

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.23.015

基于 16S rDNA 测序技术研究痰湿质受试者肠道菌群的组成及丰度

景彩¹, 肖宁¹, 张昕¹, 于慧娟¹, 张昌云², 曲一诺¹, 臧晓明¹, 母晓艺¹, 谭奇纹^{1*}

(1. 山东中医药大学针灸推拿学院, 山东省济南市长清区大学路 4655 号, 250355; 2. 山东中医药大学附属医院)

摘要 目的 探讨痰湿质体质人群肠道菌群的丰度及物种组成差异。方法 收集痰湿质及平和质受试者各 30 例粪便样本, 提取两组样本中细菌总 DNA 进行检测定量, 构建 Miseq 文库并测序, Miseq 测序得到的 PE 读长根据重叠区关系进行拼接, 再根据不同的相似度水平, 对所有序列进行分类单元 (OTU) 聚类分析, 并分别在各个分类水平上统计各样本的群落组成。利用 16S rDNA 测序技术分析痰湿质及平和质肠道菌群结构的组成及丰度变化。结果 在分类单元 (OTU) 水平上, 偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 显示痰湿质与平和质在肠道菌群组成上具有明显差异; 在门水平上, 痰湿质肠道菌群中拟杆菌门/厚壁菌门的比值低于平和质; 在属水平上, 痰湿质相对丰度下降的菌属主要为拟杆菌属、罗氏菌属 ($P < 0.01$)、粪栖杆菌属、巨单胞菌, 痰湿质相对丰度上升的菌属主要为戴阿利斯特菌属、Lachnoclostridium、直链真杆菌属、Dorea。结论 痰湿质与平和质体质受试者的肠道菌群在丰度及物种组成方面均有差异, 其中拟杆菌门/厚壁菌门的比值降低以及罗氏菌属相对丰度的下降是痰湿质肠道菌群的特征。

关键词 痰湿质; 平和质; 肠道菌群; 16S rDNA

痰湿质是常见的九种体质类型之一, 体质状态以黏滞重浊为主, 主要由于津液运化失司、痰湿凝聚所致^[1]。痰湿质者以形体肥胖为特征, 常表现为面部皮肤油脂较多、多汗且黏、胸闷、痰多、口黏腻或甜、喜食肥甘、苔腻、脉滑等^[2]。研究发现, 痰湿质在分子水平上具有代谢紊乱的总体特征, 是糖尿病、冠心病、高血压病、脑卒中等多种代谢相关疾病的易感体质类型, 并可能具有一定的遗传倾向^[3-5]。现代流行病学调查证实, 痰湿质是超重和肥胖的主要体质影响因素^[6], 而肥胖者与正常体重者肠道菌群存在显著差异^[7]。本研究运用 16S rDNA 技术对痰湿质和平和质体质人群肠道菌群进行高通量测序分析, 从肠道菌群的微观视角探寻痰湿质与平和质的差异, 进而分析痰湿质与肠道菌群的关联性。

1 临床资料

1.1 诊断标准

平和质或痰湿质体质判定标准参照中华中医药

学会 2009 年颁布的《中医体质分类与判定》^[8]。

1.2 纳入标准

1) 年龄 20~50 周岁; 2) 符合平和质或痰湿质判定标准; 3) 在济南地区居住 1 年以上; 4) 签署知情同意书。

1.3 排除标准

1) 明显兼夹多种体质类型; 2) 服用抗生素、益生菌, 或正在接受其他治疗者; 3) 合并严重高血压病、器质性心脏病者; 4) 妊娠期、经期及哺乳期妇女; 5) 精神病患者。

1.4 资料来源

选取 2018 年 3—9 月在山东省中医院治未病中心门诊接受体质辨识的平和质或痰湿质受试者, 共 60 例, 其中痰湿质和平和质各 30 例, 每组男、女各 15 例。本研究经山东省中医院伦理学委员会批准 (2018-033-KY)。

2 方法

2.1 一般资料采集

利用 DS01-B 型道生四诊仪舌面诊测信息采集系统 (沪械注准 20152270430)、DS01-DII 型脉象信息采集体质辨识系统 [沪食药监械 (准) 字

基金项目: 国家自然科学基金 (81373722); 山东中医药大学治未病科研创新团队基金

* 通讯作者: qiwentan@sducm.edu.cn, (0531) 68616428

2013 第 2271692 号, 上海道生医疗科技有限公司进行信息采集, 系统将根据四诊情况自动生成体质判定结果。

采用问卷调查法采集受试者一般信息、年龄、性别、生活方式信息 (吸烟、饮酒和饮食情况)、人体测量信息 [身高、体重、血压、心率、体重指数 (BMI)、腰围、臀围等]。

2.2 16S rDNA 测序

受试者于门诊采样, 特殊情况 (如腹泻等) 则延迟 5 天后采样。采集新鲜自然排出的粪便约 2 g, 装入 2 ml 试管中, 液氮保存, 用于后续 16S rDNA 测序, 由美吉生物有限公司提供测序。用 O-MEGA-soil DNA Kit (Omega Bio-Tek) 提取肠道菌群基因组 DNA, 根据 338F_806R 区域进行 PCR (ABI 公司, 型号: ABI GeneAmp® 9700) 扩增, 将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统 1.0.14.0 (Promega 公司) 进行检测定量, 构建 Miseq 文库并测序, 以 DNA 片段为模板, 芯片上固定的碱基序列为引物进行 PCR 合成, 在芯片上合成目标待测 DNA 片段; PCR 扩增, 产生 DNA 簇; 用激光扫描反应板表面, 读取每条模板序列第一轮反应所聚合上去的核苷酸种类; 统计每轮收集到的荧光信号结果, 获得模板 DNA 片段的序列。

2.3 生物信息学分析

Miseq 测序得到的 PE 读长首先根据重叠区关系进行拼接, 再根据不同的相似度水平, 对所有序列进行分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTU) 聚类分析, 采用 RDPclassifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析, 并分别在各个分类水平 (域、界、门、纲、目、科、属、种) 上统计各样本的群落组成。基于 OTU 及其聚类分析结果和分类学信息, 可以在各个分类水平上进行群落结构的统计分析: 偏最小二

乘法判别分析 (PLS-DA)、群落组成分析、Wile-oxon 秩和检验等。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计学分析, 计量资料满足正态分布以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用两独立样本的 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 两种体质受试者基本情况比较

表 1 示, 痰湿质者体重、BMI、腰围、臀围均显著高于平和质 ($P < 0.001$), 其他指标与平和质差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.2 两种体质受试者肠道菌群在 OTU 水平上的 PLS-DA 分析结果

图 1 示, PLS-DA 结果表明, 痰湿质与平和质受试者肠道菌群在 OTU 水平上可明显区分并聚成两个类群, 说明痰湿质与平和质的肠道菌群组成在 OTU 水平上具有显著差异。此外, 通过 PLS-DA 分析痰湿质样本点分布的离散程度大于平和质受试者。

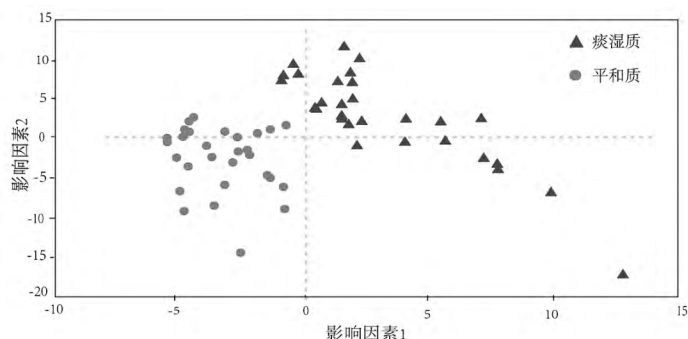


图 1 痰湿质与平和质受试者肠道菌群在 OTU 水平上的 PLS-DA 分析结果

3.3 两种体质受试者肠道菌群在门分类水平的群落组成分析结果

表 2 示, 在门水平上, 痰湿质厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形菌门

表 1 痰湿质与平和质受试者基本信息比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄 (岁)	身高 (cm)	体重 (kg)	BMI (kg/m^2)	腰围 (cm)
痰湿质	30	32.30 $\pm$ 6.27	169.87 $\pm$ 8.90	81.43 $\pm$ 16.60	28.08 $\pm$ 4.16	95.47 $\pm$ 10.80
平和质	30	32.07 $\pm$ 8.96	168.37 $\pm$ 7.94	63.54 $\pm$ 12.77	22.38 $\pm$ 3.64	78.80 $\pm$ 10.40
P 值		0.907	0.494	<0.001	<0.001	<0.001
组别	例数	臀围 (cm)	心率 (次/分)	舒张压 (mmHg)	收缩压 (mmHg)	
痰湿质	30	104.77 $\pm$ 7.05	75.00 $\pm$ 8.93	120.13 $\pm$ 20.05	75.63 $\pm$ 17.95	
平和质	30	95.17 $\pm$ 6.84	71.43 $\pm$ 7.71	111.67 $\pm$ 12.86	71.27 $\pm$ 11.25	
P 值		<0.001	0.103	0.056	0.264	

注: BMI, 体重指数

(Proteobacteria) 占比及拟杆菌门/厚壁菌门均低于平和质,而放线菌门(Actinobacteria)高于平和质。

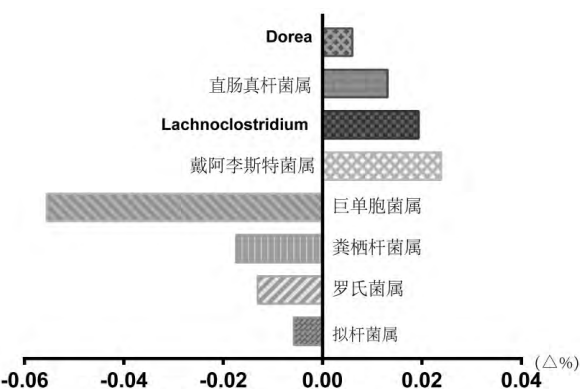
表 2 痰湿质与平和质受试者肠道菌群门水平的占比分析结果

组别	例数	厚壁菌门 (%)	拟杆菌门 (%)	变形菌门 (%)	放线菌门 (%)	拟杆菌门/厚壁菌门
痰湿质	30	73.94	9.67	7.54	7.87	0.13
平和质	30	75.90	10.93	7.63	5.11	0.14

3.4 两种体质受试者肠道菌群在属分类水平的群落组成分析结果

痰湿质前 5 个丰度高的菌属分别为粪栖杆菌属(Faecalibacterium) 12.28%,布劳特氏菌属(Blautia) 8.29%,直肠真杆菌属(Eubacterium_rectale_group) 7.10%,拟杆菌属(Bacteroides) 6.81%,罕见小球菌属(Subdoligranulum) 6.52%。平和质前五个丰度高的菌属分别为粪栖杆菌属(Faecalibacterium) 13.63%,布劳特氏菌属(Blautia) 8.46%,拟杆菌属(Bacteroides) 7.18%,罕见小球菌属(Subdoligranulum) 6.68%,巨单胞菌属(Megamonas) 6.02%。

图 2 示,痰湿质与平和质的优势菌属组成总体上大致相同,但物种丰度方面两组有差异。与平和质相比,痰湿质相对丰度明显下降的前 4 位菌属分别为拟杆菌属、罗氏菌属(Roseburia)、粪栖杆菌属、巨单胞菌属(横坐标负方向);痰湿质相对丰度明显升高的前 4 位菌属分别为戴阿利斯特菌属(Dalister)、Lachnoclostridium、直肠真杆菌属、Dorea(横坐标正方向)。



注: $\Delta\%$ 为某肠道菌群在两种体质中所占百分比之差, $\Delta\% = \text{平和质} - \text{痰湿质}$

图 2 痰湿质肠道菌群在属水平丰度上调和下调前 4 位的菌群

3 讨论

肠道菌群对机体内环境稳态及免疫平衡有至关

重要的作用。肠道菌群稳态的失调会增加肥胖、糖尿病、代谢综合征、炎症肠病等慢性疾病的发生风险^[8-9]。超重是痰湿质的主要影响因素,痰湿质也是发生腹型肥胖和全身型肥胖的主要体质类型^[10-11]。本研究利用 16S rDNA 高通量测序技术,对痰湿质与平和质受试者肠道菌群的菌落组成和丰度进行了分析,结果显示,痰湿质肠道菌群多样性在菌群组成结构、丰度水平均存在差异。

肠道菌群中 98% 可归入以下 4 门:厚壁菌门(64%),拟杆菌门(23%),变形菌门(8%)和放线菌门(3%)^[12]。研究发现,肥胖者菌群丰度与非肥胖个体丰度相比明显降低,其菌群的数量和种类不足,更容易发展成为全身性肥胖、胰岛素抵抗、脂代谢紊乱以及慢性炎症表现^[13]。Turnbaugh 等^[14] 计算肥胖小鼠和非肥胖小鼠中 9 个门水平的相对丰度,发现肥胖小鼠的拟杆菌门/厚壁菌门值低于非肥胖小鼠。多项研究^[14-16] 证实,拟杆菌门/厚壁菌门值的降低或拟杆菌门降低或厚壁菌门增加都会促进肥胖。痰湿质者体重、BMI、腰围、臀围均显著高于平和质,本研究痰湿质拟杆菌门/厚壁菌门值降低可能是痰湿质人群超重或肥胖的主要原因之一。

罗氏菌属由专性革兰氏阳性厌氧菌组成,是产短链脂肪酸(SCFAs),特别是丁酸的常见细菌之一,影响结肠运动,具有免疫维持和抗炎作用^[17]。罗氏菌属表征的修饰可能影响各种代谢途径,从而导致各种疾病如肠易激综合征、肥胖、2 型糖尿病、神经系统疾病和过敏等^[18]。乙酰辅酶 A 转移酶是丁酸合成的主要酶,是丁酸盐合成的最后一步,丁酸盐可通过底物水平磷酸化和质子梯度形成,会促进能量生成和肠上皮细胞免疫调节^[19]。SCFAs 通过增强促炎细胞因子反应的抗炎机制来调节肠道生理和免疫稳态^[20]。这一特性表明丁酸是罗氏菌属与宿主相互作用的关键因素^[18]。本研究表明,痰湿质者肠道菌群中罗氏菌属(Roseburia) 相对丰度显著降低,表明短链脂肪酸(尤其是丁酸)产生不足,机体抗炎作用减弱。研究^[21] 证明,痰湿质已处于慢性低度炎症状态。由此推测罗氏菌属丰度的显著降低可能是痰湿质炎症状态的原因之一。

有研究^[22] 显示,高血压患者的肠道中直肠真杆菌显著增加,并与收缩压和舒张压呈显著正相关。痰湿质是高血压患者的易发体质^[11]。本研究中痰湿质虽未纳入高血压病患者,但其收缩压和

舒张压相较于平和质整体偏高,由此说明痰湿质肠道菌群的特征在其“未病”状态或已存在。

肠道菌群的紊乱与痰湿质易患疾病(如肥胖、高血压等心脑血管疾病)密切相关^[23-25]。但痰湿质的肠道菌群组成结构与多样性特征尚未见报道,本研究利用高通量测序分析痰湿质与平和质的肠道菌群组成和丰度的差异。结果发现,与平和质比较,痰湿质其拟杆菌属、罗氏菌属、粪栖杆菌属、巨单胞菌属表达相对丰度明显下降;而戴阿利斯特菌属、Lachnoclostridium、直链真杆菌属、Dorea 则相对丰度明显升高。本研究从微观角度发现体质间的共性与差异性,为将来从微观构建痰湿质模型奠定了基础,为痰湿质的形成机制增添了新的理论依据,并为中医临床改善痰湿质提供新思路。

参考文献

- [1] 王琦,叶加农,朱燕波,等. 中医痰湿质的判定标准研究[J]. 中华中医药杂志,2006,21(2):73-75.
- [2] 中华中医药学会. 中医体质分类与判定[M]. 北京:中国中医药出版社,2009:1-7.
- [3] 李英帅,王济,李玲孺,等. 痰湿质的遗传特征与研究模式探析[J]. 中华中医药杂志,2014,29(9):2721-2723.
- [4] 王建荣,汤毅. 痰湿质的研究进展[J]. 世界中西医结合杂志,2015,10(1):140-143.
- [5] 李玲孺. 痰湿质与肥胖亚型的相关性及其易发代谢综合征的氧化应激机制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2012:6-7.
- [6] 朱燕波,王琦,吴承玉,等. 18805 例中国成年人中医体质类型与超重和肥胖关系的 Logistic 回归分析[J]. 中西医结合学报,2010,8(11):1023-1028.
- [7] COTILLARD A, KENNEDY SP, KONG LC, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness[J]. Nature,2013,500(7464):585-588.
- [8] ANGELAKIS E, MERHE JV, RAOULT D. Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification[J]. Lancet Infect Dis,2013,13(10):889-899.
- [9] ORG E, BLUM Y, KASELA S, et al. Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort[J]. Genome Biol, 2017,18(1):70. doi: 10.1186/s13059-017-1194-2.
- [10] 张笑梅,朱燕波,邬宁茜,等. 腹型肥胖和全身型肥胖与中医体质类型的关系[J]. 天津中医药,2014,31(10):603-607.
- [11] 韩淑辉,郑建明,张钦昌,等. 高血压病患者中阴虚、痰湿、气虚体质生化检查的差异性探讨[J]. 世界中西医结合杂志,2018,13(4):535-538.
- [12] ECKBURG PB, BIK EM, BERNSTEIN CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora[J]. Science,2005,308(5728):1635-1638.
- [13] LE CHATELIER E, NIELSEN T, QIN J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers[J]. Nature,2013,500(7464):541-546.
- [14] TURNBAUGH PJ, LEY RE, MAHOWALD MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. Nature,2006,444(7122):1027-1031.
- [15] LEY RE, BACKHED F, TURNBAUGH P, et al. Obesity alters gut microbial ecology[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2005,102(31):11070-11075.
- [16] LEY RE, TURNBAUGH PJ, KLEIN S, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity[J]. Nature,2006,444(7122):1022-1023.
- [17] ZOHREH TS, IMEN S, LATIFA B, et al. Roseburia spp.: a marker of health[J]. Future Microbiol,2017,12:157-170. doi: 10.2217/fmb-2016-0130.
- [18] TAMANAI-SHACOORI Z, SMIDA I, BOUSARGHIN L, et al. Roseburia spp.: a marker of health[J]. Future Microbiol,2017,12(2):157-170.
- [19] HATZIOANOU D, MAYER MJ, DUNCAN SH, et al. A representative of the dominant human colonic Firmicutes, Roseburia faecis M72/1, forms a novel bacteriocin-like substance[J]. Anaerobe,2013,23:5-8. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.07.006.
- [20] LACHMANDAS E, VAN DEN HEUVEL CN, DAMEN MS, et al. Diabetes mellitus and increased tuberculosis susceptibility: the role of short-chain fatty acids[J]. Diabetes Research,2016,6014631. doi: 10.1155/2016/6014631.
- [21] 郑璐玉. 痰湿质人群炎症相关机制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2013:86-87.
- [22] LIU J, AN N, MA C, et al. Correlation analysis of intestinal flora with hypertension[J]. Exp Ther Med,2018,16(3):2325-2330.
- [23] KHAN MJ, GERASIMIDIS K, EDWARDS CA, et al. Role of gut microbiota in the aetiology of obesity: proposed mechanisms and review of the literature[J]. J Obes,2016:7353642. doi: 10.1155/2016/7353642.
- [24] LI J, ZHAO F, WANG Y, et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension[J]. Microbiome,2017,5(1):14.
- [25] TANG WH, KITAI T, HAZEN SL, et al. Gut microbiota in cardiovascular health and disease[J]. Circ Res,2017,120(7):1183-1196.

Study on the Composition and Abundance of Intestinal Flora in Phlegm-Dampness Constitution Subjects Based on 16S rDNA Sequencing

JING Cai¹, XIAO Ning¹, ZHANG Xin¹, YU Huijuan¹, ZHANG Changyun², QU Yinuo¹, ZANG Xiaoming¹, MU Xiaoyi¹, TAN Qiwen¹

(1. College of Acupuncture and Moxibustion, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, 250014; 2. The Attached Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the abundance and species composition differences of intestinal flora in phlegm-dampness constitution people. **Methods** A total of 30 stool samples from phlegm-dampness constitution and 30 neutral constitution subjects were collected. The total bacterial DNA was extracted and quantified in the 2 groups. The Miseq library was constructed and the PE read length obtained by sequencing the Miseq sequencing was spliced according to the overlapping region relationship. According to different levels of similarity, operational taxonomic unit (OTU) clustering analysis was performed on all sequences, and the community composition of each sample was counted at each classification level. 16S rDNA sequencing technology was used to analyze the composition and abundance change of intestinal flora structure of the phlegm-dampness constitution and neutral constitution subjects.

Results At the level of OTU, partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) showed that there was a significant difference in the composition of intestinal flora between the phlegm-dampness constitution and the neutral constitution; at the level of the phylum, the ratio of *Bacteroides* and *Firmicutes* in the phlegm-dampness constitution group was lower than that of the neutral constitution; at the genus level, the genus of the decreased relative abundance of phlegm-dampness constitution was mainly *Bacteroides*, *Roche* ($P < 0.01$), *Faecalibacterium* and *Megamonas*, and the genus of increased relative abundance of phlegm-dampness constitution were mainly *Dialister*, *Lachnoclostridium*, *Eubacterium rectale*, and *Dorea*. **Conclusion** The intestinal flora of the subjects with phlegm-dampness constitution and neutral constitution is different in abundance and species composition, and the decreased ratio of *Bacteroides* and *Firmicutes* and the decreased relative abundance of *Roche* are the characteristics of the intestinal flora of phlegm-dampness constitution.

Keywords phlegm-dampness constitution; neutral constitution; intestinal flora; 16S rDNA

(收稿日期: 2019-02-15; 修回日期: 2019-07-06)

编辑: 王利芬

欢迎订阅 2020 年《中医杂志》

《中医杂志》(ISSN 1001-1668, CN 11-2166/R) 是由中华中医药学会和中国中医科学院主办的全国性中医药综合性学术期刊。1955 年创刊以来始终坚持“以提高为主, 兼顾普及”的办刊方针, 是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级中医药期刊之一, 是中文核心期刊和科技核心期刊、中国精品科技期刊、首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊、新中国 60 年有影响力的期刊、中国百强科技期刊、中国百种杰出学术期刊, 荣获第二届、第三届、第四届新闻出版政府奖期刊奖提名奖。

《中医杂志》主要栏目中当代名医和临证心得分别介绍名老中医和临床医生辨证用药治疗疑难病的经验; 临床研究介绍中医药治疗的新方法、新成果; 学术探讨、思路与方法、专家论坛、病例讨论、综述、百家园等栏目, 提供最新学术观点、研究成果与治疗方法, 成为学习中医药、研究中医药, 不断提高临床及研究水平的良师益友。

《中医杂志》为半月刊, 每月 2 日和 17 日出版, 每期定价 20.00 元, 全年 480 元。读者可以到全国各地邮局办理订阅手续(邮发代号: 2-698), 也可以与本刊读者服务部联系邮购, 邮购免邮费。电话: 010-64035632, 010-64089195。国外发行: 中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱, 邮编: 100044, 代号: M140)。本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。网址: <http://www.jtcm.net.cn>。

扫一扫 关注

