

骨质疏松症患者肠道菌群多样性分析

王 颢¹ 赵和平¹ 高文杰¹ 李 鑫² 梅 洋² 乔 蓉¹ 零 雨¹ 王冀邯^{1*}

1. 西安交通大学医学院附属红会医院, 陕西 西安 710054

2. 电信科学技术第十研究所, 陕西 西安 710000

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 06-0715-04

摘要: 目的 探讨原发性骨质疏松患者肠道菌群的多样性变化。方法 收集原发性骨质疏松患者 7 例与健康对照组 7 例的粪便样本, 提取肠道菌群 DNA, 16S rRNA 基因扩增, Illumina 平台测序。对测序结果进行物种注释、多样性分析、物种差异分析。结果 原发性骨质疏松患者肠道菌群在纲、目、科、属、种、分类操作单位水平的菌群种类要多于对照组, 且两组人群在纲、目、科、属、种、分类操作单位水平的肠道菌群种类有一定的重叠性; Alpha 多样性指标中的赵氏指数及艾森指数在两组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 香农指数及辛普森指数在两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Beta 多样性中的层级聚类能够将两组样本进行鉴别区分; 骨质疏松组与对照组样本在门、科、种分类水平的部分肠道菌群含量存在差异 ($P < 0.05$), 芽单胞菌门、绿弯菌门、酸杆菌门、芽单胞菌科、丛毛单胞菌科、厌氧绳菌科、毛螺菌、优杆菌等肠道菌群在骨质疏松患者中所占比例要大于正常对照组 ($P < 0.05$)。结论 16S rRNA 测序有助于分析原发性骨质疏松患者的肠道菌群多样性变化, 为研究肠道菌群与骨质代谢的关系提供理论依据。

关键词: 骨质疏松症; 肠道菌群; 16S rRNA; 测序

Diversity analysis of intestinal microbial flora in osteoporosis patients

WANG Biao¹, ZHAO Heping¹, GAO Wenjie¹, LI Xin², MEI Yang², QIAO Rong¹, QIAN Yu¹, WANG Jihan^{1*}

1. Clinical Laboratory of Hong-hui Hospital, Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an, Shanxi 710054, China

2. The Tenth Research Institute of Telecommunications Technology, Xi'an, Shanxi 710000, China

Corresponding author: WANG Jihan, Email: 513837742@qq.com

Abstract: **Objective** To explore the diversity of intestinal microbial flora in osteoporosis patients. **Methods** Fresh fecal samples from osteoporosis patients ($n = 7$) and normal controls ($n = 7$) were collected for DNA extraction, 16S rRNA amplification and Illumina sequencing. Species annotation, diversity and species differences were analyzed based on the sequencing data. **Results** Compared with normal controls, the intestinal microbial flora species in osteoporosis patients were greater in class, order, family, genus, species and operational taxonomic units (OTUs) levels, and there was certain overlap between the two groups. Chao1 estimator and ace estimator of alpha diversity were significantly different between the two groups ($P < 0.05$), while shannon index and simpson index showed no significant differences ($P > 0.05$). Hcluster of beta diversity from the sequencing data could identify osteoporosis patients from normal controls. The flora species proportion was significant different between osteoporosis patients and normal controls in phylum, family and species level ($P < 0.05$). Proportions of Gemmatimonadetes, Chlorobacteria, Acidobacteria, Gemmatimonadaceae, Comamonadaceae, Anaerolineaceae, Lachnospira multiparus, Optimal coli, etc. in osteoporosis patients were larger than those in normal controls ($P < 0.05$). **Conclusion** 16S rRNA sequencing is a powerful tool for intestinal flora diversity analysis, which can provide theoretical foundation for the correlation study of bone metabolism and intestinal flora.

Key words: Osteoporosis; Gut intestinal microbial flora; 16S rRNA; Sequencing

基金项目: 国家自然科学基金(81601898); 西安市红会医院科研基金资助课题(YJ2016013); 中国博士后科学基金资助项目(2017M613176, 2017M613177)

* 通讯作者: 王冀邯, Email: 513837742@qq.com

随着人口老龄化的到来, 原发性骨质疏松症 (Osteoporosis, OP) 在中老年人群的发病率不断增加^[1]。充分认识骨质疏松症对早期预防和治疗骨质疏松性骨折等并发症的发生具有积极的临床意

义。近年来研究发现肠道菌群失调与骨代谢异常有一定的相关性^[2]。然而,骨质疏松患者肠道菌群结构与功能是如何改变的尚不明确。本研究基于新一代测序技术,对细菌 16S rRNA 高变区进行测序,以分析原发性 OP 患者肠道菌群的结构变化,探讨原发性 OP 肠道菌群的多样性信息。

1 材料与方法

1.1 标本采集

研究选取 2016 年 5 月至 8 月西安市红会医院收治的门诊或住院原发性骨质疏松患者 7 例及健康对照组 7 例,采集受试者新鲜粪便,迅速放入冰盒后转运至 -80 ℃ 储存。受试者无合并胃肠道、高血压、糖尿病等其他系统性疾病。要求受试对象采集标本前一周未服用抗生素、类固醇药物,未服用中草药制剂,未服用微生态制剂、酸奶等益生菌。

1.2 粪便肠道菌群 DNA 提取

依据粪便肠道菌群 DNA 提取试剂盒 QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) 操作说明书进行样本 DNA 提取。用紫外分光光度计 (NanoDrop) 检测 DNA 浓度及纯度,1% 琼脂糖凝胶电泳跑胶观察 DNA 完整性。选取 OD260/OD280 值在 1.8 ~ 2.0 之间、条带完整的 DNA 样本进行后续分析。

1.3 16S rRNA PCR 扩增及 Illumina 测序

采用 TransGen AP221-02 (TransGen) 试剂对细菌 16S rRNA 的 V3、V4 可变区进行扩增,所用引物为: 338F, 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'; 806R, 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。扩增体系为: 5 × FastPfu Buffer 4 μL、2.5 mM dNTPs 2 μL、Forward Primer (5 μM) 0.8 μL、Reverse Primer (5 μM) 0.8 μL、FastPfu Polymerase 0.4 μL、BSA 0.2 μL、Template DNA 10 ng、补充 ddH₂O 至 20 μL。扩增条件为: 95 ℃ 3 分钟; 95 ℃ 30 秒、55 ℃ 30 秒、72 ℃ 45 秒 (27 次循环); 72 ℃ 10 分钟。使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN) 切胶回收 PCR 产物,将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统 (Promega) 进行检测定量,之后按照每个样本的测序量要求,进行相应比例的混合。运用 Illumina 平台构建文库, Illumina MiSeq 测序仪进行测序。

1.4 数据分析

运用 I-Sanger 生物数据分析平台进行菌群多样性分析。包含五个分析模块: 测序数据质控,物种注释与评估, Alpha 多样性, Beta 多样性,物种差异

分析。

2 结果

2.1 一般资料

本研究收录的原发性骨质疏松患者 7 例全部为女性,年龄 61 ~ 73 岁,平均年龄 (68.20 ± 5.02) 岁; 对照组 7 例全部为女性,年龄 59 ~ 71 岁,平均年龄 (66.80 ± 4.60) 岁。两组人群性别、年龄比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.2 样本肠道菌群的物种注释

采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTUs (Operational Taxonomic Units, 分类操作单位) 代表序列进行数据库比对获取分类学信息,并分别在界 (kingdom)、门 (phylum)、纲 (class)、目 (order)、科 (family)、属 (genus)、种 (species)、分类操作单位 (OTUs) 分类水平上统计样本的群落种类数目。结果如表 1 所示。可以看出,随着分类级别由高到低,骨质疏松组在纲、目、科、属、种、OTUs 水平的群落种类数目要多于对照组。图 1 展示了两组样本分别在门、科、种、OTUs 水平的韦恩图 (Venn 图),提示两组样本在不同层次的分类水平中均有一定的重叠性,且在重叠的菌群之外,骨质疏松组含有的特异性菌群类别要多于对照组。

表 1 不同分类水平下物种个数统计

Table 1 Bacterial taxonomy at different levels			
物种分类	总样本	骨质疏松症	对照
界 (Kingdom)	1	1	1
门 (Phylum)	24	24	16
纲 (Class)	37	36	29
目 (Order)	62	60	44
科 (Family)	98	94	72
属 (Genus)	233	222	176
种 (Species)	365	340	283
OTUs	507	461	379

2.3 两组样本肠道菌群多样性分析

Alpha 多样性是指一个特定区域或者生态系统内的多样性,常用的度量标准有 chao1 estimator (赵氏指数)、shannon estimator (香农指数)、ace index (艾森指数)、simpson index (辛普森指数) 等,可以反映物种的多样性丰度信息^[3]。运用组间 T 检验的方法,得出赵氏指数及艾森指数在两组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),香农指数及辛普森指数在两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2 所示。Beta 多样性能够评估微生物群落间的差异,运用 unifracc 距离算法对距离矩阵进行层级聚类

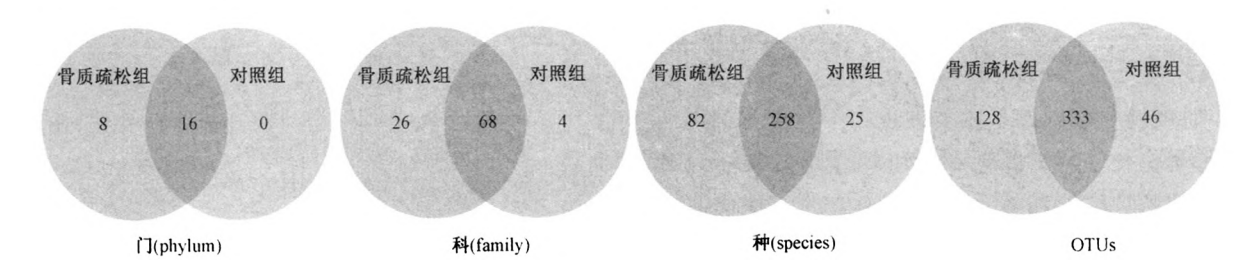


图 1 样本在门、科、种、OTUs 分类水平的韦恩图

Fig. 1 Venn diagram at different levels

注:图中绿色圆圈代表骨质疏松组,红色圆圈代表对照组。圆圈之间的重叠区域代表两组样本共有的菌群物种。
Note: The green circle represents the osteoporosis group, and the red circle represents the control group. The overlap of the two circles represents common microbial flora species of the two groups.

(hcluster)可以清楚的看出样本分支的距离远近^[4]。图 3 展示了两组样本在 OTUs 水平的聚类树,提示通过聚类可以将骨质疏松组与对照组样本进行区分。

表 2 组间 T 检验数据表			
Table 2 T test of estimators in alpha diversity			
多样性指数类型	骨质疏松组	对照组	P
赵氏指数	264.57 ± 79.36	183.42 ± 39.41	0.03213
艾森指数	263.54 ± 74.06	186.33 ± 34.83	0.02811
香农指数	3.09 ± 0.72	2.81 ± 0.62	0.4558
辛普森指数	0.12 ± 0.08	0.15 ± 0.10	0.5374

2.4 两组样本肠道菌群物种差异分析

运用 Wilcoxon 秩和检验对骨质疏松组、对照组得到的菌群进行组间差异显著性分析。表 3 展示了两组样本分别在门 (phylum)、科 (family)、种 (species) 分类水平的物种差异检验统计结果。

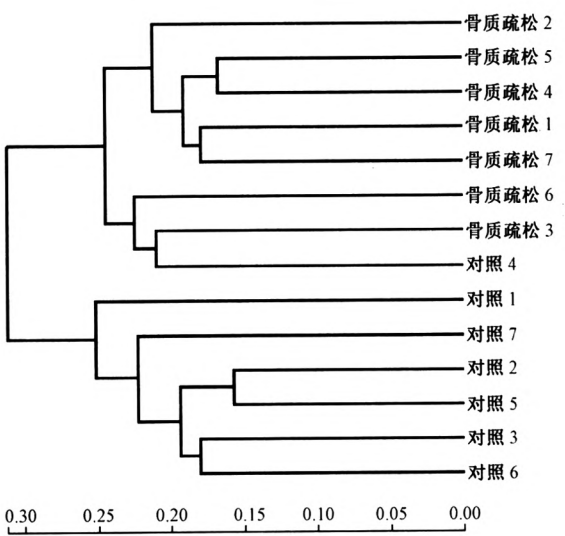


图 2 样本在 OTUs 分类水平的层级聚类图

Fig. 2 Hierarchical clustering tree at OTUs level

表 3 组间物种差异性检验统计表				
Table 3 Significance of bacterial community abundance				
分类水平	物种名称	骨质疏松组 (%)	对照组 (%)	P
门 (phylum)	芽单胞菌门	0.2662	0.0247	0.003435
	绿弯菌门	0.1114	0.009629	0.003435
	酸杆菌门	0.01776	0	0.003722
	硝化螺旋菌门	0.01033	0.0004186	0.001414
	衣原体门	0.009148	0.0004186	0.006354
	绿菌门	0.00229	0	0.01136
	芽单胞菌科	0.2662	0.0247	0.003435
科 (family)	丛毛单胞菌科	0.03792	0.003847	0.004041
	厌氧绳菌科	0.03604	0.003768	0.003435
	暖绳菌科	0.02714	0.001675	0.002222
种 (species)	毛螺菌	0.9977	0.0467	0.01475
	优杆菌	0.1347	0.06196	0.04003

注:此表比较的是两组样本在不同分类水平所具有的物种数目占该分类水平下总物种数目的百分值
Note: Comparison of the proportions of species at different levels

3 讨论

骨质疏松症临床上主要表现为腰背疼和病理性骨折,是一种以骨量降低和骨组织微结构破坏为特征、骨的脆性增加和易于骨折为特点的一种代谢性骨病^[5]。近年来,数个团队报道了肠道菌群失衡与骨质代谢的相关性^[6,7]。然而,迄今为止尚无报道揭示骨质疏松症患者肠道菌群的多样性信息。

目前人们对于样本中微生物菌群组成的了解主要依赖于传统培养、显微镜检以及细菌分离物的发酵和生化特点等方法。然而,来自患者粪便样本中绝大多数的肠道菌群不能经常规的分培养获得,导致菌群多样性基因资源难以被发现。16S rRNA基因作为是细菌鉴定的黄金标准(gold standard),被称为微生物系统分类研究中最有用和最常用的“分子钟”^[8]。在此研究中,我们对细菌16S rRNA基因中的V3、V4可变区进行基因扩增、测序。研究结果表明肠道菌群多样性分析能够有效地将骨质疏松组与对照组进行鉴别区分,且骨质疏松组肠道菌群在纲、目、科、属、种、OTUs层次的菌群种类要多于对照组。大多数菌群在两组人群中同时存在,少数菌群为骨质疏松组及对照组所特有,且对照组特异性菌群种类明显少于骨质疏松组特异性菌群。样本肠道菌群物种差异分析提示骨质疏松组与对照组在门、科、种等分类水平上的菌群存在差异,差异主要表现为骨质疏松组中的部分菌群含量要高于对照组。

综上,该研究以原发性骨质疏松症为研究对象,通过细菌16S rRNA扩增、测序、生物信息学分析,探讨了疾病状态下的肠道菌群多样性特征。然而,样本量小为该研究的一大不足,更大样本量的基础实验研究和临床研究有待进一步开展,为研究肠道菌群与骨质代谢之间的关系提供理论依据。

【参考文献】

- [1] 黄宏兴,吴青,李跃华,等. 肌肉、骨骼与骨质疏松专家共识. 中国骨质疏松杂志, 2016,22(10):1221-1229.
HUANG Hongxing, WU Qing, LI Yuehua, et al. Expert consensus on muscle, bone and osteoporosis. Chin J Osteoporos, 2016,22(10):1221-1229. (in Chinese)
- [2] 袁斯远,何芳,盛彤,等. 骨代谢与肠道菌群. 中国组织工程研究, 2015,19(42): 6838-6842.
Yuan Si-yuan, He Fang, Sheng Tong, et al. Bone metabolism and gut microbiota. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2015,19(42): 6838-6842. (in Chinese)
- [3] Jung SP, Kang H. Assessment of microbial diversity bias associated with soil heterogeneity and sequencing resolution in pyrosequencing analyses. J Microbiol, 2014,52(7): 574-580.
- [4] Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, et al. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. Appl Environ Microbiol. 2007,73(5): 1576-85.
- [5] Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. Lancet, 2006, 367(9257): 2010-2018.
- [6] Sjögren K, Engdahl C, Henning P, et al. The gut microbiota regulates bone mass in mice. J Bone Miner Res, 2012,27(6): 1357-1367.
- [7] 于婧,夏永军,王光强,等. 益生菌及益生元调节骨代谢的研究进展. 工业微生物, 2016,46(3): 56-62.
YU Jing, XIA Yong-jun, WANG Guang-qiang, et al. Research advance in role of probiotics and prebiotics in regulation of bone metabolism. Industrial Microbiology, 2016,46(3): 56-62. (in Chinese)
- [8] 刘驰,李家宝,芮俊鹏,等. 16S rRNA基因在微生物生态学中的应用. 生态学报, 2015,35(9): 2769-2788.
LIU Chi, LI Jiabao, RUI Junpeng, et al. The applications of the 16S rRNA gene in microbial ecology: current situation and problems. ACTA ECOLOGICA SINICA, 2015,35(9): 2769-2788. (in Chinese)

(收稿日期: 2016-12-25;修回日期:2017-02-05)

(上接第714页)

- [3] Diarra D, Stolina M, Polaer K, et al. Dickkopf-1 is a masterregulator of joint remodeling. Nature medicine, 2007, 13(2):156-163.
- [4] Qiang YW, Barlogie B, Rudikoff S, et al. Dkk1-induced inhibition of Wnt signaling in osteoblast differentiation is an underlying mechanism of bone loss in multiple myeloma. Bone, 2008, 42(4): 669-680
- [5] 赵薇,丁娟,芦晓红,等. 去卵巢大鼠骨质疏松症中 Sost 对 Wnt 信号通路的影响. 宁夏医学杂志, 2010, (12): 1102-1104.
ZHAO Wei, Ding Juan, Lu Xiaohong, et al. The role of sost in wnt signal pathway in ovariectomized osteoporosis rats. Ning xia Med

J,2010,(12):1102-1104.

- [6] 孙玮,张君,王乐秀,等. BMP-2 与 TNF- α 对成骨细胞增殖和分化作用的比较分析. 口腔医学, 2014,34(9): 651-654.
SUN Wei, ZHANG Jun, WANG Lexiu, et al. A comparative analysis of the effect of BMP-2 and TNF-alpha (TNF- α) on osteoblast proliferation and differentiation. Stomatology, 2014, 34(9): 651-654.
- [7] Zhang M, Yan Y, Lim YB, et al. BMP-2 modulates beta-catenin signaling through stimulation of Lrp5 expression and inhibition of beta-TrCP expression in osteoblasts. J Cell Biochem, 2009, 108(4): 896-905.

(收稿日期: 2017-03-23;修回日期:2017-03-23)