

链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠模型肠道菌群变化

朱华, 郭亚茜, 杜晓鹏, 赵文杰, 李彦红, 秦川*

(卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 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 观察链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导糖尿病大鼠模型肠道菌群结构和丰度的变化。**方法** 雄性SD大鼠25只, 随机分为对照组(C)10只、模型组(M)15只。模型组腹腔注射3%的STZ, 剂量30 mg/(kg·bw), 连续5 d。成模后每月测量体重、血糖等指标。模型成立4周和12周时, 分别在同一时间取各组大鼠的新鲜直肠粪便。在Illumina高通量测序平台上对粪便样本中细菌16S rDNA-V3区进行测序, 对肠道菌群结构、丰度进行定量分析。**结果** 模型组和对照组获得的优化序列数差异无显著性($P > 0.05$)。模型组动物肠道菌群的相对丰度指数(Chao1)、多样性指数Shannon与对照组比较降低($P < 0.05$), Simpson指数与对照组比较升高($P < 0.05$)。在门水平, 变形菌门(*Proteobacteria*)、蓝藻菌门(*Cyanobacteria*)、软壁菌门(*Tenericutes*)、TM7、放线菌门(*Actinobacter*)相对丰度降低($P < 0.05$)。在属水平, 造模4周, 模型组乳杆菌属(*Lactobacillus*)相对丰度降低($P < 0.05$); 拟杆菌属(*Bacteroides*)相对丰度升高($P < 0.05$)。造模12周, 模型组乳杆菌属(*Lactobacillus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)相对丰度升高($P < 0.05$); 双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)相对丰度降低($P < 0.05$)。**结论** STZ诱导的SD大鼠糖尿病动物肠道菌群的丰度和多样性降低, 为糖尿病与肠道菌群关系研究提供参考。

【关键词】 肠道菌群; 糖尿病; 链脲佐菌素; 高通量测序

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 03-0349-08

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.03.013

Analysis of gut microbiota in SD rat model of diabetes mellitus induced by streptozotocin

ZHU Hua, GUO Yaxi, DU Xiaopeng, ZHAO Wenjie, LI Yanhong, QIN Chuan*

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC) Beijing 100021, China)

Corresponding author: QIN Chuan. E-mail: chuanqin@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the characteristics of gut microbiota in SD rat model of diabetes mellitus induced by streptozotocin (STZ). **Methods** Twenty-five male SD rats were randomly divided into control (C) ($n = 10$) and diabetes (M) ($n = 15$) groups. Rats in the group M received intravenous injection of streptozotocin (30 mg/kg) once per day for 5 consecutive days. Fecal samples were collected and examined for the V3 region of the 16S rDNA gene by Illumina Miseq high-throughput sequencing. The abundance and composition of gut microbiota were analyzed by cluster analysis. **Results** DNA sequence analysis was successfully performed. The Chao 1 index was lower in the group M than group C ($P < 0.05$). The Shannon index was lower and the Simpson index was higher in the group M than group C ($P < 0.05$). At phylum level, the relative abundance of *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Tenericutes*, TM7, and *Actinobacteria*

【基金项目】 医科院重大协同创新项目(No. 2017-12M-2-005)。

Funded by CAMS Innovation Fund for Medical Science (No. 2017-12M-2-005)。

【作者简介】 朱华, 主任技师, 研究方向: 疾病与肠道微生态。Email: zhuhua0226@vip.sina.com

【通信作者】 秦川, 教授, 博士生导师。研究方向: 病理与病理生理学。Email: chuanqin@vip.sina.com

was lower in the group M than group C ($P < 0.05$). At genus level, 4 weeks after injection, the abundance of *Lactobacillus* was lower and that of *Bacteroidetes* was higher in the group M than group C ($P < 0.05$). 12 weeks after injection, the relative abundance of *Lactobacillus*, *Bacteroides* and *Ruminococcus* was higher and that of *Bifidobacterium* was lower in the group M than group C ($P < 0.05$). **Conclusions** This STZ-induced diabetic SD rat model has a low abundance and diversity of gut microbiota. Quantitative analysis of gut microbiota composition in this animal model provides a basic data for the study of relationship between diabetes mellitus and gut microbiota.

【Key words】 gut microbiota; diabetes mellitus; streptozotocin; high-throughput sequencing

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

糖尿病是血糖自平衡失调导致的慢性代谢性综合征,主要表现为高血糖及一系列相关症状。据世界卫生组织报告,2014 年全球糖尿病患者人数为 4.22 亿^[1]。据国际糖尿病联合会 2017 年发布的资料,我国现有糖尿病患者 1.14 亿人,超过印度,成为世界上糖尿病患者人数最多的国家^[2]。糖尿病是环境菌群、宿主遗传与免疫应激等复杂因素相互作用的结果。肠道菌群作为一种环境因素,参与宿主体内脂质代谢、氨基酸转运等多种生理生化进程,显著地影响着宿主的健康状态。随着高通量测序和生物信息学分析技术的不断进步,人们对肠道菌群与糖尿病间关系的认识也越来越深入。实验动物作为医学科学研究必不可少的工具,其正常及疾病模型状态下肠道微生物的结构、组成、丰度等数据是生物学背景资料的重要组成部分。本研究通过腹腔注射链脲佐菌素(STZ)方法复制糖尿病大鼠模型,采用 16S rDNA 高通量测序技术分析建模 12 周内动物肠道菌群结构和丰度的变化,为糖尿病与肠道菌群关系研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级雄性 SD 大鼠 25 只,由军事医学科学院实验动物中心提供【SCXK-(军)2012-0012】,4~6 周龄,体重 150~170 g。动物饲养在中国医学科学院实验动物研究所 SPF 隔离设施内【SYXK(京)2013-0014】。动物实验通过伦理委员会的审查,批准号:ZH16002。

1.2 方法

1.2.1 模型建立

大鼠按体重随机分为对照组(C)10 只、模型组(M)15 只。动物禁食 12 h 后,腹腔注射 STZ(Sigma 公司,货号 S0130)30 mg/kg,连续注射 5 d。STZ 溶于 0.1 mol/L pH 4.2 柠檬酸缓冲液中,现配现用。对照组动物注射等体积的柠檬酸缓冲液。最后一

次注射 3 d 后取尾静脉监测血糖,空腹血糖 ≥ 16.5 mmol/L 视为糖尿病模型成立。

1.2.2 粪便采集

模型成立后 4 周和 12 周,分别在同一时间取各组大鼠新鲜直肠粪便(≥ 200 mg),迅速装入无菌冻存管中放入 -80°C 冰箱。

1.2.3 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增

CTAB 法提取粪便基因组 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 是否有降解;NanoPhotometer 分光光度计检测样品纯度;Qubit2.0 Fluorometer 检测 DNA 样品浓度。以稀释后的基因组 DNA 为模板,使用带 Barcode 的特异引物,New England Biolabs 公司的 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶进行 PCR。

16S V3+4 区引物(515F 和 806R)鉴定细菌多样性。引物序列为 F: 5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3'; R: 5'-GGACTACNNGGTATCTAAT-3'。等量混样不同浓度 PCR 产物,使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,使用 Qiagen 公司胶回收试剂盒回收产物。

1.2.4 文库构建、测序及生物信息学分析

使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建,构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量,检测合格的文库使用 HiSeq 进行测序,测序策略为 PE250。对测序得到的有效数据进行分类单元(operational taxonomic units, OTUs)聚类 and 物种分类分析。对 OTUs 进行丰度、 α -多样性指数分析。

1.3 统计学方法

实验结果采用 SPSS19.0 软件进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物体重和血糖的变化

注射前对照组、模型组大鼠平均体重差异无显

著性。腹腔注射 STZ 后,对照组动物体重稳定增长,模型组体重增加不明显。4 周时模型组大鼠存活 12 只,其体重显著低于对照组($P < 0.05$)。12 周时模型组动物存活 10 只且体重减轻,与对照组比较差异极显著($P < 0.01$)。注射前对照组与模型组动物的血糖值差异无显著性,造模 4 周、12 周后模型组大鼠血糖升高,与对照组比较差异有显著性($P < 0.01$) (表 1)。

2.2 肠道菌群高通量测序结果

表 1 注射链脲菌素后动物体重和血糖的变化($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	体重 (g) Body weight (g)			血糖 (mmol/L) Blood glucose (mmol/L)		
	造模前 Before injection (n = 10)	造模 4 周 4 weeks after injection (n = 10)	造模 12 周 12 weeks after injection (n = 10)	造模前 Before injection (n = 15)	造模 4 周 4 weeks after injection (n = 12)	造模 12 周 12 weeks after injection (n = 10)
对照组 Control group	165.43 ± 18.22	326.32 ± 21.79	450.73 ± 37.32	6.01 ± 0.72	5.99 ± 0.66	6.07 ± 0.59
模型组 DM group	164.39 ± 17.88	222.48 ± 17.31 *	209.48 ± 22.72 **	5.98 ± 0.63	25.43 ± 5.65 **	27.73 ± 5.94 **

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 数据过滤统计分析表($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	原始下机 Reads 数 Raw reads		过滤后高质量 Reads 数 Clean reads		高质量序列比例 Clean reads rate(%)	
	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection
对照组 Control group	112 319.6 ± 1855.99	103 799.6 ± 2085.05	104 488.8 ± 1939.22	104 836.8 ± 4532.33	93.02 ± 0.45	98.53 ± 0.23
模型组 DM group	112 645.6 ± 5300.98	102 800.0 ± 3111.24	102 648.4 ± 2078.43	101 129.3 ± 2904.81	93.08 ± 0.32	98.53 ± 0.15
P 值	0.8932	0.7898	0.8762	0.6977	0.8912	0.9231

组别 Groups	含 N 比例大于 5% Reads 占 Raw Reads 比例 Ratio of reads containing N > 5%(%)		接头污染 Reads 数占 Raw Reads 比例 Adapter Polluted Reads ratio(%)		测序错误率小于 0.1% 碱基占总碱基比例 Clean Q30 Bases ratio (%)	
	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection
对照组 Control group	0.00	0.00	0.00	0.00	93.82 ± 0.22	89.75 ± 0.33
模型组 DM group	0.00	0.00	0.00	0.00	94.14 ± 0.40	89.62 ± 0.37
P 值	-	-	-	-	0.5432	0.7689

2.2.2 肠道菌群多样性分析

根据 OTUs 代表序列与数据库注释文件对比,在 97% (种)水平上进行 OTUs 划分,模型组在两个

2.2.1 粪便样品测序结果评估

对照组和模型组动物 2 个时间点 20 个样本共得到 2 065 796 条原始下机 reads。比较两组原始下机 reads 数、过滤后得到的高质量 Reads 数、过滤后得到的高质量序列占 Raw Reads 比例、含 N 比例大于 5% 的 Reads 占 Raw Reads 比例、Clean Reads 中测序质量值大于 30 (错误率小于 0.1%) 的碱基占总碱基 (clean reads) 比例,对照组、模型组在两个时间点差异均无显著性 (表 2)。

时间点所获得的 OTUs 数减少,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。Chao1 指数数值越大表示菌群丰度越高,模型组 Chao1 指数在两个时间点的数

值均降低,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。Shannon 指数越大、Simpson 指数越小表示肠道菌群的多样性越强,模型组的 Shannon 指数数值在两个时间点均降低,Simpson 指数数值在两个时间点均升高,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)(表 3)。

2.2.3 肠道菌群在门水平上的构成

测序结果显示:对照组 reads 在两个时间点主要分属以下 8 个门,由多到少依次为:厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、蓝藻菌门(*Cyanobacteria*)、软壁菌门(*Tenericutes*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、TM7、放线菌门(*Actinobacter*)。迷踪菌门(*Elusimicrobia*)、

绿弯杆菌门(*Chloroflexi*)仅在个别动物体内检出。造模 4 周时,模型组厚壁菌门、拟杆菌门丰度与对照组比较差异无显著性。厚壁菌门与拟杆菌门比值呈下降趋势,与对照组比较差异无显著性。变形菌门、蓝藻菌门、软壁菌门、TM7、放线菌门的相对丰度降低,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。疣微菌门仅在个别动物检出。造模 12 周时,模型组厚壁菌门、拟杆菌门的相对丰度及比值与对照组比较差异无显著性。变形菌门、蓝藻菌门、软壁菌门、TM7 的相对丰度降低,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。放线菌门在个别动物检出。疣微菌门、迷踪菌门、绿弯杆菌门未检出(表 4)。

表 3 模型组和对照组动物肠道菌群多样性比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Comparison of the α -diversity indexes of gut microbiota between the control and diabetes groups($\bar{x} \pm s$)								
组别 Groups	OUTs		Chao1		Shannon index		Simpson index	
	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection
对照组 Control group	133.0 $\pm$ 21.5	138.2 $\pm$ 14.2	226.73 $\pm$ 42.99	219.73 $\pm$ 45.44	3.44 $\pm$ 0.87	3.29 $\pm$ 0.81	0.089 6 $\pm$ 0.049 9	0.088 8 $\pm$ 0.051 2
模型组 DM group	108.2 $\pm$ 25.0	101.4 $\pm$ 16.04	187.49 $\pm$ 36.42	173.21 $\pm$ 39.42	2.38 $\pm$ 0.75	2.29 $\pm$ 0.74	0.124 3 $\pm$ 0.070 4	0.119 9 $\pm$ 0.069 8
P 值	0.0001 **	0.0000 **	0.0194 *	0.0212 *	0.0382 *	0.0321 *	0.0415 *	0.0421 *

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下表同)
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following tables)

表 4 肠道菌群在门水平上的构成($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.4 Relative abundance of the bacteria in gut microbiota at phylum level in the control and diabetes groups($\bar{x} \pm s, \%$)								
组别 Groups	厚壁菌门 <i>Firmicutes</i>		拟杆菌门 <i>Bacteroidetes</i>		厚壁菌门/拟杆菌门 <i>Firmicutes/ Bacteroidetes</i>		变形菌门 <i>Proteobacteria</i>	
	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection
对照组 Control group	59.65 $\pm$ 13.98	58.07 $\pm$ 10.65	35.18 $\pm$ 13.46	37.13 $\pm$ 10.09	1.70 $\pm$ 0.47	1.56 $\pm$ 0.49	2.49 $\pm$ 0.50	1.62 $\pm$ 0.13
模型组 DM group	60.04 $\pm$ 21.23	59.47 $\pm$ 12.78	36.33 $\pm$ 19.79	38.55 $\pm$ 8.97	1.65 $\pm$ 0.51	1.54 $\pm$ 0.58	1.96 $\pm$ 0.23	0.83 $\pm$ 0.32
P 值	0.4529	0.6783	0.5378	0.4212	0.0592	0.0611	0.0241 *	0.0362 *

组别 Groups	蓝藻菌门 <i>Cyanobacteria</i>		软壁菌门 <i>Tenericutes</i>		疣微菌门 <i>Verrucomicrobia</i>		TM7	
	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection
对照组 Control group	1.20 $\pm$ 0.45	0.27 $\pm$ 0.11	0.27 $\pm$ 0.02	1.47 $\pm$ 0.95	0.19 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.08	0.06 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01
模型组 DM group	0.40 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.02	1.06 $\pm$ 0.17	个别检出	—	0.02 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00
P 值	0.0324 *	0.0013 **	0.0452 *	0.0325 *			0.0317 *	0.0413 *

组别 Groups	放线菌门 <i>Actinobacter</i>		迷踪菌门 <i>Elusimicrobia</i>		绿弯杆菌门 <i>Chloroflexi</i>	
	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection
对照组 Control group	1.54 ± 0.11	1.29 ± 0.06	个别检出	个别检出	个别检出	个别检出
模型组 DM group	1.02 ± 1.29	个别检出	个别检出	—	—	—
P 值	0.0112 *					

2.2.4 肠道菌群在门以下水平的构成

在科水平,对 10 个相对丰度较高的菌株进行分析,造模 4 周时,模型组拟杆菌科(*Bacteroidaceae*)相对丰度增高,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。造模 12 周,模型组 S24-7、乳酸杆菌科(*Lactobacillaceae*)、梭杆菌科(*Clostridiaceae*)、拟杆菌科(*Bacteroidaceae*)相对丰度增高,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。(表 5,图 1)

在属水平,对 10 个相对丰度较高的菌株进行分析,造模 4 周时,模型组乳杆菌属(*Lactobacillus*)相对丰度降低、拟杆菌属的(*Bacteroides*)相对丰度增高,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。造模 12 周,模型组乳杆菌属(*Lactobacillus*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)相对丰度增高,双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)相对丰度降低,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。(表 6,图 2)

表 5 肠道菌群在科水平上的构成($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.5 Relative abundance of the bacteria in gut microbiota at family level in the control and diabetes groups($\bar{x} \pm s, \%$)								
组别 Groups	乳杆菌科 <i>Lactobacillaceae</i>		拟杆菌科 <i>Bacteroidaceae</i>		<i>Ruminococcaceae</i>		<i>Prevotellaceae</i>	
	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection
对照组 Control group	11.93 ± 3.62	12.10 ± 3.49	10.85 ± 3.23	1.63 ± 0.31	23.53 ± 9.26	21.66 ± 8.88	12.52 ± 3.23	17.99 ± 2.98
模型组 DM group	11.03 ± 3.79	20.40 ± 5.01	18.67 ± 5.23	2.92 ± 0.58	20.56 ± 8.21	18.08 ± 9.29	10.40 ± 3.05	14.07 ± 5.22
P 值	0.3117	0.0463 *	0.0372 *	0.0481 *	0.3914	0.3129	0.4557	0.3745

组别 Groups	S24 - 7		毛螺菌科 <i>Lachnospiraceae</i>		<i>Turicibacteraceae</i>	
	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection
对照组 Control group	22.03 ± 7.44	23.65 ± 8.55	6.62 ± 2.25	7.12 ± 1.34	5.26 ± 2.05	4.98 ± 1.22
模型组 DM group	18.96 ± 6.02	27.06 ± 9.54	5.91 ± 2.47	6.37 ± 2.11	5.02 ± 1.23	4.13 ± 1.34
P 值	0.1665	0.0242 *	0.5780	0.4453	0.3438	0.5527

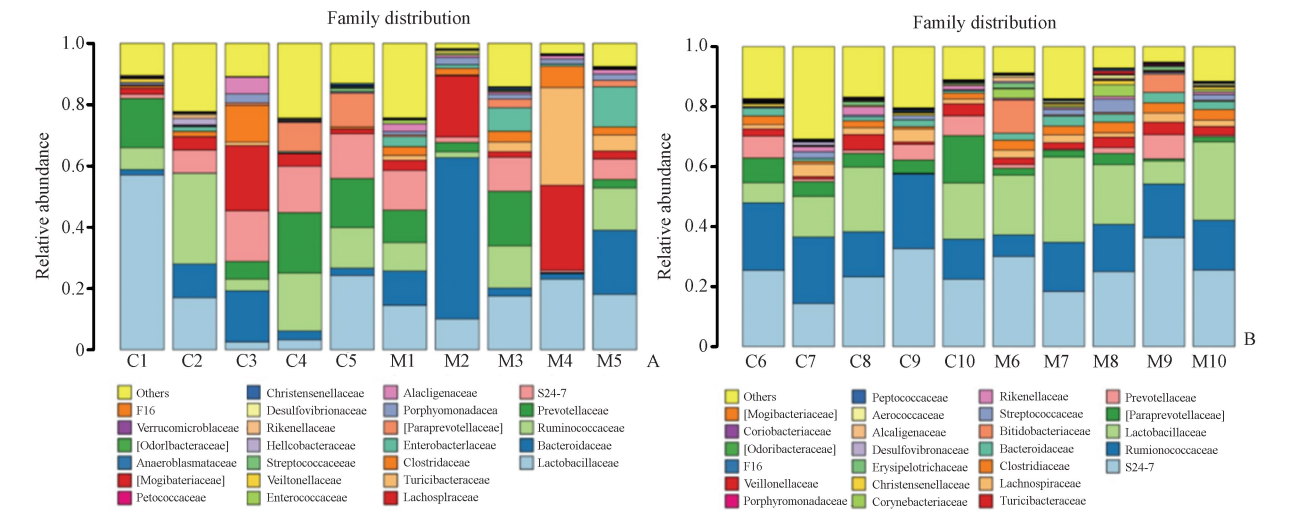
组别 Groups	梭菌科 <i>Clostridiaceae</i>		肠杆菌科 <i>Enterobacteriaceae</i>		<i>Paraprevotellaceae</i>	
	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection
对照组 Control group	2.30 ± 1.15	1.75 ± 0.23	3.07 ± 0.51	2.78 ± 0.95	1.42 ± 0.06	1.59 ± 0.12
模型组 DM group	2.01 ± 0.92	3.32 ± 1.01	2.98 ± 1.29	2.25 ± 1.01	1.39 ± 0.44	1.21 ± 0.34
P 值	0.4140	0.0134 *	0.6338	0.5438	0.2312	0.3514

表 6 肠道菌群在属水平上的构成($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.6 Relative abundance of the bacteria in gut microbiota at genus level in the control and diabetes groups($\bar{x} \pm s, \%$)								
组别 Groups	乳杆菌科 <i>Lactobacillaceae</i>		拟杆菌科 <i>Bacteroidaceae</i>		普雷沃菌属 <i>Prevotella</i>		双歧杆菌属 <i>Bifidobacterium</i>	
	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection
对照组 Control group	20.85 ± 5.22	12.1 ± 3.01	6.93 ± 1.62	1.63 ± 0.11	14.53 ± 3.26	18.73 ± 4.99	2.33 ± 0.51	1.96 ± 3.23
模型组 DM group	16.67 ± 4.78	20.5 ± 4.95	17.81 ± 4.79	2.92 ± 0.60	13.96 ± 3.21	16.78 ± 5.21	2.17 ± 0.63	0.80 ± 3.05
P 值	0.0492 *	0.0473 *	0.0171 *	0.0484 *	0.7326	0.2060	0.1152	0.0371 *

组别 Groups	瘤胃球菌属 <i>Ruminococcus</i>		<i>Blautia</i>		颤螺菌属 <i>Oscillospira</i>	
	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection
对照组 Control group	2.17 ± 0.32	1.28 ± 0.44	16.62 ± 2.25	19.78 ± 1.73	15.26 ± 1.05	18.98 ± 4.21
模型组 DM group	1.98 ± 0.44	3.09 ± 0.92	14.71 ± 2.47	15.94 ± 1.87	13.96 ± 2.00	17.01 ± 3.98
P 值	0.3739	0.0163 *	0.2608	0.3579	0.1158	0.3046

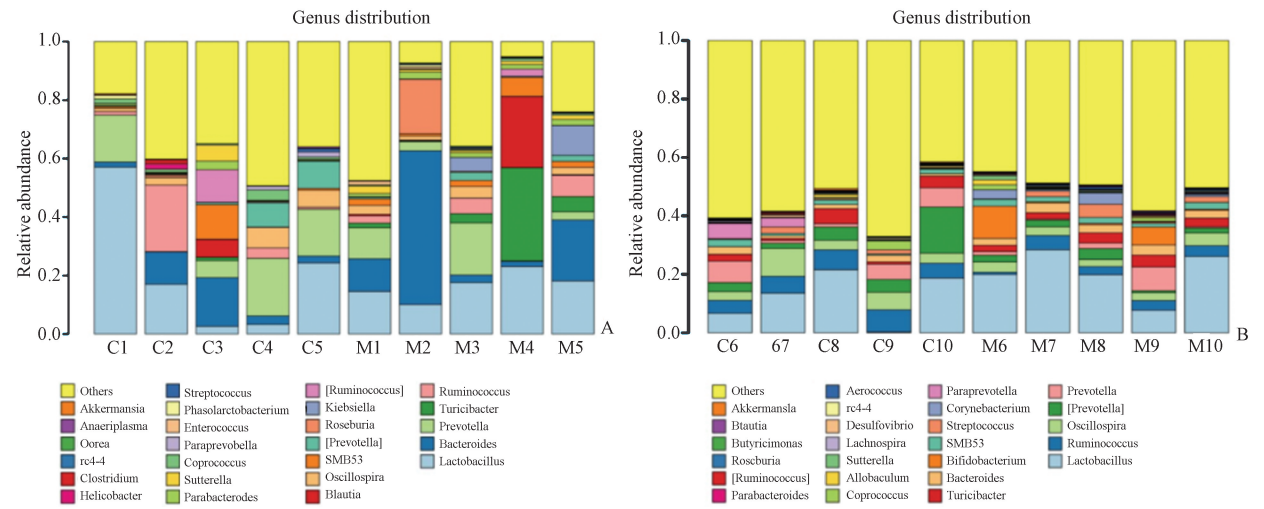
组别 Groups	SMB53		罗氏菌属 <i>Roseburia</i>		克雷伯菌属 <i>Klebsiella</i>	
	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection	造模 4 周 4 weeks after injection	造模 12 周 12 weeks after injection
对照组 Control group	10.30 ± 3.15	11.51 ± 3.23	8.07 ± 1.51	10.45 ± 2.96	1.42 ± 0.26	1.57 ± 0.32
模型组 DM group	9.41 ± 2.22	10.54 ± 2.35	7.52 ± 1.29	9.43 ± 1.01	1.21 ± 0.14	1.66 ± 0.43
P 值	0.2860	0.4203	0.3739	0.5432	0.5097	0.4498



注: A 造模后 4 周; B. 造模后 12 周; 图中 C 为对照组, M 为模型组。
图 1 对照组和模型组动物肠道菌群在科水平的相对丰度

Note. A. 4 weeks after injection; B. 12 weeks after injection; C. Control group, D. Diabetes group.

Fig.1 Relative abundance of bacteria in the gut microbiota at phylum level in the control and diabetes groups



注:A. 造模后 4 周;B. 造模后 12 周;图中 C 为对照组,M 为模型组。
图 2 对照组和模型组动物肠道菌群在属水平的相对丰度
 Note. A. 4 weeks after injection; B. 12 weeks after injection; C. Control group; D. Diabetes group.

Fig. 2 Relative abundance of bacteria in the gut microbiota at genus level in the control and diabetes groups

3 讨论

大小鼠是目前国内外常用于肠道菌群与疾病相关性研究的实验动物。啮齿类有个体小,易于操作,生物背景资料清晰、价格便宜等优点。SPF 级动物饲养在标准环境下,可排除饮食结构、饲养环境、年龄差别等因素对肠道菌群的影响。但啮齿类在解剖、生理和代谢等方面与人之间存在较大的差异,肠道菌群组成及丰度也不尽相同。充分了解实验动物及相关模型肠道菌群的基础数据,认识其与人菌群的差异和相似性,是利用动物模型进行肠道菌群与疾病相关性研究的前提。

从测序结果可以看出,STZ 诱导糖尿病 SD 大鼠模型的肠道菌群结构及丰度均发生改变。

α -多样性分析中,对照组与模型组在 Chao1、Shannon、Simpson 这 3 个指数上差异均有显著性($P < 0.05$),Chao1、Shannon 指数升高,Simpson 指数降低。提示 STZ 诱导的糖尿病 SD 大鼠模型肠道菌群多样性降低。相对丰度分析中,在门水平,对照组肠排在前 5 位的依次是厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、蓝藻菌门、软壁菌门。其中厚壁菌门、拟杆菌门二者的总和占到了全部肠道菌的 95% 以上。模型组中厚壁菌门、拟杆菌门的比例略有下降,但与对照组比较无显著性差异。相对丰度较低的变形菌门、蓝藻菌门、软壁菌门、放线菌门在模型组均有降低,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。但变形菌门、蓝藻菌门、软壁菌门在对照组随动物年龄

增长也出现相对丰度的降低,其丰度改变是与年龄相关还是与疾病相关需进一步研究。在属水平,模型组和对照组的乳杆菌属、拟杆菌属、瘤胃球菌属、双歧杆菌属相对丰度差异有显著性($P < 0.05$)。

据文献报道,中国人糖尿病及前期状态患者的肠道菌群中优势菌群为厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、梭形杆菌门、放线菌门,在门水平的优势菌群与 SD 大鼠类似,但相对丰度有差异^[3-4]。在属水平,正常人群与糖尿病患者的差异菌属主要是拟杆菌属、普雷沃菌属、IV 型梭菌属、乳杆菌属、韦荣球菌属、Blautia 球菌-直肠真杆菌属、双歧杆菌属,差异菌的种类与丰度与 SD 大鼠差别较大。在 SD 大鼠和人的肠道菌群中,厚壁菌门和拟杆菌门都是优势菌群,但在相对丰度及构成比上存在差异。有文献报道厚壁菌门与拟杆菌门的比例不平衡与糖尿病、肥胖等相关,但研究结果不统一。有研究认为肥胖人群厚壁菌门占优势,厚壁菌门/拟杆菌门比值较高^[5];也有研究认为糖尿病患者拟杆菌门占优势,而厚壁菌门/拟杆菌门比值较低^[6]。提示作为优势菌群的厚壁菌门与拟杆菌门,除相对丰度外,也应重视其比值的变化。我们的研究中厚壁菌门/拟杆菌门比值模型组与对照组比较有降低趋势,但无统计学意义,推测可能与样本数量较少相关。

值得关注的是放线菌门和疣微菌门,放线菌门在对照组 10 周龄 SD 大鼠(造模 4 周)相对丰度较高(1.54 ± 0.11),18 周龄(造模 12 周)时略有下降(1.29 ± 0.06)。而在模型组,造模 4 周时相对丰度

为(1.02 ± 1.29),造模 12 周时仅个别检出,放线菌门的相对丰度显著降低。放线菌门是革兰阳性厌氧菌,在肠道内的相对丰度不占优势,但其门内的双歧杆菌属是对人体健康产生重要作用的益生菌,在人体肠道内较为常见^[7]。双歧杆菌可以刺激免疫应答、产生维生素和氨基酸、使肠道内环境酸化,抑制腐败菌和致病菌生长、保护肠粘膜屏障,减少内毒素进入血液,并具有抗炎反应,减少结肠癌发生的作用^[8,9]。在属水平的相对分析中造模 12 周时双歧杆菌的相对丰度降低($P < 0.05$),与门水平的结果相对应,提示糖尿病的发病过程可能与起益生作用的菌群减少,毒性代谢产物堆积有关。疣微菌门在对照组均检出且两个年龄段的丰度相似,而模型组动物在造模 4 周时仅在个别动物检出,造模 12 周时未检出,提示疣微菌门可能与 STZ 诱导的糖尿病病程相关。

本研究基于肠道细菌的 16SrDNA 高通量测序技术,对 STZ 诱导的 SD 糖尿病大鼠模型肠道菌群的结构和丰度进行了初步分析,并讨论了模型动物与人有关菌群的差异和相似性,为肠道疾病与微生态方面的医学研究提供了基础资料。

参 考 文 献(References)

- [1] World Health Organization. Global Report on Diabetes [R]. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/20487119789241565257_eng.pdf;sequence=1
- [2] International Diabetes Federation. Diabetes Atlas, 8th Edition

[R]. <http://www.diabetesatlas.org/across-the-globe.html>.

- [3] 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.
- [4] 曾艺鹏, 胡燕, 吴平, 等. 患 2 型糖尿病的肥胖人群肠道菌群分析 [J]. *检验医学*, 2016, 34(2): 1 – 10.
Zeng YP, Hu Y, Wu P, et al. Analysis of gut microbiota in obese population with type 2 diabetes mellitus [J]. *Lab Med*, 2016, 34(2): 1 – 10.
- [5] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity [J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1022 – 1023.
- [6] Furet JP, Kong LC, Tap J, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers [J]. *Diabetes*, 2010, (12): 3049 – 3057.
- [7] Shkoporov AN, Khokhlova EV, Kulagina EV, et al. Application of several molecular techniques to study numerically predominant Bifidobacterium, spp and Bacteroidals order strains in the feces of healthy children [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008, 72 (3): 742 – 748.
- [8] Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, et al. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property [J]. *Appl Environ Microbiol*. 2007, 73(1): 179 – 185.
- [9] Canij PD, Neyrinck AM, Fava F, et al. Selective increases of bifidobacteria gut microflora improve high-fat-diet-induce diabetes mice through a mechanism associated with endotoxaemia [J]. *Diabetologia*, 2007, 50(11): 2374 – 2783.

[收稿日期] 2018 – 03 – 01