

王诗雨,林家锋,蒋欣如,等. 基于 16S rRNA 测序分析两种呼肠孤病毒对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 100-106.

Wang SY, Lin JF, Jiang XR, et al. Analysis of the effects of two reoviruses on the intestinal flora of mice based on 16S rRNA sequencing [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 100-106.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.013

基于 16S rRNA 测序分析两种呼肠孤病毒对小鼠肠道菌群的影响

王诗雨[#],林家锋[#],蒋欣如,孙淼,王颖,陶晓莉^{*}

(锦州医科大学基础医学院病原生物学教研室,辽宁 锦州 121000)

【摘要】 目的 探究 T1L 和 NBV 两种呼肠孤病毒对小鼠肠道菌群结构的影响。**方法** 将 25 只小鼠随机分为 5 组(对照组、NBV 滴鼻组、NBV 灌胃组、T1L 滴鼻组、T1L 灌胃组),每组 5 只。对照组用 PBS 灌胃,其余组别均用 2×10^7 PFU/mL 病毒滴度感染小鼠。7 d 后采集小鼠粪便,从每组 5 个样本中选出粪便重量较重的 3 个样本,对粪便 DNA 进行 V3+V4 可变区特异性扩增,运用 16S rRNA 测序分析小鼠粪便中菌群的丰度、多样性及物种组成结构。**结果** T1L 和 NBV 灌胃后的小鼠肠道菌群丰度和多样性与对照组相比有所下降,且 T1L 滴鼻组下降最为显著 ($P < 0.05$);与 NBV 灌胃组相比,NBV 滴鼻组的菌群丰度和多样性增加显著 ($P < 0.05$)。在门的级别上,T1L 和 NBV 灌胃组中厚壁菌(*Firmicutes*)丰度明显减少,T1L 和 NBV 滴鼻组中拟杆菌(*Bacteroidetes*)丰度明显减少;在属的级别上,T1L 滴鼻组、T1L 灌胃组和 NBV 灌胃组中罗姆布茨菌(*Romboutsia*)丰度明显减少,T1L 滴鼻组中别样杆菌(*Alistipes*)丰度明显增加 ($P < 0.05$)。**结论** T1L 和 NBV 感染小鼠会降低菌群的丰度和多样性,可能通过有益菌减少或致病菌增多来破坏菌群平衡。此外,病毒的感染方式不同,对菌群的影响也有所不同。

【关键词】 呼肠孤病毒;16S rRNA;肠道菌群;感染方式

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0100-07

Analysis of the effects of two reoviruses on the intestinal flora of mice based on 16S rRNA sequencing

WANG Shiyu[#], LIN Jiafeng[#], JIANG Xinru, SUN Miao, WANG Ying, TAO Xiaoli^{*}

(Department of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

Corresponding author: TAO Xiaoli. E-mail: taoxiaoli@jzmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects of two reoviruses, T1L and NBV, on the structure of mouse intestinal flora. **Methods** The mice were randomly divided into five groups: control, instillation-NBV (int-NBV), oral-NBV, instillation-T1L (int-T1L), and oral-T1L groups, with five mice in each group. The control group was intragastrically administered with phosphate buffered saline, and other groups were each infected with a viral titer of 2×10^7 PFU/mL. After 7 days, mouse feces were collected and three samples were selected using the heavier stool weights from each group. After V3+V4 amplification, 16S rRNA technology was used to estimate the richness, diversity and composition of bacterial flora. **Results** After T1L and NBV instillation, the abundance and diversity of intestinal flora were lowered compared with the control group, with a significant decrease ($P < 0.05$) in the int-T1L group. The abundance and diversity were markedly augmented ($P < 0.05$) in the int-NBV group compared with the oral-NBV group. At the phylum level, the abundance of Firmicutes was markedly reduced in both the oral-T1L and oral-NBV groups compared with the control

【基金项目】 辽宁省大学生创新训练项目(201910160037)。

Funded by Innovative Training Project for College Students in Liaoning Province(201910160037).

【作者简介】 王诗雨(1999—),女,本科,研究方向:感染病毒的动物模型建立。Email:2692458551@qq.com;

林家锋(1997—),男,硕士研究生,研究方向:病毒的致病机制及其动物模型建立。Email:215470273@qq.com。

[#]共同第一作者

【通信作者】 陶晓莉(1985—),女,讲师,博士,研究方向:病毒的致病机理和免疫效应。Email:taoxiaoli@jzmu.edu.cn

groups, and the abundance of Bacteroidetes was markedly reduced in both the int-T1L and int-NBV groups compared with the control group. At the genus level, Romboutsia was markedly lower in the int-T1L, oral-T1L and oral-NBV groups versus the control group, and Alistipes was markedly augmented in the int-T1L group ($P < 0.05$). **Conclusions** Two reoviruses, T1L and NBV, reduced the abundance and diversity of mouse flora and may destroy flora balance through the reduction of beneficial bacteria or the increase of pathogenic bacteria. Different infection routes have different effects on the flora of mice.

【Keywords】 reovirus; 16S rRNA; intestinal flora; infection way

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

人类肠道富含多种微生物群落,能够定期监视免疫系统、提供营养物质及抵抗致病物质侵害,拥有极其重要的功能^[1-3]。由于个体之间肠道菌群存在差异,且菌群微生态和宿主之间的联系每时每刻都在变化,因此菌群和宿主间的作用机制成为新兴研究的热点^[4-5]。一旦有病原微生物感染机体,这种作用机制是否有效、菌群的丰度和多样性是否差异显著、肠道微生态紊乱的过程又是怎样,种种疑问都亟需进一步的解决。

正呼肠孤病毒是一类双链 RNA 病毒,无囊膜,一般可分为两种亚型:哺乳动物非融合性病毒(MRV)、融合性病毒(NBV、ARV、BroV 等)^[6-8]。T1L 隶属于 MRV Lang 型,分离自人体肠道及呼吸道,研究表明,经口接种的 T1L 能够跨越回肠细胞直接攻击肠道微环境,扰乱消化系统正常的免疫功能^[9]。NBV 为纳尔森海湾病毒,可从人、鸟、牛、羊中分离出来,是一种典型的人兽共患病病毒;它能特异性结合膜受体 NgR1,在黏附因子 A 的作用下释放出病毒颗粒入侵呼吸道和消化道,扰乱宿主体内微生物正常活动^[10-11]。本研究通过 16S rRNA 测序分析 NBV 和 T1L 两种正呼肠孤病毒对小鼠肠道菌群的影响,比较不同感染方式对微生物群落及其结构的差异,从肠道微生态的角度为正呼肠孤病毒的防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

25 只 SPF 级雄性封闭群 KM 小鼠,4 ~ 5 周龄,体重 15 ~ 18 g,健康状况良好,购于锦州医科大学实验动物中心【SCXK(辽)2019-0003】。动物饲养于锦州医科大学动物实验室【SYXK(辽)2019-0007】,湿度 60%,温度 25℃,12 h 昼夜交替。所有操作均经锦州医科大学实验动物伦理委员会审核(IACUC 号:2019014)。

1.1.2 病毒株

NBV、T1L 病毒株经空斑滴度测定,病毒浓度为

2×10^7 PFU/mL,由锦州医科大学病原生物学实验室-80℃冰箱保存。

1.1.3 主要试剂与仪器

粪便基因组 DNA 提取试剂盒(中国 TIANGEN 公司,DP328),无水乙醇(北京化工厂有限公司,20120110),乌拉坦(中国 Sigma 公司,94300)。

微量分光光度计(Thermo,美国),高通量测序仪(Illumina,美国),分析天平(Mettler Toledo,瑞士),超纯水机(Millipore,德国),-80℃低温冰箱(Thermo,美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠分组及处理

随机将 25 只 SPF 级 KM 小鼠均分为 5 个组别,每组 5 只,每天按照所称量的体重处理,即:对照组(Control 组)、NBV 滴鼻组(Int-NBV 组)、NBV 灌胃组(Oral-NBV 组)、T1L 滴鼻组(Int-T1L 组)、T1L 灌胃组(Oral-T1L 组)。处理方法:对照组:0.2 mL/10 g PBS 灌胃;NBV 滴鼻组:0.2 mL/10 g NBV 滴鼻;NBV 灌胃组:0.2 mL/10 g NBV 灌胃;T1L 滴鼻组:0.2 mL/10 g T1L 滴鼻;T1L 灌胃组:0.2 mL/10 g T1L 灌胃。连续 7 d,期间给予充足的超纯水和小鼠饲料以供自由摄取。

1.2.2 小鼠粪便样品采集

灌毒完成后,次日于超净无菌环境下用 20%乌拉坦麻醉小鼠,75%乙醇消毒腹部,腹腔正中解剖,采集小鼠肠道内容物于高压灭菌过的 2 mL EP 管中,称重标记,迅速置于-80℃里保存。

1.2.3 粪便 16S rRNA 测序

从每组 5 个粪便样品中遴选出重量较高的 3 个样本,分别提取总 DNA 并测定浓度及纯度。按照引物序列(338F:5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3';806R:5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),对粪便 DNA 进行 V3+V4 可变区的特异性扩增且细菌的 16S rRNA 测序。

1.2.4 数据处理

按照新版 Illumina MiSeq 和 HiSeq 处理平台提供的模拟下机数据,经数据拆解、引物切除、PE

Reads 有效拼接和 Tags 过滤, OUTs 聚类, 在 FLASH 软件下进行质控分析, 获得最终数据。

1.3 统计学分析

Excel 2010 建立数据库, 结果均用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并且用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件分析, 两组间比较用成组 t 检验, 多组间比较用单因素方差分析, Alpha 和 Beta 多样性检验均经 Bray Curtis 检验, 显著性水平 α 为 0.05, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 菌群测序结果分析

16S rRNA 测序显示, 每组小鼠样品 PCR 扩增产物的大小集中在 (400 ± 100) bp 之间, 和 V3+V4 可变区大小基本吻合。小鼠粪便样品的稀释曲线 (rarefaction curve) 是计算随机抽取样品 OTUs 大小, 按统计量和物种多样性来绘制曲线。结果显示, 随着测序数量的增加, 每个样品聚类物种数目也在增加, 且斜率逐渐降低, 说明小鼠粪便样品送测数量合理, 测序深度足以满足后续研究 (见图 1)。

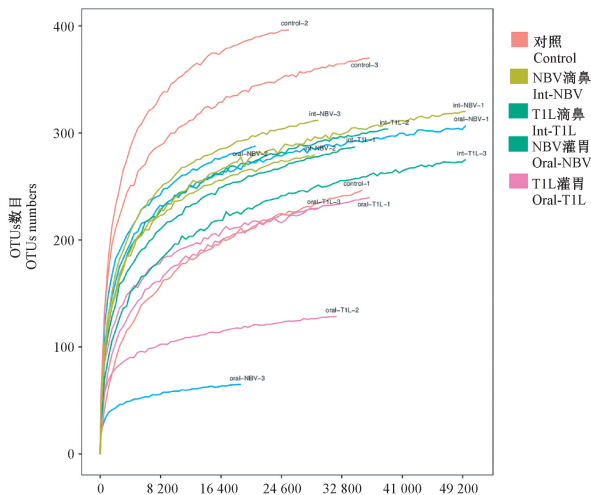


图 1 小鼠粪便样品稀释曲线

Figure 1 Rarefaction curve of mouse stool sample

物种累积曲线 (species accumulation curve) 用来判断样本量是否充分。结果显示, 在样本量渐增的同时, 所对应的物种数目也在增加, 且曲线渐趋平坦, 同样说明小鼠测序样品的数量合理 (见图 2)。

2.2 粪便样品比较分析

Anosim 分析基于 Bray Curtis 距离来比较组间和组内差异, 从而判断组间群落差异是否具有显著性。结果显示, 统计参数 $R > 0$, 即组间差异大于组内差异, 说明分组合理, 且 $P < 0.05$ 说明统计学上差

异具有显著性 (见图 3)。

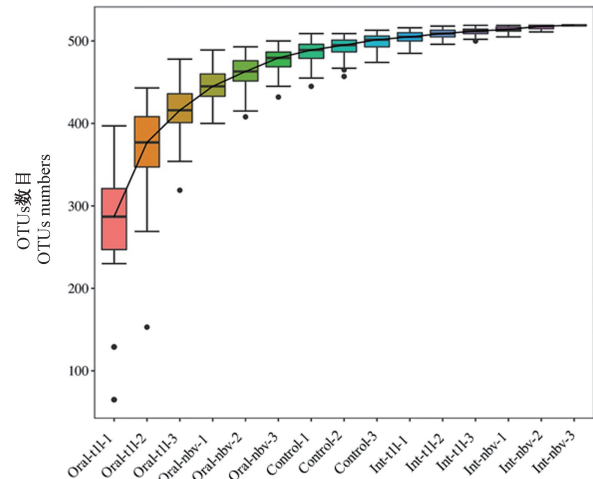


图 2 小鼠粪便样品物种累积曲线

Figure 2 Species accumulation curve of mouse stool sample

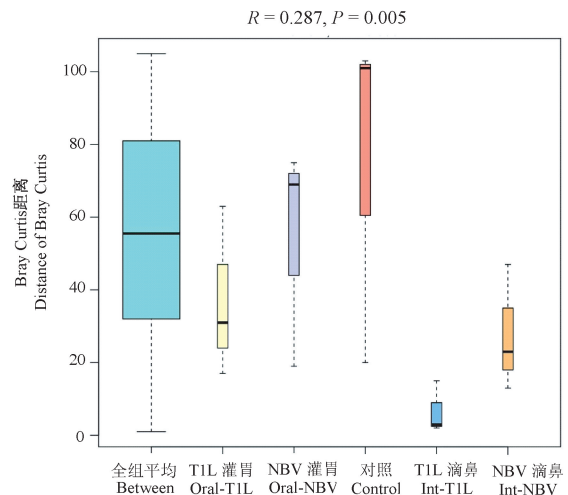


图 3 基于 Bray Curtis 距离的 Anosim 盒状图

Figure 3 Anosim box plot based on Bray Curtis distance

2.3 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性由丰富度和多样性共同决定, 囊括多个指标, 以 Chao1 和 Shannon 指数最具代表。Chao1 值越大, 则物种越丰富、数量越多; Shannon_2 值越大, 则物种越多样化, 分配越均匀。结果显示: 和对照组相比, NBV 和 T1L 感染后 Chao1 和 Shannon_2 值都降低, 且 T1L 滴鼻组明显降低, 具有显著性差异 ($P < 0.05$); NBV 滴鼻组和灌胃组相比, 两种指数升高且有统计学的差异 ($P < 0.05$)。总的来说, NBV 和 T1L 灌毒后菌群丰度和多样性都有所下降, 以 T1L 滴鼻组最为明显; 两种灌毒方式相比, 滴鼻后的小鼠菌群丰富度和多样性都有所增加, 以 NBV 滴鼻组最为明显 (见表 1)。

表 1 小鼠菌群 Alpha 多样性($n=3$)

Table 1 Alpha diversity of mouse flora($n=3$)

组别 Groups	Chao1	Shannon_2
对照组 Control group	339.43 ± 79.09	5.20 ± 1.81
NBV 滴鼻组 Int-NBV group	306.63 ± 23.33 [#]	5.18 ± 0.33 [#]
NBV 灌胃组 Oral-NBV group	226.40 ± 138.97	4.57 ± 1.24
T1L 滴鼻组 Int-T1L group	291.77 ± 12.32 [*]	4.37 ± 0.34 [*]
T1L 灌胃组 Oral-T1L group	201.97 ± 61.68	4.12 ± 0.91

注:与 Control 组相比, $^*P < 0.05$;与 oral-NBV 组相比, $^{\#}P < 0.05$ 。
Note. Compared with control groups, $^*P < 0.05$. Compared with oral-NBV groups, $^{\#}P < 0.05$.

等级丰度曲线(rank abundance curve)宽度反映物种丰度,平缓程度反映均匀性。结果显示,对照组小鼠肠道微生物丰度和均匀性最高,而 NBV、T1L 灌毒后都有所降低(见图 4)。

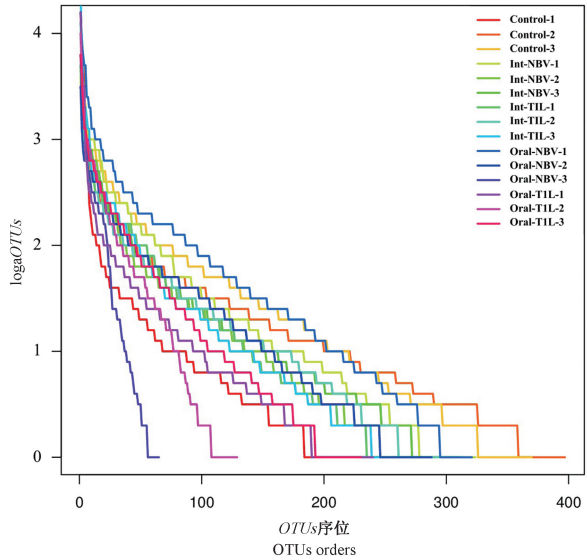


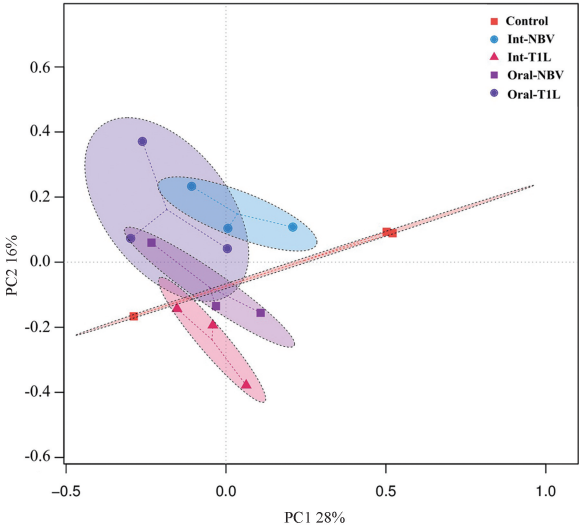
图 4 小鼠菌群的等级丰度曲线

Figure 4 Rank abundance curve of mouse flora

2.4 Beta 多样性分析

Beta 多样性是对 Bray Curits、Unweighted UniFrac、Weighted UniFrac 多变量综合统计,探讨多个样品间是否具有显著群落差异。作为 Beta 多样性降维方式的一种,主坐标分析(PCoA 分析)是从任意尺度寻找差异大小,点之间的距离越近,代表物种组成越相似。结果显示,各组点都较集中,其中 NBV 滴鼻组和对照组有明显分界线;此外,NBV 滴鼻组和灌胃组之间相距甚远区分鲜明,说明 NBV 灌毒对菌群产生了影响。总的来看,NBV 滴鼻能明

显改变小鼠微生物群落的结构(见图 5)。



注:横纵坐标代表样品间差异程度最大的代表性值。

图 5 基于 Bray Curtis 距离的 PCoA 分析

Note. The abscissa and ordinate represent the representative value with the largest difference between samples.

Figure 5 PCoA analysis based on Bray Curtis distance

2.5 粪便物种群落结构分析

从门级别的分布情况来看,共检测出 9 种主要细菌门类,厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)位列前三。与对照组相比,T1L、NBV 灌胃组的厚壁菌门丰度减少,NBV 灌胃组的变形菌门丰度显著增加,T1L、NBV 滴鼻组的拟杆菌门丰度减少。与 NBV 灌胃组相比,NBV 滴鼻组变形菌门的含量显著降低;与 T1L 灌胃组相比,T1L 滴鼻组拟杆菌门的含量显著降低($P < 0.05$)(见图 6)。同样,从门级别的相应热图也显示一致结果(见图 7)。

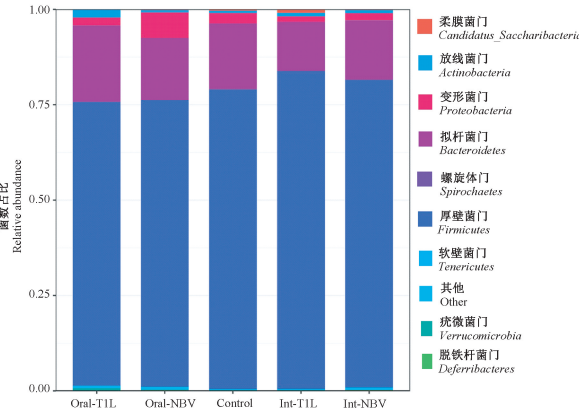


图 6 门级别上物种的相对丰度柱状图

Figure 6 Histogram of relative abundance of species at phylum level

从属级别的分布情况来看,与对照组相比,灌毒后的乳酸菌属(*Lactobacillus*)丰度显著增加,T1L 滴鼻组的别样杆菌属(*Alistipes*)丰度显著增加,NBV 灌胃组的瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)丰度显著增

加,T1L 滴鼻组、T1L 灌胃组和 NBV 灌胃组的罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)丰度显著降低($P < 0.05$)(见图 8)。同样,从属级别的相应热图也显示一致结果(见图 9)。

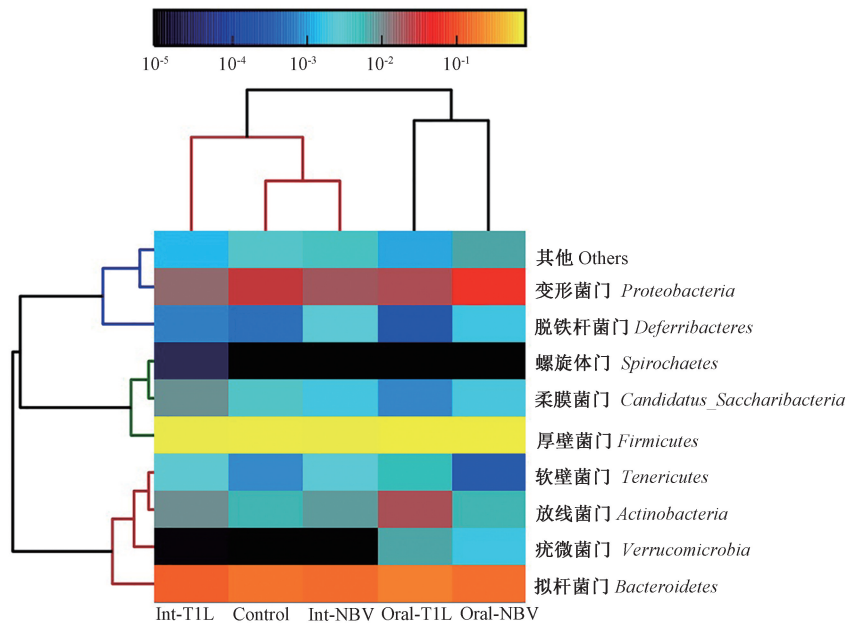


图 7 门级别上物种的相对丰度热图

Figure 7 Heat map of relative abundance of species at phylum level

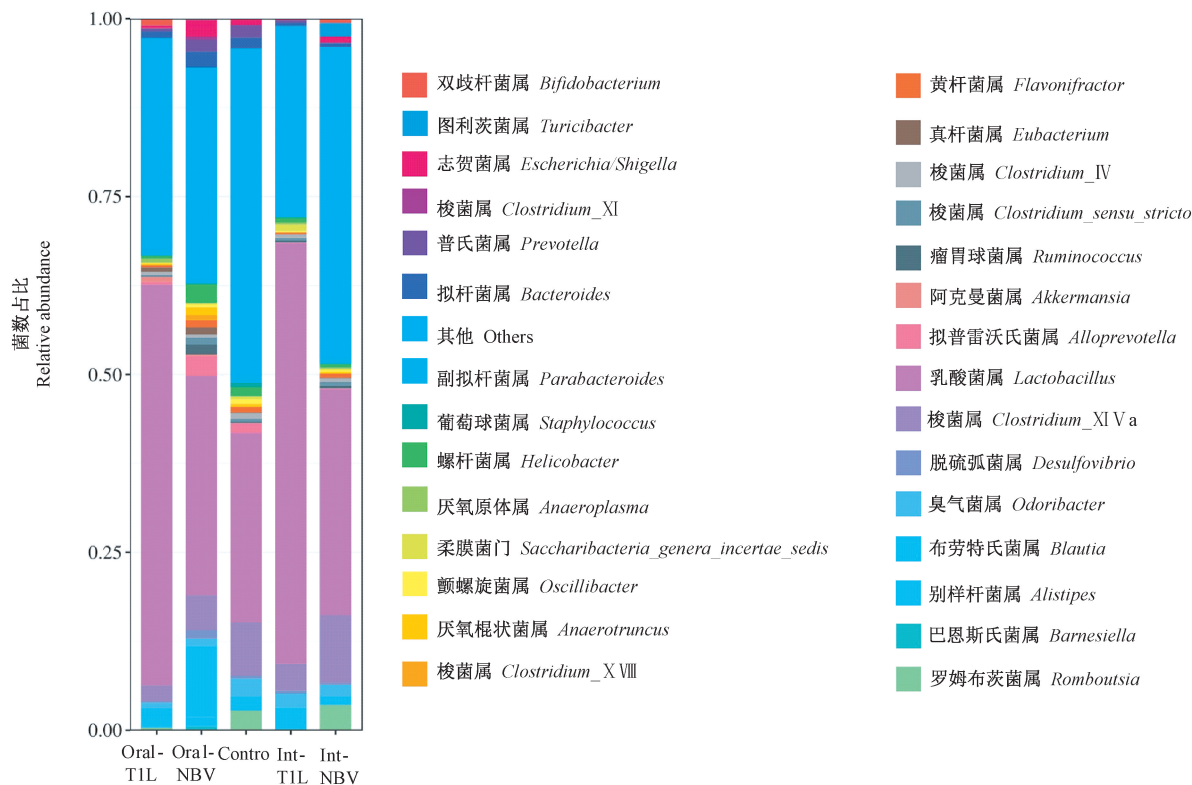


图 8 属级别上物种的相对丰度柱状图

Figure 8 Histogram of relative abundance of species at genus level

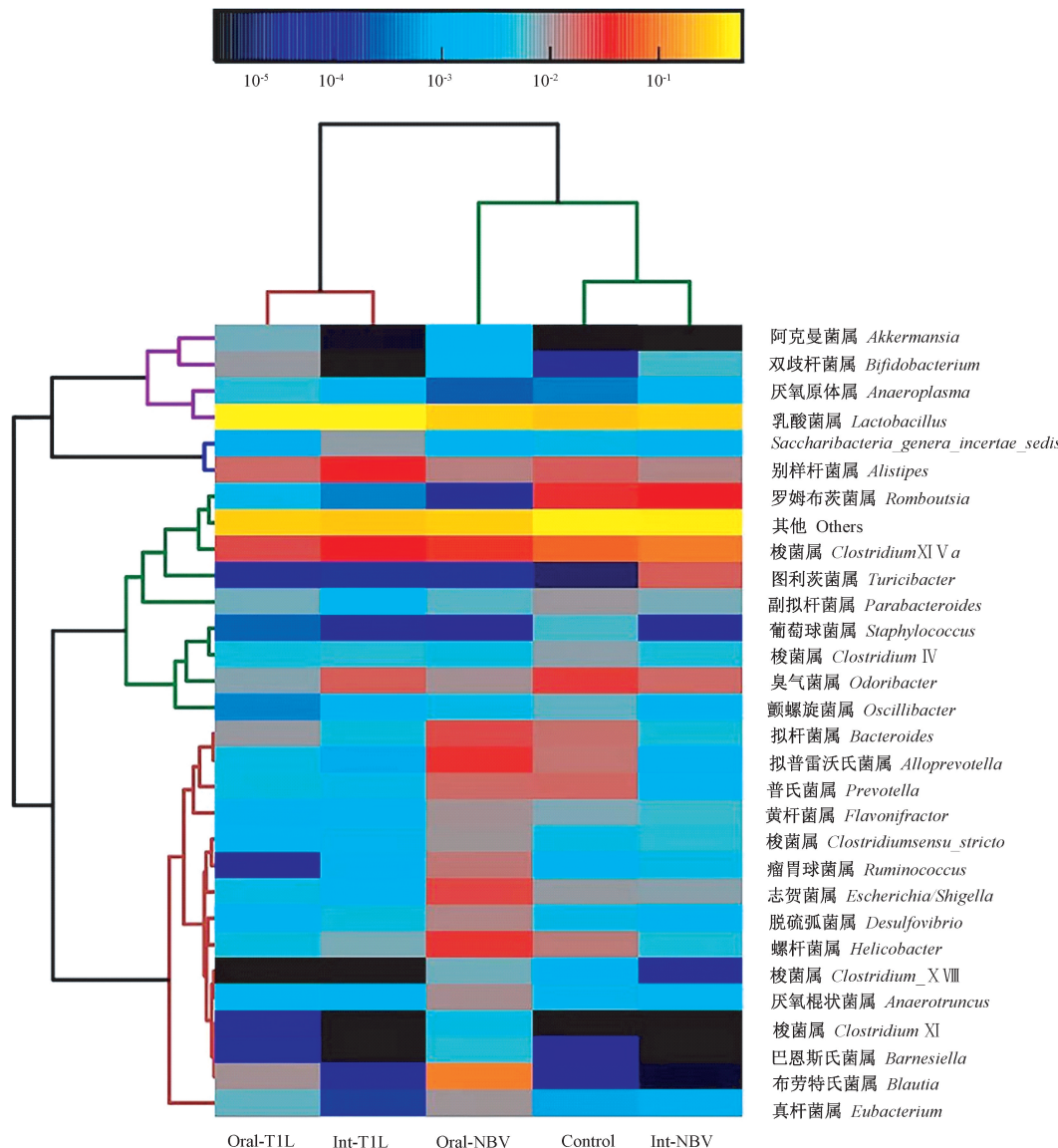


图 9 属级别上物种的相对丰度热图

Figure 9 Heat map of relative abundance of species at genus level

3 讨论

肠道菌群维系着机体稳态,是不可小觑的“天然屏障”。通过寄居在与外界相通的呼吸道或肠道粘膜表面,细菌之间或细菌与环境之间形成了一种特殊的共生关系,且相对平衡^[12]。若共生关系失衡,庞大的微生物群落会发挥独特作用,从而周而复始地保护免疫系统及相关器官,让机体处于健康状态^[13]。因此,肠道菌群的相对稳定及其与宿主间形成的相互依存关系显得极为重要。

T1L 和 NBV 都可经呼吸道和消化道感染宿主,诱发咳嗽、肺炎、腹泻、发热等炎症反应^[14]。研究表明,病毒在气管表面首次增殖,能够破坏呼吸道菌

群平衡,刺激细胞趋化因子生成,进而影响消化系统正常功能^[15-16]。Chen 等^[17]发现,呼肠孤病毒感染会改变肠道菌群,主要表现在有益细菌的损失和致病菌的代偿性增多,这可能是肠道病变的主要原因,但具体机制尚未阐明。本次研究透过 16S rRNA 测序技术,展现了经 T1L 和 NBV 感染后小鼠肠道微生物丰度和多样性都有所降低,是菌群紊乱的潜在因素;其中,经呼吸道感染 T1L 对肠道菌群的影响最为显著。从门的级别上,厚壁菌等有益细菌在病毒感染后有所减少,而变形菌等机会致病菌被认为是大肠杆菌侵袭力增加的促进因素,它在 NBV 经胃肠道感染后显著增加;从属的级别上,别样杆菌增加可能导致哺乳动物发生肠道炎症,提示 T1L 经消

化道感染会大大增强此菌的危害^[18-20]。另一方面,感染方式不同,小鼠的肠道微生物群落也表现出差异。Bassis 等^[21]已经发现,病原微生物经口鼻摄入可直达胃肠道和呼吸道上皮,而且胃肠道病原体也可经肠胃-食管逆流至下呼吸道;尚且 NBV 作为一种既可经胃肠道又可经呼吸道侵入的呼肠孤病毒,通过呼吸道感染会大大增加对正常微生物定植的威胁^[22]。基于前人勘究及本次实验研究,初步推测 NBV 经呼吸道感染比消化道更能改变菌群的丰度和多样性,可能对宿主微生态平衡的破坏力更强,但具体机制还有待深入研究。

综上,T1L 和 NBV 两种呼肠孤病毒感染均可致小鼠肠道菌群紊乱,主要表现在丰度和多样性减低,且机会致病菌富集。此外,病毒的感染方式不同也会导致肠道菌群的结构不同,优势菌种呈现明显差异。因此,从肠道菌群的角度出发,抗病毒药物如何能够在发挥药效的同时维护微生态的平衡,将是未来思考的一大课题。

参 考 文 献 (References)

- [1] Shirvani Rad S, Nikkiah A, Orvatinia M, et al. Gut microbiota: a perspective of precision medicine in endocrine disorders [J]. J Diabetes Metab Disord, 2020, 19(2): 1827-1834.
- [2] Serrano D, Pozzi C, Guglietta S, et al. Microbiome as mediator of diet on colorectal cancer risk: the role of vitamin D, markers of inflammation and adipokines [J]. Nutrients, 2021, 13(2): 363.
- [3] Jin M, Qian Z, Yin J, et al. The role of intestinal microbiota in cardiovascular disease [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(4): 2343-2350.
- [4] Mangiola F, Nicoletti A, Gasbarrini A, et al. Gut microbiota and aging [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(21): 7404-7413.
- [5] Zhang J, Zhang J, Wang R. Gut microbiota modulates drug pharmacokinetics [J]. Drug Metab Rev, 2018, 50(3): 357-368.
- [6] Duncan R, Corcoran J, Shou J, et al. Reptilian reovirus: a new fusogenic orthoreovirus species [J]. Virology, 2004, 319(1): 131-140.
- [7] Zhang X, Lei X, Ma L, et al. Genetic and pathogenic characteristics of newly emerging avian reovirus from infected chickens with clinical arthritis in China [J]. Poult Sci, 2019, 98(11): 5321-5329.
- [8] Teng L, Xie Z, Xie L, et al. Sequencing and phylogenetic analysis of an avian reovirus genome [J]. Virus Genes, 2014, 48(2): 381-386.
- [9] Brown JJ, Short SP, Stencel BJ, et al. Reovirus-induced apoptosis in the intestine limits establishment of enteric infection [J]. J Virol, 2018, 92(10): e02062-e02079.
- [10] Tao XL, Zhao W, Tong W, et al. The effects of autophagy on the replication of Nelson Bay orthoreovirus [J]. Virol J, 2019, 16(1): 90.
- [11] Forrest JC, Campbell JA, Schelling P, et al. Structure-function analysis of reovirus binding to junctional adhesion molecule 1. Implications for the mechanism of reovirus attachment [J]. J Biol Chem, 2003, 278(48): 48434-48444.
- [12] Schoeler M, Caesar R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2019, 20(4): 461-472.
- [13] Nishida A, Inoue R, Inatomi O, et al. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. Clin J Gastroenterol, 2018, 11(1): 1-10.
- [14] Kim M, Chung YH, Johnston RN. Reovirus and tumor oncolysis [J]. J Microbiol, 2007, 45(3): 187-192.
- [15] Aguirre de Cárcer D, Hernández B, Rastrojo A, et al. Infection with diverse immune-modulating poxviruses elicits different compositional shifts in the mouse gut microbiome [J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173697.
- [16] Deriu E, Boxx GM, He XS, et al. Influenza virus affects intestinal microbiota and secondary salmonella infection in the gut through type I interferons [J]. PLoS Pathog, 2016, 12(5): e1005572.
- [17] Chen X, Zheng M, Huang M, et al. Muscovy duck reovirus infection disrupts the composition of intestinal microbiota in muscovy ducklings [J]. Curr Microbiol, 2020, 77(5): 769-778.
- [18] Xu H, Wei Y, Ma H, et al. Alterations of gut microbiome in the patients with severe fever with thrombocytopenia syndrome [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 2315.
- [19] 曲巍, 张智, 马建章, 等. 高通量测序研究益生菌对小鼠肠道菌群的影响 [J]. 食品科学, 2017, 38(1): 214-219.
- Qu W, Zhang Z, Ma JZ, et al. Effect of probiotics on gut microbiota in mice evaluated by high-throughput sequencing [J]. Food Sci, 2017, 38(1): 214-219.
- [20] Becker C, Neurath MF, Wirtz S. The intestinal microbiota in inflammatory bowel disease [J]. ILAR J, 2015, 56(2): 192-204.
- [21] Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals [J]. mBio, 2015, 6(2): e00037.
- [22] Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens [J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(11): 790-801.

[收稿日期] 2021-03-01