

· 腹部疾病 ·

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*

1. 汕头大学医学院 (广东 汕头 515041)

2. 北京大学深圳医院消化内科 (广东 深圳 518036)

杨莉丽^{1,2} 王成文² 邹傲²

【摘要】目的 通过高通量测序方法分析肠易激综合征患者(Irritable Bowel Syndrome, IBS)和健康人肠道菌群差异。**方法** 采用Illumina系统MiSeq平台对正常组和IBS组粪便进行16S rRNA测序。**结果** IBS患者的肠道菌群多样性无显著变化。在门水平上, Firmicutes丰度显著增加($P < 0.01$), Bacteroidetes的丰度和Bacteroidetes/Firmicutes的比值下降。在科水平上, 正常组和IBS组粪便肠道菌群中检测到Cryomorphaceae、Erysipelotrichaceae、Campylobacteraceae和Fibrobacteraceae, 且丰度变化具有显著差异($P < 0.05$)。**结论** IBS患者和健康人相比, 肠道菌群多样性未见明显差异。但某些细菌菌种存在显著差异。

【关键词】 肠易激综合征; 肠道菌群; 高通量测序; 16S rRNA

【中图分类号】 R378.2

【文献标识码】 A

【基金项目】 深圳市科技计划项目: No. JCYJ201404151625429

DOI: 10.3969/j.issn.1009-3257.2017.05.015

High-throughput Sequencing Analysis of Intestinal Microbiota in Patients with Irritable Bowel Syndrome and Healthy Individuals*

YANG Li-li, WANG Cheng-wen, ZOU Ao. Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China

[Abstract] Objective To compare differences of intestinal microbiota between IBS patients and healthy by using high-throughput sequencing technology. **Methods** The feces were collected IBS group and healthy group. The community structure and abundance of intestinal microbiota were examined via analyzing 16S rRNA high throughput sequencing using Illumina System. **Results** The diversities of intestinal bacteria were no significant differences in IBS group. In phyla level, the abundance of Firmicutes was significantly increased ($P < 0.01$), while the abundance of Bacteroidetes and the ratio of Bacteroidetes/Firmicutes were decreased ($P < 0.01$). Besides, in family level, cryomorphaceae, erysipelotrichaceae, campylobacteraceae and fibrobacteraceae were detected in IBS group and healthy group. Their abundance were significantly difference, respectively ($P < 0.05$). **Conclusion** No significant differences in the bacterial diversity indices are found, but some bacterial species significantly differ between the patients with IBS and healthy controls.

[Key words] Irritable Bowel Syndrome; Intestinal Microbiota; High-throughput Sequencing; 16S rRNA

肠易激综合征(Irritable Bowel Syndrome, IBS)是一组以腹痛、腹胀、排便习惯和粪便性状改变为主要临床表现, 症状可持续存在或间歇发作, 是最常见的肠道功能紊乱性疾病^[1]。近年来, 许多研究发现IBS患者存在肠道菌群的变化, 并认为IBS的发生发展与肠道菌群变化有关。本文通过高通量测序细菌16SrRNA基因序列技术对IBS患者肠道菌群分布进行分析并观察其变化情况。

1 资料和方法

1.1 对象 2015年10月至2016年10月在北京大学深圳医院消化科门诊就诊的IBS患者10例, 采用罗

马III诊断标准^[2], 排除消化道器质性病变。其中男5例, 女5例, 年龄18~61岁。正常组为10例北京大学深圳医院体检健康者。全部病例无畏寒发热史、胃肠道手术史, 无慢性小肠或结肠感染史、慢性肝病、糖尿病、甲亢病史, 近3月来未使用过抗生素。

1.2 方法

1.2.1 肠道菌群DNA的提取: 使用无菌的离心管收集粪便样本50g, 并用肠道菌群细菌基因组提取试剂盒制备粪便样本中微生物总DNA, 具体方法按说明书进行。

1.2.2 16S rDNA的扩增与测序: 用分光光度计对提取的全基因组DNA进行质检, 质检合格的细菌进行16S rDNA的V4可变区进行扩增, 扩增条件为:

94℃变性, 30s; 50℃退火, 30s; 72℃延伸, 30s。引物为: 正向5'-AYTGGGYDTAAAGNG-3', 反向5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3', PCR产物经均一化处理后建库, PCR体系为25 μL, 测序平台为Illumina系统MiSeq。

1.3 统计学分析 使用SPSS16.0软件对菌群多样性进行t检验, 使用mothur软件中metastats命令进行组间统计学差异分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 16S rRNA基因测序分析 对测序后的结果进行分析, 正常组和IBS组的有效序列分别为(67246±19467)和(55564±9892), 优化后分别得到(67457±19497)和(55742±9888)条优质序列。在相似度为97%条件下, 应用生物信息学软件对序列进行操作单元聚类, 共获得47656个OTU代表序列, 其中纲水平4763个, 科水平47038个, 属水平46201个。经绘制Observed species指数稀释曲线、Chao指数稀释曲线, 大部分测序的样品接近平台期。分析两组样品的

表1 正常组和IBS组测得的序列数及覆盖率

组别	有效序列	优质序列	覆盖率
正常组	67246±19467	67457±19497	0.97±0.01
IBS组	55564±9892	55742±9888	0.965±0.006

表2 FPE作用前后肠道菌科水平变化 ($\bar{x} \pm s$)

科水平	正常组	IBS组	P值
Cryomorphaceae	0.06±0.05	0.01±0.01	0.00
Erysipelotrichaceae	0.04±0.02	0.01±0.01	0.02
Campylobacteraceae	0.06±0.05	0.01±0.01	0.00
Fibrobacteraceae	0.07±0.07	0.01±0.02	0.00

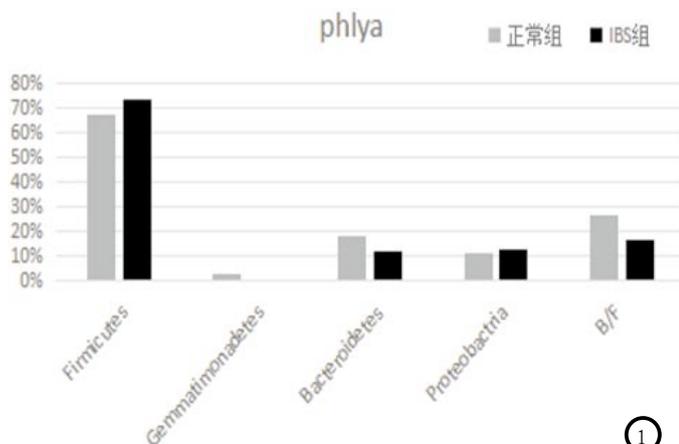


图1 正常组和IBS组肠道菌群主要门的变化。B/F: Bacteroidetes/Firmicutes

测序结果, 发现它们的覆盖率均 $>97\%$ ($P > 0.05$), 表示测序深度已基本覆盖到粪便样本中绝大多数物种, 见表1。

2.2 肠道菌群结构分析 对测序序列与16S rDNA数据库进行比对, 分析结果发现样本中细菌绝大多数由Firmicutes、Bacteroidetes和Proteobacteria组成, 正常组和IBS组Firmicutes序列分别为30467条和39850条, 占总菌的比例为67%和73%; Bacteroidetes序列分别为7675条和6203条, 占总菌的比例为18%和13%; Proteobacteria序列分别为5462条和6492条, 占总菌的比例为11%和13%。统计分析发现与正常组相比, IBS组样品的Firmicutes丰度显著增加 ($P < 0.01$), Bacteroidete的丰度和Bacteroidetes/Firmicutes的比值也明显下降 ($P > 0.01$), 见图1。

对高通量测序数据进一步深入分析, 分析结果发现正常组和IBS组肠道菌群主要的科均为Alcaligenaceae、Lachnospiraceae、Rikenellaceae和Ruminococcaceae, 分别占总数的8.5%、41.1.1%、8.1%、23.8%和8.1%、42.4%、7.0%、25.1%。统计分析发现正常组和IBS组有4个科Cryomorphaceae、Erysipelotrichaceae、Campylobacteraceae、和Fibrobacteraceae的丰度发生显著变化, 具有统计学意义, 见表3。

3 讨论

近年来, 国内外大量研究发现IBS与肠道菌群紊乱密切相关, 很多研究结果指出肠道菌群失调可能是IBS发病的重要机制。与正常人相比, IBS患者肠道内拟杆菌、双歧杆菌和乳酸杆菌等组成异常, 其厚壁门与拟杆菌门比值比正常组高2倍之多^[3]。Jalanka-Tuovinen等通过phylogenetic microarray和qPCR实验研究了IBS和正常人的粪便菌群组成, 发现患者粪便中的拟杆菌门是正常人的12倍, 而对于非培养的梭状芽孢杆菌, 正常组则是处理组的35倍^[4]。这些研究结果提示IBS患者肠道内菌群与正常人相比具有较大差异。

本研究通过高通量测序方法, 取得正常组和IBS患者的粪便样品中微生物的结构和丰度, 并分析IBS患者肠道菌种的变化。结果显示, 肠道微生物主要由Firmicutes、Bacteroidetes和Proteobacterias构成。在IBS患者中, Firmicutes丰度显著增加 ($P < 0.01$), Bacteroidete的丰度和

Bacteroidetes/Firmicutes的比值也明显下降($P > 0.01$)。Bacteroidetes与Firmicutes比值是肠道微生物生态平衡、肠道健康的重要指标,与国外Rajilic-Stojanovic M等的研究结果一致^[5]。此外,对肠道菌群科水平进一步的研究,分析发现正常人组和IBS组在Cryomorphaceae、Erysipelotrichaceae、Campylobacteraceae、和Fibrobacteraceae 4个科的丰度变化明显差异,具有统计学意义。Cryomorphaceae属于拟杆菌门,在人体肠道内的丰富程度与高脂饮食、体育锻炼等生活有关^[6]。本研究在IBS组中Erysipelotrichaceae明显下降,Erysipelotrichaceae减少可导致IBS的发生^[7]。Campylobacteraceae属于变形菌门,与饮食习惯和身体营养状况有关^[8],Fibrobacteraceae常在多种动物的肠道中检出,如食草类动物:牛、羊,Fibrobacteraceae与内脏神经高敏感性有关^[9]。本研究结果提示IBS患者和健康人相比,菌群多样性未见明显差异。但某些细菌菌种存在显著差异。Campylobacteraceae、Cryomorphaceae、Erysipelotrichaceae和Fibrobacteraceae这4科,可能在IBS的诊断和治疗中具有积极作用。

因本研究样本量相对较少,故未对IBS亚型进行分组研究,IBS亚型对肠道微生物也有一定影响,因此肠道菌群对IBS发病影响的具体机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(5):377-390.
- [2] Drossman DA, Corraziari E, Delvaux M, et al. Rome III: The functional gastrointestinal disorders[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(130):1466-1479.
- [3] Dai, C.Z., C. Q. Jiang, M. Ma, X. Y. Jiang, L. J., Probiotics and irritable bowel syndrome[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(36):5973-5980.
- [4] Jalanka-Tuovinen J, S.J., Salonen A, Immonen O, Garsed K, Kelly FM, Zaitoun A, Palva A, Spiller RC, de Vos WM., Faecal microbiota composition and host-microbe cross-talk following gastroenteritis and in postinfectious irritable bowel syndrome[J]. *Gut*, 2013: p. Epub ahead of print.
- [5] Rajilic-Stojanovic M, Biagi E, Heilig HG, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5):1792-1801.
- [6] Dai C, Zheng CQ, Jiang M, et al. Probiotics and irritable bowel syndrome[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(36):5973-5980.
- [7] 陈宏运, 崔红燕, 吴彬彬, 等. 植物发酵液对D-半乳糖致衰老模型小鼠的抗氧化活性研究[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(8):7-11, 17.
- [8] Roberts LM, McCahon D, Holder R, et al. A randomised controlled trial of a probiotic 'functional food' in the management of irritable bowel syndrome[J]. *BMC Gastroenterol*, 2013, 13(1):45
- [9] Zhou XY, Li M, Li X, et al. Visceral hypersensitive rats share common dysbiosis features with irritable bowel syndrome patients[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(22):5211-5227.

【收稿日期】2017-09-21

(上接第 36 页)

不均质包块型患者为9例,混合型患者为2例。经阴道彩色多普勒超声的诊断符合率(93.33%)高于经腹彩色多普勒超声的诊断符合率(66.67%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。此次研究结果同王凡的研究一致,说明经阴道彩色多普勒超声诊断剖宫产子宫疤痕妊娠的符合率很高。

综上所述,在剖宫产子宫疤痕妊娠的诊断中,经阴道彩超的价值要高于经腹彩超,诊断符合率很高,值得推广。

参考文献

- [1] 卢琼洁, 刘彦芝, 杨婉玲等. 经阴道彩色多普勒超声对剖宫产子宫疤痕妊娠的诊断价值[J]. *临床超声医学杂志*, 2014, 16(7):503-504.
- [2] 王保纪. 经阴道彩色多普勒超声检测剖宫产子宫疤痕妊娠中的临床意义研究[J]. *中外医疗*, 2016, 35(7):175-177.
- [3] 贾学丽. 剖宫产子宫疤痕妊娠诊断中经阴道彩色多普勒超声的价值分析[J]. *医学美容(中旬刊)*, 2014, 35(6):136-136.
- [4] 魏玉芹. 经阴道彩色多普勒超声在诊断剖宫产子宫疤痕妊娠中的价值研究[J]. *中国农村卫生*, 2016, 28(22):77-77.
- [5] 冯玲. 应用经阴道彩色多普勒超声检测剖宫产子宫疤痕妊娠中的临床意义研究[J]. *中外医疗*, 2014, 36(31):180-181.
- [6] 成小玉. 经腹和经阴道联合彩超检查诊断剖宫产子宫疤痕妊娠[J]. *中外女性健康研究*, 2015, 29(7):45.
- [7] 江娟. 经阴道彩超诊断及鉴别诊断子宫疤痕妊娠的价值[J]. *医学信息*, 2015, 34(38):76-77, 78.
- [8] 王凡. 经腹与经阴道彩超检查在剖宫产子宫疤痕妊娠诊断中的应用价值[J]. *中国实用医药*, 2016, 38(21):56-57.

【收稿日期】2017-09-18