

· 论著 ·

基于 16S rRNA 高通量测序技术分析 I 型骨质疏松大鼠肠道菌群结构变化

马思聪 郝永强* 富灵杰*

上海市骨科内植物重点实验室,上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科,上海 200011

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 03-0366-06

摘要: **目的** 探讨 I 型骨质疏松大鼠肠道菌群的结构变化。**方法** 采用去势法建立 I 型骨质疏松大鼠模型 ($n=24$); 雌性 SD 大鼠随机分为 4 组 ($n=6$), 实验动物自由进食水, 12 h 光照周期。分别在去势前和去势后 4、8、12 周共 4 个时间点, 采用直接收集法采集大鼠粪便。利用 16S rRNA 高通量肠菌基因测序技术, 在 phylum (门), class (纲), order (目), family (科), genus (属), species (种) 级别分析肠道菌群的变化规律。**结果** 厚壁菌门与拟杆菌门是肠道菌群的主要构成肠菌, 无论在去势前或去势后, 二者含量之和均超过肠道菌群总量的 90%。厚壁菌门含量在去势后下降并且持续到术后 8 周, 其含量在术后 12 周显著增加 ($P<0.05$); 拟杆菌门的含量变化趋势与此相反。另外, 在纲、目级别的物种差异变化趋势较为一致。普雷沃氏菌属、Odoribacter 含量在术后 12 周明显降低 ($P<0.05$), 而螺杆菌属与 Alistipes 在术后 12 周含量显著增多 ($P<0.05$)。在种级别的分类中, 白色瘤胃球菌在术后 12 周显著增多 ($P<0.05$), 而单形拟杆菌含量显著降低 ($P<0.05$)。**结论** I 型骨质疏松大鼠的肠道菌群在不同分类级别的结构组成上发生了显著性改变, 为研究肠道菌群和骨质疏松症的关系提供理论依据。

关键词: 骨质疏松症; 肠道菌群; 去势大鼠; 16S rRNA

Analysis of the gut microbiota changes in ovariectomized rats based on 16S rRNA high throughput gene sequencing

MA Sicong, HAO Yongqiang*, FU Lingjie*

Shanghai Key Laboratory of Orthopedic Implants, Department of Orthopedic Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

* Corresponding author: FU Lingjie, Email: lingjiefuspine@163.com; HAO Yongqiang, Email: hao_yongqiang@hotmail.com

Abstract: **Objective** To investigate the changes of the gut microbiota in rats with type I osteoporosis. **Methods** Ovariectomy was used to establish the rat model of type I osteoporosis ($n=24$). Female SD rats were randomly divided into 4 groups ($n=6$ each). The experimental animals were freely access to water and food and had a 12-hour light cycle. The rat feces were collected by direct collection method before ovariectomy and at 4, 8, and 12 weeks post ovariectomy. High throughput 16S rRNA sequencing technology was used to analyze the changes of intestinal flora at phylum, class, order, family, genus, and species level. **Results** Firmicutes and Bacteroides were the main components of the intestinal flora. The total content of both bacteria was more than 90% of that of intestinal flora before and after ovariectomy. The content of Firmicutes decreased after ovariectomy and lasted until 8 weeks after operation. The content of Firmicutes increased significantly at 12 weeks after operation ($P<0.05$). The trend of change of Bacteroides was opposite. In addition, the result of species differences at class and order levels were consistent. The contents of Prevotella and Odoribacter decreased significantly at 12 weeks after operation ($P<0.05$), while the contents of Helicobacter and Alistipes increased at 12 weeks after operation ($P<0.05$). In the classification of species level, Ruminococcus albus increased significantly 12 weeks after operation ($P<0.05$), while the content of Bacteroides uniformis decreased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** The composition and structure of gut microbiota changed significantly after ovariectomy at different taxonomic levels in rats with type I osteoporosis, which might provide theoretical basis for the study of the relationship between gut microbiota and

基金项目: 上海交通大学医学院附属第九人民医院交叉学科基金项目(JYJC201809); 上海市临床医学中心(2017ZZ01023); 上海市临床重点专科。

* 通信作者: 富灵杰, Email: lingjiefuspine@163.com; 郝永强, Email: hao_yongqiang@hotmail.com

osteoporosis.

Key words: osteoporosis; gut microbiota; ovariectomized rats; 16S rRNA

近年来,从骨免疫学及骨微生物学的新概念证实了肠道菌群与骨代谢之间的紧密联系,干预与调节肠道菌群有望成为预防和治疗绝经后骨质疏松症的新策略^[1-6]。目前,骨质疏松症的肠道菌群结构改变的时间变化规律尚不清楚。本研究拟利用去势大鼠构建 I 型骨质疏松症动物模型,利用 16S rRNA 高通量测序技术分析比较去势前后的肠道菌群的结构变化并提供较为详细的实验数据,为明确骨质疏松症和肠道菌群的发病联系提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

采用 12 周龄雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,共 24 只,体重 228~265 g。由上海交通大学医学院附属第九人民医院动物实验中心提供 (SCXK2012-0002)。

1.2 I 型骨质疏松大鼠动物模型建立及粪便肠道菌群收集

SD 大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 4 组,每组各 6 只。去势前组的 6 只大鼠收集骨骼和肠菌样本。去势后 4 周组、8 周组、12 周组各 6 只大鼠采用去势法建立 I 型骨质疏松大鼠模型。具体方法是^[7]:采用戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉,麻醉生效后,大鼠放置于俯卧位并固定四肢,腰背部消毒铺巾。采用胸腰段后背直切口,从双侧肋脊角进入腹腔,依靠局部的脂肪组织辨认卵巢,顺利结扎并切除卵巢,同法处理另一侧卵巢组织。最后逐层缝合,关闭切口。术后于腹腔内注射镇痛药和抗生素,大鼠每 2 只置于单笼饲养,自由进食水,12 h 光照周期。

采用 DXA 法测量去势前组及去势 12 周组的大鼠骨密度 BMD,鉴定模型是否构建成功。收集去势前和去势后 4 周、8 周、12 周组的肠菌标本:采用直接收集法采集大鼠粪便,收集过程中严格采用无菌操作。每只大鼠收集 0.25~0.45 g,储存于 -80 °C 冰箱。

1.3 16S rRNA 高通量肠菌测序

1.3.1 基因组 DNA 抽提及 PCR 扩增:采用 DNA 提取试剂盒 E.Z.N.A.® Soil DNA Kit (D5625-01),按照操作说明对每个大鼠粪菌样本进行 DNA 提取。首先,用 1% 琼脂糖凝胶电泳对抽提的基因组 DNA 检测其完整性,并检验浓度和纯度。其次,指定 V3

及 V4 可变区域并合成带有 barcode 的特异引物。扩增体系具体为:5×FastPfu Buffer 4 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2 μL、Forward Primer (5 μmol/L) 0.8 μL、Reverse Primer (5 μmol/L) 0.8 μL、FastPfu Polymerase 0.4 μL、Template DNA 10 ng、补充 dd H₂O 至 20 μL。扩增条件为:95 °C 3 min;95 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 45 s,循环 27 次;72 °C 10 min。每个样本重复 3 次,将同一样本的 PCR 产物混合后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN, 美国) 对 PCR 产物进行切胶并回收,Tris-HCl 洗脱。利用 2% 琼脂糖进行电泳检测,参照电泳初步定量结果,利用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统 (Promega, 美国) 对 PCR 产物进行检测,按照每一个样本的测序量要求进行对应比例的混合^[8-9]。

1.3.2 文库构建与测序:区分样本后采用 Illumina 平台构建文库并进行 16S rRNA 肠菌测序。

1.4 统计学处理

16S rRNA 测序得到的 PE reads,首先根据 overlap 关系进行拼接。同时对序列质量进行质控和过滤,使用 Mothur 工具包并采用 RDP classifier 贝叶斯算法,对相似水平的 OTU (97%) 代表序列进行分类学分析。区分样本后比对 Silva 数据库在各个分类级别:phylum (门),class (纲),order (目),family (科),genus (属),species (种) 进行群落结构的统计分析。属、种级别计量资料使用 SPSS 23.0 统计软件进行分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用单因素方差分析 (ANOVA) 来检验去势前后各组的肠菌差异,骨密度计量资料使用 *t* 检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

与去势前 BMD 比较,雌性 SD 大鼠去势后 12 周的全身骨密度显著下降 ($P < 0.05$) (图 1),表明 I 型骨质疏松大鼠模型构建成功。

2.1 门 (phylum) 级别的物种差异变化

为了比较去势前和去势后不同时间点的大鼠的肠道菌群的物种差异,我们首先对比了 24 个样本 (4 组, $n = 6$) 中的肠道菌群在肠菌的门 (phylum) 级别的物种组成 (图 2)。结果显示,厚壁菌门与拟杆菌门是肠道菌群的主要构成肠菌,无论在去势前或

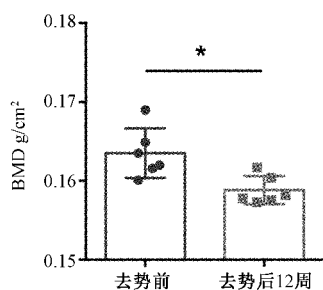


图1 去势大鼠骨质疏松模型的建立

去势前与去势后12周的大鼠全身骨密度比较 ($P < 0.05$)。

Fig.1 The establishment of ovariectomized rat model; comparison of total BMD between pre- and 12 weeks post-ovariectomy ($P < 0.05$)

去势后,二者含量之和均超过肠道菌群总量的90%。其中,厚壁菌门在去势后出现了下降的趋势,一直持续到术后8周。然而,厚壁菌门的含量随后出现了明显的增加,并且这种增加和去势前比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与此相反,拟杆菌门的含量在去势后逐渐增加,一直持续到术后8周,随后其含量显著下降。变形菌门的含量没有出现显著性的变化 ($P > 0.05$)。

2.2 纲(class)级别的物种差异变化

纲是隶属于门的分类级别,通过比较纲级别的

物种差异能够进一步细化肠菌变化特征(图3)。梭菌纲(厚壁菌门)和拟杆菌纲(拟杆菌门)是含量最大的肠道菌群。梭菌纲的含量变化趋势和厚壁菌门基本一致,在去势后下降并持续到术后8周;同样,在术后12周其含量显著增高。类似的,拟杆菌纲的含量变化趋势和拟杆菌门趋于一致。芽孢杆菌纲(厚壁菌门)在去势术后8周显著增多。

2.3 目(order)级别的物种差异变化

在目级别的肠道菌群构成上,梭菌目(梭菌纲)和拟杆菌目(拟杆菌纲)则是主要的肠道菌群(图4)。梭菌目的变化规律和梭菌纲、厚壁菌门在各自级别的肠道菌群构成的变化规律趋于一致。而拟杆菌目的变化规律则和拟杆菌纲、拟杆菌门在各自级别的变化趋势相似。另外,乳杆菌目在去势12周时其含量显著增加。

2.4 科(family)级别的物种差异变化

随着肠菌分类级别的细化,去势大鼠的科级别的肠道菌群出现了较为复杂的变化(图5)。首先,毛螺旋菌科(梭菌目)、s24-7(拟杆菌目)和瘤胃菌球科(梭菌目)是肠道菌群的主要构成肠菌。其次,毛螺旋菌科(去势前:53.1%)在去势后其含量显著降低(去势后4周:22.0%),一直持续到术后8周(24.4%),随后其含量逐渐增高(去势后12周:

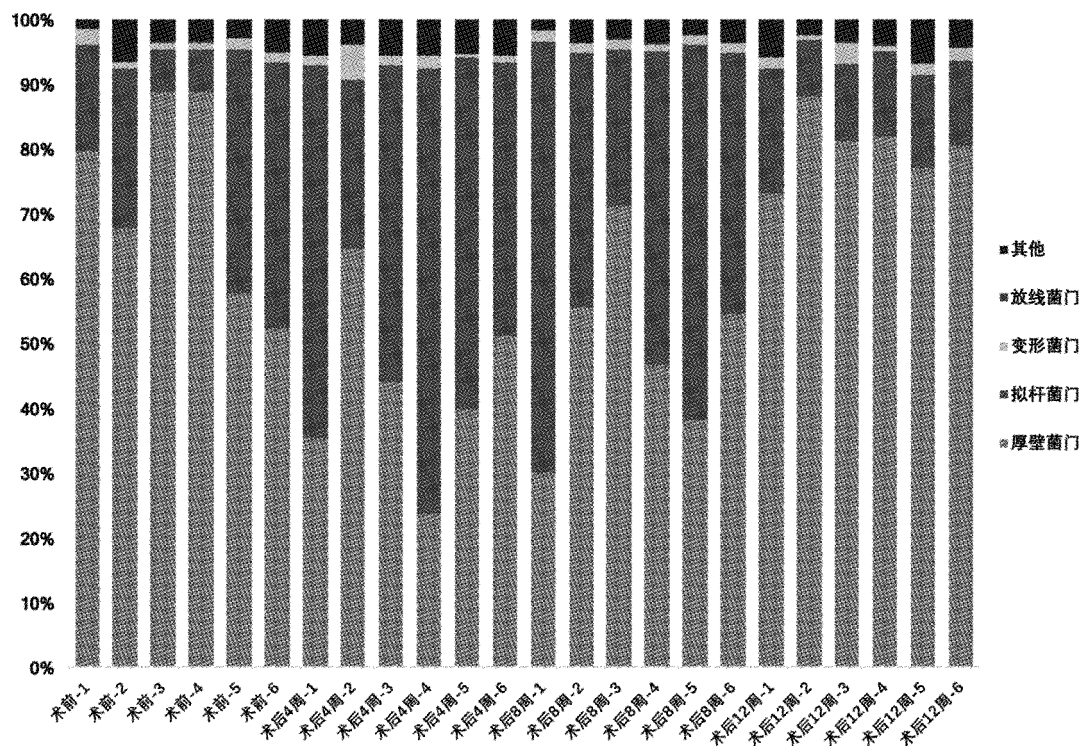


图2 门(phylum)级别的物种差异变化

Fig.2 Abundance difference in phylum level of gut microbiota

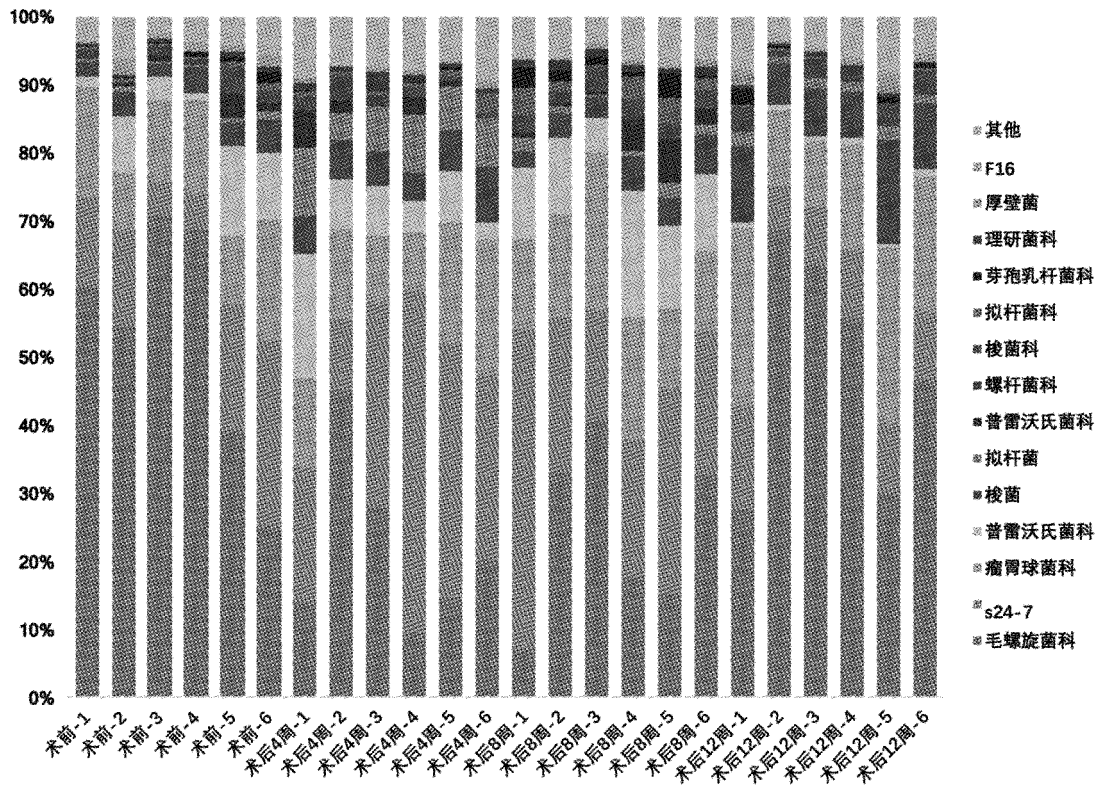


图 5 科 (family) 级别的物种差异变化

Fig.5 Abundance difference in family level of gut microbiota

级别差异(表 1)。与术前比较,普雷沃氏菌属(普雷沃氏菌科)、*Odoribacter* 含量在术后 12 周明显降低($P<0.05$)。而螺杆菌属(螺杆菌科-弯曲菌目-ε 变形菌纲-变形菌门)与 *Alistipes* 在术后 12 周含量增多($P<0.05$)。在种级别的分类中,白色瘤胃球菌在术后 12 周显著增多($P<0.05$)。相反,单形拟杆菌含量显著降低($P<0.05$)。见表 2。

表 1 术前与术后 12 周属级别的物种含量差异($\bar{x}\pm s$)Table 1 Abundance difference in genus level of gut microbiota between pre-and 12 weeks post-ovariectomy($\bar{x}\pm s$)

项目	术前/(%)	术后 12 周/(%)	P 值
普雷沃氏菌属	6.1670±2.0430	0.7633±0.0747	0.045
螺杆菌属	0.0416±0.0130	0.3933±0.1146	0.027
YS2	0.0516±0.0101	0.0200±0.0073	0.031
<i>Odoribacter</i>	0.0600±0.0109	0.0233±0.0055	0.019
<i>Alistipes</i>	0.0216±0.0047	0.1300±0.0353	0.027

表 2 术前与术后 12 周种级别的物种含量差异($\bar{x}\pm s$)Table 2 Abundance difference in species level of gut microbiota between pre-and 12 weeks post-ovariectomy($\bar{x}\pm s$)

项目	术前/(%)	术后 12 周/(%)	P 值
白色瘤胃球菌	0.2139±0.0493	0.4368±0.0616	0.006
单形拟杆菌	0.0165±0.0085	0.0083±0.0021	0.005

3 讨论

胃肠道内富含人体内种类最多、密度最大的微生物群落,按照界、门、纲、目、科、属、种分类^[10]。阐明肠道菌群及其代谢产物在绝经后骨质疏松症发病过程中的变化规律和结构特征,是深入了解肠道菌群调节机制的重要前提。临床研究发现,原发性骨质疏松症患者的肠道菌群 OTUs 数量与 Alpha 多样性高于对照组^[8-9]。然而,也有研究显示低骨量人群的 OTUs 和肠菌种类的数量低于对照组^[11]。上述研究结果不一致的原因可能和其临床试验的入排标准、病例数量、性别比例等差异有关^[12]。目前,肠道菌群在绝经后骨质疏松症发病过程中的时间变化规律尚未完全阐明。

本研究通过去势法构建 I 型骨质疏松动物模型,其优点是该模型是经典的 I 型骨质疏松症的实验研究使用的动物模型,其试验动物间的个体差异较小。本研究发现,雌性大鼠去势后,厚壁菌门的梭菌纲的梭菌目的毛螺旋菌科的螺杆菌属,以及厚壁菌门的梭菌纲的梭菌目的瘤胃球菌科的白色瘤胃球菌属,其含量在去势后显著增多,而拟杆菌门的拟杆菌纲的拟杆菌目的普雷沃氏菌科的普雷沃氏菌属含量显

著下降。

16S rRNA 测序技术是目前微生物系统实验研究中鉴定肠道菌群的常用方法。我们发现在去势后12周时,白色瘤胃球菌含量显著增多,而单形拟杆菌的含量显著降低,其差异具有统计学意义。虽然本研究不能证实骨质疏松症的发生和这些肠菌含量变化之间的因果关系,未来应进一步利用肠菌移植等方法研究这些肠菌对骨质疏松症发生的作用与影响,阐明特异肠菌对机体骨量变化的影响。在种(species)级别的肠道菌群测序上,宏基因组学的优势在于其测序程度更深以及可测序列更加完整,但价格昂贵。因此,未来需进一步结合宏基因组学测序技术进一步验证肠道菌群与骨质疏松症的内在关系。

综上所述,I型骨质疏松的肠道菌群数量和结构组成在门、纲、目等级别上发生了显著性改变,为研究肠道菌群和骨质疏松症的关系提供理论依据。

【参 考 文 献】

- [1] Black DM, Rosen CJ. Clinical practice. postmenopausal osteoporosis[J]. N Engl J Med, 2016, 374(3):254-262.
- [2] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2017) [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2017, 10(5):413-443.
- [3] 中华医学会骨科学分会骨质疏松学组. 骨质疏松性骨折诊疗指南[J]. 中华骨科杂志, 2017, 37(1):1-10.
- [4] Ohlsson C, Sjögren K. Osteomicrobiology: a new cross-disciplinary research field[J]. Calcif Tissue Int, 2018, 102(4):426-432.
- [5] Hsu E, Pacifici R. From Osteoimmunology to osteomicrobiology: how the microbiota and the immune system regulate bone[J]. Calcif Tissue Int, 2018, 102(5):512-521.
- [6] Jones RM, Mulle JG, Pacifici R. Osteomicrobiology: The influence of gut microbiota on bone in health and disease[J]. Bone, 2018, 115:59-67.
- [7] Coutel X, Delattre J, Marchandise P, et al. Mandibular bone is protected against microarchitectural alterations and bone marrow adipose conversion in ovariectomized rats[J]. Bone, 2019, 127:343-352.
- [8] 王颀, 赵和平, 高文杰, 等. 骨质疏松症患者肠道菌群多样性分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(6):715-718.
- [9] Wang J, Wang Y, Gao W, et al. Diversity analysis of gut microbiota in osteoporosis and osteopenia patients[J]. Peer J, 2017, 5:e3450.
- [10] Ibáñez L, Rouleau M, Wakkach A, et al. Gut microbiome and bone[J]. Joint Bone Spine, 2019, 86(1):43-47.
- [11] Li C, Huang Q, Yang R, et al. Gut microbiota composition and bone mineral loss-epidemiologic evidence from individuals in Wuhan, China[J]. Osteoporos Int, 2019, 30(5):1003-1013.
- [12] Das M, Cronin O, Keohane DM, et al. Gut microbiota alterations associated with reduced bone mineral density in older adults[J]. Rheumatology (Oxford), 2019, 58(12):2295-2304.

(收稿日期: 2019-09-11;修回日期: 2019-10-15)