

肠道菌群参与慢性便秘发生发展机制的研究

蓝文通^{1,2}, 熊理守², 李秀红^{1*}

1. 中山大学公共卫生学院 妇幼卫生学系, 广东 广州 510080

2. 中山大学附属第一医院 内镜中心, 广东 广州 510080

【摘要】 目的 探索影响慢性便秘的优势菌群及其分布特征。方法 选取慢性便秘病例患者和健康对照 23 例分别纳入便秘组与对照组, 内镜下用无菌活检钳分别钳取升结肠和降结肠黏膜各 2 块(>100 ng), 采用 16S rDNA 测序技术进行检测。结果 对照组前十优势菌群的占比高于便秘组。其中, 对照组升结肠与降结肠的菌群分布非常接近, 而便秘组中施诺德格拉斯氏菌群在降结肠(0.012 936%)中占比高于升结肠(0.000 001%)。对照组升结肠内菌群结构分布最为集中, 便秘组升结肠菌群分布最为分散。在菌落组成的组内差异方面, 对照组差异较大, 便秘组差异较小, 且对照组与便秘组菌落组成相似度不高。对照组与便秘组的菌群复杂度在组间及组内均无明显差异。结论 慢性便秘患者肠黏膜菌群丰度下降, 且菌群的组成明显不同于健康者, 主要表现为变形菌门, 肠杆菌的减少, 拟杆菌的增加, 致病机制可能是肠道菌群失调引起菌群代谢产物(组学)的改变。

【关键词】 慢性便秘; 菌群丰度; 肠道菌群; 16S rDNA

Research of the intestinal flora in pathogenesis of chronic constipation patients

Lan Wentong^{1,2}, Xiong Lishou², Li Xiuhong^{1*}

1. Department of Maternal and Child Health, College of Public Health, Sun Yat Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

2. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

【Abstract】 Objective To explore the dominant flora and its distribution characteristics affecting chronic constipation. **Methods** Sequence-specific 16S rDNA detection was employed to detect the difference of intestinal flora between 23 patients with chronic constipation (CC) and 23 health controls (HCs). Ascending and descending colon mucosal tissues were taken and transferred to a -80°C refrigerator for preservation. **Results** The proportion of the top 10 dominant bacteria in the HCs was higher than that in patients with CC. Among them, the flora distribution of ascending colon and descending colon in the HCs was similar, while the Snodgrassella flora was richer in descending colon (0.012 936%) than in ascending colon (0.000 001%) of the patients with CC. The intestinal flora distribution was most concentrated in ascending colon of HCs, while the intestinal flora distribution was most dispersed in ascending colon of patients with CC. Referred to the bacterial colonies, it was similar in the patients with CCs and very different in HCs. The similarities of the bacterial colonies between the health group and the constipation group were not high. There was no significant difference in the bacterial complexity between the HCs and the patients with CC. **Conclusion** The abundance of intestinal mucosal flora in patients with CC was decreased, and the composition of intestinal mucosal flora was significantly different from that of HCs. The principal manifestation was reduction of proteobacteria and enterobacteria, and increase of bacteroides. The pathogenic mechanism may be the change of microbial metabolites (omics) caused by intestinal flora imbalance.

【Key words】 Chronic constipation; Bacteria abundance; Intestinal flora; 16S rDNA

基金项目: 国家自然科学基金项目(81970471)

第一作者: 蓝文通, E-mail: lanwentongcody@163.com

* 通信作者: 李秀红, E-mail: lixh@mail.sysu.edu.cn

慢性便秘(chronic constipation, CC)是一种多因素导致的常见胃肠道疾病,临床常表现为排便困难、排便次数减少及粪便干硬等,病程通常为6个月以上。中老年及女性患病率较高^[1-3]。慢性便秘诱导的多类并发症严重影响着患者的健康与生活,严重者可致死^[4-6]。多项研究显示,便秘与患者肠道菌群结构密切相关,参与慢性便秘的发生发展过程^[7,8]。研究表明,肠道菌群不仅可通过模式识别受体途径激活炎症反应通路,也可通过其代谢物如短链脂肪酸直接或间接的影响消化道的动力、黏膜敏感性等^[9]。前期大量的研究均以患者粪便作为对象,但是粪便微生物的组成并不能完全代表便秘患者肠道黏膜微生物构成的真实情况。为更为真实地模拟肠道菌群的构成,本研究拟通过16S rDNA基因测序的方法比较慢性便秘患者与健康人群的肠道菌群结构差异,探索影响慢性便秘的优势菌群及其分布特征,以期慢性便秘的诊治提供相应的理论基础。

1 资料与方法

1.1 研究对象 本研究采用病例对照研究设计,纳入慢性便秘患者和健康对照各23例,所有患者均同意参与并签署知情同意书。根据功能性便秘罗马IV的诊断标准将患者分为便秘组与对照组。

便秘组:根据自愿原则,从临床招募患有慢性便秘的患者23例。所有便秘组患者均能完善全结肠镜检查,年龄范围为19~63岁,其中男性10例,女性13例,均明确诊断为慢性便秘的患者。疾病的诊断标准(便秘罗马IV诊断标准):诊断前患者临床相关症状出现时间 ≥ 6 个月,且3个月内出现症状必须同时满足以下3个条件:①出现排便困难(以下标准至少符合2项):a)每4次排便中存在1次排便困难;b)排便4次中至少有1次的形状为干球粪或硬粪;c)排便4次中至少有1次存在排便不尽;d)每4次排便中至少有1次直肠梗阻(或堵塞)感;e)每4次排便中至少有1次需手法辅助排便;f)每周排便少于3次。②不用泻药时很少出现稀便。③不满足肠易激综合症的诊断标准。

对照组:以年龄、性别、体质量指数(body mass index, BMI)相匹配的体检患者。对照组受试者年龄范围为27~48岁,其中男性12例,女性11例,均明确诊断未患有慢性便秘。出现以下症状者不

纳入对照组:①6个月内有明显的消化道和其他躯体症状者;②小于18岁或大于60岁;③不能耐受结肠镜检查;④有手术病史;⑤6个月以内使用过抗生素、激素等影响肠道微生态的制剂。

1.2 研究方法

1.2.1 人口学基本特征调查 采用自编问卷,了解调查对象的人口学基本特征,包括性别、年龄、身高、体重等信息。

1.2.2 肠道菌群的样本采集和分析

1.2.2.1 肠黏膜标本收集 在确定便秘组与对照组患者后,对所有受试人员进行结肠镜检查。在内镜下用无菌活检钳分别钳取升结肠和降结肠黏膜各2块(>100 ng),用无菌针头挑入2 ml冻存管,立即转入 -80°C 冰箱保存。

1.2.2.2 16S rDNA 测序 冻存肠黏膜样本送至北京诺禾致源科技股份有限公司(北京)进行16S rDNA测序。采用CTAB的方法提取黏膜样本的DNA,检测其纯度与浓度后用无菌水稀释至 $1\text{ ng}/\mu\text{l}$ ^[11]。合格样品与其特异性引物配置PCR反应体系,设置对应的PCR参数进行PCR扩增,对其产物进行混样和纯化。使用TruSeq[®] DNA PCR-Free样品制备试剂盒(Illumina,美国)进行文库构建,构建好的文库经过Qubit和Q-PCR定量,文库合格后,使用NovaSeq6000进行上机测序。下机数据根据条码序列和PCR扩增引物序列特异性标记为不同样本的数据,去除条码序列和引物序列后使用FLASH软件(V1.2.7)对各样本序列进行拼接,得到原始序列^[12]。原始序列经过严格的过滤后,去除低质量的序列和嵌合体序列,得到最终的有效数据^[13-15]。

1.2.2.3 测序数据分析 使用Uparse软件(V7.0.1001)对所有有效序列进行聚类分析,将一致性达97%的序列聚类成为操作分类单元,同时筛选操作分类单元的代表序列,使用Mothur方法与SILVA132的SSUrRNA数据库对其进行物种注释^[16-18]。分别在界门纲目科属种层面上统计各样本的群落组成,并使用MUSCLE软件(V3.8.31)进行快速多序列比对,得到所有操作分类单元代表序列的系统发生关系^[19]。最后对各组数据进行均一化处理后进行alpha多样性分析、beta多样性、环境因子关联分析等。

1.3 统计学处理 数据运用SPSS 19.0进行统计软件分析,计量资料(两组人群的身高、体重、

BMI、每周排便次数、便秘时间指标)均采用均数 ± 标准差表示,样本比较采用 *t* 检验。两组样本的菌群差异性比较均采用非参数检验 (Mann-Whitney *U* 秩和检验),采用多元线性回归和 Logistics 回归探索肠道微生态影响慢性便秘发病的因素。

2 结果

2.1 样本人口学特征 便秘组及对照组患者各 23 例,其基本信息见表 1。便秘组与对照组患者的年龄、体重和 BMI 之间均无统计学差异。

表 1 纳入样本的基线资料

项目	便秘组	对照组	<i>P</i>
年龄($\bar{x}\pm s$, 岁)	37.65±12.72	38.30±5.12	0.824
体重($\bar{x}\pm s$, kg)	61.61±12.59	61.72±12.36	0.977
体质量指数($\bar{x}\pm s$, kg/m ²)	22.64±3.58	22.82±3.51	0.867
排便频率($\bar{x}\pm s$, 次/d)	4.80±1.67	1.17±0.29	<0.001
每周排便次数($\bar{x}\pm s$, 次)	1.51±0.34	6.43±1.19	<0.001
每次排便时间($\bar{x}\pm s$, min)	17.13±8.08	8.52±3.84	0.003
病程时间($\bar{x}\pm s$, 月)	86.78±71.11	NA	NA

2.2 两组优势菌群比较 对 92 个样本的 16S rDNA 测序分析共获得了 8 480 517 个原始序列通过对序列拼接,平均每样品测得 92 180 条序列,经过质控平均得到 78 930 条有效数据,质控有效数据量达 59 671,质控有效率达 65.11% (56.69%~91.61%)。有效数据中测序错误率小于 0.1% 的碱基平均占比为 91.91% (89.4%~94.63%)。以 97% 的一致性将序列聚类成为操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs),共得到 9684 个 OTUs,其中,能注释到数据库的 OTUs 数目为 7103 (73.35%),注释到界门纲目科属种各水平的比例与优势菌群如表 2 所示。便秘组患者的 OTUs 数目(5973)小于对照组(7314),其中二者重合的 OTUs 数目为 3684。

2.3 两组优势菌群组成分析比较 筛选组内不同部位及组外丰度前 10 的优势菌群进行了差异分析。在属水平(图 1),对照组丰度最高的菌群为不明肠杆菌科,而便秘组为拟杆菌属。同时,在对照组中,前 10 位优势菌群的占总菌群比高于便秘组。其中,对照组升结肠与降结肠的菌群分布非常接近,而便秘组中施诺德格拉斯氏菌群的占比在升结肠(0.000 001%)和降结肠(0.012 936%)中差异很大。

2.4 两组菌群结构及复杂性分析比较 为分析

表 2 注释水平及优势菌群

注释水平	注释比例(%)	优势菌群
界	73.35	NA
门	58.55	厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门
纲	54.82	梭状芽孢杆菌、 γ -变形菌、类杆菌
目	49.49	梭状芽孢杆菌、肠杆菌、类杆菌
科	44.00	肠杆菌科、毛螺旋菌科、普雷沃氏菌科
属	26.66	不明肠杆菌属、梭杆菌属、不明钩端螺旋菌科
种	8.53	大肠埃希菌、梭杆菌、梭杆菌_sp_RMA_1065

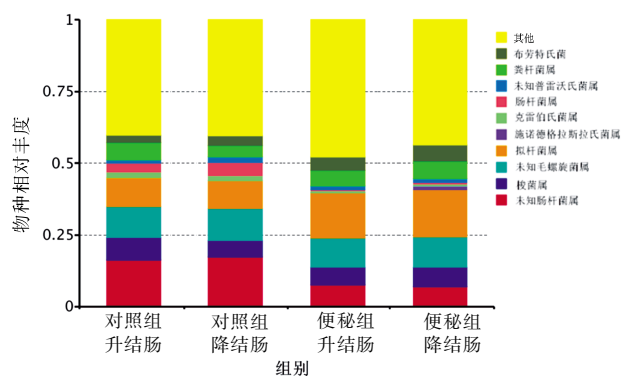


图 1 各组中丰度前 10 位的优势菌群(属水平)

便秘组与对照组菌落结构差异,对其进行了 PCoA、PCA、NMDS 及 UPGMA 分析。样本间距离代表其物种组成结构相似度(图 2)。PCoA 结果显示,对照组升结肠组内数据最为接近,而便秘组升结肠数据最为分散;对照组与便秘组菌落组成相似度不高。PCA 结果显示,对照组菌落组成组内差异很大,便秘组菌落组成组内差异很小。NMDS 结果显示,便秘组菌落组成组内差异很小,且对照组与便秘组菌落组成相似度不高。UPGMA 的聚类结果也同样支持 NMDS 的结果。

对不同样本在 97% 一致性阈值下的样本复杂度分析指数(shannon 指数、simpson 指数、chao1 指数、ACE 指数、goods_coverage 指数、谱系多样性)进行统计,见表 3(均一化时选取的数据量:分界值=36 313)。结果显示,对照组与便秘组的组内差异均无显著性差异,而对照组与便秘组无显著组间差异。

3 讨论

结肠黏膜菌群的比较分析结果显示,在门水平上,厚壁菌门、变形菌门和拟杆菌门为优势菌群,占总菌群数量的 80% 以上,行使肠道菌群对宿主影响的主要功能。在便秘组中,变形菌门的占比较对照组显著下降,而拟杆菌门显著上升,厚壁菌门无明显差异。Dandan 等^[19]通过构建脾虚便秘小

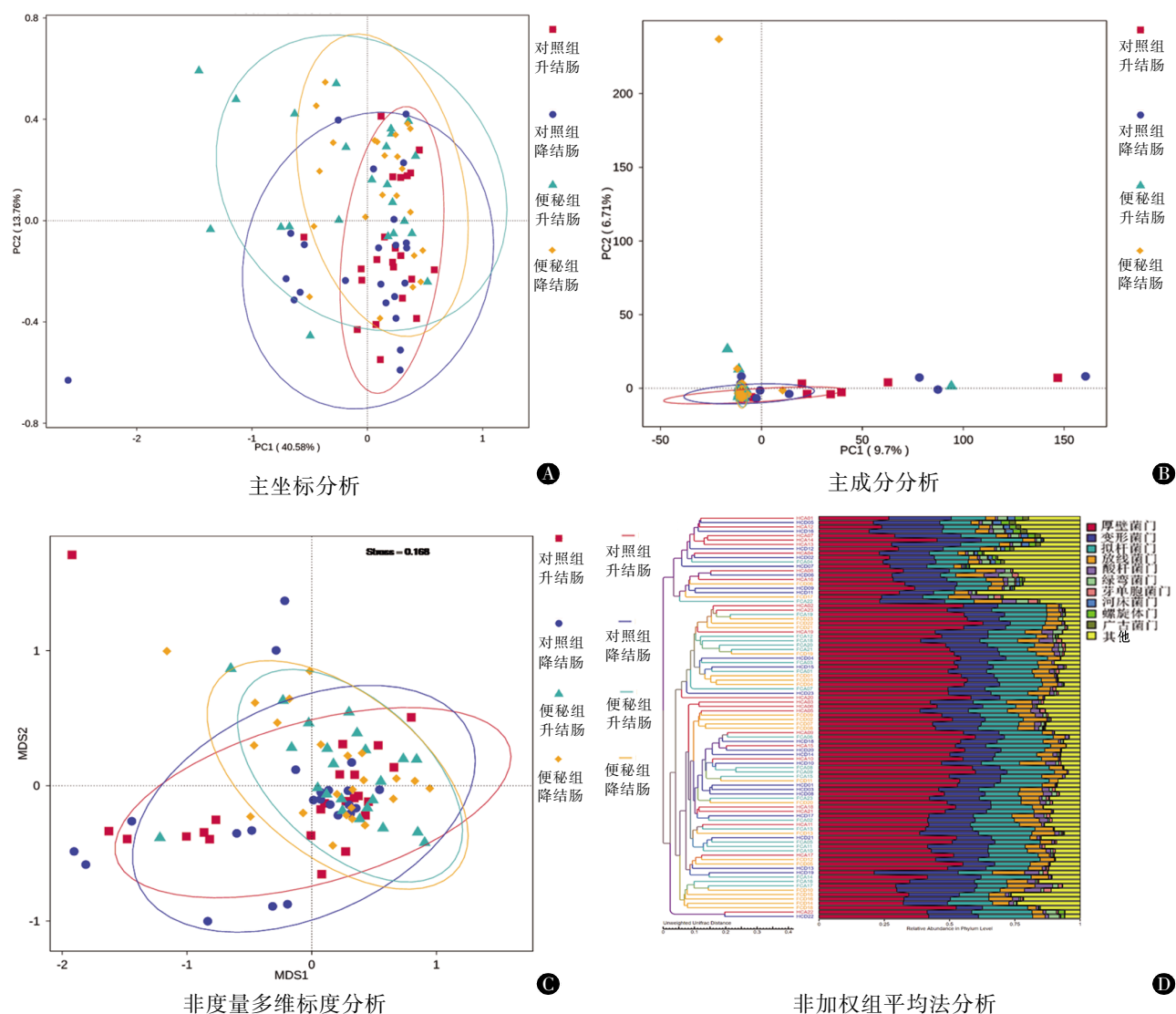


图2 主坐标、主成分、非度量多维标度及非加权组平均法分析

表3 样本复杂度分析

分组	观察到的菌群	shannon 指数	simpson 指数	chao1 指数	ACE 指数	goods_coverage 指数	谱系多样性
便秘组升结肠	604	5.113	0.903	764.323	793.052	0.995	109.410
便秘组降结肠	614	5.224	0.911	793.425	821.480	0.995	125.148
对照组升结肠	742	5.080	0.885	977.918	1022.161	0.993	144.974
对照组降结肠	778	5.009	0.882	1014.376	1061.713	0.993	165.279

鼠模型研究便秘对肠道菌群的影响,发现变形菌门的占比显著降低。黄林生等^[20]对便秘患者与健康人群的粪便样品进行了比较分析,结果显示变形菌门的占比显著降低。Liu 等^[21]构建了大鼠便秘模型,显示便秘组中拟杆菌的占比发生了显著变化。本研究与前期研究结果相似,表明变形菌门和拟杆菌门作为便秘患者的优势菌群,在便秘发生机制中发挥着重要的作用。

在属水平上,不明肠杆菌科、不明毛螺菌科及

拟杆菌属为优势菌群。其中,便秘组中不明肠杆菌科(16.5%)占比相较于对照组(6.5%)显著下降,而拟杆菌属(16%)的占比相较于对照组(9.5%)显著上升。结果表明,优势菌群不明肠杆菌科和拟杆菌属的含量变化可能是导致慢性便秘的诱因之一。值得一提的是,在便秘组降结肠中施诺德格拉斯拉氏菌群的占比达 0.012 936,而在便秘组升结肠和对照组中几乎没有。提示施诺德格拉斯拉氏菌群在降结肠中的增加可能是引发慢性便秘的重

要原因之一。目前尚无相关报道,该发现可能为慢性便秘机制的研究提供新方向。

对菌群结构的差异分析表明,便秘组的菌群结构组内差异很小,而对照组组内差异较大;而便秘组和对照组菌群结构相似度不高,对照组中前10位优势菌群的占总菌群比高于便秘组。结果表明,相较于健康人,便秘患者的菌群结构更为复杂,种类更多及不够稳定。菌群结构变化大会影响宿主健康状态。

本研究采用宏基因组学的研究方法对肠道菌群进行测序,将差异菌群由传统的门和属水平进一步聚焦在种水平进行比较,在方法学上具有一定的优势。本研究通过对便秘组和对照组之间的比较确定便秘人群和存在特征性差异的菌群但仍有不足之处,首先每组纳入的人群数量较少,其次未能将饮食结构、个体差异性等影响菌群结构的因素进行综合考虑。

综上,本研究采用宏基因组学的研究方法对肠道菌群进行测序,发现便秘患者肠黏膜菌群丰度下降,且组成与健康对照组有显著差异,主要表现为变形菌门肠杆菌的减少,拟杆菌的增加,致病机制可能是肠道菌群失调引起菌群代谢产物(组学)的改变,具有机制有待进一步研究。随着对慢性功能性便秘的微生物生态研究和治疗进一步深入,从肠道微生态的角度揭示疾病的发生机制以及利用肠道微生态进行治疗将是一个热点方向。

参考文献

- [1] LONG Y, HUANG Z, DENG Y, et al. Prevalence and risk factors for functional bowel disorders in South China: a population based study using the Rome III criteria [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2017,29(1).
- [2] 郭晓峰,柯美云,潘国宗.北京地区成人慢性便秘整群、分层、随机流行病学调查及其相关因素分析[J].*中华消化杂志*,2002,22(10):637-638.
- [3] 熊理守,陈旻湖,陈惠新.广东省社区人群慢性便秘的流行病学研究[J].*中华消化杂志*,2004,24(8):488-491.
- [4] 刘宝华.慢性便秘与结肠直肠癌的相关性[J].*中华胃肠外科杂志*,2017,20(3):255-257.
- [5] 孙楷文,李聪.肝性脑病的治疗进展[J].*大连医科大学学报*,2018,40(5):462-468.
- [6] 李福章.女性经常便秘提防乳腺癌[J].*家庭医学*,2010,(4):32.
- [7] 毕洪玲,张桂兰,何婧.便秘患者肠菌群的调查[J].*临床军医杂志*,2003,31(3):82-84.
- [8] 余英.老年性便秘与肠道菌群失调的相关性及药物干预性研究[J].*胃肠病学和肝病学杂志*,2010,19(12):1133-1135.
- [9] 郑鹏,嵇武.肠道菌群与肠道疾病的研究进展[J].*医学综述*,2014,20(24):4479-4481.
- [10] ZEEVENHOOVEN J, KOPPEN IJ, BENNINGA MA, et al. The New Rome IV Criteria for Functional Gastrointestinal Disorders in Infants and Toddlers. [J]. *Gastroenterol Hepatol Nutr*, 2017, 20(1):1-13.
- [11] STEWART C N J, VIA L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications[J]. *Biotechniques*, 1993, 14(5):748-750.
- [12] MAGOČ T, SALZBERG SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [13] BOKULICH NA, SUBRAMANIAN S, FAITH JJ, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(1): 57-59.
- [14] CAPORASO JG, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nat Methods*, 2010,7(5): 335-336.
- [15] ROGNES T, FLOURI T, NICHOLS B, et al. (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics [J]. *PeerJ*, 2016,4:e2584.
- [16] HAAS BJ, GEVERS D, EARL AM, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons [J]. *Genome Res*, 2011, 21(3): 494-504.
- [17] EDGAR RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10):996-998.
- [18] WANG Q, GARRITY GM, TIEDJE JM, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [19] 李丹丹,肖新云,邓艳玲,等.脾虚便秘造模对小鼠肠道细菌多样性的影响 [J]. *应用与环境生物学报*,2016,22 (3):437-441.
- [20] 黄林生,沈通一,秦环龙,等.慢性功能性便秘患者的肠道菌群分析[J/CD].*中华结直肠疾病电子杂志*,2017,6(2):121-126.
- [21] LIU J, CHANG R, ZHANG X, et al. Non-isoflavones Diet Incurred Metabolic Modifications Induced by Constipation in Rats via Targeting Gut Microbiota. [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:3002.