

基于微生物 16S rDNA 测序技术研究高脂血症豚鼠肠道菌群的变化

王宏¹, 江茜¹, 康利¹, 袁玲¹, 刘洪斌¹, 王蕾¹, 杨景明²

(1.天津市医药科学研究所,天津市 300020;2.天津市滨海新区大港医院,天津市 300270)

[关键词] 高脂血症; 豚鼠; 微生物 16S rDNA 测序; 肠道菌群

[摘要] 目的 利用微生物 16S rDNA 测序技术研究高脂血症豚鼠肠道菌群的变化情况。方法 豚鼠随机分为对照组和模型组,每组 10 只。高脂喂养 8 周复制高脂血症模型。第 8 周末测定豚鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL)水平;剖取肝脏、主动脉和结肠,HE 染色观察肝脏、主动脉和结肠组织形态学变化;16S rDNA 测序检测豚鼠肠道内容物微生物组成和比例的变化情况。结果 与对照组相比,模型组豚鼠血清 TC、TG、LDL 和 HDL 水平均显著升高($P<0.01$);组织形态学显示,模型组豚鼠均出现重度脂肪肝病,但仅 1 只模型组豚鼠出现少量泡沫细胞聚集。16S rDNA 基因序列分析显示,与对照组相比,在门分类学水平上,模型组豚鼠肠道互养菌门细菌比例显著增加($P<0.05$);在属分类学水平上,模型组豚鼠肠道毛螺旋菌 *NK4A136*、瘤胃球菌、幽门螺杆菌、*Odoribacter*、*Allobaculum* 和 *Caldicoprobacter* 细菌比例显著降低($P<0.05$), 依赖杆菌、毛螺旋菌 *XPB1014*、锥形杆菌和 *Enterorhabdus* 细菌比例明显升高($P<0.05$)。结论 高脂血症豚鼠肠道菌群的组成及比例发生了明显变化。该实验结果为基于肠道菌群研究高脂血症作用机制奠定了理论基础。

[中图分类号] R5;Q93

[文献标识码] A

The changes of gut microbiota of hyperlipemia guinea pigs by microbial 16S rDNA sequencing

WANG Hong¹, JIANG Qian¹, KANG Li¹, YUAN Ling¹, LIU Hongbin¹, WANG Lei¹, YANG Jingming²

(1. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China; 2. Tianjin Coastal New-region Dagan Hospital, Tianjin 300270, China)

[KEY WORDS] hyperlipemia; guinea pigs; microbial 16S rDNA sequencing; gut microbiota

[ABSTRACT] **Aim** To study the changes of gut microbiota of hyperlipemia guinea pigs by microbial 16S rDNA sequencing. **Methods** Guinea pigs were randomly divided into normal group and model group, with 10 in each group.

Guinea pig models of hyperlipidemia were established by high fat diet. After feeding for 8 weeks, serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL) and high density lipoprotein cholesterol (HDL) levels were detected. HE staining was performed to detect the histological changes of liver, aorta and colon. The changes of gut microbiota were detected by 16S rDNA analysis. **Results** The levels of TC, TG, LDL and HDL of model group were higher than that of control group ($P<0.01$).

According to the histomorphological test, all guinea pigs in the model group showed severe fatty liver, but only one of them appeared early symptoms of atherosclerosis. The gut microbiota 16S rDNA high-throughput sequencing analysis result showed that, compared with control group, at the phyla level, the proportion of *Synergistetes* was obviously increased ($P<0.05$); at the genus level, the proportions of *lachnospiraceae* *NK4A136*, *ruminococcus*, *helicobacter*, *odoribacter*, *allobaculum* and *caldicoprobacter* of the model group were significantly reduced ($P<0.05$); the proportions of *fretibacterium*, *lachnospiraceae* *XPB1014*, *pyramidobacter* and *enterorhabdus* were obviously increased ($P<0.05$). **Conclusions** The compositions and proportions of gut microbiota in guinea pigs were significantly changed by high-fat feeding. The results of the experiment laid a theoretical foundation for the study of the

[收稿日期] 2018-03-07

[修回日期] 2018-06-29

[基金项目] 天津市滨海新区卫生局科技项目(2014BWK001)

[作者简介] 王宏,硕士,助理研究员,研究方向为心脑血管药理,E-mail 为 wh19860906@126.com。通信作者杨景明,主任医师,E-mail 为 yangjmdg@126.com。

mechanism of hyperlipidemia based on intestinal flora.

高脂血症是体内脂质代谢紊乱而引发的临床常见病症,是脂肪肝^[1]、动脉粥样硬化^[2-3]等疾病的主要诱因。高脂饮食是高脂血症的独立危险因素^[4],肠道作为食物消化吸收的主要器官,其重要组成成分肠道菌群,在高脂血症发生发展过程所起的作用越来越受到人们的重视^[5-7]。

16S 核糖体 DNA (16S rDNA) 是编码原核生物核糖体 RNA 相对应的 DNA 序列,能揭示微生物的特征核酸序列。16S rDNA 测序是指对环境样本 16S rDNA 高变区进行聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增,然后对 PCR 产物进行高通量测序的一种技术,可对特定环境下的微生物种类和丰度进行有效的鉴定。相比于传统细菌培养的鉴定方法,16S rDNA 测序技术具有快速、准确、灵敏度高的特点。

由于豚鼠血浆脂质构成和脂代谢特征与人类存在诸多相似之处^[8]。本实验选用豚鼠为研究对象,通过高脂喂养复制豚鼠高脂血症模型。利用微生物 16S rDNA 测序技术测定豚鼠肠道菌群的变化,从肠道菌群角度探讨高脂血症的发病机制,为临床治疗奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

白化豚鼠,普通级,雄性,体重 250~300 g, 80~90 天,购自北京隆安实验动物养殖中心[许可证号: SCXK(京)2014-0003]。

1.2 主要试剂与仪器

粪便 DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司),高保真 DNA 聚合酶(美国 KAPA 公司),核酸定量分析试剂盒(美国 Invitrogen 公司),高敏 DNA 试剂盒(美国 Agilent 公司),MiSeq 试剂盒 v2、v3(美国 Illumina 公司),离子 PGM Hi-Q OT2 试剂盒(美国 Life Tech 公司)。日立 7080 全自动生化仪(日本积水医疗科技有限公司),显微镜(日本 Nikon 公司),MiSeq 测序仪(美国 Illumina 公司)。

1.3 动物模型复制与分组

豚鼠普通饲料适应性饲养 7 天后,随机分为两组:对照组和模型组,每组 10 只。对照组给予普通饲料,模型组给予高脂饲料(配方:0.5%胆固醇+10%猪油+89.5%基础饲料),豚鼠自由饮水摄食,共 8 周。

1.4 血清脂质水平测定

第 8 周末各豚鼠禁食不禁水 16 h, 45 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,静置 30 min 后,2500 r/min 离心 10 min 取血清。全自动生化分析仪(Hitachi 7080, Japan)测定豚鼠血清中总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)和高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDLC)的含量。

1.5 组织形态学检测

剖取豚鼠肝脏、主动脉和结肠于 10% 甲醛固定液固定,用石蜡包埋后切成 5 μm 厚度的切片,脱水后进行 HE 染色。显微镜观察并采图。

1.6 肠道微生物 DNA 的提取、扩增及 16S rDNA 的高通量测序

剖取各豚鼠结肠内容物,抽提肠道菌群 DNA 并采用 Qubit 2.0 和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行质检。按照实验操作说明对纯化的基因组 DNA 进行两轮 PCR 扩增,完成测序样本文库构建。16S rDNA 检测合成扩增的引物上游 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3', 下游 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。按照 MiSeq 用户指南准备测序试剂,采用双末端测序程序进行测序并进行相应数据分析。

1.7 统计学方法

应用 GraphPad Prism 6.0 软件处理数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数间的比较应用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高脂喂养对豚鼠血脂水平的影响

与对照组相比,模型组豚鼠血清 TC、TG、LDLC 和 HDLC 水平均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$; 表 1)。

表 1. 高脂喂养对豚鼠血脂水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1. Effect of high fat diet on the level of serum lipid of guinea pigs($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	HDLC (mmol/L)
对照组	0.906±0.135	0.172±0.042	0.796±0.109	0.050±0.011
模型组	8.709±1.152 ^a	0.373±0.104 ^a	4.091±0.628 ^a	0.221±0.080 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 高脂喂养对豚鼠肝脏、主动脉弓及结肠病理形态学的影响

对照组肝组织排列好,细胞分界清,肝索结构清晰,排列整齐;模型组肝组织均呈重度脂肪变,累及整个小叶,空泡较大,均匀一致,弥漫性分布(图1)。

对照组主动脉内膜光滑、完整、无损伤,腔内无血栓形成;模型组仅 1 只豚鼠出现主动脉内膜增厚,内膜下见少量泡沫细胞聚集(图1)。

对照组结肠上皮均完整,未见糜烂和溃疡;模型组结肠未见显著改变(图1)。

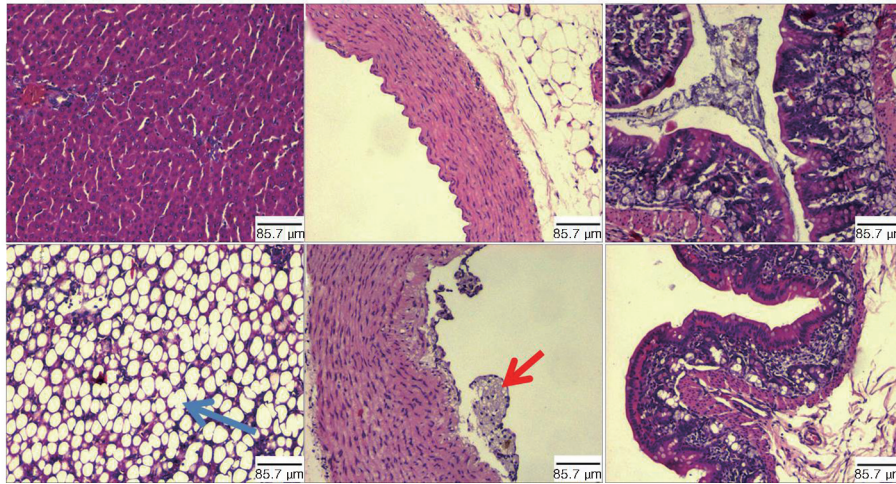


图 1. 高脂喂养对豚鼠肝脏(左)、主动脉(中)和结肠(右)病理组织学的影响 上图为对照组,下图为模型组。蓝色箭头为脂肪空泡,红色箭头为少量泡沫细胞聚集。

Figure 1. Effect of high fat diet on pathologic histology of liver(left), aorta(middle) and colon(right) of guinea pigs

2.3 高脂喂养对豚鼠肠道微生态构成及分布丰度的影响

测序结果显示豚鼠肠道微生物主要包括 8 个菌门:厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、螺旋菌门(*Spirochaetae*)、变

形菌门(*Proteobacteria*)、蓝菌门(*Cyanobacteria*)、糖化细菌门(*Saccharibacteria*)和互养菌门(*Synergistetes*)。

2.3.1 高脂喂养对豚鼠肠道菌群门层次各物种组成的影响 与对照组相比,模型组互养菌门细菌比例显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$;图2)。

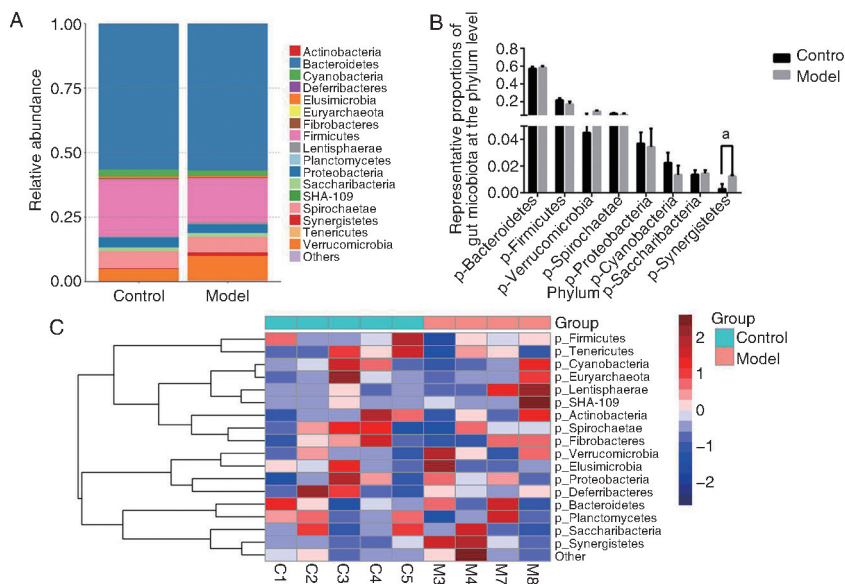


图 2. 高脂喂养对豚鼠肠道菌群各物种组成比例在门分类学水平上的影响($n=5$) A 为门层次物种分类的柱状聚集图;B 为门层次物种统计学分析柱状图;C 为门层次 heatmap 图,heatmap 图是用颜色反应不同样本的菌群组成。a 为 $P<0.05$,与对照组比较。

Figure 2. Effect of high fat diet on composition of gut microbiota of guinea pigs at phylum level($n=5$)

2.3.2 高脂喂养对豚鼠肠道菌群属层次各物种组成的影响 与对照组相比,模型组毛螺旋菌 *NK4A136*、瘤胃球菌、幽门螺杆菌、*Odoribacter*、*Allobaculum* 和 *Caldicoprobacter* 细菌比例显著降低 ($P <$

0.05 和 $P < 0.01$), 依赖杆菌、毛螺旋菌 *XPB1014*、锥形杆菌和 *Enterorhabdus* 细菌比例明显升高 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$; 图 3)。

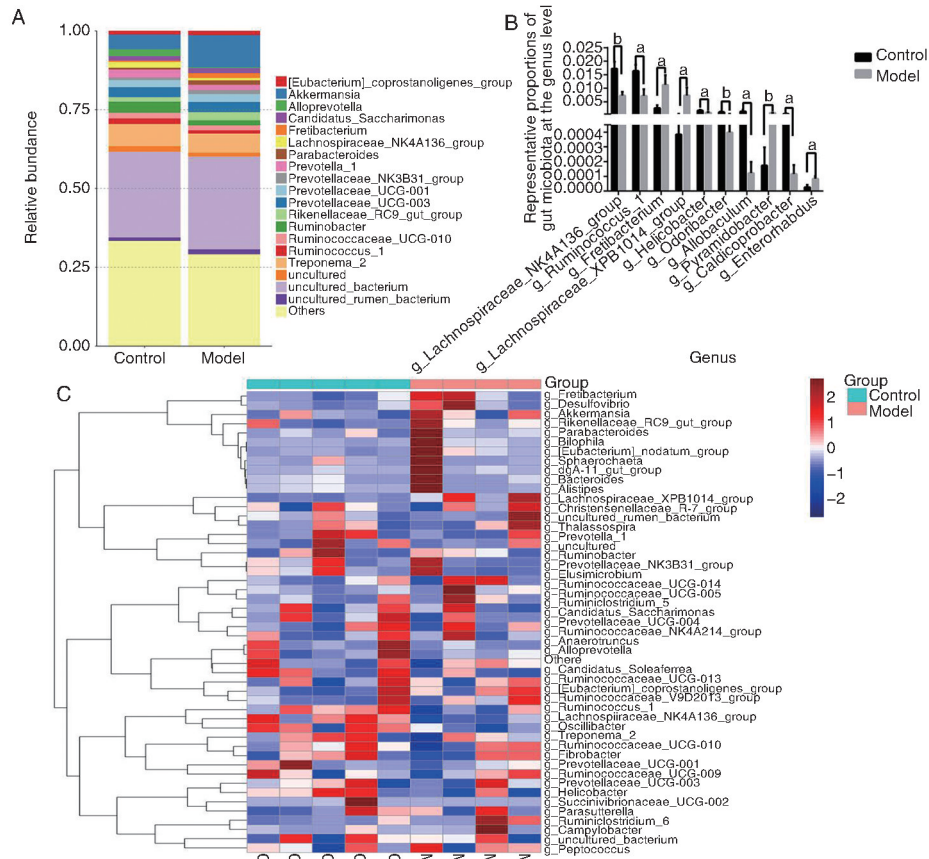


图 3. 高脂喂养对豚鼠肠道菌群各物种组成比例在属分类学水平上的影响 ($n = 5$) A 为属层次物种分类的柱状聚集图; B 为属层次物种统计学分析柱状图; C 为属层次 heatmap 图。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 3. Effect of high fat diet on composition of gut microbiota of guinea pigs at genus level ($n = 5$)

3 讨论

高脂喂养豚鼠 8 周成功复制了高脂血症模型, 模型组豚鼠均出现重度脂肪肝病变, 但仅 1 只模型组豚鼠出现少量泡沫细胞聚集。高脂饮食能明显改变豚鼠肠道菌群的组成及比例。

本实验结果发现, 与对照组相比, 模型组豚鼠血清 TC、LDLC 及 TG 显著升高的同时 HDLC 水平也有所上升, 该结果与李金莲^[9] 实验结果一致。原因分析如下: 一方面, 血清 HDLC 水平只能反映 HDL 中胆固醇的含量, 并不能反应 HDL 在高脂血症中的代谢情况及在其中发挥的作用^[10]; 另一方面, HDL 包括多个亚类, 各亚类颗粒大小不同, 且在胆固醇逆向转运中的作用相差较大^[11]。研究发现,

在各类高脂血症患者血清中, 小颗粒的 HDL 亚类增加, 大颗粒的 HDL 亚类含量减少^[12]。本实验发现高脂喂养豚鼠血清 HDLC 水平升高, 因此我们推测 HDLC 升高的同时各 HDL 亚类也可能发生一定的变化, 弄清这些亚类的具体变化情况, 有利于我们更加深入地认识 HDL 在高脂血症中的作用。

豚鼠与人类有很多相似之处^[13], 如主要的循环胆固醇均为 LDLC, 具有胆固醇酯转运蛋白、脂蛋白脂肪酶和胆固醇酰基转移酶, 因此豚鼠被认为是复制动脉粥样硬化的理想模型。但是本研究结果发现, 高脂喂养 8 周后, 模型组豚鼠全部出现高脂血症和非酒精性脂肪肝, 但是仅 1 只出现动脉内膜下少量泡沫细胞聚集, 提示相比于用于动脉粥样硬化造模, 豚鼠有可能更适用于研究脂质代谢和非酒精

性脂肪肝,该结论与 Ye 等^[14]课题组的研究结论相仿。

本实验采用微生物 16S rDNA 高通量测序技术对豚鼠肠道内容物进行分析,结果发现高脂饮食豚鼠互养菌门细菌比例明显增加。互养菌门为条件致病菌,与牙周炎发病密切相关。Wu 等^[15]发现大鼠急性心肌梗死术后 7 天粪便中互养菌门丰度显著增加,相关机制可能与肠道血流和通透性改变有关。在属分类学水平上,模型组豚鼠 *Allobaculum* 比例显著下降,这与研究报道的高脂饮食对 *Allobaculum* 的抑制作用相符^[16-18]。此外,Chen 等^[19]高脂喂养 SD 大鼠 28 天,发现其粪便瘤胃球菌水平与血清 TG 水平呈正相关,与本实验结果相反;Shao 等^[20]高脂喂养 SD 大鼠 28 天,粪便中 *Odoribacter* 水平明显升高,也与本研究结果相反。可能的原因:实验动物种属不同,不同动物种属自身携带的菌群和易感菌群也不同,所以高脂饮食干预后肠道菌群变化也不同。

本实验所用豚鼠虽为普通级豚鼠,但是符合国家级实验动物等级质量标准,遗传背景清晰;购来后,饲养环境要求严格,室温控制在 20~25 °C 范围,相对湿度控制在 40%~70% 范围,12 h 光照,12 h 黑暗。且实验符合随机、对照、重复原则,所以实验所得数据具有可靠性及一定的参考意义。

本研究验证了肠道菌群与高脂血症的密切关系,并且为基于肠道菌群研究高脂血症的机制提供了理论依据。但是变化的肠道菌群影响机体脂质代谢的具体机制仍需深入研究。

[参考文献]

- [1] 胡秋峰,张勇. 血糖、血脂及肥胖因素与脂肪肝的关系研究[J]. 现代医药卫生, 2016, 32(3): 422-423.
- [2] 孙少卫,董文娟,谢雪娇,等. 动脉粥样硬化的中西医观[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(5): 524-528.
- [3] 周筱琼,于小妹,叶雄伟,等. 高脂血症患者血浆致动脉粥样硬化指数与血栓形成危险因子的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(10): 799-802.
- [4] 马武男. 社区居民高脂血症与饮食和生活方式的关系研究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(18): 3544-3545.
- [5] 李超,崔立红. 高脂血症、高脂饮食与肠道菌群的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21(14): 1273-1277.
- [6] 朱玲军,项美香. 双歧杆菌三联活菌胶囊联合阿托伐他汀片对高脂血症患者血脂、载脂蛋白及肠道菌群水平的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(10): 1175-1177, 1184.

- [7] 熊静芳,傅国胜. 高脂血症患者肠道优势菌群与血清脂质水平相关性研究[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(11): 1282-1285.
- [8] Xiangdong L, Yuanwu L, Hua Z, et al. Animal models for the atherosclerosis research: a review [J]. Protein Cell, 2011, 2(3): 189-201.
- [9] 李金莲. 豚鼠高脂血症、早期动脉粥样硬化模型的建立、机理探讨及与大鼠模型比较研究[D]. 中国协和医科大学, 2009.
- [10] 孔路科. 高密度脂蛋白亚类在临床相关疾病中的分布特征[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(7): 878-881.
- [11] Tian L, Fu M. The relationship between high density lipoprotein subclass profile and plasma lipids concentrations [J]. Lipids Health Dis, 2010, 9: 118.
- [12] 徐燕华,傅明德,刘秉文,等. 不同类型高脂血症患者血清高密度脂蛋白亚类组成的研究[J]. 临床心血管病杂志, 2003, 19(2): 83-86.
- [13] Zhang Y, Si Y, Yao S, et al. *Celastrus orbiculatus* Thunb. decreases athero-susceptibility in lipoproteins and the aorta of guinea pigs fed high fat diet [J]. Lipids, 2013, 48(6): 619-631.
- [14] Ye P, Cheah IK, Halliwell B. High fat diets and pathology in the guinea pig. Atherosclerosis or liver damage? [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1832(2): 355-364.
- [15] Wu ZX, Li SF, Chen H, et al. The changes of gut microbiota after acute myocardial infarction in rats [J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0180717.
- [16] Lin CH, Chen YH, Tsai TY, et al. Effects of deep sea water and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 on hypercholesterolemia hamsters gut microbiota [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 101(1): 321-329.
- [17] Everard A, Lazarevic V, Gaia N, et al. Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity [J]. ISME J, 2014, 8(10): 2116-2130.
- [18] Ravussin Y, Koren O, Spor A, et al. Responses of gut microbiota to diet composition and weight loss in lean and obese mice [J]. Obesity (Silver Spring), 2012, 20(4): 738-747.
- [19] Chen D, Yang Z, Chen X, et al. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* hsryfm 1301 on the intestinal microbiota of a hyperlipidemic rat model [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 386-394.
- [20] Shao Y, Hou D, Peng Q, et al. *Lactobacillus plantarum* HNU082-derived improvements in the intestinal microbiome prevent the development of hyperlipidaemia [J]. Food Funct, 2017, 8(12): 4508-4516.

(此文编辑 许雪梅)