acid	6.15×10 ⁶	1.55×10 ⁷	0.397
	Creatine	2.38×10 ⁷	6.31×10 ⁷	0.377
	Arachidic acid	8.94×10 ⁷	2.38×10 ⁸	0.375
	Pyroglutamic acid	4.76×10 ⁵	2.04×10 ⁶	0.233
	Stearic acid	7.97×10 ⁶	3.48×10 ⁷	0.229
	Palmitic acid	1.18×10 ⁸	8.05×10 ⁸	0.147
	Norepinephrine	1.39×10 ⁷	1.27×10 ⁸	0.109
	Oleic acid	6.05×10 ⁷	8.34×10 ⁸	0.073
	Alloepipregnanolone	3.47×10 ⁵	1.50×10 ⁸	0.002
Alzheimer's disease	L-leucine	2.84×10 ⁹	9.81×10 ⁷	28.974
	Sorbitol	5.38×10 ⁷	4.43×10 ⁶	12.135

Continued to Table 6				
Disease	Metabolites	High (content)	H ₂ O (content)	FC (High/H ₂ O)
Lung cancer	Fumaric acid	8.10×10 ⁶	9.98×10 ⁵	8.120
	Mannitol	4.47×10 ⁷	1.10×10 ⁷	4.071
	L-proline	2.72×10 ⁷	7.85×10 ⁶	3.465
	Galactitol	9.46×10 ⁷	4.01×10 ⁷	2.358
	L-phenylalanine	1.77×10 ⁷	8.64×10 ⁶	2.052
	Methylmalonic acid	8.64×10 ⁶	5.28×10 ⁷	0.164
	Choline	1.35×10 ⁶	8.27×10 ⁶	0.163
	Fumaric acid	8.10×10 ⁶	9.98×10 ⁵	8.120
	Mannitol	4.47×10 ⁷	1.10×10 ⁷	4.072
	Creatine	2.38×10 ⁷	6.31×10 ⁷	0.377
Canavan disease	Choline	1.35×10 ⁶	8.27×10 ⁶	0.163
	Uric acid	3.05×10 ⁸	7.91×10 ⁷	3.856
	Thymidine	3.59×10 ⁷	1.50×10 ⁷	2.391
Isovaleric acidemia	3-methyladenine	1.15×10 ⁶	1.19×10 ⁸	0.010
	Palmitoleic acid	6.27×10 ⁷	2.49×10 ⁷	2.520
	Erucic acid	3.05×10 ⁹	7.17×10 ⁹	0.425
	Oleic acid	6.05×10 ⁷	8.34×10 ⁸	0.073

中剂量饮酒组与对照组相比，差异代谢物主要关联疾病有：精神分裂症、阿尔茨海默病、肺癌、帕金森病、枫糖尿病等。与精神分裂症相关的代谢物中上调变化最大的是L-亮氨酸和胆固醇，下调变化最大的是甲基丙二酸与L-苏氨酸变化最大；与肺癌相关的代谢物中胆碱和牛磺酸变化最大。(图6，表7)

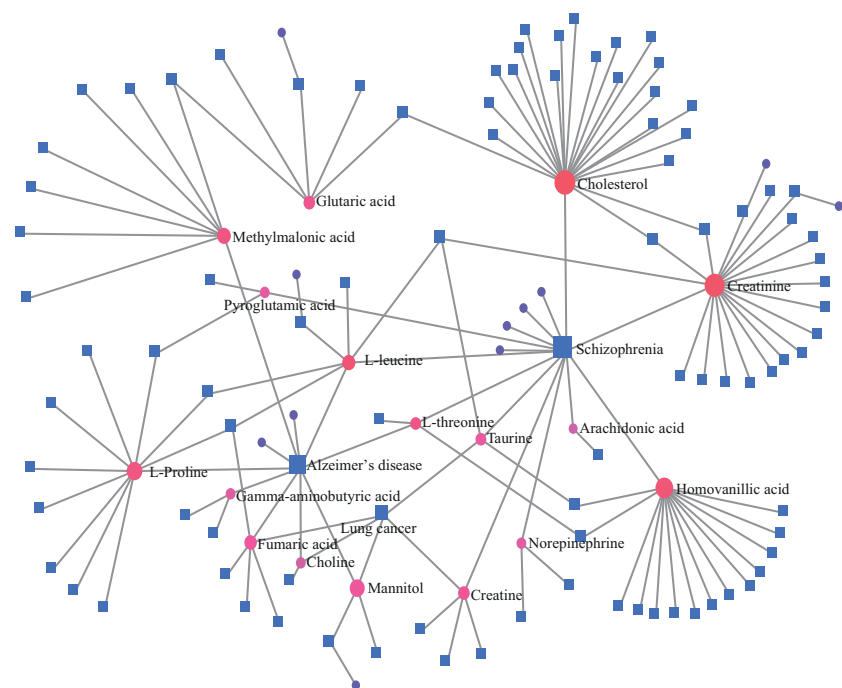


Fig. 6 Relationship of diseases and differential metabolites (medium-dosage vs control group)
The blue squares represent diseases and the dots represent metabolites. The size of node corresponds to its node degree in the network. The color of dots corresponds to the betweenness centrality. The node with stronger color is more important in the network (The node degree refers to the number of links between the node and other nodes. Betweenness centrality represents the proportion of all the shortest paths that pass through a node in a complex network, reflecting the degree of centralization of the node).

Table 7 List of diseases and differential metabolites (medium-dosage vs control group)

Disease	Metabolites	Medium (content)	H ₂ O (content)	FC (Medium/H ₂ O)
Schizophrenia	L-leucine	8.85×10 ⁸	9.81×10 ⁷	9.03
	Cholesterol	3.17×10 ⁷	4.75×10 ⁶	6.68
	Alloepipregnanolone	7.96×10 ⁸	1.50×10 ⁸	5.33
	Homovanillic acid	1.81×10 ⁸	3.60×10 ⁷	5.03
	N-acetylserotonin	3.41×10 ⁷	1.58×10 ⁷	2.16
	Norepinephrine	4.18×10 ⁷	1.27×10 ⁸	0.33
	Arachidonic acid	2.41×10 ⁸	7.68×10 ⁸	0.31
	gamma-glutamylcysteine	2.57×10 ⁶	8.70×10 ⁶	0.30
	Stearic acid	8.40×10 ⁶	3.48×10 ⁷	0.24
	Creatine	1.39×10 ⁷	6.31×10 ⁷	0.22
	Pyroglutamic acid	4.23×10 ⁵	2.04×10 ⁶	0.21
	Taurine	5.93×10 ⁶	2.80×10 ⁷	0.21
	L-threonine	1.06×10 ⁷	5.26×10 ⁷	0.20
	Creatinine	1.40×10 ⁶	1.01×10 ⁷	0.14
	Choline	1.36×10 ⁸	8.27×10 ⁶	16.39
Alzheimer's disease	L-leucine	8.85×10 ⁸	9.81×10 ⁷	9.03
	Sorbitol	2.56×10 ⁷	4.43×10 ⁶	5.77
	Fumaric acid	3.73×10 ⁶	9.98×10 ⁵	3.74
	L-proline	2.73×10 ⁷	7.85×10 ⁶	3.48
	Mannitol	2.85×10 ⁷	1.10×10 ⁷	2.59
	Gamma-aminobutyric acid	2.22×10 ⁵	9.18×10 ⁵	0.24
	L-threonine	1.06×10 ⁷	5.26×10 ⁷	0.20
	Methylmalonic acid	9.13×10 ⁶	5.28×10 ⁷	0.17
	Choline	1.36×10 ⁸	8.27×10 ⁶	16.39
Lung cancer	Fumaric acid	3.73×10 ⁶	9.98×10 ⁵	3.74
	Mannitol	2.85×10 ⁷	1.10×10 ⁷	2.59
	Creatine	1.39×10 ⁷	6.31×10 ⁷	0.22
	Taurine	5.93×10 ⁶	2.80×10 ⁷	0.21
	Homovanillic acid	1.81×10 ⁸	3.60×10 ⁷	5.03
Parkinson's disease	Taurine	5.93×10 ⁶	2.80×10 ⁷	0.21
	L-leucine	8.85×10 ⁸	9.81×10 ⁷	9.03
Maple syrup urine disease	Creatine	1.39×10 ⁷	6.31×10 ⁷	0.22
	Taurine	5.93×10 ⁶	2.80×10 ⁷	0.21

低剂量与对照组相比,差异代谢物主要关联疾病有:精神分裂症、高血压疾病等。与精神分裂症相关的代谢物中上调变化最大的是N-乙酰血清素,下调变化最大的是油酸;与高血压相关的代谢物中变化最大的为花生四烯酸和二氢尿嘧啶(表8,图7)。

从代谢物含量看,随着饮酒剂量的增加,与疾病(精神分裂症、阿尔茨海默病、肺癌)相关的一些代谢物含量发生渐进变化。其中淋巴液中代谢物胆固醇(Cholesterol)、L-亮氨酸(L-Leucine)、富马酸(Fumaric acid)、甘露醇(Mannitol)的含量

随着饮酒剂量的增加而增加(图8)。从代谢物数目看:中剂量饮酒组与精神分裂症相关的代谢物富集到了14种,而高剂量饮酒组富集到了17种代谢物,代谢物数目增加了3个;中剂量饮酒组与阿尔茨海默病相关的代谢物富集到9种,高剂量饮酒组富集到9种;中剂量饮酒组关于肺癌相关的代谢物富集到5种,高剂量饮酒组富集到4种(表6,7)。从整体看,与精神分裂症相关的代谢物数目随饮酒量增加有增多趋势。这些结果表明,经肠-淋巴途径吸收的一些代谢物对酒精具有剂量依赖性,高剂量饮酒可能会加重或加速相关疾病的发生。

Table 8 List of diseases and differential metabolites (low-dosage vs control group)				
Disease	Metabolites	Low (content)	H ₂ O (content)	FC (Low/H ₂ O)
Schizophrenia	N-Acetylserotonin	2.53×10 ⁸	1.58×10 ⁷	16.05
	Arachidonic acid	3.85×10 ⁹	7.68×10 ⁸	5.02
	Cholesterol	2.13×10 ⁷	4.75×10 ⁶	4.48
	Alloepipregnanolone	6.50×10 ⁸	1.50×10 ⁸	4.35
	Norepinephrine	2.74×10 ⁷	1.27×10 ⁸	0.22
	Creatinine	1.93×10 ⁶	1.01×10 ⁷	0.19
	Oleic acid	3.74×10 ⁷	8.34×10 ⁸	0.04
Hypertension	Arachidonic acid	3.85×10 ⁹	7.68×10 ⁸	5.02
	Alpha-Linolenic acid	7.94×10 ⁷	1.68×10 ⁸	0.47
	Dihydrouracil	8.07×10 ⁶	3.05×10 ⁷	0.26
Canavan disease	Thymidine	3.15×10 ⁷	1.50×10 ⁷	2.10
	Uridine	2.16×10 ⁶	4.93×10 ⁶	0.44
	Creatinine	1.93×10 ⁶	1.01×10 ⁷	0.19
Isovaleric acidemia	Erucic acid	1.47×10 ¹⁰	7.17×10 ⁹	2.05
	Alpha-Linolenic acid	7.94×10 ⁷	1.68×10 ⁸	0.47
	Oleic acid	3.74×10 ⁷	8.34×10 ⁸	0.04
Phenylketonuria	2-Hydroxyphenylacetate	1.42×10 ⁷	3.21×10 ⁷	0.44
	Creatinine	1.93×10 ⁶	1.01×10 ⁷	0.19

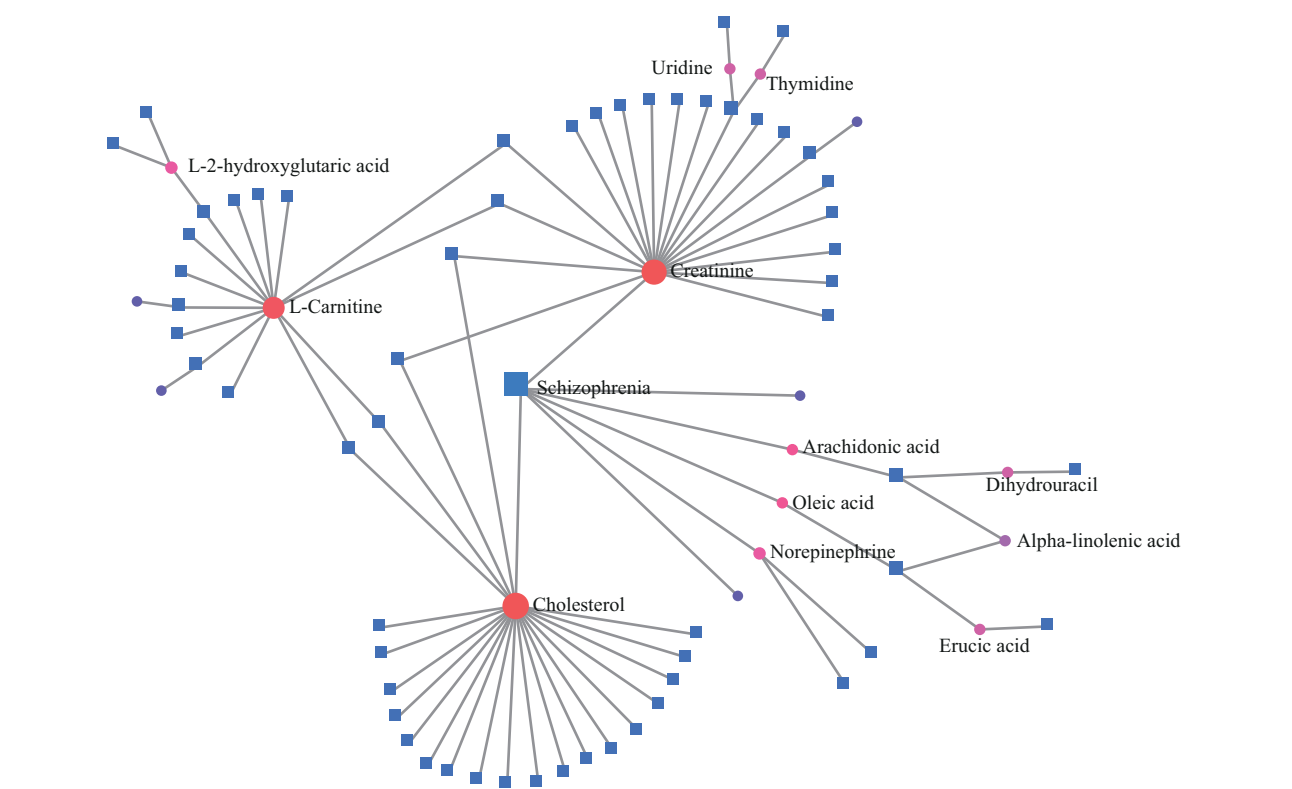


Fig. 7 Relationship of diseases and differential metabolites (low-dosage vs control group)

The blue squares represent diseases and the dots represent metabolites. The size of node corresponds to its node degree in the network. The color of dots corresponds to the betweenness centrality. The node with stronger color is more important in the network (The node degree refers to the number of links between the node and other nodes. Betweenness centrality represents the proportion of all the shortest paths that pass through a node in a complex network, reflecting the degree of centralization of the node).

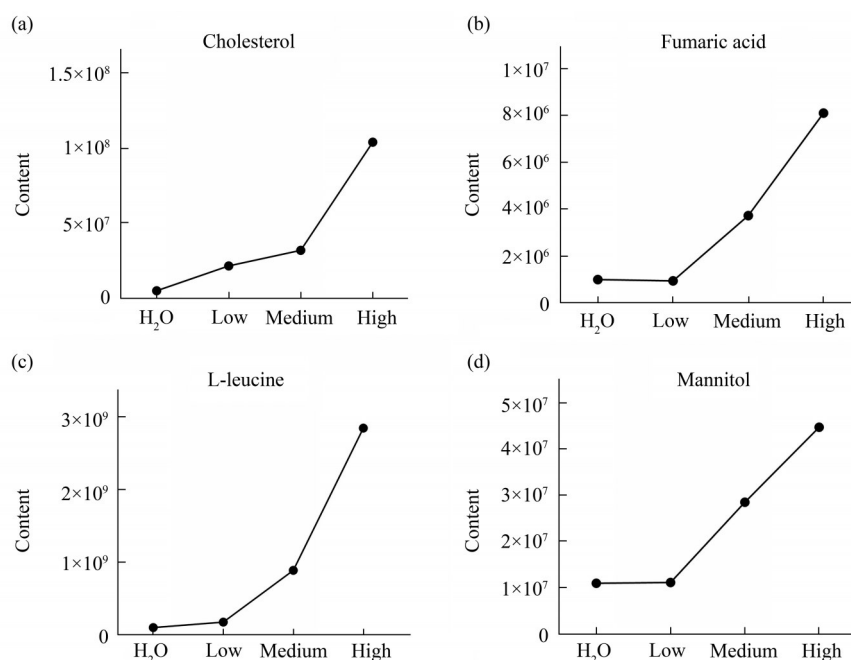


Fig. 8 Some metabolites absorbed by the intestinal-lymphatic pathway are dose-dependent on alcohol intake

(a) The content of cholesterol; (b) the content of fumaric acid; (c) the content of L-leucine; (d) the content of mannitol.

3 讨 论

饮酒剂量是人们广泛关注的问题。本研究按人和动物间体表面积折算的等效剂量比值换算,对于70 kg的人,高、中、低剂量组分别相当于饮用56、28、5.6度白酒111 ml。世界卫生组织定义的“标准酒精摄入量”是10 g酒精,建议男性和女性每天的饮酒量不应超过2个“标准酒精摄入量”。因此高剂量饮酒组大约是6个“标准酒精摄入量”。本研究发现,高剂量饮酒后肠系膜淋巴液中代谢物发生显著变化,表明高剂量饮酒可能通过肠淋巴途径带来较大危害。

Voutilainen等^[6]对饮酒后血液中代谢物变化进行了汇总,其中苯丙氨酸和甘氨酸脱氧胆酸在饮酒后血液中上调,这两种物质在高剂量饮酒组淋巴液中分别上调了2.05倍和2.97倍,与血液中变化趋势一致。酒后血液中谷氨酰胺为下调趋势,本文发现中剂量饮酒和低剂量饮酒后的淋巴液中分别下调至对照组的1/7和1/3左右。由于血液中的物质部分来源于淋巴液,这证明了淋巴液中物质对血液循环的贡献,也说明了本实验数据的可靠性。

一般认为,肠淋巴途径主要转运脂类物质,而本文发现酒后淋巴液中糖类和氨基酸类物质也发生了明显改变。比较高剂量饮酒和对照组发现,糖类

物质山梨醇、D-果糖、D-甘露糖分别上调了12.14、9.69、8.07倍,氨基酸类物质乙酰半胱氨酸下调至对照组的1/4左右;另外,胆固醇上调了21.89倍等。比较中剂量饮酒和对照组发现,氨基酸类物质:L-亮氨酸、L-脯氨酸分别上调了9.03倍、3.48倍,焦谷氨酸、L-苏氨酸分别下调至对照组的1/5左右,糖类物质D-果糖、D-甘露糖分别上调3.58、2.57倍。氨基酸的吸收主要发生在肠内的十二指肠和空肠,通过主动转运进入小肠绒毛细胞和肠上皮细胞,之后进入到肠道血管内通过血液循环被运送到全身各处。糖类物质在机体中被小肠内的酶分解为单糖,之后通过主动运输和被动扩散吸收入血。本文结果表明,肠道内的糖类、氨基酸等物质可能会通过肠-淋巴途径吸收,并且饮酒后这些物质的运输会发生变化。

饮酒与炎症反应密切相关^[17],高剂量饮酒组与对照组的差异代谢物富集到了不饱和脂肪酸生物合成通路,此通路相关物质包含花生四烯酸、油酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、芥酸,其中,花生四烯酸在高剂量组上调7.25倍,而其他几种脂肪酸均下调。花生四烯酸可通过前列腺素和白三烯通路引起促炎反应^[18],而部分下调的脂肪酸具有一定抑炎作用,如:油酸可通过Ras/MAPKs/PPAR- γ 信号通路抑制炎症和氧化应激反应^[19]。这些结果表

明, 酒后肠淋巴途径对不同脂类物质的吸收具有选择性, 且可能通过促进花生四烯酸吸收而引起炎症反应。

另外, 在饥饿状态下, 胆汁酸由肝脏分泌进入胆管并被储存到胆囊, 进食以后, 胆囊收缩, 会将贮存的胆汁酸排入小肠。在小肠中, 95%的胆汁酸会经门静脉重吸收返回肝脏, 而另外5%左右会以粪便的形式排出体外, 这是机体的肝肠循环^[20-21]。本实验在肠系膜淋巴液中也发现了胆汁酸及其相关代谢物, 这说明一部分胆汁酸也会通过肠系膜淋巴液转运入血。另外, 有研究发现, 在阿尔茨海默病患者的血清中胆汁酸发生了变化, 其中脱氧胆酸及其甘氨酸和牛磺酸结合形式的次级胆汁酸水平增加^[22], 本实验中高剂量饮酒组和中剂量饮酒组较对照组肠系膜淋巴液中的胆汁酸相关代谢物含量也发生了变化。鉴于胆汁酸与阿尔茨海默病的相关性, 淋巴液中胆汁酸相关代谢物直接进入血液, 可能会增加饮酒后患阿尔茨海默病的风险。

胆固醇在高、中、低剂量饮酒组中分别上调21.89、6.68、4.48倍, 这说明饮酒会导致淋巴液中胆固醇的含量增加, 进而血液中的胆固醇含量也会增加。研究表明, 血清低密度脂蛋白胆固醇升高是动脉粥样硬化的主要危险因素。胆固醇、脂肪和其他物质在主动脉中积聚可以形成斑块, 减慢血液流动并降低血管弹性, 进而引发心梗、脑梗等心脑血管疾病^[23-24]。因此, 肠系膜淋巴液中的胆固醇增高可能是导致饮酒后机体易患心脑血管疾病的一大诱因。

通过差异代谢物与疾病之间的相关分析, 高、中剂量饮酒组相比对照组中的差异代谢物均富集到了阿尔茨海默病。阿尔茨海默病是一种进行性神经退行性疾病, 其特征是行为异常和认知缺陷。 γ 氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 作为大脑中主要的抑制性神经递质, 与认知功能有关, 有研究表明, GABA水平升高与阿尔茨海默病风险降低相关^[25-26]。本研究中, 低剂量组与中剂量组和对照组相比, GABA均下调至对照组的1/4左右。因此, 饮酒后GABA的降低可能是导致阿尔茨海默病的一个重要原因。胆碱是大脑中一种重要的神经递质, 对大脑有一定的保护作用。饮酒会对神经系统产生影响, 而胆碱可以帮助维持神经系统的正常功能。本研究发现, 胆碱在中剂量组上调16.39倍, 而在高剂量组下调至对照组的1/6左右。说明中剂量饮酒后, 可能触发了胆碱的保护机制, 胆碱

含量增加, 抵抗酒精对记忆和认知能力的损伤^[27]。但高剂量饮酒后, 胆碱含量下降, 这可能是高剂量饮酒后诱发阿尔茨海默病的一个重要原因^[28-29]。综上所述, 从个别代谢物的变化看, 中剂量饮酒不一定只有损伤作用, 可能也有一定的保护作用, 但还要从整体进行分析来确定饮酒是否有危害性。

精神分裂症是一种症状复杂多样的认知综合征, 对个人和社会都有巨大的影响^[30]。GABA系统、多巴胺和谷氨酸系统的功能紊乱与精神分裂症的发生密切相关^[31-32]。Arrúe等^[33]测定了精神分裂症患者血浆中GABA的浓度, 发现精神分裂症患者的GABA水平显著低于对照组; 另外, 临床研究表明, 在精神分裂症患者中, 血浆多巴胺代谢产物高香草酸 (homovanillic acid, HVA) 水平随着疾病的严重程度而增加^[34]。因此, 本文分析了实验结果中GABA和HVA的表达水平, 发现GABA在低、中剂量组与对照组相比均降低, 对于HVA, 中剂量饮酒组上调了5.03倍, 表明饮酒可能与精神分裂相关。Yao等^[35]研究表明, 精神分裂症患者的血浆中N-乙酰血清素相比于健康对照组显著增加。本实验中高、中剂量饮酒组肠系膜淋巴液中N-乙酰血清素均升高, 表明饮酒可能与精神分裂症的发生相关。另外, 淋巴液中增高的N-乙酰血清素入血后, 可以通过激活大脑中的酪氨酸激酶受体B (tyrosine kinase receptor B, TrkB) 来发挥抗抑郁作用^[36], 这也就能够解释饮酒后容易出现兴奋现象的原因。

事实上, 阿尔茨海默病和精神分裂症这些精神类疾病都与炎症反应有着密切的联系, 炎症反应是许多疾病的病理基础。研究发现, 在精神分裂症患者的血液和脑脊液中, 促炎标志物 (如细胞因子) 的水平升高, 其中花生四烯酸作为脂质的主要成分, 可以通过环氧合酶、脂氧合酶和细胞色素P450酶三种代谢途径, 转化为引发炎症反应的各种代谢物^[37-38]。随着炎症时间的延长, 可以促进机体释放各种炎症因子和细胞因子, 导致促炎反应始终比抗炎反应强, 最终损害神经元并引起体内各种病理改变, 导致神经和精神类疾病的发生。因此, 肠淋巴途径中这些炎症相关代谢物的变化可能是造成饮酒后精神类疾病发生的一大原因。

本实验的局限性在于只选取了大鼠饮酒后的一个时间点收集淋巴液, 数据仅为一个时间点的结果, 仍需要通过多时间点的检测, 来进一步明确酒精的急性和慢性作用。另外, 每组淋巴液样本为三

只大鼠的淋巴液混合样,忽略了大鼠之间的个体差异,但从整体观测淋巴液中代谢物的变化,具有较好的可靠性。并且本实验为动物实验,不能准确反映人类饮酒的真实情况。此外,多项研究发现连续高剂量饮酒可引起肝脏损伤,出现肝脏炎症增加、肝细胞点状坏死、转氨酶升高等现象^[11-13],这是否会影响肝脏的胆汁分泌和排泄,进一步导致淋巴液中所转运的物质发生变化,是值得思考的问题。这可能是解释饮酒后淋巴液成分改变的关键,因此,后续研究中,应明确饮酒后肝损伤对肠淋巴途径的影响。

4 结 论

大鼠酒精灌胃后,肠系膜淋巴液中大量代谢物发生了变化,尤其是高剂量饮酒组,差异代谢物的数目和含量均有更为显著的变化。这些差异代谢物与炎症反应、神经系统疾病、精神性疾病、癌症的发生密切相关。由于淋巴液进入血液的过程中没有生物转化作用,因此,酒精通过淋巴途径对这些疾病有更为直接的影响。另外,随着饮酒剂量的增加,淋巴液中与疾病相关的一些代谢物含量随之增加,其中与精神分裂症相关的代谢物数目有增多趋势,表明经肠-淋巴途径吸收的一些代谢物对酒精具有剂量依赖性。这些结果明确了连续饮酒对机体的潜在影响,对于健康饮酒提供了理论依据。

附件 见本文网络版 (<http://www.pibb.ac.cn> 或 <http://www.cnki.net>):

PIBB_20230402_Table_S1.xlsx

参 考 文 献

- [1] Barbería-Latasa M, Gea A, Martínez-González M A. Alcohol, drinking pattern, and chronic disease. *Nutrients*, 2022, **14**(9): 1954
- [2] Collaborators G B D A. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*, 2018, **392**(10152): 1015-1035
- [3] Rumgay H, Shield K, Charvat H, *et al.* Global burden of cancer in 2020 attributable to alcohol consumption: a population-based study. *Lancet Oncol*, 2021, **22**(8): 1071-1080
- [4] Roerecke M. Alcohol's impact on the cardiovascular system. *Nutrients*, 2021, **13**(10): 3419
- [5] Peng B, Yang Q, Joshi R B, *et al.* Role of alcohol drinking in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(7): 2316
- [6] Voutilainen T, Kärkkäinen O. Changes in the human metabolome associated with alcohol use: a review. *Alcohol Alcohol*, 2019, **54**(3): 225-234
- [7] Lian J S, Liu W, Hao S R, *et al.* A serum metabonomic study on the difference between alcohol- and HBV-induced liver cirrhosis by ultraperformance liquid chromatography coupled to mass spectrometry plus quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Chin Med J (Engl)*, 2011, **124**(9): 1367-1373
- [8] Ridlon J M, Kang D J, Hylemon P B, *et al.* Gut microbiota, cirrhosis, and alcohol regulate bile acid metabolism in the gut. *Dig Dis*, 2015, **33**(3): 338-345
- [9] Engen P A, Green S J, Voigt R M, *et al.* The gastrointestinal microbiome: alcohol effects on the composition of intestinal microbiota. *Alcohol Res*, 2015, **37**(2): 223-236
- [10] Hussain M M. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol*, 2014, **25**(3): 200-206
- [11] 田苗苗, 霍丽娟, 晋阳. 乙酰半胱氨酸对急性酒精性肝损伤大鼠 NF- κ B 和 TNF- α 的影响. *山西医科大学学报*. 2010, **41**(2): 113-115
- [12] Tian M M, Huo L J, Jin Y. *Journal of Shanxi Medical University*, 2010, **41**(2): 113-115
- [13] Qiao J Y, Li H W, Liu F G, *et al.* Effects of Portulaca Oleracea extract on acute alcoholic liver injury of rats. *Molecules*, 2019, **24**(16): 2887
- [14] 陈世林, 洪汝涛, 刁磊, 等. 水飞蓟素对大鼠急性酒精性肝损伤的保护作用. *安徽医科大学学报*. 2010, **45**(2): 209-212
- [15] Chen S L, Hong R T, Diao I, *et al.* *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2010, **45**(2): 209-212
- [16] Demurtas A, Pescina S, Nicoli S, *et al.* Validation of a HPLC-UV method for the quantification of budesonide in skin layers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2021, **1**(1164): 122512
- [17] Zelena E, Dunn W B, Broadhurst D, *et al.* Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum. *Anal Chem*, 2009, **81**(4): 1357-1364
- [18] Want E J, Masson P, Michopoulos F, *et al.* Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nat Protoc*, 2013, **8**(1): 17-32
- [19] Wang H J, Zakhari S, Jung M K. Alcohol, inflammation, and gut-liver-brain interactions in tissue damage and disease development. *World J Gastroenterol*, 2010, **16**(11): 1304-1313
- [20] Samuelsson B. Arachidonic acid metabolism: role in inflammation. *Z Rheumatol*, 1991, **50** Suppl 1(1): 3-6
- [21] Zhang B, Zeng M, Wang Y, *et al.* Oleic acid alleviates LPS-induced acute kidney injury by restraining inflammation and oxidative stress via the Ras/MAPKs/PPAR-gamma signaling pathway. *Phytomedicine*, 2022 (94): 153818
- [22] 刘笑, 王琰. 胆汁酸的合成调控及其在生理与病理中的功能机制. *遗传*, 2019, **41**(5): 365-374
- [23] Liu X, Wang Y. *Hereditas (Beijing)*, 2019, **41**(5): 365-374
- [24] Vlahcevic Z R, Heuman D M, Hylemon P B. Regulation of bile acid synthesis. *Hepatology*, 1991, **13**(3): 590-600
- [25] Mahmoudiandehkordi S, Arnold M, Nho K, *et al.* Altered bile acid

- profile associates with cognitive impairment in Alzheimer's disease-an emerging role for gut microbiome. *Alzheimers Dement*, 2019, **15**(1): 76-92
- [23] Chiang J Y L, Ferrell J M, Wu Y, *et al.* Bile acid and cholesterol metabolism in atherosclerotic cardiovascular disease and therapy. *Cardiol Plus*, 2020, **5**(4): 159-170
- [24] Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, *et al.* High-cholesterol feeding aggravates cerebral infarction *via* decreasing the CB1 receptor. *Neurosci Lett*, 2007, **414**(2): 183-187
- [25] Bai X, Edden R A, Gao F, *et al.* Decreased gamma-aminobutyric acid levels in the parietal region of patients with Alzheimer's disease. *J Magn Reson Imaging*, 2015, **41**(5): 1326-1331
- [26] Xu Y, Zhao M, Han Y, *et al.* GABAergic inhibitory interneuron deficits in Alzheimer's disease: implications for treatment. *Front Neurosci*, 2020, **30**(14): 660
- [27] Bekdash R A. Choline and the brain: an epigenetic perspective. *Adv Neurobiol*, 2016, **12**: 381-399
- [28] Judd J M, Jasbi P, Winslow W, *et al.* Inflammation and the pathological progression of Alzheimer's disease are associated with low circulating choline levels. *Acta Neuropathol*, 2023, **146**(4): 565-583
- [29] Yuan J, Liu X, Liu C, *et al.* Is dietary choline intake related to dementia and Alzheimer's disease risks? Results from the Framingham Heart Study. *Am J Clin Nutr*, 2022, **116**(5): 1201-1207
- [30] Owen M J, Sawa A, Mortensen P B. Schizophrenia. *Lancet*, 2016, **388**(10039): 86-97
- [31] Schmidt M J, Mirmics K. Neurodevelopment, GABA system dysfunction, and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 2015, **40**(1): 190-206
- [32] Howes O, Mccutcheon R, Stone J. Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century. *J Psychopharmacol*, 2015, **29**(2): 97-115
- [33] Arrúe A, Dávila R, Zumárraga M, *et al.* GABA and homovanillic acid in the plasma of Schizophrenic and bipolar I patients. *Neurochem Res*, 2010, **35**(2): 247-253
- [34] Garcia A, Galinowski A, Guicheney P, *et al.* Free and conjugated plasma homovanillic acid in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry*, 1989, **26**(1): 87-96
- [35] Yao J K, Dougherty G G Jr, Reddy R D, *et al.* Altered interactions of tryptophan metabolites in first-episode neuroleptic-naive patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 2010, **15**(9): 938-953
- [36] Tosini G, Ye K, Iuvone P M. N-acetylserotonin: neuroprotection, neurogenesis, and the sleepy brain. *Neuroscientist*, 2012, **18**(6): 645-653
- [37] Wang T, Fu X, Chen Q, *et al.* Arachidonic acid metabolism and kidney inflammation. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(15): 3683
- [38] Müller N. Inflammation in Schizophrenia: pathogenetic aspects and therapeutic considerations. *Schizophr Bull*, 2018, **44**(5): 973-982

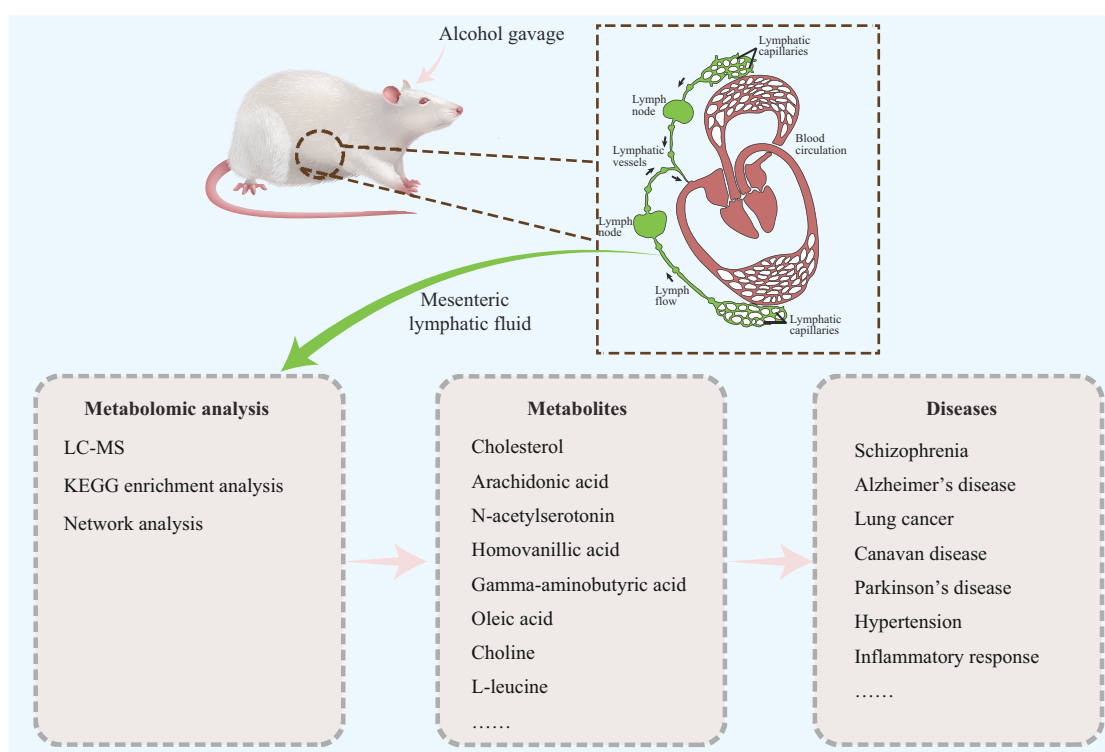
Metabolomic Analysis of Mesenteric Lymph Fluid in Rats After Alcohol Gavage*

ZHANG Yuan^{1)**}, MENG Zi-Ye^{1)**}, LI Wen-Bo¹⁾, JING Yu-Meng¹⁾, LIU Gui-Chen¹⁾, HAO Zi-Yao¹⁾,
XU Xiu^{1,2)***}, ZHAO Zhen-Ao^{1,2)***}

¹⁾Institute of Microcirculation, Basic Medical College, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

²⁾Hebei Key Laboratory of Critical Disease Mechanism and Intervention, Zhangjiakou 075000, China)

Graphical abstract



Abstract Objective The absorption of substances into blood is mainly dependent on the mesenteric lymphatic pathway and the portal venous pathway. The substances transported *via* the portal venous pathway can be metabolized by the biotransformation in the liver. On the contrary, the substances in the mesenteric lymph fluid enter the blood circulation without biotransformation and can affect the body directly. Alcohol consumption is

* This work was supported by grants from Hebei Natural Science Foundation (H2022405054) and Hebei Northern University Doctoral Startup Funding Project (BSJJ202410).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

ZHAO Zhen-Ao. Tel: 86-18896957709, E-mail: zhao22840718@163.com

XU Xiu. Tel: 86-13932324770, E-mail: xiu66328769@163.com

Received: October 22, 2023 Accepted: March 25, 2024

strongly linked to global health risk. Previous reports have analyzed the changes of metabolites in plasma, serum, urine, liver and feces after alcohol consumption. Whether alcohol consumption affects the metabolites in lymph fluid is still unknown. Therefore, it is particularly important to explore the changes of substances transported via the mesenteric lymphatic pathway and analyze their harmfulness after alcohol drinking. **Methods** In this study, male Wistar rats were divided into high, medium, and low-dosage alcohol groups (receiving Chinese Baijiu at 56%, 28% and 5.6% ABV, respectively) and water groups. The experiment was conducted by alcohol gavage lasting 10 d, $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Then mesenteric lymph fluid was collected for non-targeted metabolomic analysis by using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and bioinformatic analysis. Principal component analysis and hierarchical clustering were performed by using Biodeep. Meanwhile, KEGG enrichment analysis of the differential metabolites was also performed by Biodeep. MetaboAnalyst was used to analyze the relationship between the differential metabolites and diseases. **Results** The metabolites in the mesenteric lymph fluid of the high-dosage alcohol group change the most. Based on the KEGG enrichment analysis, the pathways of differential metabolites between the high-dosage alcohol group and the control group are mainly enriched in the central carbon metabolism in cancer, bile secretion, linoleic acid metabolism, biosynthesis of unsaturated fatty acids, *etc.* Interestingly, in the biosynthesis of unsaturated fatty acids category, the content of arachidonic acid is increased by 7.25 times, whereas the contents of palmitic acid, oleic acid, stearic acid, arachidic acid and erucic acid all decrease, indicating lipid substances in lymph fluid are absorbed selectively after alcohol intake. It's worth noting that arachidonic acid is closely related to inflammatory response. Furthermore, the differential metabolites are mainly related with schizophrenia, Alzheimer's disease and lung cancer. The differential metabolites between the medium-dosage alcohol and the control group were mainly enriched in phenylalanine metabolism, valine, leucine and isoleucine biosynthesis, linoleic acid metabolism and cholesterol metabolism. The differential metabolites are mainly related to schizophrenia, Alzheimer's disease, lung cancer and Parkinson's disease. As the dose of alcohol increases, the contents of some metabolites in lymph fluid increase, including cholesterol, L-leucine, fumaric acid and mannitol, and the number of metabolites related to schizophrenia also tends to increase, indicating that some metabolites absorbed by the intestine-lymphatic pathway are dose-dependent on alcohol intake. **Conclusion** After alcohol intake, the metabolites transported *via* the intestinal-lymphatic pathway are significantly changed, especially in the high-dosage group. Some metabolites absorbed *via* the intestinal-lymphatic pathway are dose-dependent on alcohol intake. Most importantly, alcohol intake may cause inflammatory response and the occurrence of neurological diseases, psychiatric diseases and cancer diseases. High-dosage drinking may aggravate or accelerate the occurrence of related diseases. These results provide new insights into the pathogenesis of alcohol-related diseases based on the intestinal-lymphatic pathway.

Key words mesenteric lymph fluid, alcohol gavage, metabolomics, fatty acids

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0402