

• 论 著 •

基于 16S rDNA 和代谢组学技术的笑气中毒小鼠肠道微生物研究

刘聪颖^{1,2,3,5}, 张枫林⁴, 李耀光^{1,2,3,5}, 章雯^{1,2,3,5}, 贡克明^{1,2,3,5}, 严江伟^{1,2,3,5}, 贾娟^{1,2,3,5}

(1. 山西医科大学, 山西 晋中 030600; 2. 法庭毒物分析公安部重点实验室, 山西 晋中 030600; 3. 法医学山西省重点实验室, 山西 晋中 030600; 4. 济南市公安局章丘分局, 山东 济南 250200; 5. 山西省法医鉴定工程研究中心, 山西 晋中 030600)

【摘要】目的 利用 16S rDNA 和代谢组学技术分析笑气中毒小鼠肠道菌群结构及其代谢物的变化, 并分析肠道菌群和代谢物之间的相关性, 进而探讨肠道微生物与笑气中毒机制的关联性。**方法** C57BL/6 小鼠被随机分成对照组和笑气中毒组 (n = 6), 将小鼠放置于染毒装置中, 中毒组每次给予 90 000 ppm 笑气, 染毒 28 天, 2 次/天, 每次 1 h; 对照组给予空气。末次染毒结束 24 h 后收集小鼠粪便, 利用 16S rDNA 测序技术分析微生物菌群结构差异, 筛选显著差异菌群; 利用代谢组学技术检测粪便样本中代谢物的变化, 寻找差异代谢物, 并对得到的肠道差异菌群和差异代谢物进行相关性分析。**结果** 16S rDNA 结果显示, 笑气中毒组较对照组肠道菌群的丰富度升高而物种多样性无显著变化, 两组之间肠道菌群结构也存在显著差异。代谢组学结果显示共筛选出 112 种与笑气中毒相关的显著差异代谢物, 主要涉及 cAMP 信号通路和鞘脂代谢 2 条代谢通路。Spearman 相关性分析发现肠道差异菌群与差异代谢物之间存在密切的关联性。**结论** 笑气中毒后会引起机体肠道菌群结构和代谢物谱改变, 且肠道菌群丰度的变化影响多条代谢通路, 这可能与笑气中毒会损伤神经系统和血液系统有关, 为笑气中毒机制的进一步研究和临床治疗提供依据。

【关键词】 笑气中毒; 16S rDNA; 代谢组学; 差异菌群; 差异代谢物**【中图分类号】** D918.93**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1001-5728(2025)04-0438-07

doi:10.13618/j.issn.1001-5728.2025.04.010

Intestinal microbiota in mice with nitrous oxide poisoning: A study based on 16S rDNA and metabolomics. Liu Congying^{1,2,3,5}, Zhang Fenglin⁴, Li Yaoguang^{1,2,3,5}, Zhang Wen^{1,2,3,5}, Yun Keming^{1,2,3,5}, Yan Jiangwei^{1,2,3,5}, Jia Juan^{1,2,3,5} (1. Shanxi Medical University, Jinzhong Shanxi 030600; 2. Key Laboratory of Forensic Toxicology Analysis, Ministry of Public Security, Jinzhong Shanxi 030600; 3. Key Laboratory of Forensic Medicine in Shanxi Province, Jinzhong Shanxi 030600; 4. Zhangqiu Branch of Jinan Public Security Bureau, Jinan Shandong, 250200; 5. Shanxi Province Engineering Research Center of Forensic Identification, Jinzhong Shanxi 030600)

【Abstract】Objective To analyze changes in intestinal microbiota composition and metabolites in mice with nitrous oxide poisoning using 16S rDNA sequencing and metabolomics, and to examine correlations between gut microbes and metabolites in order to explore the mechanisms of nitrous oxide poisoning. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into a control group and a nitrous oxide poisoning group (n = 6). The poisoning group was exposed to 90,000 ppm nitrous oxide twice daily for 1 h over 28 days, while the control group was exposed to air. Fecal samples were collected 24 h after the last exposure. 16S rDNA sequencing was used to analyze structural differences in microbial communities and identify significantly different taxa. Metabolomics analysis was performed to detect changes in fecal metabolites and identify differential metabolites. Correlation analysis was conducted between differential microbiota and

metabolites. **Results** 16S rDNA sequencing showed that the poisoning group had increased microbial abundance compared with controls, while species diversity remained unchanged. Significant differences were observed in gut microbiota structure between groups. Metabolomics identified 112 differential metabolites related to nitrous oxide poisoning, mainly involving the cAMP signaling pathway and sphingolipid metabolism. Spearman

【基金项目】 山西省基础研究计划面上项目 (202403021211125)。**【作者简介】** 刘聪颖, 女, 硕士研究生, 研究方向: 基于代谢组学和微生物组学的法医毒物学研究。**【通信作者】** 贾娟, 女, 副教授, 副主任法医师, 硕士研究生导师, 博士, 主要从事基于多组学的法医毒物学研究。

严江伟, 男, 教授, 博士研究生导师, 博士, 主要从事法医基因组学研究。

贾娟、严江伟同为通信作者。

correlation analysis revealed a strong association between differential microbiota and differential metabolites. **Conclusion** Nitrous oxide poisoning alters the structure and metabolic profiles of intestinal microbiota. Changes in microbial abundance affect multiple metabolic pathways, which may be related to damage to the nervous and hematological systems. These findings provide a basis for further research on the mechanisms of nitrous oxide poisoning and for clinical treatment.

【Key words】 Nitrous oxide poisoning; 16S rDNA; Metabolomics; Differential microbiota; Differential metabolites

笑气 (nitrous oxide) 又名一氧化二氮, 因其吸入后会让人迅速产生欣快感、镇痛和解离效应而广受“欢迎”。短时间大剂量吸入笑气会导致窒息死亡^[1, 2], 而长期滥用笑气会引起吸食者体内维生素 B₁₂ 缺乏导致神经系统和血液系统损伤^[3-5]。

研究表明^[6] 肠道微生物群与机体代谢、免疫及多种疾病的发生和发展密切相关, 肠道代谢物被认为是肠道菌群影响机体功能的重要媒介。通过分析微生物菌群结构变化及对代谢功能的影响, 近年来在药毒物的毒性机制研究中发挥了重要作用。研究发现^[7] 氯硝西洋暴露会诱导斑马鱼肠道菌群失调, 促进代谢物脂多糖生成并通过血脑屏障引发神经炎症; 还有研究发现^[8] 大鼠口服甲基汞后会引体内脱硫弧菌和螺旋杆菌等肠道微生物丰度上升伴随谷氨酸和 γ -氨基丁酸等神经相关代谢物改变, 出现记忆力下降和认知障碍。

目前关于笑气中毒对肠道微生物的影响及其中毒机制的研究尚未见报道。因此, 本研究将建立小鼠笑气中毒模型, 联合 16S rDNA 和代谢组学技术分析中毒小鼠粪便中肠道菌群结构及其代谢物的变化, 并进行相关性分析, 探讨肠道微生物与笑气中毒机制的关联。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

NEB Next[®] Ultra[™] DNA Library Prep Kit 试剂盒; Qubit[®] 2.0 荧光计 (Thermo Scientific); AB Triple TOF 6600 质谱仪 (AB SCIEX); Illumina NovaSeq 6000 测序平台; 1290 Infinity 超高压液相色谱仪 (Agilent); 全身暴露静式染毒装置 HOPE-MED 8050-3C (天津开发区合普工贸有限公司); 笑气 (河南源正特种气体有限公司, 99.9%)。

1.2 动物模型建立和样本采集

6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 12 只, 体重 18~20 g, 购自北京市昌扬西山养殖场, 许可证号: SCXK (京) 2019-0010。适应性喂养一周后进行实验, 取材前禁食 12 h。将小鼠随机分为对照组和笑气中毒组, 每组 6 只, 放置于染毒装置中进行实验。笑气中毒组

小鼠每次给予 90 000 ppm 笑气, 染毒 28 天, 2 次/天, 每次 1 h; 对照组给予空气平行对照。末次染毒结束 24 h 后, 收集小鼠粪便, 液氮速冻, 置于 -80 °C 冰箱保存待检。

1.3 16S rDNA 高通量测序

采用 SDS 法提取小鼠粪便样本中 DNA 进行 PCR 扩增, 使用建库试剂盒构建文库, 并进行质检^[9]。基于 Illumina NovaSeq 6000 平台进行 16S rDNA 测序, 并对原始测序结果进行过滤、拼接及去嵌合体等处理。对处理后的数据进行 α 多样性和 β 多样性分析; 对门水平和属水平上的群落组成进行比较, 并通过 LEfSe 分析评估物种相对丰度, 以 LDA 值 > 2 为条件来筛选显著差异物种; 利用 PICRUST 软件进行 KEGG 功能预测。

1.4 代谢组学分析

取适量粪便样本, 经前处理后上机检测。色谱条件: HILIC 色谱柱 (ACQUITY UPLC BEH Amide 柱, 2.1 mm $\times$ 100 mm $\times$ 1.7 μ m); 柱温 25 °C; 流速 0.5 mL/min; 进样体积 2 μ L; 流动相: 水 + 25 mM 乙酸铵 + 25 mM 氨水, 乙腈; 梯度洗脱见表 1^[10, 11]。质谱条件: 以电喷雾电离 (ESI) 正负离子模式进行检测; 母离子扫描范围 m/z: 60~1 000 Da; 产物离子扫描范围: 25~1 000 Da。使用 XCMS 软件分析数据, 并对鉴定到的代谢物建立正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 模型, 根据变量权重值 VIP > 1 和 P < 0.05 来筛选差异代谢物; 基于 KEGG 数据库对差异

表 1 LC 梯度洗脱程序		
Table 1 The procedure of gradient elution		
时间 (min)	A %	B %
0~0.5	5	95
0.5~7	5~35	95~65
7~8	35~60	65~40
8~9	60	40
9~9.1	60~5	40~95
9.1~12	5	95

代谢物进行代谢通路富集分析。

1.5 组学关联分析

对差异肠道微生物和差异代谢物进行 Spearman 相关性分析, 揭示肠道微生物群落与代谢物间的互作关系, $P < 0.05$ 时认为有统计学意义。

2 结果

2.1 笑气中毒小鼠肠道菌群的微生物组学分析

2.1.1 笑气中毒小鼠肠道菌群的多样性分析

为评估肠道菌群的物种多样性和物种丰度^[12], 采用 Shannon 指数和 ACE 指数作为 α 多样性评价指标。结果显示 (图 1A、1B): 两组间 ACE 指数差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Shannon 指数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示笑气中毒导致肠道菌群的丰富度升高而物种多样性无明显变化。通过非度量多维尺度分析 (NMDS) 来评估样本间群落组成

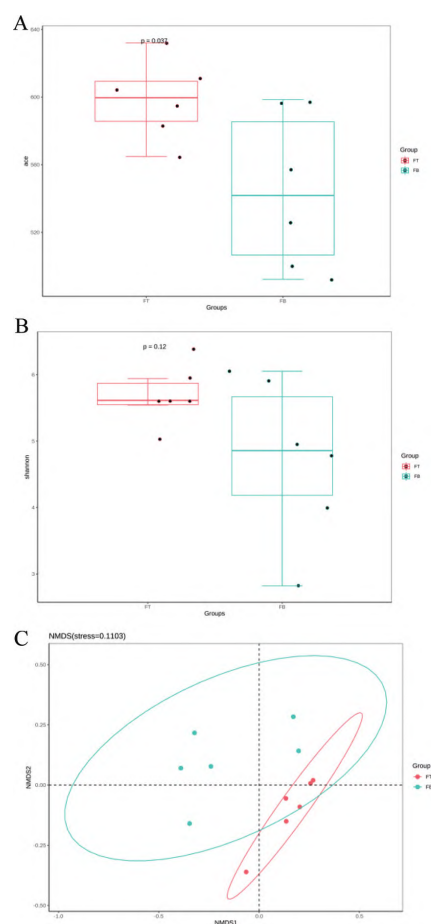


图 1 笑气中毒小鼠肠道菌群多样性分析

Fig. 1 Diversity analysis of intestinal microbiota in nitrous oxide-poisoned mice

A: ACE 指数; B: Shannon 指数; C: NMDS 分析; FB: 对照组; FT: 笑气中毒组

A: ACE index; B: Shannon index; C: NMDS analysis; FB: control group; FT: nitrous oxide poisoning group

的 β 多样性, 结果表明 (图 1C): 笑气中毒组和对照组之间肠道菌群结构存在明显差异 ($\text{Stress} < 0.2$)。

2.1.2 笑气中毒小鼠肠道菌群的物种组成及差异分析

在门水平上 (图 2A), 笑气中毒组和对照组小鼠的肠道菌群主要包括拟杆菌门 (*Bacteroidota*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、放线菌门 (*Actinobacteriota*)、变形菌门 (*Proteobacteria*) 和脱铁杆菌门 (*Deferribacteres*)。与对照组比较, 笑气中毒组小鼠的厚壁菌门和脱铁杆菌门相对丰度降低, 拟杆菌门、变形菌门和放线菌门相对丰度升高。

在属水平上 (图 2B), 笑气中毒组和对照组小鼠的肠道菌群主要由 *uncultured bacterium*、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、粪杆菌属 (*Faecalibaculum*)、红螯菌科属 (*Coriobacteriaceae.UG.002*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*)、毛螺菌科-NK4A136 菌属 (*Lachnospiraceae.NK4A136.group*)、*Dubosiella*、另枝菌属 (*Alistipes*) 等组成。与对照组比较, 笑气中毒组小鼠中乳酸杆菌属、*Dubosiella* 和另枝菌属相对丰度下降, 粪杆菌属、红螯菌科属和脱硫弧菌属相对丰度上升。

LEfSe 分析显示, 笑气中毒组中丹毒杆菌属 (*Erysipelatoclostridium*)、支原体属 (*Mycoplasma*)、*Gordonibacter*、*uncultured Bacteroidales bacterium* 显著富集; 对照组中 *Turicibacter* 和副拟杆菌属 (*Parabacteroides*) 显著富集 (LDA 值 > 2)。

2.1.3 笑气中毒小鼠肠道菌群功能预测

根据 KEGG 功能通路预测结果, 相对丰度排名前 9 的代谢通路为: 膜运输 (Membrane Transport)、氨基酸代谢 (Amino Acid Metabolism)、碳水化合物代谢 (Carbohydrate Metabolism)、核苷酸代谢 (Nucleotide Metabolism)、复制和修复 (Replication and Repair)、翻译 (Translation)、能量代谢 (Energy Metabolism)、辅因子和维生素代谢 (Metabolism of Cofactors and Vitamins) 和细胞信号传导 (Cellular Processes and Signaling)。

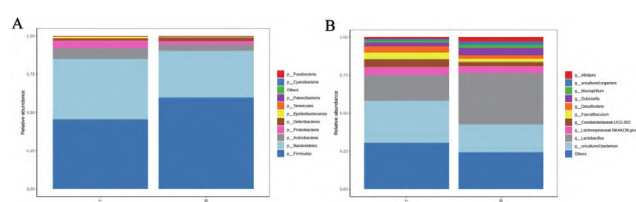


图 2 笑气中毒小鼠肠道菌群在门水平 (A)、属水平 (B) 的分布

Fig. 2 Distribution of intestinal microbiota on the phylum(A) and genus(B) level in nitrous oxide-poisoned mice

2.2 笑气中毒小鼠肠道代谢组学分析

2.2.1 笑气中毒小鼠肠道代谢物 OPLS-DA 分析

笑气中毒组和对照组小鼠粪便样本 OPLS-DA 分析结果显示（图 3），两组样本在正、负离子模式下均能很好地分离，两组小鼠肠道代谢物存在差异。采用置换检验对模型进行检测，结果显示模型的 R^2 和 Q^2 均随着置换保留度的降低而下降，排除模型过拟合的可能性。

2.2.2 笑气中毒小鼠肠道差异代谢物和代谢通路分析

基于 OPLS-DA 分析结果，合并正负离子模式共筛选出 112 种显著差异代谢物。表 2 中展示主要涉及的 45 种差异代谢物，其中有 30 个差异代谢物上调，有 15 个差异代谢物下调。通过 KEGG 通路富集分析筛选出两条显著代谢通路：cAMP 信号通路（cAMP signaling pathway）和鞘脂代谢（Sphingolipid metabolism）。

2.3 笑气中毒小鼠肠道差异菌群及代谢物相关性

Spearman 相关性分析结果显示（图 4）：笑气中毒组小鼠中 *Turicibacter* 与 18 种差异代谢物具有显著的相关性；副拟杆菌属与 20 种差异代谢物具有显著的相关性；*uncultured Bacteroidales bacterium* 与 34 种差异代谢物具有显著的相关性；丹毒杆菌属与 27 种差异代谢物具有显著的相关性；*Gordonibacter* 属与 24 种差异代谢物具有显著的相关性；支原体属与 17 种差异代谢物具有显著的相关性，提示肠道菌群丰度的变化对代谢物影响显著。

3 讨论

笑气滥用会导致机体出现脊髓病、周围神经病变、贫血、记忆下降和认知障碍等症状^[3,4]。本实验研究结果表明，笑气作为毒性物质摄入体内，会改变肠道菌群结构并诱发肠道菌群代谢紊乱，从而影响机体健康。

人体的肠道菌群组成以厚壁菌门和拟杆菌门为主，有研究表明，厚壁菌门/拟杆菌门比例的失衡会导致肠道通透性增加，损伤肠道屏障进而引发炎症^[12]。本研究发现笑气中毒引起小鼠肠道菌群厚壁菌门丰度降低和拟杆菌门丰度升高，还引起乳酸杆菌属和另枝菌属等有益菌属丰度下降，这不仅破坏肠道稳态，降低肠道免疫力，也进一步影响肠道代谢。这与 Zhang 等^[13]在关于甲基苯丙胺诱导小鼠中毒的研究中发现的菌群变化相似。

本研究代谢组学数据表明，笑气中毒会导致 cAMP 信号通路异常。肠道代谢物琥珀酸盐和前列腺素都会与 G 蛋白偶联受体（GPCR）结合，并激

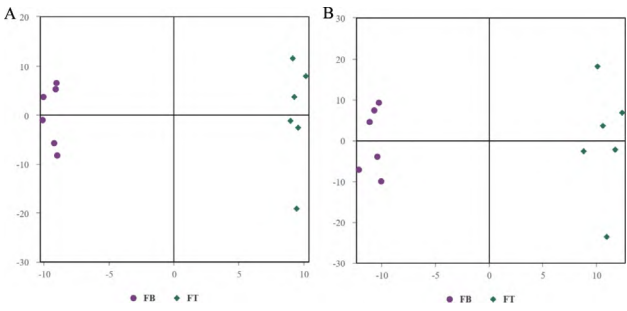


图 3 笑气中毒小鼠粪便样本的 OPLS-DA 得分图
Fig. 3 OPLS-DA score plot of fecal samples in nitrous oxide-poisoned mice
A: 正离子模式; B: 负离子模式
A: positive ion mode; B: negative ion mode

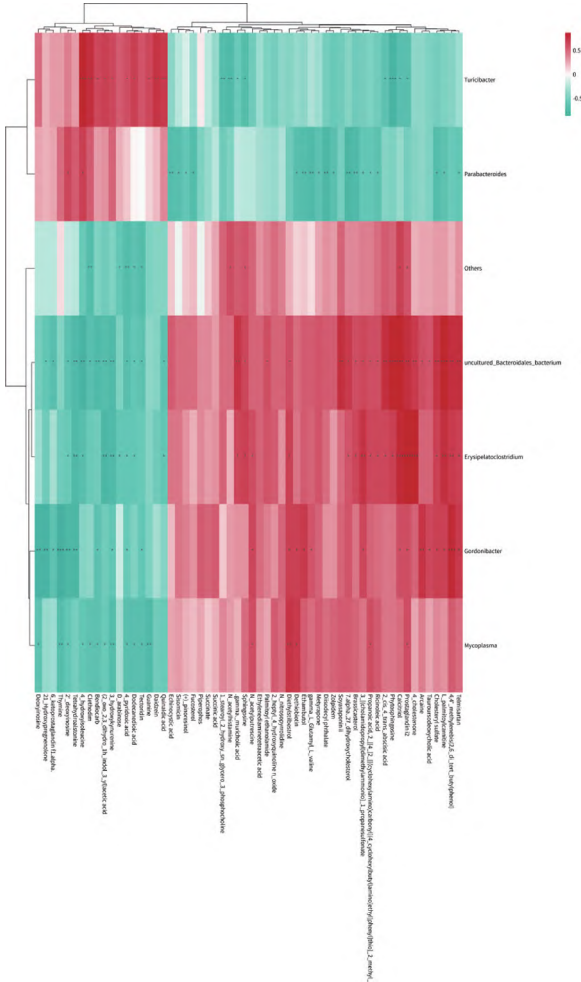


图 4 笑气中毒小鼠肠道差异菌群与差异代谢物的 Spearman 相关性分析
Fig. 4 Spearman correlation analysis of differential intestinal flora with differential metabolites in nitrous oxide-poisoned mice
注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 横轴表示差异代谢物, 纵轴表示差异菌群; 红色表示正相关, 蓝色表示负相关
Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; the horizontal axis indicates the differential metabolites, the vertical axis indicates the differential flora; red represents positive correlation while blue represents negative correlation

表 2 笑气中毒小鼠肠道差异代谢物

Table 2 Intestinal differential metabolites of nitrous oxide-poisoned mice

差异代谢物	代谢物中文名称	P 值	VIP 值	趋势
gamma-L-Glutamyl-L-valine	γ-L- 谷氨酰 -L- 缬氨酸	0.027 783 62	1.146 195 37	↑
Succinate	琥珀酸盐	0.008 119 55	7.619 649 44	↑
1-stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine	1- 硬脂酰基 -sn- 甘油 -3- 磷酸胆碱	0.035 847 99	4.747 982 28	↑
(+)-pinoresinol	(+)- 松脂素	0.047 410 05	2.492 628 73	↑
Brassicasterol	油菜甾醇	0.004 689 50	4.807 548 48	↑
Ricinoleic acid	蓖麻油酸	0.005 169 13	4.415 851 85	↑
Dethiobiotin	脱硫生物素	0.006 994 61	1.245 955 80	↑
Cholesteryl sulfate	胆固醇硫酸酯	0.005 693 38	5.780 041 64	↑
2-cis-4-trans-abscisic acid	2- 顺式 ,4- 反式脱落酸	0.024 452 51	2.259 688 44	↑
Phytosphingosine	植物鞘氨醇	0.004 823 31	5.001 920 26	↑
N-acetylserine	N- 乙酰丝氨酸	0.017 841 06	2.531 628 49	↑
Propanoic acid	丙酸	0.007 013 96	2.974 668 57	↑
L-palmitoylcarnitine	棕榈酰肉碱	0.001 190 91	3.336 971 66	↑
Echinocystic acid	刺囊酸	0.046 445 45	1.112 890 08	↑
Ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸	0.012 925 61	8.737 874 55	↑
Succinic acid	琥珀酸	0.025 517 73	1.371 632 99	↑
1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	1- 棕榈酰溶血磷脂酰胆碱	0.026 404 61	6.235 338 26	↑
Oleoylel-carnitine	油酰 -L- 肉碱	0.000 310 91	3.577 379 57	↑
Prostaglandin i2	前列腺素	0.003 168 03	2.853 849 01	↑
Myristoyl-l-carnitine	肉豆蔻左旋肉碱	0.002 085 44	1.776 049 27	↑
1-hexadecyl-sn-glycero-3-phosphocholine	1- 十六烷基 -sn- 甘油基 -3- 胆碱磷酸	0.026 500 10	3.579 157 44	↑
Stearoylcarnitine	Stearoylcarnitine	0.000 149 96	2.140 203 72	↑
N-acetylputrescine	N- 乙酰基 -1,4- 二氨基丁烷	0.018 874 68	2.255 898 44	↑
.gamma.-muricholic acid	γ- 鼠胆酸	0.043 871 79	2.627 133 90	↑
Linoleoylcarnitine	亚油酰基肉碱	0.002 970 91	2.617 568 15	↑
1-(1z-hexadecenyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	1-(1z-hexadecenyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	0.003 980 43	4.367 853 10	↑
2-heptyl-4-hydroxyquinoline n-oxide	2- 庚基 -4- 羟基喹啉 -n- 氧化物	0.022 778 53	2.480 990 67	↑
Sphingosine	鞘氨醇	0.046 054 61	6.593 721 64	↑
Tauroursodeoxycholic acid	牛磺熊去氧胆酸	0.047 323 05	1.463 705 85	↑
Calcitriol	钙三醇	0.000 461 07	2.258 338 33	↑
4-pyridoxic acid	4- 吡哆酸	0.020 846 83	1.779 550 96	↓
Bendiocarb	恶虫威	0.012 317 16	1.785 349 95	↓
Deoxyinosine	脱氧肌苷	0.027 159 90	8.103 547 21	↓
2'-deoxyinosine	2'- 脱氧肌苷	0.023 461 95	3.318 460 23	↓
Daidzein	黄豆苷元	0.038 613 19	2.084 028 00	↓
Guanine	鸟嘌呤	0.046 620 22	2.992 254 71	↓
Thymine	胸腺嘧啶	0.027 428 27	6.710 116 41	↓
3-hydroxykynurenine	3- 羟基犬尿氨酸	0.000 224 89	8.212 196 59	↓
D-arabinose	D- 阿拉伯糖	0.048 681 47	3.437 660 37	↓
Val-Val	Val-Val	0.031 388 87	3.234 241 13	↓
(2-oxo-2,3-dihydro-1h-indol-3-yl)acetic acid	(2- 氧代 -2,3- 二氢 -1H- 吲哚 -3- 基) 乙酸	0.004 477 64	4.524 550 61	↓
6-ketoprostaglandin f1.alpha.	6- 酮前列腺素 F1α	0.019 020 57	3.962 977 68	↓
Dodecanedioic acid	十二碳二元酸	0.028 011 71	2.625 738 18	↓
4-hydroxyisoleucine	4- 羟基异亮氨酸	0.002 457 25	1.876 981 82	↓
Arg-gly	Arg-gly	0.039 370 06	1.680 015 51	↓

↑ : 差异代谢物水平上调; ↓ : 差异代谢物水平下调

↑ : Level of differential metabolites were increased; ↓ : Level of differential metabolites were decreased

活膜结合的腺苷酸环化酶,形成第二信使环磷酸腺苷(cAMP)^[14,15]。cAMP可直接作用于蛋白激酶A(PKA),激活下游信号底物如cAMP反应元件结合蛋白(CREB)和NMDA受体的磷酸化,调节大脑记忆与认知功能^[16,17]。本研究中笑气中毒后琥珀酸盐和前列环素含量升高,干扰cAMP信号通路进而影响下游信号触发,这可能是导致神经兴奋性增加,出现记忆力下降和认知减退等症状的原因。此外,乳酸杆菌属、毛螺菌属和副拟杆菌属等菌群会分泌短链脂肪酸(SCFA)^[18],SCFA也能作为GPCR的配体参与cAMP信号通路,本研究中肠道菌群丰度的变化导致SCFA代谢紊乱,进一步影响神经系统信号传导。

鞘脂是细胞膜磷脂的主要成分,它在信号通路的调节和神经元的存活中起着重要的作用^[19]。鞘氨醇可通过鞘脂代谢产物神经酰胺水解产生,有研究表明鞘氨醇的增加会抑制神经元等细胞的增殖并诱导细胞凋亡^[20]。本研究中出现鞘脂代谢通路异常,这一过程受丹毒杆菌属和*Turicibacter*的影响,导致鞘氨醇和植物鞘氨醇上调,细胞膜磷脂合成受阻,可能会造成神经系统脱髓鞘而引起周围神经病变。

肠道菌群还会参与辅因子和维生素的代谢。有研究显示维生素B₆对维生素B₁₂的缺乏具有潜在的保护作用,且它对其他神经的保护机制与谷胱甘肽生物合成基因的上调有关^[21],4-吡哆酸是维生素B₆的代谢产物^[22]。本研究中丹毒杆菌属、*Gordonibacter*和支原体属水平上升引起4-吡哆酸下调,提示笑气中毒干扰维生素B₆代谢,激活机体保护机制。同时,副拟杆菌属的改变调控谷胱甘肽合成相关代谢物γ-L-谷氨酰-L-缬氨酸上调,也提示维生素B₆的保护机制被激活。

除此之外,肠道菌群改变还会影响核苷酸代谢。本研究发现笑气中毒后支原体属和*Gordonibacter*的富集引起脱氧肌苷、2'-脱氧肌苷、鸟嘌呤和胸腺嘧啶水平下调,导致嘌呤代谢和嘧啶代谢紊乱。嘌呤和嘧啶的供应不足会影响DNA合成和细胞正常功能,提示可能是笑气中毒后出现骨髓抑制和巨幼细胞性贫血等症状的原因。

综上所述,本研究通过16S rDNA和代谢组学技术对笑气中毒小鼠的肠道微生物变化进行研究,发现笑气中毒小鼠肠道菌群结构和代谢物谱均发生变化,且肠道菌群丰度的变化影响cAMP信号通路、鞘脂代谢、维生素B₆代谢和核苷酸代谢等通路,这可能与笑气中毒损伤神经系统和血液系统有关,为笑气中毒机制的进一步研究和临床治疗提供依据。

参考文献

- [1] Leth P M, Astrup B S. Suffocation caused by plastic wrap covering the face combined with nitrous oxide inhalation[J]. *Forensic Sci Med Pathol*, 2017, 13(3): 372-374.
- [2] 孙文凯, 郑吉龙, 张振宇, 等. 一氧化二氮中毒窒息死亡法医学鉴定1例[J]. *中国法医学杂志*, 2020, 35(3): 328-329.
- [3] De Halleux C, Juurlink D N. Diagnosis and management of toxicity associated with the recreational use of nitrous oxide[J]. *CMAJ*, 2023, 195(32): E1075-E1081.
- [4] Xiang Y, Li L, Ma X, et al. Recreational nitrous oxide abuse: prevalence, neurotoxicity, and treatment[J]. *Neurotox Res*, 2021, 39(3): 975-985.
- [5] Zheng D, Ba F, Bi G, et al. The sharp rise of neurological disorders associated with recreational nitrous oxide use in China: a single-center experience and a brief review of Chinese literature[J]. *J Neurol*, 2020, 267(2): 422-429.
- [6] Zheng C, Qi Z, Chen R, et al. The association between the dietary index for gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease and liver fibrosis: evidence from NHANES 2017-2020[J]. *BMC Gastroenterol*, 2025, 25(1): 163.
- [7] Lin W, Qin Y, Ren Y. Flunitrazepam and its metabolites compromise zebrafish nervous system functionality: An integrated microbiome, metabolome, and genomic analysis[J]. *Environ Pollut*, 2024, 341: 122949.
- [8] Lin X, Zhao J, Zhang W, et al. Acute oral methylmercury exposure perturbs the gut microbiome and alters gut-brain axis related metabolites in rats[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 190: 110130.
- [9] de Muinck E J, Trosvik P, Gilfillan G D, et al. A novel ultra high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing library preparation method for the Illumina HiSeq platform[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 68.
- [10] Benton H P, Ivanisevic J, Mahieu N G, et al. Autonomous metabolomics for rapid metabolite identification in global profiling[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(2): 884-891.
- [11] 贾娟, 王超忍, 尉志文, 等. 氰化物急性中毒大鼠的血浆代谢组学研究[J]. *中国法医学杂志*, 2023, 38(5): 525-529, 536.
- [12] 肖贺, 孙兴旭, 孙成宏, 等. 基于肠道菌群测序和粪便代谢组学的荆防颗粒保护急性肺损伤机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(7): 1915-1923.
- [13] Zhang K K, Chen L J, Li J H, et al. Methamphetamine disturbs gut homeostasis and reshapes serum metabolome, inducing neurotoxicity and abnormal behaviors in mice[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 755189.
- [14] Krzak G, Willis C M, Smith J A, et al. Succinate receptor 1: an emerging regulator of myeloid cell function in

(下转第449页)

- [14] Xiao B, Tian X, Xie W, et al. Functional consequence of protein kinase a-dependent phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor: sensitization of store overload-induced Ca^{2+} release[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(41): 30256-30264.
- [15] Kang P W, Chakouri N, Diaz J, et al. Elementary mechanisms of calmodulin regulation of $\text{NaV}1.5$ producing divergent arrhythmogenic phenotypes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(21): e2025085118.
- [16] Tikhomirov R, Oakley R H, Anderson C, et al. Cardiac GR mediates the diurnal rhythm in ventricular arrhythmia susceptibility[J]. *Circ Res*, 2024, 134(10): 1306-1326.
- [17] Giardinelli S, Meliotta G, Mentino D, et al. Molecular basis of cardiomyopathies in Type 2 diabetes[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(15): 8280.
- [18] Wang X, Yu Q, Liao X, et al. Mitochondrial dysfunction in arrhythmia and cardiac hypertrophy[J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2023, 24(12): 364.
- [19] Balderas E, Lee S H J, Rai N K, et al. Mitochondrial calcium regulation of cardiac metabolism in health and disease[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2024, 39(5): 247-268.
- [20] Fu Z P, Ying Y G, Wang R Y, et al. Aged gut microbiota promotes arrhythmia susceptibility via oxidative stress[J]. *iScience*, 2024, 27(10): 110888.
- [21] Yuan W, Lin H, Sun Y, et al. Myocardin reverses insulin resistance and ameliorates cardiomyopathy by increasing IRS-1 expression in a murine model of lipodystrophy caused by adipose deficiency of vacuolar H^{+} -ATPase V0d1 subunit[J]. *Theranostics*, 2024, 14(5): 2246-2264.
- [22] Morishima M, Tahara S, Wang Y, et al. Oxytocin downregulates the $\text{CaV}1.2$ L-type Ca^{2+} channel via Gi/cAMP/PKA/CREB signaling pathway in cardiomyocytes[J]. *Membranes*, 2021, 11(4): 234.
- [23] Mlynarska E, Hajdys J, Czarnik W, et al. The role of antioxidants in the therapy of cardiovascular diseases-a literature review[J]. *Nutrients*, 2024, 16(16): 2587.
- [24] Aguilar-Sanchez Y, Rodriguez de Yurre A, Argenziano M, et al. Transmural autonomic regulation of cardiac contractility at the intact heart level[J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 773.
- [25] Zhang D, Zhao M M, Wu J M, et al. Dual-omics reveals temporal differences in acute sympathetic stress-induced cardiac inflammation following $\alpha 1$ and β -adrenergic receptors activation[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(7): 1350-1365.
- [26] Hering D, Lachowska K, Schlaich M. Role of the sympathetic nervous system in stress-mediated cardiovascular disease[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2015, 17(10): 80.
- [27] Qasim H, Rajaei M, Xu Y, et al. AKAP12 upregulation associates with PDE8A to accelerate cardiac dysfunction[J]. *Circ Res*, 2024, 134(8): 1006-1022.
- [28] Nayak T K, Parasania D, Tilley D G. Adrenergic orchestration of immune cell dynamics in response to cardiac stress[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2024, 196: 115-124.
- [29] Koba S. Angiotensin II, Oxidative stress, and sympathetic nervous system hyperactivity in heart failure[J]. *Yonago Acta Med*, 2018, 61(2): 103-109.

(收稿日期: 2024-10-17)

(上接第 443 页)

- inflammation[J]. *Trends Immunol*, 2021, 42(1): 45-58.
- [15] Bill A, Rosethorne E M, Kent T C, et al. High throughput mutagenesis for identification of residues regulating human prostacyclin (hIP) receptor expression and function[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e97973.
- [16] Qin Y, Huang W, Wang Z, et al. 1,2-Dichloroethane causes anxiety and cognitive dysfunction in mice by disturbing GABA metabolism and inhibiting the cAMP-PKA-CREB signaling pathway[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 279: 116464.
- [17] Lv D, Xiao B, Liu H, et al. Enhanced NMDA receptor pathway and glutamate transmission in the hippocampal dentate gyrus mediate the spatial learning and memory impairment of obese rats[J]. *Pflugers Arch*, 2024, 476(5): 821-831.
- [18] Blacher E, Levy M, Tatirovsky E, et al. Microbiome-modulated metabolites at the interface of host immunity[J]. *J Immunol*, 2017, 198(2): 572-580.
- [19] Zeng K, Zhou X, Liu W, et al. Determination of endogenous sphingolipid content in stroke rats and HT22 cells subjected to oxygen-glucose deprivation by LC-MS/MS[J]. *Lipids Health Dis*, 2023, 22(1): 13.
- [20] Abraham C E, Miranda G E, Agnolazza D L, et al. Synthesis of sphingosine is essential for oxidative stress-induced apoptosis of photoreceptors[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(2): 1171-1180.
- [21] Joncquel Chevalier-Curt M, Grzych G, Tard C, et al. Nitrous oxide abuse in the emergency practice, and review of toxicity mechanisms and potential markers[J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 162: 112894.
- [22] Gu Y, Jiang F, Yuan X, et al. A novel automated multi-cycle magnetic solid-phase extraction coupled to LC-MS/MS to study the disorders of six functional B vitamins in patients with gastroenterology and hyperhomocysteinemia[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2024, 241: 115989.

(收稿日期: 2024-11-04)