

系统性红斑狼疮小鼠肠道微生物与抗 dsDNA 抗体水平的相关性

邹桂香¹, 段新旺^{1*}, 牛海涛^{2*}

(1. 南昌大学第二附属医院 风湿免疫科, 南昌 330006; 2. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 探讨系统性红斑狼疮(简称狼疮)TC 小鼠肠道微生物菌群结构与抗 dsDNA 抗体之间的关系。**方法** ELISA 法检测狼疮 TC 小鼠血清抗 dsDNA 抗体,然后分别收集 dsDNA 阳性组和阴性组的小鼠粪便,利用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序,进行粪便样本 16S 测序,比较两组之间的肠道微生物菌群结构与抗 dsDNA 抗体水平之间的关系。**结果** 通过 ELISA 检测抗体结果和小鼠粪便高通量测序结果显示,dsDNA 阳性组 TC 小鼠的物种群落多样性显著低于 dsDNA 阴性组;同时,两组 TC 小鼠肠道微生物分别在门水平 Chloroflexi(绿弯菌门);纲水平 Betaproteobacteria(β 变形菌纲)、Deltaproteobacteria(δ 变形菌纲)和 Ktedonobacteria(纤线杆菌纲);目水平 Burkholderiales(伯克氏菌目)、Desulfovibrionales(脱硫弧菌目)和 Ktedonobacterales(纤线杆菌目);科水平 Alcaligenaceae(产碱菌科)和 Desulfovibrionaceae(脱硫弧菌科);属水平 *Parasutterella*(副萨特氏菌属)和 *Desulfovibrio*(脱硫弧菌属)上差异有显著性($P < 0.05$)。**结论** 狼疮 TC 小鼠肠道微生物菌群结构与抗 dsDNA 抗体高度相关,本研究为进一步阐明肠道微生物菌群与系统性红斑狼疮发病机制的关系提供依据。

【关键词】 肠道微生物菌群;系统性红斑狼疮;抗 dsDNA 抗体

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 02-0195-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.02.009

Correlation between gut microbiota and anti-dsDNA antibody in the mouse model of systemic lupus erythematosus

ZOU Guixiang¹, DUAN Xinwang^{1*}, NIU Haitao^{2*}

(1. Department of Rheumatology, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China.
2. Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021)

Corresponding author; DUAN Xinwang. E-mail: 13970085678@163.com; NIU Haitao. E-mail: niuhaitao@cnilas.org

【Abstract】 Objective To explore the relationship between gut microbiota and anti-dsDNA antibody in systemic lupus erythematosus (lupus) TC mice. **Methods** ELISA was performed to detect serum anti-dsDNA antibody in the lupus TC mice. Then, the feces of both dsDNA-positive and -negative mice were collected, and 16S rRNA of the stool sample was sequenced by Illumina HiSeq 2500 high-throughput sequencing, to analyze the relationship between gut microbiota and anti-dsDNA antibody level in the two groups. **Results** The result of ELISA and mouse fecal high-throughput sequencing showed that the species diversity of gut microbiota in the dsDNA-positive TC mice was significantly lower than that in the dsDNA-negative TC mice. The gut microbiota of TC mice in the two groups showed significant differences at different

【基金项目】国家重点研发计划资助(No. 2017YFC1103603);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(No. 2016-12M-1-006)。Funded by National Key R & D Program of China (No. 81371384) and CAMS Initiative for Innovative Medicine (No. 2016-12M-1-006).
【作者简介】邹桂香(1988—),女,硕士研究生,专业:内科学-风湿免疫学方向。E-mail: 18679551002@163.com
【通信作者】段新旺(1972—),男,主任医师,专业:内科学-风湿免疫学方向。E-mail: 13970085678@163.com;
牛海涛(1970—),男,研究员,专业:免疫方向。E-mail: niuhaitao@cnilas.org

classification levels: Chloroflexi at phylum level, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria and Ktedonobacteria at class level, Burkholderiales, Desulfovibrionales and Ktedonobacterales at order level, Alcaligenaceae and Desulfovibrionaceae at family level, and *Parasutterella* and *Desulfovibrio* at genus level ($P < 0.05$ for all). **Conclusions** The flora composition of gut microbiota in lupus TC mice is highly correlated with anti-dsDNA antibody. The results of our study provide a basis for further elucidation of the relationship between gut microbiota and the pathogenetic mechanism of systemic lupus erythematosus.

【Key words】 gut microbiota; systemic lupus erythematosus; Anti-dsDNA antibody; mice

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE, 简称狼疮), 是以抗核抗体为代表的多种致病性自身抗体增加、免疫复合物异常沉积及免疫细胞功能失调而引起的一种慢性多器官损害的自身免疫性疾病。作为一种具有代表性的系统性的自身免疫性结缔组织病, 发病具有明显的性别差异, 男女比例大体上为 1:9^[1]。虽然国际上对狼疮的研究很多, 但确切的发病机制仍不清楚^[2]。研究普遍认为其发病机制与基因遗传、免疫失调、激素及环境等多种因素相关^[3]。狼疮是一种多基因易感性疾病, 有明显的家系聚集性。相关研究中报道, 狼疮患者中同卵双胞胎共同患病率为 24%~57%, 远高于异卵双胞胎共同患病率的 2%^[4-5]。所以同卵双胞胎中有一方发病, 另一方的不发病的概率也有 40% 以上, 环境因素可能起到了重要作用。

系统性红斑狼疮小鼠模型 B6. NZMSle1/2/3 (TC 小鼠) 是一种是由 C57BL/6 J 小鼠与狼疮 NZM2410 小鼠杂交后建立的、同时携带三种狼疮易感基因 (*Sle1/Sle2/Sle3*) 的纯合遗传性自发狼疮小鼠, 该模型可模拟人类狼疮的自身免疫特征, 其发病主要特征表现为抗 dsDNA 阳性^[6]。然而我们的研究发现虽然 TC 小鼠基因型完全相同, 但有很少一部分雌鼠不发病, 表现为抗 dsDNA 阴性, 该部分雌鼠不发病的原因至今未明。相关研究提示, 基因遗传因素虽然在狼疮的发病中发挥重要作用, 但环境因素也与狼疮的发生发展密切相关^[7]。我们推测肠道微生物作为环境因素的重要组成部分, 与 TC 小鼠的 dsDNA 水平相关。相关报道, 狼疮发病的危险因素包括: 使用抗生素、寄生虫药物或胃肠道疾病相关药物等^[8]。上述危险因素提示肠道微生物菌群结构与狼疮发病高度相关。

肠道微生物菌群参与了人体的代谢、营养和免疫调节功能^[9-10]。通过与相邻的肠道黏膜环境直接相互作用, 肠道微生物菌群可影响肠道黏膜的通透性, 进而参与局部和全身的免疫炎症活动^[11]。越

来越多的证据表明, 胃肠道中的微生物菌群影响啮齿动物模型中自身免疫疾病的发生发展^[12]。

本研究通过检测同周龄 TC 雌鼠的抗 dsDNA 抗体, 比较 dsDNA 阳性组与 dsDNA 阴性组的肠道微生物菌群结构差异, 探讨狼疮 TC 小鼠肠道微生物菌群结构与抗 dsDNA 抗体的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

TC 小鼠为纯合狼疮小鼠 (B6. NZMSle1/2/3), 由美国佛罗里达大学 Morel Laurence 教授实验室赠送并在中国医学科学院医学实验动物研究所 SPF3 级动物房饲养及繁殖【SYXK(京)2015-0035】, 在饲养及繁殖期间, 使用小鼠标准饲料和洁净饮用水 (由中国医学科学院医学实验动物研究所提供)。饲养环境: 相对湿度 40%~70%, 温度 20~26℃, 昼夜交替各半。所有实验操作符合实验动物伦理要求 (伦理审批号: ILAS—FG-2015-016)。

1.1.2 试剂材料

ELISA 法检测抗 dsDNA 抗体实验的相关试剂: 包被抗原 dsDNA, 购于 Sigma 公司; 标记抗体 Goat Anti-Mouse IgG, 购于 Southern Biotech 公司; 酶底物显色剂 Phosphatase substrate, 购于 Sigma 公司。小鼠粪便 DNA 提取试剂盒, 购于天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 抗 dsDNA 抗体检测

30 周龄 TC 雌性小鼠 35 只, 体重 25~30 g, 脸颊采血后离心, 取血清。ELISA 检测血清中抗 dsDNA 抗体, 具体操作步骤参考文献^[13]。

1.2.2 小鼠粪便收集

无菌环境下收集 TC 小鼠的新鲜粪便, 每份标本粪便均不少于 3 粒, 快速置于灭菌离心管中, -80℃ 保存。

1.2.3 DNA 提取和测序

按照说明书,使用粪便 DNA 提取试剂盒对小鼠粪便样本中的微生物总 DNA 进行提取;利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度,将基因组 DNA 样品稀释至 1 ng/ μ L 作为模板,针对细菌的 16S rRNA 基因高变区 V3 ~ V4 区进行 PCR 扩增。PCR 产物检验合格后,通过混样、建库及文库质控,将检测合格的文库进行高通量测序。

1.3 数据分析与统计学方析

将原始序列进行碱基去除过滤,再去除嵌合体序列得到最终有效的序列。根据最终有效序列的相似性对微生物菌群进行聚类,相似性为 97% 的序列聚类成为 OTUs (operational taxonomic units)。采用 OTUs 聚类分析及物种注释、多样性指数分析及组间差异物种分析等对两组 TC 小鼠微生物菌群进行生物学信息分析。

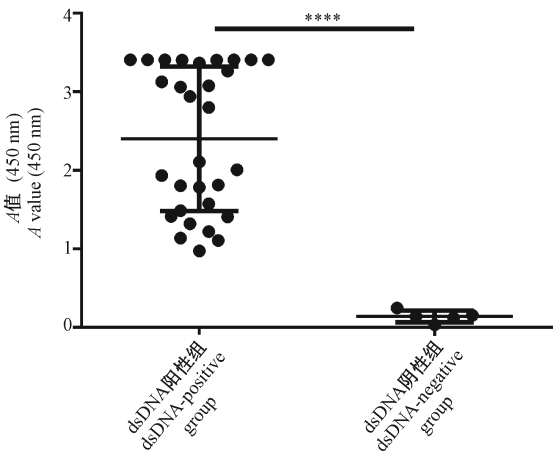
微生物菌群数据采用 Qiime 软件计算 Shannon, Simpson 指数及 UniFrac 距离并采用 R 软件 (Version 2.15.3) 进行 Alpha 多样性指数及 Beta 多样性指数组间差异分析,进行 *t* 检验,及作图。血清检测抗体数据采用 GraphPad Prism 6 软件进行 *t* 检验。所有数据均以 $P < 0.05$ 为差异有显著性的标准。

2 结果

2.1 抗 dsDNA 抗体检测

TC 小鼠的 dsDNA 检测结果如图 1 所示;同龄 TC 小鼠多数为 dsDNA 阳性 (dsDNA-pos.), 然而很

少部分 TC 小鼠为 dsDNA 阴性 (dsDNA-neg.)。



注:dsDNA 阳性的 TC 小鼠 ($n = 30$); dsDNA 阴性的 TC 小鼠 ($n = 5$); **** $P < 0.0001$ 。

图 1 TC 小鼠 dsDNA 浓度

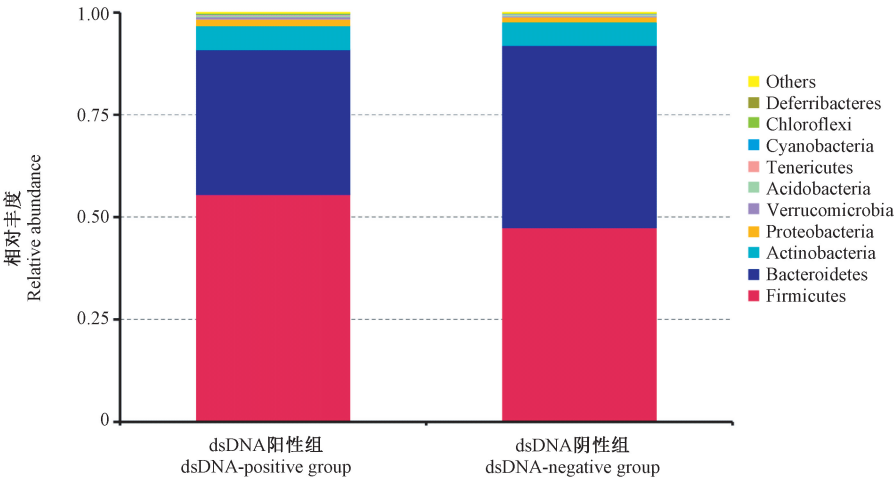
Note. dsDNA-positive lupus TC mice ($n = 30$); dsDNA-negative lupus TC mice ($n = 5$). **** $P < 0.0001$.

Fig. 1 dsDNA concentration in the TC mice

2.2 肠道微生物菌群生物学信息分析

2.2.1 肠道微生物物种丰度分析

为了解两组样本的物种丰度含量,根据不同分类水平的物种注释及丰度信息,选取两组在门水平上平均丰度排名前 10 的物种,根据其在每组中的丰度信息,得到门水平上物种相对丰度柱形图,可直观查看每组样本在门水平上相对丰度较高的物种及其比例。两组组间门水平相对丰度信息如图 2 所示:dsDNA 阳性组 TC 小鼠 Firmicutes (厚壁菌门) 的



注:不同颜色代表不同的菌门。

图 2 组间门水平相对丰度结构对比图

Note. Different color represents different phyla.

Fig. 2 Relative abundance of the gut microbiota between groups at phylum level

物种丰度含量高于 dsDNA 阴性组, dsDNA 阳性组 TC 小鼠 Bacteroidetes (拟杆菌门) 的物种丰度含量低于 dsDNA 阴性组, 提示厚壁菌门与拟杆菌门和 TC 小鼠 dsDNA 水平有一定相关性。

2.2.2 肠道微生物菌群多样性比较分析

肠道微生物菌群多样性可用 Alpha 多样性指数和 Beta 多样性指数进行分析。通过 Alpha 多样性指数分析, 本研究未发现 dsDNA 阳性与 dsDNA 阴性组 TC 小鼠组间物种多样性均值差异有显著性。

Beta 多样性是对微生物群落构成的比较分析, 评估不同组样本微生物群落的差异。如图 3 所示: 利用 OTUs 的丰度信息构建 UniFrac 距离 (Unweighted UniFrac, Beta 多样性指标之一), 通过 t 检验, dsDNA 阳性组的物种群落多样性显著低于 dsDNA 阴性组 TC 小鼠 ($P < 0.05$)。提示 TC 小鼠的微生物菌群多样性与抗 dsDNA 抗体水平相关。

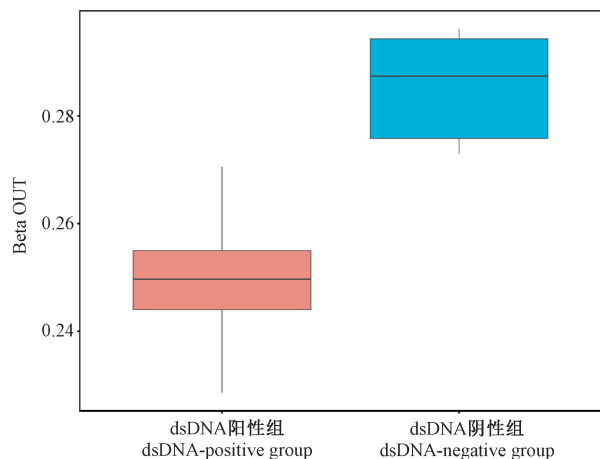


图 3 Beta 多样性组间差异箱形图

Fig. 3 Box graph of the β -diversity of group differences

2.2.3 肠道微生物菌群结构组间差异物种分析

通过在门、纲、目、科、属水平上对两组测序样本进行比较分析, 发现 dsDNA 阳性组与 dsDNA 阴性组 TC 小鼠分别在门水平的 Chloroflexi (绿弯菌门); 纲水平的 Betaproteobacteria (β 变形菌纲)、Deltaproteobacteria (δ 变形菌纲) 和 Ktedonobacteria (纤线杆菌纲); 目水平的 Burkholderiales (伯克氏菌目)、Desulfovibrionales (脱硫弧菌目) 和 Ktedonobacterales (纤线杆菌目); 科水平的 Alcaligenaceae (产碱菌科) 和 Desulfovibrionaceae (脱硫弧菌科); 属水平 Parasutterella (副萨特氏菌属)、Desulfovibrio (脱硫弧菌属) 上差异均有显著性 (图 4), 提示 TC 小鼠的肠道微生物菌群结构可能与抗 dsDNA 抗体水平相关。

3 讨论

3.1 肠道微生物菌群多样性与系统性红斑狼疮的关系

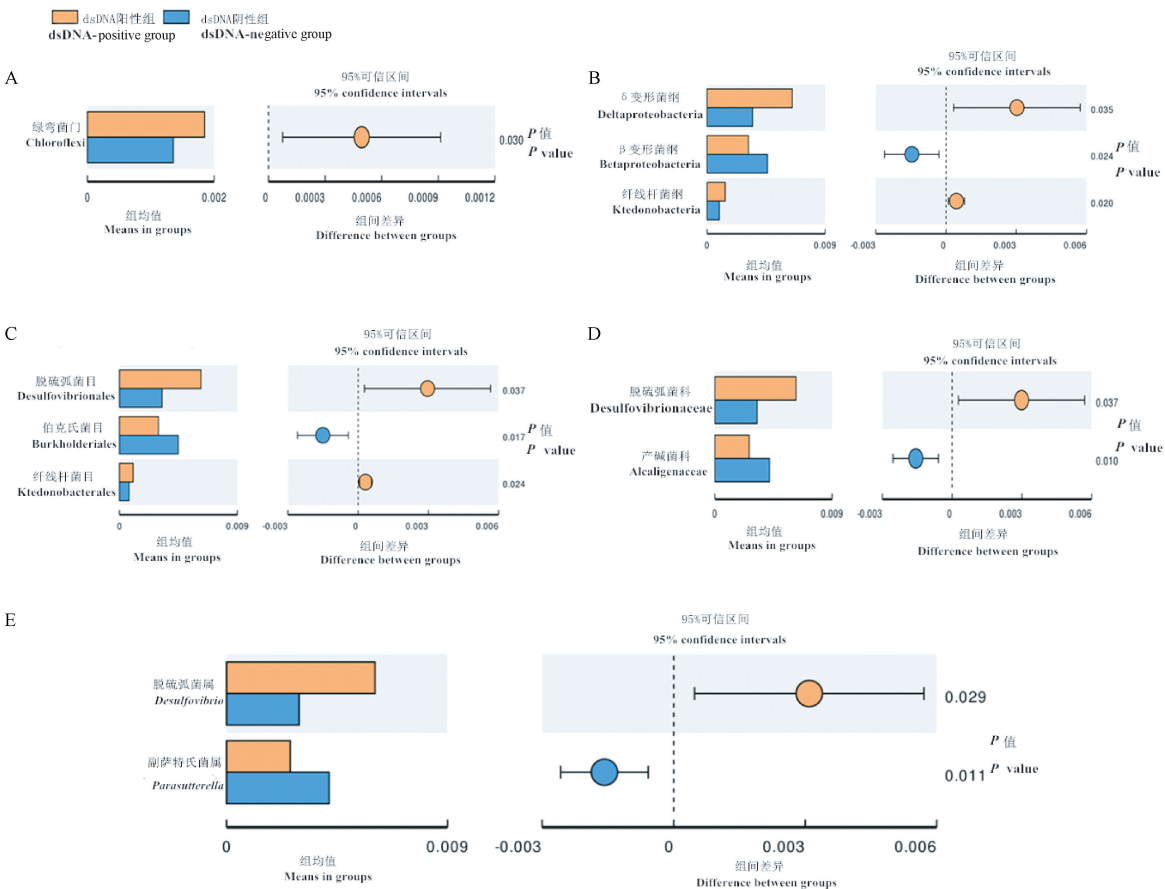
相关研究分析, 肠道微生物菌群整体多样性降低将增加自身免疫性疾病的风险^[14]。本研究发现 dsDNA 阳性的 TC 小鼠和 dsDNA 阴性的 TC 小鼠之间在 Beta 多样性指数中差异有显著性, 且 dsDNA 阳性组 TC 小鼠的 Unweighted UniFrac 数值显著低于 dsDNA 阴性组, 说明 dsDNA 阳性组的肠道微生物菌群多样性指数降低可能与系统性红斑狼疮的发病相关, 提示肠道微生物菌群多样性降低与狼疮抗 dsDNA 抗体水平相关。

3.2 肠道微生物菌群结构与系统性红斑狼疮的关系

本研究肠道微生物菌群的门、纲、目、科、属不同物种分类水平中, 既有益生菌如乳杆菌, 也有与宿主共存的机会致病菌如大肠杆菌, 还有致病菌如金葡菌等。且 dsDNA 阳性组与阴性组 TC 小鼠在肠道微生物菌群的各个分类水平差异均有显著性, 提示肠道微生物菌群结构与狼疮抗 dsDNA 抗体水平相关。

肠道微生物菌群中厚壁菌门和拟杆菌门在本研究中两组占 90% 以上, 属于优势菌群。厚壁菌门和拟杆菌门的比例被称为 F/B 比率, 可作为评估肠道微生物菌群失调的生物标志物^[15], 且 F/B 比率被认为与人类肠道微生物菌群成分有显著的相关性^[16]。有文献报道, 狼疮患者, 其肠道微生物菌群 F/B 比率低于健康人^[17]。但有另外文献报道, 高血压和肥胖患者肠道微生物菌群 F/B 比率高于健康人^[18-19]。尽管肠道微生物菌群 F/B 比率被认为是肠道微生物菌群紊乱的标志, 但 F/B 比率的升高或降低与疾病的相关性仍存在很大争议。本研究 dsDNA 阳性组 TC 小鼠的 F/B 比率高于 dsDNA 阴性组, 与人类狼疮报道的 F/B 比率低于健康人群差异较大, 可能与 TC 小鼠的狼疮易感基因相关, 有待进一步深入研究。

相关研究发现, 狼疮小鼠病情的严重程度与肠道中乳酸杆菌的消耗和毛螺菌的增加有一定相关性^[20]。本研究中发现 *Lachnospiraceae* _NK4A136_group (毛螺菌) 在 dsDNA 阳性组 TC 小鼠含量高于 dsDNA 阴性组, 提示毛螺菌的增加与抗 dsDNA 水平正相关。Proteobacteria (变形菌门) 在两组中含量在 1.2%~1.6% 左右, 在该菌门下, dsDNA 阳性组与



注:橙色表示 dsDNA 阳性组 TC 小鼠,蓝色表示 dsDNA 阴性组 TC 小鼠。A 图,左侧表示绿弯菌门水平;B 图,左侧表示 β 变形菌纲, δ 变形菌纲和纤维杆菌纲水平;C 图,左侧表示伯克氏菌目、脱硫弧菌目和纤维杆菌目水平;D 图,左侧表示产碱菌科和脱硫弧菌科水平;E 图,左侧表示副萨特氏菌属和脱硫弧菌属水平;所有 A、B、C、D、E 图,右侧均为该图左侧物种在两组组间差异的统计学分析结果 P 值, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

图 4 门、纲、目、科、属水平组间差异物种对比图

Note. Orange indicates dsDNA positive TC mice and blue indicates dsDNA negative TC mice. The left side of Panel A shows the level of Chloroflexi. The left side of Panel B shows the levels of Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, and Ktedonobacteria. The left side of Panel C shows the levels of Burkholderiales and Desulfovibrionales. The left side of Panel D shows the levels of Alcaligenaceae and Desulfovibrionaceae. The left side of Panel E shows levels of *Parasutterella* and *Desulfovibrio*. All of the right side of Panels A, B, C, D, E are P value of statistical analysis between the two groups. Significant difference was shown as $P < 0.05$.

Fig. 4 Comparison chart of differential species of gut microbiota between the groups at phylum, class, order, family, and genus levels

dsDNA 阴性组 TC 小鼠在属水平副萨特氏菌属和脱硫弧菌属差异具有显著性。变形菌门大多数都是致病菌,虽然在肠道微生物菌群中含量较少,但是本研究中两种差异具有显著性的菌属均属于变形菌门,提示变形菌门在狼疮的发生发展中发挥了一定作用。本研究的结果为进一步深入研究肠道微生物菌群与狼疮发病机制的关系提供了依据。

参 考 文 献 (References)

[1] Alarcón-Segovia D, Alarcón-Riquelme ME, Cardiel MH, et al. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients

from the GLADEL cohort [J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(4): 1138 - 1147.

[2] Crispín JC, Liossis SN, Kis-Toth K, et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances [J]. Trends Mol Med, 2010, 16(2): 47 - 57.

[3] Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus [J]. N Engl J Med, 2011, 365(22): 2110 - 2121.

[4] Deapen D, Escalante A, Weinrib L, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 1992, 35(3): 311 - 318.

[5] Block SR, Winfield JB, Lockshin MD, et al. Studies of twins with systemic lupus erythematosus. A review of the literature and presentation of 12 additional sets [J]. Am J Med, 1975, 59

(4): 533 – 552.

[6] Morel L, Croker BP, Blenman KR, et al. Genetic reconstitution of systemic lupus erythematosus immunopathology with polycongenic murine strains [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(12): 6670 – 6675.

[7] Luppi P, Rossiello MR, Faas S, et al. Genetic background and environment contribute synergistically to the onset of autoimmune diseases [J]. J Mol Med (Berl), 1995, 73(8): 381 – 393.

[8] 叶冬青,胡以松,李向培,等. 系统性红斑狼疮发病的环境因素及其与几种趋化因子基因的交互作用 [J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(11): 949 – 953.

Ye DQ, Hu YS, Li XP, et al. Influences of environmental factors and interaction of several chemokines gene-environmental on systemic lupus erythematosus [J]. Chin J Epidemiol, 2004, 25(11): 949 – 953.

[9] McLean MH, Dieguez D Jr, Miller LM, et al. Does the microbiota play a role in the pathogenesis of autoimmune diseases? [J]. Gut, 2015, 64(2): 332 – 341.

[10] Sathyabama S, Khan N, Agrewala JN. Friendly pathogens: prevent or provoke autoimmunity [J]. Crit Rev Microbiol, 2014, 40(3): 273 – 280.

[11] Cox AJ, West NP, Cripps AW. Obesity, inflammation, and the gut microbiota [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2015, 3(3): 207 – 215.

[12] Vieira SM, Pagovich OE, Kriegel MA. Diet, microbiota and autoimmune diseases [J]. Lupus, 2014, 23(6): 518 – 526.

[13] Niu H, Sobel ES, Morel L. Defective B-cell response to T-dependent immunization in lupus-prone mice [J]. Eur J Immunol, 2008, 38(11): 3028 – 3040.

[14] Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease [J]. Cell Microbiol, 2014, 16(7): 1024 – 1033.

[15] Mariat D, Firmesse O, Levenez F, et al. The Firmicutes / Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age [J]. BMC Microbiol, 2009, 9: 123.

[16] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity [J]. Nature, 2006, 444(7122): 1022 – 1023.

[17] Hevia A, Milani C, López P, et al. Intestinal dysbiosis associated with systemic lupus erythematosus [J]. MBio, 2014, 5(5): e01548 – 14.

[18] Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension [J]. Hypertension, 2015, 65(6): 1331 – 1340.

[19] Sanz Y, Moya-Pérez A. Microbiota, inflammation and obesity [J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 817: 291 – 317.

[20] Zhang H, Liao X, Sparks JB, et al. Dynamics of gut microbiota in autoimmune lupus [J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(24): 7551 – 7560.

[收稿日期] 2017 – 12 – 29

《中国实验动物学报》
撰写研究性论文要求 2 – 文题、作者单位

文题 (居中, 各级标题均按照此格式)

标题是论文的“眼”, 论文的中心论点, 论文内容的高度概括, 是连接论文和读者的桥梁。应简明确切反映论文的特定内容, 外延和内涵恰如其分。

正文中的各级标题用阿拉伯数字连续编号, 可至 3 级标题。

作者与单位 (居中)

署名限于选定研究课题和制订研究方案、参加全部或主要部分研究工作并作出主要贡献、参加撰写论文并能对内容负责的人。按贡献大小或实际参与分量排列名次。多位作者的署名之间应用逗号隔开, 姓名之间不留空格。

单位包括工作单位全称、所在省市名 (省会城市可略去省名) 及邮政编码; 单位名称与省市名之间应以逗号分隔, 邮编和省市之间空一格; 整个数据项用圆括号括起。