

狼疮性肾炎患者肠道菌群变化及代谢物硫酸吲哚酚分析

苏 晗¹, 邢 倩^{2*}

¹青岛大学附属青岛市市立医院, 山东 青岛

²青岛大学附属青岛市市立医院, 风湿免疫科, 山东 青岛

Email: 1059061796@qq.com, *gdz696@163.com

收稿日期: 2020年12月25日; 录用日期: 2021年1月19日; 发布日期: 2021年1月26日

摘 要

目的: 分析狼疮性肾炎(Lupus nephritis, LN)患者与健康人群肠道菌群的结构及代谢产物差异, 探讨肠道菌群在LN发病中的作用。方法: 选取系统性红斑狼疮患者51例, 分为狼疮性肾炎组(LN组) 27例和狼疮非肾炎组(N-LN组) 24例, 另选取53例健康志愿者作为健康对照组(H组)。基于Illumina MiSeq平台分别对SLE患者和健康对照组的粪便样本进行Alpha多样性分析、Beta多样性分析以及属水平上的菌群差异性分析, 采用ELISA双抗体夹心法测定SLE患者和健康对照组血清硫酸吲哚酚(IS)浓度, 对LN患者的24h尿蛋白定量与其血清IS浓度进行Pearson相关性分析, 采用受试者工作曲线(ROC曲线), 根据最佳敏感性和特异性确定IS诊断界点。结果: LN组较健康对照组血IS浓度和肠杆菌含量均显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。在LN患者中, 24 h尿蛋白定量与血清IS浓度呈正相关($r = 0.86, P < 0.01$)。结论: 狼疮性肾炎患者存在肠道菌群失调, 肠杆菌含量明显增加, 相关代谢产物血清IS异常, 可能参与LN发病。

关键词

狼疮性肾炎, 肠道菌群, 24 h尿蛋白定量, 硫酸吲哚酚

Analysis of Intestinal Flora and Indoxyl Sulfate in the Patients with Lupus Nephritis

Han Su¹, Qian Xing^{2*}

¹Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao Shandong

²Department of Rheumatic Immunity, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao Shandong

Email: 1059061796@qq.com, *gdz696@163.com

*通讯作者。

Abstract

Objective: To analyze the structure and metabolites of intestinal flora in patients with lupus nephritis and healthy controls, and to explore the role of intestinal flora in the pathogenesis of LN. **Methods:** 51 patients with systemic lupus erythematosus were divided into the lupus nephritis group (group LN, n = 27) and the lupus non-glomerulonephritis group (group N-LN, n = 24), and 53 healthy volunteers were selected as the healthy control group (group H). Based on the Illumina-MiSeq platform, the fecal samples of SLE patients and healthy controls were analyzed by Alpha diversity analysis, Beta diversity analysis and flora difference analysis at genus level. The blood Indoxyl sulfate (IS) concentration in SLE patients and healthy controls was determined by ELISA double antibody sandwich method. The correlation between the 24 h urinary protein quantification and the blood IS concentration in LN patients was examined by the Pearson correlation test. The best cutoffs for the blood IS concentration in predicting a 24 h urinary protein quantification were determined with the receiver operating characteristic curve (ROC). **Results:** The blood IS concentration and the content of fecal Faecalibacterium in group LN were significantly higher than those in the healthy control group ($P < 0.05$). In patients with LN, the 24 h urinary protein quantification was positively correlated with the blood IS concentration ($r = 0.86, P < 0.01$). **Conclusion:** The patients with lupus nephritis have intestinal flora imbalance, the content of fecal Faecalibacterium is significantly increased, and the blood IS concentration is abnormal, which may be involved in the pathogenesis of LN.

Keywords

Lupus Nephritis, Intestinal Flora, 24 h Urinary Protein Quantification, Indoxyl Sulfate

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种以大量自身抗体产生为特征的全身性自身免疫性疾病,可累及肾脏、心脏、神经系统等多个脏器,约50%~70%的SLE患者合并肾脏损害,SLE患者早期肾脏受累通常预后不良[1]。狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)患者肾脏受累的表型形式复杂多样,如蛋白尿、管型尿、血尿及不同程度的肾功能损害,其中以蛋白尿最为常见。临床上通常以24 h尿蛋白定量评估LN患者病情严重程度。SLE的发病与遗传、环境密切相关,目前病因不明,但近年来发现肠道菌群的紊乱可能参与了SLE的发病[2]。肠道是人体最大的免疫器官,正常情况下肠道菌群按照一定的比例相互制约调节肠道的稳态和免疫状态[3]。当肠道菌群比例失调,将会破坏肠道屏障的稳态从而导致自身免疫性疾病的发生[4],其致病机制可能与肠道代谢物密切相关。

血清硫酸吲哚酚(Indoxyl sulfate, IS)是一种由肠杆菌(Faecalibacterium)等菌群代谢产生的一种蛋白结合类的肾毒性物质,其可以通过氧化应激及相关炎症反应损害肾脏血管内皮,从而损伤肾脏[5]。IS对肾脏等靶器官的损害是近年来研究的热点之一。但LN患者中尿蛋白与血清IS浓度是否存在相关关系尚不明确。本文旨在通过研究LN患者与健康人群肠道菌群的结构差异,分析24 h尿蛋白定量与血清IS浓度

之间的关系, 进一步评估血清 IS 浓度与 LN 患者肾脏损害之间的关联性, 从而为寻求 LN 新的治疗靶点提供理论依据。

2. 资料与方法

2.1. 一般资料

收集 2018 年 9 月至 2020 年 10 月在青岛市市立医院风湿免疫科门诊及病房治疗的已确诊及新发 SLE 患者, 作为 SLE 组, 共计 51 例。所有 SLE 患者均符合美国风湿病学会(American Rheumatism Association criteria, ARA)在 1997 年所修订的 SLE 分类标准[6], LN 患者同时具备上述 SLE 分类标准并具有以下一项以上表现: 1) 蛋白尿: >0.5 g/24h; 2) 管型: 红细胞、血红蛋白、颗粒管型或混合管型; 3) 肾活检: 证实为狼疮性肾炎, 病理改变符合国际肾脏病学会/肾脏病理学会(ISN/RPS 分类标准)。入选 24 h 尿蛋白定量 >0.5 g 的 LN 患者作为狼疮性肾炎组(LN 组, 27 例), 男 8 例, 女 19 例, 平均年龄 36.11 ± 10.99 岁; 明确无狼疮性肾炎的 SLE 患者作为狼疮无肾炎组(N-LN 组, 24 例), 男 6 例, 女 18 例, 平均年龄 37.58 ± 9.84 岁。另选取健康志愿者作为对照组(H 组, 53 例), 男 18 例, 女 35 例, 平均年龄 37.96 ± 10.73 岁。健康对照组与 SLE 组在性别、年龄上差异无统计学意义($P > 0.05$)。

本研究的各个程序均符合医院伦理委员会所制定的伦理学标准, 所有入组对象均签署知情同意书。

2.1.1. 纳入标准

1) 符合 ARA 在 1997 年 SLE 分类诊断标准; 2) 年龄 18~60 周岁; 3) 体质指数在正常范围之内, 无超重或肥胖; 4) 未重叠其他风湿性疾病如类风湿性关节炎、干燥综合征等; 5) 在采样前, 受试者至少 8 周未接受抗生素或益生菌治疗; 6) 无特殊饮食习惯。

2.1.2. 排除标准

1) 正在进行或既往进行过肾脏透析的患者; 2) 肾脏移植患者; 3) 肌酐清除率 < 15 ml/min; 4) 患有高血压、糖尿病, 精神疾病, 胃肠炎及其他炎症性疾病和传染病等; 5) 入院前服用过糖皮质激素或免疫抑制剂药物; 6) 失访者。

2.2. 方法

2.2.1. 尿液的收集与检测

嘱 SLE 患者和健康对照组于第一天早 7 点排空膀胱后, 收集第一天早 7 点到第二天早 7 点的 24 小时尿量于干燥洁净的容器中, 充分混匀后用专用尿液收集器取 5 ml 尿液送于检验科测定其蛋白质浓度, 再与 24 小时尿液总量相乘, 即得到 24 小时尿蛋白总量。

2.2.2. 粪便的收集与菌群的测定

采用专用粪便标本采集管, 分别收集 SLE 组和健康对照组的粪便样本, 利用 Illumina MiSeq 平台对样本 16S rRNA 基因序列 V3~V4 高变区进行 PCR 扩增及测序, 对 SLE 组和健康对照组进行 Alpha 多样性分析、Beta 多样性分析, 并在属水平上对 SLE 组与健康对照组粪便中肠杆菌的含量进行差异性分析。

2.2.3. 酶联免疫法(ELISA)测定血硫酸吲哚酚

分别采取 SLE 组和健康对照组晨起静脉血 2 ml, 取上清液于 EP 管在 -80°C 冰箱中保存。检测采用双抗体夹心法, 严格按说明书操作。

2.3. 统计学处理

采用 SPSS20.0 进行统计学分析, 计量资料以均数 \pm 标准差表示, 用 *Pearson* 进行相关性分析。 $P < 0.05$

表示差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 狼疮性肾炎组与健康对照组肠道菌群存在差异

本研究基于 OTU 水平对 SLE 组和健康对照组在 Illumina MiSeq 平台进行肠道菌群 Alpha 多样性分析和 Beta 多样性分析, 发现 SLE 组患者较健康对照组 Alpha 多样性、Beta 多样性显著下降, 其中 LN 组较健康对照组下降更为显著, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。在菌门水平上, SLE 组粪便中厚壁菌门含量较健康对照组显著下降($P < 0.05$), 拟杆菌门显著上升($P < 0.05$), 厚壁菌门/拟杆菌门(F/B)比率显著下降($P < 0.05$)。在菌属水平上, LN 组粪便中双歧杆菌、乳酸杆菌等含量较健康对照组下降($P < 0.05$), 而肠杆菌、瘤胃球菌属等含量较健康对照组上升($P < 0.05$), 见图 1。其中 LN 组粪便中肠杆菌的含量较健康对照组显著上升($P < 0.01$), 见图 2。

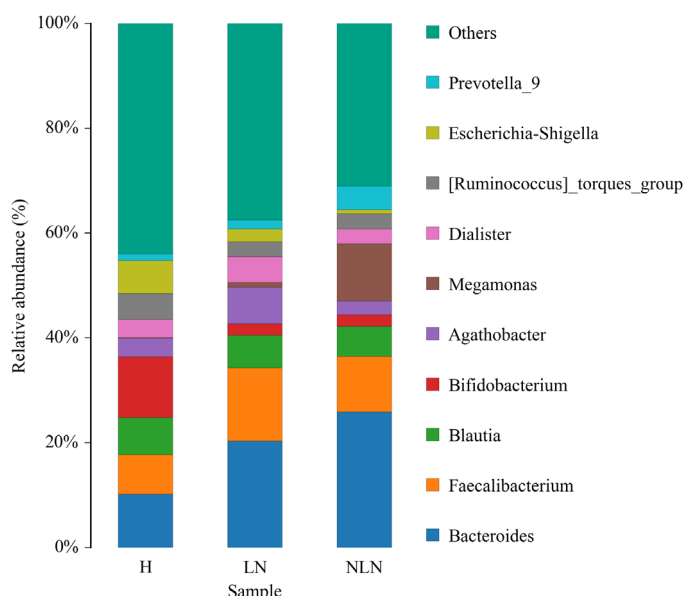


Figure 1. Histogram of species distribution
图 1. 物种分布柱状图

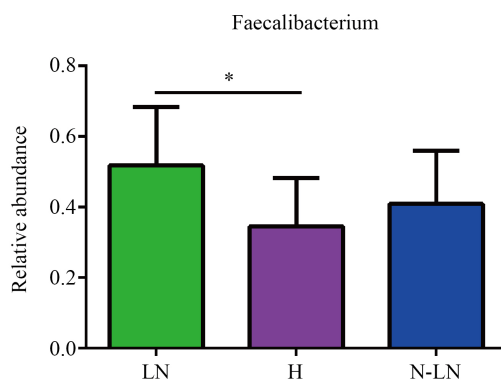


Figure 2. Histogram of faecalibacterium content difference, *: $P < 0.01$
图 2. 肠杆菌含量差异柱状图, *: $P < 0.01$

3.2. 狼疮性肾炎组与健康对照组血清 IS 浓度存在差异

LN 组血清 IS 浓度为 (100.56 ± 18.57) pg/ml, 狼疮无肾炎组血清 IS 浓度为 (17.13 ± 3.25) pg/ml, 健康对照组血清 IS 浓度为 (11.06 ± 2.41) pg/ml。LN 组血清 IS 浓度较狼疮无肾炎组、健康对照组均显著增加($P < 0.001$)。进一步对 LN 组的 24 h 尿蛋白定量与血清 IS 浓度进行相关性分析, 发现 LN 组的 24 h 尿蛋白定量与其血清 IS 浓度之间呈正相关($r = 0.86, P < 0.01$), 即随着 LN 组 24 h 尿蛋白定量的增加, 其血清中的 IS 浓度也随之升高, 见图 3。其相关性方程式为 $Y = 6.79 * X + 26.28$ 。

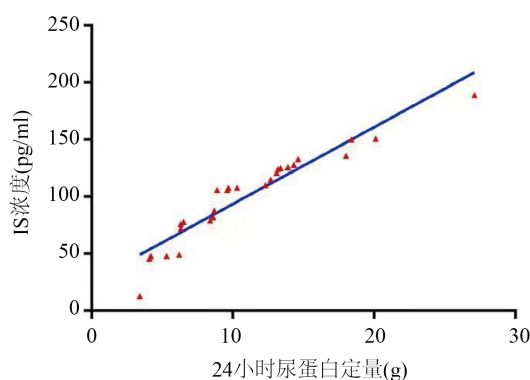


Figure 3. Scatter diagram of correlation analysis
图 3. 相关性分析散点图

3.3. 硫酸吲哚酚预测狼疮性肾炎患者的 24 h 尿蛋白定量水平

把 IS 作为诊断指标, 将 24 h 尿蛋白定量是否大于 0.5 g 作为分组变量, 绘制 SLE 组的 ROC 曲线, 见图 4。结果显示, 血清 IS 曲线下面积 $AUC = 0.755$, 诊断有统计学意义($P = 0.002$)。通过尤登指数(即敏感度 + 特异度-1)计算得出, 血清 IS 的 ROC 曲线, 其最佳阈值出现在敏感度为 0.778, 特异度为 0.625 时, 最佳诊断界值为 74 pg/ml。即当血清 IS 浓度在 74 pg/ml 时, 能较好的反映 LN 患者的 24 h 尿蛋白定量水平。

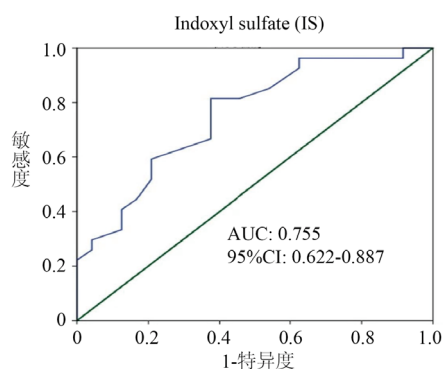


Figure 4. ROC curve of serum IS
图 4. 血清 IS 的 ROC 曲线

4. 讨论

目前, 国内外研究均证实 SLE 患者存在不同程度的肠道菌群失调[7], 其中最具特征性的为厚壁菌和拟杆菌比值(F/B)的降低[8]。有研究显示, SLE 患者肠道菌群中链球菌和乳杆菌显著增多, 而费氏杆菌显

著减少[9]; 另有研究显示 SLE 患者肠道菌群中乳酸杆菌显著降低, 毛螺菌和瘤胃球菌显著增加[10][11]。肠道菌群多样性下降[12], 肠道菌群及其代谢产物的紊乱[13]可使全身免疫系统过度活跃, 从而导致自身免疫病的发生发展。本研究发现, 与健康对照组相比, SLE 患者粪便双歧杆菌、乳酸杆菌等有益菌含量显著减少, 而肠杆菌、瘤胃球菌属等菌群含量增多。其中, LN 患者粪便菌群多样性较健康对照组显著下降, 其肠杆菌含量较健康对照组显著增加, 提示我们可能由于肠杆菌及其代谢产物含量的增加, 并通过某种途径参与了自身免疫系统的调节而导致了 LN 的发病。

一直以来, LN 的发病机制认为主要是在自身抗体的作用下, 导致补体和免疫复合物沉积于肾小球, 从而趋化了 IL-17、IL-6、TNF γ 等炎症因子造成肾脏的局部炎症反应[14][15]。而新近研究表明, 肾脏在无免疫复合物沉积的情况下仍可出现不同程度的损伤[16], 提示存在其他危害肾脏的因素。IS 是一种分子量大小约 251 Da 的蛋白结合型尿毒症毒素[17], 是由肠杆菌等菌群产生的肠道代谢产物[18]。肠杆菌等通过对肠道中滞留的色氨酸进行分解代谢, 产生吲哚后吸收入血, 在肝脏中羟基化生成 3-羟基吲哚, 最终经硫酸化形成 IS [19]。血清 IS 浓度与肾功能呈负相关, 在肾功能正常的情况下, 血清 IS 主要通过肾小管分泌清除后随尿液排出; 当肾功能受损时, 经尿液排出的 IS 随之减少, 从而造成了 IS 在体内的聚集, 进一步加重了肾脏的损伤[20]。近年来, 认为 IS 与慢性肾脏病的发生发展密切相关。目前认为, 血清 IS 不仅可以通过促进炎症因子如 IL-6、IL-17 的表达导致肾脏发生局部炎症反应, 还可以对细胞内活性氧水平进行上调[5], 诱发血管舒缩反应的失衡, 进而导致肾脏系统内皮发生损伤。LN 作为一种危害性极大的肾脏疾病, 常导致不同程度的肾脏损伤。

本研究发现, LN 患者与健康人肠道菌群的结构和比例存在不同程度的差异, 其肠道益生菌比例下降, 而肠道有害菌比例上升, 且肠道菌群多样性下降, LN 患者肠道中产 IS 的大肠杆菌含量的增多, LN 患者 24 h 尿蛋白定量与其血清 IS 浓度呈正相关, 提示 IS 与 LN 的发病之间可能存在某种关联, 推测 IS 与 LN 病情可能存在互为因果的关系。一方面由于 LN 患者肠道菌群的失调, 使肠道中产 IS 的肠杆菌显著增加, 增加了血清 IS 的含量; 另一方面, 由于 LN 患者本身存在的肾脏器质性改变导致血清 IS 排出受阻而蓄积, 进一步加重了肾脏病情从而尿蛋白量增加。

近年来, 对于肠道菌群及其代谢产物的研究越来越多, 发现多种肠道菌及其代谢产物与肾脏疾病密切相关。有研究发现, 三甲氧胺(TMAO)的增加与肾脏疾病的发生发展及预后相关[21]。TMAO 是在肠道内经肠道菌代谢胆碱及卵磷脂生成的代谢产物, 吸收入血后在肝脏单加氧酶的作用下进一步氧化生成 TMAO, 其含量被证实与拟杆菌目呈正相关[22]。目前口服益生菌制剂[23]及进行粪便移植[24], 是主要的改善肠道菌群紊乱的方式, 可以在一定程度上干预自身免疫性疾病的发病及病情严重程度。最新研究发现, 维生素 B3 的代谢产物胡芦巴碱不仅可以抑制大肠杆菌、粪肠球菌等条件致病菌生长, 还可以抑制 TMAO 的生成[25]。Wikoff 等提出了肾毒性的肠道菌群代谢产物马尿酸和苯乙酸[26]; Jones 在慢性肾脏病患者体内发现了可经由肠道微生物代谢产生的胍类化合物, 部分具有肾毒性[27]; 吲哚乙酸具有诱导肾小球硬化、肾间质纤维化的作用[28]; 血中对甲酚硫酸盐含量的升高与慢性肾脏病患者的病死率相关联[29]。临床研究已经证实了肾脏病与 IS 之间的关联性, 而 LN 作为肾脏病的一种, 通过降低 SLE 患者血清中 IS 的浓度, 可能成为将来预防及改善 LN 患者肾脏损害的一种新型治疗手段。目前, 血清 IS 可以通过调节肠道菌群、口服吸附剂、血液透析等方式清除[30][31]。因此通过给予 LN 患者口服胡芦巴碱等物质抑制肠道中大肠杆菌等条件致病菌的生长, 从而减少 IS 等肾毒性肠道菌群代谢产物的生成, 可能会延缓 LN 患者肾脏病情的进展。

5. 不足与展望

由于实验室条件限制, 本实验对 IS 的浓度测定采用酶联免疫法进行, 目前国内外对 IS 的测定多采

用液相色谱-质谱分析法,其准确度更佳,但酶联免疫法检测 IS 浓度价格便宜、操作方便,临床中可用于初步评估。此外,本研究中 LN 患者的样本量不足,且饮食习惯存在地域差别,需要多地域更大的样本量来进行证实研究。因此,我们下阶段将优化实验方法及样本量,从不同的肠道菌群和代谢产物角度出发,通过改善肠道菌群结构从而抑制肾毒性肠道菌代谢产物,为延缓及防治肾脏疾病提供新的治疗思路。

参考文献

- [1] Almaani, S., Meara, A. and Rovin, B.H. (2017) Update on Lupus Nephritis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, **12**, 825-835. <https://doi.org/10.2215/CJN.05780616>
- [2] Sonnenburg, J.L. and Backhed, F. (2016) Diet-Microbiota Interactions as Moderators of Human Metabolism. *Nature*, **535**, 56-64. <https://doi.org/10.1038/nature18846>
- [3] Qin, J., Li, R., Raes, J., et al. (2010) A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing. *Nature*, **464**, 59-65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- [4] 李苗, 付冰冰, 等. 系统性红斑狼疮与肠道菌群的相关研究[J]. 新医学, 2016, 47(11): 735-741.
- [5] Chu, S., Mao, X., Guo, H., et al. (2017) Indoxyl Sulfate Potentiates Endothelial Dysfunction via Reciprocal Role for Reactive Oxygen Species and RhoA/ROCK Signaling in 5/6 Nephrectomized Rats. *Free Radical Research*, **51**, 237-252. <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1296575>
- [6] Hochberg, M.C. (1997) Updating the American College of Rheumatology Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatology*, **40**, 1725. <https://doi.org/10.1002/art.1780400928>
- [7] 唐余燕, 贺海东. 肠道微生物群在慢性肾脏病中的作用机制研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2019(5): 957-961.
- [8] Hevia, A., Milani, C., Lopez, P., et al. (2014) Intestinal Dysbiosis Associated with Systemic Lupus Erythematosus. *MBio*, **5**, e01548-01514. <https://doi.org/10.1128/mBio.01548-14>
- [9] Li, Y., Wang, H.F., Li, X., et al. (2019) Disordered Intestinal Microbes Are Associated with the Activity of Systemic Lupus Erythematosus. *Clinical Science*, **133**, 821-838. <https://doi.org/10.1042/CS20180841>
- [10] Azzouz, D., Omarbekova, A., Heguy, A., et al. (2019) Lupus Nephritis Is Linked to Disease-Activity Associated Expansions and Immunity to a Gut Commensal. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **78**, 947-956. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214856>
- [11] Zhang, H., Liao, X., Sparks, J.B., et al. (2014) Dynamics of Gut Microbiota in Autoimmune Lupus. *Applied and Environmental Microbiology*, **80**, 7551-7560. <https://doi.org/10.1128/AEM.02676-14>
- [12] Petersen, C. and Round, J.L. (2014) Defining Dysbiosis and Its Influence on Host Immunity and Disease. *Cellular Microbiology*, **16**, 1024-1033. <https://doi.org/10.1111/cmi.12308>
- [13] D'amelio, P. and Sassi, F. (2018) Gut Microbiota, Immune System, and Bone. *Calcified Tissue International*, **102**, 415-425. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0331-y>
- [14] Nowling, T.K. and Gilkeson, G.S. (2011) Mechanisms of Tissue Injury in Lupus Nephritis. *Arthritis Research & Therapy*, **13**, 250. <https://doi.org/10.1186/ar3528>
- [15] Schmidt, T., Paust, H.J., Krebs, C.F., et al. (2015) Function of the Th17/Interleukin-17A Immune Response in Murine Lupus Nephritis. *Arthritis & Rheumatology*, **67**, 475-487. <https://doi.org/10.1002/art.38955>
- [16] 陈独群, 胡伟新. 狼疮足细胞病: 一种特殊类型的狼疮性肾炎[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2017, 26(1): 72-75+94.
- [17] Vaziri, N.D., Zhao, Y.Y. and Pahl, M.V. (2016) Altered Intestinal Microbial Flora and Impaired Epithelial Barrier Structure and Function in CKD: The Nature, Mechanisms, Consequences and Potential Treatment. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **31**, 737-746. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv095>
- [18] Ellis, R.J., Small, D.M., Vesey, D.A., et al. (2016) Indoxyl Sulphate and Kidney Disease: Causes, Consequences and Interventions. *Nephrology (Carlton)*, **21**, 170-177. <https://doi.org/10.1111/nep.12580>
- [19] Bergstrom, J. and Lindholm, B. (1998) Malnutrition, Cardiac Disease, and Mortality: An Integrated Point of View. *American Journal of Kidney Diseases*, **32**, 834-841. [https://doi.org/10.1016/S0272-6386\(98\)70148-9](https://doi.org/10.1016/S0272-6386(98)70148-9)
- [20] 唐小芳, 刘虹. 硫酸吡啶酚对心血管毒性作用的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2019, 12(7): 697-701.
- [21] 张发明, 李玥葵. 菌移植治疗炎症性肠病的争议[J]. 协和医学杂志, 2019, 10(3): 211-215.
- [22] 王珊, 夏耿红, 何彦, 等. 氧化三甲胺分布特征及其与肠道菌群的关联性[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(4):

455-460.

- [23] Kim, D., Yoo, S.A. and Kim, W.U. (2016) Gut Microbiota in Autoimmunity: Potential for Clinical Applications. *Archives of Pharmacal Research*, **39**, 1565-1576. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0796-7>
- [24] Xu, M.Q., Cao, H.L., Wang, W.Q., *et al.* (2015) Fecal Microbiota Transplantation Broadening Its Application beyond Intestinal Disorders. *World Journal of Gastroenterology*, **21**, 102-111. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i1.102>
- [25] Anwar, S., Bhandari, U., Panda, B.P., *et al.* (2018) Trigonelline Inhibits Intestinal Microbial Metabolism of Choline and Its Associated Cardiovascular Risk. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **159**, 100-112. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.06.027>
- [26] Wikoff, W.R., Anfora, A.T., Liu, J., *et al.* (2009) Metabolomics Analysis Reveals Large Effects of Gut Microflora on Mammalian Blood Metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 3698-3703. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812874106>
- [27] Jones, J.D. and Burnett, P.C. (1974) Creatinine Metabolism in Humans with Decreased Renal Function: Creatinine Deficit. *Clinical Chemistry*, **20**, 1204-1212. <https://doi.org/10.1093/clinchem/20.9.1204>
- [28] Dou, L., Sallee, M., Cerini, C., *et al.* (2015) The Cardiovascular Effect of the Uremic Solute Indole-3 Acetic Acid. *Journal of the American Society of Nephrology*, **26**, 876-887. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013121283>
- [29] Watanabe, H., Miyamoto, Y., Honda, D., *et al.* (2013) p-Cresyl Sulfate Causes Renal Tubular Cell Damage by Inducing Oxidative Stress by Activation of NADPH Oxidase. *Kidney International*, **83**, 582-592. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.448>
- [30] Meert, N., Eloit, S., Schepers, E., *et al.* (2011) Comparison of Removal Capacity of Two Consecutive Generations of High-Flux Dialysers during Different Treatment Modalities. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **26**, 2624-2630. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq803>
- [31] Sirich, T.L., Luo, F.J., Plummer, N.S., *et al.* (2012) Selectively Increasing the Clearance of Protein-Bound Uremic Solutes. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **27**, 1574-1579. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr691>