

杨宏,张振,付旭锋. 来曲唑诱导大鼠多囊卵巢综合征模型的肠道菌群分析[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(5): 585-591.
YANG H, ZHANG Z, FU X F. Gut microbiota in a rat model of polycystic ovary syndrome induced by letrozole [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(5): 585-591.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.05.005

来曲唑诱导大鼠多囊卵巢综合征模型的肠道菌群分析

杨宏,张振,付旭锋*

(宁夏医科大学生育力保持教育部重点实验室,银川 750004)

【摘要】目的 探讨来曲唑(雌激素合成抑制剂)是否会对多囊卵巢综合征患者的肠道微生物群的组成、多样性和丰度有影响。**方法** 利用来曲唑诱导并构建了 PCOS 大鼠模型,通过 16S rRNA 的测序方法分析了正常和 PCOS 大鼠模型的肠道菌群结构。**结果** 在门水平,PCOS 组的厚壁菌门($73.29\% \pm 5.34\%$ vs. $77.17\% \pm 4.01\%$)的丰度较正常组降低,拟杆菌门($23.85\% \pm 6.22\%$ vs. $17.21\% \pm 6.90\%$)的丰度增加。在属水平,PCOS 的罗氏菌属($5.61\% \pm 3.20\%$ vs. $16.13\% \pm 6.20\%$)和苏黎世杆菌属($1.75\% \pm 2.23\%$ vs. $9.98\% \pm 7.34\%$)的丰度较正常组降低,而乳杆菌属($18.83\% \pm 11.50\%$ vs. $15.88\% \pm 7.06\%$)、普雷沃氏菌属($4.58\% \pm 1.09\%$ vs. $0.46\% \pm 0.15\%$)和瘤胃球菌属($2.97\% \pm 1.56\%$ vs. $1.16\% \pm 0.60\%$)的丰度增加,进一步分析了两组差异菌群的 KEGG 信号通路,结果显示 PCOS 大鼠模型的肠道内胆酸生物合成相关的信号通路发生了变化。**结论** 来曲唑灌胃构建的 PCOS 大鼠模型的肠道菌群结构明显发生紊乱,并且可能与胆酸生物合成相关的信号通路有关。

【关键词】 多囊卵巢综合征;肠道微生物;16S rRNA 测序;厚壁菌门;拟杆菌门;胆酸生物合成

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 05-0585-07

Gut microbiota in a rat model of polycystic ovary syndrome induced by letrozole

YANG Hong, ZHANG Zhen, FU Xufeng*

(Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance of Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Corresponding author: FU Xufeng. E-mail: fuxufeng100@163.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of the estrogen synthesis inhibitor letrozole on the composition, diversity, and abundance of the intestinal microbiota in rats with polycystic ovary syndrome (PCOS). **Methods** A rat model of PCOS was induced using the estrogen synthesis inhibitor letrozole. The gut microbiota structures of normal and PCOS rats were analyzed 16S rRNA sequencing. **Results** At the phylum level, rats in the PCOS group had a lower abundance of *Firmicutes* ($73.29\% \pm 5.34\%$ vs. $77.17\% \pm 4.01\%$) and a higher abundance of *Bacteroidetes* ($23.85\% \pm 6.22\%$ vs. $17.21\% \pm 6.90\%$) compared with the normal group. At the genus level, the abundances of *Rochella* ($5.61\% \pm 3.20\%$ vs. $16.13\% \pm 6.20\%$) and *Zurichella* ($1.75\% \pm 2.23\%$ vs. $9.98\% \pm 7.34\%$) were lower in the PCOS group than in the normal group, but the abundances of *Lactobacillus* ($18.83\% \pm 11.50\%$ vs. $15.88\% \pm 7.06\%$), *Prevotella* ($4.58\% \pm 1.09\%$ vs. $0.46\% \pm 0.15\%$), and *Ruminococcus* ($2.97\% \pm 1.56\%$ vs. $1.16\% \pm 0.60\%$) were increased. Analysis of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes signaling pathways of the differentially expressed bacteria showed

【基金项目】 国家自然科学基金(81960270)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81960270).

【作者简介】 杨宏,男,在读硕士研究生,研究方向:生殖损伤与修复。Email:1124659403@qq.com

【通信作者】 付旭锋,男,副教授,硕士生导师,研究方向:生殖损伤与修复。Email:fuxufeng100@163.com

that signaling pathways related to bile acid biosynthesis in the intestine were changed in the PCOS rat model. **Conclusions** The structure of intestinal flora in PCOS rat model constructed by intragastric administration of letrozole is significantly disordered, which may be related to the signaling pathways related to bile acid biosynthesis.

【Keywords】 polycystic ovary syndrome; gut microbiota; 16S rRNA sequencing; *Firmicutes*; *Bacteroidetes*; bile acid biosynthesis

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

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种常见的内分泌疾病, 在育龄女性中的患病率约为 6% ~ 10%^[1]。PCOS 患者常伴有多种临床特征, 包括胰岛素分泌异常、相对促性腺激素比值和排卵功能异常等症状^[2]。女性激素的紊乱会影响卵巢功能, 并且雄性激素升高也是 PCOS 患者的主要特征^[3]。虽然研究表明, 环境、遗传和激素是诱发 PCOS 发生发展的重要因素, 但由于 PCOS 的临床异质性特征, 其病因仍不清楚^[4]。因此, 解决这些关键问题仍是巨大的挑战^[5]。

肠道菌群通过调节宿主的代谢和生理功能, 为宿主保证营养平衡和能量代谢, 进而维持内稳态的平衡。近年来, 有大量研究探讨 PCOS 与肠道菌群变化的关系^[6]。有研究表明, PCOS 患者的肠道菌群存在显著的失衡, 并且肠道菌群结构发生明显改变, 如拟杆菌门和厚壁菌门的比例失衡^[7-8]。为了解高雄激素对 PCOS 肠道微生物的影响, 本研究利用雌激素合成的芳香化酶抑制剂来曲唑灌胃构建 PCOS 大鼠模型, 采用 16S rRNA 测定大鼠粪便微生物, 并对肠道菌群和机体的潜在影响进行了分析, 这一研究为 PCOS 的诊断与治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

10 只 6 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠, 体重约为 180 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】。饲养期间各组大鼠自由饮食饲料和饮水, 饲养环境: 昼夜各半循环照明, 湿度恒定在 35% ~ 65%, 温度控制在 22 ~ 25 ℃, 饲养于宁夏医科大学实验动物中心【SYXK(宁)2020-0001】。所有治疗和动物护理程序均按照宁夏医科大学医学伦理委员会 (NXMU-2018-088) 批准的动物操作指南进行。

1.1.2 主要试剂与仪器

来曲唑 (恒瑞药业股份有限公司, 中国), 羧甲基纤维素钠 (北京索莱宝科技有限公司, 中国),

DNA 提取试剂盒 (Omega Bio-Tek, Norcross)。Nanodrop2000 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific), Qubit R 2.0 荧光仪 (Life Technologies, CA)。

1.2 方法

1.2.1 分组

实验前连续 2 个周期进行阴道涂片检查, 确认大鼠动情周期正常。将大鼠随机分为对照组 ($n = 5$) 和 PCOS 组 ($n = 5$)。PCOS 组给予来曲唑的羧甲基纤维素钠混悬液灌胃, 剂量为 1 mg/kg, 每天 1 次, 连续灌胃 21 d。对照组灌胃等剂量的羧甲基纤维素钠。诱导造模 21 d 后, 观察到大鼠动情周期紊乱, 睾酮、雌二醇增高, 以及包膜下囊肿形成, 包膜厚度增加, 黄体减少, 闭锁和囊性卵泡增多, 确定 PCOS 模型构建成功。收集每只大鼠的粪便 (> 200 mg), 放入无菌样品管中, 液氮速冻后置于 -80 ℃ 超低温冰箱保存。模型构建及鉴定已在前期研究有详细叙述^[9]。

1.2.2 基因组 DNA 提取及 16S rRNA 测序

采用 16S rRNA 基因测序分析小鼠粪便中的肠道微生物群组成。根据制造商的说明, 使用 DNA 提取试剂盒从每个粪便样本中分离和纯化微生物基因组 DNA。使用 Nanodrop 2000 分光光度计和 Qubit R 2.0 荧光仪测定 DNA 的完整性和浓度。利用特异引物扩增微生物基因组 DNA 中细菌 16S rRNA 基因的 V3 ~ V4 区。采用 Illumina Hiseq 2500 平台, 按照诺禾致源科技有限公司提供的标准方案对等摩尔浓度的聚合酶链反应 (PCR) 产物进行纯化、定量和测序。

1.3 统计学分析

基于 Deblur 算法建立扩增序列变体 (Amplicon Sequence Variant, ASV) 的特征表和特征序列, 利用在线平台 (Majorbio Biotech Co., Ltd) 和通过 QIIME 生物信息学平台进行质量筛选和过滤, 获得高质量序列。 α 多样性分析, 包括 Shannon 指数曲线和 OTUs 稀释曲线, 测量了基于最低 97% 的序列确定的精细化操作分类单元的物种丰富度。采用主坐标分析 (PCoA) 和非度量多维尺度 (NMDS) 进行群落分布

相似性的 β 多样性分析,通过分析不同样本群落组成的差异,揭示样本间的差异和距离。采用线性判别分析效应量(LEfSe)分析两组间门和属水平的显著性差异。基于过滤和筛选后的高质量序列,利用 PICRUS_t 软件预测了微生物的功能。首先根据已测微生物基因组的 16S rRNA 基因全长序列与 Greengenes 数据库比对,然后构建全谱系的基因功能预测谱,从而实现对菌群 KEGG 代谢功能的预测^[10]。

2 结果

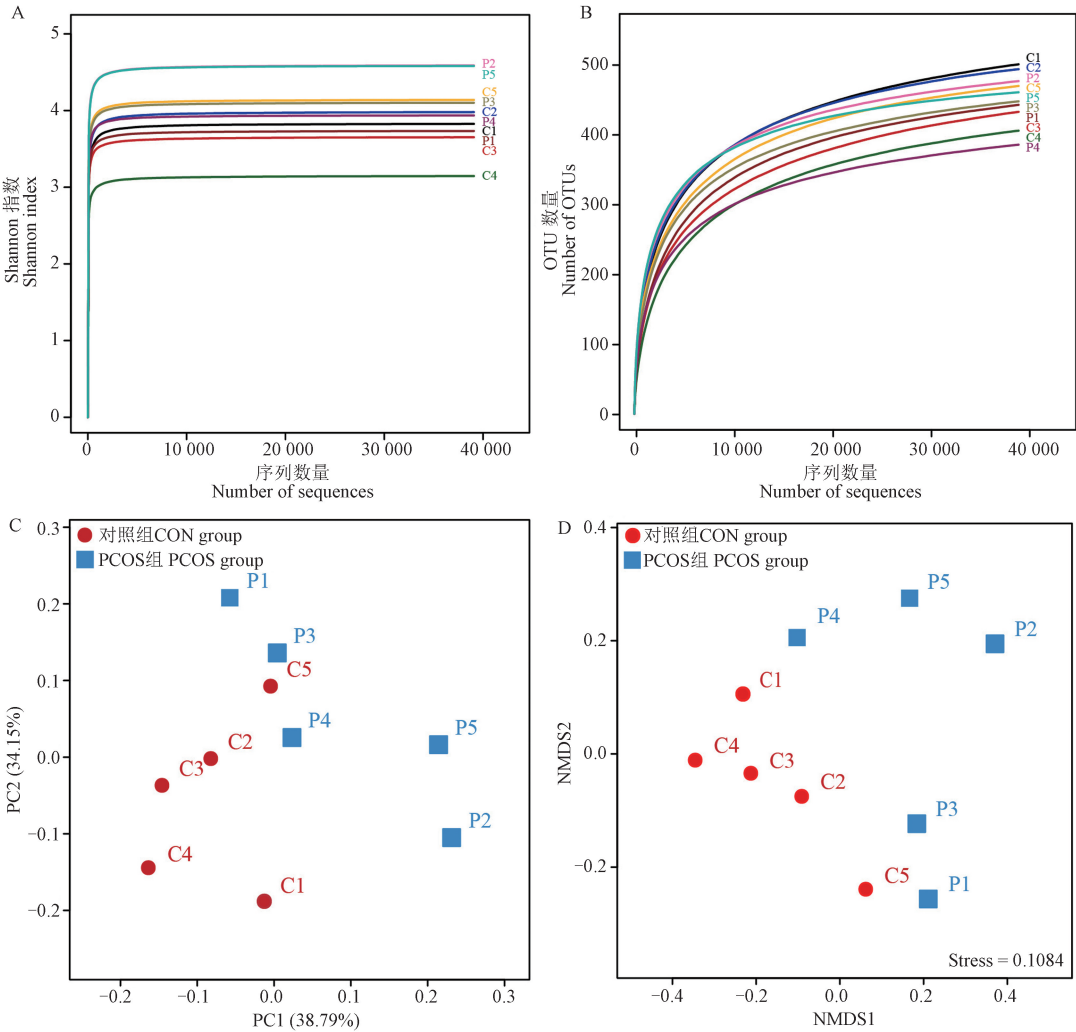
2.1 菌群结构的 α 多样性分析和 β 多样性分析

通过 PCOS 模型的构建及鉴定^[9],收集两组粪便进行 16S rRNA 检测和生信分析。利用 Shannon 指数曲线和 OTUs 稀释曲线进行 α 多样性分析,结

果显示对照组和 PCOS 组的肠道微生物群丰富度无显著性差异,但 Shannon 指数曲线和稀释曲线随着样本数的增加逐步趋于渐近线(图 1A,1B),说明可以反映样品中绝大多数的微生物物种信息。采用主坐标分析(PCoA)和非度量多维尺度(NMDS)进行群落分布相似性的 β 多样性分析,结果显示对照组和 PCOS 组簇明显分离(图 1C,1D),这表明两组的肠道微生物群结构表现出显著性差异。

2.2 肠道菌群结构比较

在门水平,对照组和 PCOS 组的肠道微生物群主要富集在厚壁菌门($77.17\% \pm 4.01\%$ vs. $73.29\% \pm 5.34\%$)、拟杆菌门($17.21\% \pm 6.90\%$ vs. $23.85\% \pm 6.22\%$)、变形菌门($2.74\% \pm 3.50\%$ vs. $1.11\% \pm 0.41\%$)和软壁菌门($1.17\% \pm 0.38\%$ vs.



注:A:Shannon 指数;B:OTU 数量;C:主成分分析;D:非度量多维尺度分析。

图 1 对照组和 PCOS 组大鼠肠道菌群的 α 多样性和 β 多样性分析

Note. A. Shannon index. B. Number of OTUs. C. Principal component analysis. D. Non-metric multidimensional scaling.

Figure 1 Analysis of α diversity and β diversity of the gut microbiota in CON group and PCOS group rats

0.89% ± 0.42%), 总丰度分别为 98.28% 和 99.15%(图 2A)。在属水平上,丰富度 0.1% 以上的有 22 个属级单元,总丰度分别占正常大鼠和 PCOS 大鼠肠道菌群的 90.13% 和 85.52%, 两组的肠道微生物群主要富集在乳杆菌属(15.88% ± 7.06% vs. 18.83% ± 11.50%), 拟杆菌属 S24-7(14.19% ± 5.18% vs. 16.59% ± 2.83%), 罗氏菌属(16.13% ± 6.20% vs. 5.61% ± 3.20%), 毛螺菌属(3.28% ± 1.40% vs. 8.46% ± 6.20%), 苏黎世杆菌属(9.98% ± 7.34% vs. 1.75% ± 2.23%)(图 2B)。这些结果说明来曲唑诱导 PCOS 模型的肠道菌群结构明显改变。

2.3 肠道菌群的差异热图

门水平上的差异热图显示,共筛选出 10 个差异菌门,分别是厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、软壁菌门、放线菌门、螺旋菌门、蓝藻门、原 TM7 门、迷踪菌门和疣微菌门。其中,PCOS 组的厚壁菌门和拟杆菌门最丰富,而迷踪菌门和疣微菌门丰度最小。与正常组相比,PCOS 组拟杆菌门、蓝藻门、原 TM7 门和疣微菌门的丰度增加,而厚壁菌门、变形菌门、软壁菌门、放线菌门、螺旋菌门和迷踪菌门的丰度降低(图 3A)。属水平上的差异热图显示,共筛选出 100 个差异菌属,Top10 的分别是:乳杆菌属、拟杆菌属 S24-7、罗氏菌属、毛螺菌属、苏黎世杆菌属、瘤胃球菌属 UCG-014、异杆菌属、毛螺菌科 NK4A136、梭菌属和普雷沃菌属 UCG-001。与正常组相比,PCOS 组的乳杆菌属、拟杆菌属 S24-7、毛螺菌属、普雷沃菌属 UCG-001、毛螺菌科 NK4A136 和

瘤胃球菌属 UCG-014 的丰度增加,而罗氏菌属、苏黎世杆菌属、异杆菌属和梭菌属的丰度降低(图 3B)。这些结果表明来曲唑诱导 PCOS 模型的肠道菌群丰度明显改变。

2.4 差异菌群的 LEfSe 分析

LEfSe 分析是一种发现和解释高纬度数据生物标识(分类单元、通路、基因)的分析工具,可以实现两个或者多个分组之间的比较,从而找到组间在丰度上具有显著性差异的物种。所以采用 LEfSe 分析,研究结果显示正常大鼠和 PCOS 大鼠的肠道微生物群中,有 31 个类群的丰度具有显著性差异,其中 PCOS 组的肠道微生物群中的消化球菌科、瘤胃球菌属 UCG-009 和普雷沃菌科的丰富度显著高于正常大鼠,而消化链球菌科、厚壁菌门、双歧杆菌、迷踪菌门、柯林斯菌属、真杆菌属、螺旋体、密螺旋体属、经黏液真杆菌属、丹毒丝菌科和苏黎世杆菌属显著低于正常大鼠(图 4)。这些研究结果表明来曲唑诱导 PCOS 模型的肠道菌群丰度具有显著性差异。

2.5 差异菌群的 KEGG 富集分析

对差异肠道微生物群进行 KEGG 信号通路功能富集分析,结果显示,与正常组相比,PCOS 组的肠道微生物改变影响到的信号通路有:钴酸盐 a, C-二胺 I 的腺苷钴胺素生物合成、从钴胺酰胺 II 中提取的腺苷钴胺素、霉菌酸酯生物合成、腺苷钴胺素与钴胺 I、磷酸盐生物合成 I、丝氨酸和甘氨酸生物合成超途径 I、(5Z)-十二烷-5-烯酸酯生物合成生物合成、脂肪酸生物合成起始的超病理、棕榈油

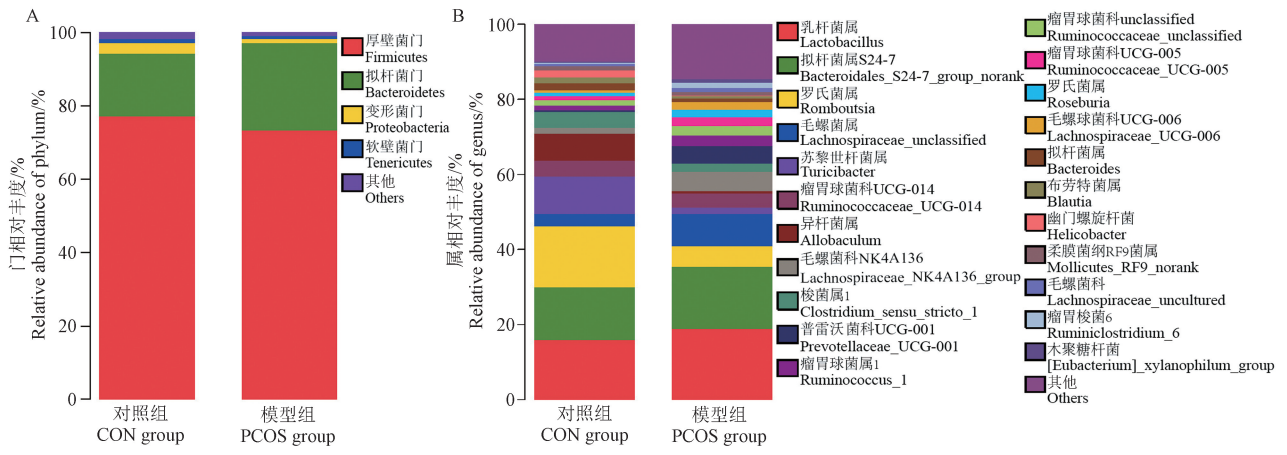
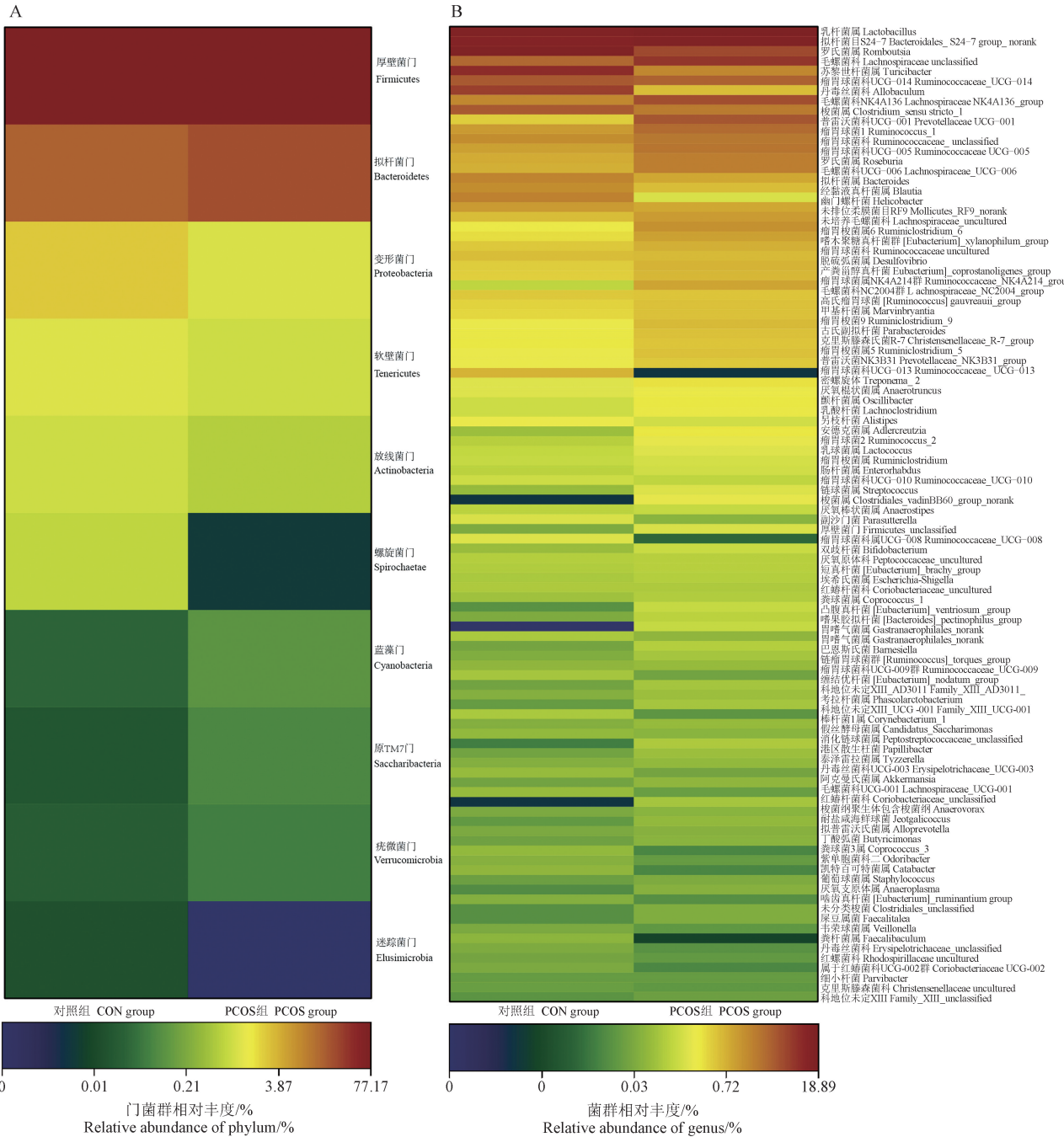


图 2 对照组和 PCOS 组大鼠肠道菌群的相对丰度

Note. A. Phylum level. B. Genus level. Figure 2 Relative abundance of gut microbiota in CON group and PCOS group rats



注:A:门水平;B:属水平。

图 3 对照组和 PCOS 组相对丰度的肠道菌群差异热图

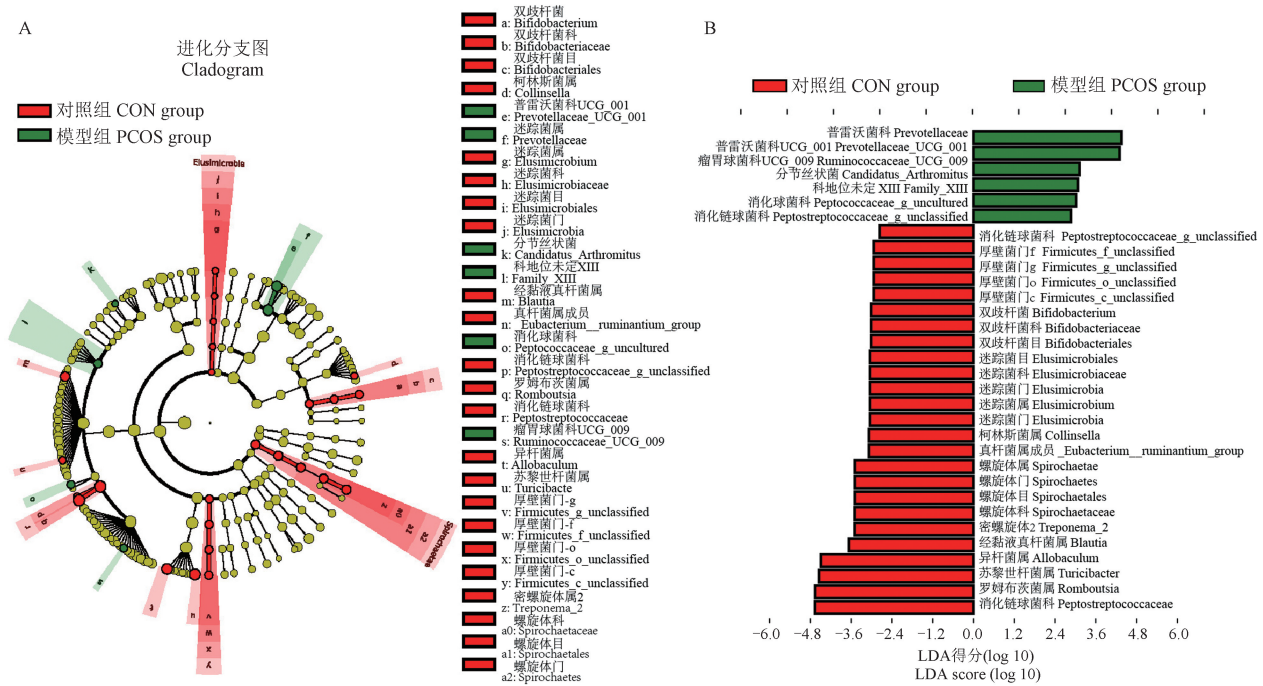
Note. A. Phylum level. B. Genus level.

Figure 3 Heat map of gut microbiota difference in relative abundance between CON group rats and PCOS group rats

酸生物合成、硬脂酸合成Ⅱ、油酸生物合成Ⅳ、棕榈酸酯合成Ⅱ、血红素生物合成Ⅰ、来自谷氨酸的血红素生物合成的超途径、6-羟甲基二氢蝶呤二磷酸生物合成Ⅰ和甘油降解为丁醇等(图5)。这些结果表明,来曲唑诱导PCOS模型肠道菌群的结构改变可能通过上述通路影响机体功能。

3 讨论

PCOS是育龄期女性最常见的生殖内分泌代谢性疾病,其主要特征雄激素过高与代谢失调有关,而激素水平与肠道菌群变化密切相关,因此肠道菌群结构紊乱可能是导致PCOS的重要因素^[4]。本研



注:A:进化分支图;B:LDA 值分布柱状图。

图 4 对照组和 PCOS 组大鼠差异菌群的 LEfSe 分析

Note. A. Phylogenetic tree. B. Bar graph of LDA value distribution.

Figure 4 LEfSe analysis of the differential flora between CON group and PCOS group rats

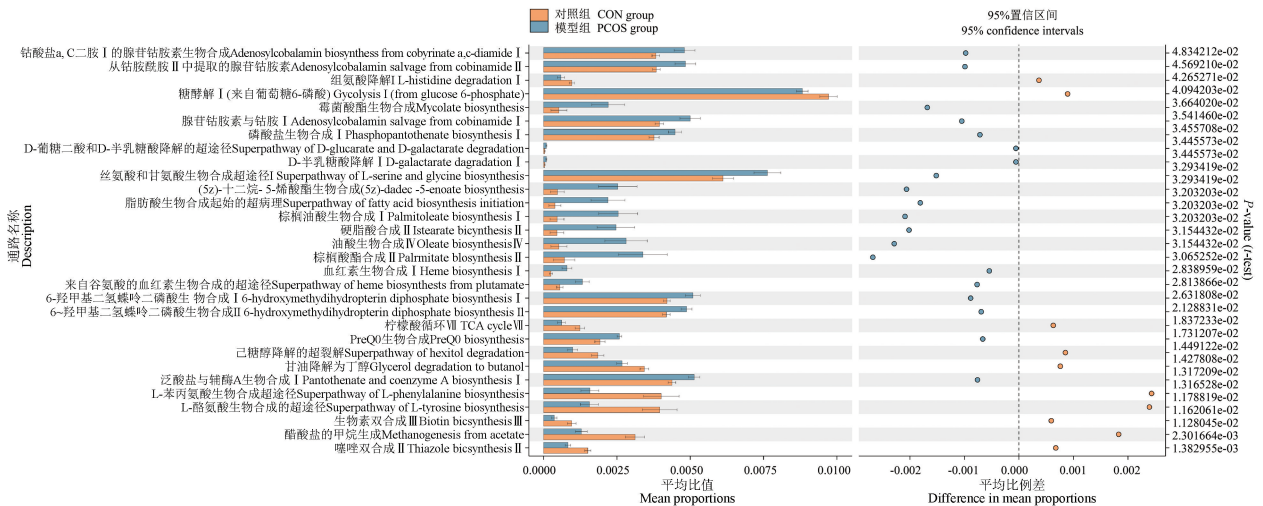


图 5 KEGG 富集预测图

Figure 5 KEGG enrichment prediction map

究发现,在 PCOS 模型大鼠中, α 多样性分析无显著性差异,但 β 多样性分析后菌群丰度有显著变化,这可能是由于样本量小且肠道微生物组个体间变异性较高所致。人类肠道微生物群主要由两个门类组成,即厚壁菌门和拟杆菌门^[11]。有报道指出与正常组相比,PCOS 组中厚壁菌门的相对丰度显著下降^[8]。拟杆菌门参与人体中许多重要的代谢活动,包括胆汁酸和其他类固醇的生物转化等^[12],

PCOS 患者的肠道拟杆菌丰度的显著升高。也有研究报道,与正常大鼠相比,低有氧能力的卵巢切除大鼠,拟杆菌丰度增加,厚壁菌丰度减少,这提示肠道菌群结构可能和雌激素合成密切相关^[13]。本研究有相似的结果,与对照组相比,在 PCOS 组大鼠中,厚壁菌丰度显著减少,而拟杆菌丰度显著增加。

PCOS 的病因复杂且发病机制仍不明确,但与

肠道菌群的改变存在紧密的相关性。本研究中 PCOS 大鼠在属水平上的有益菌丰度减少,如罗氏菌属和苏黎世杆菌属。苏黎世杆菌属可作为肠道益生菌通过多糖物质的影响进而调节糖脂代谢^[14],对稳定肠道屏障和新陈代谢也起到了至关重要的作用^[15]。同时,PCOS 大鼠还表现为普雷沃菌属和瘤胃球菌属丰度增加。其中,普雷沃菌的丰度增加会导致代谢紊乱,减少 IL-18 的产生并加剧肠道炎症,从而发生低级别全身性炎症以及细菌性阴道疾病^[16-17]。这些研究提示 PCOS 的发生与普雷沃菌引起的炎症密切相关。有研究表明,肠道菌群紊乱引起的胆汁酸代谢异常与 PCOS 的发生发展密切相关^[18]。本研究中通过肠道菌群的变化富集到的信号通路发现,来曲唑诱导的 PCOS 大鼠模型肠道菌群显著富集到脂肪酸生物合成、(5Z)-十二烷-5-烯酸酯生物合成、棕榈油酸生物合成、硬脂酸合成 II、油酸生物合成 IV、棕榈酸酯合成 II 和甘油降解为丁醇信号通路,这些通路都属于脂肪酸代谢,并且和胆汁酸代谢途径都有紧密的联系。这提示来曲唑诱导的 PCOS 大鼠模型的肠道菌群可能是由胆汁酸代谢途径相关信号通路进行调控的。

本研究采用雌激素合成的芳香化酶抑制剂来曲唑灌胃构建 PCOS 大鼠模型,发现 PCOS 大鼠模型的肠道菌群结构明显发生紊乱。这一研究能够更好地模拟 PCOS 患者的高雄激素的症状,这为临床通过调节肠道菌群治疗 PCOS 具有一定的参考。然而,由于人类的饮食和生活规律极其复杂,很难在动物模型上反应出人类的肠道菌群特征,但这些发现可能会为后续的 PCOS 诊断和治疗研究提供科学依据。

参 考 文 献(References)

[1] LI T, ZHANG T, GAO H, et al. Tempol ameliorates polycystic ovary syndrome through attenuating intestinal oxidative stress and modulating of gut microbiota composition-serum metabolites interaction [J]. Redox Biol, 2021, 41: 101886.

[2] CHEN J, ZHOU Q, ZHANG Y, et al. Discovery of novel serum metabolic biomarkers in patients with polycystic ovarian syndrome and premature ovarian failure [J]. Bioengineered, 2021, 12 (1): 8778-8792.

[3] LI G, WANG Y, WANG J, et al. Long non-coding RNA placenta-specific protein 2 regulates micorRNA-19a/tumor necrosis factor α to participate in polycystic ovary syndrome [J]. Bioengineered, 2022, 13(1): 856-862.

[4] ZHENG Y, BIAN Y, WU R, et al. High-throughput sequencing profiles about lncRNAs and mRNAs of ovarian granulosa cells in

polycystic ovary syndrome [J]. Front Med, 2021, 8: 741803.

[5] ZHANG Y, HU M, MENG F, et al. Metformin ameliorates uterine defects in a rat model of polycystic ovary syndrome [J]. EBioMedicine, 2017, 18: 157-170.

[6] RONG P, FU Q, ZHANG X, et al. A bibliometrics analysis and visualization of autism spectrum disorder [J]. Front Psychiatry, 2022, 13: 884600.

[7] ZHANG J, SUN Z, JIANG S, et al. Probiotic *Bifidobacterium lactis* V9 regulates the secretion of sex hormones in polycystic ovary syndrome patients through the gut-brain axis [J]. mSystems, 2019, 4(2): e00017-e00019.

[8] WANG Q, WANG Q, ZHAO L, et al. Blood bacterial 16S rRNA gene alterations in women with polycystic ovary syndrome [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 814520.

[9] XU B, DAI W, LIU L, et al. Metformin ameliorates polycystic ovary syndrome in a rat model by decreasing excessive autophagy in ovarian granulosa cells via the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Endocr J, 2022, 69(7): 863-875.

[10] HAN D, SUN P, HU Y, et al. The immune barrier of porcine uterine mucosa differs dramatically at proliferative and secretory phases and could be positively modulated by colonizing microbiota [J]. Front Immunol, 2021, 12: 750808.

[11] ABDULLA O A, NEAMAH W, SULTAN M, et al. The ability of AhR ligands to attenuate delayed type hypersensitivity reaction is associated with alterations in the gut microbiota [J]. Front Immunol, 2021, 12: 684727.

[12] TONEATTI D M, ALBARRACÍN VH, FLORES M R, et al. Stratified bacterial diversity along physico-chemical gradients in high-altitude modern stromatolites [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 646.

[13] COX-YORK K A, SHEFLIN A M, FOSTER M T, et al. Ovariectomy results in differential shifts in gut microbiota in low versus high aerobic capacity rats [J]. Physiol Rep, 2015, 3 (8): e12488.

[14] KIM J E, LEE J Y, KANG C H. *Limosilactobacillus fermentum* MG4295 improves hyperglycemia in high-fat diet-induced mice [J]. Foods, 2022, 11(2): 231.

[15] PAL D, NASKAR M, BERA A, et al. Chemical synthesis of the pentasaccharide repeating unit of the O-specific polysaccharide from *Ruminococcus gnavus* [J]. Carbohydr Res, 2021, 507: 108384.

[16] FANG X, YUE M, WEI J, et al. Evaluation of the anti-aging effects of a probiotic combination isolated from centenarians in a SAMP8 mouse model [J]. Front Immunol, 2021, 12: 792746.

[17] XU T, YANG D, LIU K, et al. Miya improves osteoarthritis characteristics via the gut-muscle-joint axis according to multi-omics analyses [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 816891.

[18] QI X, YUN C, SUN L, et al. Gut microbiota-bile acid-interleukin-22 axis orchestrates polycystic ovary syndrome [J]. Nat Med, 2019, 25(8): 1225-1233.