

· 论著 ·

肠道菌群失调对2型糖尿病患者生物钟信号通路的影响*

王萍 李强 何小群 谢冰 刘峰*

中国科学院大学深圳医院 内分泌代谢科 (广东 深圳 518000)

【摘要】目的 通过比较2型糖尿病患者与健康人群的肠道菌群，探索其对宿主本身生物钟信号通路相关基因表达的影响。方法 通过肠道菌群16S rRNA测序对2型糖尿病患者和健康志愿者肠道菌群测序及粪菌移植后小鼠的RNA测序。结果 糖尿病患者肠道菌群不仅多样性下降，而且厚壁菌门、双歧杆菌门等含量大幅减少。比较糖尿病患者粪菌移植小鼠和健康人群粪菌移植小鼠移植后的基因表达差异发现，生物钟信号通路明显富集。结论 糖尿病患者与健康人肠道菌群差异明显，且肠道菌群可能通过调节时钟基因代谢通路影响宿主内分泌。

【关键词】糖尿病；肠道菌群；高通量测序；16S rRNA；时钟基因

【中图分类号】R587.1

【文献标识码】A

【基金项目】光明区经济发展专项资金(2020R01018)(2021R01008)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2024.5.040

The Impact of Dysbiosis of Gut Microbiota on the Circadian Signaling Pathway in Patients with Type 2 Diabetes*

WANG Ping, LI Qiang, HE Xiao-qun, XIE Bing, LIU Feng*

University of Chinese Academy of Sciences Shenzhen hospital, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

Abstract: *Objective* This study aims to explore the effects of gut microbiota on the expression of host circadian signaling pathway-related genes by comparing the gut microbiota of patients with type 2 diabetes and healthy individuals, *Methods* Gut microbiota 16S rRNA sequencing was performed on patients with type 2 diabetes and healthy volunteers, as well as on mice after fecal microbiota transplantation. RNA sequencing was conducted on the mice after transplantation, *Results* The gut microbiota of patients with type 2 diabetes exhibited not only reduced diversity but also significant decreases in the abundance of Firmicutes and Bacteroidetes. Comparative analysis of gene expression after fecal microbiota transplantation in mice from patients with diabetes and healthy individuals revealed a significant enrichment of the circadian signaling pathway, *Conclusion* There are notable differences in gut microbiota between patients with type 2 diabetes and healthy individuals, and gut microbiota may influence host endocrine function by regulating clock gene metabolic pathways.

Keywords: Diabetes; Intestinal Microbiota; High Throughput Sequencing; 16S rRNA; Clock Gene

2型糖尿病是最常见的多病因的代谢性疾病，发病率高，易引起严重的微血管、大血管并发症，造成多重器官损伤^[1-2]，缺乏有效的治疗手段，患者生存质量普遍偏低，致残率、致死率高。近年来随着国民生活水平的提高及生活方式的改变，2型糖尿病患病率逐年上升。2017年，国际糖尿病联盟(IDF)第八版糖尿病地图集显示，全球目前约有4.25亿糖尿病患者，中国糖尿病的发病率约为10%^[3]，糖尿病患者已达1.14亿，占全球糖尿病患者总数的1/3。据估计，到2045年，糖尿病患者的人数将增加到7亿^[4]。因此，研究预防以及治疗2型糖尿病的病理生理机制迫在眉睫。有研究表明，其发病原因除了遗传因素外，激素水平异常、免疫功能紊乱、微生物感染及其毒素等也可能是其重要的致病因素^[5]。近年来，肠道菌群(gut microbiota)在内分泌系统、神经系统、心血管系统等疾病发生发展中的作用受到高度关注^[6-7]。并被研究证明在2型糖尿病的发生发展中起着至关重要的作用，地位等同于遗传、环境、饮食因素等^[8-9]。其中神经内分泌功能紊乱(特别是褪黑素)被视为糖尿病致病的重要因素^[10]。本研究通过比较2型糖尿病患者与健康人群的肠道菌群差异，探索其对宿主本身生物钟信号通路相关基因表达的影响，从而窥探出肠道菌群影响2型糖尿病的可能机制。

1 资料与方法

1.1 样本来源 2型糖尿病患者(9人)和健康志愿者(9人)，二者年龄、性别、BMI等均无统计学差异。

1.2 方法 肠道菌群16S rRNA测序：采集新鲜中后段的粪便样本1-5g提取微生物基因组DNA，扩增其16S rRNA的V3、V4高变区

后进行建库及标记。通过Illumina MiSeq平台对成功建库的样本进行高通量测序分析，以研究样本中微生物的种类、对应的丰度、微生物菌群的多样性、功能活性等特征。

ELISA方法检测血浆中褪黑素的浓度：在已包被好的ELISA的反应孔中加入一定稀释的血浆样本100μL，37℃孵育1小时后加入新鲜稀释的酶标抗体。加入新鲜配置的TMB底物溶液100μL，37℃孵育后于各反应孔中加入2M硫酸50μL，通过酶标仪在450nm处读取各孔的OD值。

RNA-seq筛选可能相关作用通路：提取2型糖尿病患者和健康志愿者肠道菌群分别移植到无菌小鼠(每组3只)中，提取脑组织总RNA，交于基因测序公司进行RNA转录组测序检测。检测结果通过标准化处理、通过DESeq2获得差异基因后，使用GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)软件进行功能富集。

qPCR和Western blot方法验证 RNA-seq 筛选出的信号通路：提取2型糖尿病患者和健康志愿者肠道菌群移植的无菌小鼠(3只)的脑组织总RNA和总蛋白，通过实时荧光定量 PCR和Western blot 的方法对 RNA-seq 筛选出的相关性最大的生物钟信号通路中重要蛋白的转录和表达进行检测。

2 结果

2.1 糖尿病患者与健康人肠道菌群差异 通过16S rRNA测序结果显示(图1)，结果分析发现，糖尿病患者肠道菌群不仅多样性下降，而且厚壁菌门的比例也显著降低，具有保护作用的双歧杆菌含量大幅减少。

【第一作者】王萍，女，硕士，主治医师，主要研究方向：糖尿病及其并发症。E-mail: wangping060510@163.com

【通讯作者】刘峰，男，博士，主任医师，主要研究方向：糖尿病及其并发症。E-mail: liufengdyx@163.com

2.2 糖尿病人组与健康人群组的粪菌对小鼠血糖有影响 将糖尿病人组与健康人群组的粪菌分别移植到无菌小鼠小肠内, 14天后检测小鼠日间的各项血糖指标, 发现接受糖尿病患者肠道菌群移植的无菌小鼠相较于接种了健康人肠道菌群的无菌小鼠, 其血浆褪黑素水平升高, 胰岛素水平降低而且小鼠血糖浓度升高(图2), 提示肠道菌群可能通过影响肠/脑轴-神经内分泌功能在糖尿病

发生、发展过程中发挥作用。

2.3 肠道菌群可能通过调节时钟基因代谢通路影响宿主内分泌 通过RNA-seq检测2型糖尿病患者和健康志愿者肠道菌群移植的无菌小鼠在日间的脑组织基因转录水平的变化发现, 二者在转录水平有着较大的差异。通过GSEA富集时钟基因相关通路时发现, 生物钟信号通路在此二者中的差异尤为显著(图3)。

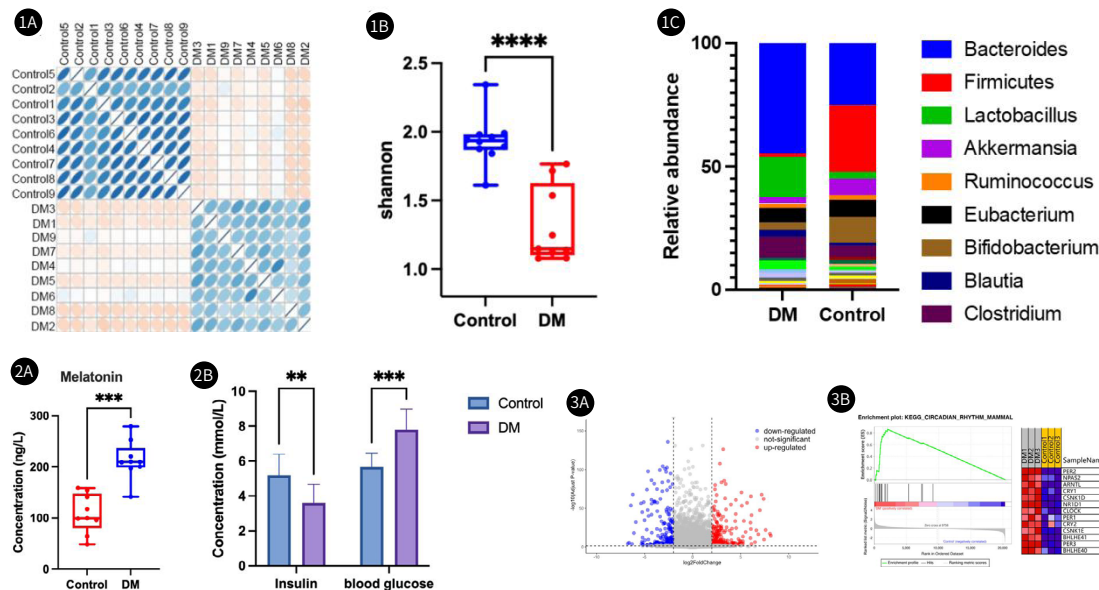


图1A 糖尿病患者与健康人群16S rRNA测序结果相关性图; 图1B 糖尿病患者与健康人群肠道菌群shannon指数; 图1C 糖尿病患者与健康人群肠道菌群组成。图2A 糖尿病人组与健康人群组的粪菌移植后, 小鼠血浆中褪黑素的差异; 图2B 糖尿病人组与健康人群组的粪菌移植后, 小鼠血浆中胰岛素与血糖的差异。图3A 糖尿病人组与健康人群组的粪菌移植后, 小鼠脑组织基因表达火山图; 图3B GSEA分析RNA-seq结果。

3 讨论

人体神经内分泌系统如下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴功能是受自主的、不依赖于环境变化的生物节律调节, 即所谓生物钟调节。通过高通量测序, 研究发现肠道菌群可能通过干扰宿主时钟基因的节律影响肠/脑轴-神经内分泌功能。肠道菌群(gut microbiota)与多种疾病关系密切。有研究通过对345个中国人(2型糖尿病患者和健康对照)肠道微生物DNA进行的基于鸟枪法深度测序技术的两阶段宏基因组相关性分析, 发现了近60000种2型糖尿病相关的基因标志物^[11]。肠道菌群在2型糖尿病发病机制中所起的作用可能更趋向于一种“功能性失调”, 而非传统上认为的存在某些特定菌种, 直接参与到疾病的发生。我们的结果也进一步证实糖尿病患者肠道菌群的失调可能是该病发生发展的原因之一。生物钟通过元件基因(period/PER, TIM, CLK, CYC, VRI等)构成生物钟信号通路, 并形成以24小时为周期的负反馈基因转录和翻译的振荡过程。生物钟失调会导致失眠、体乏、抑郁、免疫功能低下等各种疾病, 其正常工作对人体神经内分泌如下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴功能的维持非常重要^[12]。而且已有实验证明功能性生物钟对于胰岛功能和葡萄糖稳态至关重要^[13]。值得注意的是, 肠道菌群与宿主生物钟通路存在着密切联系。近期研究表明, 在人类和小鼠中, 肠道菌群的组成和功能是受昼夜节律的摄食行为和宿主时钟基因的表达所调控的^[14]。干扰时差或生物钟等会导致肠道菌群失调。这为肠道菌群如何调节身体组成提供了更深一步的分子学机理, 同时也对为何干扰肠道菌群-生物钟相互作用会导致代谢性疾病提供了新的研究方向。大量的前期研究也表明, 生物钟可调节神经内分泌因子的水平, 并调控组织对这些刺激的反应^[15]。我们的研究结果也发现, 接受糖尿病患者肠道菌群移植的无菌小鼠相较于接种了健康人肠道菌群的无菌小鼠, 其肠上皮细胞时钟基因相关通路表达节律失调, 提示肠道菌群可能通过影响宿主生物钟信号通路干扰肠/脑轴-神经内分泌功能在糖尿病病程中发挥作用。

参考文献

- [1] Ahmad E, Lim S, Lamprey R, et al. Type 2 diabetes [J]. Lancet, 2022, 400 (10365): 1803-1820.
- [2] 杨梅丽, 郑斌, 恩格列净和阿格列汀治疗新发2型糖尿病的疗效分析[J]. 罕见疾病杂志, 2022, 29 (10): 100-101.
- [3] L Wang, P Gao, M Zhang, et al. Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013 [J]. Jama, 2017, 317 (24): 2515-2523.
- [4] N H Cho, J E Shaw, S Karuranga, et al. IDF diabetes atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2022, 183: 109119.
- [5] Gargano G, Oliva F, Migliorini F, et al. Melatonin and adolescent idiopathic scoliosis: The present evidence [J]. Surgeon, 2022, 20 (6): e315-e321.
- [6] Pedersen H K, Gudmundsdottir V, Nielsen H B, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity [J]. Nature, 2016, 535 (7612): 376-381.
- [7] 杨莉丽, 王成文, 邹傲. 高通量测序分析肠易激综合征患者和健康人肠道菌群差异 [J]. 罕见疾病杂志, 2017, 24 (5): 37-39.
- [8] S Song, J Lee. Dietary patterns related to triglyceride and high-density lipoprotein cholesterol and the incidence of type 2 diabetes in Korean men and women [J]. Nutrients, 2018, 11 (1): 8.
- [9] J Jeon, J Jang, K Park. Effects of consuming calcium-rich foods on the incidence of type 2 diabetes mellitus [J]. Nutrients, 2018, 11 (1): 31.
- [10] Karamitri A, Jockers R. Melatonin in type 2 diabetes mellitus and obesity [J]. Nat Rev Endocrinol, 2019, 15 (2): 105-125.
- [11] Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes [J]. Nature, 2012, 490 (7418): 55-60.
- [12] Mohawk J A, Green C B, Takahashi J S. Central and peripheral circadian clocks in mammals [J]. Annu Rev Neurosci, 2012, 35: 445-462.
- [13] Sadacca LA, Lamia KA, Blum B, et al. An intrinsic circadian clock of the pancreas is required for normal insulin release and glucose homeostasis in mice [J]. Diabetologia, 2011, 54: 120-124.
- [14] Gutierrez Lopez D E, Lashinger L M, Weinstock G M, et al. Circadian rhythms and the gut microbiome synchronize the host's metabolic response to diet [J]. Cell Metab, 2021, 33 (5): 873-887.
- [15] Gamble K L, Berry R, Frank S J, et al. Circadian clock control of endocrine factors [J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10 (8): 466-475.

(收稿日期: 2023-05-25)

(校对编辑: 韩敏求)