

# 基于16S rRNA基因测序技术分析 非酒精性脂肪性肝病大鼠的肠道菌群

李晓玲, 孙凤霞, 张莹雪, 郭雨菲, 门秋爽 (首都医科大学附属北京中医医院 肝病科, 北京 100010)

**摘要:** **目的** 基于16S rRNA基因测序技术分析非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 大鼠的肠道菌群。**方法** 以SPF级SD大鼠为实验对象, 随机分为普通饮食组 (对照组) 和高脂饮食组 (模型组)。高脂饮食组通过进食高脂饲料8周诱发NAFLD模型。8周后检测大鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 和总胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平, 取肝组织进行HE及油红O染色, 采集大鼠新鲜粪便通过高通量测序法对肠道粪便细菌16S rRNA的V3-V4区进行基因测序。利用UPARSE软件进行类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 聚类, 采用RDP Classifier算法对OTU代表序列进行比对分析, 并在门、纲、目、科、属、种等水平上进行注释其群落的物种信息。基于OTU聚类结果, 利用mothur软件和Qimme (V.1.8) 进行Alpha多样性分析和Beta多样性分析, 并通过LEfSe软件进行组间菌落差异分析。**结果** 与正常组相比, 模型组大鼠AST [(23.63 ± 4.82) U/L vs (10.61 ± 1.17) U/L]、ALT [(9.98 ± 2.27) U/L vs (3.40 ± 0.81) U/L]、LDL-C [(0.69 ± 0.11) mmol/L vs (0.34 ± 0.10) mmol/L]、TG [(0.90 ± 0.24) mmol/L vs (0.33 ± 0.13) mmol/L] 及TC [(5.69 ± 0.72) mmol/L vs (2.10 ± 0.42) mmol/L] 水平均显著升高, HDL-C [(0.62 ± 0.14) mmol/L vs (1.07 ± 0.17) mmol/L] 水平显著降低, 差异均有统计学意义 ( $P$ 均< 0.05)。两组共获得2607个OTU, 经过抽平处理后获得2547个OTU, 其中对照组2367个, 模型组2168个, 两组共享OTU为1988个。随样本量增加物种累积曲线趋于平缓, 表明样本量充分。在Alpha多样性指数中, 模型组的香农指数 ( $7.0673 \pm 0.4812$  vs  $6.1695 \pm 0.7165$ )、物种个数 [(968.6250 ± 233.0221) 个 vs (1155.9500 ± 129.0011) 个] 和PD\_Whole\_Tree指数 ( $69.3449 \pm 14.2872$  vs  $82.0219 \pm 10.2012$ ) 显著低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P$ 均< 0.05), Chao1指数也低于对照组 ( $1418.4503 \pm 277.8639$  vs  $1599.1725 \pm 100.1048$ ), 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。采用主成分分析、主坐标分析、层次聚类分析、偏最小二乘法判别分析和非度量多维尺度法等Beta多样性分析方法均能将模型组与对照组大鼠完全区分开来, 进一步说明二者间的菌群有明显区别。采用RDP Classifier算法对OTU代表序列进行比对分析, 结果表明, 从门水平分析, NAFLD大鼠厚壁菌门和放线菌门丰度增加, 其中放线菌门丰度显著增加, 拟杆菌门和变形菌门的丰度降低。从纲水平分析, NAFLD大鼠放线菌纲和丹毒丝菌纲相对丰度显著升高, 而杆菌纲相对丰度显著下降。从目水平分析, NAFLD大鼠红椿菌目和丹毒丝菌目相对丰度显著升高, 而乳杆菌目和酸微菌目相对丰度显著降低。从科水平分析, NAFLD大鼠毛螺菌科 (Lachnospiraceae)、瘤胃菌科 (Ruminococcaceae)、消化链球菌科 (Peptostreptococcus)、丹毒丝菌科 (Erysipelotrichaceae) 和双歧杆菌科 (Bifidobacteriaceae) 等增加, 其中双歧杆菌科、肽链球菌科显著增加, 乳酸杆菌科 (Lactobacillaceae)、普雷沃氏菌科 (Prevotellaceae) 和拟杆菌目S24-7组比例下降, 其中乳酸杆菌科显著性减少。采用LEfSe对组间差异显著的物种分析, 结果表明两组间

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2023.04.008

基金项目: 首都卫生发展科研专项项目 (首发2018-2-2173); 北京市属医院科研培育计划 (PZ2019011); 首都医科大学附属北京中医医院中医药学科建设项目-中医肝病学

通讯作者: 孙凤霞 Email: sunfengxia01969@163.com

差异起重要作用的肠道微生物类群共126个, LDA值大于3.6的微生物类群共24个。结论与普通饮食组相比, 高脂饮食组干预8周后大鼠肠道菌群结构和多样性均发生显著变化。

关键词: 脂肪性肝病, 非酒精性; 大鼠; 16S rRNA基因测序技术; 肠道菌群

### Analysis of intestinal flora in rats with non-alcoholic fatty liver disease based on 16S rRNA gene sequencing

Li Xiaoling, Sun Fengxia, Zhang Yingxue, Guo Yufei, Men Qiushuang (*Department of Hepatic, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China*)

**Abstract: Objective** To analyze the intestinal flora of rats with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by 16S rRNA gene sequencing technology. **Methods** SPF grade SD rats were used as experimental subjects and randomly divided into normal diet group (control group) and high-fat diet group (model group). The high-fat diet group induced NAFLD model by consuming high-fat feed for 8 weeks. After 8 weeks, serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triglycerides (TG) and aspartate aminotransferase (AST) of rats were detected. Liver tissue was taken for HE and oil red O staining, and fresh feces of rats were collected for gene sequencing of the V3-V4 region of 16S rRNA in intestinal feces using high-throughput sequencing. UPARSE software was used for operational taxonomic unit (OTU) clustering, RDP Classifier algorithm was used for alignment analysis of OTU representative sequences, and annotating species information of their communities at the phylum, class, order, family, genus, species level. Based on the OTU clustering results, Alpha diversity analysis and Beta diversity analysis were conducted using Mathur software and Qimme (V.1.8), and inter group colony differences were analyzed by LEfSe software. **Results** Compared with rats in normal group, the levels of AST [(23.63 ± 4.82) U/L vs (10.61 ± 1.17) U/L], ALT [(9.98 ± 2.27) U/L vs (3.40 ± 0.81) U/L], LDL-C [(0.69 ± 0.11) mmol/L vs (0.34 ± 0.10) mmol/L], TG [(0.90 ± 0.24) mmol/L vs (0.33 ± 0.13) mmol/L] and TC [(5.69 ± 0.72) mmol/L vs (2.10 ± 0.42) mmol/L] of rats in model group increased significantly, the levels of HDL-C [(0.62 ± 0.14) mmol/L vs (1.07 ± 0.17) mmol/L] reduced significantly, the differences were statistically significant (all  $P < 0.05$ ). A total of 2607 OTUs were obtained in two groups, and after leveling treatment, 2547 OTUs were obtained, including 2367 in control group and 2168 in model group. The two groups shared 1988 OTUs. As the sample size increased, the species accumulation curve tended to flatten out, indicating that the sample size was sufficient. In the Alpha diversity index, the Shannon index ( $7.0673 \pm 0.4812$  vs  $6.1695 \pm 0.7165$ ), the number of species ( $968.6250 \pm 233.0221$  vs  $1155.9500 \pm 129.0011$ ), and PD\_Whole\_Tree index ( $69.3449 \pm 14.2872$  vs  $82.0219 \pm 10.2012$ ) of rats in model group were significantly lower than those of control group, the differences were statistically significant (all  $P < 0.05$ ). The Chao1 index of rats in control group was lower than that of control group ( $1418.4503 \pm 277.8639$  vs  $1599.1725 \pm 100.1048$ ), but the difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). Beta diversity analysis methods such as principal component analysis, principal coordinate analysis, hierarchical clustering analysis, partial least squares discriminant analysis and non metric multidimensional scaling could completely distinguish the model group from the control group, further indicating a significant difference in the bacterial community between the two groups. The RDP Classifier algorithm was used to compare and analyze OTU representative sequences. The results showed that at the phylum level, the abundance of Firmicutes and Actinobacteria in NAFLD rats increased, among which Actinobacteria abundance increased significantly, while Bacteroidetes and Proteobacteria abundance decreased significantly. At the class level, the relative abundance of

Actinobacteria and Erythromycetes in NAFLD rats increased significantly, while the relative abundance of Bacteroides decreased significantly. From the perspective of order level, the relative abundance of Coriobacteriales and Erysipelothrix in NAFLD rats increased significantly, while the relative abundance of Lactobacillales and Acidimicrobiales decreased significantly. From a family level, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Peptostreptococcus, Erysipelotrichaceae and Bifidobacteriaceae increased in NAFLD rats, among which Bifidobacteriaceae and Peptostreptococcus increased significantly, while Lactobacillaceae, the proportion of Prevotellaceae and S24-7 groups of Bacteroidales decreased, among which Lactobacillus decreased significantly. LEfSe was used to analyze species with significant differences between the two groups, the results showed that there were 126 gut microbiota groups with significant differences between the two groups, and 24 microbiota groups with LDA values greater than 3.6.

**Conclusions** Compared with rats in general diet group, the structure and diversity of intestinal flora changed significantly in high-fat diet group.

**Key words:** Fatty liver disease, non-alcoholic; Rat, 16S rRNA sequencing; Intestinal flora

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除酒精和其他明确的肝损伤因素所致的,以肝细胞内脂肪过度沉积为主要临床病理特征性疾病,包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎及其相关肝硬化。伴随生活方式及饮食习惯的改变,NAFLD发病率也在显著增高,影响6%~45%的全球人口,发病人群中70%有2型糖尿病,90%为严重肥胖患者。目前,NAFLD的发病率无论是在发达国家还是发展中国家都呈逐年升高趋势,已成为危害人类健康的常见疾病之一<sup>[1,2]</sup>。

NAFLD作为一种代谢性疾病,其发病机制尚不完全清楚。近年研究发现,肠道菌群作为人体重要的“器官”,在消化、营养、代谢、免疫、情绪等生理心理活动中都发挥重要作用。根据Vanni等<sup>[3]</sup>提出的“肠-肝轴”概念,肠道菌群与NAFLD的发生和发展有着密切联系,而NAFLD也会影响肠道菌群的组成和结构<sup>[4-8]</sup>。为了研究NAFLD对肠道菌群的影响,本研究构建了高脂膳食诱发的NAFLD大鼠模型,并通过16S rRNA高通量测序<sup>[9]</sup>分析了造模8周后的肠道菌群变化。

## 1 资料和方法

**1.1 实验动物** 实验动物为SPF级SD雄性大鼠,6~8周龄,体质量(200±20)g,购自北京斯贝福生物科技有限公司,动物合格证编号:1404160003,许可证号:SCXK(京)2015-0015。高脂饲料(52.5%基础饲料、10%鲜奶粉、10%果糖、10%蛋黄粉、5%食用盐、10%熟猪油、2%胆固醇、0.5%胆盐)购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

**1.2 构建NAFLD大鼠模型** 参考文献方法<sup>[10]</sup>,构建高脂饲料诱导的NAFLD大鼠模型。16只SPF级雄性SD大鼠适应性饲养1周后,随机分为2组,正常对照组8只,造模组8只,正常对照组给予普通饲料喂

养,造模组给予高脂饲料喂养,持续饲养8周完成NAFLD大鼠模型的构建。

**1.3 标本采集与检测** 8周实验周期结束,以1%戊巴比妥钠麻醉大鼠,麻醉剂量1 ml/100 g,腹主动脉取血,静置离心后取血清,检测血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、甘油三酯(triglyceride, TG)和总胆固醇(total cholesterol, TC)水平。取肝最大叶,从中间位置向外依次切成5份(宽度1 cm左右),分别进行HE染色、油红O染色。在饮食干预的第8周结束时,采用人工采集法,在超净台中采集大鼠的新鲜粪便于无菌冻存管中,并将所有样品立即放置于-80℃冰箱保存备用,进行16S rRNA基因片段的扩增及高通量测序。

**1.4 肝脏病理检测** HE染色:常规包埋,脱蜡,无水酒精、酒精浸洗,染色、封片。油红O染色:冰冻切片干燥,4%多聚甲醛固定,水洗,晾干。油红工作液浸染8~10 min,水洗。75%酒精稍分化,水洗,着色、封片;镜下观察:鲜红色颗粒为脂滴。

**1.5 粪便样本DNA的提取纯化** 采用QIAamp DNA Stool Mini Kit试剂盒(QIAGEN, Germany)提取肠道菌群基因组DNA。提取的总DNA经紫外分光光度计测定纯度,并用1%琼脂糖凝胶电泳检测后于4℃保存备用。

**1.6 16S rRNA基因片段的扩增及高通量测序** 以肠道菌群样本总DNA为模板,采用16S rRNA V3-V4区通用引物(319F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3', 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),按照TransStart Fastpfu DNA polymerase(TransGen)试

剂说明书进行PCR扩增。扩增产物通过2%琼脂糖凝胶电泳分离,使用AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒切胶回收PCR产物。随后进行Miseq文库构建,并进行illumina Miseq PE300测序。

**1.7 生物信息学分析** 原始数据下机后,用Trimmomatic去除测序结果末端低质量序列,根据PE reads间的重叠关系,利用FLASH软件将成对reads拼接成一条序列,使用mothur软件对拼接的序列进行质量过滤,去除低质量序列,获得优化后的序列。随后利用UPARSE软件按照97%相似性进行分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类,采用RDP Classifier算法对OTU代表序列进行比对分析,并在门、纲、目、科、属、种等水平注释其群落的物种信息。基于OTU聚类结果,利用mothur软件和Qimme(V.1.8)进行Alpha多样性分析(物种累积分析、样本稀释曲线、Shannon、observed species、PD\_Whole\_Tree和Chao1等物种多样性和丰富度参数分析)和Beta多样性分析(主成分分析、主坐标分析、层次聚类分析、偏最小二乘法判别分析和非度量多维尺度分析),并通过LEfSe软件进行组间菌落差异分析。

**1.8 统计学处理** 应用SPSS 20.0统计软件进行数据分析。AST、ALT、LDL-C等正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠生物化学指标及肝组织病理** 与正常组相比,模型组大鼠AST、ALT、LDL-C、TG及TC水平均显著升高,HDL-C水平显著降低,差异均有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ ),见表1。肝组织HE染色显示正常组大鼠肝细胞内几乎未见脂肪空泡,极少见炎性细胞浸润,肝索呈放射态整齐排列;模型组大鼠肝细胞内细胞核被脂肪空泡挤至边缘,肝索畸形,大量炎性细胞聚集浸润,肝细胞坏死明显。油红O染色显示正常组大鼠肝组织未见红色脂肪颗粒,模型组大鼠肝组织可见大量密集鲜红色脂滴,见图1。

**2.2 测序信息** 模型组和对照组各8份样品,经Illumina MiSeq平台测序,去除barcode和primer拼接后共获得1370822条有效序列,去除嵌合体、短序列后共获得1225659条优质序列。对所有优质序列进行长度统计分析,发现99.93%的序列长度为

400~440 bp。对获得的优质序列按照97%的序列相似性进行聚类,共获得2607个OTU,经过抽平处理后获得2547个OTU,其中对照组2367个,模型组2168个,两组共享OTU为1988个(图2)。物种累积曲线表明随样本量增加,曲线趋于平缓,表明样本量充分,见图3。

**2.3 Alpha多样性分析** 通过稀释曲线比较两组样品的Alpha多样性,结果表明模型组肠道菌群的稀释曲线较对照组平缓,提示模型组的菌群多样性较对照组下降,见图4。比较两组Alpha多样性指数,结果表明模型组香农指数、物种个数和PD\_Whole\_Tree指数显著低于对照组,差异有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ ),Chao1指数也低于对照组,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表2。以上结果提示NAFLD大鼠肠道菌群Alpha多样性下降。

**2.4 Beta多样性分析** 采用主成分分析、主坐标分析、层次聚类分析、偏最小二乘法判别分析和非度量多维尺度法等Beta多样性分析方法均能将模型组与对照组大鼠完全区分开来,进一步说明二者间的菌群有明显区别,见图5至图9。

**2.5 NAFLD对大鼠肠道菌群物种组成的影响** 采用RDP Classifier算法对OTU代表序列进行比对分析,并在门、纲、目、科、属、种水平上注释其群落的物种信息。从门水平分析,大鼠在发生NAFLD后,厚壁菌门和放线菌门丰度增加,其中放线菌门丰度显著增加,拟杆菌门和变形菌门的丰度降低(图10A)。从纲水平分析,大鼠在发生NAFLD后,放线菌纲和丹毒丝菌纲相对丰度显著升高,而杆菌纲相对丰度显著下降(图10B)。从目水平分析,大鼠在发生NAFLD后,红椿菌目和丹毒丝菌目相对丰度显著升高,而乳杆菌目和酸杆菌目相对丰度显著降低(图10C)。从科水平分析,大鼠发生NAFLD后,毛螺菌科(Lachnospiraceae)、瘤胃菌科(Ruminococcaceae)、消化链球菌科(Peptostreptococcus)、丹毒丝菌科(Erysipelotrichaceae)和双歧杆菌科(Bifidobacteriaceae)等增加,其中双歧杆菌科、肽链球菌科显著增加,乳酸杆菌科(Lactobacillaceae)、普雷沃氏菌科(Prevotellaceae)和拟杆菌目S24-7组比例下降,其中乳酸杆菌科显著性减少(图10D)。从属水平分析,大鼠在发生NAFLD后,Romboutsia属,

表1 正常组和模型组大鼠生物化学指标( $\bar{x} \pm s$ )

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
正常组	3.40 ± 0.81	10.61 ± 1.17	0.33 ± 0.13	2.10 ± 0.42	1.07 ± 0.17	0.34 ± 0.10
模型组	9.98 ± 2.27	23.63 ± 4.82	0.90 ± 0.24	5.69 ± 0.72	0.62 ± 0.14	0.69 ± 0.11
$t$ 值	7.7218	7.4247	5.9067	12.1817	5.7795	6.6591
$P$ 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

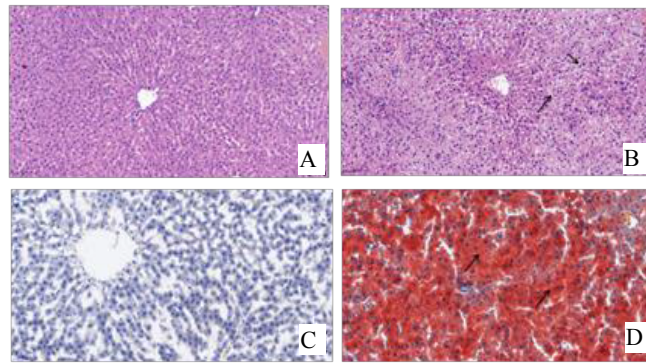


图1 正常组和模型组大鼠肝组织病理(×200)

注: A、B 为 HE 染色, C、D 为油红 O 染色; A 为正常组, 大鼠肝细胞内几乎未见脂肪空泡, 极少见炎性细胞浸润, 肝索呈放射态整齐排列; B 为模型组, 大鼠肝细胞内细胞核被脂肪空泡挤至边缘, 肝索畸形, 大量炎性细胞聚集浸润, 肝细胞坏死明显; C 为正常组, 大鼠肝组织未见红色脂肪颗粒; D 为模型组, 大鼠肝组织可见大量密集鲜红色脂滴。

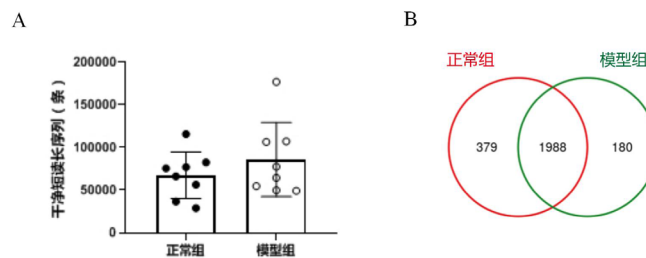


图2 测序数据统计分析

注: A 为模型组和对照组大鼠优质序列统计分析; B 为模型组和对照组 OTU 分布的 Venn 图。

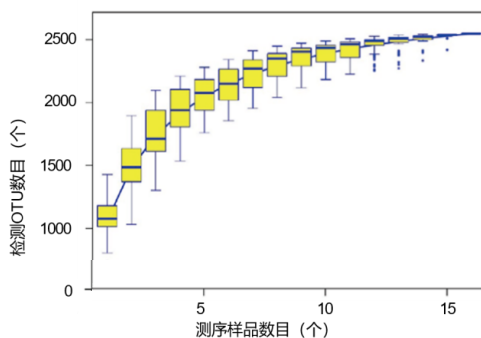


图3 物种累积曲线

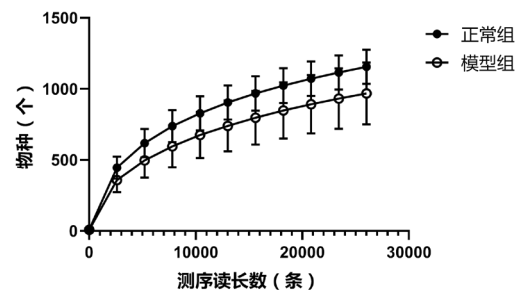


图4 正常组和对照组大鼠样本稀释曲线

表2 正常组和模型组大鼠 Alpha 多样性分析 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	香农指数	物种 (个)	PD Whole Tree指数	Chao1指数
正常组	6.1695 ± 0.7165	1155.9500 ± 129.0011	82.0219 ± 10.2012	1599.1725 ± 100.1048
模型组	7.0673 ± 0.4812	968.6250 ± 233.0221	69.3449 ± 14.2872	1418.4503 ± 277.8639
t值	2.9422	1.9893	2.0425	1.7307
P值	0.0401	0.0499	0.0281	0.1605

*Prevotellaceae\_NK3B31\_group*和拟杆菌属的相对丰度显著升高, 而*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*, 乳杆菌属, *Prevotella\_9*和*Roseburia*属菌的相对丰度显著下降(图10E)。在种水平上, 大鼠在发生NAFLD后, *Streptococcus\_sp.\_GDLAMI-SD2*和*Bacillus subtilis*的相对丰度显著

升高, 而*Clostridium leptum*, *Lactobacillus gasseri*和*Lactobacillus vaginalis*的相对丰度显著降低(图10F)。

2.6 菌群LEfSe分析 LEfSe对组间差异显著的物种分析见图12。对正常组和模型组间差异起重要作用的微生物类群有126个。其中LDA值大于3.6的微生物类群

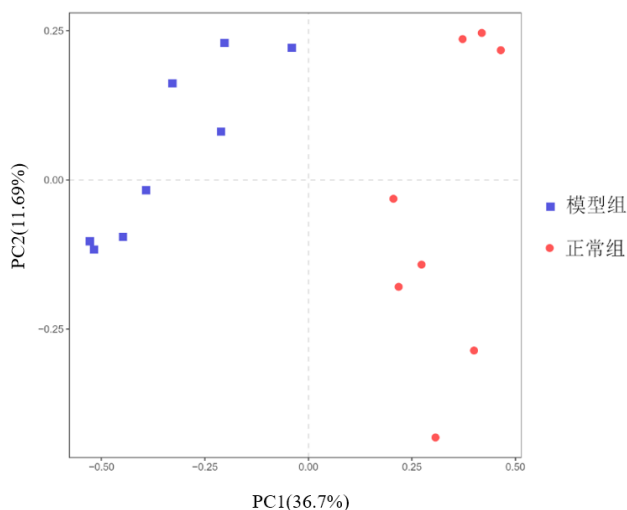


图5 基于 OTU 水平的主成分分析

注：横坐标表示第1主成分，百分比表示第1主成分对样本差异的贡献值；纵坐标表示第2主成分，百分比表示第2主成分对样本差异的贡献值；图中每个点表示1个样本，同组样本使用同种颜色表示。两组大鼠粪便样本在图中距离越远，提示两组样本的菌群组成区别越大。

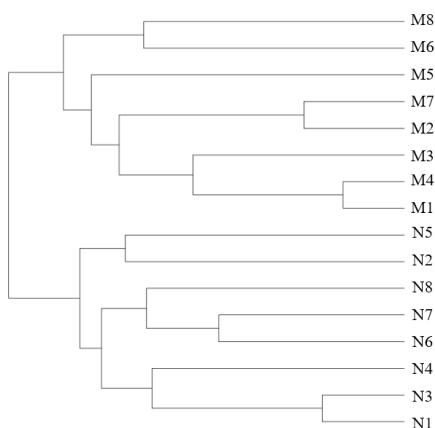


图7 层次聚类分析

注：树枝长度代表样本间的距离，越相似的样本越能聚在一起；两组样本的菌群有明显区别。

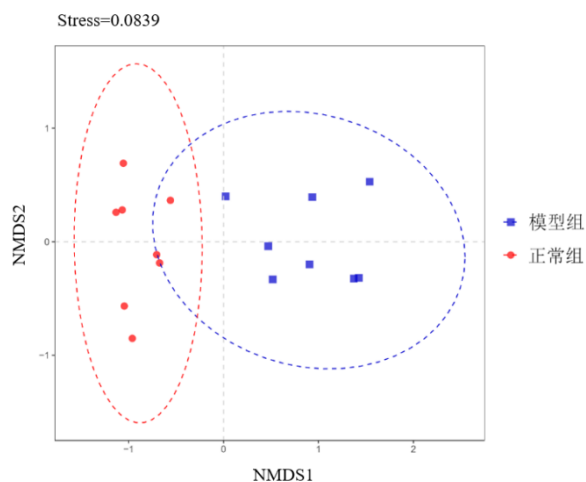


图9 非度量多维尺度分析

注：图中每个点表示一个样本，点与点间的距离表示差异程度，同组的样本使用同种颜色表示；两组样本的菌群有明显区别。

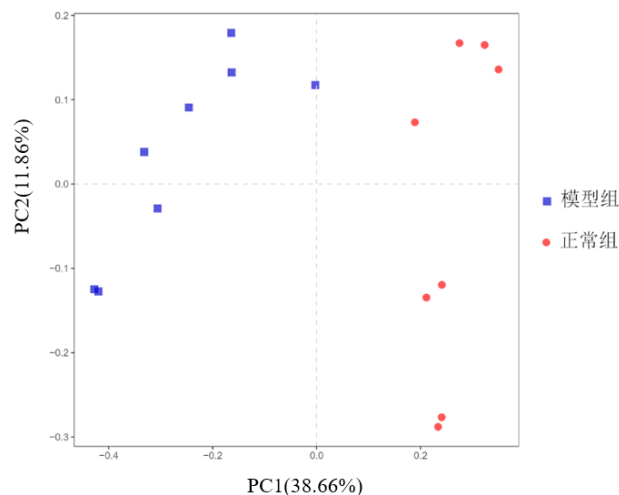


图6 基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析

注：图中不同颜色的点代表不同的分组情况，横纵坐标轴的刻度是相对距离，无实际意义。PC1、PC2 分别代表对于两组样本微生物组成发生偏移的疑似影响因素；两组样本的菌群有明显区别。

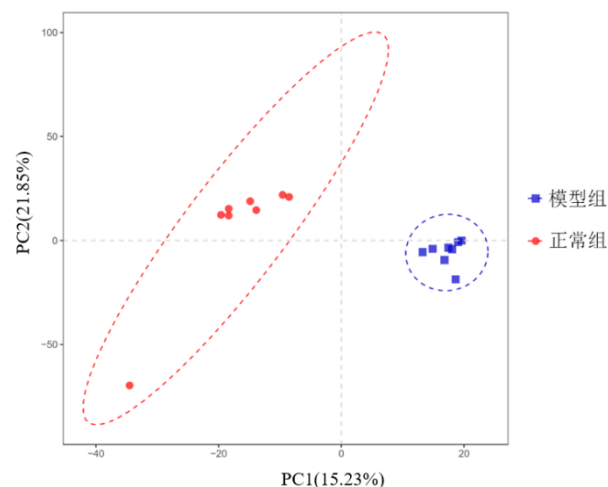


图8 偏最小二乘法判别分析

注：运用 PLS-DA 建立微生物含量与样品类型之间的关系模型，对样品类型进行预测，将模型组与对照组大鼠完全区分开来，提示二者间的菌群有明显区别。

有24个，包括门水平的放线菌门；纲水平的放线菌纲、红螺菌纲、杆菌纲；目和科水平的双歧杆菌目/科、红螺菌目/科、乳杆菌目/科；属水平的布劳特氏菌属 (*Blautia*)、梭状杆菌属 (*Fusicatenibacter*)、*Subdoligranulum*、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、*Lachnoclostridium*、柯林斯菌属 (*Collinsella*)、粪球菌属 (*Coprococcus*) 在正常组相对丰度高，乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、*Lachnospiraceae* NK4A136组、罗斯氏菌属 (*Roseburia*)、瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*)、异位丙酸杆菌属 (*Alloprevotella*) 在正常组相对丰度高；在种水平，加氏乳杆菌种 (*Lactobacillus gasseri*) 和阴道乳杆菌种 (*Lactobacillus vaginalis*) 在正常组中相对丰度高。



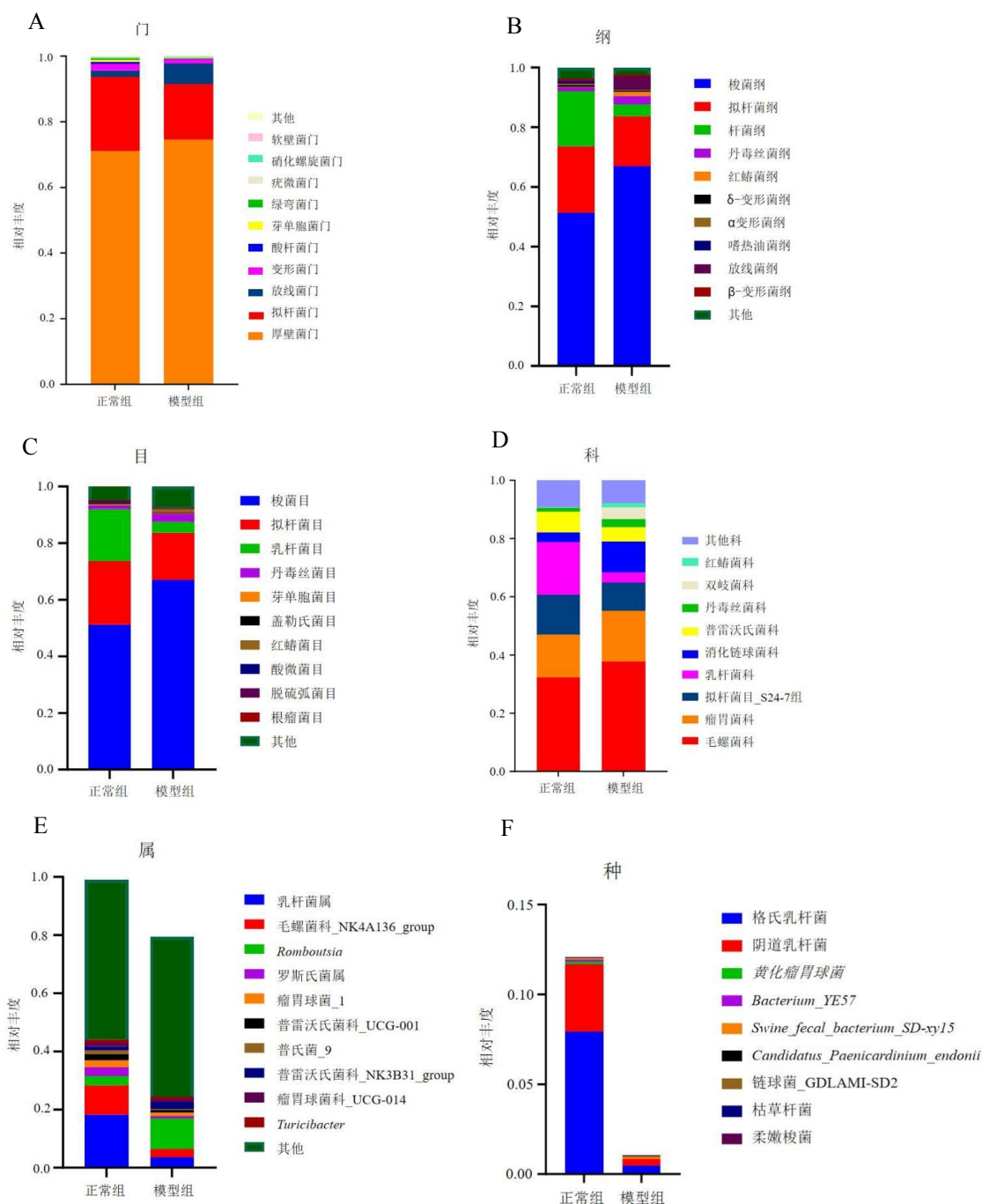


图 10 大鼠肠道菌群 LEfSe 分析

### 3 讨论

近几十年来,肠道菌群在保持人体健康及肠道疾病的发生、发展中发挥的作用成为研究热点,肠道菌群的代谢活动可能参与肝脏脂肪的生成过程,并影响肝脏细胞的脂肪变性<sup>[11,12]</sup>。研究发现,NAFLD患者存在肠道菌群构成的改变,肠道菌群失调可能参与NAFLD的发生发展<sup>[13,14]</sup>。本研究以SPF级SD大鼠为研究对象,通过高脂膳食喂养8周诱导NAFLD大鼠模型,并通过对16S rRNA V3-V4区扩增子的高通量测序分析,研究NAFLD发生发

展过程中肠道菌群的变化。

本研究表明,经8周高脂饲养的模型组大鼠,其血清ALT、AST及血脂等水平升高,肝脏病理显示大量脂肪空泡生成,脂肪性病变严重,表明造模成功。与普通饮食组相比,高脂膳食干预8周后大鼠肠道菌群结构和多样性均发生了显著变化。大鼠肠道菌群多样性分析显示:与对照组相比,无论是代表群落物种丰度的Chao指数,还是代表微生物菌落物种均匀度的Shannon指数,以及代表多样性的物种数和PD\_Whole\_Tree参数,高脂膳食干预8周后均显著降低,

提示高脂膳食组的Alpha多样性降低,与文献报道的高脂饮食可降低肠道菌群物种的丰富性与多样性相符合<sup>[15-17]</sup>。而通过主成分分析、主坐标分析、层次聚类分析等Beta多样性分析方法发现,高脂膳食组能与普通饮食组大鼠的肠道菌群分布明显分离,提示高脂膳食显著改变了大鼠肠道菌群多样性。针对大鼠肠道菌群组成的进一步分析发现:相比正常饮食组,高脂饮食组大鼠肠道菌群中的放线菌门、双歧杆菌科和肽链球菌科细菌相对丰度显著增加,乳酸杆菌科细菌相对丰度显著下降。本研究证实NAFLD的发生伴随着肠道菌群的失调,提示肠道菌群在NAFLD的发生发展过程中发挥重要作用<sup>[18-20]</sup>。

本研究通过LEfSe分析发现厚壁菌门的布劳特氏菌属(*Blautia*)在NAFLD大鼠的相对丰度高,既往研究也发现,在NAFLD不同的临床表型中,无论是在单纯性脂肪肝<sup>[21]</sup>、非酒精性脂肪性肝炎<sup>[22]</sup>,还是在NAFLD相关晚期纤维化中<sup>[23]</sup>,布劳特氏菌属在肠道菌群中的丰度均上升,提示该菌在NAFLD发生发展中发挥重要作用。与既往临床研究不同,本研究发现大鼠肠道菌群乳酸杆菌属丰度显著降低,而放线菌门双歧杆菌属丰度显著升高,这可能与宿主NAFLD发病的诱因不同有关,也可能与NAFLD发展的不同阶段有关<sup>[24]</sup>。此外,本研究中梭状杆菌属(*Fuscatenibacter*)在高脂饮食组的丰度升高,既往研究发现该菌丰度与血清中HDL-C水平呈正相关,本研究也发现高脂饮食组大鼠的HDL-C水平较正常组下降,因此推测梭状杆菌属丰度的升高可能与宿主代偿性调节HDL-C有关,具体机制有待进一步研究<sup>[25,26]</sup>。

肠道菌群对肝脏的影响可通过“肠-肝轴”发挥作用<sup>[7,27,28]</sup>,通过控制肠道菌群紊乱可改善NAFLD人群的肝脂肪变性及肝功能<sup>[29]</sup>,表明维持肠道菌群平衡在阻止NAFLD的发生发展中有重要作用<sup>[30-32]</sup>。本研究发现的两组间差异显著的菌种具有成为微生态制剂或药物作用靶标的潜能,也可能作为判断NAFLD临床表型特征的标志物而用于NAFLD的筛查诊断。

## 参考文献

- [1] 夏凡,周本杰. 肠-肝轴功能紊乱在非酒精性脂肪肝病发病机制中的作用及相关治疗策略[J]. 世界华人消化杂志,2018,26(24):1439-1447.
- [2] 展玉涛,李贝,张川. 非酒精性脂肪性肝病的流行病学与自然史: 第九届全国疑难及重症肝病大会[C]. 北京:2017.
- [3] VANNI E, BUGIANESI E. The gut-liver axis in nonalcoholic fatty liver disease: another pathway to insulin resistance?[J]. Hepatology, 2009,49(6):1790-1792.
- [4] 池肇春. 肠道细菌与非酒精性脂肪性肝病研究进展与现状[J]. 中西医结合肝病杂志,2019,29(2):97-102.
- [5] 耿妍,鲁晓岚,耿燕,等. 肠道菌群紊乱在大鼠非酒精性脂肪肝中的作用机制[J]. 分子诊断与治疗杂志,2020,12(12): 1626-1630.
- [6] LEUNG C, RIVERA L, FURNESS JB, et al. The role of the gut microbiota in NAFLD[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13(7):412-425.
- [7] JIN C, FLAVELL R A. Innate sensors of pathogen and stress: linking inflammation to obesity[J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 132(2):287-294.
- [8] POETA M, PIERRI L, VAJRO P. Gut-liver axis derangement in non-alcoholic fatty liver disease[J]. Children (Basel), 2017, 4(8):66.
- [9] MCGOVERN E, KENNY D A, MCCABE M S, et al. 16S rRNA sequencing reveals relationship between potent cellulolytic genera and feed efficiency in the rumen of bulls[J]. Front Microbiol, 2018, 9:1842.
- [10] 陈丽如, 张立平, 刘源, 等. 柴芪汤对非酒精性脂肪肝大鼠固醇调节元件结合蛋白-1c表达的影响[J]. 西部中医药, 2016, 29(12):13-17.
- [11] MALAGUARNERA M, VACANTE M, ANTIC T, et al. Bifidobacterium longum with Fructo-Oligosaccharides in Patients with Non Alcoholic Steatohepatitis[J]. Dig Dis Sci, 2011, 57(2):545-553.
- [12] LE ROY T, LLOPIS M, LEPAGE P, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice[J]. Gut, 2013, 62(12):1787-1794.
- [13] 易艳容, 曾亚, 何佳, 等. 非酒精性脂肪性肝病患者肠道菌群变化及双歧杆菌三联活菌胶囊对肠道菌群、肝功能、血脂及胰岛素抵抗的影响[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2016, 8(3):87-92.
- [14] 乔兵, 周永, 马文洁, 等. 肠道菌群失调在非酒精性脂肪性肝病中研究进展[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2020, 12(4):29-33.
- [15] LE CHATELIER E, NIELSEN T, QIN J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers[J]. Nature, 2013, 500(7464):541-546.
- [16] FANG S, EVANS R M. Microbiology: wealth management in the gut[J]. Nature, 2013, 500(7464):538-539.
- [17] 黄红丽, 周永健, 郑啼婴, 等. 肠道菌群在非酒精性脂肪性肝病大鼠中的变化及意义[J]. 广东医学, 2016, 37(9):1283-1286.
- [18] TANG W, YAO X, XIA F, et al. Modulation of the gut microbiota in rats by hugan qingzhi tablets during the treatment of high-fat-diet-induced nonalcoholic fatty liver disease[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018:7261619.
- [19] ZHU L, BAKER R D, ZHU R, et al. Gut microbiota produce alcohol and contribute to NAFLD[J]. Gut, 2016, 65:1232.
- [20] SHARPTON S R, AJMERA V, LOOMBA R. Emerging role of the gut microbiome in nonalcoholic fatty liver disease: from composition to function.[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2019, 17:296-306.
- [21] DELCHIERICO F, NOBILI V, VERNOCCHI P, et al. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach[J]. Hepatology, 2017, 65(2):451-464.
- [22] SHEN F, ZHENG R D, SUN X Q, et al. Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2017, 16(4):375-381.
- [23] PONZIANI F R, BHOORI S, CASTELLI C, et al. Hepatocellular carcinoma is associated with gut microbiota profile and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2019, 69(1):107-120.
- [24] NOBILI V, PUTIGNANI L, MOSCAA, et al. Bifidobacteria and lactobacilli in the gut microbiome of children with non-alcoholic fatty liver disease: which strains act as health players?[J]. Arch Med Sci, 2018, 14(1):81-87.
- [25] AHN S B, JUN D W, KANG B K, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of a multispecies probiotic mixture in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):5688.
- [26] 任士萌, 梅璐, 黄煌, 等. 非酒精性脂肪性肝病患者肠道菌群及生物化学指标相关性分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2019, 27(5):369-375.
- [27] 涂宏飞, 费素娟. 肠道微生态与非酒精性脂肪性肝病[J]. 肝脏, 2018, 23(4):347-349.
- [28] 盛国光. 肝衰竭患者肠道微生态变化及其干预措施[J]. 中西医结合肝病杂志, 2016, 26(5):257-259.
- [29] 汪玲娟, 张建萍, 陈慕恒. 益生菌对非酒精性脂肪肝患儿肝功能糖脂代谢及肠道菌群的影响[J]. 中国学校卫生, 2019, 40(10):1545-1548.
- [30] DOULBERIS M, KOTRONIS G, GIALAMPRIINU D, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: An update with special focus on the role of gut microbiota[J]. Metab Clin Exp, 2017, 71:182-197.
- [31] SCHNABL B, BRENNER D A. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases[J]. Gastroenterology, 2014, 146(6):1513-1524.
- [32] JUST S, MONDOT S, ECKER J, et al. The gut microbiota drives the impact of bile acids and fat source in diet on mouse metabolism[J]. Microbiome, 2018, 6(1):134.

收稿日期: 2021-09-04

李晓玲, 孙凤霞, 张莹雪, 等. 基于16S rRNA基因测序技术分析非酒精性脂肪性肝病大鼠的肠道菌群[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2023, 15(4): 39-46.