

网络出版时间:2022-8-17 9:30 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220816.0930.032.html

基于 16S rDNA 测序技术分析利福平致大鼠肝损伤中肠道菌群变化特征

杨璐铭¹, 郝金奇^{1,2}, 王 林¹, 裴盛斐¹, 郭 玉¹, 唐琴艳³, 李 玥¹, 高学磊¹, 李玉红^{1,4}, 郝明媛⁵, 冯福民^{1,3}

摘要 目的 采用 16S rDNA 测序技术分析利福平(RFP)致大鼠抗结核药物性肝损伤(ADLI)中肠道菌群的变化。**方法** 将 24 只雄性 SD 大鼠随机均分为对照组(D0 组)、RFP 灌胃 10 d 组(R10 组)、RFP 灌胃 28 d 组(R28 组)。用随机数字表法每组选取 4 只大鼠的粪便标本进行 16S rDNA 测序。

结果 与 D0 组比较,R10 组和 R28 组 α 多样性和 β 多样性均发生改变($P < 0.05$),门水平上拟杆菌门(*Bacteroidetes*)丰度增加,厚壁菌门(*Firmicutes*)丰度减少($P < 0.05$);属水平上 *unclassified_f_Prevotellaceae*、特氏菌属(*Blautia*)、*Prevotellaceae_NK3B31_group*、*Erysipelotrichaceae_uCG-003*、*Fournierella* 丰度增加,乳杆菌属(*Lactobacillus*)、*Romboutsia*、*Ruminococcaceae_uCG-014* 丰度减少($P < 0.05$)。**结论** RFP 致大鼠 ADLI 过程中,肠道菌群数量减少,结构和组成均发生改变,有益菌减少,致病菌增多,但其菌群多样性未见改变。

关键词 抗结核药物性肝损伤;利福平;16S rDNA;肠道菌群;高通量测序

中图分类号 R 183.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1469-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.024

2021-12-03 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81760609)

作者单位:华北理工大学¹ 公共卫生学院、³ 生命科学学院,唐山 063200

² 内蒙古科技大学包头医学院,包头 014040

⁴ 中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心,北京 102206

⁵ 呼伦贝尔市传染病医院检验科,呼伦贝尔 162650

作者简介:杨璐铭,女,硕士研究生;

冯福民,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:fm_feng@sina.com

利福平(rifampicin, RFP)是 WHO 推荐使用的

In vitro phagocytosis model of endometrial cancer cells by macrophages via live cell application

Tan Xuewen, Chen Weile, Chen Yizhao, Fang Yilong, Jiang Haifeng, Xu Zhen, Tu Jiajie, Wei Wei
(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Lab of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032)

Abstract Objective The live cell application was used to observe the process of phagocytosis of endometrial cancer cells by macrophages, and flow cytometry was used to detect the effects of macrophages engulfing tumor cells on activation of cytotoxic T cell. **Methods** Ishikawa cells and THP1-induced macrophages were labeled with CFSE fluorescent probe and CD11b respectively, and then mixed and seeded on a glass imaging dish. The live cell application was performed to record the phagocytosis of Ishikawa cells by macrophages within 120 minutes. Flow cytometry was used to detect the effect of macrophages engulfing tumor cells on activation of cytotoxic T cell. **Results** The green fluorescence of Ishikawa cells was taken up by macrophages after the co-cultured two types of cells were in contact with each other, and macrophages were able to engulf multiple Ishikawa cells continuously. Macrophages that engulfed Ishikawa cells could induce activation of cytotoxic T cell. **Conclusion** The live cell application was successfully conducted to construct an *in vitro* model of phagocytosis of tumor cells by macrophages, which provided a feasible experimental method for detecting the dual killing process of macrophages and T cells on tumor cells.

Key words live cell application; macrophages; Ishikawa cells; phagocytosis; cytotoxic T cells

一线抗结核药物之一,然而经 RFP 治疗的结核病患者会出现血清转氨酶升高、轻度肝炎、肝脏胆汁淤积等肝损伤表现^[1]。这种抗结核药物性肝损伤(anti-tuberculosis drug-induced liver injury, ADLI)已成为结核病治疗中的一大难题,肠道微生物组学研究的进展为 ADLI 的预防和治疗提供了新思路。

人类肠道微生物群由 1 000 多种细菌组成^[2]。肠道菌群处于生态平衡状态时可以抵抗致病菌并且防止致病菌过度繁殖,但当大量使用抗生素或抗菌药物后,肠道菌群的生态平衡被破坏,进而通过肠-肝轴调控肝脏疾病的进展^[3]。此外,肠道菌群也可通过分泌对甲酚来降低对乙酰氨基酚的磺化作用,进而导致药物性肝损伤的发生^[4]。而 RFP 治疗后的肠道菌群变化特征与 ADLI 的发生是否有关联仍需研究。该研究使用 16S rDNA 测序技术分析 RFP 致 ADLI 大鼠模型中肠道菌群的变化特征。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只,6~8 周龄、体质量 180~250 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于华北理工大学实验动物中心,大鼠自由进食与饮水,交替照明各 12 h,温度 24℃左右,相对湿度 60%~80%。本研究已获华北理工大学动物伦理委员会审查批准(批文号:LX2018137)。

1.2 主要试剂 RFP 购自日本 TCI 公司,丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 RFP 灌胃液配制 称取 RFP 粉末 1.2 g 溶解于 60 ml 生理盐水中,配置成浓度为 20 mg/ml 的 RFP 灌胃液。

1.4 动物分组 24 只 SD 雄性大鼠经适应性喂养 1 周,随机分为对照组(D0 组, $n=8$)、RFP 灌胃 10 d 组(R10 组, $n=8$)、RFP 灌胃 28 d 组(R28 组, $n=8$)。对照组大鼠在 0 d 处死,其余两组给予 100 mg/(kg·d) RFP 灌胃,分别于连续灌胃 10 d 和 28 d 后处死各组所有大鼠。

1.5 标本采集 末次给药 24 h 后,收集大鼠新鲜粪便颗粒于 5 ml 无菌冻存管中,置于 -80℃保存。处死大鼠,取肝组织,经 HE 染色后观察组织形态。

1.6 ALT、AST 检测 按照试剂盒说明书进行操

作,在 96 孔板中加入 ALT、AST 基液和血清,37℃ 孵育 30 min,各孔中加入 2,4-二硝基胍,37℃ 孵育 20 min,各孔加入 NaOH,室温静置。使用酶标仪检测吸光度(optical density, OD)值。

1.7 16S rDNA 测序 使用随机数字表法每组选取 4 只大鼠的粪便标本送至上海美吉生物医药科技有限公司进行 16S rDNA 测序。设计 16S rDNA V3~V4 区域的引物,引物序列为 F:5'-NNNNCTACGGGNGGCWGCAG-3', R:5'-NNNNGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3',扩增 16S rDNA 片段,将获得 PCR 产物进行纯化后,采用 Qubit 2.0 测定纯化后的 PCR 扩增子浓度,构建 cDNA 文库,使用 Illumina-MiSeq 平台来测序。

1.8 肠道菌群测序结果分析 Alpha 多样性分析采用 Sobs 指数和 Shannon 指数; β 多样性分析采用主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA),并使用相似性分析(analysis of similarities, Anosim)来评估组间差异;分别从门和属水平比较各组大鼠肠道菌群组成。

1.9 统计学处理 使用 STAMP 和 R 软件进行组间差异分析。STAMP 软件中的 ANOVA 检验和 Rstats 包中的 Kruskal-Wallis 秩和检验用于多组间差异分析, Wilcoxon 秩和检验用于两组间差异分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验大鼠肝组织 HE 染色结果 D0 组肝小叶结构正常,肝细胞形态完整,整齐排列,细胞核大小正常;R10 组肝细胞排列紊乱、细胞质疏松,伴有气球样变和点状坏死;R28 组可见肝小叶结构破坏,大面积肝细胞溶解性坏死且部分细胞核染色变深。见图 1。与 R0 组比较,R10 组和 R28 组 ALT、AST 水平升高($P < 0.05$),差异有统计学意义,见表 1。表明随着 RFP 灌胃时间的延长,肝细胞出现损伤现象,大鼠 ADLI 造模成功。

表 1 三组大鼠血清 ALT、AST 水平变化(U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT	AST
R0	8	39.28 ± 2.91	86.43 ± 6.61
R10	8	81.45 ± 6.67*	174.94 ± 18.57*
R28	8	104.79 ± 8.72*	212.37 ± 19.84*
F 值		102.39	64.19
P 值		<0.001	<0.001

与 R0 组比较; * $P < 0.05$

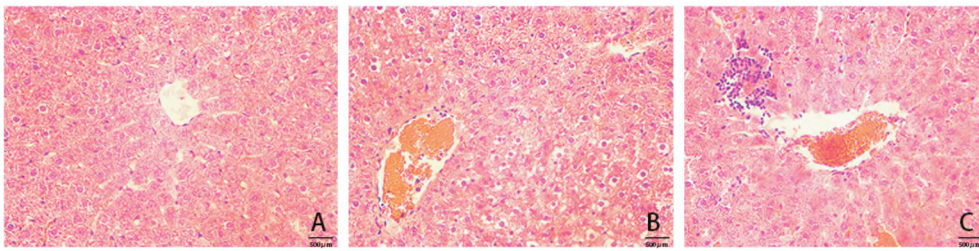


图1 三组大鼠肝组织病理学光镜图 ×200
A: D0组; B: R10组; C: R28组

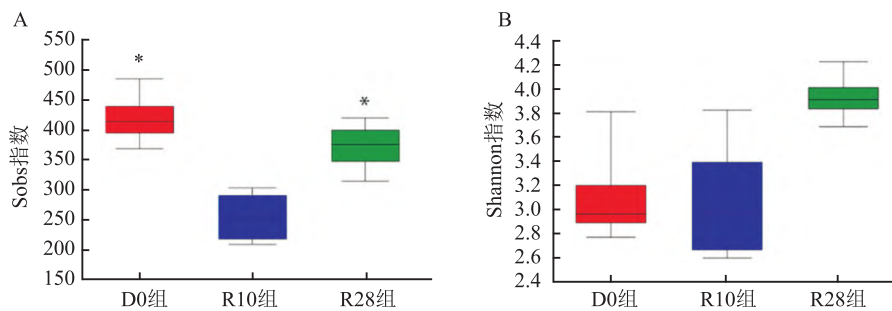


图2 三组大鼠肠道菌群的 Alpha 多样性
A: Sobs 指数; B: Shannon 指数; 与 R10 组比较: * $P < 0.05$

2.2 实验大鼠肠道菌群结构的变化 Sobs 指数和 Shannon 指数可以反映群落物种数量和群落多样性, D0 组、R10 组、R28 组 Sobs 指数差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Shannon 指数差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2。通过 PCoA 图对肠道菌群进行 β 多样性分析, 可以直观的看到 D0 组、R10 组、R28 组明显分开, 而各组组内样本呈现聚集现象, 第一主成分 (PC1) 和第二主成分 (PC2) 分别解释了总变量的 33.93% 和 23.35%; 结合 Anosim 分析, 三组大鼠组内肠道菌群结构相似, 各组间肠道菌群结构差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 3。说明在 RFP 致大鼠肝损伤过程中改变了肠道菌群结构及其丰富度, 而多样性未发生改变。

2.3 实验大鼠肠道菌群物种组成分析 根据 OUT 物种注释结果, 三组大鼠在门水平上主要由厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、疣微菌门 (*Verrucomicrobia*) 和 *Proteobacteria* 构成, 其中 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 占细菌总数的 85% 以上, 在三组中均丰度最高。Kruskal-Wallis 检验结果显示, 在三组中丰度变化有差异的是 *Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Actinobacteria* 和 *Verrucomicrobia*。与 D0 组大鼠比较, 随着给予 RFP

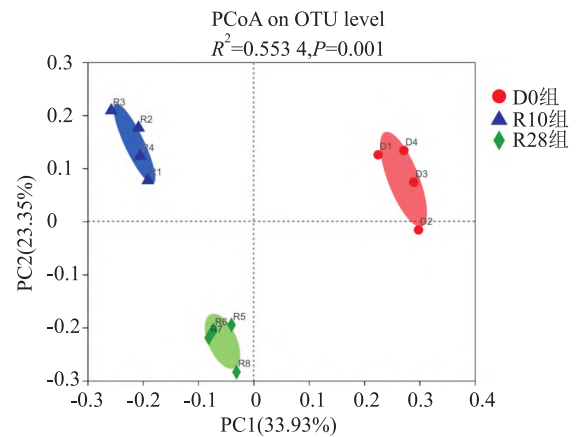


图3 三组大鼠肠道菌群的 PCoA 图

图中样本距离越远, 菌群结构差异越大; R^2 表示分组对样本差异的解释度, R^2 值越大, 表示分组对差异的解释度越高

药物时间的延长, *Bacteroidetes* 丰度增加, *Firmicutes* 丰度减少, *Actinobacteria* 丰度先增加后减少, *Verrucomicrobia* 丰度先减少后增加 ($P < 0.05$)。其中 *Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Actinobacteria* 丰度变化较明显, D0 组、R10 组、R28 组 *Firmicutes* 丰度分别为 72%、53%、32%; *Bacteroidetes* 丰度分别为 17%、33%、61%; *Actinobacteria* 丰度分别为 4%、16%、2%。进

一步两两比较,与 D0 组比较,R10 组 *Firmicutes* 和 *Patescibacteria* 丰度减少,R28 组 *Firmicutes* 和 *Actinobacteria* 丰度减少,*Bacteroidetes* 丰度增加 ($P < 0.05$);与 R10 组比较,R28 组 *Actinobacteria* 丰度减少 ($P < 0.05$)。见图 4。

在属水平上,三组大鼠粪便样本中共有 *Lactobacillus*、*Bifidobacterium*、*Romboutsia* 等 21 个属,Kruskal-Wallis 检验结果显示,三组大鼠肠道菌群相对丰度有统计学差异的属共 15 个。与 D0 组比较,随着给予 RFP 药物时间的延长 *unclassified_f_Prevotellaceae*、*Blautia*、*Prevotellaceae_NK3B31_group*、*Erysipelotrichaceae_uCG-003*、*Fournierella* 丰度增加,*Lactobacillus*、*Romboutsia*、*Ruminococcaceae_uCG-014* 丰度减少,*Bifidobacterium*、*Dubosiella*、*Faecalibaculum* 丰度先增加后减少,*Alloprevotella*、*Akkermansia*、*Prevotellaceae_Ga6A1_group*、*Ruminococcus_1* 丰度先减少后增加(均 $P < 0.05$),其中 *Lactobacillus* 丰度变化较为明显,D0 组、R10 组、R28 组 *Lactobacillus* 丰度分别为 52%、34%、8%;与 D0 组比较,R10 组 *Dubosiella*、*unclassified_f_lachnospiraceae*、*Faecalibaculum* 丰度增

加,R28 组 *norank_f_Muribaculaceae*、*Ruminococcus_1* 丰度增加,*Lactobacillus* 丰度减少;与 R10 组比较,R28 组 *Lactobacillus*、*Faecalibaculum* 丰度减少,*Ruminococcus_1* 丰度增加 ($P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

肠道菌群是衡量机体健康程度及水平的指标之一,已有研究发现肠道菌群多样性与多种疾病有关。本研究选择 16S rDNA 高通量测序技术对 RFP 诱导大鼠肝损伤模型中的肠道菌群多样性进行分析,其结果能够有效解释粪便标本中肠道菌群的物种分布、丰度、差异以及进化关系,为 RFP 诱导的 ADLI 机制研究提供了新的视角,为 ADLI 的预防及治疗提供实验理论基础。

肠道是微生物群的天然栖息地,菌群可以通过各种途径发挥作用。有益菌群,比如粪球菌属 (*Coprococcus*)、假丁酸弧菌属 (*Pseudobutyriivibrio*)、罗氏菌属 (*Rothia*) 等,可以通过产生短链脂肪酸而使宿主受益^[5]。在本研究中,厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 在 RFP 构建的大鼠 ADLI 模型中

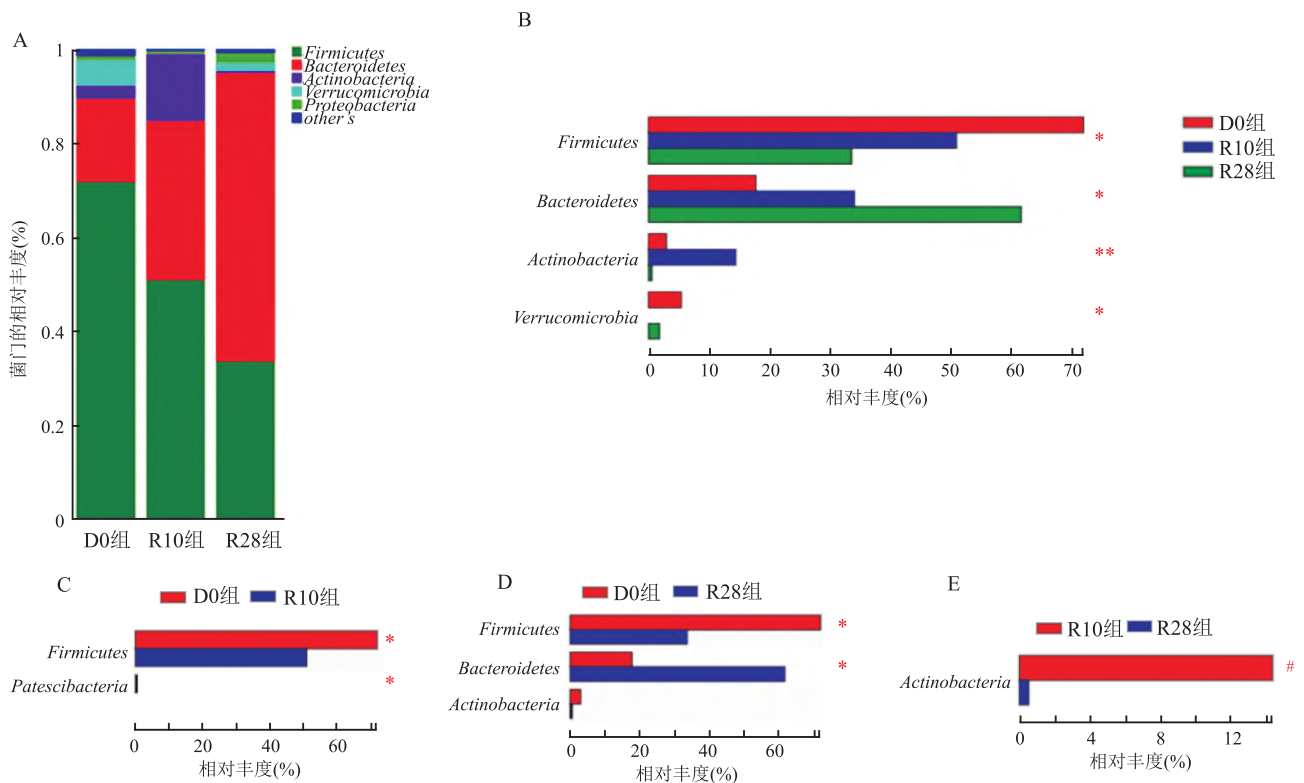


图 4 三组大鼠肠道菌群在门水平的组成及差异分析

A: 三组大鼠肠道菌群在门水平的物种组成;B: 三组大鼠肠道菌群的菌门差异比较;C: D0 组和 R10 组的菌门差异比较;D: D0 组和 R28 组的菌门差异比较;E: R10 组和 R28 组的菌门差异比较;与 R0 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 R10 组比较: # $P < 0.05$

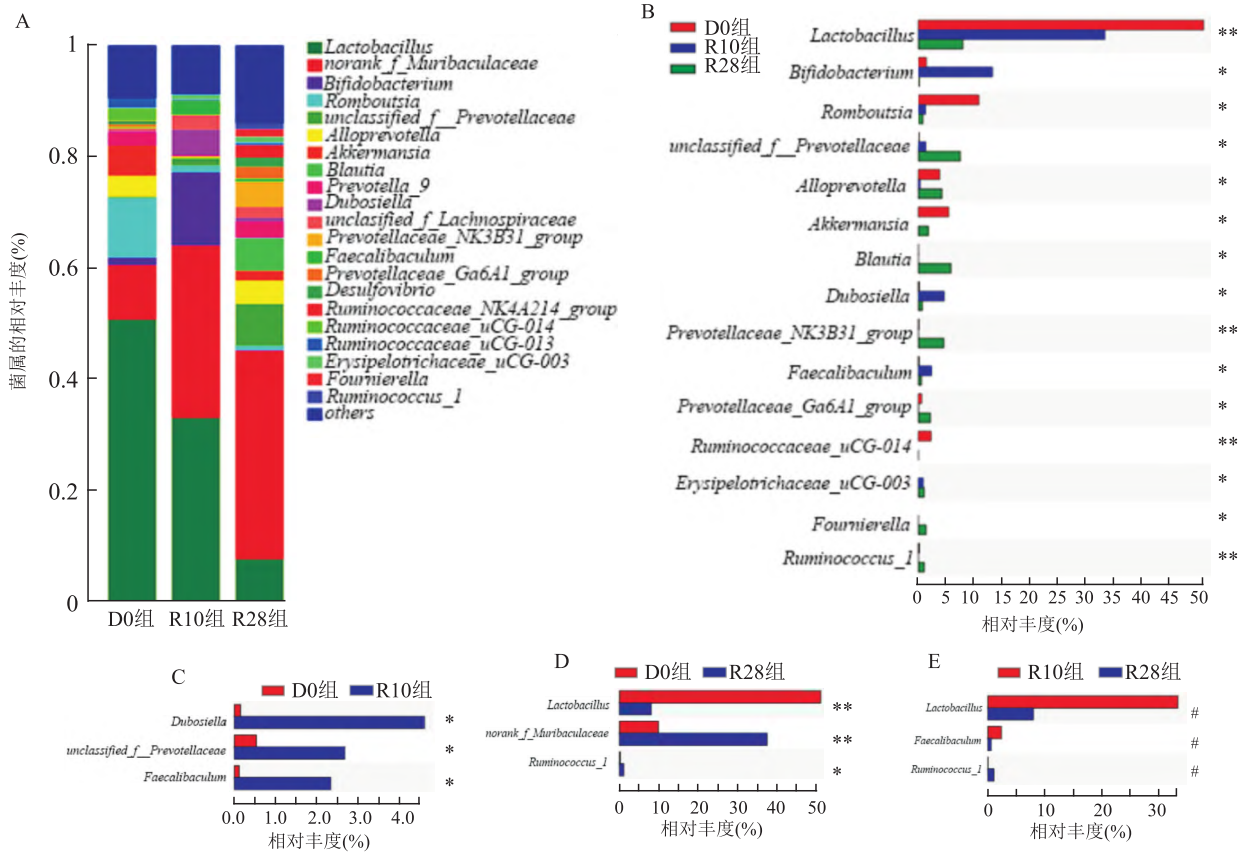


图5 三组大鼠肠道菌群在属水平的组成及差异分析

A: 三组大鼠肠道菌群在属水平的物种组成; B: 三组大鼠肠道菌群的菌属差异比较; C: D0组和R10组的菌属差异比较; D: D0组和R28组的菌属差异比较; E: R10组和R28组的菌属差异比较; 与R0组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与R10组比较: # $P < 0.05$

是绝对优势菌群,随着给予RFP药物时间的延长,*Bacteroidetes*丰度增加,*Firmicutes*丰度减少,虽然影响了其组成比例,但未影响优势菌群的种类。*Firmicutes*和*Bacteroidetes*在不同的肝脏疾病均被证实可以影响疾病的进展,比如,*Bacteroidetes*减少,放线菌门(*Actinobacteria*)的增加,会导致肝病的恶化^[6]。也有研究发现,在酒精性肝病发生后,起到抗炎和保护黏膜作用的*Firmicutes*呈现显著降低^[7]。大鼠给予RFP灌胃后,*Bacteroidetes*丰度增加,说明*Bacteroidetes*参与了ADLI发生,但因果关系尚不明确。

同样的,有研究报道指出肠道微生物群对药物的代谢有直接和间接的影响^[8],这导致肠道菌群中有益菌群和致病菌群丰度变化程度不同,这可能是*Actinobacteria*丰度先增加后减少的原因,进一步的,在属水平上,本研究发现在ADLI大鼠肠道中*Lactobacillus*数量减少,*Lactobacillus*作为一种有益共生菌属,可增强小鼠肝脏的核转录因子E2相关因子2活性,进而起到保护肝脏免受氧化性损伤^[9]。在慢性

肝炎患者和全身炎症反应综合征患者粪便中均表现出致病菌数量增加,*Bifidobacterium*和*Lactobacillus*等有益菌的数量减少^[10-11],与本研究结果一致。

本研究通过对大鼠肠道菌群的分析,证实了RFP致ADLI的发生改变了大鼠肠道菌群的丰度,未改变其多样性,菌群的结构和组成均发生了改变,有益菌减少,致病菌增多。本研究对大鼠的饲养过程进行了严格的质量控制,提升了肠道菌群与ADLI之间联系的可靠性,然而大鼠的饲养时间也可能是一个影响因素,未能在每个时间点设置空白对照组是本研究的局限性。肠道菌群数量较多,组成复杂,探究关键菌群在ADLI中如何发挥作用仍是进一步研究的重点。

参考文献

[1] 马玉,张一杨,贾云鹏,等.一线抗结核药物联用致肝细胞炎性损伤中SIRT1的作用研究[J].安徽医科大学学报,2019,54(12):1942-6.
 [2] Lv L, Yao C, Yan R, et al. *Lactobacillus acidophilus* LA14 allevi-

- ates liver injury[J]. *mSystems*,2021 6(3):e0038421.
- [3] Aron-wisnewsy J, Warmbrunn M V, Nieuwdorp M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: modulating gut microbiota to improve severity[J]. *Gastroenterology*,2020,158(7):1881–98.
- [4] Clayton T A, Baker D, Lindon J C, et al. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009,106(34):14728–33.
- [5] Korlepara V, Kumar N, Banerjee S. Gut microbiota and inflammatory disorders[J]. *Curr Drug Targets*,2022,23(2):156–69.
- [6] Kirpich I A, Petrosino J, Ajami N, et al. Saturated and unsaturated dietary fats differentially modulate ethanol-induced changes in gut microbiome and metabolome in a mouse model of alcoholic liver disease[J]. *Am J Pathol*,2016,186(4):765–76.
- [7] Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of crohn disease patients[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2008,105(43):16731–6.
- [8] Wilson I D, Nicholson J K. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity[J]. *Transl Res*,2017,179:204–22.
- [9] Saeedi B J, Liu K H, Owens J A, et al. Gut-resident lactobacilli activate hepatic Nrf2 and protect against oxidative liver injury[J]. *Cell Metab*,2020,31(5):956–68.
- [10] Xing H C, Li L J, Xu K J, et al. Protective role of supplement with foreign Bifidobacterium and Lactobacillus in experimental hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. *J Gastroenterol Hepatol*,2006,21(4):647–56.
- [11] Shimizu K, Ogura H, Goto M, et al. Altered gut flora and environment in patients with severe SIRS[J]. *J Trauma*,2006,60(1):126–33.

16S rDNA analysis of characteristic changes of intestinal flora in rat liver injury model by rifampicin

Yang Luming¹, Hao Jinqi^{1,2}, Wang Lin¹, Pei Shengfei¹, Guo Yu¹, Tang Qinyan³, Li Yue¹,
Gao Xuelei¹, Li Yuhong^{1,4}, Hao Mingyuan⁵, Feng Fumin^{1,3}

(¹School of Public Health, North China University of Technology, Tangshan 063200; ²School of Public Health, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040; ³College of Life Sciences, North China University of Technology, Tangshan 063200; ⁴National Center for Tuberculosis Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206; ⁵Dept of Clinical Laboratory, Hulun Buir Infectious Disease Hospital, Hulun Buir 162650)

Abstract Objective 16S rDNA sequencing technology was used to analyze the changes of intestinal flora in rats with anti-tuberculosis drug-induced liver injury (ADLI) induced by rifampicin (RFP). **Methods** Twenty-four male SD rats were randomly divided into control group (D0 group), RFP gavage group for 10 days (R10 group), and RFP gavage group for 28 days (R28 group). The fecal specimens of 4 rats in each group were selected by random number table method for 16S rDNA sequencing. **Results** Compared with the D0 group, the α diversity and β diversity of the R10 and R28 groups both changed (all $P < 0.05$), the abundance of *Bacteroidetes* increased at the phylum level, the abundance of *Firmicutes* decreased (all $P < 0.05$), and the abundance of *Unclassified_f_Prevotellaceae*, *Blautia*, *Prevotellaceae_NK3B31_group*, *Erysipelotrichaceae_uCG-003*, *Fournierella*, increased at the genus level, *Lactobacillus*, *Romboutsia*, *Ruminococcaceae_uCG-014* decreased in abundance (all $P < 0.05$). **Conclusion**

In the process of RFP-induced ADLI in rats, the number of intestinal flora decreased, the structure and composition changed, the beneficial bacteria decreased, and the pathogenic bacteria increased, but the diversity of the flora remained unchanged.

Key words anti-tuberculosis drug-induced liver injury; rifampicin; 16S rDNA; gut microbiot; high-throughput sequencing