

克罗恩病与肠道菌群变化的相关性研究

陈杨芳 邹珂

[摘要] 目的 研究克罗恩病与肠道菌群变化的相关性。方法 收集临床确诊的克罗恩病患者粪便标本30份(克罗恩病组)进行16S rDNA测序,并与健康对照人群(对照组)样本30份,比较两组样品中的肠道菌种数量,以及门和属水平一级标本肠道微生态组成分析。结果 克罗恩病组患者肠道微生态菌种数量(390.13 ± 168.02)个,低于对照组(670.53 ± 221.29)个,差异有统计学意义($t=150.00, P<0.05$)。在肠道微生态门一级组成分析中,克罗恩病组从高到低分别为厚壁菌门(44.90%)、变形菌门(31.42%)、拟杆菌门(17.85%)和放线菌门(3.08%);对照组从高到低分别为厚壁菌门(52.95%)、拟杆菌门(37.62%)、变形菌门(4.53%)和放线菌门(4.11%)。在属一级组成分析中,克罗恩病组从高到低分别为大肠杆菌/志贺菌属(22.58%)、拟杆菌属(12.18%)、韦永氏球菌属(7.03%)、毛螺旋菌属(5.60%)、肠球菌属(4.79%);对照组从高到低分别为拟杆菌属(19.55%)、粪菌属(15.53%)、普氏菌属(15.26%)、罗斯氏菌属(6.87%)。两组在门和属一级的肠道微生态组成比较,差异均有统计学意义(χ^2 分别=21.96、9.16, P 均<0.05)。结论 克罗恩病患者肠道微生态多样性受到破坏,微生态组成细菌的变异性更大。

[关键词] 克罗恩病; 肠道微生态; 16S rDNA测序

Relationship between Crohn's disease and gut microbial dysbiosis CHEN Yangfang, ZOU Ke. Department of Laboratory, Wenzhou People's Hospital, Wenzhou 325000, China.

[Abstract] **Objective** To explore the relationship between Crohn's disease and gut microbial dysbiosis. **Methods** In this study, 16S rDNA sequencing was performed in 30 stool samples from clinically diagnosed Crohn's disease patients and 30 stool samples from healthy control population. The abundance distribution of the phylum and genus levels in the two samples were compared, as well as the intestinal microecological composition of specimens difference from phylum and genus levels. **Results** The number of gut microbial in patients with Crohn's disease was 390.13 ± 168.02 , which was lower than the control group (670.53 ± 221.29), the difference was statistically significant ($t=150.00, P<0.05$). In the analysis of phylum level, gut microbial were mainly composed of firmicutes (44.90%), proteobacteria (31.42%), bacteroidetes (17.85%) and actinobacteria (3.08%) in Crohn's disease group, while gut microbial were mainly composed of firmicutes (52.95%), bacteroidetes (37.62%), proteobacteria (4.53%) and actinobacteria (4.11%) in control group. In the analysis of the genus level, gut microbial were mainly composed of escherichia/Shigella (22.58%), bacteroides (12.18%), veillonella (7.03%), lachnospiraceae (5.60%) and enterococcus (4.79%) in Crohn's disease group, while gut microbial were mainly composed of bacteroides (19.55%), faecalibacteria (15.53%), prevotella (15.26%) and roseburia (6.87%) in control group. The intestinal microecological composition of specimens between Crohn's disease and healthy control were significantly different at phylum and genus levels ($\chi^2=21.96, 9.16, P<0.05$). **Conclusion** Compared with healthy population, the gut microbial diversity of Crohn's disease patients is destroyed, and the gut microbial of microecological composition have more variability.

[Key words] Crohn's disease; gut microbial; 16S rDNA sequencing

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2020.005.006

基金项目:温州市科技计划项目(Y20170211)

作者单位:325000 浙江温州,温州市人民医院检验科
(陈杨芳,消化内科(邹珂))

克罗恩病是一种慢性肠道炎症性疾病,近年其全球发病率呈上升趋势^[1]。目前认为遗传易感性、环境、肠道微生态与肠道黏膜免疫等因素参与了克

罗恩病发病^[2],但确切机制尚不清楚,肠道微生态失调对其发病至关重要^[3]。本次研究拟采用16 sRNA技术分析克罗恩病患者肠道菌群成分,与健康人群进行对比,以期指导克罗恩病的临床诊疗。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2016年1月至2019年8月在温州市人民医院治疗并确诊为克罗恩病患者30例,其中男性14例、女性16例,年龄22~76岁,平均年龄(45.63±3.12)岁;均符合2010年我国关于炎症性肠病诊断和治疗的共识意见中克罗恩病的诊断标准^[4]。获得患者知情并签署知情同意书。选取同期本院体检人群30例为对照组,其中男性16例、女性14例,年龄28~70岁,平均年龄(45.53±3.17)岁。两组在性别、年龄等一般资料比较,差异均无统计学意义(P 均>0.05)。

1.2 方法 取两组患者自然排出的新鲜粪便1 g放于无菌管中,-80℃保存备用。取0.5 g粪便样品,使用天根DNA提取试剂盒(DP328)(由北京天根生化科技有限公司生产)提取粪便中的DNA,操作过程按照试剂盒说明书操作。使用正向引物5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'和反向引物5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'对粪便中细菌基因组16S rDNA基因的V34区域进行扩增。在扩增片段两端加上Illumina测序接头序列,在Illumina Miseq测序平台上进行PE300测序,每个样品得到两个配对的原始fastq文件。比较两组样品中的肠道菌种数量,以及门和属水平一级标本肠道微生态组成分析。

1.3 统计学方法 采用SPSS 16.0统计学软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。计量资料比较采用 t 检验;计数资料比较采用 χ^2 检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肠道菌种数量 克罗恩病组中菌种数量有(390.13±168.02)个,而对照组有(670.53±221.29)个,克罗恩病组患者肠道微生态菌种数量低于对照组数量,差异有统计学意义($t=150.00, P<0.05$)。

2.2 两组标本肠道微生态组成分析 在肠道微生态门一级组成分析中,克罗恩病组从高到低分别为厚壁菌门(44.90%)、变形菌门(31.42%)、拟杆菌门(17.85%)和放线菌门(3.08%);对照组从高到低分别为厚壁菌门(52.95%)、拟杆菌门(37.62%)、变形

菌门(4.53%)和放线菌门(4.11%)。两组在门一级的肠道微生态组成比较,差异有统计学意义($\chi^2=21.96, P<0.05$)。克罗恩病组细菌共有30门,对照组细菌共有19门,克罗恩病组与对照组有17门是两者共有的,分别占各自比例56.67%,89.47%。

在属一级组成分析中,克罗恩病组从高到低分别为大肠杆菌/志贺菌属(22.58%)、拟杆菌属(12.18%)、韦永氏球菌属(7.03%)、毛螺旋菌属(5.60%)、肠球菌属(4.79%);对照组从高到低分别为拟杆菌属(19.55%)、粪菌属(15.53%)、普氏菌属(15.26%)、罗斯氏菌属(6.87%)。两组在属一级肠道微生态细菌组成上比较,差异有统计学意义($\chi^2=9.16, P<0.05$)。克罗恩病组细菌共有466个属,对照组细菌共有318个属,克罗恩病组与对照组有262个属实两者共有的,分别占各自比例56.22%,82.39%。

3 讨论

随着二代测序、宏基因组学等技术的飞速发展,克罗恩病与肠道微生态的相关研究越来越多^[5]。尽管如此,克罗恩病发病、进展与肠道微生态之间的关系仍不明确。由于取材方式(镜下活检与粪便)、患者疾病状态(缓解期与活动期)、疾病严重程度(轻型、中型、重型)等诸多因素的影响,对于克罗恩病肠道微生态失衡的研究结果往往不尽相同。目前,普遍认为克罗恩病患者肠道微生态多样性常常受到破坏。本次研究结果显示,克罗恩病患者肠道微生态菌种数量少于健康对照组($P<0.05$),表明健康对照人群肠道微生态物种多样性远远优于克罗恩病患者。在肠道微生态门一级组成分析中,克罗恩病组中主要是厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门和放线菌门为主,健康对照则主要是厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门和放线菌门。相比于健康对照,克罗恩病人群的变形菌门数量增多,而厚壁菌门、拟杆菌门数量减少($P<0.05$),与Jostins等^[6]的研究结果基本相符。属一级组成分析中,克罗恩病患者相比于健康对照人群,其肠道微生态中大肠杆菌/志贺菌属、韦永氏球菌属、肠球菌属、乳杆菌属数量明显增多,而拟杆菌属、粪菌属、普氏菌数量则明显减少($P<0.05$)。其中大肠杆菌志贺菌属已被报道与克罗恩病相关^[7],肠球菌属更是提示克罗恩病的活动期状态^[8]。健康对照人群中单个样品物种数目比较高,而在属一级的物种总数反而少,提示健康人中的肠道菌群种类比较稳定。在克罗恩病组患者

中,肠道菌群存在的数量更多,肠道菌群结果变异比对照组要明显,表明克罗恩病患者肠道微生态中细菌变异度大,也反映了克罗恩病患者肠道免疫能力下降,容易滋生杂菌。

目前克罗恩病与肠道微生态失衡两者的因果关系仍不清楚,克罗恩病可能是肠道微生态失衡所导致,即肠道菌群的变化引起慢性炎症,但反之亦然,即肠道慢性炎症下,机体肠道微生态同样可以出现明显失衡^[9]。此外,在克罗恩病状态下肠道微生态的变迁形式及其具体机制亦不清楚,后续仍需大量基础研究。

由于克罗恩病的诊断主要依据临床表现、肠镜及镜下活检,通过干预肠道微生态的异常状况,重新恢复或建立正常肠道微生态,是克罗恩病治疗的重要措施之一。目前已经有顽固性克罗恩病患者通过粪便秘植的手段治疗,并且获得良好效果的报道^[10]。

综上所述,克罗恩病患者肠道微生态多样性受到破坏,微生态组成细菌的变异性更大。尽管克罗恩病状态下肠道微生态的变迁形式及其具体机制仍不清楚,但随着检测技术的不断发展,克罗恩病发病、进展与肠道微生态之间的关系及其作用机制将会逐渐被阐明,从而为克罗恩病的诊断、治疗提供新的思路。本次研究的不足之处在与,16S技术鉴定精度不高,只能到属,后期可以使用宏基因组方法,从而鉴定差异种。

参考文献

- 1 Torres J, Mehandru S, Colombel JF, et al. Crohn's disease [J]. *Lancet*, 2017, 389(10080): 1741-1755.
- 2 Zuo T, Ng SC. The gut microbiota in the pathogenesis

- and therapeutics of inflammatory bowel disease[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2247.
- 3 Dheer R, Davies JM, Quintero MA, et al. Microbial signatures and innate immune gene expression in lamina propria phagocytes of inflammatory bowel disease patients[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2020, 9(3): 387-402.
- 4 Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH, et al. World gastroenterology organization practice guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2010, 16(1): 112-124.
- 5 Sun M, Wu W, Liu Z, et al. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases [J]. *J Gastroenterol*, 2017, 52(1): 1-8.
- 6 Jostins L, Ripke S, Weersma RK, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease[J]. *Nature*, 2012, 491(7422): 119-124.
- 7 Da Silva Santos AC, Gomes Romeiro F, Yukie Sasaki L, et al. *Escherichia coli* from Crohn's disease patient displays virulence features of enteroinvasive (EIEC), enterohemorrhagic (EHEC), and enteroaggregative (EAEC) pathotypes[J]. *Gut pathogens*, 2015, 7(1): 2-10.
- 8 Zhou Y, Chen H, He H, et al. Increased enterococcus faecalis infection is associated with clinically active Crohn disease[J]. *Medicine*, 2016, 95(39): e5019.
- 9 Wlodarska M, Kostic AD, Xavier RJ. An integrative view of microbiome-host interactions in inflammatory bowel diseases[J]. *Cell host microbe*, 2015, 17(5): 577-591.
- 10 Cui B, Feng Q, Wang H, et al. Fecal microbiota transplantation through mid-gut for refractory Crohn's disease: safety, feasibility, and efficacy trial results[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2015, 30(1): 51-58.

(收稿日期 2019-12-20)

(本文编辑 蔡华波)