

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2016)24-11-1086-05

## 基于 DGGE 和 real-time PCR 分析肾血管性高血压大鼠肠道菌群的变化

陈珍珍<sup>1</sup>, 胡海<sup>2</sup>, 文荣<sup>1</sup>, 白丽云<sup>1</sup>, 王英<sup>3</sup>, 王占黎<sup>4</sup>, 杨建新<sup>5</sup>

(包头医学院 1.研究生院, 2.基础医学院病理生理学教研室, 3.公共卫生学院流行病学教研室, 4.第二附属医院检验科, 内蒙古包头市 014030; 5.包头钢铁集团第三职工医院, 内蒙古包头市 014010)

[关键词] 肾血管性高血压; 肠道菌群; 两肾一夹模型; 大鼠

[摘要] **目的** 分析两肾一夹(2K1C)肾血管性高血压(RVH)模型大鼠肠道菌群结构的变化,为 RVH 的防治提供新思路。**方法** 8 周龄雄性 SD 大鼠随机分为 2K1C 模型组和假手术组(每组 8 只),2K1C 手术制备 RVH 模型。无创尾套法测量大鼠尾动脉收缩压。手术干预 4 周后,收集肠道中粪便并从中提取菌群 DNA,采用 PCR-变性梯度凝胶电泳方法分析 2K1C 大鼠肠道菌群的多样性,实时荧光定量 PCR 对肠道中优势菌群双歧杆菌属和乳酸杆菌属进行定量检测。**结果** 与假手术组相比,2K1C 模型组尾动脉收缩压显著升高(164.77 mmHg 比 122.08 mmHg,  $P < 0.05$ ),而假手术组尾动脉收缩压与造模前相比未发生明显改变(122.08 mmHg 比 120.13 mmHg,  $P > 0.05$ )。2K1C 模型组与假手术组间肠道菌群多样性有明显差异( $P < 0.05$ ),且 2K1C 模型组肠道菌群多样性较低。2K1C 模型组双歧杆菌属和乳酸杆菌属含量明显低于假手术组( $2.335 \times 10^{-3}$  ng/g 比  $1.805 \times 10^{-2}$  ng/g,  $0.048$  ng/g 比  $0.139$  ng/g,  $P < 0.05$ )。**结论** 2K1C RVH 大鼠肠道菌群多样性显著降低,双歧杆菌属和乳酸杆菌属含量发生明显改变,提示其可能参与了 2K1C 大鼠高血压的发生发展过程。

[中图分类号] R544.1

[文献标识码] A

## Changes of Intestinal Flora in Rats with Renovascular Hypertension Analyzed by DGGE and Real-time PCR

CHEN Zhen-Zhen<sup>1</sup>, HU Hai<sup>2</sup>, WEN Rong<sup>1</sup>, BAI Li-Yun<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>3</sup>, WANG Zhan-Li<sup>4</sup>, and YANG Jian-Xin<sup>5</sup>

(1. Graduate School, 2. Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, 3. Department of Epidemiology, School of Public Health, 4. Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014030, China; 5. Third Workers Hospital of Baotou Iron and Steel Group, Baotou, Inner Mongolia 014010, China)

[KEY WORDS] Renovascular Hypertension; Intestinal Flora; Two Kidney One Clip Model; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To analyze the changes of the intestinal flora structure of two kidney one clip (2K1C) renovascular hypertension (RVH) rats, and to provide a new idea for the prevention and treatment of RVH. **Methods** 8 week old male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 2K1C model group ( $n=8$ ) and sham operation group ( $n=8$ ), and RVH model was prepared by 2K1C surgery. The systolic pressure of tail artery was measured by non-invasive tail cuff method. At 4th week after the operation, intestinal feces were collected and the bacteria DNA was extracted from the feces. The diversity of intestinal flora in 2K1C rats was analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. The dominant bacteria (bifidobacterium and lactobacillus) in the intestinal tract were quantitatively detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** Compared with the sham operation group, systolic pressure of tail artery in 2K1C model group was significantly higher than that in sham operation group (164.77 mmHg vs 122.08 mmHg,  $P < 0.05$ ). However, there was no significant change in the systolic pressure of tail artery in sham operation group compared with the previous model (122.08 mmHg vs 120.13 mmHg,  $P > 0.05$ ). There was a significant difference in intestinal flora diversity be-

[收稿日期] 2016-04-26

[修回日期] 2016-05-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460049);内蒙古高等学校青年科技英才支持计划项目(NJYT-14-A13)

[作者简介] 陈珍珍,在读硕士研究生,研究方向为疾病防控,E-mail 为 359438056@qq.com。通讯作者杨建新,副主任医师,研究方向为肾血管病变,E-mail 为 nmyangjianxix@163.com。胡海,副教授,研究方向为肠道菌群,E-mail 为 btyxyhh@163.com。

tween 2K1C model group and sham operation group ( $P < 0.05$ ), and intestinal flora diversity was lower in 2K1C model group. The contents of bifidobacterium and lactobacillus in 2K1C model group were significantly lower than those in sham operation group ( $2.335 \times 10^{-3}$  ng/g vs  $1.805 \times 10^{-2}$  ng/g,  $0.048$  ng/g vs  $0.139$  ng/g,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The diversity of intestinal flora in 2K1C RVH rats is significantly decreased, and the contents of bifidobacterium and lactobacillus are significantly changed, suggesting that it may be involved in the occurrence and development of hypertension in 2K1C rats.

肠道平衡指在正常情况下,肠道菌群、宿主和外部环境保持平衡状态。某些疾病可打破这种平衡,导致肠道菌群失衡<sup>[1]</sup>。研究表明,心脏病、动脉粥样硬化均会导致肠道菌群稳态发生改变<sup>[2]</sup>。高血压与心脑血管疾病发病率密切相关<sup>[3]</sup>,并且是动脉粥样硬化发生的独立危险因素<sup>[4]</sup>。肾血管性高血压(renovascular hypertension, RVH)占高血压人群的1%~5%<sup>[5]</sup>,故研究RVH肠道菌群的变化对治疗高血压、预防心脑血管疾病以及动脉粥样硬化的发生具有重要意义。单侧RVH是继发性高血压的一种,主要由肾脏实质性病变和肾动脉病变引起的血压升高<sup>[6]</sup>。单侧RVH的核心病理生理机制为单侧肾血流减少,激活肾素-血管紧张素系统,导致进行性肾脏缺血,引起进行性肾实质破坏和肾功能降低等肾结构和功能的改变<sup>[7]</sup>。研究人员发现,在单侧RVH动物实验中,当狭窄持续存在,肾素的释放并非持续性增加<sup>[5]</sup>,所以肾动脉狭窄导致高血压的过程一定还有其他机制的参与。同时,有学者提出高血压使肠道菌群结构发生改变<sup>[8]</sup>。但RVH肠道菌群改变的方式鲜见报道。本次实验,采用DNA-PCR-DGGE[DGGE:变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis)]、实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, real-time PCR)等试验方法,欲阐明RVH的肠道菌群结构及其优势菌群的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

粪便总DNA提取试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)购自宝生物工程(大连)有限公司;普通PCR试剂盒购自杭州宝赛生物科技有限公司;PCR引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。清洁级8周龄雄性SD大鼠由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供[许可证号:SCXK-(军)2012-0004]。基因扩增仪、凝胶成像仪均购自Bio-Rad公司;微量紫外分光

光度仪、Real-time PCR扩增仪购自Thermo公司。

### 1.2 2K1C大鼠模型制备及取样

16只健康8周龄雄性SD大鼠(150~170 g)适应性饲养1周,测定大鼠尾动脉收缩压(systolic blood pressure, SBP)、体重作为基准值。以体重为依据按随机数字表法分为两组:两肾一夹(two kidney one clip, 2K1C)模型组、假手术组。手术制备实验模型:2K1C模型组在左肾动脉中段套内径为0.2 mm的银夹;假手术组分离左肾动脉但不钳夹。动态关注大鼠生命体征36 h。术后3天内,给予青霉素V钾片,每只0.5万单位/天。每周固定时间测定大鼠尾动脉SBP、体重并记录。与术前SBP基准值相比,术后SBP上升 $\geq 30$  mmHg为高血压模型标准,低者剔除。手术干预4周后处死,收集肠道中粪便待检。

### 1.3 肠道菌群总DNA提取

将粪便样本按照粪便总DNA提取试剂盒说明书操作,DNA质量和浓度分别用1%琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度仪测定。

### 1.4 PCR-DGGE检测

对肠道菌群总DNA 16S rRNA V3可变扩增区进行扩增,采用通用引物序列为V3F+GC:5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCAC-3', V3R+GC:3'-GGG GGC CTA CGG GAG GCA GCA G-5',目的基因片段长度220 bp。使用DGGE梯度胶制备装置,制备变性剂梯度为40%~55%(100%的变性剂为7 mol/L尿素和40%去离子甲酰胺混合物)的8%的聚丙烯酰胺凝胶,待胶凝固后,在60℃恒温中,点样20  $\mu$ L,100 V恒压电泳5 h后,采用银染法染色。用凝胶成像仪观察DGGE电泳图谱并拍照,采用Quantity One分析软件分析肠道菌群的微生物群落的多样性。

### 1.5 real-time PCR检测

对肠道微生物优势菌群双歧杆菌、乳酸杆菌进行绝对定量分析,采用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收粪便DNA制备成待测优势菌群的标准菌株,采用10倍梯度稀释成8个浓度梯度( $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  ng/g)后上机制备标准曲

线。优势菌群引物序列及退火温度如表 1 所示。

表 1. PCR 引物信息和预期产物长度

Table 1. PCR primer information and expected product length

名称	引物	DNA 序列(5'-3')	退火温度	PCR 产物长度
双歧杆菌	正向	CTCCTGGAACGGGTGG	50℃	550 bp
	反向	GGTGTCTTCCCGATATCTACA		
乳酸杆菌	正向	AGCACTAGGGAATCTTCCA	58℃	341 bp
	反向	CACCGCTACACATGGAG		

1.6 统计分析

实验中大鼠的血压和体重数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。符合正态分布且方差齐的两组独立数据采用两独立样本 *t* 检验( $\alpha=0.05$ ),非正态或方差不齐的数据采用秩和检验。采用 Quantity One 软件进行 DGGE 图谱的非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)聚类分析。所有统计数据应用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血压与体重变化

2K1C 模型组与假手术组大鼠造模前后血压及体重见表 2。实验结束时,2K1C 模型组大鼠血压与假手术组及造模前相比均显著上升,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );假手术组大鼠血压与造模前相比未发生明显改变。造模后两组大鼠体重无明显差异,但均比造模前增加。

表 2. 两组大鼠血压及体重的变化

Table 2. Changes of blood pressure and body weight in two groups of rats

时间	血压(mmHg)		体重(g)	
	假手术组	2K1C 模型组	假手术组	2K1C 模型组
8 周龄	120.13±11.95	121.89±11.11	251.88±11.32	252.78±12.02
10 周龄	119.69±18.35	136.35±16.59	296.25±15.75	295.56±14.88
12 周龄	122.08±7.66	164.77±27.26 <sup>ab</sup>	362.14±24.98 <sup>b</sup>	346.25±24.89 <sup>b</sup>

a 为  $P<0.05$ ,与假手术组相比;b 为  $P<0.05$ ,与同组 8 周龄(造模前)相比。

2.2 粪便总 DNA 提取及 PCR-DGGE 结果

从粪便中提取肠道总 DNA 进行 16S rRNA V3 可变区扩增,条带长度约 220 bp。扩增后产物进行 DGGE 实验,将 DGGE 图谱进行 UPGMA 聚类分析,两组之间的相似系数为 0.29。结果显示,2K1C 模型组大鼠肠道菌群多样性明显减少且与假手术组的相似性较低。2K1C 模型组 3 个样本(编号 1、2、3)和假手术组 3 个样本(编号 4、5、6)16S rRNA V3 区的 PCR 产物凝胶电泳图谱见图 1;DGGE 图谱及 UPGMA 聚类分析结果见图 2。

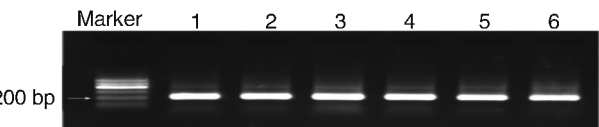


图 1. 肠道微生物总 DNA 凝胶电泳图谱 1、2、3 为 2K1C 模型组样本,4、5、6 为假手术组样本。

Figure 1. Total DNA gel electrophoresis of intestinal microbes

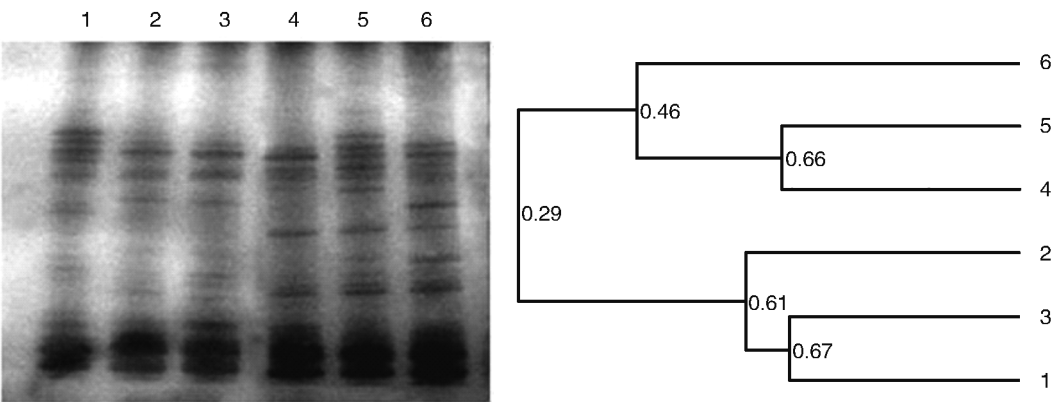


图 2. 两组 DGGE 图谱中肠道菌群的变化以及 UPGMA 聚类分析 1、2、3 为 2K1C 模型组样本,4、5、6 为假手术组样本。

Figure 2. Changes of intestinal flora by DGGE and UPGMA cluster analysis in the two groups

### 2.3 real-time PCR 定量检测结果

2K1C 模型组大鼠双歧杆菌属和乳酸杆菌属含量明显低于假手术组 ( $2.335 \times 10^{-3}$  ng/g 比  $1.805 \times$

$10^{-2}$  ng/g,  $0.048$  ng/g 比  $0.139$  ng/g,  $P < 0.05$ ; 图 3), 每组的数值为组内 8 只大鼠的平均值。

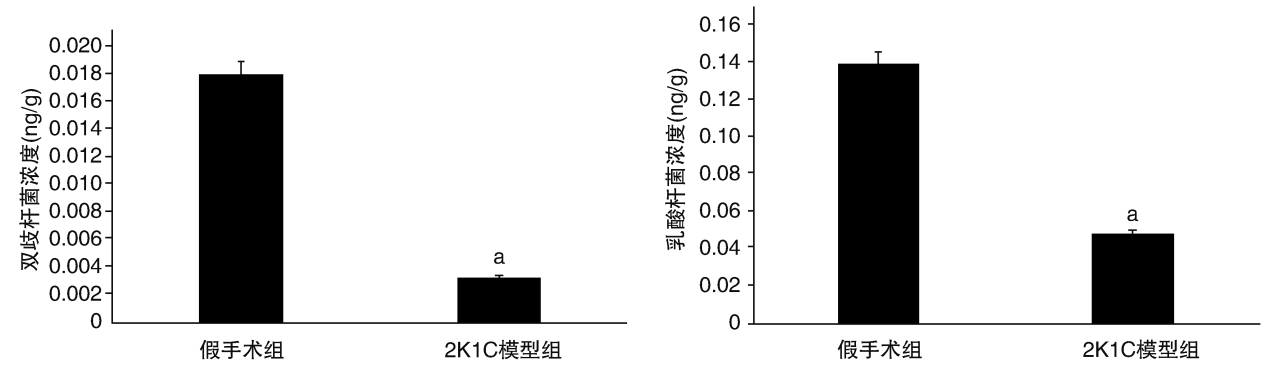


图 3. 两组大鼠肠道菌浓度 ( $n=8$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与假手术组相比。

Figure 3. Concentration of intestinal bacteria in the two groups of rats ( $n=8$ )

### 3 讨论

肠道菌群作为寄居在人体肠道内微生物群落的总称,是人体内最大的微生物调节系统,在维持机体正常代谢方面发挥重要作用。肠道菌群失调是指人体肠道有益菌群与有害菌群之间相对平衡状态被打破,有益菌数量减少,有害菌群大量繁殖,使体内产生大量的内毒素,破坏上皮屏障的完整性,降低机体免疫能力,引发炎症及其他免疫相关疾病<sup>[9]</sup>。因此,维持肠道菌群平衡对于机体健康具有重要的意义。有研究显示,肠道益生菌具有恢复肠道菌群平衡<sup>[9]</sup>、抵抗癌症<sup>[10]</sup>的作用。作为肠道有益菌的代表,双歧杆菌属和乳酸杆菌属已被证实具有防止细菌感染、维持肠道稳态、抗炎的能力<sup>[11-12]</sup>。其核心机制为双歧杆菌属、乳酸杆菌属繁殖产生的低能脂肪酸降低肠道 pH 值,抑制大肠杆菌、产气荚膜菌等有害菌群的生长<sup>[13]</sup>,且调节 Toll 样受体、NOD 样受体、细胞因子和 T 细胞转录因子的表达,增加白细胞介素 10 的表达,有效的降低炎症的发生<sup>[12]</sup>,提高机体的免疫能力<sup>[14]</sup>。同时, Ramezani 等<sup>[15]</sup>研究慢性肾衰竭终末期时的肠道菌群发现,肠道内双歧杆菌属、乳酸杆菌属等有益菌在维持肠道菌群平衡以及减缓慢性肾衰竭发展上发挥了重要作用。RVH 对肾功能的损坏是慢性肾衰竭发生的重要原因,但国内尚无研究人员对 RVH 与肠道菌群之间的关系作出报道。

本实验设立 2K1C 模型组和假手术组,通过两组间的对比进行 RVH 肠道菌群结构分析。实验结

束时,2K1C 模型组大鼠与假手术组大鼠相比体重相近,血压显著提高,假手术组大鼠实验前后血压无明显变化。基于 16S rRNA PCR 方法较传统的微生物培养技术更灵敏<sup>[16-17]</sup>,故本研究采用 PCR-DGGE、real-time PCR 等方法进行检测和分析。PCR-DGGE 结果显示,高血压使肠道菌群种类及数量发生明显变化,多样性降低,且与假手术组具有明显区别,该结果与 Vaziri 等<sup>[18]</sup>的结果一致。real-time PCR 结果显示,高血压使肠道菌群含量明显改变;2K1C 模型组双歧杆菌属数量较对照组降低 1 个数量级,乳酸杆菌属的数量降低 3 倍左右。由以上结果可知,RVH 使大鼠肠道菌群失调,导致内毒素过量释放,诱导炎症的发生,加速机体衰老,加剧 RVH 病情。因此,肠道菌群失调可能在 2K1C 大鼠高血压的发生发展中发挥了重要作用。

#### [参考文献]

- [1] Duda-Chodak A, Tarko T, Satora P, et al. Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review[J]. Eur J Nutr, 2015, 54(3): 325-341.
- [2] Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, et al. Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis[J]. Cell, 2015, 163(7): 1585-595.
- [3] 张鹏, 陆红丽, 张春梅, 等. TRPC 通道下调肾性高血压大鼠主动脉平滑肌对血管紧张素 II 的反应[C]//中国力学学会中国生物医学工程学会生物力学专业委员会, 中国生物物理学会生物力学与生物流变学专业委员会. 第十一届全国生物力学学术会议暨第十三届全



- 国生物流变学学术会议会议论文摘要汇编. 2015; 1.
- [4] 徐依成, 徐亚辉, 王培福, 等. H 型高血压与脑大动脉粥样硬化病变关系的探讨[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(12): 1 295-297.
- [5] 蔡广研. 我国肾性高血压的治疗现状与对策[C]//中华医学会, 中华医学会肾脏病学分会. 中华医学会肾脏病学分会 2013 年学术年会论文汇编. 2013; 2.
- [6] Franchi F, Knudsen BE, Oehler E, et al. Non-invasive assessment of cardiac function in a mouse model of renovascular hypertension[J]. Hypertens Res, 2013, 36(9): 770-775.
- [7] 秦旭平, 叶峰, 廖端芳, 等. 肾性高血压大鼠血浆中降钙素基因相关肽与血管紧张素 II 浓度及肾素活性的变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(6): 469-472.
- [8] Egshatyan L, Kashtanova D, Popenko A, et al. Gut microbiota and diet in patients with different glucose tolerance[J]. Endocr Connect, 2016, 5(1): 1-9.
- [9] Thompson JR. Is irritable bowel syndrome an infectious disease? [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(4): 1 331-334.
- [10] Li J, Sung CY, Lee N, et al. Probiotics modulated gut microbiota suppresses hepatocellular carcinoma growth in mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(9): E1 306-315.
- [11] Oda Y, Ueda F, Utsuyama M, et al. Improvement in human immune function with changes in intestinal microbiota by *Salacia reticulata* extract ingestion: A randomized placebo-controlled trial[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0 142 909.
- [12] Seil S, Mary EM, Chen Si, et al. Bifidobacterium breve and lactobacillus rhamnosus treatment is as effective as budesonide at reducing inflammation in a murine model for chronic asthma[J]. Respir Res, 2014, 15(1): 15-46.
- [13] 李红娟. Lactobacillus casei AST18 抗真菌代谢产物分析及抑菌作用研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014; 1-17.
- [14] Yu H, Meng H, Zhou F, et al. Urinary microbiota in patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia [J]. Arch Med Sci, 2015, 11(2): 385-394.
- [15] Ramezani A, Raj DS. The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions[J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(4): 657-670.
- [16] Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(4): 840-862.
- [17] Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service[J]. J Med Microbiol, 2003, 52(8): 685-691.
- [18] Vaziri ND, Wong J, Pahl M, et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora[J]. Kidney Int, 2013, 83(2): 308-315.
- (此文编辑 曾学清)