

# 基于 16S rDNA 测序分析脓毒症大鼠早期肠道微生态的变化

李弘毅<sup>1</sup> 翟瑞卿<sup>2</sup> 梁火燕<sup>1</sup> 朱彦辉<sup>1</sup> 闫岩<sup>1</sup> 王诚扬<sup>1</sup> 丁显飞<sup>1</sup> 宋高飞<sup>1</sup> 孙同文<sup>1</sup>

<sup>1</sup>郑州大学第一附属医院综合 ICU, 河南省重症医学重点实验室, 河南省重症医学工程研究中心, 郑州市脓毒症重点实验室, 郑州 450052; <sup>2</sup>哈尔滨医科大学生物信息科学与技术学院, 黑龙江哈尔滨 150081

通信作者: 孙同文, Email: suntongwen@163.com

**【摘要】** **目的** 通过 16S rDNA 测序技术探究脓毒症大鼠早期肠道微生态变化。**方法** 将 60 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为盲肠结扎穿孔术 (CLP) 组和假手术组 (Sham 组), 每组 30 只。CLP 组采用 CLP 法制脓毒症大鼠模型; Sham 组只开腹但不进行盲肠结扎穿孔。术后 24 h 每组取 8 只大鼠肠道粪便及腹主动脉血, 其余大鼠用于观察 7 d 存活情况。采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平; 对粪便样本进行 16S rDNA 测序, 利用序列对比和聚类后获得的操作分类单元 (OTU) 信息进行多样性分析 ( $\alpha$  多样性和  $\beta$  多样性)、主坐标分析及线性判别分析效应量分析 (LEfSe), 观察脓毒症大鼠早期肠道微生态的变化并挖掘标志性菌群。**结果** 制模后 24 h, CLP 组大鼠出现呼吸急促、毛发散乱等表现, 且血清 TNF- $\alpha$  水平较 Sham 组显著升高 (ng/L:  $43.95 \pm 9.05$  比  $11.08 \pm 3.27$ ,  $P < 0.01$ ); 制模后 7 d, Sham 组大鼠全部存活, 而 CLP 组大鼠累积生存率仅 31.82%。多样性分析显示, Sham 组与 CLP 组  $\alpha$  多样性指标比较差异无统计学意义 [物种数量 (个):  $520.00 \pm 52.15$  比  $492.25 \pm 86.61$ , Chao1 丰富度估计量:  $707.25 \pm 65.69$  比  $668.93 \pm 96.50$ , Shannon 指数:  $5.74 \pm 0.42$  比  $5.79 \pm 0.91$ , Simpson 指数:  $0.93 \pm 0.03$  比  $0.94 \pm 0.05$ , 均  $P > 0.05$ ];  $\beta$  多样性分析显示, 无论是否根据 OTU 加权, 组间差异均大于组内差异 (丰度加权矩阵:  $R = 0.23$ ,  $P = 0.04$ ; 丰度不加权矩阵:  $R = 0.32$ ,  $P = 0.01$ )。门水平差异菌群分析显示, 与 Sham 组相比, CLP 组变形菌门和 TM7 菌门丰度显著升高 [18.100% (15.271%, 26.665%) 比 6.974% (2.854%, 9.764%), 0.125% (0.027%, 0.159%) 比 0.018% (0.008%, 0.021%), 均  $P < 0.05$ ]; 在属水平上, CLP 组螺杆菌属、钉杆菌属、颗粒链菌属、梭菌属 XVIII 等机会致病菌的丰度较 Sham 组显著升高 [5.090% (1.812%, 6.598%) 比 0.083% (0.034%, 0.198%), 0.244% (0.116%, 0.330%) 比 0.016% (0.008%, 0.029%), 0.006% (0.003%, 0.010%) 比 0.001% (0%, 0.003%), 0.094% (0.035%, 0.430%) 比 0.007% (0.003%, 0.030%), 均  $P < 0.05$ ], 而拟普雷沃菌属、罗姆布茨菌属等益生菌的丰度较 Sham 组显著降低 [7.345% (3.662%, 11.546%) 比 22.504% (14.403%, 26.928%), 0.113% (0.047%, 0.196%) 比 1.229% (0.809%, 2.290%), 均  $P < 0.01$ ]。LEfSe 分析结果显示, 厚壁菌门所属益生菌在 Sham 组显著富集, 罗姆布茨菌是富集最显著的菌种; 而螺杆菌属、颗粒链菌属和梭菌属 XVIII 等机会致病菌在 CLP 组显著富集, 螺杆菌属 *\_NGSU\_2015* 为富集最显著的菌种。**结论** 脓毒症早期大鼠肠道微生态结构显著改变, 主要表现为拟普雷沃菌属等益生菌丰度显著降低, 螺杆菌属等机会致病菌丰度显著升高。

**【关键词】** 肠道菌群; 脓毒症; 盲肠结扎穿孔术; 16S rDNA 测序

**基金项目:** 国家自然科学基金 (U2004110, 82172129); 河南省医学科技攻关计划重大项目 (SBGJ202101015)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20201215-00754

## Analysis of the changes in intestinal microecology in the early stage of sepsis rat based on 16S rDNA sequencing

Li Hongyi<sup>1</sup>, Zhai Ruiqing<sup>2</sup>, Liang Huoyan<sup>1</sup>, Zhu Yanhui<sup>1</sup>, Yan Yan<sup>1</sup>, Wang Chengyang<sup>1</sup>, Ding Xianfei<sup>1</sup>, Song Gaofei<sup>1</sup>, Sun Tongwen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of General Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Henan Provincial Key Laboratory of Critical Medicine, Henan Provincial Engineering Research Center for Critical Care Medicine, Zhengzhou Key Laboratory of Sepsis, Zhengzhou 450052, Henan, China; <sup>2</sup>College of Bioinformatics Science and Technology, Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang, China

Corresponding author: Sun Tongwen, Email: suntongwen@163.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the changes of intestinal microecology in the early stage of sepsis rat model by 16S rDNA sequencing. **Methods** Sixty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into cecal ligation and puncture (CLP) group and sham operation group (Sham group), with 30 rats in each group. In the CLP group, sepsis rat model was reproduced by CLP method; the rats in the Sham group only underwent laparotomy without CLP. At 24 hours after the operation, the intestinal feces and serum samples of 8 rats in each group were collected. The survival rate of the rest rats was observed until the 7th day. The level of serum tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Intestinal feces were sequenced by 16S rDNA sequencing technology. The operational taxonomic unit (OTU) data obtained after sequence comparison and clustering was used for  $\alpha$  diversity and  $\beta$  diversity analysis, principal coordinate analysis and linear discriminant analysis effect size analysis (LEfSe) to

observe the changes of intestinal microecology in early sepsis rats and excavate the marker flora. **Results** At 24 hours after the reproduction of the model, the rats in the CLP group showed shortness of breath, scattered hair and other manifestations, and the level of serum TNF- $\alpha$  increased significantly as compared with that in the Sham group (ng/L:  $43.95 \pm 9.05$  vs.  $11.08 \pm 3.27$ ,  $P < 0.01$ ). On the 7th day after modeling, the cumulative survival rate of the Sham group was 100%, while that of the CLP group was 31.82%. Diversity analysis showed that there was no significant difference in  $\alpha$  diversity parameter between the Sham group and the CLP group (number of species:  $520.00 \pm 52.15$  vs.  $492.25 \pm 86.61$ , Chao1 richness estimator:  $707.25 \pm 65.69$  vs.  $668.93 \pm 96.50$ , Shannon index:  $5.74 \pm 0.42$  vs.  $5.79 \pm 0.91$ , Simpson index:  $0.93 \pm 0.03$  vs.  $0.94 \pm 0.05$ , all  $P > 0.05$ ). However, the  $\beta$  diversity analysis showed that the difference between groups was greater than that within groups whether weighted according to OTU or not (abundance weighted matrix:  $R = 0.23$ ,  $P = 0.04$ ; abundance unweighted matrix:  $R = 0.32$ ,  $P = 0.01$ ). At the phylum level, the abundance of *Proteobacteria* and *Candidatus\_sacchari* in the CLP group increased significantly as compared with the Sham group [18.100% (15.271%, 26.665%) vs. 6.974% (2.854%, 9.764%), 0.125% (0.027%, 0.159%) vs. 0.018% (0.008%, 0.021%), both  $P < 0.05$ ]. At the genus level, the abundance of opportunistic pathogen including *Helicobacter*, *Ruthenium*, *Streptococcus*, *Clostridium XVIII* in the CLP group was significantly higher than that in the Sham group [5.090% (1.812%, 6.598%) vs. 0.083% (0.034%, 0.198%), 0.244% (0.116%, 0.330%) vs. 0.016% (0.008%, 0.029%), 0.006% (0.003%, 0.010%) vs. 0.001% (0%, 0.003%), 0.094% (0.035%, 0.430%) vs. 0.007% (0.003%, 0.030%), all  $P < 0.05$ ], and the abundance of probiotics such as *Alloprevotella* and *Romboustia* was significantly lower than that in the Sham group [7.345% (3.662%, 11.546%) vs. 22.504% (14.403%, 26.928%), 0.113% (0.047%, 0.196%) vs. 1.229% (0.809%, 2.29%), both  $P < 0.01$ ]. LEfSe analysis showed that the probiotics belonging to *Firmicutes* were significantly enriched in the Sham group, and *Romboustia* was the most significantly enriched species. Opportunistic pathogens such as *Helicobacter*, *Streptococcus* and *Clostridium XVIII* were significantly enriched in the CLP group, *Helicobacter\_NGSU\_2015* was the most significantly enriched species. **Conclusion** In the early stage of sepsis, the intestinal microbiota structure of rats is significantly changed, which mainly shows that the abundance of *Alloprevotella* and other probiotics is significantly reduced, while that of *Helicobacter* and other opportunistic pathogens is significantly increased.

**[Key words]** Intestinal flora; Sepsis; Cecal ligation and perforation; 16S rDNA sequencing

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (U2004110, 82172129); Henan Provincial Advanced Medical Science and Technology Research Major Project of China (SBCJ202101015)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20201215-00754

根据第 3 版国际脓毒症与感染性休克定义<sup>[1]</sup>, 脓毒症是宿主对感染反应失调导致的危及生命的器官功能障碍, 在我国重症监护病房发生率超过 20%, 病死率在 35% 以上, 是重症患者主要死亡原因<sup>[2]</sup>。内皮损伤和微循环障碍在脓毒症病理生理过程中扮演着重要角色<sup>[3]</sup>。肠道是人体最大的免疫器官, 也是多器官功能障碍时最先受累器官。基础和临床研究都表明, 脓毒症伴随肠道黏膜屏障受损和菌群移位等肠道功能异常现象<sup>[4-6]</sup>。肠黏膜屏障功能受损导致细菌、毒素入血和移位, 可加重系统性炎症及远隔器官功能失调, 反过来进一步加重肠黏膜损伤, 从而形成恶性循环<sup>[3, 6-8]</sup>。肠道微生物生态可能成为预防和治疗脓毒症的新靶点<sup>[9]</sup>。现有的研究中采集脓症患者粪便样本的时间点大多集中于入院 72 h 后; 而有研究表明入院 6 h 肠道菌群即开始变化<sup>[10]</sup>; 前期基础研究则表明, 24 h 可能是脓毒症动物模型菌群结构变化的高峰期<sup>[11]</sup>。与临床队列相比, 动物模型缩小了药物应用、遗传、习惯和代谢的变异, 更能反映共同的病理生理过程。因此, 本研究通过 16S rDNA 测序技术结合生物信息学分析, 观察脓毒症早期大鼠肠道菌群谱的改变, 以期为后续探寻脓毒症早期生物标志物及治疗靶点提供理论基础。

## 1 材料与与方法

**1.1 实验动物:** 6~8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 ( $200 \pm 12$ ) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号: SCXK(京)2016-0006。动物饲养于河南省中医药研究院, 以颗粒维持饲料饲养, 每天 12 h 昼夜循环, 自由进食水, 在 ( $25 \pm 2$ ) °C 的 SPF 级环境中饲养 1 周。本研究动物实验方案及数据分析流程经郑州大学第一附属医院科研项目伦理审查委员会审批 (审批号: 2019-KY-235), 均符合动物福利与伦理相关要求。

**1.2 动物分组及模型制备:** 动物术前禁食 12 h, 按随机数字表法分为假手术组 (Sham 组) 和盲肠结扎穿孔术 (cecum ligation and puncture, CLP) 组, 每组 30 只。CLP 组采用 CLP 法建立脓毒症大鼠模型<sup>[12]</sup>。腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 1 mL/kg 麻醉大鼠, 仰卧位固定, 开腹后牵出盲肠, 在盲肠约 1/2 处结扎, 于结扎肠管中点用 18 G 无菌注射器针头在两侧系膜缘间贯穿 1 次, 挤出少量肠内容物后回纳腹腔, 关腹。皮下注射 37 °C 预热的 0.9% 氯化钠溶液进行液体复苏。Sham 组不结扎穿孔刺盲肠, 其余步骤相同。制模完成后所有大鼠在复温灯下照射 1 h, 放回动物房。

**1.3 样本收集和指标检测:** 两组均于制模后 24 h 取

8 只大鼠,收集结肠末端粪便,立即浸入液氮淬灭,24 h 后转至  $-80^{\circ}\text{C}$  储存。采用含促凝剂的负压采血管收集大鼠腹主动脉血 2 mL,  $4^{\circ}\text{C}$  下静置 30 min,待血清析出后离心并收集上层血清,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。采用酶联免疫吸附试验检测血清肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 水平,根据试剂盒(武汉华美生物工程有限公司)说明书操作。观察其余大鼠的 7 d 生存情况。

**1.4 16S rDNA 测序:** 提取粪便样本中的总微生物 DNA,采用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 对菌群 DNA 的 V3~V4 区域进行扩增,引物为 341F ( $5'$ -CCTACGGGNGGCWGCAG- $3'$ ) 和 805R ( $5'$ -GACTACHVGGGTATCTAATCC- $3'$ ),每个样本引物 5' 端分别用特异性条形码标记,并对通用引物进行测序。PCR 产物验证通过 2% 琼脂糖凝胶电泳进行,以超纯水作为阴性对照。PCR 产物纯化后使用 Qubit 荧光计定量。制备扩增子库,在 NovaSeq PE250 平台进行扩增子库和样本测序,测序深度和量分别使用 Angilent 2100 型生物分析仪(美国安捷伦科技有限公司)及 Illumina 库定量试剂盒(美国卡帕生物科技有限公司)进行评估,原始数据匹配端合并采用 FLASH 软件进行。依据 Fqtrim (v0.94) 标准对原始数据进行质量控制,使用 Vsearch (v2.3.4) 过滤嵌合序列,应用 DADA2 包解调,去重后获得单碱基精度的特征序列。基于扩增序列变体构建操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU),序列比对用 Blast 进行,并通过 SILVA 数据库进行分类和注释,用每个样本总丰度进行归一化。 $\alpha$  多样性和  $\beta$  多样性通过 QIIME2 软件计算,均以相同随机序列进行归一化。

## 1.5 数据分析

**1.5.1 炎症因子及生存分析:** 符合正态分布的连续性变量以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验。采用 Kaplan-Meier 法分析两组大鼠的生存情况,组间比较采用时序检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。相关分析和运算用 R 语言 (v4.0.2) 的 base 包和 survival 包完成。

**1.5.2 测序数据质控:** 采用物种稀释曲线反映测序深度,对不同样本量进行 100 次随机取样模拟,观察样本物种多样性随样本量增加的变化趋势,曲线趋于平缓则说明测序深度足够。

**1.5.3  $\alpha$  多样性分析:**  $\alpha$  多样性可反映样本内部的群落丰富度,通过 Chao1 丰富度估计量和物种数量评估物种丰富度,低丰度特征序列的深度用序列覆

盖率评估,菌群丰富度及均匀度分别用 Shannon 指数和 Simpson 指数评价。数据符合正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 Mann-Whitney  $U$  检验, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

**1.5.4  $\beta$  多样性分析:** 根据 OTU 聚类信息计算样本间的距离,分别根据丰度加权与不加权的方式构建样本 Unifrac 距离矩阵,采用主坐标分析 (principal coordinate analysis, PCoA) 进行特征降维,同时通过 Anosim 相似性检验来验证组间差异,Anosim 检验的  $R$  值范围为  $-1 \sim 1$ , $R$  值越接近 1,表明组间差异越大, $P < 0.05$  则表明检验可信度较高。

**1.5.5 物种差异分析:** 利用门、纲、目、科、属、种水平的菌落组成和丰度信息进行差异菌群分析。经正态性检验菌群丰度呈非正态分布,以中位数(四分位数) [ $M(Q_1, Q_3)$ ] 表示,组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。通过线性判别分析效应量分析 (linear discriminant analysis effect size analysis, LEfSe) 探讨潜在的疾病相关菌群标志,如线性判别分析 (linear discriminant analysis, LDA) 分值 ( $\log_{10}\text{LDA}$ )  $> 2$ ,则该菌群被认为是潜在的标志菌群。分析相关运算及结果可视化用 R 语言 (v4.0.2) 的 vegan 包和 ggplot2 包完成。

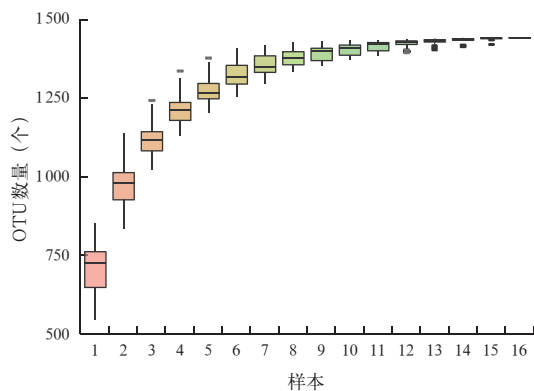
## 2 结果

**2.1 CLP 制模情况:** 制模后 24 h, CLP 组大鼠出现倦怠、乏力、毛发散乱、呼吸急促、腹部膨隆的表现;而 Sham 组大鼠无明显异常改变。CLP 组大鼠血清 TNF- $\alpha$  水平较 Sham 组显著升高 ( $\text{ng/L}$ :  $43.95 \pm 9.05$  比  $11.08 \pm 3.27$ ,  $P < 0.01$ ),提示 CLP 大鼠体内炎症水平显著升高。制模后 7 d, CLP 组大鼠存活 7 只,而 Sham 组存活 22 只;Kaplan-Meier 生存曲线分析亦显示,CLP 组大鼠 7 d 累积生存率显著低于 Sham 组 (31.82% 比 100.00%,  $P < 0.01$ )。

### 2.2 肠道菌群分析

**2.2.1 16S rDNA 测序结果:** 对收集到的 16 份动物粪便样本进行 16S rDNA 测序后,共得到 893 081 条有效序列,平均序列数 55 817.56 条,平均序列长度 502 bp,质量值  $> 30$  的碱基百分比均值为 87.32%。

**2.2.2 OTU 聚类和稀释曲线:** 对 CLP 组和 Sham 组样本中的有效序列聚类后共获得 1 436 个 OTU,其中 108 个只在 Sham 组出现,68 个只在 CLP 组出现,1 260 个为两组共有。物种稀释曲线显示 (图 1),随着样本量增加,新增 OTU 数量减少,曲线趋于平缓,提示测序深度足够。



注: OTU 为操作分类单元; 在对不同样本量进行的 100 次随机取样模拟中选取 16 次进行分析

图 1 大鼠肠道菌群 OTU 的样本稀释曲线

2.2.3  $\alpha$  多样性分析 (表 1): CLP 组大鼠肠道菌群  $\alpha$  多样性指标与 Sham 组相比差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。两组样本覆盖率均达 99% 左右。

组别	动物数 (只)	物种数量 (个)	Chao1 丰富度估计量	Shannon 指数
Sham 组	8	520.00 $\pm$ 52.15	707.25 $\pm$ 65.69	5.74 $\pm$ 0.42
CLP 组	8	492.25 $\pm$ 86.61	668.93 $\pm$ 96.50	5.79 $\pm$ 0.91

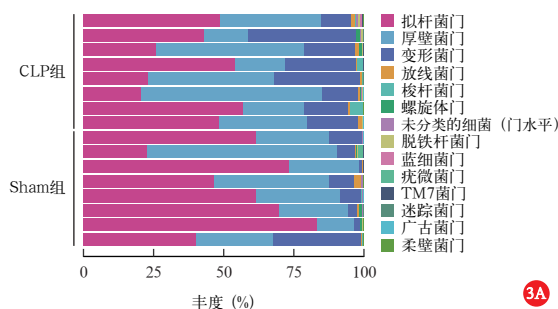
  

组别	动物数 (只)	Simpson 指数	序列覆盖率 (%)
Sham 组	8	0.93 $\pm$ 0.03	98.84 $\pm$ 0.18
CLP 组	8	0.94 $\pm$ 0.05	98.93 $\pm$ 0.19

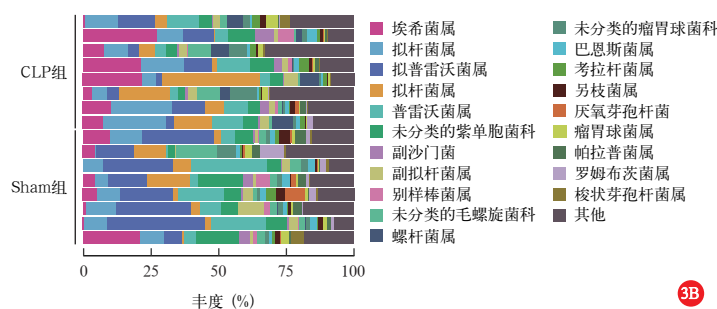
注: Sham 为假手术, CLP 为盲肠结扎穿孔术; 物种数量和 Chao1 丰富度估计量为物种丰富度指标, Shannon 指数为菌群丰富度指标, Simpson 指数为菌群均匀度指标

2.2.4  $\beta$  多样性分析: 分别基于 OTU 丰度加权与不加权 Unifrac 距离构建样本距离矩阵, 并进行 PCoA 分析, 可以看出两组样本区分度较好, 样本间距离小于组间距离 (图 2); Anosim 相似性检验结果也表明, 不论是否根据 OTU 丰度加权, 组间差异均显著大于组内差异 (丰度加权矩阵:  $R = 0.23, P = 0.04$ ; 丰度不加权矩阵:  $R = 0.32, P = 0.01$ )。

2.2.5 门水平差异菌群分析: 在门水平上, 两组大鼠肠道优势菌群均为拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌



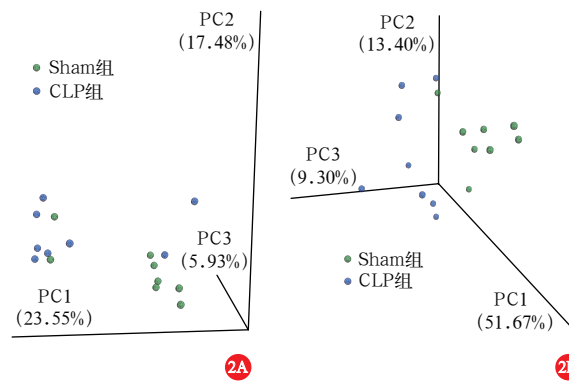
3A



3B

注: CLP 为盲肠结扎穿孔术, Sham 为假手术

图 3 两组大鼠在门水平 (A) 与属水平 (B) 肠道菌群构成的堆积棒状图



2A

2B

注: Sham 为假手术, CLP 为盲肠结扎穿孔术, OTU 为操作分类单元, PCoA 为主坐标分析; PC1、PC2、PC3 表示选定的主成分, 坐标轴的含义为相对距离, 无实际意义; 样本越接近, 说明菌群相似性越高

图 2 根据两组大鼠肠道菌群 OTU 丰度加权 (A) 与不加权 (B) 的 PCoA 分析

门 (图 3A)。与 Sham 组相比, CLP 组变形菌门丰度显著升高 [18.100% (15.271%, 26.665%) 比 6.974% (2.854%, 9.764%),  $P < 0.05$ ], 拟杆菌门丰度略有降低 [45.794% (25.276%, 50.095%) 比 61.558% (45.079%, 70.648%),  $P > 0.05$ ], 厚壁菌门的丰度相近 [33.721% (20.683%, 47.039%) 比 26.751% (24.680%, 32.732%),  $P > 0.05$ ]。另外, CLP 组 TM7 菌门的丰度较 Sham 组显著升高 ( $P < 0.05$ ; 表 2)。

2.2.6 属水平差异菌群分析 (图 3B; 表 2): 在属水平上, CLP 组丰度较高的肠道菌群依次是拟杆菌属 [10.643% (7.989%, 17.834%)], 埃希菌属 [9.180% (6.713%, 21.420%)], 乳酸杆菌属 [6.467% (3.694%, 15.340%)], 而 Sham 组丰度较高的肠道菌群依次是拟普雷沃菌属 [22.504% (14.403%, 26.928%)], 普雷沃菌属 [6.360% (4.077%, 17.579%)] 和未分类的紫单胞菌科 [6.719% (6.145%, 9.947%)]。CLP 组拟普雷沃菌属丰度较 Sham 组显著降低 ( $P < 0.01$ )。CLP 组显著富集的菌属包括丁酸弧菌属、钉杆菌属、颗粒链菌属、梭菌属 XVIII、普罗旺斯菌属、光冈菌属、厌氧产氢杆菌属及螺杆菌属, 丰度显著高于 Sham 组

(均  $P < 0.05$ ); 而 CLP 组拟普雷沃菌属、帕拉普菌属、马赛普雷沃菌属、罗姆布茨菌属、未定的毛螺旋菌科、乳头杆菌属、优杆菌属、月单胞菌属、未分类的梭菌目、瘤胃球菌属、消化球菌属和厌氧棒状杆菌属丰度则较 Sham 组明显降低 (均  $P < 0.05$ )。

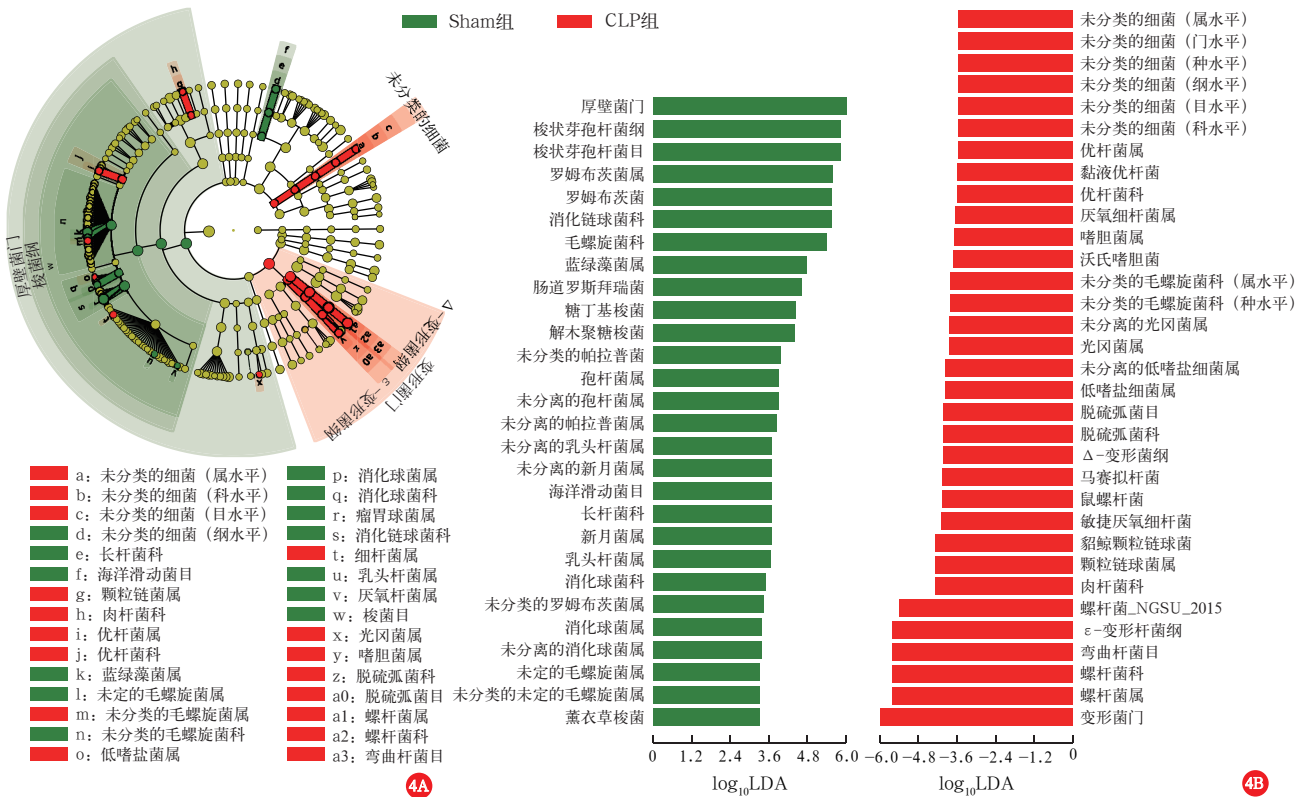
**2.2.7 LEfSe 分析 (图 4):** 对归一化的菌群丰度由门至种进行 LEfSe 分析, 得到 84 个组间差异物种, 与差异菌群分析结果基本一致。LDA 分析显示, 与 CLP 组相比, 厚壁菌门在 Sham 组富集最显著, 集中于梭

菌目下的罗姆布茨菌属、乳头杆菌属、消化球菌属、孢子杆菌属和未定的毛螺旋菌科; 此外, 新月菌属也在 Sham 组显著富集。与 Sham 组相比, 未分类的细菌和变形菌门在 CLP 组显著富集, 集中在 OTU 894、OTU 8251、OTU 2398、嗜胆菌属、螺杆菌属; 另外, 未分类的毛螺旋菌科、光冈菌属、厌氧杆菌属、颗粒链球菌属和厚壁菌门下的优杆菌属也在 CLP 组显著富集。在种水平, 罗姆布茨菌属和螺杆菌属\_NGSU\_2015 分别为 Sham 组与 CLP 组最具特征性物种。

表 2 两组大鼠肠道差异显著菌属丰度比较 [  $M(Q_L, Q_U)$  ]

门	属	丰度 (%)		门	属	丰度 (%)	
		Sham 组	CLP 组			Sham 组	CLP 组
拟杆菌门	丁酸弧菌属	0.070 (0.034, 0.078)	0.154 (0.115, 0.216) <sup>a</sup>	变形菌门	未分类的梭菌目	0.017 (0.015, 0.048)	0.006 (0.003, 0.010) <sup>b</sup>
	拟普雷沃菌属	22.504 (14.403, 26.928)	7.345 (3.662, 11.546) <sup>a</sup>		梭菌属 XVIII	0.007 (0.003, 0.030)	0.094 (0.035, 0.430) <sup>b</sup>
	帕拉普菌属	2.183 (0.531, 3.015)	0.170 (0.093, 0.927) <sup>b</sup>		普罗旺斯菌属	0.005 (0.002, 0.012)	0.031 (0.011, 0.057) <sup>b</sup>
	马赛普雷沃菌属	0.046 (0.022, 0.099)	0.010 (0.002, 0.026) <sup>b</sup>		光冈菌属	0 (0, 0)	0.003 (0, 0.007) <sup>b</sup>
厚壁菌门	钉杆菌属	0.016 (0.008, 0.029)	0.244 (0.116, 0.330) <sup>a</sup>		瘤胃球菌属	0.037 (0.028, 0.061)	0.008 (0.003, 0.014) <sup>b</sup>
	颗粒链球菌属	0.001 (0, 0.003)	0.006 (0.003, 0.010) <sup>a</sup>		消化球菌属	0.007 (0.004, 0.026)	0.001 (0, 0.003) <sup>b</sup>
	罗姆布茨菌属	1.229 (0.809, 2.290)	0.113 (0.047, 0.196) <sup>a</sup>		厌氧棒状杆菌属	0.086 (0.046, 0.411)	0.022 (0.007, 0.041) <sup>b</sup>
	未定的毛螺旋菌科	0.010 (0.002, 0.016)	0 (0, 0) <sup>b</sup>		厌氧产氢杆菌属	0.003 (0.002, 0.004)	0.005 (0.004, 0.012) <sup>b</sup>
	乳头杆菌属	0.003 (0.002, 0.006)	0 (0, 0) <sup>b</sup>		TM7 菌门 未定的 TM 菌门	0.018 (0.008, 0.021)	0.125 (0.027, 0.159) <sup>b</sup>
	优杆菌属	0.051 (0.043, 0.060)	0.011 (0.006, 0.019) <sup>b</sup>				
	月单胞菌属	1.027 (0.598, 1.408)	0.111 (0.073, 0.388) <sup>b</sup>				

注: Sham 为假手术, CLP 为盲肠结扎穿孔术; 与 Sham 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$



注: Sham 为假手术, CLP 为盲肠结扎穿孔术, LEfSe 为线性判别分析 (LDA) 效应量分析; 绿色代表 Sham 组较 CLP 组显著富集且差异显著的菌群 (Sham 组), 红色代表 CLP 组较 Sham 组显著富集且差异显著的菌群 (CLP 组)

图 4 两组大鼠肠道菌群 LEfSe 分析进化分支图 (A) 和 LDA 分值柱形图 (B)

### 3 讨论

本研究中使用 CLP 模型分析脓毒症早期大鼠肠道微生态多样性和构成的改变,结果显示,CLP 组与 Sham 组大鼠肠道菌群  $\alpha$  多样性参数的差异并无统计学意义,这与先前报道的大鼠 CLP 制模后 72 h 肠道菌群的变化一致<sup>[13]</sup>,提示在脓毒症早期肠道微生态多样性并未发生显著改变。此前临床研究报道,脓毒症患者入院 6 h 肠道菌群的  $\alpha$  多样性即开始降低<sup>[10]</sup>;而采用 DNA 扩增凝胶电泳分离比对进行的严重腹腔感染动物模型的研究结果表明,制模后 24 h 回结肠  $\alpha$  多样性指标 Shannon 指数升高<sup>[11]</sup>。这一差异可能与临床实践中患者入院后进食方式的改变和抗菌药物的应用有关。另外,  $\beta$  多样性分析结果显示,CLP 组与 Sham 组在菌群构成和丰度上存在显著差异,这与先前报道的结果基本一致<sup>[11,13-14]</sup>,表明 CLP 制模后 24 h,脓毒症模型动物肠道微生态稳态已发生改变。

在门水平的差异菌群分析显示,CLP 组大鼠肠道变形菌门和 TM7 菌门的丰度均较 Sham 组显著升高,其中变形菌门在 LDA 分析中也表现出两组间的显著差异,其下属多种机会致病菌。有研究表明,变形菌门的异常扩张与结肠细胞的氧化增加相关,可能是肠道上皮功能失调的特征<sup>[15]</sup>,这与脓毒症的病理生理背景相符,具有作为脓毒症早期菌群标志的潜力。然而,本实验中鉴定到的 TM7 菌门菌群均为目前尚未确定归属的菌群,有研究报道其与糖尿病小鼠乏力、消瘦、高血糖等症状有关<sup>[16]</sup>,具有潜在的研究价值。

在属水平的差异菌群分析显示,拟杆菌门普雷沃菌科下的菌属丰度显著降低,这与近年临床肠道微生态研究结果相同<sup>[14,17]</sup>。普雷沃菌是一类益生菌,与肠道丁酸水平相关<sup>[16]</sup>,包括丁酸在内的短链脂肪酸被证明可以调节能量代谢,改善胰岛素抵抗,并促进肠道营养的分解吸收<sup>[18]</sup>。Schulthess 等<sup>[19]</sup>的研究表明,丁酸可以通过抑制组蛋白脱乙酰酶 3 驱动巨噬细胞代谢的变化,增加抗微生物肽的作用。除普雷沃菌外,罗姆布茨菌属、乳头杆菌属、优杆菌属、厌氧棒状菌属也是产短链脂肪酸益生菌<sup>[20-22]</sup>,本研究显示 CLP 组上述益生菌丰度均较 Sham 组显著降低,提示脓毒症早期肠道消化功能和稳态破坏。差异菌群分析及 LDA 分析均提示,厚壁菌门下的罗姆布茨菌属在 CLP 组显著富集,而在制模 72 h 及之后时间点采样的研究数据中并未发现其与对照组存

在显著差异<sup>[11,13]</sup>,具有进一步研究价值。本研究中其他在 CLP 组丰度明显降低的菌群,如月单胞菌属被报道与口腔溃疡的修复有关,具有潜在的抗炎作用<sup>[23]</sup>。Milani 等<sup>[24]</sup>关于老年住院患者感染的研究则表明,未分类的梭菌目菌群丰度降低与艰难梭菌感染呈正相关,反映了脓毒症早期可能存在的菌群移位和机会致病菌丰度上升,这也在本研究 CLP 组富集的差异菌属中得到印证,且与临床研究报道结果相近<sup>[17]</sup>,与近年来报道的脓毒症小鼠肠道菌群分析结果基本相符<sup>[25]</sup>。在本研究 CLP 组中,富集最明显的菌属为螺杆菌属。螺杆菌属可以从大鼠结肠分离得到<sup>[26]</sup>。Sarma-Rupavtarm 等<sup>[26]</sup>的研究表明,实验性或自发的螺杆菌属感染促进了结肠炎相关的免疫异常,并可能受白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)的反向调控;而螺杆菌属其他菌种如肝螺杆菌可导致小鼠肝炎和肠道炎症反应<sup>[27]</sup>。以上研究都表明螺杆菌属在促炎过程中具有潜在作用。Jin 和 Zhang<sup>[28]</sup>的研究表明,高脂饮食组大鼠肠道中丁酸弧菌属和梭状芽孢杆菌\_XVIII 的丰度均显著增加,而采用二甲胂诱导肿瘤后梭状芽孢杆菌\_XVIII 的丰度则显著升高,提示两种菌属丰度升高在炎症与免疫过程中具有潜在的关联;Kwong 等<sup>[29]</sup>研究报道,菌血症患者粪便中颗粒链菌属的富集与菌血症患者后续的癌症风险相关,提示可能与持续的免疫功能失调有关。

值得注意的是,尽管本研究中 Sham 组与 CLP 组厚壁菌门的丰度差异无统计学意义,但 LDA 分析仍表明厚壁菌门可能是 Sham 组的标志性菌群,而在属种水平上部分厚壁菌门下属菌群反而在 CLP 组显著富集。一般认为,丁酸弧菌属是产丁酸的益生菌,而本研究结果显示丁酸弧菌属却在 CLP 组显著富集,丁酸弧菌下属某些菌群被报道为罕见的菌血症致病菌<sup>[30]</sup>,这可能是丁酸弧菌属异常表现的原因之一。Xia 等<sup>[31]</sup>的研究表明,在酒精性肝硬化小鼠模型中,丁酸弧菌属的富集与肝脏的氧化应激及炎症相关,这也是脓毒症中器官损伤的机制之一<sup>[3]</sup>。另外,光冈菌属发酵产生乳酸和琥珀酸,与普氏杆菌近似<sup>[32]</sup>,却在脓毒症早期大鼠肠道中异常富集。目前关于光冈菌属的报道有限,其具体机制仍有待进一步研究证明。

近年来,关于粪菌移植作为治疗手段的报道越来越多。在小鼠模型中发现,移植正常小鼠的粪便可提高脓毒症小鼠肠道细菌清除能力,并可以通过干

扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 途径修复肠道免疫功能<sup>[33]</sup>; 甚至曾有案例报道粪菌移植成功逆转了脓毒症伴腹泻患者的肠道菌群紊乱<sup>[34]</sup>。本研究结果也表明, 普雷沃菌属可能是粪菌移植的备选菌群之一, 后续应当开展相关研究探究其实际作用和机制。

综上所述, 在脓毒症早期大鼠肠道中菌群多样性变化不显著, 但菌群组成发生显著变化, 表现为以普氏杆菌为主的益生菌丰度降低, 以螺杆菌属为主的机会致病菌丰度升高, 可能是潜在的菌群标志。具有发酵作用的丁酸弧菌属和光冈菌属在脓毒症大鼠体内异常富集, 其机制及与脓毒症的关联仍需要进一步研究明确。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315 (8): 801–810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [2] Xie JF, Wang HL, Kang Y, et al. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: a national cross-sectional survey [J]. Crit Care Med, 2020, 48 (3): e209–e218. DOI: 10.1097/CCM.0000000000004155.
- [3] Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management [J]. BMJ, 2016, 353: i1585. DOI: 10.1136/bmj.i1585.
- [4] Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure [J]. Arch Surg, 1990, 125 (3): 403–404. DOI: 10.1001/archsurg.1990.01410150125024.
- [5] Chang RM, Wen LQ, Chang JX, et al. Repair of damaged intestinal mucosa in a mouse model of sepsis [J]. World J Emerg Med, 2013, 4 (3): 223–228. DOI: 10.5847/wjem.j.issn.1920-8642.2013.03.012.
- [6] Hunninghake GW, Doerschug KC, Nymon AB, et al. Insulin-like growth factor-1 levels contribute to the development of bacterial translocation in sepsis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182 (4): 517–525. DOI: 10.1164/rccm.200911-1757OC.
- [7] Dickson RP, Singer BH, Newstead MW, et al. Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome [J]. Nat Microbiol, 2016, 1 (10): 16113. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.113.
- [8] Haak BW, Wiersinga WJ. The role of the gut microbiota in sepsis [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2017, 2 (2): 135–143. DOI: 10.1016/S2468-1253(16)30119-4.
- [9] Haak BW, Prescott HC, Wiersinga WJ. Therapeutic potential of the gut microbiota in the prevention and treatment of sepsis [J]. Front Immunol, 2018, 9: 2042. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02042.
- [10] Hayakawa M, Asahara T, Henzan N, et al. Dramatic changes of the gut flora immediately after severe and sudden insults [J]. Dig Dis Sci, 2011, 56 (8): 2361–2365. DOI: 10.1007/s10620-011-1649-3.
- [11] 岳超. 严重腹腔感染时肠道微生态改变及 DGGE 对脓毒症早期诊断的研究 [D]. 南京: 南京大学, 2014.
- [12] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. Nat Protoc, 2009, 4 (1): 31–36. DOI: 10.1038/nprot.2008.214.
- [13] 曹会玲. 不同药物治疗对脓毒症大鼠肠道微生态的影响 [D]. 天津: 天津医科大学, 2018.
- [14] 张小亚, 杨小娟, 张振祺, 等. 基于 16S rDNA 测序技术分析重症肺炎患者肠道菌群的变化 [J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31 (12): 1479–1484. DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2019.12.009.
- [15] Litvak Y, Byndloss MX, Tsolis RM, et al. Dysbiotic proteobacteria expansion: a microbial signature of epithelial dysfunction [J]. Curr Opin Microbiol, 2017, 39: 1–6. DOI: 10.1016/j.mib.2017.07.003.
- [16] Zhang HH, Liu J, Lv YJ, et al. Changes in intestinal microbiota of type 2 diabetes in mice in response to dietary supplementation with instant tea or matcha [J]. Can J Diabetes, 2020, 44 (1): 44–52. DOI: 10.1016/j.cjcd.2019.04.021.
- [17] 刘丹, 王晓红, 张小彬, 等. 脓毒症患者肠道菌群紊乱的临床研究 [J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28 (6): 736–742. DOI: 10.3760/ema.j.issn.1671-0282.2019.06.015.
- [18] Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity [J]. Nat Rev Endocrinol, 2015, 11 (10): 577–591. DOI: 10.1038/nrendo.2015.128.
- [19] Schulthess J, Pandey S, Capitani M, et al. The short chain fatty acid butyrate imprints an antimicrobial program in macrophages [J]. Immunity, 2019, 50 (2): 432–445. e7. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.12.018.
- [20] Schwirtz A, Hold GL, Duncan SH, et al. *Anaerostipes caccae* gen. nov., sp. nov., a new saccharolytic, acetate-utilising, butyrate-producing bacterium from human faeces [J]. Syst Appl Microbiol, 2002, 25 (1): 46–51. DOI: 10.1078/0723-2020-00096.
- [21] Paraiso IL, Plagmann LS, Yang LP, et al. Reductive metabolism of xanthohumol and 8-prenylnaringenin by the intestinal bacterium *Eubacterium ramulus* [J]. Mol Nutr Food Res, 2019, 63 (2): e1800923. DOI: 10.1002/mnfr.201800923.
- [22] Gerritsen J, Hornung B, Renckens B, et al. Genomic and functional analysis of *Romboutsia ilealis* CRIB<sup>1</sup> reveals adaptation to the small intestine [J]. PeerJ, 2017, 5: e3698. DOI: 10.7717/peerj.3698.
- [23] Stehlikova Z, Tlaskal V, Galanova N, et al. Oral microbiota composition and antimicrobial antibody response in patients with recurrent aphthous stomatitis [J]. Microorganisms, 2019, 7 (12): 636. DOI: 10.3390/microorganisms7120636.
- [24] Milani C, Ticinesi A, Gerritsen J, et al. Gut microbiota composition and *Clostridium difficile* infection in hospitalized elderly individuals: a metagenomic study [J]. Sci Rep, 2016, 6: 25945. DOI: 10.1038/srep25945.
- [25] 赵赫, 匡重伸, 李芳, 等. 脓毒症模型小鼠的肠道菌群组成与变化 [J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (1): 10–16. DOI: 10.3760/ema.j.issn.121430-20200814-00579.
- [26] Sarma-Rupavtarm RB, Ge ZM, Schauer DB, et al. Spatial distribution and stability of the eight microbial species of the altered schaedler flora in the mouse gastrointestinal tract [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70 (5): 2791–2800. DOI: 10.1128/AEM.70.5.2791-2800.2004.
- [27] Franklin CL, Eriksen AC. Microbiota and reproducibility of rodent models [J]. Lab Anim (NY), 2017, 46 (4): 114–122. DOI: 10.1038/labanim.1222.
- [28] Jin HY, Zhang CX. High fat high calories diet (HFD) increase gut susceptibility to carcinogens by altering the gut microbial community [J]. J Cancer, 2020, 11 (14): 4091–4098. DOI: 10.7150/jca.43561.
- [29] Kwong TNY, Wang XS, Nakatsu G, et al. Association between bacteremia from specific microbes and subsequent diagnosis of colorectal cancer [J]. Gastroenterology, 2018, 155 (2): 383–390. e8. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.04.028.
- [30] García-Agudo L, Nilsen E. *Butyricimonas virosa*: a rare cause of bacteremia [J]. Anaerobe, 2018, 54: 121–123. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2018.08.001.
- [31] Xia T, Zhang B, Li SP, et al. Vinegar extract ameliorates alcohol-induced liver damage associated with the modulation of gut microbiota in mice [J]. Food Funct, 2020, 11 (4): 2898–2909. DOI: 10.1039/c9fo03015h.
- [32] Willems A, Collins MD. 16S rRNA gene similarities indicate that *Hallella seregens* (Moore and Moore) and *Mitsuokella dentalis* (Haapsalo et al.) are genealogically highly related and are members of the genus *Prevotella*: emended description of the genus *Prevotella* (Shah and Collins) and description of *Prevotella dentalis* comb. nov [J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45 (4): 832–836. DOI: 10.1099/00207713-45-4-832.
- [33] Kim SM, DeFazio JR, Hyoju SK, et al. Fecal microbiota transplant rescues mice from human pathogen mediated sepsis by restoring systemic immunity [J]. Nat Commun, 2020, 11 (1): 2354. DOI: 10.1038/s41467-020-15545-w.
- [34] Li QR, Wang CY, Tang C, et al. Successful treatment of severe sepsis and diarrhea after vagotomy utilizing fecal microbiota transplantation: a case report [J]. Crit Care, 2015, 19 (1): 37. DOI: 10.1186/s13054-015-0738-7.

(收稿日期: 2020-12-15)