

·论 著·

类风湿关节炎患者肠道菌群的分布及其临床意义

康海英 吴君平 张马军 王云卿

[摘要] 目的 探究肠道菌群在类风湿关节炎(RA)发生中的分布及其临床意义。方法 选取RA患者20例和同期健康对照组20例作为研究对象。对两组患者的肠道菌群进行高通量测序,比较两组的OTU菌群丰度、 α -多样性、 β -多样性、菌群分布及LEfSe差异分析。结果 RA组的OTU菌群丰度、 α -多样性、 β -多样性低于对照组。RA组的 *Intestinibacter* 菌属的丰度增加,乳杆菌属(*Lactobacillus*)、大肠志贺氏杆菌(*Escherichia shigella*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、*Candidatus Saccharimonas* 菌属、*Odoribacter* 菌属、肠球菌属(*Enterococcus*)丰度降低。结论 RA患者肠道菌群丰度明显低于健康人,部分菌群存在明显差异,改变肠道菌群结构可能是今后RA治疗的一个研究方向。

[关键词] 肠道菌群; 类风湿关节炎; 高通量测序

The distribution and clinical significance of intestinal flora in the pathogenesis of rheumatoid arthritis KANG Haiying, WU Junping, ZHANG Majun, et al. Department of Rheumatology and Immunology, the Fifth People's Hospital of Yuhang District, Hangzhou 311100, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the distribution and clinical significance of intestinal flora in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Methods** Totally 20 patients with rheumatoid arthritis (RA) and 20 healthy control groups were selected as the study subjects. High-throughput sequencing was performed on the intestinal flora of the two groups, and the abundance, α -diversity, β -diversity, distribution of OTU flora and LEfSe differences of the two groups were compared. **Results** The intestinal flora abundance, α -diversity and β -diversity of RA group were lower than those of control group. The abundance of *Intestinibacter* increased, the abundance of *Lactobacillus*, *Escherichia shigella*, *Klebsiella*, *Candidatus Saccharimonas*, *Odoribacter* and *Enterococcus* decreased in the RA. **Conclusion** The intestinal flora abundance of RA patients is obviously lower than that of healthy people, and some of the flora have obvious differences. Therefore, changing the intestinal flora structure may be a research direction for the treatment of RA in the future.

[Key words] intestinal flora; rheumatoid arthritis; high-throughput sequencing

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性的,以骨质破坏、关节功能丧失及慢性滑膜炎为特征的自身免疫性疾病^[1]。其发病机制尚未明了,可能与遗传和内外环境因素有关^[2]。随着新一代高通量测序技术的发展,微生物与RA的关系也受到临床科研工作者越来越多的关注,尤其是肠道

微生物群。有研究表明,肠道菌群紊乱与RA的发生和发展密切相关^[3]。本研究采用高通量测序技术分析RA人群与正常人群中肠道菌群的分布特征及差异,旨在为今后RA的防治提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2018年1月至2020年7月在杭州市余杭区第五人民医院就诊的RA患者20例为RA组。本次研究经过本院伦理委员会批准,所有受试者签署知情同意书。排除:①既往接受过抗风湿治疗的患者;②接受过激素治疗的患者;③近期3个月内接受过抗生素治疗的患者;④应用过胃肠动力药的患者;⑤合并有胃肠炎病史的患

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2021.004.006

基金项目:杭州市余杭区医疗卫生科研、重点学科建设(医学2017015)

作者单位:311100 浙江杭州,杭州市余杭区第五人民医院内分泌肾脏科(康海英),内分泌科(吴君平),检验科(张马军)

者;⑥合并其他自身免疫性疾病的患者。另外选取同期门诊健康体检者 20 例为对照组。RA 组中男性 7 例、女性 13 例;平均年龄(45.26 ± 8.13)岁;平均病程(3.42 ± 1.10)年;对照组中男性 6 例、女性 14 例;平均年龄(42.64 ± 7.82)岁。两组性别、年龄比较,差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

1.2 检测方法

1.2.1 粪便样本的采集 所有样本人群均无特殊饮食习惯。均在早上 6:00~8:00 用无菌采样盒收集新鲜粪便标本。采样时均佩戴无菌手套,手持无菌棉签迅速取样后放置于无菌培养盒中,在 -18°C 下冷冻保存,并于 24 h 内完成 DNA 提取。

1.2.2 总 DNA 提取 采用 QIAamp DNA Stool Mini Kit 试剂盒提取粪便细菌基因组总 DNA,严格按照说明书进行实验操作。

1.2.3 肠道菌群分析 所有样本均使用引物 338F 和 80627R 进行 16S rDNA V3~V4 可变区的 PCR 扩增,正向引物序列为 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3',反向引物序列为 5'-GGACTACHVGGGT-WTCTAAT-3'。构建 MiSeq 文库,使用 MiSeq 高通量测序(由美国 Illumina 公司生产)进行双端测序。MiSeq 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。获得优化序列后,使用 QIIME 软件进行操作分类单位(operational taxonomic units, OTU)聚类,基于 Silva 数据库对 OTU 进行物种注释和分类学分析。

1.3 监测指标 比较两组患者肠道菌群分布的 OTU 分析、 α -多样性分析、 β -多样性分析及菌群组成差异。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计分析软件对数据进行处理。组间肠道菌群的 α -多样性采用 t 检验,各菌群间差异比较采用 Wilcoxon 秩和检验,组间菌群差异采用 LDA 及 LEfSe 分析。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 OTU 分析见封二图 2

由封二图 2 可见,RA 组的肠道菌群丰度低于对照组,且肠道菌群 OTU 数目总和低于对照组。

2.2 两组患者肠道菌群的 α -多样性分析见封二图 3

由封二图 3 可见,RA 组 Chao 和 Sobs 指数均低于对照组,差异有统计学意义(t 分别=0.01、0.02, P 均 <0.05)。

2.3 两组患者肠道菌群的 β -多样性分析见封三图 4

由封三图 4 可见,基于 OTU 丰度的主成分分析显示,RA 组的肠道菌群结构明显与对照组不同,对照组的 β -多样性明显高于 RA 组,在对照组中,部分粪便样本的细菌群落与 RA 组相似,而对照组中其他个体的微生物组成与 RA 组完全不同。

2.4 两组患者肠道菌群组成比较见封三图 5

由封三图 5 可见,在属水平,拟杆菌属和 *Faecalibacterium* 菌是两组人群中丰度最高的菌群,虽然 RA 组拟杆菌属和 *Faecalibacterium* 菌的丰度高于对照组,但两组差异无统计学意义。

2.5 LEfSe 差异性分析见封三图 6

由封三图 6 可见,两组患者的肠道菌群构成存在显著差异,其中 RA 组的 *Intestinibacter* 菌属的相对丰度高于对照组,对照组中乳杆菌属(*Lactobacillus*)、大肠志贺氏杆菌(*Escherichia shigella*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、*Candidatus Saccharimonas* 菌属、*Odoribacter* 菌属、肠球菌属(*Enterococcus*)相对丰度明显高于 RA 组。

3 讨论

RA 在世界范围内的发病率约 1%,在发达国家的发病率为 0.5%~1.0%,在我国的发病率为 0.3%~0.6%,且女性发病率约为男性的 2~3 倍^[4,5]。人体在正常情况下,肠道内存在着梭菌、双歧杆菌及类杆菌等大量定殖细菌,会影响机体内环境,并促进体内维生素、蛋白质等营养物质合成,成为肠道的天然屏障^[6]。有研究表明,肠道定殖菌群如果出现菌群结构或数量的改变,会使肠道的屏障功能减弱,致病菌易侵袭机体而诱发疾病,且细胞因子会被肠道细菌细胞壁的肽聚糖成分激发并释放,这可能是诱发 RA 发病的一个重要因素^[7]。自 21 世纪以来,RA 患者与健康人之间的菌群差异就得到了系统的论证^[8]。但是国内 RA 患者微生物的构成比例仍不清楚,以往的研究多采用细菌培养的方法分析菌群结构,但这种方式受多种因素影响,因此也就不能客观地评价菌群结构以及菌群与疾病的相关关系。近来基于 16S rDNA 基因设计通用引物进行 PCR 扩增,通过高通量测序分析菌群结构,是菌群结构分析的有效方法。16S rRNA 测序技术的优点是不必培养细菌即可检测环境的微量细菌,同时随着宏基因组测序技术的日趋成熟,这使系统性分析肠道菌群结构和功能成为可能。

本研究结果显示 RA 组的肠道菌群丰度、 α -多样性、 β -多样性低于对照组,这与 Chen 等^[9]、Van de Wiele 等^[10]的研究结果一致。在属水平,拟杆菌属和 Faecalibacterium 菌是两组人群中丰度最高的菌群,虽然 RA 组拟杆菌属和 Faecalibacterium 菌的丰度高于对照组,但两组无明显统计学差异。RA 组的 *Intestinibacter* 菌属的丰度增加,乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、大肠志贺氏杆菌属 (*Escherichia shigella*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、*Candidatus Saccharimonas* 菌属、*Odoribacter* 菌属、肠球菌属 (*Enterococcus*) 丰度降低。这表明 RA 患者的肠道菌群与健康人群存在差异,肠道菌群的组成可能通过改变微生物功能而促进 RA 的发生或发展。乳杆菌属与机体的免疫应答密切相关,参与机体的非特异性和特异性免疫应答,它可能在 RA 发生和发展过程中起关键作用。乳杆菌属及肠杆菌属等肠道定植菌群数量的减少,可能会阻碍黏膜免疫系统的发育成熟,降低机体免疫力,增加 RA 的易感性,激活机体的自身免疫应答,导致 RA 的发生。而且机体肠道微生物在生长和分裂过程中,肽聚糖会不断地从细胞壁中脱落,并越过肠道屏障进入循环。Huang 等^[11]的实验研究表明,肠道微生物群可间接地使肽聚糖增加,导致胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷酰胺浓度升高,激活并触发促炎症信号通路,促使 RA 的炎症反应加重。本次研究与 Huang 等^[11]的研究类似,RA 患者均发生肠道菌群结构的改变,提示 RA 的发生发展可能受不同发病机制的促进或诱导。

肠道菌群与宿主相互作用形成了人体复杂有序的微生态系统,物种多样性丰富,其含量高,数量约为人体细胞的 10 倍。大量研究均表明,肠道菌群除了能维持人体肠道、免疫环境及生理功能的稳态,还会影响肠道以外的部位。一项研究曾表明 RA 的发生发展受肠道菌群的差异性及多样性的影响,菌群紊乱会促进 RA 形成,而调整菌群则可有效延缓 RA 进一步发展^[12]。Liu 等^[13]研究提示了乳杆菌属与 RA 的发生和发展之间的潜在关系,这与本次研究的结果一致。Zhang 等^[14]通过宏基因组测序检测 RA 患者治疗前后口腔及肠道菌群的变化,结果显示,RA 患者发病一年后,唾液、牙菌斑和粪便中的唾液乳杆菌均显著增加,且在疾病处于高度活动期的患者中表达最为明显,而嗜血杆菌的丰度则明显下降,且与 RA 自身免疫抗体的滴度呈负相关。

表明肠道菌群紊乱与 RA 疾病的发生和发展密切相关。但对于肠道菌群如何影响机体诱发 RA 的机制仍有待进一步的研究和考证。

本次研究为小样本、单中心的病例对照研究,可能会存在组间个体差异较大的情况,后期应增大样本量进行进一步的研究。目前 RA 患者主要以药物治疗为主,治疗效果较好,但长期服药的副作用较大,探究更有效安全的治疗方法势在必行。本次研究中 RA 患者存在一定的肠道菌群紊乱,日后研究可多从肠道菌群调整角度出发进行探索分析,为 RA 的防治提供理论依据。

综上所述,RA 患者的肠道菌群分布与健康人群存在显著差异,其发病可能与肠道菌群结构和数量的变化有关。而肠道菌群如何影响机体诱发 RA 的机制仍有待进一步的研究和考证。

参考文献

- 1 傅根莲,刘晓霞,许敏霞.延续护理对类风湿关节炎患者自我护理能力和负性情绪的影响[J].健康研究,2018,38(4):382-385.
- 2 王志文.早期类风湿关节炎患者的肠道微生物群落研究[J].按摩与康复医学,2018,9(16):62-63.
- 3 Maeda Y, Takeda K. Role of gut microbiota in rheumatoid arthritis[J]. J Clin Med, 2017, 6(6):60.
- 4 庞立园,丁锐,张瑾,等.菌群变化对类风湿关节炎的影响[J].中国微生态学杂志,2016,28(12):1477-1479.
- 5 蔡艳娟,杜娟,卢小岚,等.抗突变型瓜氨酸波形蛋白抗体对类风湿关节炎的诊断价值[J].川北医学院学报,2019,34(2):197-200,211.
- 6 丁瑞雪,武俊瑞,岳喜庆,等.益生菌对肠道营养健康调控作用的研究进展[J].中国乳品工业,2018,46(1):24-32.
- 7 高举梅,刘毅,刘冰,等.双歧杆菌四联活菌片对类风湿关节炎患者 TNF- α 和脂联素水平的影响[J].泰山医学院学报,2017,38(7):761-764.
- 8 Sun Y, Chen Q, Lin P, et al. Characteristics of gut microbiota in patients with rheumatoid arthritis in Shanghai, China[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9:369.
- 9 Chen J, Wright K, Davis JM, et al. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis[J]. Genome Med, 2016, 8(1):43.
- 10 Van de Wiele T, Van Praet JT, Marzorati M, et al. How the microbiota shapes rheumatic diseases[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(7):398-411.
- 11 Huang Z, Wang J, Xu X, et al. Antibody neutralization of microbiota-derived circulating peptidoglycan dampens inflammation and ameliorates autoimmunity[J]. Nat Microbi-

- ol, 2019, 4(5): 766-773.
- 12 Vaahntovu J, Munukka E, Korkeamäki M, et al. Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis[J]. *J Rheumatol*, 2008, 35(8): 1500-1505.
 - 13 Liu X, Zou Q, Zeng B, et al. Analysis of fecal *Lactobacillus* community structure in patients with early rheumatoid arthritis[J]. *Curr Microbiol*, 2013, 67(2): 170-176.
 - 14 Zhang X, Zhang D, Jia H, et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment[J]. *Nat Med*, 2015, 21(8): 895-905.

(收稿日期 2020-11-09)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第304页)

miRNA-21 表达水平能够使 PTEN mRNA、FasL mRNA 表达水平升高,与文献报道一致^[17]。

综上所述,胆囊癌组织中 miRNA-21 明显高于正常癌旁组织,下调胆囊癌细胞中 miRNA-21 表达水平能够抑制细胞增殖活力、周期和迁移能力,使细胞内 PTEN 和 FasL 表达增高,具有作为胆囊癌治疗新靶点的潜力。

参考文献

- 1 焦辉,鲁艳,张志刚,等.胆囊结石合并胆囊癌 134 例临床分析[J]. *中国基层医药*, 2020, 27(13): 1555-1558.
- 2 Rappard DF, Bugiani M, Boelens JJ, et al. Gallbladder and the risk of polyps and carcinoma in metachromatic leukodystrophy[J]. *Neurology*, 2016, 87(1): 103-111.
- 3 Goetze TO. Gallbladder carcinoma: Prognostic factors and therapeutic options[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(43): 12211-12217.
- 4 Matsumoto Y, Fujimoto K, Mitsuoka E, et al. Cholecystoduodenal fistula caused by aggressive mucinous gallbladder carcinoma with a porcelain gallbladder[J]. *Clin J Gastroenterol*, 2019, 12(5): 460-465.
- 5 Vishnoi A, Rani S. MiRNA Biogenesis and regulation of diseases: An overview[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1509(7): 1-10.
- 6 Van RK, Calin GA. Cancer hallmarks and microRNAs: The therapeutic connection[J]. *Adv Cancer Res*, 2017, 135(1): 119-149.
- 7 Ma S, Zhang A, Li X, et al. MiR-21-5p regulates extracellular matrix degradation and angiogenesis in TMJOA by targeting Spry1[J]. *Arthritis Res Ther*, 2020, 22(1): 99.
- 8 Wu Y, Song Y, Xiong Y, et al. MicroRNA-21 (Mir-21) promotes cell growth and invasion by repressing tumor suppressor PTEN in colorectal cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(3): 945-958.
- 9 Orosz E, Kiss I, Gyöngyi Z, et al. Expression of Circulating miR-155, miR-21, miR-221, miR-30a, miR-34a and miR-29a: Comparison of colonic and rectal cancer[J]. *In Vivo*, 2018, 32(6): 1333-1337.
- 10 Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease[J]. *RNA Biol*, 2011, 8(5): 706-713.
- 11 Lu J, Tan T, Zhu L, et al. Hypomethylation causes MIR21 overexpression in tumors[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 18(5): 47-57.
- 12 黄体政,孙鹤,肖军. miR-21 在结肠癌细胞失巢凋亡调节中的作用及机制研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2020, 45(5): 645-649.
- 13 Chen CY, Chen J, He L, et al. PTEN: Tumor suppressor and metabolic regulator[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9(5): 338.
- 14 Yan Y, Huang H. Interplay among PI3K/AKT, PTEN/FOXO and AR signaling in prostate cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1210(3): 319-331.
- 15 Lettau M, Paulsen M, Schmidt H, et al. Insights into the molecular regulation of FasL (CD178) biology[J]. *Eur J Cell Biol*, 2011, 90(6): 456-466.
- 16 Badillo AI, Badillo SC, Villalobos R, et al. Defective expression of FasL and Bax in human lung cancer[J]. *Clin Exp Med*, 2003, 3(2): 106-112.
- 17 张琳梅,陈诚,张耀超,等. PTENp1 作为 miR-21 吸附“海绵”在口腔鳞癌中调控 PTEN 的表达[J]. *西安交通大学学报:医学版*, 2020, 41(5): 713-717.

(收稿日期 2021-02-24)

(本文编辑 蔡华波)