



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

## 《天津科技大学学报》网络首发论文

题目： 犊牦牛腹泻关联代谢物及其与抗氧化功能的关系  
作者： 韩雨晴, 谢林林, 张欣, 郝力壮, 孙偲, 王楠  
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250132  
收稿日期: 2025-09-02  
网络首发日期: 2026-01-28  
引用格式: 韩雨晴, 谢林林, 张欣, 郝力壮, 孙偲, 王楠. 犊牦牛腹泻关联代谢物及其与抗氧化功能的关系[J/OL]. 天津科技大学学报.  
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250132>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250132

## 犊牦牛腹泻关联代谢物及其与抗氧化功能的关系

韩雨晴<sup>1</sup>, 谢林林<sup>1</sup>, 张欣<sup>1</sup>, 郝力壮<sup>2</sup>, 孙偲<sup>3</sup>, 王楠<sup>1</sup>

(1. 天津科技大学生物工程学院, 教育部工业发酵微生物学重点实验室, 天津 300457;

2. 青海大学, 青海省高原放牧家畜动物营养与饲料科学重点实验室, 西宁 810016;

3. 青海百分牛生物科技有限公司, 西宁 810016)

**摘要:** 本研究旨在探究腹泻与健康犊牦牛粪便代谢物组成及其抗氧化能力。首先利用液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)检测2月龄左右健康(H组)与腹泻(D组)犊牦牛的粪便样本代谢物,同时分析其抗氧化性。结果显示,两组共检测到2761个代谢物,其中水苏糖、6-酮前列腺素F1a和8-羟基脱氧鸟苷在内的27个代谢物在腹泻组中显著上调( $P<0.05$ ),而 $\delta$ -三烯生育酚、迷迭香酸和根皮苷等11个代谢物显著下调( $P<0.05$ )。KEGG通路富集分析表明,差异代谢物主要富集于半乳糖代谢、嘌呤代谢和花生四烯酸代谢等代谢通路。此外,抗氧化结果显示,与健康组相比,腹泻组中 $\text{Fe}^{3+}$ 还原能力和羟自由基清除能力均显著降低( $P<0.05$ )。进一步相关性分析表明, $\delta$ -三烯生育酚、迷迭香酸和根皮苷与铁离子还原能力及羟自由基清除能力正相关( $P<0.05$ ),6-酮前列腺素F1a和8-羟基脱氧鸟苷则与铁离子还原能力及羟自由基清除能力显著负相关( $P<0.05$ )。上述结果表明,牦牛腹泻与粪便中抗氧化代谢物如 $\delta$ -三烯生育酚和迷迭香酸等代谢物含量减少以及半乳糖代谢通路紊乱相关,该结果为研发功能性饲料预防犊牦牛腹泻提供理论依据。

**关键词:** 腹泻; 粪便代谢组学; 代谢物; 抗氧化能力

中图分类号: S858.23

文献标志码: A

## Diarrhea-Associated Metabolites and Their Relationship with Antioxidant Function in Yak Calves

HAN Yuqing<sup>1</sup>, XIE Linlin<sup>1</sup>, ZHANG Xin<sup>1</sup>, HAO Lizhuang<sup>2</sup>, SUN Si<sup>3</sup>, WANG Nan<sup>1</sup>

(1.College of Biotechnology, Tianjin University of Science &amp; Technology, Tianjin 300457, China; 2. Qinghai Provincial Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science for Plateau Grazing Livestock, Qinghai University, Xining 810016, China;

3. Qinghai Baifen Niu Biotechnology Co., Ltd., Xining 810016, China)

**Abstract:** This study aims to investigate the differences in fecal metabolite composition and antioxidant capacity between healthy and diarrheic yak calves. Fecal samples from approximately two-month-old healthy (group H) and diarrheic (group D) yak calves were analyzed using LC-MS to identify metabolites and evaluate their antioxidant activity. The results showed that a total of 2,761 metabolites were detected in both groups. Among them, 27 metabolites, including stachyose, 6-ketoprostaglandin F1a, and 8-hydroxydeoxyguanosine, were significantly upregulated in the diarrheic group( $P<0.05$ ), while 11 metabolites such as  $\delta$ -tocotrienol, rosmarinic acid, and phlorizin were significantly downregulated( $P<0.05$ ). KEGG pathway enrichment analysis revealed that the differentially expressed metabolites were primarily enriched in metabolic pathways such as galactose metabolism, purine metabolism, and arachidonic acid metabolism. Furthermore, antioxidant capacity results indicated that the ferric ion reducing antioxidant power and hydroxyl radical scavenging capacity were significantly lower in the group D compared to the group H( $P<0.05$ ). Additional correlation analysis demonstrated that

收稿日期: 2025-09-02; 修回日期: 2025-10-31

基金项目: 青海省高端创新创业人才-柔性引进领军人才项目

作者简介: 韩雨晴(2001—),女,山东德州人,硕士研究生;通信作者:王楠,教授,wn929@tust.edu.cn

$\delta$ -tocotrienol, rosmarinic acid, and phlorizin were positively correlated with both ferric ion reducing ability and  $\cdot$ OH radical scavenging capacity ( $P < 0.05$ ), whereas 6-ketoprostaglandin F1 $\alpha$  and 8-hydroxydeoxyguanosine showed significant negative correlations with these antioxidant indicators ( $P < 0.05$ ). These findings suggest that diarrhea in yak calves is associated with a reduction in antioxidant metabolites such as  $\delta$ -tocotrienol and rosmarinic acid, as well as disruptions in the galactose metabolism pathway. The results provide a theoretical basis for developing functional feed to prevent diarrhea in yak calves.

**Key words:** diarrhea; fecal metabolomics; metabolite; antioxidant capacity

牦牛被誉为“高原之舟”，是我国青藏高原及其周边地区特有的畜种资源，具有极高的经济价值与生态意义<sup>[1-2]</sup>。为了进一步扩大生产，提高牦牛产量，牦牛采用集约化养殖<sup>[3]</sup>。然而，在实际生产过程中，环境变化、运输应激、断奶以及细菌感染等因素会导致犏牦牛腹泻，腹泻率高达 72.8%，严重时会导致犏牦牛死亡，这会给养殖业造成经济损失<sup>[4-5]</sup>。

研究<sup>[6]</sup>发现牦牛腹泻与肠道氧化应激紊乱密切相关。氧化应激的发生主要是由局部环境中活性氧生成与清除失衡导致的，会引起机体的氧化损伤<sup>[7]</sup>。一方面，在腹泻发生时，肠道屏障功能失衡、免疫反应紊乱会导致肠道局部活性氧（ROS）过量累积，进而诱发氧化应激<sup>[8]</sup>；另一方面，氧化应激又会进一步破坏肠道屏障完整性，引发肠道炎症及扰乱水电解质平衡，最终加重腹泻<sup>[9]</sup>。抗氧化物质可通过抑制肠道氧化应激、改善肠道屏障功能等方式发挥益生功效<sup>[10]</sup>。然而，大量研究证实在腹泻发生时，粪便中的抗氧化物质如吡啉类衍生物<sup>[11]</sup>、短链脂肪酸<sup>[12]</sup>和维生素 C<sup>[13]</sup>含量减少，甚至消失<sup>[14]</sup>。粪便抗氧化代谢物含量减少进一步削弱肠道局部环境的抗氧化能力，加剧局部炎症与氧化损伤，进而放大了氧化应激对肠道的负面影响<sup>[14]</sup>。这说明具有抗氧化活性的代谢物在预防和治疗腹泻中具有重要作用。

粪便代谢物作为食物发酵的产物和胃肠消化吸收底物，不仅为机体提供营养，还在维持肠道屏障完整性、调节免疫系统和改善肠道菌群结构等方面发挥关键作用<sup>[15]</sup>。肠道代谢物的紊乱是诱发和加剧腹泻的核心环节<sup>[14]</sup>。其中，短链脂肪酸和胆汁酸的失衡与腹泻的关联尤为引人关注。研究<sup>[16]</sup>发现，腹泻仔猪粪便中乙酸、丙酸、丁酸等短链脂肪酸（SCFAs）的含量显著下降。SCFAs 不仅是肠上皮细胞的关键能量来源，而且能通过降低肠道 pH 抑制沙门氏菌、大肠杆菌等病原体的定植，其含量的减少直接削弱了肠道屏障的防御能力，导致腹泻易感性增加<sup>[17-18]</sup>。外源性补充丁酸盐可通过抑制大肠杆菌、沙门氏菌等促炎菌的增殖，促进普拉梭菌有益菌的定植，恢复菌群平衡，强化肠道屏障，有效缓解腹

泻症状<sup>[19-20]</sup>。胆汁酸是胆汁的重要成分，具有调节脂质代谢、葡萄糖代谢、免疫应答和机体能量平衡的作用<sup>[21]</sup>。Jia 等<sup>[22]</sup>研究表明，腹泻状态下人体肠道胆汁酸的吸收过程受阻，其在肠腔内的滞留加剧肠道炎症，腹泻持续恶化。

当前，关于普通犏牦牛腹泻的研究较为丰富，但针对高海拔、特殊生理环境下犏牦牛腹泻的系统性研究仍相对匮乏，其致病机理和防控方案均有待深入探索。此外，青海犏牦牛的自然放牧养殖方式极易引起犏牦牛腹泻。本研究采用非靶向代谢组学分析技术，对腹泻犏牦牛与健康犏牦牛的粪便代谢物进行比较分析。同时，探究犏牦牛粪便代谢物对抗氧化功能的影响，并通过相关性分析揭示粪便代谢物变化与犏牦牛腹泻之间的内在关联，以期为制备功能性饲料添加剂、预防或治疗犏牦牛腹泻提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

甲醇、乙腈、水，Fisher Chemical 公司；甲酸，CNW 公司；异丙醇（2-propanol），Merck 公司；L-2-氯苯丙氨酸，Adamas-beta 公司。

NewClassic MF MS105DU 型电子天平，瑞士 METTLER TOLEDO 公司；Centrifuge 5424 R 型冷冻离心机、Centrifuge 5430R 型冷冻离心机，德国 Eppendorf 公司；SBL-10TD 型控温超声波清洗机（10 L），宁波新芝生物科技股份有限公司；Wonbio-96c 多样品冷冻研磨仪，上海万柏生物科技有限公司；LNG-T88 型台式快速离心浓缩干燥器，太仓市华美生化仪器厂；JXDC-20 型氮气吹扫仪，上海净信实业发展有限公司；Vanquish Horizon System UHPLC 型液相色谱系统、Q-Exactive HF-X 型质谱仪，Thermo Scientific 公司。

### 1.2 实验设计与饲养管理

选取来自青海省果洛藏族自治州玛多县、处于自然放牧条件下的犏牦牛（2~3 月龄）作为研究对象，所有犏牦牛均遵循牛场的标准化免疫程序与管理模式

进行饲养。根据4分制粪便评分标准(1分:正常,成形;2分:软便,能成形;3分:稠状腹泻,难以成形;4分:水样腹泻)<sup>[23]</sup>对粪便进行评分,其中粪便评分2~3分且伴有明显腹泻症状犊牦牛被判定为腹泻犊牦牛,粪便评分0~1分且经兽医诊断为健康的犊牦牛被纳入健康组。分别随机采集15份腹泻(D)与15份健康犊牦牛(H)的粪便样本立刻置于液氮中速冻,随后保存于-80℃备用。

### 1.3 样品处理

精确称取(60±5)mg粪便样品放入含有6mm直径研磨珠的2mL无菌离心管中,加入400μL含内标(L-2-氯苯丙氨酸)的提取液(甲醇与水体积比为4:1)。将离心管置于冷冻组织研磨仪中研磨6min(-10℃,50Hz),低温超声提取30min(5℃,40kHz),然后在-20℃静置30min;4℃、13000g离心15min,取上清液上机分析。另外,每个样品分别移取20μL上清液,混合后作为质控样本。

### 1.4 粪便LC-MS代谢组学分析

采用UHPLC液相色谱系统串联Q-Exactive高分辨质谱仪开展液相色谱-质谱联用(LC-MS)分析与检测,利用Progenesis Q1软件(美国Waters Corporation公司)进行数据处理。通过正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)模型前2个主成分的差异权重贡献值(VIP),结合单变量分析得到的P值,实现差异代谢物的筛选,并对筛选出的代谢物在KEGG数据库中匹配和聚类分析,得到相应的代谢通路。

### 1.5 抗氧化活性的测定

取-80℃粪便50mg,加入1mL95%乙醇或PBS缓冲盐溶解混匀,并稀释至5mg/mL,12000r/min离心10min,用0.45μm过滤膜过滤。

#### 1.5.1 Fe<sup>3+</sup>还原能力的测定

取稀释后的样品250μL置于试管中。加入pH6.6的磷酸盐缓冲液250μL,摇匀后加入K<sub>3</sub>[Fe(CN)]水溶液250μL,充分混匀后于50℃反应20min。再加入10% C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>溶液250μL,离心半径为4cm,3000r/min离心10min。取上清液100μL,加入蒸馏水100μL和0.1% FeCl<sub>3</sub>溶液20μL。反应30min后,测定700nm处吸光度,以蒸馏水作为空白组,每个样品测3次取平均值,按照式(1)计算还原能力( $R_{Fe^{3+}}$ )。

$$R_{Fe^{3+}} = (A - A_0) \times 100\% \quad (1)$$

式中:A为样品的吸光度,A<sub>0</sub>为空白组吸光度。

#### 1.5.2 羟自由基清除能力的测定

取稀释后样品60μL置于试管中,加入6mmol/L FeSO<sub>4</sub>溶液和6mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液各60μL,室温下静置10min后,再加入6mmol/L水杨酸溶液30μL,摇匀,室温下静置30min,测定510nm处吸光度A,以蒸馏水代替样品为空白组,以蒸馏水代替水杨酸为对照组,按照式(2)计算羟自由基清除率( $R_{OH}$ )。

$$R_{OH} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:A<sub>0</sub>为空白组吸光度,A<sub>1</sub>为样品吸光度,A<sub>2</sub>为对照组吸光度。

#### 1.5.3 DPPH自由基清除率

取稀释后样品100μL和0.15mmol/L DPPH-乙醇溶液100μL,混匀避光后静置30min,以蒸馏水为空白组,测定517nm处吸光度,按照式(3)计算DPPH自由基清除率( $R_{DPPH}$ )。

$$R_{DPPH} = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中:A<sub>0</sub>为空白组吸光度,A<sub>1</sub>为样品吸光度,A<sub>2</sub>为对照组(以乙醇代替DPPH-乙醇溶液)吸光度。

### 1.6 粪便抗氧化与粪便代谢物的相关性分析

对粪便抗氧化数据与差异代谢物进行Spearman相关性分析,根据Spearman相关系数,绘制相关性热图,评估筛选的差异代谢物与粪便抗氧化的相关性。

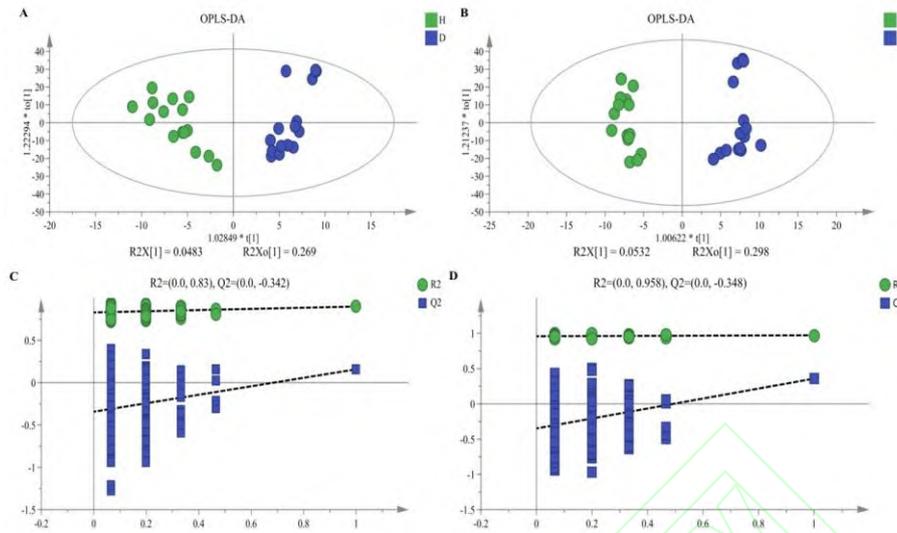
### 1.7 统计分析

使用GraphPad Prism 9软件进行实验数据的统计学处理与可视化。通过Mann-whitney U检验和Student's t检验分析组间差异并绘制图表。统计学显著性水平定义如下:\*、\*\*和\*\*\*分别表示组间具有显著差异P<0.05、P<0.01、P<0.001。

## 2 结果与分析

### 2.1 代谢数据质量评价

利用高效液相色谱-质谱联用技术,在健康组和腹泻组犊牦牛粪便中共检测出2761个代谢物。正交偏最小二乘法判别分析(图1)显示两组样本在两种离子模式下的分离趋势,随机模型的R<sup>2</sup>和Q<sup>2</sup>随着替换保留量的逐渐减少而逐渐减小,说明原模型不存在过拟合现象,模型稳健性良好,结果可信。



A: 正离子模式正交偏最小二乘判别分析图; B: 负离子模式正交偏最小二乘判别分析图; C: 正离子模式正交偏最小二乘判别置换检验图; D: 负离子模式正交偏最小二乘判别置换检验图。

图 1 代谢数据质量评价

Fig. 1 Evaluation of metabolic data quality

## 2.2 差异代谢物功能分析

原始数据包含 2 个质控样本和 30 个实验样本, 代谢物分类及占比见表 1。主要的代谢物脂类和类脂分子(包括胆汁酸、脂肪酸、类固醇、甘油酯、甘油磷脂、鞘脂等物质), 占 29.156%; 有机酸及其衍生物(包括羧酸、酮酸、 $\gamma$ -酮酸、 $\beta$ -羟基酸及其他代谢物), 占 19.558%; 有机杂环化合物(包括吡喃、吡啶、喹啉及衍生物、咪唑、嘧啶、吲哚及衍生物、吡咯及衍生物等代谢物), 占 15.647%; 杂环型化合物(包括苯二酚、酪醇、甲氧基酚等酚类, 三氟甲基苯、苯乙烯、苯丙烷、苯乙胺、苯甲酸等苯环型化合物), 占 9.091%; 有机含氧化合物(包括醇类、醚、羰基化合物等有机氧化合物), 占 7.389%。

表 1 代谢物分类及占比

Tab. 1 Proportions of classified metabolites

代谢物种类	数量	占比/%
脂质和类脂分子	805	29.2
有机酸及其衍生物	540	19.6
有机杂环化合物	432	15.6
杂环型化合物	251	9.09
有机含氧化合物	204	7.38
苯丙烷和聚酮	163	5.90
核苷酸和类似物	43	1.55
生物碱及其衍生物	32	1.15
有机含氮化合物	32	1.15
有机硫化物	7	0.254

木脂素、新木脂素及相关化合物	6	0.217
碳氢化合物及其衍生物	6	0.217
有机磷化物	1	0.0360
有机 1,3-偶极化合物	1	0.0360
其他	238	8.62
共计	2761	100

以  $VIP > 1$ 、 $P < 0.05$ 、 $\log_2|FC| \geq 0.26$  为标准筛选健康组和腹泻组差异代谢物, 结果如图 2 和表 2 所示, 在正负离子模式下共筛选出 38 个差异代谢物。其中, 与健康组相比, 腹泻犊牛上调的代谢物有 27 个, 下调的代谢物有 11 个。值得注意的是, 水苏糖、6-酮前列腺素 F1a 和 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 等代谢物显著上调,  $\delta$ -三烯生育酚、根皮苷、迷迭香酸等代谢物显著下调 (图 3)。

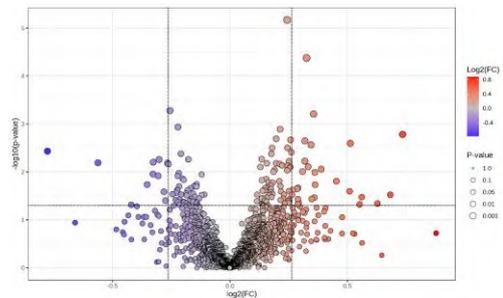


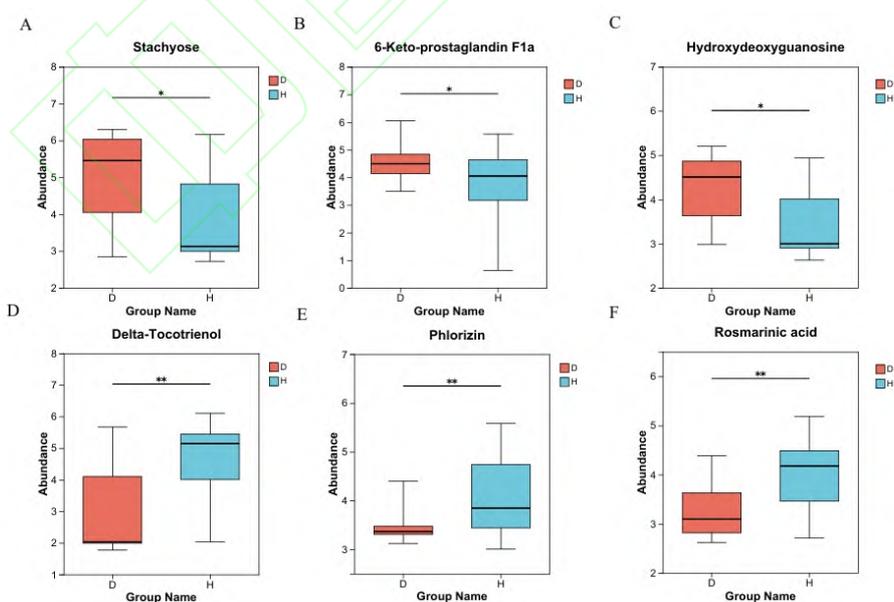
图 2 腹泻组与健康组差异显著代谢物火山图

Fig. 2 Volcano plot of fecal difference metabolites between diarrhea group and healthy group

表2 差异显著代谢物

Tab. 2 significantly differential metabolites

代谢物	P	VIP	FC	代谢物	P	VIP	FC
3-苯基-1-(2,4,6-三羟基苯基)丙-1-酮	0.0019	4.0553	1.6645	羟基脱氧鸟苷	0.0102	2.9495	1.2392
白藜芦醇	0.0156	3.3661	1.6053	6-酮-前列腺素 F1 a	0.0337	2.3168	1.2304
灵芝酸 $\eta$	0.0277	3.2439	1.4752	双(4-羟基苯基)甲烷	0.0235	2.2035	1.2224
醉椒素	0.0415	2.9479	1.4658	木岑树脂二醇	0.0332	2.5727	1.2220
6,8-二羟基嘌呤	0.0014	2.9556	1.4268	乳牛杆菌素	0.0203	2.4572	1.2188
2'-O-甲基异甘草素	0.0090	3.1514	1.3693	萜叶酚	0.0478	2.2100	1.2080
胡椒醛	0.0408	2.8314	1.3259	反式对孟烷-7,8-二醇 8-葡萄糖苷	0.0381	2.2308	1.2036
(+)-顺式凯内酯	0.0071	3.0150	1.3093	组氨酰异亮氨酸	0.0174	2.1214	1.2009
赤霉素 A15	0.0134	2.6693	1.2861	根皮苷	0.0063	2.6371	0.8319
脱水豌豆素	0.0097	2.6671	1.2846	杯伞素	0.0268	2.5481	0.8233
藏红花素 5	0.0008	3.4312	1.2800	迷迭香酸	0.0052	2.9254	0.8112
水苏糖	0.0292	3.0117	1.2728	8-氨基鸟苷	0.0073	3.1772	0.8091
1,2-二丁酰甘油	0.0029	2.9012	1.2702	(S)-异尿嘧啶丙氨酸	0.0071	2.4240	0.7973
去甲东莨菪碱	0.0158	2.9307	1.2597	$\beta$ -D-吡喃木糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-吡喃鼠李糖	0.0047	2.4967	0.7973
单丙酰基尸胺	0.0001	3.3749	1.2538	基-(1 $\rightarrow$ 2)-D-岩藻糖			
$\gamma$ -氨基丁酰赖氨酸	0.0416	2.6411	1.2522	4-己烯酰肉碱	0.0171	2.3200	0.7831
5-甲基胞嘧啶	0.0038	2.5295	1.2478	3,5,6-三羟基-5-(羟甲基)-2-甲氧基-2-环己烯-1-酮	0.0385	2.7932	0.7811
3,4-黄酮二酮	0.0067	2.7166	1.2475	9-羟基-7-巨豆三烯-3-酮葡萄糖苷	0.0434	2.8362	0.7600
(R)-醉椒素	0.0391	2.4788	1.2467	L-吡喃素	0.0372	2.6361	0.7472
				$\delta$ -生育三烯酚	0.0052	4.0236	0.6776



A: 水苏糖相对丰度柱状图; B: 6-酮前列腺素 F1a 相对丰度柱状图; C: 8-羟基脱氧鸟苷相对丰度柱状图; D:  $\delta$ -三烯生育酚相对丰度柱状图;

E: 根皮苷相对丰度柱状图; F: 迷迭香酸相对丰度柱状图

图3 腹泻组与健康组犊牛粪便差异代谢物的柱状图

Fig. 3 Bar chart of differential metabolites in feces between diarrheic and healthy calves

对差异显著的代谢物富集 KEGG 通路分析, 结果如图 4 所示。差异代谢物主要富集到半乳糖代谢、花生四烯酸代谢和嘌呤代谢等代谢通路。

### 2.3 粪便代谢物抗氧化活性

健康组与腹泻组粪便物抗氧化能力如图 5 所示。与健康组相比, 腹泻组粪便铁离子还原能力显著降低 ( $P < 0.05$ ), 提示腹泻状态下肠道内源性抗氧化物质等含量减少, 导致粪便抗氧化能力下降。与健康组相比, 腹泻组的羟自由基的清除能力显著降低 ( $P < 0.05$ ), 推测健康组和腹泻组的代谢物质差异导致羟自由基清除能力的差异。健康组与腹泻组粪便 DPPH 自由基清除率无统计学显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 粪便抗氧化与粪便代谢物的关联分析

进一步探究抗氧化指标与粪便代谢物的相关性, 结果如图 6 所示。与粪便代谢物抗氧化呈正相

关的代谢物主要有  $\delta$ -三烯生育酚、迷迭香酸和根皮苷, 与粪便代谢物抗氧化呈负相关的代谢物主要有 6-酮前列腺素 F1a 和 8-羟基脱氧鸟苷。

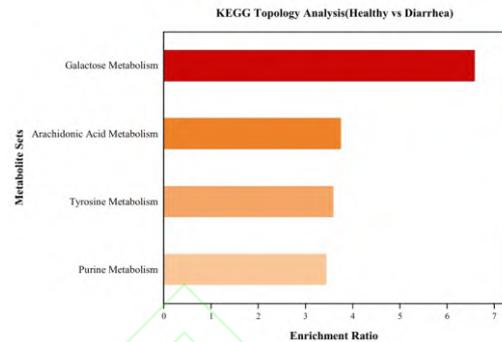
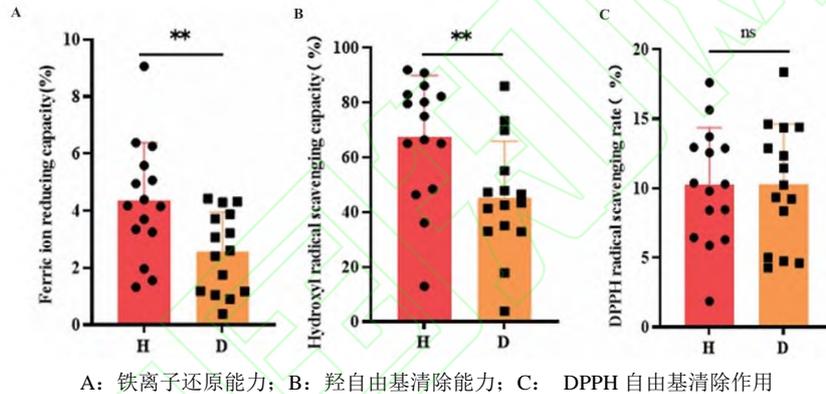


图 4 KEGG 通路富集

Fig. 4 KEGG pathway enrichment



A: 铁离子还原能力; B: 羟自由基清除能力; C: DPPH 自由基清除作用

图 5 健康组与腹泻组粪便物抗氧化能力

Fig. 5 Antioxidant capacity of fecal metabolites in the healthy and diarrheal groups

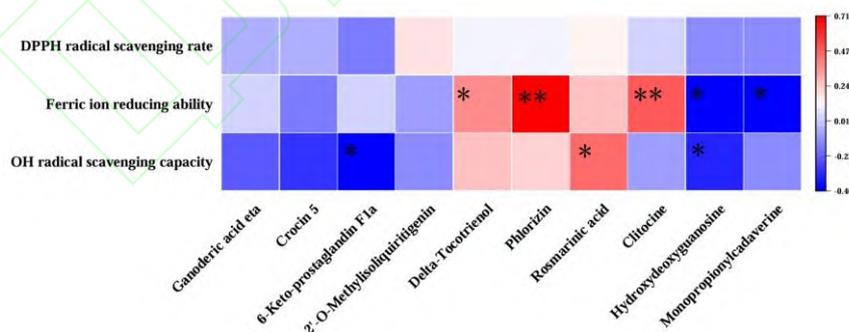


图 6 粪便抗氧化与显著性差异代谢物的相关性热图

Fig. 6 Heatmap of the correlation between fecal antioxidants and significantly differential metabolites

## 3 讨论

肠道作为高度复杂的生态系统, 其内环境稳态依赖于宿主细胞与肠道内各类物质的动态交互作用。粪便代谢物组成可反映肠道生理状态, 与免疫应答、氧化还原平衡及屏障功能密切相关<sup>[24]</sup>。因此,

系统分析腹泻犊牦牛粪便代谢物的特征性变化及其抗氧化特性, 对阐明犊牦牛腹泻的发病机制及优化治疗方案具有重要的理论与实践意义。

犊牛腹泻的发生与代谢物变化有着密切关系<sup>[25]</sup>。在本研究中, 与健康组相比, 腹泻犊牦牛粪便中水苏糖、6-酮前列腺素 F1a 和 8-羟基脱氧鸟苷

(8-OHdG)等代谢物显著增加,而 $\delta$ -三烯生育酚、根皮苷和迷迭香酸等代谢物显著减少。Fu等<sup>[26]</sup>报道新生犊牛腹泻时,DNA氧化损伤标志物8-羟基脱氧鸟苷水平显著高于健康犊牛,与本研究结果相似。研究<sup>[27]</sup>证实,鼠伤寒沙门氏菌在宿主肠道活性氧的刺激下通过Fenton反应攻击其DNA,诱导8-羟基脱氧鸟苷产生。Hamal等<sup>[28]</sup>研究发现,类芽孢杆菌科暴露于氧化应激状态时,自身活性氧会攻击DNA中的鸟嘌呤(G)碱基,产生8-羟基脱氧鸟苷。水苏糖是一种功能性低聚糖,主要存在于豆科、唇形科和玄参科植物中<sup>[29]</sup>。研究<sup>[30]</sup>发现,犊牛腹泻时有益菌减少可能导致水苏糖未被充分代谢,从而在粪便中积累。Takeuchi等<sup>[31]</sup>发现在肠道发生炎症和损伤时,6-酮前列腺素F1a含量增加。6-酮前列腺素F1a是由前列环素转化而来,其水平直接反映了前列环素的合成量<sup>[32]</sup>。肠道炎症发生时,肠道黏膜巨噬细胞、中性粒细胞分泌的IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等促炎因子,进一步激活周围细胞的环氧合酶(前列环素合成的关键酶)表达,导致前列环素增加,代谢产生6-酮前列腺素F1a<sup>[31]</sup>。根皮苷作为一种来源广泛的黄酮类化合物,主要存在于苹果的嫩叶、根茎、果实和其他植物组织中<sup>[33]</sup>。根皮苷通过抑制核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路和调节细胞因子分泌,显著减轻肠道炎症反应,提示其在肠道炎症相关疾病中的潜在保护作用<sup>[34]</sup>。迷迭香酸一种天然酚酸类化合物,广泛存在于各种植物中,尤以唇形科和紫草科植物中含量最高,具有抗炎、抗氧化的作用<sup>[35]</sup>。赵林艺等<sup>[36]</sup>发现迷迭香酸具有抑制沙门氏菌定植、减轻脏器损伤、缓解小鼠肠炎的功效。因此,犊牛腹泻的发生与粪便代谢谱的失衡密切相关,有益代谢物的减少与有害代谢物堆积,共同导致肠道屏障受损、免疫调节异常及炎症加剧。

本研究中差异代谢物主要富集半乳糖代谢、花生四烯酸代谢和嘌呤代谢等代谢通路,提示这些紊乱与腹泻密切相关。Gutzwiller等<sup>[37]</sup>报道腹泻犊牛存在半乳糖代谢紊乱的情况。在炎症性肠病和腹泻模型中,NF- $\kappa$ B信号通路的激活导致花生四烯酸代谢通路紊乱<sup>[38]</sup>。Vuerich等<sup>[39]</sup>发现,在炎症性肠病发生时,嘌呤代谢关键酶表达异常可影响免疫细胞活化、炎症因子释放及肠道黏膜功能。

在动物肠道微环境中,较高的抗氧化水平可有效降低肠道氧化应激水平,维持肠道微生态平衡,促进有益菌的生长和繁殖,抑制有害菌的侵袭,从而减少肠道炎症的发生<sup>[40]</sup>。在本研究中,腹泻组抗氧化指标Fe<sup>3+</sup>还原能力和羟自由基清除能力均显著

低于健康组。Fu等<sup>[26]</sup>报道腹泻犊牛粪便抗氧化水平显著降低,这与本研究结果相似。

$\delta$ -三烯生育酚、根皮苷和迷迭香酸与铁离子还原能力及羟自由基清除能力正相关,8-羟基脱氧鸟苷则与铁离子还原能力及羟自由基清除能力显著负相关。Suarna等<sup>[41]</sup>发现 $\delta$ -三烯生育酚在抑制脂质过氧化方面表现出非常强的活性。根皮苷能有效清除DPPH自由基和超氧阴离子,并展现出显著的铁离子还原能力<sup>[42]</sup>。迷迭香酸是一种已知具有强大抗氧化活性的多酚化合物<sup>[43]</sup>。迷迭香酸通过酚羟基结构提供氢原子,从而具有优异的铁离子还原能力和清除羟自由基、DPPH自由基等多种自由基的能力<sup>[44]</sup>。与健康犊牛相比,腹泻犊牛体内DNA氧化损伤生物标志物8-羟基脱氧鸟苷的水平显著升高,而代表机体整体防御能力的总抗氧化状态则显著降低<sup>[26]</sup>。在氧化应激状态下,活性氧中的羟基自由基优先攻击DNA中鸟嘌呤(G)的C8位,导致鸟嘌呤氧化,最终形成8-OHdG,该损伤会破坏DNA的正常碱基配对结构<sup>[45]</sup>。为修复DNA损伤,机体通过8-羟基鸟嘌呤DNA糖苷酶等机体特异性DNA修复酶对8-OHdG进行剪切清除,使其经肾脏随尿液排泄<sup>[46]</sup>。然而,当宿主DNA修复能力不足时会导致8-OHdG在体内持续累积,加剧肠道损伤,进一步促进腹泻的发展<sup>[46]</sup>。这些结果表明将富含抗氧化功能的根皮苷和迷迭香酸的植物添加在牦牛饲料中对缓解氧化应激、预防和治疗牦牛腹泻具有潜在应用价值。

肠道局部的氧化应激会导致氧化还原电位失衡,而肠道中低电位环境的维持对于双歧杆菌等有益菌的生存非常必要,同时也抑制大肠杆菌、变形杆菌等致病菌过度增殖<sup>[47]</sup>。Winter等<sup>[48]</sup>指出,当抗氧化防线崩溃,肠道氧化还原稳态被打破,氧化应激环境直接导致菌群结构从以脆弱拟杆菌、双歧杆菌等有益菌为主的有益生态,向以产气荚膜梭菌、黏附侵袭性大肠杆菌等致病菌为主的失调生态转变。具有抗氧化活性的多酚类化合物通过调节谷胱甘肽系统,维持细胞还原环境从而巩固肠道氧化还原电位,为双歧杆菌、梭状芽孢杆菌属等有益菌的定植和生长提供了有利的微环境<sup>[49]</sup>。本研究中,健康组中富集的具有抗氧化活性的 $\delta$ -三烯生育酚、根皮苷和迷迭香酸等物质可能通过提升肠道抗氧化水平,稳定肠道低氧化还原电位,进而改善肠道菌群维持机体健康。

## 4 结 论

本研究采用 LC-MS 技术对腹泻与健康犊牦牛粪便代谢物的差异性进行了分析。结果显示,与健康组相比,腹泻犊牦牛粪便中水苏糖、6-酮前列腺素 F1a 和 8-羟基脱氧鸟苷含量显著升高,而  $\delta$ -三烯生育酚、根皮苷和迷迭香酸含量显著降低。此外,肠道内半乳糖代谢、花生四烯酸代谢和嘌呤代谢等通路发生了显著变化。这些代谢物的显著变化与抗氧化性紧密相关。本研究揭示了腹泻犊牦牛粪便代谢物的变化及其对抗氧化性的影响,为开发预防牦牛腹泻的新型绿色添加剂提供理论基础。

### 参考文献:

- [1] 韩昕丽, 梁丹辉. 我国牦牛产业经济分析[J]. 中国食物与营养, 2024, 30(2):17-20.
- [2] 和占星, 黄梅芬, 雷波, 等. 中国牦牛的生态行为研究进展[J]. 家畜生态学报, 2019, 40(4):1-9.
- [3] 彭文丽. 高原牦牛适度标准化养殖效益探索[J]. 中国动物保健, 2025, 27(6):48-49.
- [4] 王靖俊, 刘帅, 彭容, 等. 中国规模化牧场后备奶牛疾病与淘汰现状[J]. 中国奶牛, 2022(2):61-66.
- [5] 石勇. 犊牦牛腹泻种类、病因及防治[J]. 畜牧兽医科学, 2021(23):32-33.
- [6] ZELIGER H I. Predicting disease onset in clinically healthy people[J]. Interdisciplinary toxicology, 2016, 9(2):39-54.
- [7] SIES H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine[J]. Redox biology, 2015, 4:180-183.
- [8] ZEESHAN M, ATIQ A, AIN Q U, et al. Evaluating the mucoprotective effects of glycyrrhizic acid-loaded polymeric nanoparticles in a murine model of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis via suppression of inflammatory mediators and oxidative stress[J]. Inflammopharmacology, 2021, 29(5): 1539-1553.
- [9] AL-SADI R, YE D, DOKLADNY K, et al. Mechanism of IL-1 $\beta$ -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability[J]. Journal of immunology, 2008, 180(8):5653-5661.
- [10] SAHOO D K, HEILMANN R M, PAITAL B, et al. Oxidative stress, hormones, and effects of natural antioxidants on intestinal inflammation in inflammatory bowel disease[J]. Frontiers in endocrinology, 2023, 14:1217165.
- [11] ROTHHAMMER V, QUINTANA F J. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease[J]. Nature reviews immunology, 2019, 19(3):184-197.
- [12] LIU H, WANG J, HE T, et al. Butyrate: a double-edged sword for health?[J]. Advances in nutrition, 2018, 9(1):21-29.
- [13] TRABER G M, STEVENS F J. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective[J]. Free radical biology and medicine, 2011, 51(5):1000-1013.
- [14] LIU P, WANG Y, YANG G, et al. The role of short-chain fatty acids in intestinal barrier function, inflammation, oxidative stress, and colonic carcinogenesis[J]. Pharmacological research, 2021, 165: 105420.
- [15] ROOKS M G, GARRETT W S. Gut microbiota, metabolites and host immunity[J]. Nature reviews immunology, 2016, 16(6):341-352.
- [16] MOESER A J, POHL C S, RAJPUT M. Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs[J]. Animal nutrition, 2017, 3(4):313-321.
- [17] DUNCAN S H, LOUIS P, THOMSON J M, et al. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota[J]. Environmental microbiology, 2009, 11(8): 2112-2122.
- [18] SHIN R, SUZUKI M, MORISHITA Y. Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. Journal of medical microbiology, 2002, 51(3): 201-206.
- [19] PENG L, LI Z R, GREEN R S, et al. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers[J]. The Journal of nutrition, 2009, 139(9): 1619-1625.
- [20] PARADA VENEGAS D, DE LA FUENTE M K, LANDSKRON G, et al. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases[J]. Frontiers in immunology, 2019, 10: 277.
- [21] 赵玉玺. 河南省犊牛腹泻主要病原调查及犊牛腹泻微流控芯片验证[D]. 郑州:河南农业大学, 2018.
- [22] JIA W, XIE G, JIA W. Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis[J]. Nature reviews gastroenterology & hepatology, 2018, 15(2):111-128.

- [23] GOMEZ D E, ARROYO L G, COSTA M C, et al. Characterization of the fecal bacterial microbiota of healthy and diarrheic dairy calves[J]. *Journal of veterinary internal medicine*, 2017, 31(3): 928-939.
- [24] WANG J, ZHU N, SU X, et al. Gut-microbiota-derived metabolites maintain gut and systemic immune homeostasis[J]. *Cells*, 2023, 12(5): 793.
- [25] MALMUTHUGE N, GUAN L L. Understanding the gut microbiome of dairy calves: opportunities to improve early-life gut health[J]. *Journal of dairy science*, 2017, 100(7):5996-6005.
- [26] FU Z L, YANG Y, MA L, et al. Dynamics of oxidative stress and immune responses in neonatal calves during diarrhea[J]. *Journal of dairy science*, 2023, 107(2):1286-1298.
- [27] FASNACHT M, POLACEK N. Oxidative stress in bacteria and the central dogma of molecular biology[J]. *Frontiers in Molecular biosciences*, 2021, 8: 671037.
- [28] HAMAL DHAKAL S, KAVITA K, PANCHAPAKESAN S S S, et al. 8-oxoguanine riboswitches in bacteria detect and respond to oxidative DNA damage[J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2023, 120(40): e2307854120.
- [29] 马璇. 水苏糖的研究现状[J]. *吉林农业*, 2019 (3): 108-109.
- [30] 张燕敏, 刘帅, 滕战伟, 等. 功能性寡糖缓解犊牛腹泻的机理研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2025, 56(3):979-994.
- [31] TAKEUCHI K, AMAGASE K. Roles of cyclooxygenase, prostaglandin E2 and EP receptors in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract[J]. *Current pharmaceutical design*, 2018, 24(18):2002-2011.
- [32] MONCADA S, GRYGLEWSKI R, BUNTING S, et al. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation[J]. *Nature*, 1976, 263(5579):663-665.
- [33] 李童, 孔丽娟, 冯艳丽, 等. 根皮苷改善鼠伤寒沙门菌诱导的小鼠盲肠炎以及肠道屏障损伤[J]. *中国兽医学报*, 2025, 45(3):587-593.
- [34] LIU Y, LIU Y, GUO Y, et al. Phlorizin exerts potent effects against aging induced by D-galactose in mice and PC12 cells[J]. *Food & function*, 2021, 12(5):2148-2160.
- [35] 苏平, 王根女, 吴丹, 等. 迷迭香酸的生理活性功能及其来源研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(12):135-138.
- [36] 赵林艺, 易丹丹, 王梦会, 等. 迷迭香酸对肠炎沙门氏菌致小鼠腹泻及组织损伤的影响[J]. *饲料研究*, 2025, 48(13):67-72.
- [37] GUTZWILLER A. Glucose and galactose absorption after ingestion of milk containing hydrolysed lactose in calves with diarrhoea[J]. *Journal of veterinary medicine series A*, 2000, 47(8): 495-500.
- [38] ZHOU R, HUANG K, CHEN S, et al. Zhilining Formula alleviates DSS-induced colitis through suppressing inflammation and gut barrier dysfunction via the AHR/NF- $\kappa$ Bp65 axis[J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155571.
- [39] VUERICH M, MUKHERJEE S, ROBSON SC, et al. Control of gut inflammation by modulation of purinergic signaling[J]. *Frontiers in immunology*, 2020, 11:1882.
- [40] CHENG Y, LIU S, WANG F, et al. Effects of dietary *Terminalia chebula* extract on growth performance, immune function, antioxidant capacity, and intestinal health of broilers[J]. *Animals*, 2024, 14(5):746.
- [41] SUARNA C, HOOD R L, DEAN R T, et al. Comparative antioxidant activity of tocotrienols and other natural lipid-soluble antioxidants in a homogeneous system, and in rat and human lipoproteins[J]. *Biochimica et biophysica acta (BBA): lipids and lipid metabolism*, 1993, 1166(2/3): 163-170.
- [42] REZK B M, HAENEN G R, VAN DER VIJGH W J, et al. The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2002, 295(1):9-13.
- [43] IMRAISH A, ZIHLIF M, ABU THIAB T, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of rosmarinic acid trimetallic (Cu<sub>0.5</sub>Zn<sub>0.5</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles[J]. *Chemistry & biodiversity*, 2024, 21(5):e202301739.
- [44] MARCHEV A S, VASILEVA L V, AMIROVA K M, et al. Rosmarinic acid from bench to valuable applications in food industry[J]. *Trends in food science & technology*, 2021, 117: 182-193.
- [45] COOKE M S, EVANS M D, DIZDAROGLU M, et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease[J]. *The FASEB journal*, 2003, 17(10):1195-1214.
- [46] 杨柳春, 王克义. DNA 氧化损伤标志物 8-羟基脱氧鸟苷与相关肿瘤关系的研究进展[J]. *浙江医学*, 2021, 43(23): 2608-2612.
- [47] ROUND J L, MAZMANIAN S K. The gut microbiota

shapes intestinal immune responses during health and disease[J]. *Nature reviews immunology*, 2009, 9(5): 313-323.

[48] WINTER S E, BÄUMLER A J. Why related bacterial species bloom simultaneously in the gut: principles underlying the 'Like will to like' concept[J]. *Cellular*

*microbiology*, 2014, 16(2): 179-184.

[49] MILEO A M, NISTICÒ P, MICCADEI S. Polyphenols: immunomodulatory and therapeutic implication in colorectal cancer[J]. *Frontiers in immunology*, 2019, 10: 729.

