

· 基础研究 ·

兔膝骨性关节炎模型肠道菌群的 16S rRNA 检测分析[△]

梅其杰¹, 徐文飞¹, 延伟伟², 袁长深¹, 郭锦荣¹, 黄西龙¹, 曾超¹, 彭俊青^{3*}

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 广西南宁 530023; 2. 广西中医药大学, 广西南宁 530200;
3. 华中科技大学同济医学院附属梨园医院, 湖北武汉 430077)

摘要: [目的] 探讨肠道菌群在兔膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 与正常对照之间的差异。[方法] 20 只大耳白兔, 随机分成 2 组, 12 只关节内注射 2% 木瓜蛋白酶溶液制备 KOA 模型, 另外 8 只关节内注射等量生理盐水为正常对照。采集动物粪便样本, 利用 16S rRNA 基因靶向测序技术进行检测, 分析各自粪便中肠道菌群的多样性及分布情况。[结果] KOA 组粪便含有 20 188 种物种 (ASV/OTU), 而对照组含有 14 029 种 (ASV/OTU)。KOA 组在粪便菌群的门、属水平上显著丰富于对照组 ($P < 0.05$), 但两组在菌群纲、目、科、种水平上的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。KOA 组在门水平以厚壁菌、拟杆菌的数量最多, 在属水平上以瘤胃球菌属及颤螺菌属数量最多; 其中明显的标志物种为变形杆菌。菌群主要与代谢通路密切相关, 其中在碳水化合物代谢、氨基酸代谢及辅助因子和维生素代谢上极为突出。[结论] KOA 组与对照组的肠道菌群之间存在一定差异, 标志物种为变形杆菌。

关键词: 16S rRNA, 肠道菌群, 变形杆菌, 膝骨关节炎

中图分类号: R684.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2022) 06-0528-05

16S rRNA detection and analysis of gut microbiota in osteoarthritis model in rabbits // MEI Qi-jie¹, XU Wen-fei¹, YAN Wei-wei², YUAN Chang-shen¹, GUO Jin-rong¹, HUANG Xi-long¹, ZENG Chao¹, PENG Jun-qing³. 1. The First Affiliated Hospital, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 2. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 3. Liyuan Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, China

Abstract: [Objective] To investigate the difference of gut microbiota between knee osteoarthritis (KOA) and normal control in rabbits. [Methods] A total of 20 Japanese white rabbits were randomly divided into 2 groups, of them, 12 animals were injected 2% papain solution intraarticularly to prepare KOA model, while the other 8 rabbits were injected normal saline intraarticularly as normal control. Fecal samples were collected and detected by 16S rRNA gene targeted sequencing technology to analyze the diversity and distribution of gut microbiota in their feces. [Results] The KOA group had a total of 20 188 species (ASV/OTU), while the control group was of 14 029 species (ASV/OTU). The fecal flora in KOA group was significantly more abundant than that in the control group in levels of phylum and genus ($P < 0.05$), but there were no statistical significant differences in the levels of class, order, family and specie between the two groups ($P > 0.05$). The KOA group had the greatest number of firmicutes and bacteroides at phylum level, and ruminococcus and spironella flutter at genus level, with an obvious marker species of proteus. The gut microbiota was closely related to metabolic pathways, especially carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, cofactor and vitamin metabolism. [Conclusion] There are some differences in gut microbiota between KOA group and control group, and proteus is the marker species.

Key words: 16S rRNA, gut microbiota, proteus, knee osteoarthritis

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种常见的老年性关节疾病, 以反复关节疼痛、活动受限、软骨退变为主要特征^[1]。据流行病学研究发现, 65 岁以上老年人 KOA 的发病率可达 50%, 随着人口老龄化的加重, KOA 的发病率越来越高^[2, 3], 从而导

致致残率及经济压力更加沉重, 然而目前其发病机制尚未明确。有研究发现, KOA 可能与肠道菌群 (gut microbiota, GMB) 的变化有关, 虽然没有直接证据表明 GMB 是否通过免疫系统影响 KOA 的发生和发展, 但两者有共同的危险因素, 如饮食、年龄、肥

DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2022.06.10

[△]基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目 (编号: 82060875, 82160912); 广西高校中青年骨干教师科研基础能力提升项目 (编号: 2021KY0298)

作者简介: 梅其杰, 副主任医师, 研究方向: 骨关节炎防治研究, (电话) 15177132717, (电子信箱) 2236976228@qq.com

* 通信作者: 彭俊青, (电子信箱) pjq515664054@163.com

胖、炎性疾病等^[4-10]。作者的前期研究显示, GMB 可能参与了 KOA 发病机制^[11], 然而目前却尚无试验研究来进一步证实此观点, 故本文拟通过对 KOA 兔进行肠道菌群基因测序, 观察兔 KOA 模型与 GMB 变化的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

成年健康 CV 级日本大耳白兔 20 只(产地: 南宁), 体重 2~3 kg, 雌雄各半, 由广西广得生物科技有限公司提供(许可证号: SCXK 桂 2017-0001)。按随机数字表法随机分成 2 组, KOA 组 12 例, 对照组 8 例, 分别编号。

1.2 膝关节关节炎模型建立

兔子先在 SPF 级实验室适应 3 d。将兔仰卧固定于兔台上, 用剪刀剃掉右后腿膝关节周围毛发, 露出皮肤, 碘伏棉签消毒, 轻轻弯曲右膝关节, 自膝关节外侧膝眼进针, 刺入关节腔内, 先回抽, 确定针头位于关节腔内后, KOA 组于 1、4、7 d 注入含 2% 木瓜蛋白酶溶液 0.5 ml, 注射完后屈伸膝关节 20 次左右, 以使所注射溶液能均匀浸润膝关节腔。对照组相同方法注射 0.5 ml 生理盐水。注射后每天驱使兔活动 20 min。首次关节腔注射木瓜蛋白酶 2 周后即可获得稳定的 KOA 模型。

1.3 样本采集与 DNA 提取

将兔 KOA 模型造模成功后, 未做特殊药物干预, 于第 15 d 早上, 统一收集两组兔的粪便, 将标本置于 -80°C 的干冰包装袋, 按测序公司的要求, 24 h 转送至其实验室。采用二代 16S rRNA 测序技术对粪便样本进行检测。对所有采集的粪便样本, 进行总 DNA 提取, 并利用 Nanodrop 法进行定量检测, 同时运用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳试验鉴定提取质量。

1.4 DNA 扩增

采用全式金公司的 Pfu 高保真 DNA 聚合酶, 以微生物核糖体 RNA 或特定基因片段为靶点, 通过设计相应的引物并添加样本特异性 Barcode 序列, 进而对 rRNA 基因可变区或特定基因片段进行 PCR 扩增。同时运用磁珠的吸附作用对扩增产物进行纯化回收, 采用荧光试剂 (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit) 对回收产物进行荧光定量, 按照每个样本的测序量需求, 对各样本进行相应比例的混合。

1.5 文库分析

采用美国 Illumina 公司的 TruSeq Nano DNA LT

Library Prep Kit 制备测序文库, 首先对上述扩增产物进行序列末端修复, 通过试剂盒中的 End Repair Mix 2 切除 DNA 序列 5' 端的突出碱基, 同时添加一个磷酸基团、补齐 3' 端的缺失碱基; 在 DNA 序列的 3' 端添加 A 碱基以防止 DNA 片段自连, 同时保证目标序列能与测序接头相连(测序接头 3' 端有一个突出的 T 碱基); 在序列 5' 端添加含有文库特异性标签(即 Index 序列)的测序接头, 使 DNA 分子能被固定在 Flow Cell 上; 采用 BECKMAN AMPure XP Beads, 通过磁珠筛选去除接头自连片段, 纯化添加接头后的文库体系; 对上述连上接头的 DNA 片段进行 PCR 扩增, 从而富集测序文库模板, 并采用 BECKMAN AMPure XP Beads 再次纯化文库富集产物; 通过 2% 琼脂糖凝胶电泳, 对文库做最终的片段选择与纯化。

1.6 DNA 测序

上机测序前, 先对文库在 Agilent Bioanalyzer 上进行质检, 后采用 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 在 Promega QuantiFluor 荧光定量系统对文库进行定量分析, 筛选合格的文库; 将合格的上机测序文库梯度稀释后, 根据所需测序量按相应比例混合, 并经 NaOH 变性为单链进行上机测序。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计软件对实验数据进行统计学处理, 计量资料 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数对比采用独立样本 *t* 检验方法; 计数资料采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 样本的差异性分析

本项目纳入的研究样本共 20 例, 其中 KOA 组 12 例, 对照组 8 例, 结果显示, KOA 组共含有 20 188 种物种 (ASV/OTU), 而对照组含有 14 029 种 ASV/OTU, 其中两者共有的 ASV/OTU 有 3 924 个, 详见图 1a。使用 GraPhlAn 工具, 展示各 ASV/OTU (样本总体中的) 在进化树中的位置, 并标出各分类单元。画出样本中相对丰度在 0.01% 以上的 ASV/OTU, 详见图 1b。将两组菌群所含的物种进行比较, 结果见表 1, 两组间在门、属水平的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), KOA 组在门、属水平上菌群均较对照组更为丰富; 而在纲、目、科、种水平的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明 KOA 组在纲、目、科、种水平上菌群与对照组相当。

表 1 KOA 组与对照组物种分类 (种, $\bar{x} \pm s$) 与比较

物种层级	KOA 组	对照组	P 值
门	10.92±0.90	9.88±0.64	0.007
纲	19.08±2.23	17.88±1.46	0.161
目	26.67±3.42	24.75±3.15	0.216
科	42.75±6.51	40.00±6.51	0.213
属	54.75±7.23	48.88±3.40	0.047
种	25.83±3.95	28.13±2.23	0.116

此外,为深入研究韦恩图中的物种分类分布(各个区域)情况,ASV/OTU 的数量使用柱状图表述,研究发现在门水平上:厚壁菌、拟杆菌的数量最多,在属水平上:瘤胃球菌属及颤螺菌属数量最多,详见图 1c;而在各个区域的物种丰度组成上发现:厚壁菌、拟杆菌的物种丰度较广(门水平上);同时发现瘤胃球菌属及多形杆状菌物种丰度广(属水平上),详见图 1d。

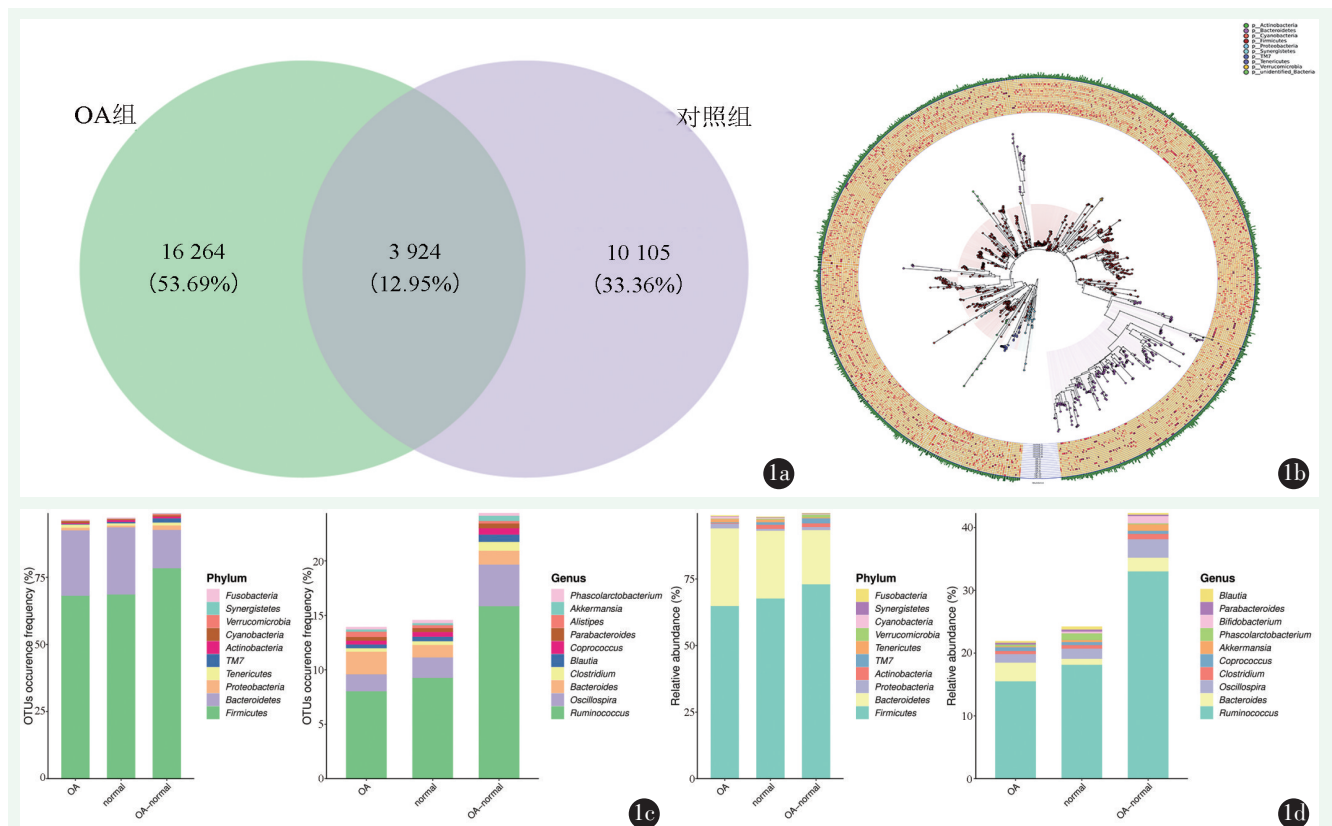


图 1 两组样本差异性分析图 1a: ASV/OTU 的韦恩图 1b: 含显著性分析的 GraPhlAn 进化树图 1c: 韦恩图不同区域的 ASV/OTU 数目统计柱状图 1d: 韦恩图不同区域的 ASV/OTU 丰度柱状图

2.2 物种组成热图

采用热图进行物种组成分析比较样本间的物种组成差异:将样本中平均丰度前 50 位的属的丰度数据绘制热图,发现 OA 组的物种组成较对照组的更加丰富,尤其在普雷沃菌属、不动杆菌属、厌氧菌属、绿脓杆菌属、劳森氏菌属等菌群。详见图 2a。

2.3 LEfSe 分析

LEfSe 分析是一种常见的差异分析方法,不仅可以对所有分类水平同时进行差异分析,而且更强调寻找分组之间稳健的差异物种,即标志物种(biomarker)。本研究发现 KOA 组的变形杆菌、 α -变形菌、弧菌科等差异显著,其中变形杆菌为 KOA 组的 GMB 标志物种,详见图 2b。

2.4 关联网络分析

基于微生物之间相互关系进行样本网络推断分析(network analysis)构建样本的关联网络图,其中每个点代表群落中的一个 ASV/OTU;两个点之间的连接线代表所连接的两个点之间的正相关或负相关的分布趋势。研究发现 KOA 组与对照组均含有丰富的菌群,详见图 2c。

2.5 代谢通路分析

利用 KEGG 数据库对样本从代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞进程、生物体系统和人类疾病 6 个方面进行二级功能通路丰度分析,发现菌群样本主要与代谢通路密切相关,其中在碳水化合物代谢、氨基酸代谢及辅助因子和维生素代谢上极为突

出；详见图 2d。

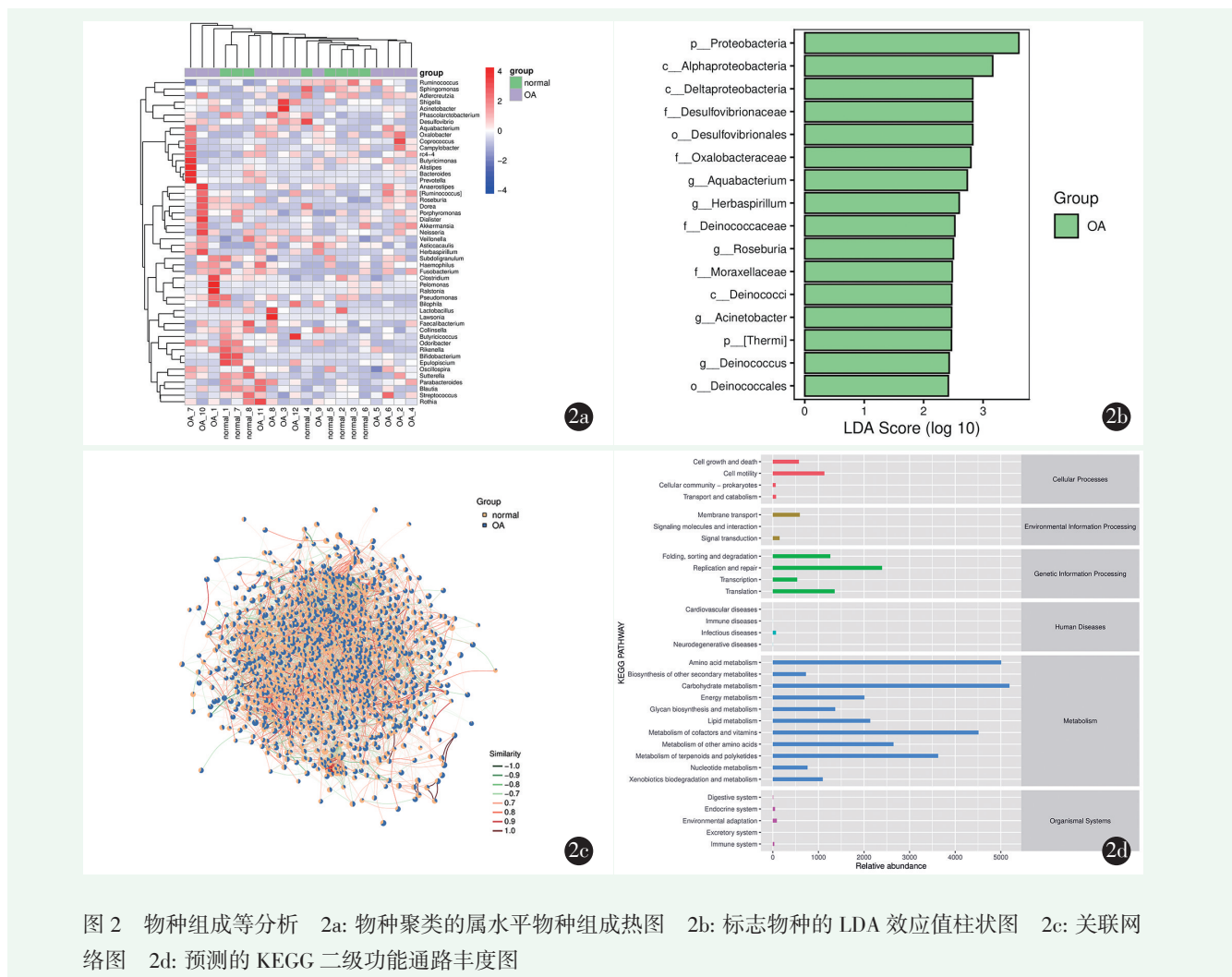


图 2 物种组成等分析 2a: 物种聚类的属水平物种组成热图 2b: 标志物种的 LDA 效应值柱状图 2c: 关联网络图 2d: 预测的 KEGG 二级功能通路丰度图

3 讨论

众所周知，在人类肠道中存在的大量微生物菌落对人类健康起到至关重要的调节作用。GMB 不仅对消化系统产生影响，而且能调节机体的代谢、免疫、炎症状态^[12, 13]。有研究显示，通过利于运动对 GMB 的重塑作用及对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 及 Toll 样受体 4 (toll-like receptor4, TLR4) 信号通路的调控，因 LPS 能激活 TLR4 受体蛋白及下游蛋白 NF- κ B 这两条途径^[14]。另外，研究表明 GMB 在痛风性关节炎的发病机制扮演了重要角色，可能因其能够抑制抑炎因子的释放，以及促进促炎因子的释放^[15]。同时，有研究通过探讨 GMB、肠道微环境、脑肠轴、代谢免疫与骨关节炎的关系，发现 GMB 影响中药的疗效，中药可影响 GMB 平衡，且证实 GMB 与骨关节炎密切相关^[16]。

但是，GMB 中哪些菌属在 KOA 起作用呢？本研究门、属水平发现：KOA 组在门、属水平上菌群均较对照组丰富；在纲、目、科、种水平发现：KOA 组在纲、目、科、种水平上菌群与对照组相当。进一步研究发现，在门水平上：厚壁菌、拟杆菌的数量最多；在属水平上：瘤胃球菌属及颤螺菌属数量最多；在 ASV/OTU 丰度图上，结果亦是如此。同时，OA 组的标志物种为变形杆菌。这一结果与大多数的研究类似^[17-21]。因此，作者认为肠道菌群中的变形杆菌有可能成为研究 KOA 的标志物。

另外，作者前期的研究发现 miRNA 在 KOA 发生发展中的作用明显。而外泌体在 OA 的深入研究，亦为 OA 软骨再生提供了新思路^[22]。已有学者在 miRNA-21^{-/-}小鼠模型上，发现 miRNA 具有正向或负向调控肠道的免疫调节功能和屏障功能，从而起到重要调节作用^[23, 24]；另外，还发现 GMB 也可作为 miRNA 和宿主之间的桥梁。因其可通过改变 miRNA

的表达水平进而与宿主相互作用。那么,解析 miRNA 与 GMB 相互作用的机制,将在 KOA 发病机制上提供新的思路和方法。

GMB 和宿主关系为相互影响,可视为两者之间的动态平衡。GMB 对人体代谢与免疫系统影响,体现在健康状态及疾病的发生发展中;而机体的行为(生活方式、饮食、运动习惯等)又反作用影响 GMB,导致 GMB 的多样性。虽然,当前已有许多研究发现了某些疾病伴随着肠道菌群的改变而改变,且肠道菌群发生变化也会影响疾病的发展进程及其转归;但是,研究均未能阐明其中的因果关系。Xu 等^[25]在对亚洲人群的肠道菌群研究后,发现微生物与疾病,并不能简单定义谁是因谁是果。在不同的复杂疾病中,肠道菌群时而为因,时而为果,需要个案分析。

就目前而言,对肠道菌群的具体结构和功能及其影响因素和作用机制的深入研究仍将是未来肠道菌群研究的重点方向。本研究为实验兔的研究,与大多数的研究(无菌小鼠为实验对象)一样,仅仅是一种病态的动物模型,其结果能否适用于临床还是未知的,为此,本研究团队将在下一阶段对 KOA 人体的肠道菌群群落分布、物种丰度以及肠道菌群代谢产物进行研究,为肠道菌群相关疾病的发生机制及其原理提供新思路、新方法。

参考文献

- [1] 中华医学会骨科学分会关节外科学组,王坤正.骨关节炎诊疗指南(2018年版)[J].中华骨科杂志,2018,38(12):705-715.
- [2] Kulkarni P, Martson A, Vidya R, et al. Pathophysiological landscape of osteoarthritis [J]. *Adv Clin Chem*, 2021, 100 (1): 37-90.
- [3] Peat G, Thomas MJ. Osteoarthritis year in review 2020: epidemiology & therapy [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2021, 29 (2): 180-189.
- [4] Mcquade JL, Daniel CR, Helminck BA, et al. Modulating the microbiome to improve therapeutic response in cancer [J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20 (2): 77-91.
- [5] Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease [J]. *Nature*, 2011, 472 (7341): 57-63.
- [6] Li J, Zhao F, Wang Y, et al. Gut microbiotadysbiosis contributes to the development of hypertension [J]. *Microbiome*, 2017, 5 (1): 14.
- [7] Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders [J]. *Cell*, 2013, 155 (7): 1451-1463.
- [8] Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16 (6): 341-352.
- [9] Sanna S, Van Zuydam NR, Mahajan A, et al. Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases [J]. *Nat Genet*, 2019, 51 (4): 600-605.
- [10] Torres PJ, Siakowska M, Banaszewska B, et al. Gut microbial diversity in women with polycystic ovary syndrome correlates with hyperandrogenism [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103 (4): 1502-1511.
- [11] 徐文飞,梅其杰,袁长深,等.探讨肠道菌群对膝关节炎治疗的影响[J].中国微生态学杂志,2021,33(3):369-373.
- [12] Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, et al. Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease [J]. *Immunol Rev*, 2017, 279 (1): 70-89.
- [13] Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: shaping our immune responses throughout life [J]. *Tissue Barriers*, 2017, 5 (4): e1373208.
- [14] 刘欣,郭宇冰,楚治良,等.肠道菌群的影响因素研究进展[J].结直肠肛门外科,2020,26(4):393-397.
- [15] 李君霞,王茂杰,黄闰月,等.痛风肠道微生态研究现状与思考[J].免疫学杂志,2018,34(11):1008-1012.
- [16] Wu YR, Kuang GY, Lu FG, et al. Pathological relationship between intestinal flora and osteoarthritis and intervention mechanism of Chinese Medicine [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25 (9): 716-720.
- [17] 司景磊,黄叶,陈奎蓉,等.基于16S rRNA测序揭示杜洛克猪早期体重与肠道微生物的关系[J].中国畜牧兽医,2021,48(1):190-199.
- [18] 白雪松,刘鹤,宋岩,等.基于16S rRNA技术分析当归超微粉对小鼠肠道菌群多样性的影响[J].现代食品科技,2021,37(4):25-32,251.
- [19] 潘艳艳,范友芬,李吉良,等.基于16S核糖体RNA高通量测序的特重度烧伤患者肠道菌群动态变化分析[J].中华烧伤杂志,2020,36(12):1159-1166.
- [20] 董万涛,宋敏,巩彦龙,等.基于16S rRNA序列分析糖皮质激素诱导大鼠骨质疏松模型肠道菌群的变化[J].中国骨质疏松杂志,2020,26(9):1291-1296,1339.
- [21] 王丽玮,徐浩翔,段志敏,等.基于16S rRNA基因测序的寻常型银屑病肠道菌群差异研究[J].中华皮肤科杂志,2020,53(9):692-697.
- [22] 寇龙威,郭珈宜,李峰,等.外泌体在修复骨关节炎软骨损伤中的应用[J].中国矫形外科杂志,2020,28(22):2073-2076.
- [23] Johnston DGW, Williams MA, Thaiss CA, et al. Loss of microRNA-21 influence the gut microbiota, causing reduced susceptibility in a murine model of colitis [J]. *J Crohns Colitis*, 2018, 12 (7): 835-848.
- [24] Teng Y, Ren Y, Sayed M, et al. Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 24 (5): 637-652.
- [25] Xu FZ, Fu YQ, Sun TY, et al. The interplay between host genetics and the gut microbiome reveals common and distinct microbiome features for complex human diseases [J]. *Microbiome*, 2020, 8 (1): 145.

(收稿:2021-07-20 修回:2022-02-09)

(同行评议专家:李宏宇)

(本文编辑:宁桦)