

感染性腹泻患者肠道菌群失衡特征分析

古文鹏¹, 吕迪², 周晓芳¹, 贾森泉¹, 赵晓南¹, 张勇¹, 周永明¹, 尹建雯¹, 黄莉¹, 伏晓庆¹

摘要:目的 研究不同病原体感染造成的感染性腹泻患者肠道菌群失衡特征,以及拟杆菌属在维持肠道内环境稳态中的作用,为后续感染性腹泻的治疗提供新思路。方法 采用三代全长 16S rRNA 扩增子方法,测定由病毒和细菌等病原感染引起的腹泻患者肠道菌群,同时与健康人群肠道进行对比分析。按照单一细菌感染、单一病毒感染、混合感染以及艰难梭菌感染等对腹泻患者进行分组和分析。结果 拟杆菌属在健康人群肠道环境中占据绝对的数量和丰度水平,而感染性腹泻患者的拟杆菌门/纲/目/科/属等各分类水平的相对丰度均有下降。 α 多样性分析结果显示不同组别之间无统计学差异; β 多样性中,NMDS和PCoA分析显示健康对照组与感染性腹泻各组中形成了明显的不同聚类群。健康人群肠道菌群的多样性水平高于各感染性腹泻组。物种差异分析表明,由不同病原体感染造成的感染性腹泻患者具有各自不同的优势肠道菌群。单一病毒感染之后以双歧杆菌属作为其优势菌群;单一细菌感染之后以链球菌属为优势菌群;混合感染组中以拉氏梭菌属为优势菌群。艰难梭菌感染组中的埃希菌属和克雷伯菌属是该组中的优势菌群。同时,健康人群肠道中的优势菌群是拟杆菌属。COG功能预测结果显示,健康对照组与各感染组形成了明显不同的聚类群。感染性腹泻各组中的防御机制功能、细胞壁合成、蛋白修饰、细胞分化以及复制和重组等功能均明显降低。结论 由不同病原体感染造成的感染性腹泻患者出现不同程度的菌群失调特征,肠道菌群的多样性降低,并出现各自的优势菌群。同时,拟杆菌属在维持人体肠道内环境稳态中具有关键作用,为后续感染性腹泻的治疗和研究等领域提供了新的思路。

关键词:感染性腹泻;肠道菌群;拟杆菌属

中图分类号:R378

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2024)05-0408-07

Characteristics of gut microbiota dysbiosis in patients with infectious diarrhea

GU Wen-peng¹, LYU Di², ZHOU Xiao-fang¹, JIA Sen-quan¹, ZHAO Xiao-nan¹,
ZHANG Yong¹, ZHOU Yong-ming¹, YIN Jian-wen¹, HUANG Li¹, FU Xiao-qing¹

(1. Institute of Acute Infectious Disease Prevention and Control, Yunnan Provincial Centre for
Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China;

2. School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

Abstract: This study investigated the characteristics of gut microbiota imbalance in patients with infectious diarrhea caused by various pathogenic infections, and the role of *Bacteroides* in maintaining homeostasis in the intestinal environment. The gut microbiota in patients with diarrhea caused by pathogenic infections, such as viral and bacterial infections, was determined through full-length 16S rRNA amplicon sequencing. Patients with diarrhea were grouped and analyzed according to the presence of single bacterial infection, single viral infection, mixed infection, or *Clostridioides difficile* infection. *Bacteroides* had the highest absolute number and relative abundance in the gut microbiota in healthy people, whereas patients with infectious diarrhea showed lower relative abundance of *Bacteroides* at each phylum/order/family/genus taxonomic level. Alpha diversity analysis indicated no significant differences among groups. NMDS and PCoA indicated formation of distinct clusters in the control group compared with the different infectious diarrhea groups. The diversity of the gut microbiota was higher in the control

国家自然科学基金(No.82360398)和云南省基础研究计划项目(No. 202301AT070160)联合资助

通讯作者:伏晓庆, Email: yncdcfxq@163.com;

ORCID: 0000-0003-3582-1987

作者单位:1. 云南省疾病预防控制中心急性传染病防制所,昆明 650022;

2. 昆明医科大学公共卫生学院,昆明 650500

group than the infectious diarrhea groups. Patients with infectious diarrhea caused by different pathogens showed differing predominant gut microbiota. *Bifidobacterium* predominated in the single viral infection group, *Streptococcus* predominated in the single bacterial infection group, and *Lachnoclostridium* predominated in the mixed infection group. *Escherichia* and *Klebsiella* were the major gut microbiota in the *C. difficile*

infection group. Meanwhile, the dominant gut microbiota in the healthy population was *Bacteroides*. COG function prediction revealed that the healthy control group formed a distinct cluster from the different infection groups. The functions of defense mechanisms, cell wall synthesis, protein modification, cellular differentiation, and replication and recombination were significantly diminished in all infectious diarrhea groups. In general, patients with infectious diarrhea caused by different pathogens showed dysbiosis, with diminished gut microbiota diversity and the emergence of related biomarkers. Our findings indicated that *Bacteroides* has a key role in maintaining the homeostasis of the human intestinal environment, thus providing new ideas for the subsequent treatment of infectious diarrhea and research in other fields.

Keywords: infectious diarrhea; gut microbiota; *Bacteroides*

Supported by the Yunnan Fundamental Research Project (No.202301AT070160) and the National Natural Science Foundation of China (No.82360398)

Corresponding author: Fu Xiao-qing, Email: yncdcfxq@163.com

感染性腹泻是目前世界范围内普遍存在的公共卫生问题,腹泻的发生与肠道微生物群落的失调高度相关^[1]。一般来说,不同的病原体,如细菌、真菌或病毒的感染可能造成患者产生不同的临床症状。尽管感染性腹泻的死亡水平呈逐渐下降的趋势,但该疾病对 5 岁以下儿童仍是一个主要的健康问题^[2]。研究显示,感染性腹泻每年造成约 130 万儿童死亡的发生,同时造成了巨大的社会和经济负担^[3]。

肠道微生物群落和宿主相互共存,维持平衡和共生的互动关系,从而抑制病原体的定植和感染的发生。此外,粘膜免疫系统的成熟和肠道屏障的维持也取决于宿主肠道微生物群落的平衡^[4]。研究显示,肠道微生物群落的失衡增加了宿主对多种病原体的易感性并引发不同的疾病,包括腹泻、过敏和心血管疾病^[5]。既往对于腹泻患者肠道菌群的研究多集中于炎症性肠病、克罗恩病、肠易激综合征等慢性肠道疾病,由病原体感染引起的急性腹泻患者的肠道菌群相关研究则报道较少。因此,本文将探究不同病原体感染造成的急性腹泻患者肠道菌群及其特征,以及拟杆菌属在维持肠道内环境稳态中的作用,为后续感染性腹泻的治疗提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 腹泻患者信息及病原构成 收集 2018 年 7 月至 2020 年 11 月,云南省 4 家哨点医院腹泻患者粪便标本病原检测阳性 85 份,以及 7 份健康对照组样本,共 92 份作为研究对象(见表 1)。腹泻患者均为医院初诊病例,4 家医院为本研究覆盖省、市、区不

同级别的哨点医院。哨点医院 A 和 B 为昆明市的三甲综合医院;哨点医院 C 为昆明市三甲儿童医院;哨点医院 D 为昆明市社区卫生服务中心。所有的腹泻标本既往已经开展腹泻类病毒(轮状病毒、札如病毒、诺如病毒、腺病毒、星状病毒)和细菌病原谱(致泻性大肠、沙门菌、志贺菌、弯曲菌、耶尔森菌和艰难梭菌)的检测(表 1)^[6]。腹泻患者的纳入标准:1)患者每日腹泻 3 次或以上,伴有粪便性状的改变;2)有明确的病原体感染诊断。排除标准:1)排除霍乱、细菌性和阿米巴痢疾等甲、乙类传染病造成的感染;2)排除其它非感染性因素造成的腹泻病例。本研究经过云南省疾病预防控制中心伦理审查委员会的审查和批准(批准号:伦审批 2018-09 号)。所有受试对象的样本采集前均签署了样本采集知情同意书。

我们按照腹泻患者的病原检测结果分成了单一病毒感染组(SV,42 例)、单一细菌感染组(SB,19 例)、混合感染组(M,10 例)、艰难梭菌感染组(CD,14 例),同时包含对照组(C,7 例)。

1.2 粪便样本 DNA 提取及 PCR 扩增 采用粪便基因组 DNA 核酸提取试剂盒(北京天根,DP328)对 92 份粪便标本进行 DNA 提取。使用 16S rRNA V1—V9 引物扩增包含所有可变区域的全长 16S rRNA 基因:8F(5'-AGAGTTTGTATYMTGGCT-CAG-3')和 1492R(5'-GYTACCTTGTTACGACTT-3')。采用 PrimeSTAR HS(Premix, TaKa-Ra)进行 PCR 扩增,98 °C 2 min;98 °C 15 s,60 °C 20 s,74 °C 90 s,共 30 个循环。

表 1 感染性腹泻患者基本信息及病原谱构成情况
Tab.1 Basic information and pathogen detection results for patients with diarrhea

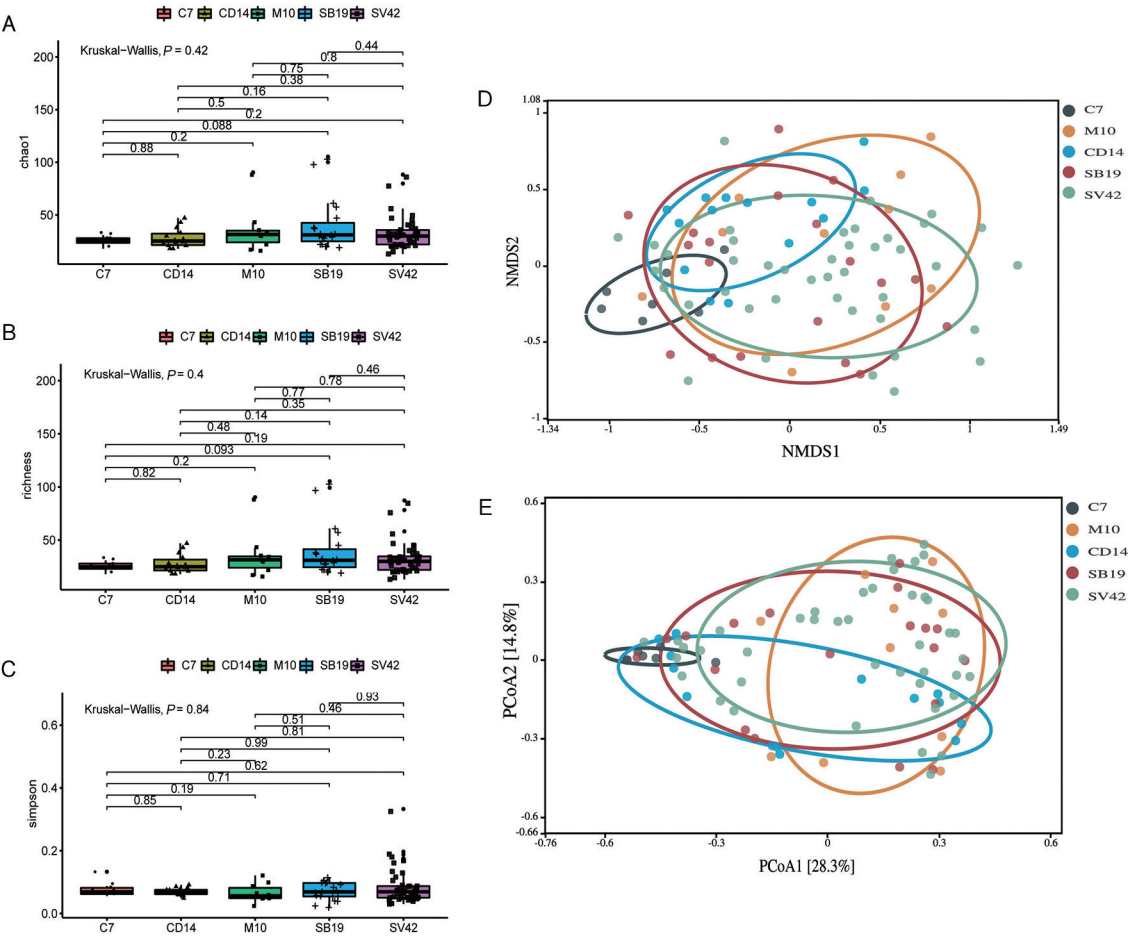
患者信息		组别				
		对照组 (C=7)	单一病毒感染组 (SV=42)	单一细菌感染组 (SB=19)	混合感染组 (M=10)	艰难梭菌感染组 (CD=14)
性别	男	6	29	11	8	8
	女	1	13	8	2	6
平均年龄 (岁)		35.71±20.66	6.48±3.17	18.69±13.85	10.64±5.56	50.33±27.16
病原检测 阳性数	轮状病毒		22	—	3	—
	札如病毒		5	—	3	—
	诺如病毒		7	—	3	—
	腺病毒		6	—	2	—
	星状病毒		2	—	1	—
	致泻性大肠埃希菌		—	11	8	—
	非伤寒沙门菌		—	8	2	—
	艰难梭菌		—	—	—	14

1.3 建库测序及分析 使用 AMPure XP 试剂盒 (Beckman Coulter, USA) 纯化每个 PCR 扩增子产物, 并将等量的纯化扩增子进行 pooling 上机测序。采用 PacBioSequel II Sequencing Kit 2.0 (Pacific Biosciences, USA) 在 PacBio Sequel II (Pacific Biosciences) 上对纯化的扩增子进行测序, 并最终生成具有 ≥ 3 个全长 reads 和 ≥ 20 个质量值的 CCS 读数。使用 R 软件对 CCS 读数进行下机数据质量控制^[7]。DADA2 软件进一步处理经过质控数据的 CCS 读数, 包括质量过滤、去噪和嵌合体过滤等, 按照软件的默认设置生成 ASV 表格, 并由 ASV 表构建 OTU 聚类表^[8]。将每个 OTU 的代表序列与 SILVA 数据库进行比对获得物种注释信息。

1.4 统计分析 采用 R 软件进行共有及特有物种统计、群落组成分析、物种丰度聚类分析、Alpha 和 Beta 多样性分析以及组间差异统计分析。LEfse 软件进行组间物种的差异性分析, LDA 评估差异显著物种的影响 (LDA Score), LDA Score 的筛选值为 3, 结果即为各组内的 biomarker。非参数检验 Anosim 分析微生物群落结构组间是否具有统计学差异。通过 PICRUST 对 OTU 丰度表进行标准化, 然后计算每个 OTU 对应的 Greengene ID, 并比对到 COG 数据库, 获得 OTU 对应的 COG 家族信息, 计算各 COG 的丰度, 进行 COG 功能预测分析^[9]。本研究所有测序数据均提交到 NCBI 数据库 GenBank accession: PRJNA968050。

2 结 果

2.1 不同组别群落相对丰度比较 群落丰度聚类结果显示, 在门分类水平, C7 健康对照组拟杆菌门 (*Bacteroidota*) 的丰度最高, 占 60.62%; CD14 艰难梭菌感染组中, 脱硫菌门 (*Desulfobacterota*) 和变形菌门 (*Proteobacteria*) 的丰度较高, 分别占 32.89% 和 32.78%; M10 混合感染组中, 互养菌门 (*Synergistota*) 的相对丰度占 45.43%; SB19 单一细菌感染组中, 梭杆菌门 (*Fusobacteriota*) 和疣微菌门 (*Verrucomicrobiota*) 相对丰度为 38.05% 和 32.95%; SV42 单一病毒感染组中, 弯曲菌门 (*Campilobacterota*)、疣微菌门 (*Verrucomicrobiota*) 和放线菌门 (*Actinobacteriota*) 的相对丰度分别占 42.86%、19.28% 和 18.05%, 见图 1A 所示。在目分类水平, C7 组的拟杆菌目 (*Bacteroidales*, 50.62%)、CD14 组的丹毒丝菌目 (*Erysipelotrichales*, 30.38%) 和毛螺菌目 (*Lachnospirales*, 29.27%)、M10 组的梭菌目 (*Clostridiales*, 26.29%)、SB19 组的假单胞菌目 (*Pseudomonadales*, 26.45%) 和气单胞菌目 (*Aeromonadales*, 17.42%)、SV42 组的红螺菌目 (*Rhodospirillales*, 23.01%) 分别是各组相对丰度较高的分类单元 (图 1B)。在科分类水平, C7 组的拟杆菌科 (*Bacteroidaceae*, 58.22%)、CD14 组的丹毒丝菌科 (*Erysipelotrichaceae*, 30.38%)、M10 组的消化链球菌科 (*Peptostreptococcaceae*, 26.28%)、SB19 组的巴斯德菌科 (*Pasteurellaceae*, 26.45%) 和 SV42 组的明串球菌科 (*Leuconostocaceae*, 16.18%)



注:A.表示 α 多样性中的 chao1 指数(组间差异 KW 检验, $P=0.42$);B.表示 α 多样性中的 richness 指数(组间差异 KW 检验, $P=0.4$);C.表示 α 多样性中的 simpson 指数(组间差异 KW 检验, $P=0.84$);D.表示 β 多样性中的 NMDS 分析(不同组别样本形成的聚类群用不同颜色表示);E.表示 β 多样性中的 PCoA 分析(不同组别样本形成的聚类群用不同颜色表示)。

图 2 不同组别的多样性分析结果
Fig.2 Diversity results for the different study groups

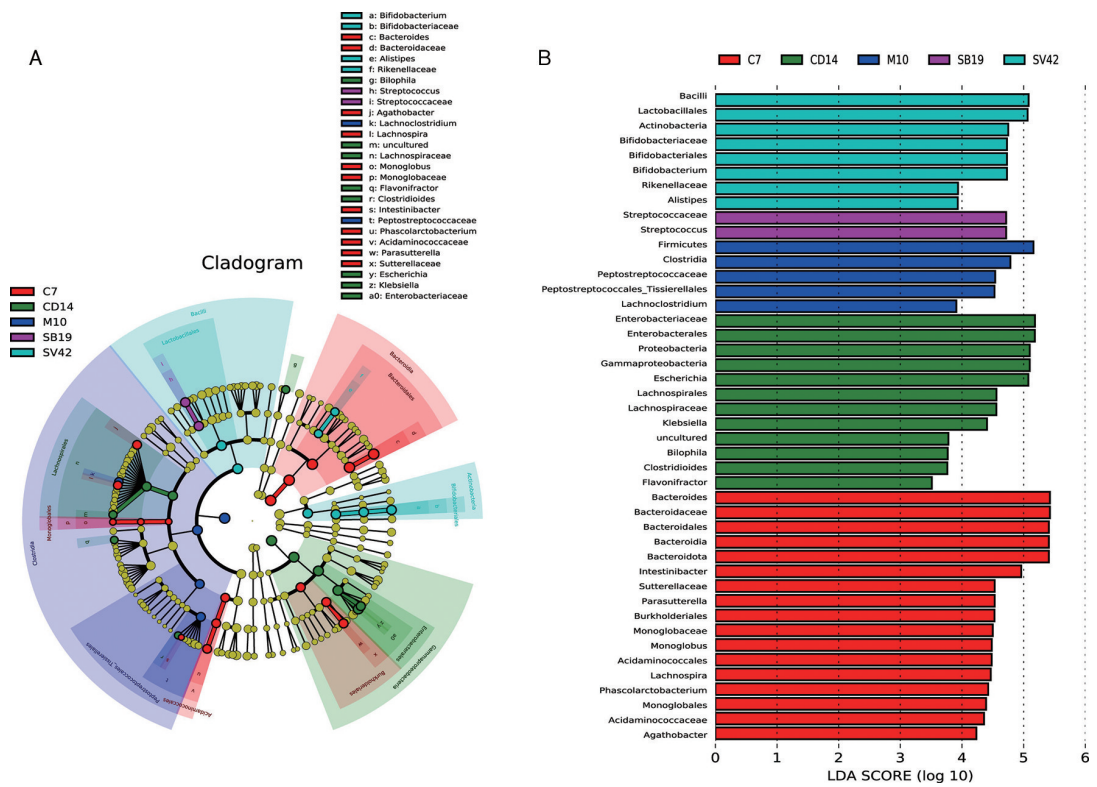
CD14 组中有 8 个分类单元分值超过 4 分,SV42 组中有 6 个,而 M10 组中有 4 个。最少的则是 SB19 组,仅有 2 个分类单元的得分大于 4,见图 3。组间差异性分析结果显示,在门水平,C7 组的拟杆菌门明显高于其它感染组($P=0.014$)。在目水平,拟杆菌目(*Bacteroidales*, $P=0.014$)、肠杆菌目(*Enterobacterales*, $P=0.025$)、乳杆菌目(*Lactobacillales*, $P=0.014$)和毛螺菌目(*Lachnospirales*, $P=0.013$)在 5 组之间具有统计学差异。在科水平,肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*, $P=0.043$)、拟杆菌科(*Bacteroidaceae*, $P=0.014$)和毛螺菌科(*Lachnospiraceae*, $P=0.014$)在多组之间的比较中具有统计学差异。而在属水平,仅有拟杆菌属(*Bacteroides*)在 5 组之间具有统计学差异($P=0.014$),以健康对照组中比例最高。

2.4 COG 功能预测 C7 对照组和感染组之间的 COG 功能预测聚类结果见图 4 所示。其中对照组

与感染组形成了明显不同的聚类群。对照组中的防御机制、细胞壁合成、蛋白修饰、细胞分化以及复制和重组等功能具有较高的丰度水平。CD14 组中以离子转运和代谢的功能分布最高;SB19 组中以细胞内转运、分泌和囊泡运输功能分布最高;M10 组以氨基酸转运和代谢最高;而 SV42 组以核苷酸转运和代谢功能最高。

3 讨论

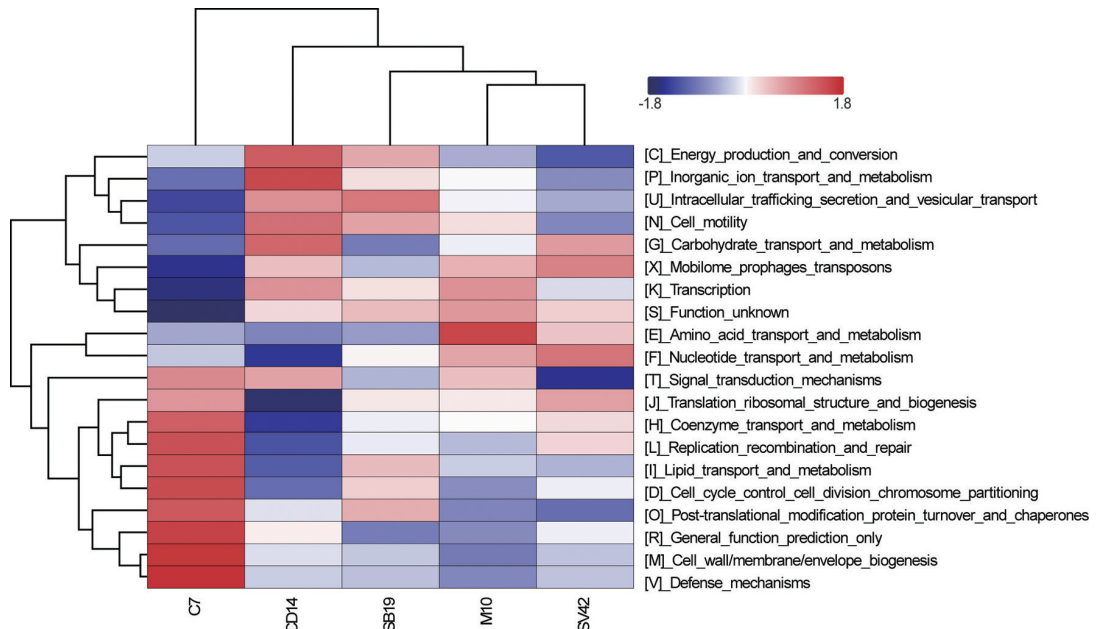
感染性腹泻患者的菌群失调是以病原体占主导地位为特征的。病原体抑制了患者正常的肠道微生物,导致宿主肠道内的共生菌群减少。同时,病原体产生的毒素也通过破坏正常的肠道功能和免疫反应导致了腹泻的发生^[10]。致泻大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌和艰难梭菌被认为是细菌性腹泻的主要病原体;而轮状病毒、诺如病毒和肠道病毒等被认为是病毒性腹泻的主要病原体^[1]。因此,本研究根据感



注:图例颜色分别对应了每个组别中的特征性菌群;A.表示 LEfse 分析结果,其中圆圈中的点代表不同组别中的特征性肠道菌群,B.表示 LDA 评分结果,不同组别的优势肠道菌群用不同颜色表示,其中横坐标表示 LDA 评分值。

图 3 不同组别之间的物种差异分析

Fig.3 Difference analysis of the infectious diarrhea and control groups



注:红色区域表示 COG 功能预测丰度高,蓝色代表 COG 功能预测丰度低。

图 4 不同组别之间 COG 功能预测聚类热图

Fig.4 Cluster heatmap of COG functional prediction analysis of different groups

染性腹泻病原不同进行分组,探究由不同病原体感染造成的患者肠道菌群特征。同时,由于艰难梭菌感染往往与宿主的肠道菌群失调和服用抗生素等因素有关^[11],因此单独对其进行分组和分析。研究结果发现,与健康人群相比,各种病原造成的感染性腹泻患者的肠道菌群多样性是明显下降的。物种差异

分析结果揭示了健康人群中菌群多样性程度最高,而单一细菌感染组中的多样性程度最低。

本研究还发现,拟杆菌在健康人群肠道环境中占据绝对的数量和丰度水平,而感染性腹泻患者的拟杆菌门/纲/目/科/属等各分类水平的相对丰度均有下降。研究显示,人类的肠道是由复杂的细菌群落组成的,其中以拟杆菌门和厚壁菌门的细菌占绝大部分。拟杆菌属占全部可培养的肠道微生物的30%,目前有20多个种,其中大部分被认为是有助于宿主的营养状况和免疫的共生菌^[12]。只有产肠毒素的脆弱拟杆菌(ETBF)与腹泻疾病有关,而非产肠毒素的脆弱拟杆菌(NTBF)菌株被认为是抵抗结肠炎症的潜在益生菌。动物实验研究结果同样证明了拟杆菌属在维持肠道内环境稳态中的作用。Zhang W等^[13]建立了一个抗生素相关性腹泻(AAD)的大鼠模型,并通过增加特定共生菌群的丰度,即用脆弱拟杆菌菌株ZY-312来治疗和缓解AAD相关腹泻。他们的结果表明,脆弱拟杆菌对感染性疾病的治疗是有益的。本研究中同样发现了拟杆菌属在维持健康人群肠道菌群平衡方面的关键作用。不论是由单一病原菌或是病毒造成的感染,甚至是细菌与病毒造成的混合性感染,患者肠道环境中的拟杆菌各分类水平均呈现显著下降。

既往的研究多关注药物治疗感染性腹泻的效果以及相关肠道菌群特征的改变,没有系统的研究指出感染性腹泻过程中,患者的肠道菌群的状态及其特点。本研究发现,由不同病原体感染造成的感染性腹泻患者具有各自不同的优势肠道菌群特征。单一病毒感染之后以双歧杆菌属作为其优势菌群;单一细菌感染之后(艰难梭菌除外)以链球菌属作为其优势菌群;混合感染组中以消化链球菌作为其优势菌群。艰难梭菌感染组中的埃希菌属和克雷伯菌属是该组中的优势菌群。同时,健康人群肠道中各种菌群的相对丰度均具有较高水平,并以拟杆菌属最高。关于艰难梭菌感染引起的不同宿主肠道菌群失调已有相关研究报道。课题组前期通过建立艰难梭菌树鼯感染模型发现,动物在感染艰难梭菌菌株之后肠道环境中埃希菌属的相对丰度上升,被认为是艰难梭菌感染定植的标志物之一^[14]。本研究同样发现了患者感染艰难梭菌后,埃希菌属同样可作为其感染的特征性标志物。

利益冲突:无

引用本文格式:古文鹏,吕迪,周晓芳,等.感染性腹泻患者肠道菌群失衡特征分析[J].中国人兽共患病学报,2024,40(5):408-414. DOI: 10.3969/j.

issn.1002-2694.2024.00.070

参考文献:

- [1] Li Y, Xia S, Jiang X, et al. Gut microbiota and diarrhea: an updated review [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 625210. DOI: 10.3389/fcimb.2021.625210
- [2] Lamberti LM, Ashraf S, Walker CL, et al. A systematic review of the effect of rotavirus vaccination on diarrhea outcomes among children younger than 5 years [J]. Pediatr Infect Dis J, 2016, 35(9):992-998. DOI: 10.1097/INF.0000000000001232
- [3] Troeger C, Forouzanfar M, Rao P C, et al. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015 [J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17(9): 909-948. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30276-1
- [4] Leslie JL, Young VB. The rest of the story: the microbiome and gastrointestinal infections [J]. Curr Opin Microbiol, 2015, 23:121-125. DOI: 10.1016/j.mib.2014.11.010
- [5] Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease [J]. Gastroenterology, 2009, 136(1):65-80. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.10.080
- [6] 李桂满,古文鹏,侯敏,等.昆明地区2018—2020年腹泻患者中艰难梭菌感染特征分析[J].中华流行病学杂志, 2023, 44(4): 624-628. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220712-00624
- [7] Hall M, Beiko RG. 16S rRNA gene analysis with QIIME2 [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1849: 113-129. DOI: 10.1007/978-1-4939-8728-3_8
- [8] Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, et al. DADA2: High-resolution sample inference from illumina amplicon data [J]. Nat Methods, 2016, 13(7):581-583. DOI: 10.1038/nmeth.3869
- [9] Douglas GM, Beiko RG, Langille MGI. Predicting the functional potential of the microbiome from marker genes using PICRUSt [J]. Meth Mol Biol, 2018, 1849: 169-177. DOI: 10.1007/978-1-4939-8728-3_11
- [10] Vega L, Herrera G, Munoz M, et al. Gut microbiota profiles in diarrheic patients with co-occurrence of *Clostridioides difficile* and blastocystis [J]. PLoS One, 2021, 16(3): e0248185. DOI: 10.1371/journal.pone.0248185
- [11] 王晓亚,安彦波,戴敏高,等.艰难梭菌感染与肠道微生态的研究进展[J].中国人兽共患病学报, 2021, 37(9): 833-838. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.107
- [12] Wick EC, Sears CL. *Bacteroides* spp. and diarrhea [J]. Curr Opin Infect Dis, 2010, 23(5): 470-474. DOI: 10.1097/QCO.0b013e32833da1eb
- [13] Zhang W, Zhu B, Xu J, et al. *Bacteroides fragilis* protects against antibiotic-associated diarrhea in rats by modulating intestinal defenses [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1040. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01040
- [14] Gu W, Li W, Wang W, et al. Response of the gut microbiota during the *Clostridioides difficile* infection in tree shrews mimics those in humans [J]. BMC Microbiol, 2020, 20(1): 260. DOI: 10.1186/s12866-020-01943-z

收稿日期:2023-10-07 编辑:张智芳