

2型糖尿病患者肠道菌群两种分子指纹图谱分析研究*

吴晓康¹, 马超峰², 余鹏博³, 韩 蕾⁴, 尹佳锋¹, 张 妮¹, 李妙美¹, 王香玲¹, 徐纪茹⁴

- (1. 西安交通大学第二附属医院检验科, 西安 710004; 2. 西安市疾病预防控制中心, 西安 710054;
3. 陕西省疾病预防控制中心, 西安 710054;
4. 西安交通大学基础医学院免疫与病原生物学, 西安 710061)

摘要:目的 利用重复共有序列(ERIC)和变性梯度凝胶电泳(DGGE)两种分子指纹图谱技术对2型糖尿病患者肠道菌群结构特征分析,探讨2型糖尿病与肠道菌群的相关性及对两种方法的评价。方法 收集8例健康人和7例2型糖尿病患者粪便样本,提取粪便菌群总DNA,采用ERIC-PCR和DGGE-PCR分子指纹图谱技术对两组人群肠道菌群结构分析,比较其多样性、相似性等生态学特征。结果 与健康对照组比较,2型糖尿病患者肠道菌群图谱条带和Shannon-Wiener多样性指数降低,但无统计学意义;组内相似性降低差异有统计学意义($P < 0.05$),菌群结构发生变化;两种指纹图谱技术均能直观反映肠道菌群结构特征,ERIC方法简便,反映菌群多样性良好,但是实验影响因素较多,不可切胶测序;DGGE能较好反映菌群多样性、相似性等生态学特征,而且可选择条带切胶测序。结论 2型糖尿病患者肠道菌群组成结构发生改变,糖尿病的发生与肠道菌群有一定相关性;ERIC和DGGE是研究肠道菌群分辨率高、重复性好的指纹图谱技术,DGGE并可进行切胶测序比对鉴定细菌,二者可结合使用。

关键词:2型糖尿病;肠道菌群;分子指纹图谱;重复共有序列;变性梯度凝胶电泳

中图分类号:R587.1;Q503 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)04-024-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.04.006

Analysis of Intestinal Microbiota of Type 2 Diabetes Patients of by Two Fingerprint Technologies

WU Xiao-kang¹, MA Chao-feng², YU Peng-bo³, HAN Lei⁴, YIN Jia-feng¹,

ZHANG Ni¹, LI Miao-xian¹, WANG Xiang-ling¹, XU Ji-ru⁴ (1. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China;

2. Center for Disease Control and Prevention of Xi'an, Xi'an 710054, China;

3. Center for Disease Control and Prevention, Xi'an 710054, China; 4. Department of Immunology and Pathogenic Biology, Basic Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: Objective To explore the characteristics of intestinal Microbiota in T2DM patients by two molecular fingerprint technologies, and investigate the correlation of intestinal microbiota and T2DM, and evaluate the application value of two fingerprint technologies. **Methods** Fecal samples of 8 healthy groups and 7 diabetes patients were collected. Then the total DNA of gut microbiota was extracted. Through the analysis of products by two molecular fingerprints of ERIC-PCR and DGGE-PCR, ecological characteristics of diversity and similarity of gut microbiota were obtained in healthy groups and diabetes patients. **Results** Compared to healthy groups, the number of bands and Shannon-Wiener index of gut microbiota in diabetes patients was decreased but no statistical significance. The similarity in patients group was declining ($P < 0.05$), and the construction of gut microbiota was inclined to differ. Two fingerprint technologies of ERIC and DGGE could directly reflect the diversity of gut microbiota and were the modern molecular biological techniques without depending on cultivation. ERIC was simple and convenient, had a better reflection of microbial diversity, but gel band cutting and regarded as a proper approach with higher diffraction efficiency and excellent repetition to study sequencing couldn't be performed since there were more influencing factors on the experiment. DGGE could better reflect the ecological characteristics such as microbial diversity and similarity, and selecting bands, gel band cutting and sequencing could be done. **Conclusion** The composition and construction of gut microbiota in diabetes patients were changed, which suggests the occurrence of the disease had the correlation with gut microbiota. ERIC and DGGE is regarded as a proper approach with higher diffraction efficiency and excellent repetition to study intestinal microbiota, but also gel band cutting, sequencing, bacteria identification can be performed by DGGE, both can be used in combination.

* 基金项目:国家自然科学基金资助,项目批准号:No. 81200583;中央高校基本科研业务费专项资金资助(xjj2015151)。

作者简介:吴晓康(1977—),男,博士,助理研究员,主要从事肠道菌群与代谢性疾病相关性研究,E-mail:wxk111506@sohu.com。

通讯作者:徐纪茹,教授,E-mail:xujiru@mail.xjtu.edu.cn。

Keywords: type 2 diabetes; intestinal microbiota; molecular fingerprint; ERIC; DGGE

肠道菌群与代谢性疾病相关性研究近年来已经成为热点,随着现代分子生物学技术的不断发展,极大推动此方面的研究,其中分子指纹图谱技术就是代表性的研究方法。本研究采用肠杆菌基因间重复共有序列(ERIC)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)两种分子指纹图谱技术对2型糖尿病患者肠道菌群结构特征进行分析,了解疾病情况下肠道菌群变化情况。

1 材料与方法

1.1 研究对象 在西安交通大学第二附属医院和社区居民收集糖尿病患者和健康人群粪便样本,其中健康人群8份、糖尿病患者7份,采样程序均符合医院伦理学要求。选样标准:①近3个月内无腹泻、痢疾、结肠炎等肠道疾病;②近3月未使用抗生素、益生菌或益生元等制品。用一次性无菌便秘收集粪便标本,密封后置冰盒中1 h内运送至实验室-80℃冰箱,备用。

1.2 仪器与试剂 Dcode 变性梯度凝胶电泳系统, Gel Doc™ XR 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); 2720 型 PCR 扩增仪(ABI/美国); NanoPhotometer™(德国 IMPLLEN 公司); -80℃ 低温冰箱(DW-40L262, 三洋/日本); QIAamp Stool Mini Kit 购自德国 QIAGEN 公司; Taq 酶、dNTP 及缓冲液、丙烯酰胺(Acr)、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(Bis)购自美国 Promega 公司; 过硫酸铵购自天津市化学试剂三厂; 琼脂糖购自西班牙; TEMED 购自 sigma 公司; 去离子甲酰胺、尿素购自 Amresco 公司; 引物合成在上海生工生物工程股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 肠道菌群总 DNA 提取: 参照 QIAamp DNA Stool Mini Kit 提取粪便样品中菌群总 DNA 的步骤。提取产物用微量核酸检测仪 NanoPhotometer™测定 DNA 含量。

1.3.2 PCR 扩增: ERIC 分析参照 Versalovic 等^[1]设计的引物 ERIC-1: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTACAC-3' 和 ERIC-2: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'; DGGE 选择细菌 16SrRNA-V3 区通用引物参照 Muyzer 等^[2]设计的引物 V3-F: 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3', V3-R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3', 在正向引物 5' 端添加 40 bp 的 GC 夹, 有利于产物在 DGGE 中的分析。50 μl PCR 反应体系包括: 10 × buffer 5 μl, 正向引物、反向引物(5 μmol/L) 各 2 μl, dNTP(10 mmol/L) 1 μl, MgCl₂ (2.5 mmol/L) 5 μl, Taq DNA(5 U/μl) 0.4 μl, DNA 模板 4 μl, H₂O

30.6 μl。PCR 扩增程序为: ERIC 程序为: 95℃ 预变性 7 min; 然后进入循环, 变性 95℃ 30 s; 退火 50℃ 1 min; 延伸 65℃ 8 min, 共 30 个循环; 最后 65℃ 延伸 16 min^[1]。DGGE 程序为: 采用 touchdown PCR 方案程序^[2], 即预变性 95℃ 5 min, 95℃ 变性 1 min, 退火温度初次设定为 65℃ 1 min, 延伸 65℃ 1 min, 最后退火温度降到 55℃, 在此退火温度再进行 10 个循环, 72℃ 7 min, 4℃ 保存。PCR 产物用 NanoPhotometer™微量核酸检测仪测定含量。

1.3.3 指纹图谱分析: ①ERIC 分析: 用 2 g/dl 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 将 PCR 产物与上样缓冲液混合后点样, 电泳的电压为 6 v/cm。EB 染色 20 min, 以 DNA Marker II 和 DL2000 为核酸分子量标准, 在凝胶成像系统下观察结果并拍照保存。②DGGE 分析: 采用 DCode™ Universal Mutation 系统对产物分析, 经预试验 16SrDNA-V3 区扩增产物最适变性梯度范围(由上到下)为 40%~75%, 聚丙烯酰胺浓度为 10%。取 10 μl 扩增产物与 6×上样缓冲液混匀后加到上样孔中, 即电泳: 100v 电压 12 h, 电泳温度设置为 60℃。电泳完毕后, 将胶放入 EB 溶液(0.5 g/ml)中染色 20 min, 成像系统下观察图像并拍照保存。图像分析利用 Quantity One 软件(Bio-Rad, USA)分析指纹图谱中条带数目、灰度值, 分析糖尿病患者和健康人肠道菌群的多样性。

1.4 统计学分析 本实验所有数据运用 SPSS17.0 统计分析软件进行分析。采用 UPGMA 方法, 计算出 Dice 相似性系数。组间和组内相似性系数等计量资料结果均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, *t* 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

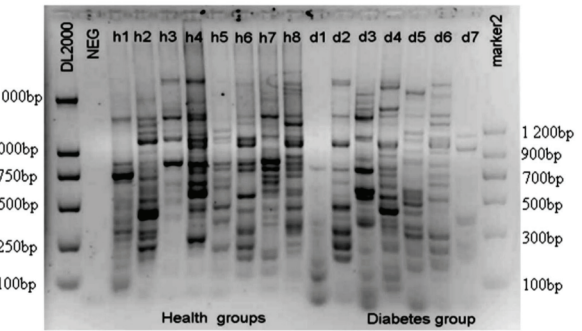
2.1 糖尿病患者与健康人肠道菌群 ERIC 图谱结果 ERIC 图谱上条带的数量、位置和亮度在不同样本有不同的特征。两组中, 样本条带数范围为 5~18 条, 不同样本间具有位置相同的条带(见图 1)。比较两组样本条带数和 Shannon-Wiener 指数, 可以看到健康组略高于糖尿病组。比较两组图谱条带的相似性, 发现糖尿病组内相似性低于健康组组内差异有统计学意义($P < 0.05$), 提示糖尿病组个体之间相似度降低, 肠道菌群组成结构可能发生变化, 见表 1。

2.4 糖尿病患者与健康人肠道菌群 DGGE 图谱结果 图谱上条带数量、位置和亮度在不同样本有不同特征。两组中, 样本条带数范围为 7~25 条,

图谱上分离的条带清晰可见(见图2)。比较两组样本条带数和 Shannon-Wiener 指数,可以看到健康人组条带比糖尿病组更加丰富,条带位置分布呈现不同。相似性分析,发现健康组组内相似性高于糖尿病组差异有统计学意义($P<0.05$),健康个体之间菌群组成更加相似,糖尿病患者之间菌群相对更趋于不同,菌群组成结构可能发生变化,见表2。

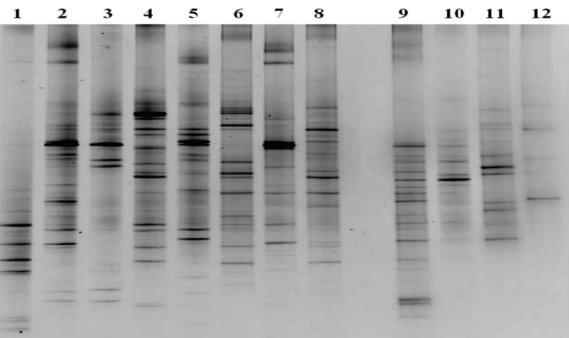
表1 糖尿病组和健康人群肠道菌群 ERIC 图谱多样性和相似性分析

项 目	健康人组 (n=8)	糖尿病组 (n=7)	t	P
菌群多样性				
ERIC 条带数	11.75±2.60	10.29±4.42	0.794	0.441
Shannon-Wiener 指数	3.25±0.48	3.07±0.81	0.55	0.592
菌群相似性(Dice 相似性系数)				
组内相似性(%)	45.00±13.98	24.45±15.95	4.793	0.00
组间相似性(%)	34.00±16.43			



注:h1~h8 为健康人;d1~d7 为糖尿病患者;NEG 为 PCR 扩增阴性对照。

图1 健康组和糖尿病组肠道菌群 ERIC 分析图谱



注:1~8 为健康人;9~12 为糖尿病患者

图2 健康人组和糖尿病组肠道菌群 DGGE 分析图谱

2.5 ERIC 和 DGGE 指纹图谱技术评价 根据上述实验结果,将两种指纹图谱比较归纳,见表3。

3 讨论 近年来,分子指纹图谱技术被广泛应用到微生物生态学研究,它具有可同时分析多个样品、快速直观等优点,适合对微生物群落结构和多样性的分析及动态变化的监测。

表2 糖尿病组和健康人组肠道菌群 DGGE 图谱多样性和相似性分析

项 目	健康人组 (n=8)	糖尿病组 (n=7)	t	P
菌群多样性				
DGGE 条带数	14.75±2.92	11.0±4.89	1.689	0.122
Shannon-Wiener 指数	3.46±0.32	2.87±0.84	1.803	0.102
菌群相似性(Dice 相似性系数)				
组内相似性(%)	40.36±14.64	24.85±12.11	2.415	0.022
组间相似性(%)	34.09±11.08			

表3 ERIC 和 DGGE 技术评价

项 目	ERIC	DGGE
分离片段大小(kb)	>3	100~700
图谱分离条带数(条)	4~15	5~19
条带测序鉴定	不可	可以
染色方法	溴化乙锭	溴化乙锭
实验时间(h)	5	24
仪器要求	普通水平电泳	DCode 电泳系统
影响因素	扩增条件及引物的选择	凝胶变性梯度范围、扩增条件
优点	操作简便、省时	分辨率高、重复性好
缺点	条带密集不易分辨	没有合适的分子标准物来比较不同批次电泳图谱

本实验采用 ERIC 和 DGGE 指纹图谱对糖尿病患者和健康人群肠道菌群的分析,获得两组人群肠道菌群的多样性和相似性特征,两种方法所得结果相似,表明糖尿病患者肠道菌群结构发生改变,不同于健康人群,其原因可能是疾病情况下,肠道微生态环境发生改变,影响菌群结构,但目前也不排除由于菌群的变化导致疾病发生的机制。

ERIC 序列最初是在 *E. coli*, *Salmonella typhimurium* 等肠道细菌中发现的,以多拷贝形式出现的反向重复序列^[3]。根据 44bp 大小的保守序列设计的引物可对细菌 DNA 进行扩增,可得到反映细菌基因组结构的图谱,具有图谱稳定、重复性好、简便快速和灵敏度高的特点,ERIC-PCR 已经被用到肠道菌群结构特征的分析中^[4,5]。本实验中,ERIC 指纹图谱技术操作简便,普通琼脂糖凝胶电泳就可完成,不需要专门仪器设备,省时省力,但实验结果很大程度上会受到 PCR 扩增条件的影响,如引物选择,dNTP,Mg²⁺,DNA 聚合酶浓度和扩增程序等。图谱上虽能明显看到菌群丰富多样性特征,但是条带密集,不易分辨,可能与琼脂糖凝胶电泳分辨率较低有关;目前条带切下回收测序、鉴定其菌属还有一定难度,不能提供关于菌群组成的信息。另外,由于长度相同的 DNA 片断其序列可能不一样,可能会高估样品间的相似性^[6]。

DGGE 指纹图谱技术是现在分析群落组成结构及多样性的主要分子工具之一,不依赖传统的培养过程,大大缩短分析时间,图谱的直观性增强了对群落多样性的分析,该技术操作简便、快速,实验结果重复性好。DGGE 技术在微生物多样性等研究中发挥了重要作用,已被成功应用到很多微生物生态学分析研究中^[7,8]。本实验选择分辨率较好的 V3 区作为目的基因,并在引物 5'端加 GC 夹,提高了 DNA 片段分离效果。为了减少 PCR 中的非特异性扩增,采用了“touchdown”扩增程序,能准确地反映肠道菌群的多样性。

综合实验过程中的条件,两种指纹图谱技术具有更高的分辨率,重复性好,并且 DGGE 图谱条带可以进一步切胶回收测序,与现有的 16SrRNA 基因专用 RDP 数据库进行比对鉴定菌群。但两种方法仅能够反映有限的肠道优势菌属,一定程度上会低估肠道菌群的种类,如果能结合新一代高通量测序技术将成为肠道菌群研究的适宜方法。

参考文献:

- [1] Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes [J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(24): 6823-6831.
- [2] Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16s ribosomal-RNA [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.
- [3] Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria [J]. Molecular Microbiology, 1991, 5(4): 825-834.
- [4] Wei G, Pan L, Du H, et al. ERIC-PCR fingerprinting-based community DNA hybridization to pinpoint genome-specific fragments as molecular markers to identify and track populations common to healthy human guts [J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 59(1): 91-108.
- [5] Cao SY, Wang MS, Cheng AC, et al. Comparative analysis of intestinal microbial community diversity between healthy and orally infected ducklings with *Salmonella enteritidis* by ERIC-PCR [J]. World Journal of Gastroenterology, 2008, 14(7): 1120-1125.
- [6] 车玉伶, 王 慧, 胡洪营, 等. 微生物群落结构和多样性解析技术研究进展 [J]. 生态环境, 2005, 14(1): 127-133.
Che YL, Wang H, Hu HY, et al. Research progresses on analytical technologies used in microbial community structure and diversity [J]. Ecology and Environment, 2005, 14(1): 127-133.
- [7] Ledder RG, Gilbert P, Huws SA, et al. Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(2): 516-523.
- [8] Tresse O, Lorrain MJ, Rho D. Population dynamics of free-floating and attached bacteria in a styrene-degrading biotrickling filter analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(4/5): 585-590.