

• 论 著 •

肝性脑病大鼠经粪便细菌移植后的肠道菌群宏基因组分析*

王巍巍¹, 刘丰睿², 吕朝华¹, 申呈祥¹

(1. 重庆市铜梁区人民医院肝胆胰外科, 重庆 402560; 2. 陆军军医大学第二附属医院肝胆外科, 重庆 400037)

[摘要] **目的** 建立肝性脑病大鼠模型及粪便细菌移植(FMT)模型, 探索细菌移植后肝性脑病大鼠肠道菌群的变化。**方法** 选择 30 只 SD 大鼠, 采用四氯化碳联合乙醇的方法建立肝性脑病大鼠模型。将大鼠随机分成 3 组, A 组为正常对照组, B 组为肝性脑病模型组, C 组为 FMT 组, 每组 10 只。B 组进行同等剂量生理盐水灌胃, C 组进行 FMT(按 200 μ L/d 灌胃, 每毫升细菌溶液含细菌 1.5×10^{11})。每天观察大鼠生存情况。收集大鼠肠道粪便进行宏基因组测序。**结果** 实验过程中大鼠共死亡 9 只, A 组无死亡。FMT 前后, C 组大鼠移植后体重明显增加。通过宏基因组测序, 发现 C 组较 B 组可有效地改善菌种的多样性和丰度; 与 A 组比较, B、C 组中变形菌门含量显著升高, 拟杆菌门丰度显著降低。**结论** FMT 可以改变肝性脑病大鼠肠道菌群的结构。

[关键词] 粪便细菌移植; 肝性脑病; 宏基因组; 肠道菌群; 大鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.06.003

中图法分类号: R333.4; R378.2; R575.3

文章编号: 1009-5519(2024)06-0913-05

文献标识码: A

Macrogenomic analysis of intestinal flora in rats with hepatic encephalopathy
after fecal microbiota transplantation*

WANG Weiwei¹, LIU Fengrui², LYU Chaohua¹, SHEN Chengxiang¹

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Tongliang District People's Hospital of Chongqing, Chongqing 402560, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of the Army Medical University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To establish a rat model of hepatic encephalopathy and fecal microbiota transplantation(FMT) model, and explore the effects of bacterial transplantation on intestinal flora in rats with hepatic cirrhosis. **Methods** A total of 30 SD rats were selected and rat liver models were established using carbon tetrachloride+ethyl alcohol method. The rats were randomly divided into three groups: group A as the normal control group, group B as the hepatic encephalopathy model group, and group C as the FMT group, with 10 rats in each group. Group B was given the same dose of normal saline, and group C was given FMT transplantation (200 μ L/d, bacteria 1.5×10^{11} per mL of bacterial solution). The survival of the rats was observed daily. The intestinal feces of rats were collected for metagenomic sequencing. **Results** A total of nine rats died during the experiment, while group A did not die. Before and after FMT, the body weight of rats in group C increased significantly after transplantation. Through metagenomic sequencing, it was found that group C could effectively improve the diversity and abundance of bacteria compared with group B. Compared with group A, the content of Proteobacteria in group B and C was significantly increased, while the abundance of Bacteroides was significantly decreased. **Conclusion** FMT can alter the structure of intestinal flora in rats with hepatic encephalopathy.

[Key words] Fecal microbiota transplantation; Hepatic encephalopathy; Metagenome; Intestinal flora; Rats

肝硬化是一种严重影响人类生活质量的疾病, 会引起如肝性脑病(HE)等严重并发症。近年研究表明, 微生物群和宿主之间的联系在 HE 的发病机制中起着关键作用, 因此微生物群落组成和功能不仅可以应用在 HE 的诊断领域, 其治疗作用还被探索用于 HE 的治疗^[1-2]。

近年来, 粪便细菌移植(FMT)已成为生物医学和临床医学的研究热点。FMT 对不同疾病的临床反应

与各种疾病相关的微生物群-宿主相互作用提供了证据, 如重症感染、糖尿病、癌症、肝硬化、肠道疾病和其他疾病^[3-4]。

近年来, 已有学者将 FMT 安全应用于代偿性肝硬化和酒精性肝硬化患者, 并取得了有效的临床结果。对于 HE 患者, FMT 不仅可以改变相关患者的认知功能, 还可明显降低相关不良事件发生风险^[5-6]。因此, 本研究对 HE 大鼠进行 FMT, 通过研究其肠道

* 基金项目: 重庆市科卫联合医学项目(2022MSXM044)。

作者简介: 王巍巍(1982—), 博士研究生, 副主任医师, 主要从事肠道细菌移植方面的研究。

微生物变化情况,以期进一步了解 FMT 后何种细菌发挥作用,为深入研究 FMT 相关机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 选择雄性 SPF 级 SD 大鼠 30 只,体重(250.0±49.0)g,购于湖南安生美药物研究院有限公司,许可证号:SCXK(湘)2019-0004。各大鼠购回后适应性喂养 1 周,保持自由饮水、进食,通风,12 h 明暗交替。将 30 只大鼠随机分为 3 组:A 组为正常对照组,B 组为 HE 模型组,C 组为 FMT 组,每组 10 只。本研究通过重庆市铜梁区人民医院伦理委员会审核并批准(2021-40)。

1.2 HE 大鼠模型的建立 参照前期研究建立 HE 大鼠模型^[7]。四氯化碳、大豆油按 2 : 3 的比例混合,于 B、C 组大鼠颈背部皮肤皮下注射,首次注射按每 100 g 体重 0.5 mL,而后按每 100 g 体重 0.3 mL 注射,每周注射 2 次;予 5%乙醇自来水溶液自饮。A 组正常喂养,普通饮水,颈背部皮下注射生理盐水。造模持续 9 周。

1.3 模型验证 参照前期研究进行模型验证^[7]。大鼠持续造模 9 周后,随机选取 B 组大鼠 5 只,A 组大鼠 1 只,7%水合氯醛(每 100 g 体重 0.5 mL)麻醉,暴露肝脏,可见 B 组大鼠肝脏相比 A 组大鼠病变明显,说明造模成功。

1.4 各组大鼠的处理 B 组进行同等剂量生理盐水灌胃;C 组进行 FMT,按 200 μL/d(1 mL 粪便细菌溶液中含粪便细菌 1.5×10¹¹)进行灌胃处理,移植细菌购于河北蓝域信科菌群资源中心。每天观察大鼠生存情况。收集大鼠肠道粪便进行宏基因组测序。

1.5 肠道菌群宏基因组分析 参考朱宏斌等^[8]的方法,进行细菌宏基因组分析。首先基于 Illumina NovaSeq/HiSeq 高通量测序平台,采用全基因组鸟枪法策略,将提取获得的菌群宏基因组总 DNA,或宏转录组以 mRNA 为模板合成的 cDNA 双链,随机打断为短片段,并构建合适长度的插入片段文库,对这些文库进行双端测序。每个样本构建一个文库。对原始数据进行质量筛查,去除非目的序列(Trimmomatic 0.32, <http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>),获取可用于下游宏基因组分析的高质量数据集。接着,在进行 BBCMS 校正后读取长序列,使用 MEGAHIT 进行拼接,构建宏基因组叠连群(contigs)序列集;使用软件 MMseqs2 的 linclust 模式将 contigs 序列集按相似度 95%、对齐区域覆盖度 90%(占短序列的比例)进行去冗余,获得非冗余的 contigs 集合,去冗余后采用专门用于预测原核微生物和宏基因组基因序列的 MetaGeneMark 软件(<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>)识别其中的开放阅读框(ORF),进行基因预测,获得非冗余氨基酸序列集。随后,对氨基酸序列使用 KEGG 数据库、GO 数据库及 EggNOG 数据库等进行功能注释,获得各等级的功能类群丰度谱,并进行功能组成分析、多样性分析、差异分析等。同时,对高质量数据集、非冗余

氨基酸序列进行物种注释,获得种及种以下精细水平的物种组成谱,并进行物种组成分析、多样性分析、差异分析等。物种注释利用 MEGAN 比对 NR 数据库,利用 R 软件绘制门、纲、目、科、属、种分类等级的物种丰度柱状图。

1.6 各组大鼠关键菌群的 LEfSe 分析 为了更加了解大鼠肠道菌种的显著差异,进行 LEfse 分析。通过 LEfSe 本地分析软件进行分析,并使用 R 软件的 ggtree 等包将分析结果可视化。

1.7 统计学处理 所有数据采用 SPSS24.0 软件进行统计。符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。物种和功能差异采用 STAMP 分析;多组间统计使用单因素方差;组间差异使用 Welch's *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般生存情况和大便情况 实验过程共死亡大鼠 9 只,所有大鼠在建模后都出现不同程度嗜睡、反应迟缓及活动量变少情况,偶有厌食及消瘦。在 FMT 后 2 周,B 组大鼠仍然持续上述变化,C 组大鼠开始出现自主活动增加,进食增加并伴随大便明显好转呈正常状态。移植前,3 组大鼠体重比较,差异无统计学意义($P>0.05$);移植后,B 组大鼠体重较 A 组明显下降,C 组较 B 组明显增加,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠移植前后体重变化($\bar{x} \pm s$,g)			
时间	A 组	B 组	C 组
移植前	252.3±23.2	240.8±30.0	254.9±37.9
移植后	265.2±27.1	237.9±25.8 ^a	284.9±15.8 ^b

注:与 A 组移植后比较,^a $P<0.05$;与 B 组移植后比较,^b $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠肠道菌群结构差异分析 在门水平上,将注释到的菌门取 20 类进行绘制(图 1)。与 A 组比较,B、C 组中变形菌门的丰度升高,拟杆菌门的丰度下降;C、B 组进行对比,拟杆菌门的丰度增加,变形菌门的丰度下降,差异均有统计学意义($P<0.05$)。在种水平上,将注释到的菌种取含量前 20 种的进行绘制(图 2),与 A 组进行比较,B 组中大肠杆菌(*Escherichia coli*)、拟杆菌(*Bacteroides sartorii*)、Dorea sp. CAG:317、志贺氏杆菌(*Shigella sonnei*)、梭状芽孢杆菌(*Clostridium perfringens*)菌种的含量增加,而普雷沃氏菌(*Prevotella* sp.)MGM1、P2-180、P5-92 及厚壁菌门细菌(*Firmicutes bacterium*)ASF500、0.1×D8-71、1×D42-67 的丰度明显减少,C 组相对 B 组改善明显。Dorea sp. CAG:317 在 C 组丰度最高。韦恩图分析显示,3 组大鼠共有相同菌种 19 034 种,A 组与 B 组和 A 组与 C 组共有相同菌种分别为 681、1 327 种,B 组与 C 组共有相同菌种 1 148 种;而有组别特异性的菌种为 A 组 1 200 种,B 组 865 种,C 组 1 151 种。

将每个样本的种水平分类单元按其丰度从高到低沿横坐标依次排列后,将丰度值经 log₂ 对数转换作为纵坐标,在 R 软件中编写脚本绘制各样本的丰度等级曲线。

丰度等级曲线显示,相对 A 组来说,B 组菌种的丰度明显降低,FMT 后,C 组菌种的丰度明显增加(图 3)。

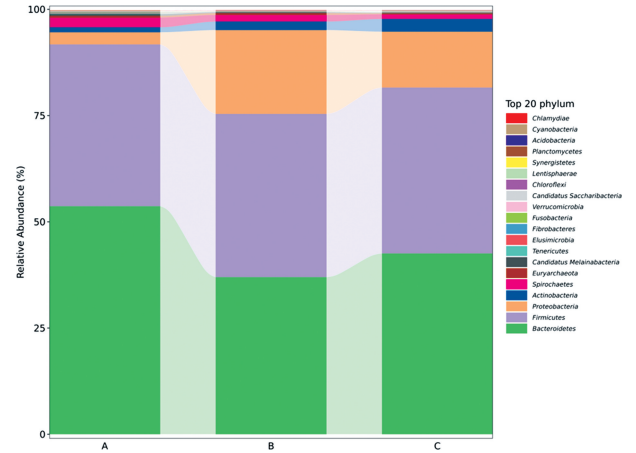


图 1 门水平分布

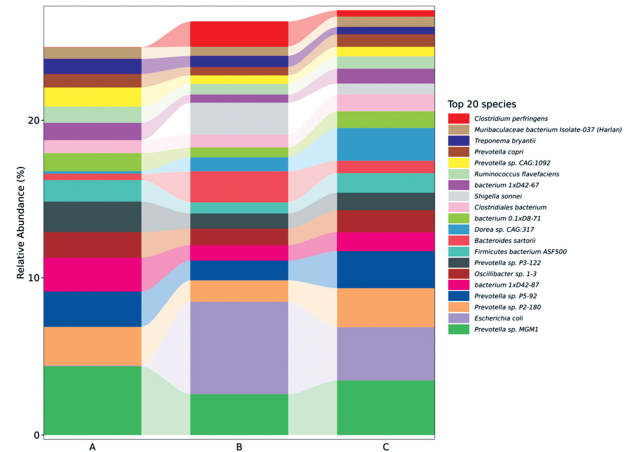


图 2 种水平分布

2.3 各组大鼠关键菌群的 LEfSe 分析 在种水平上,取 3 组大鼠肠道菌群 LDA 差异分析对数得分值大于 4 的菌种进行比较,结果显示,3 组间具有显著差异的物种分别有拟普雷沃菌科、气单胞菌科及琥珀酸弧菌科等 32 种;肠杆菌科、梭状芽孢杆菌及志贺氏菌等 48 种;Dorea sp. CAG:317 及乳酸杆菌属 12 种。不同种间 LDA 评分的柱状分布见图 4,差异物种的系统发育分布见图 5。

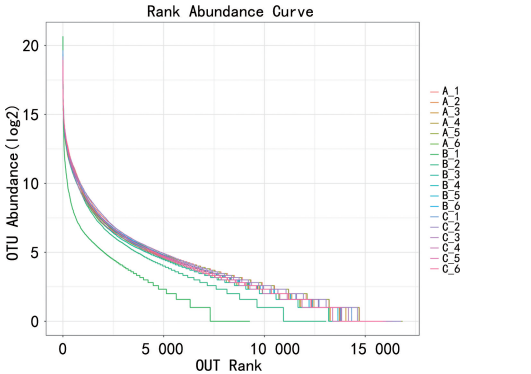
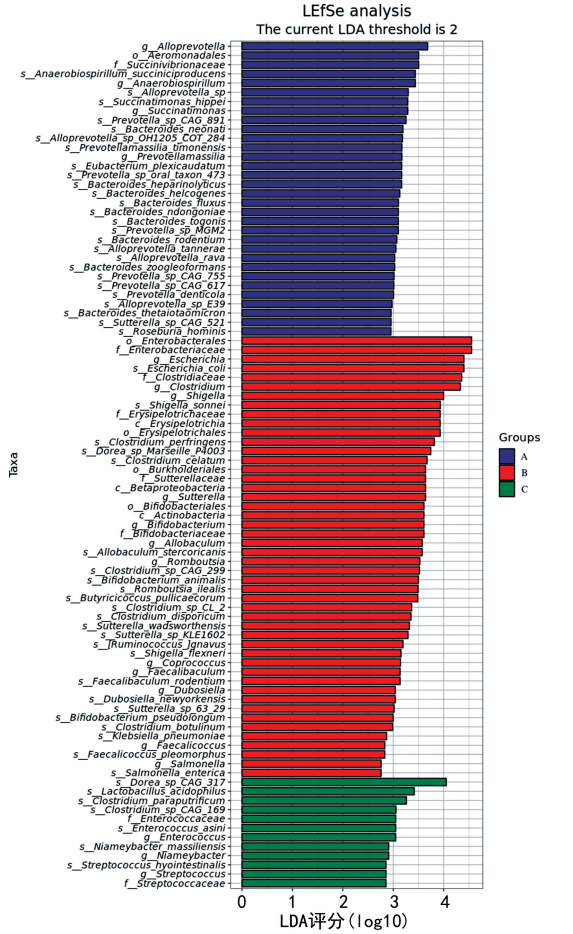


图 3 丰度等级曲线



注:长度越长表明该分类单元的差异越显著。

图 4 不同种间 LDA 评分的柱状分布



图 5 分类学分支图

3 讨 论

HE 作为晚期肝硬化住院和发病的最主要原因,在实际治疗中,可以用于治疗的方案极其有限^[9]。人类肠道和肝脏的微生物组通过影响每个系统的健康和疾病状态而共存,全身炎症及内毒素血症等影响肠道微生物的因素是 HE 发病的主要机制^[10]。近年来,微生物-肠道-肝脏轴学说成为研究热点,肝脏通过门静脉系统及胆道系统与胃肠道直接相关,因此首先接触肠源性代谢物、细胞成分和激素等物质,与肝脏免疫细胞相互作用,引起炎症反应,诱发各种肝脏疾病的进展^[11-12]。

肠道菌群是影响肠道功能的一个很重要的因素,关系到肝硬化及其并发症的进展^[13]。FMT 最近已成为肝硬化相关疾病的潜在治疗方法^[14]。鉴于肠道微生物在 HE 的治疗中越来越被重视,现在很多的证据表明肠道微生物和 HE 的发病机制有关^[5]。然而,就病程而言,肝硬化发生在 HE 之前,加之肝硬化是一个不可逆的过程,因此,研究关注点可能更应该在 HE 发生之前甚至是早期肝硬化。

众所周知,肝硬化也是原发性肝癌的一个前置性病变,所以对肝硬化的早期干预也无疑有益于肝癌的防治。越来越多的证据表明,从肝硬化前期到肝硬化、肝功能失代偿期直至肝移植,肠道菌群组成和功能的变化在肝脏疾病中起着重要作用^[15]。本研究在动物的选择和 FMT 模型的构建方法上,作者团队在前期研究中也做了探索,最终选择死亡率更低、可重复性和观察性更好的 SD 大鼠作为最终的实验动物^[7,16],在建模方法上最终选择了四氯化碳联合乙醇的方法构建 HE 模型^[7]。

本研究结果发现,相对 B 组来说,C 组在移植前后能有效改善大鼠的体重,使其体重增长情况更加趋近于 A 组,B 组大鼠相对于 A 组表现出明显的下降趋势,后期也未得到改善。

既往宏基因组研究表明,肝硬化患者肠道菌群丰度存在降低现象,同时发生变化的是潜在致病菌,如肠杆菌科、葡萄球菌科和肠球菌科的相对丰度增加,潜在有益细菌毛螺菌科和瘤胃菌科的相对丰度降低^[17]。本研究采用宏基因组手段分析了 HE 模型大鼠在 FMT 前后肠道菌群结构和功能的差异化,并对其做了物种 Alpha 多样性分析,丰度等级曲线结果表明,FMT 可以显著改善 HE 大鼠肠道菌群的丰度。FMT 后,肠道菌群的丰度基本上恢复到了与 A 组相当的水平。物种结果分析发现,3 组分组菌群结构优势门是拟杆菌门和变形菌门,且相对 A 组而言,B 组变形菌门丰度升高,而许多致病性细菌均属于这两门菌属,如大肠杆菌和痢疾杆菌、沙门氏菌属。而拟杆菌门丰度呈下降趋势,普雷沃菌属是拟杆菌门中优势属。相对于 B 组,C 组变形菌门呈现下降趋势,拟杆菌门呈现升高趋势。这与前面的一些研究结论吻合^[18]。上述研究结果提示,FMT 可以有效地恢复肝硬化所带来的拟杆菌的损耗,同时也有效地抑制肝硬

化所带来的变形菌的增加,因此推测 FMT 通过改变肠道菌群中不同菌的比例来调节肠道微环境从而达到有效治疗 HE 的目的。

本研究 LEfSe 分析结果表明,B 组显著表达的菌种有大肠杆菌及梭状芽孢杆菌等,从构成上来说主要还是以变形菌门肠杆菌科为主,结果和前面的研究相吻合。而经过 FMT 后,乳酸杆菌及 *Dorea sp.* CAG:317 等益生菌占有更大优势,后者可能通过诱导 Treg 并抑制 Th17 细胞的分化和功能,从而调节肠道免疫反应,维持肠道黏膜屏障的完整性和稳定性^[19],进而减少肠道有害物质进入门静脉系统损害肝脏。综上所述,FMT 主要是通过改变肠道菌群中拟杆菌门和变形杆菌门中不同细菌的比例来调节肠道微生物环境,进而影响 HE 的病程和大脑的功能。作者团队既往的研究结果表明,FMT 可以明显改善 HE 大鼠的肠道屏障功能及认知功能,进而改变大鼠的行为。因此有理由认为,FMT 是针对肝硬化所致 HE 的一个潜在治疗方案^[7],可改善患者的生活质量。

本研究不足之处在于,仅针对肠道细菌改变进行了研究,但对于肝硬化所致 HE,大脑组织到底发生了何种改变仍值得研究。随后将进一步利用功能磁共振研究 HE 大鼠经 FMT 后大脑结构及功能,探索其作用机制。

参考文献

- [1] BLOOM P P, TAPPER E B, YOUNG V B, et al. Microbiome therapeutics for hepatic encephalopathy[J]. J Hepatol, 2021, 75 (6): 1452-1464.
- [2] OOIJEVAAR R E, TERVEER E M, VERSPAGET H W, et al. Clinical application and potential of fecal microbiota transplantation[J]. Annu Rev Med, 2019, 70: 335-351.
- [3] ZHANG F, CUI B, HE X, et al. FMT-standardization Study Group. Microbiota transplantation: Concept, methodology and strategy for its modernization[J]. Protein Cell, 2018, 9(5): 462-473.
- [4] WON S M, OH K K, GUPTA H, et al. The link between gut microbiota and hepatic encephalopathy[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 8999.
- [5] BAJAJ J S, KHORUTS A. Microbiota changes and intestinal microbiota transplantation in liver diseases and cirrhosis[J]. J Hepatol, 2020, 72 (5): 1003-1027.
- [6] TREBICKA J, MACNAUGHTAN J, SCHNABL B, et al. The microbiota in cirrhosis and its role in hepatic decompensation[J]. J Hepatol, 2021, 75 (Suppl 1): S67-S81.
- [7] WANG W W, ZHANG Y, HUANG X B, et al. Fecal microbiota transplantation prevents hepatic encephalopathy in rats with carbon tetrachloride-in-

duced acute hepatic dysfunction[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(38):6983-6994.

[8] 朱宏斌,沈伟,王竞,等. 宏基因组研究高脂饮食诱导小鼠的肥胖易感性与肠道菌群的关系[J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(8):773-780.

[9] AFECTO E, PONTE A, FERNANDES S, et al. Fecal microbiota transplantation in hepatic encephalopathy: A review of the current evidence and future perspectives[J]. *Acta Gastroenterol Belg*, 2021, 84(1):87-90.

[10] DHIMAN R K. Gut microbiota, inflammation and hepatic encephalopathy: A puzzle with a solution in sight[J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2012, 2(3):207-210.

[11] TRIPATHI A, DEBELIUS J, BRENNER D A, et al. Publisher correction: The gut-liver axis and the intersection with the microbiome[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(12):785.

[12] GUPTA H, YOUNG S, SHIN M J, et al. Role of gut microbiota in hepatocarcinogenesis[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(5):121.

[13] QUIGLEY E M, STANTON C, MURPHY E F. The gut microbiota and the liver. Pathophysiological and clinical implications [J]. *J Hepatol*, 2013, 58(5):1020-1027.

[14] TUN K M, HONG A S, BATRA K, et al. A systematic review of the efficacy and safety of fecal microbiota transplantation in the treatment of hepatic encephalopathy and clostridiales infection in patients with cirrhosis[J]. *Cureus*, 2022, 14(5):e25537.

[15] SCHWABE R F, TABAS I, PAJVANI U B. Mechanisms of fibrosis development in non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(7):1913-1928.

[16] FARJAM M, DEHDAB P, ABBASSNIA F, et al. Thioacetamide-induced acute hepatic encephalopathy in rat: Behavioral, biochemical and histological changes[J]. *Iran Red Crescent Med J*, 2012, 14(3):164-170.

[17] QIN N, YANG F L, LI A, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis [J]. *Nature*, 2014, 513(7516):59-64.

[18] BAJAJ J S, KASSAM Z, FAGAN A, et al. Fecal microbiota transplant from a rational stool donor improves hepatic encephalopathy: A randomized clinical trial[J]. *Hepatology*, 2017, 66(6):1727-1738.

[19] CHAPUT N, LEPAGE P, COUTZAC C, et al. Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(6):1368-1379.

(收稿日期:2023-07-18 修回日期:2024-01-03)

(上接第 912 页)

and fully connected layer network[J]. *Neural Networks*, 2022, 145:288-299.

[12] 工业互联网创新中心(上海)有限公司, 36 氩研究院, 中国信息通信研究院云计算与大数据研究所. 2020 人工智能医疗产业发展蓝皮书[R]. 上海:工业互联网创新中心(上海)有限公司, 2020.

[13] ESSA I, KANG S B, POLLEFEYS M. Guest editors' introduction to the special section on award-winning papers from the IEEE conference on computer vision and pattern recognition 2009 (CVPR 2009)[J]. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell*, 2011, 33(12):2339-2340.

[14] 钟京谕,姚伟武. 人工智能在骨关节炎影像诊断中的研究现状与进展[J]. *中华放射学杂志*, 2019, 53(9):790-793.

[15] LEUNG K, ZHANG B F, TAN J M, et al. Prediction of total knee replacement and diagnosis of osteoarthritis by using deep learning on knee radiographs: Data from the osteoarthritis initiative[J]. *Radiology*, 2020, 296(3):584-593.

[16] NORMAN B, PEDIOIA V, NOWOROLSKI A, et al. Applying densely connected convolutional neural networks for staging osteoarthritis severity from plain radiographs[J]. *J Digit Imaging*, 2019, 32(3):471-477.

[17] LIU F, ZHOU Z Y, SAMSONOV A, et al. Deep learning approach for evaluating knee Mr images: Achieving high diagnostic performance for cartilage lesion detection [J]. *Radiology*, 2018, 289(1):160-169.

[18] 朱丽娜,韩超,刘想. 等 U-Net 深度学习网络对 MRI 表观扩散系数图中前列腺癌自动分割及定位的可行性研究[J]. *中华放射学杂志*, 2020, 54(10):974-979.

[19] 崔应谱,孙兆男,刘想,等. 用深度学习和阈值算法自动检出 CT 平扫图像中肾结石的可行性研究[J]. *中华放射学杂志*, 2020, 54(9):869-873.

[20] 张晓东,孙兆男,任昕,等. 基于深度残差网络研发辅助诊断软件用于 X 线胸片分类诊断[J]. *放射学实践*, 2019, 34(9):952-957.

(收稿日期:2023-12-09 修回日期:2024-02-10)