

城市与山村青少年肠道菌群及其代谢组学差异的研究

沈续航¹, 苏时雨², 关静¹, 沈继龙², 陈熙¹

摘要 目的 调查城市与山村青少年肠道菌群及代谢产物的差异,探究不同生活环境和行为方式的青少年肠道微生态及其对健康的意义,旨在指导青少年建立更为科学健康的生活饮食方式。**方法** 收集合肥市中学生粪便标本($n=14$)和绩溪县山村中学生粪便标本($n=18$),两组学生年龄均在13.0~13.5岁。对粪便样本进行16S核糖体DNA鉴定(16S rDNA)、非靶向代谢产物检测(LC-MS),然后进行生物信息学分析。**结果** 城乡两地青少年肠道菌群差异显著,城市学生以 *Lachnospirillum* 菌、粪厌氧棒状杆菌(*Anaerostipes*) 菌属占优势,这些细菌占比增高与肠癌、动脉粥样硬化以及抑郁症等疾病有关;而在山村青少年,优势细菌是瘤胃球菌属(*Ruminococcaceae UCG-002*)、巴恩斯菌属(*Barnesiella*)和真杆菌属(*Eubacterium*)等,这些细菌与胆汁酸、短链脂肪酸、脂质代谢、碳水化合物分解等代谢相关,对维持免疫平衡和生理功能发挥重要作用。两组代谢产物也存在显著的差异,主要表现在花生四烯酸代谢、血小板激活、5-羟色胺代谢、维生素吸收、初级胆汁酸代谢等通路上。**结论** 城市和山村青少年肠道菌群和代谢产物具有显著差异;山村青少年因生活饮食方式更合理而拥有更健康的肠道菌群分布和代谢产物。**关键词** 城乡人群;青少年;肠道菌群;16S rDNA;LC-MS;代谢组学

中图分类号 R 179

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)11-1952-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.025

人体肠道内存在大约100万亿个微生物,包括细菌、真菌和寄生虫等,远超人体自身的细胞总和。其中细菌为主要组成部分,主要存在于结肠尤其是结肠末端。它们与人体构成一个精密协调、动态平衡的生态系统,在调节宿主的免疫反应、参与能量代谢、维持肠黏膜细胞形态和功能上发挥重要作用^[1]。早在1980年改革开放初期,中国城镇化水平只有19.4%,至2019年已超过60%^[2]。随着中国

城镇化水平的提升以及工业化的发展,城镇青少年的饮食习惯和生活环境也发生了巨大变化。而肠道菌群的结构与饮食习惯、生活环境等密切相关。大量的研究^[3]表明,不健康的生活习惯可通过肠道菌群的失调而影响机体的内稳态,增加慢性疾病的发病率。虽然近年来肠道菌群与健康/疾病的关系研究较多,然而有关在校青少年学生,尤其是中国城市和山村中学生菌群的特征、差异及其意义尚未见文献报道。该研究旨在分析城市和山村中学生肠道菌群及代谢产物的差异,揭示人体在生命早期建立健康的内稳态将直接影响其成年后的健康状态或患病风险,警示城市青少年应通过调整饮食结构、合理提高运动量来改善肠道菌群结构从而保持健康的身体、降低相关慢性疾病的发病风险。

1 材料与方法

1.1 病例资料 合肥市蜀山区第五十中学东校八年级学生,随机选取14例。学生均为合肥市区出生并入学,所有的学生均无本市以外居住史。另外,在宣城市绩溪县伏岭中心学校选择八年级学生18例,学生均在当地山村出生并入学,无城市居住史。纳入标准:①年龄13~14岁;②既往无胃肠病史。排除标准:①近3个月内服用过抗生素或益生菌;②近1年内有非居住地旅居史。

1.2 样品收集 晨起8:00左右,用无菌勺挑取排出的新鲜粪便1.0g,一次性无菌粪便采集塑料杯储存,每份标本标记姓名、年龄、性别置于干冰中转运至-80℃冰箱保存备用。

1.3 肠道菌群16S rDNA基因测序 使用 MagPure Soil DNA LQ Kit 基因组DNA抽提试剂盒,提取研究个体的粪便样品DNA。针对16S rDNA基因的V3-V4高可变区进行PCR扩增,上游引物为343F(5'-TACGGRAGGCAGCAG-3')、下游引物为798R(5'-AGGGTATCTAATCCT-3')。PCR扩增产物经AMPure XP beads纯化后送上海欧易公司进行双端测序。

1.4 LC/MS非靶向代谢产物检测 取出冻存的肠道内容物样本约60mg装入管中,加入内标(L2-

2023-07-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82073947)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022²病原生物学安徽省重点实验室,安徽医科大学病原生物学教研室,合肥 230032

作者简介:沈续航,男,博士研究生;

陈熙,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: ayfy-chenxi@163.com

氯苯丙氨酸) 20 μl , 加入 650 μl 甲醇-水(4:1)用研磨机进行研磨;冰水浴超声提取, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置;离心(13 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), 装入 200 μl 上清液于 LC-MS 进样小瓶中挥干;用 300 μl 甲醇-水(1:4)复溶; $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下静置;离心(13 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), 取 150 μl 的上清液 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存, 以待后续 LC-MS 分析。将所有样本的提取液等体积混合用作质控样本。所有提取试剂使用前均在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行预冷。ACQUITY UPLC I-Class plus 超高效液相串联 QE 高分辨质谱仪组成的液质联用系统作为分析仪器。色谱条件, 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 (100.0 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 柱温: $45\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流速: 0.35 mL/min; 进样量: 2 μl ; 流动相: A-水(含 0.1% 甲酸), B-乙腈(含 0.1% 甲酸)。

1.5 16S rDNA 测序分析 原始数据为 FASTQ 格式, 对样品进行去杂和去除序列中的嵌合体序列, Vsearch 软件将相似度 $\geq 97\%$ 的序列归为一个操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs), 物种比对注释由 RDP classifier 软件操作完成。之后, 采用偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)对两组的样本结果进行组与组之间相似性分析。用 R 软件分析肠道菌群 α 多样性、 β 多样性及两地中学生的肠道优势菌属。

1.6 统计学处理 使用 R 语言和 SPSS 软件进行统计学分析, 正态定量资料采用 t 检验或者 ANOVA 检验, 非正态定量资料采用非参数秩和检验。组间肠道菌群 α 多样性差异分析、菌群丰度差异分析使用 Wilcoxon 秩和检验(非配对)。组间肠道菌群 β 多样性分析采用基于 Bray-curtis 距离矩阵的主成分分析(principal component analysis, PCA)。代谢组学的分析中, 使用 PLS-DA 和 Wilcoxon 秩和检验对不同组别的代谢物进行分析, 变量投影重要性(variable importance in projection, VIP)值大于 1、 $P < 0.05$ 的代谢物鉴定为组间差异代谢物。用 Pearson 相关系数衡量两个代谢物之间的线性相关程度。代谢通路的变化通过鉴定出的组间差异代谢物比对到京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)查询, 通路富集分析 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OTU 水平的 venn 分析 使用 Vsearch 软件, 对质控得到的优质序列 valid tags 按照 97% 的相似度进行 OTU 分类, 绘制 venn 图。两组 32 个样本共

产生 5 780 个 OTU; 其中 2 组共有的 OTU 为 3 915 个, 城市与山村青少年特有的 OTU 分别为 783 个和 1 082 个。见图 1。

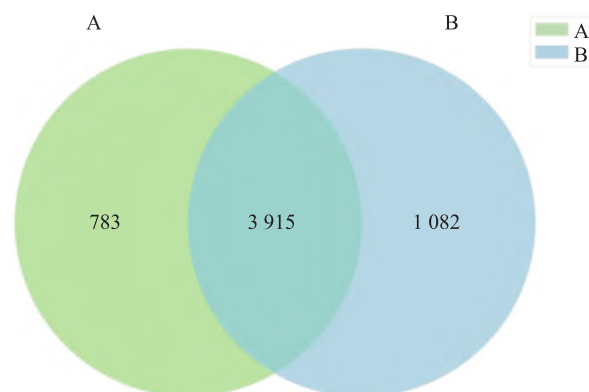


图1 不同分组粪便样本在 OTU 水平上的 venn 分组
A: 城市组; B: 山村组

2.2 Alpha 多样性、Beta 多样性分析 通过 Wilcoxon t 检验、PCA 对山村青少年肠道菌群多样性进行分析, 两组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1 和图 2。

表1 不同组别多样性指标分析比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Chao1	shannon	simpson
城市青少年	14	1 411.33 \pm 487.33	4.96 \pm 1.46	0.86 \pm 0.10
山村青少年	18	1 438.83 \pm 469.43	5.28 \pm 1.21	0.88 \pm 0.10

2.3 菌群差异分析 城乡青少年肠道菌群在属水平上的结构有较大差异(图 3)。经 Wilcoxon t 检验分析, 差异较大的菌属包括 *Lachnospirillum* ($t = 2.479$, $P < 0.05$)、粪厌氧棒状杆菌(*Anaerostipes*) ($t = 3.028$, $P < 0.05$)、瘤胃球菌(*Ruminococcaceae UCG-002*) ($t = -2.435$, $P < 0.05$)、巴恩斯菌(*Barnesiella*) ($t = -2.109$, $P < 0.05$) 和真杆菌(*Eubacterium*) ($t = 3.028$, $P < 0.05$) 等。

2.4 多元分析代谢组差异 为了探究城乡中学生粪便代谢物之间的差异, 对两组用偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA), 结果显示两组间粪便代谢物差异明显(图 4A)。R2X(cum): 0.494; R2Y(cum): 0.894; Q2(cum): 0.214。利用火山图可以对 P 值, 可视化 VIP 和 Fold Change 值, 筛选差异代谢产物(图 4B)。与城市青少年组对比红色、蓝色点代表山村青少年组中显著上调、下调的差异代谢产物; 灰色点代表差异无统计学意义。相关性分析使用 Pearson 相关系

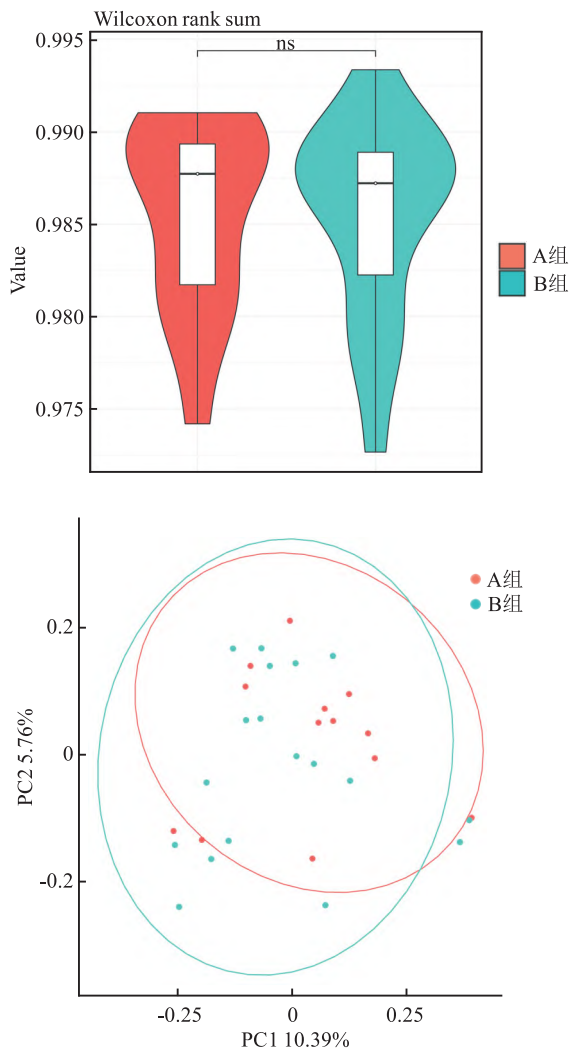


图2 两组中学生粪便菌群多样性对比
A:城市组;B:山村组

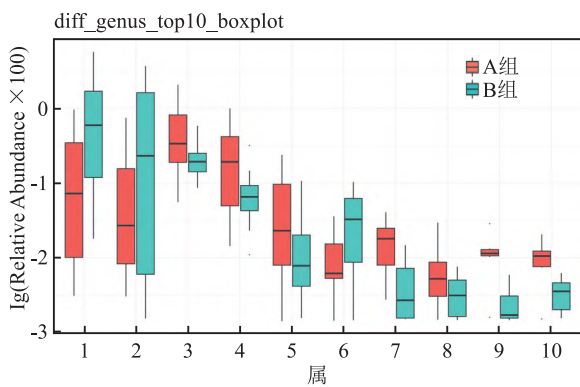


图3 两组之间属水平上的肠道菌群差异

A:城市组;B:山村组;1: *UGG-002*; 2: *Barnesiella*; 3: *Lachnoclostridium*; 4: *Anaerostipes*; 5: *Tyzzerella*; 6: *Family_XIII_AD3011_group*; 7: *Sellimonas*; 8: *Allobaculum*; 9: *Faecatitalea*; 10: *CL500-29_marine_group*

数衡量 2 个代谢物之间的线性相关程度,红色表示正相关,蓝色表示负相关(图 4C)。通过 KEGG(ht-

tps://www.kegg.jp)数据库检索差异代谢物的相关代谢通路,基于 KEGG 数据库对差异代谢物进行代谢通路富集分析,山村中学生明显高于城市中学生的代谢通路包括花生四烯酸代谢、血小板活化、5-羟色胺代谢、维生素的消化吸收、初级胆汁酸代谢($P < 0.05$)(图 4D)。

3 讨论

城乡儿童因饮食生活习惯、成长环境上的差异导致拥有不同的肠道菌群结构。有报道^[4]显示,城市青少年与农村青少年相比平均每人日膳食能量、脂肪和蛋白质的摄入量与功能占比均较高,而碳水化合物摄入量及供能以及膳食纤维占比则较低。碳水化合物、脂肪和蛋白质三大营养素摄入失衡与糖尿病、血脂异常、心脑血管疾病、肿瘤等慢性病的发生以及其并发症密切相关。膳食脂肪的供能比过高会导致超重肥胖等相关慢性病的发病风险加大^[5]。有研究^[4]表明肠道菌群的构成结构在 3 岁以后已经与成人高度相似且相对稳定。该研究从肠道菌群结构以及代谢产物两方面的差异来进行分析,期望能够更加全面清晰的反映生活饮食习惯、生活环境不同的两组青少年人群肠道微生态的差异以及其导致的终末代谢产物的差异,对未来改善青少年肠道菌群结构,在预防因肠道内稳态失衡而导致的慢性疾病中提供指导作用。

对两组青少年粪便样本进行测序分析后显示,城市青少年肠道菌群在属水平上 *Lachnoclostridium* 和 *Anaerostipes* 等占优势。有研究^[6]表明, *Anaerostipes* 和 *Lachnoclostridium* 菌属的某些菌种在抑郁症患者的肠道菌群中占比增高,并且与色氨酸和 5-羟色胺的代谢有关,可能预示着城市青少年有更大的精神压力,比山村青少年有更高的抑郁症发病风险。同时 *Lachnoclostridium* 菌属在动脉粥样硬化患者中显著增加,它能够将胆碱有效地转化为微生物三甲胺(microbial trimethylamine, TMA), TMA 裂解酶通过裂解 TMA 产生氧化三甲胺促进动脉粥样硬化的发展^[7]。更为重要的是 Liang et al^[8]近期调查研究了 1 012 例包括健康人群、结直肠腺瘤、结直肠癌患者粪便标本,结果显示, *Lachnoclostridium* 菌属可作为非侵入性的结直肠腺瘤以及结直肠癌的诊断标志物。该研究表明该菌属在城市青少年人群中占比明显增高。有研究^[9]表明肠道菌群中的特定菌属可作为结直肠癌发生发展的促进因素,且与疾病预后相关。该现象与城市人群结直肠癌发病率高于

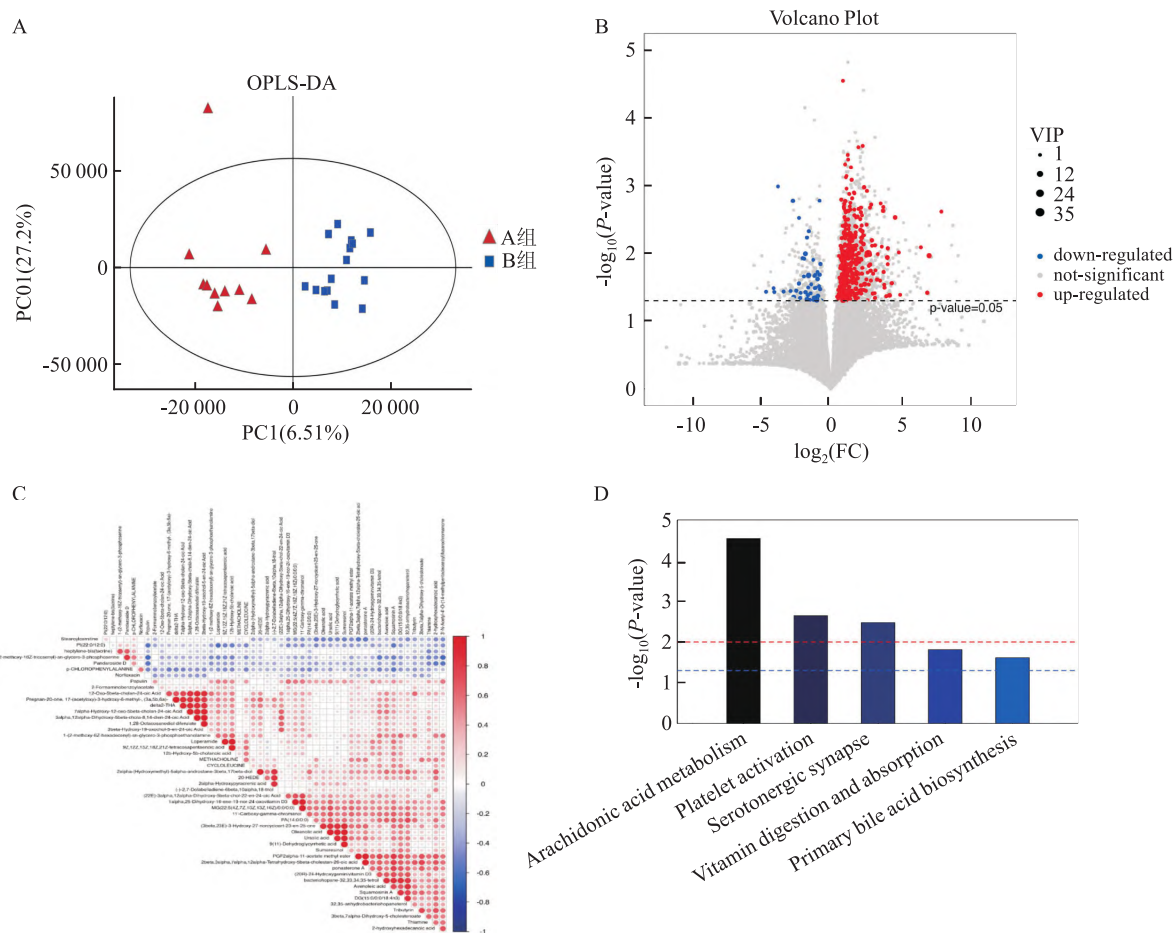


图4 城乡青少年肠道代谢产物以及相关代谢通路差异

A: PLS-DA 粪便代谢物差异分析; B: 火山图筛选差异代谢物; C: 差异代谢物相关性分析; D: 差异代谢物代谢通路富集分析

农村相符合,且近年来结直肠癌病人逐渐年轻化^[10],警示城市青少年应养成良好的生活饮食习惯,注意预防筛查结肠病变。

与城市学生不同的是,山村青少年肠道菌群在属水平上以瘤胃球菌(*Ruminococcaceae UCG-002*)、巴恩斯菌(*Barnesiella*)、真杆菌(*Eubacterium*)等菌属为优势菌。*Ruminococcaceae* 作为益生菌参与次级胆汁酸的产生,缺乏该菌可能会导致患肠道炎症的概率增加,影响宿主的免疫系统^[11]。*Eubacterium* 菌属与鞘氨醇水平呈正相关。鞘氨醇的在维持宿主脂质稳态中起重要作用。*Eubacterium* 产生丁酸,丁酸是短链脂肪酸的重要成员。丁酸的缺乏会导致结肠炎的发生与病理加重^[12]。同时有研究^[13]表明,*Eubacterium* 丰度下降也与自闭症、阿尔茨海默病等精神疾病密切相关。

该研究代谢组学结果显示,与城市中学生相比,山村中学生在花生四烯酸代谢、血小板活化、5-羟色胺代谢、维生素的消化吸收、初级胆汁酸代谢等通路

的表达显著上调。其中花生四烯酸代谢可以通过激活 Wnt 信号通路,刺激肠道上皮细胞的更新再生,在维持肠道上皮完整性以及预防结肠炎中发挥重要作用^[14];5-羟色胺代谢可调节认知与记忆能力^[15];已知初级胆汁酸代谢参与了免疫调节并维持免疫稳态^[16]。

该研究虽然样本量不大,但是属于两组正常人群的对比观察,而非是作为疾病的对照。后续的研究正在进行中,包括加大样本量和完善相关信息,为揭示城乡青少年肠道菌群与代谢产物差异以及维护在校青少年健康提供可靠的依据。

参考文献

- [1] Paone P, Cani P D. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: The expected slimy part Ners? [J]. Gut, 2020, 69 (12): 2232 - 43.
- [2] 王 凯, 林辰辉, 吴乘月. 中国城镇化率 60% 后的趋势与规划选择[J]. 城市规划, 2020, 44(12): 9 - 17.
- [3] Makki K, Deehan E C, Walter J, et al. The impact of dietary fiber

- on gut microbiota in host health and disease[J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(6):705–15.
- [4] Stewart C J, Ajami N J, O'Brien J L, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study[J]. *Nature*, 2018, 562(7728):583–8.
- [5] 张薇,李静. 城乡7~13岁儿童慢性病患率及相关行为特点[J]. *中国卫生工程学*, 2020, 19(6):870–1.
- [6] Xiao L, Yan J, Yang T, et al. Fecal microbiome transplantation from children with autism spectrum disorder modulates tryptophan and serotonergic synapse metabolism and induces altered behavior in germ-free mice[J]. *mSystems*, 2021, 6(2):e01343–20.
- [7] Cai Y Y, Huang F Q, Lao X, et al. Integrated metagenomics identifies a crucial role for trime thylamine-producing *Lachnospirillum* in promoting atherosclerosis [J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2022, 8(1):11.
- [8] Liang J Q, Li T, Nakatsu G, et al. A novel faecal *Lachnospirillum* marker for the non-invasive diagnosis of colorectal adenoma and cancer[J]. *Gut*, 2020, 69(7):1248–57.
- [9] Zhao L, Zhang X, Zhou Y, et al. *Parvimonas micra* promotes colorectal tumorigenesis and is associated with prognosis of colorectal cancer patients[J]. *Oncogene*, 2022, 41(36):4200–10.
- [10] Mauri G, Sartore-Bianchi A, Russo A G, et al. Early-onset colorectal cancer in young individuals[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(2):109–31.
- [11] Mao J, Wang D, Long J, et al. Gut microbiome is associated with the clinical response to anti-PD-1 based immunotherapy in hepatobiliary cancers [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(12):e003334.
- [12] Lavelle A, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(4):223–37.
- [13] Doifode T, Giridharan V V, Generoso J S, et al. The impact of the microbiota-gut-brain axis on Alzheimer's disease pathophysiology [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 164:105314.
- [14] Wang Q, Lin Y, Sheng X, et al. Arachidonic acid promotes intestinal regeneration by activating WNT signaling[J]. *Stem Cell Reports*, 2020, 15(2):374–88.
- [15] Forero A, Ku H P, Malpartida A B, et al. Serotonin (5-HT) neuron-specific inactivation of Cadherin-13 impacts 5-HT system formation and cognitive function [J]. *Neuropharmacology*, 2020, 168:108018.
- [16] Hang S, Paik D, Yao L, et al. Bile acid metabolites control T(H)17 and T(reg) cell differentiation [J]. *Nature*, 2019, 576(7785):143–8.

Study on the difference of gut microbiota and metabolites between urban and rural adolescents

Shen Xuhang¹, Su Shiyu², Guan Jing¹, Shen Jilong², Chen Xi¹

(¹*Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;*

²*The Key Laboratory of Microbiology and Parasitology Anhui, Anhui Provincial Laboratory of Pathogen Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)*

Abstract Objective To investigate the differences in gut microbiota and metabolites between urban and rural middle school students and explore their significance in gut homeostasis, so as to establish a healthy lifestyle and diet for children. **Methods** Fecal samples were collected from middle school students in Hefei ($n = 14$) and Jixi county ($n = 18$, Southern Anhui), aged 13.0–13.5 years. Stool samples were sequenced by 16S ribosomal DNA identification (16S rDNA) and detected for non-targeted metabolites by liquid chromatograph mass spectrometer (LC-MS), followed by bioinformatic analysis. **Results** *Lachnospirillum* and *Anaerostipes* were dominant in the urban students that had been reported to be associated with colorectal cancer, atherosclerosis, depression and other disorders. In the village children, *Ruminococcaceae UCG-002*, *Barnesiella* and *Eubacterium* dominated. An increased proportion of these microbes were related to metabolism of bile acids, short-chain fatty acids, lipid and carbohydrate decomposition, and play an important role in maintaining immune balance and physiological function. Additionally, significant differences in gut metabolites of the two groups were noted, mainly in arachidonic acid metabolism, platelet activation, serotonin metabolism, vitamin absorption, primary bile acid metabolism and other pathways. **Conclusion** Adolescent students of urban and mountainous areas differ in gut microbiota and metabolites. Rural children have a healthy bacterial flora and metabolites in guts due to a reasonable lifestyle and diet in comparison with the city children.

Key words urban and rural population; adolescent; gut microbiota; 16S rDNA; LC-MS; metabonomics