

· 临床 ·

基于高通量测序技术的2型糖尿病湿热困脾证、气阴两虚证患者肠道菌群特征及功能差异

冉颖卓, 邵鑫*, 胡钢, 陆源源, 李鸣, 沈宝华, 孔文文, 官艳华, 杨鑫, 方家, 刘晶
(南京市中医院, 南京 210012)

[摘要] 目的:探讨2型糖尿病(T2DM)湿热困脾证、气阴两虚证患者肠道菌群的结构特征和功能差异。方法:选择2018年6月至2020年1月就诊于南京中医药大学附属南京中医院的T2DM湿热困脾证患者62例,气阴两虚证患者60例,收集其血清及粪便样本,比较两证型患者体质量指数(BMI),糖脂代谢,空腹胰岛素(FINS),空腹C肽(FCP),胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),粪便样本提取DNA建库,采用高通量16S rDNA测序技术,对2组肠道菌群及菌群代谢通路分析比较。结果:①与气阴两虚证患者比较,湿热困脾证患者的BMI,空腹血糖(FPG),餐后2h血糖(2h PBG),总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白(LDL),FINS,FCP,HOMA-IR均明显升高,HDL明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。②两组菌群物种组成及差异,在纲水平上,以拟杆菌纲,梭状芽胞杆菌纲, γ 蛋白杆菌纲等为主,气阴两虚证的梭状芽胞杆菌、柔膜菌纲、疣微菌纲的相对丰度明显高于湿热困脾证($P<0.05$);目水平下以拟杆菌目、梭菌目、肠杆菌目等为主,气阴两虚证的梭菌目、丹毒丝菌目、疣微菌目的相对丰度明显高于湿热困脾证,而气单胞菌目则在湿热困脾证高于气阴两虚证($P<0.05$);科水平下以拟杆菌科、普氏菌科、瘤胃球菌科等为主,其中气阴两虚证的瘤胃球菌科、紫单胞菌科、丹毒丝菌科等的相对丰度明显高于湿热困脾证($P<0.05$);属水平下以拟杆菌属、普氏菌属、副拟杆菌属等为主,其中气阴两虚证的副拟杆菌属、丁酸弧菌属、瘤胃梭菌属等的相对丰度显著高于湿热困脾证,而在湿热困脾组的克雷伯菌属、巨球形菌属则高于气阴两虚证($P<0.05$)。③基于运算分类单位(OTU)的Venn分析发现湿热困脾证和气阴两虚证患者独有的OUT分别49,47个。④基于OTU的 β 多样性和 α 分析,结果Shannon,Simpson指数差异均具有统计学意义,Ace,Chao指数差异无统计学意义,气阴两虚证患者的肠道微生物多样性高于湿热困脾证患者($P<0.05$);Anosim分析提示两组 β 多样性差异具有统计学意义($P<0.05$)。⑤线性判别效应(LEfSe)分析发现湿热困脾证可选择克雷伯菌、巨球形菌属、气单胞菌目3种菌群作为关键的生物标志物,气阴两虚证可选择瘤胃梭菌属、伯克氏菌科、劳氏菌属、丁酸弧菌属、丹毒丝菌目等14种菌群作为关键的生物标志物。⑥功能注释及分析可见湿热困脾证涉及精氨酸和脯氨酸代谢、脂多糖生物合成、烟酸和烟酰胺代谢等9个代谢通路,气阴两虚证涉及阿卡波糖和缬草霉素生物合成,胰高血糖素信号通路,NOD样受体信号通路等10个代谢通路。结论:T2DM湿热困脾证和气阴两虚证患者存在肠道菌群明显的差异和功能差异,可作为T2DM中医辨证客观化的参考和中医药治疗的靶点。

[关键词] 2型糖尿病; 湿热困脾证; 气阴两虚证; 肠道菌群; 16S rDNA高通量测序

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R255.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)02-0139-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220298

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211119.1523.002.html>

[网络出版日期] 2021-11-20 12:06

Characteristics and Functional Differences of Intestinal Flora in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Dampness Heat Trapping Spleen Syndrome and Qi-Yin Deficiency Syndrome: An Analysis Based on High-throughput Sequencing Technology

RAN Ying-zhuo, SHAO Xin*, HU gang, LU Yuan-yuan, LI Ming, SHEN Bao-hua,
KONG Wen-wen, GUAN Yan-hua, YANG Xin, FANG Jia, LIU Jing
(Nanjing Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210012, China)

[收稿日期] 20210609(008)

[基金项目] 江苏省重点研发计划(社会发展)项目(BE2017618);南京市中医药青年人才项目(2020-NJSZYQNR-SX);冉颖卓南京市名中医工作室

[第一作者] 冉颖卓,主任中医师,从事中医药防治糖尿病及其并发症的临床研究,E-mail:18951755369@163.com

[通信作者] *邵鑫,博士,副主任中医师,从事糖尿病及其并发症的中西医结合临床和基础研究,E-mail:shaoxin_025@hotmail.com

[Abstract] **Objective:** To explore the structural characteristics and functional differences of intestinal flora in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) of dampness heat trapping spleen(DHTS) syndrome and Qi-Yin deficiency(QYD) syndrome. **Method:** From June 2018 to January 2020, 62 T2DM patients with DHTS syndrome and 60 with QYD syndrome were selected from Nanjing Hospital of Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine. Serum and fecal samples were collected to compare body mass index (BMI), glucose and lipid metabolism, fasting insulin (FINS) and fasting C-peptide (FCP) levels, and homeostasis model assessment of insulin resistance(HOMA-IR) of the two syndrome types. Fecal samples were extracted for DNA database construction, and 16S rDNA high-throughput sequencing was used to analyze and compare the intestinal flora and metabolic pathways. **Result:** ① The BMI, fasting plasma glucose(FPG), 2-hour postprandial blood glucose (2 h PBG), total cholesterol(TC), triglyceride(TG), low density lipoprotein(LDL), FINS, FCP, and HOMA-IR were higher in patients with DHTS syndrome than in patients with QYD syndrome, and the high density lipoprotein(HDL) of the former was lower than that of the latter, ($P<0.05$, $P<0.01$). ② In terms of species composition and differences, Bacteroidetes, Clostridia and Gammaproteobacteria were dominant at the class level, and the relative abundance of Clostridia, Mollicutes and Verrucomicrobiae in QYD syndrome group was higher than that in DHTS syndrome group. At the order level, Bacteroidales, Clostridiales and Enterobacteriales were mainly found. The relative abundance of Clostridiales, Erysipelotrichales and Verrucomicrobiales in QYD syndrome group was obviously higher than that in DHTS syndrome group, while Aeromonadales in the former was lower than that in the latter ($P<0.05$). At the family level, Bacteroidaceae, Prevotellaceae and Ruminococcaceae were predominant. The relative abundance of Ruminococcaceae, Porphyromonadaceae and Erysipelotrichaceae in QYD syndrome group was higher than that in DHTS syndrome group($P<0.05$). At the genus level, *Bacteroides*, *Prevotella* and *Parabacteroides* were mainly found. The relative abundance of *Parabacteroides*, *Butyrivibrio* and *Ruminiclostridium* in QYD syndrome group was higher than that in DHTS syndrome group, while that of *Klebsiella* and *Megasphaera* in DHTS syndrome group was higher than that in QYD syndrome group($P<0.05$). ③ Through Venn analysis of operational taxonomic units(OTU), it was found that there were 49 OTUs in patients with DHTS syndrome patients and 47 OTUs in QYD syndrome patients. ④ The results of OTU β diversity and α analysis showed that Shannon and Simpson indexes had statistical differences, while Ace and Chao indexes had no statistical differences. The intestinal microbial diversity of patients with QYD syndrome was higher than that of patients with DHTS syndrome($P<0.05$). The analysis of similarities (ANOSIM) showed that the difference of β diversity between the two groups was significant($P<0.05$). ⑤ Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe) results demonstrated that *Klebsiella*, *Megasphaera* and Aeromonadales could be selected as the key biomarkers for DHTS syndrome; 14 bacteria such as *Ruminiclostridium*, Burkholderiaceae, *Lautropia*, *Butyrivibrio*, Erysipelotrichales can be selected as the key biomarkers for QYD syndrome. ⑥ Functional annotation and analysis showed that the DHTS syndrome involved 9 metabolic pathways, including arginine and proline metabolism, lipopolysaccharide biosynthesis, nicotinic acid and nicotinamide metabolism, while the QYD syndrome involved 10 metabolic pathways, including acarbose and valinomycin biosynthesis, glucagon signaling pathway and NOD-like receptor signaling pathway. **Conclusion:** There are obvious differences in intestinal flora and functions in T2DM patients of DHTS syndrome and QYD syndrome, which can be used as reference for traditional Chinese medicine (TCM) syndrome differentiation and the target of TCM treatment.

[Keywords] type 2 diabetes mellitus; dampness heat trapping spleen syndrome; Qi-Yin deficiency syndrome; intestinal flora; 16S rDNA high-throughput sequencing

2型糖尿病(T2DM)是最常见的代谢性疾病,已占糖尿病患者的90%^[1]。据国际糖尿病联

盟(IDF)报道,到2045年,全世界将有6.93亿糖尿病患者^[2]。目前认为本病的发病机制主要包括胰岛素

分泌缺陷和胰岛素抵抗(IR)两个方面。当肝脏、肌肉和脂肪等靶器官组织对胰岛素敏感性下降,引起相对的IR,胰腺 β 细胞由于负荷增加而导致功能失调,无法代偿IR,从而诱发T2DM^[3]。更值得关注的是,IR贯穿于T2DM的自然病程,并通过高胰岛素水平导致心血管疾病等疾病的发生^[4-5],虽然对于T2DM的发病因素尚未完全阐明,但除了肥胖、久坐生活方式和增龄等许多众所周知的促发因素外,肠道菌群因其与能量获取的关系密切,正而受到越来越多的关注^[6-7]。目前研究已经证明,T2DM患者与正常人群肠道菌群的差异在IR和代谢综合征的发展过程中起着至关重要的作用^[8-9]。目前中医药对于T2DM与肠道菌群的研究方兴未艾,主要集中在动物实验研究,对于临床辨证论治研究主要涉及脾虚证^[10]、痰湿热互结^[11]、湿热证^[12-13]、脾弱胃强证^[14]等,采用的方法有定性定量分析、高通量测序等,但当前下不同证型间的T2DM患者肠道菌群结构特征和功能差异的根本性的科学问题少见报道,且研究样本量偏少,这限制了阐明本病中医辨证本质,难以形成统一辨证标准。因此,本研究选取湿热困脾证、气阴两虚证2种最常见证型,分析其肠道菌群结构和功能的差异,可以为T2DM中医辨证论治的临床和基础研究提供更多证据和新思路。

1 临床资料

1.1 一般资料 选择2018年6月至2020年1月就诊于南京中医药大学附属南京中医院的湿热困脾证、气阴两虚证T2DM患者。其中湿热困脾证62例(男39例,女23例),年龄(54.24±9.20)岁,糖化血红蛋白水平(9.10±2.05)%,病程(4.50±1.57)年;气阴两虚证60例(男42例,女18例),年龄(57.58±9.12)岁,糖化血红蛋白水平(9.21±2.07)%,病程(4.78±1.67)年。各组患者年龄、性别及糖化血红蛋白及病程组间比较差异均无统计学意义,具有可比性。本研究经南京市中医院医学伦理委员会批准(KY2017005)。

1.2 糖尿病诊断标准 参照1999年世界卫生组织(WHO)专家咨询报告与国际糖尿病联盟公布的糖尿病诊断标准^[15]制订。

1.3 中医湿热困脾证、气阴两虚证辨证标准 参照《中药新药治疗糖尿病的临床研究指导原则(试行)》^[16]诊断标准制订。

1.3.1 湿热困脾证 主证为①胸脘腹胀,或食后饱满;②头身困重。次证为①体形肥胖,②心胸烦闷,③四肢倦怠,④小便黄赤,⑤大便不爽,⑥咽干口燥。舌脉为舌红苔黄腻,脉滑而数。

1.3.2 气阴两虚证 主证为①咽干口燥,②倦怠乏力。次证为①多食易饥,②口渴喜饮,③气短懒言,④五心烦热,⑤心悸失眠,⑥溲赤便秘。舌脉为舌红少津液,苔薄或花剥,脉细数无力,或细而弦。

两证型均以主证2项+次证3项,结合舌脉即可确诊。

1.4 纳入标准 ①就诊时,由3名主治医师及以上具有相关临床工作经验5年以上临床医生对患者进行疾病诊断基础上进行辨证分型,根据辨证结果,符合T2DM诊断标准及上述2种中医证型辨证标准者;②年龄40~70岁;③签署知情同意书。

1.5 排除标准 ①1月内服用抗生素治疗患者;②口服药物中包括阿卡波糖、二甲双胍等已报道对肠道菌群有影响药物者;③合并严重高血压、重度肺功能不全、重度心律失常和肝、肾、造血系统等严重原发性疾病、精神病患者;④妊娠或哺乳期妇女。

2 方法

2.1 糖脂代谢,体质量指数(BMI),胰岛功能及胰岛素抵抗相关指标检测 患者均于清晨空腹采集肘静脉血3mL,500~4 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径19 cm),采用日立7600型全自动生化仪测定脂代谢指标:总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),高密度脂蛋白(HDL),低密度脂蛋白(LDL);采用葡萄糖氧化酶法测空腹血糖(FPG),餐后2 h血糖(2 h PBG);采用放射免疫分析法检测空腹胰岛素(FINS),空腹C肽(FCP);胰岛素抵抗状态采用稳态模型评估法判断,计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR), $HOMA-IR = FINS(mU \cdot L^{-1}) \times FPG(mmol \cdot L^{-1}) / 22.5$ 。

2.2 粪便收集及DNA提取 使用无菌粪便采集盒(专利号ZL 201621208783.3)采集所有入选者自然排出的当日初次新鲜粪便(>2 g),迅速将粪便装于无菌样品管中,送至微基生物科技(上海)有限公司,在无菌条件下进行分装,液氮冷却后置于-80℃超低温冰箱中保存。粪便样品的DNA提取按照QIAamp DNA Stool Mini Kit试剂盒(德国Qiagen公司,批号154020947)说明书进行,抽提的DNA利用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA。

2.3 目标序列扩增和测序 选取16S V4~V5区序列进行高通量测序分析。采用两步聚合酶链式反应(PCR)扩增方法进行文库构建。将纯化的DNA作为模板,利用16S V4~V5区通用引物,且含有部分Illumina测序引物的融合引物进行PCR扩增。

采用的515上游引物5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'和926下游引物5'-CCGTC AATTCMTT

GAGTTT-3'(引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成);并用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,检测效果较好的样本于2%琼脂糖凝胶电泳切胶回收,以回收产物为模板进行一次8循环的PCR扩增,将Illumina平台测序所需要的接头,测序引物,标签序列添加到目的片段两端。全部PCR产物采用AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒(美国Axygen公司,批号20821KE1)进行回收,并用FTC-3000™型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(上海枫岭生物技术有限公司)进行荧光定量,等摩尔比混匀后完成文库构建,采用Illumina测序平台完成测序。

2.4 生物信息学分析 对测得的原始数据通过barcode分配样品reads,得到每个样本的有效序列,采用Trimmomatic(Version 0.35)软件,将测序结果末端低质量的序列去掉,根据PE reads之间的overlap关系,采用Flash(Version 1.2.11)软件将成对的reads拼接成一条序列,同时采用mothur(Version 1.33.3)软件对序列质量进行质控和过滤,将模糊碱基(ambiguous=0),单碱基高重复区(homologous=8),过长(maxlength=580)和过短(minlength=200)的序列及PCR过程中产生的一些嵌合体去除,从而得到优化序列,之后采用Uparse软件(usearch

Version V8.1.1756, <http://drive5.com/uparse/>)进行运算分类单位(OTU)聚类,同时去掉 singleton OTU, OTU代表序列与Silva 128数据库比对进行物种信息注释。基于分类学信息,在门、纲、目、科、属、种分类水平上进行群落结构的统计分析。

2.5 统计学方法 运用SPSS 23.0软件统计分析数据。计数资料比较采用 χ^2 检验;计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差分析或秩和检验,进一步两两比较采用最小显著性差异法(LSD)-*t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。利用Mothur(Version 1.33.3)进行Alpha多样性分析(Chao, Ace等物种丰富度统计, Shannon, Simpson等物种多样性统计)和基于Bray_curtis_OTU用Anosim分析Beta多样性。在上述分析的基础上,利用R语言(Version 3.6.3) Venn图,群落结构柱形图,系统发育等的统计学和可视化分析。

3 结果

3.1 两组患者BMI,糖脂代谢水平比较 研究结果显示,与气阴两虚证组比较,湿热困脾证患者的BMI, FPG, 2 h PBG, TG, LDL水平均明显升高($P<0.05, P<0.01$); HDL水平显著降低($P<0.01$)。见表1。

表1 两组患者BMI,糖脂代谢水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of BMI, glucose and lipid metabolism between two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	BMI/kg·m ⁻²	FPG/mmol·L ⁻¹	2 h PBG/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	HDL/mmol·L ⁻¹	LDL/mmol·L ⁻¹
气阴两虚证	60	24.86±3.08	7.98±2.74	13.20±4.36	4.51±0.87	1.33±0.76	1.18±0.26	2.54±0.71
湿热困脾证	62	26.88±3.96 ²⁾	10.02±3.32 ²⁾	14.81±4.43 ¹⁾	5.42±1.54 ²⁾	3.58±3.39 ²⁾	0.99±0.25 ²⁾	3.01±1.11 ²⁾

注:与气阴两虚证组比较¹⁾ $P<0.05, ^2)$ $P<0.01$ (表2同)。

3.2 两组患者FINS, FCP, HOMA-IR水平比较 与气阴两虚证组比较,湿热困脾证组患者的FINS, FCP, HOMA-IR均显著高于气阴两虚证,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表2。

表2 两组患者FINS, FCP, HOMA-IR水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of FINS, FCP and HOMA-IR levels between two groups ($\bar{x}\pm s$)

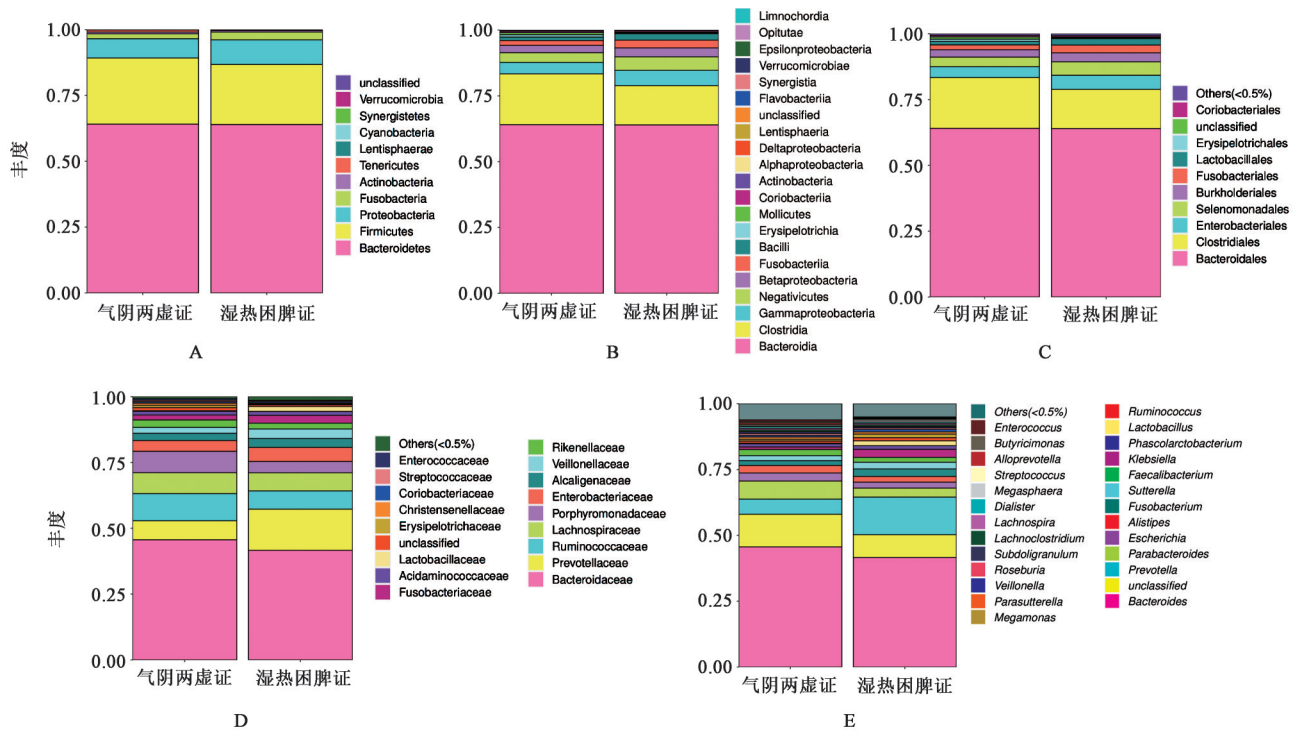
组别	例数	FINS/mU·L ⁻¹	FCP/ μ g·L ⁻¹	HOMA-IR
气阴两虚组	60	7.00±4.20	1.82±1.14	2.52±1.83
湿热困脾组	62	14.06±9.71 ²⁾	2.87±1.32 ²⁾	6.31±5.08 ²⁾

3.3 两组菌群物种组成及差异分析

3.3.1 两组菌群物种组成情况 在所有样本中,门水平下共检测到细菌门10个,其中排名前5位的为拟杆菌门 Bacteroidetes, 厚壁菌门 Firmicutes, 变形菌门 Proteobacteria, 梭杆菌门 Fusobacteria, 放线菌

门 Actinobacteria;纲水平下共检测到细菌纲20个,排名前5位的为拟杆菌纲,梭状芽胞杆菌纲, γ 蛋白杆菌纲,革兰氏阴性菌纲, β -变形菌纲;目水平下共检测到细菌目31个,其中前5位的为拟杆菌目,梭菌目,肠杆菌目, Selenomonadales 目,伯克氏菌目;科水平下共检测到细菌科55个,其中前5位的为拟杆菌科、普氏菌科、瘤胃球科、毛螺旋菌科、紫单胞菌科;属水平下共检测到细菌属145个,其中前5位的为拟杆菌属、普氏菌属、副拟杆菌属、埃希菌属、另枝菌属。见图1。

3.3.2 两组样本相对丰度及 β 多样性差异分析 在纲水平,气阴两虚证的梭状芽胞杆菌、柔膜菌纲、疣微菌纲的相对丰度明显高于湿热困脾证($P<0.05$);在目水平,气阴两虚证组的梭菌目、丹毒丝菌目、疣微菌目的相对丰度明显高于湿热困脾证,而气单胞



A. 门水平; B. 纲水平; C. 目水平; D. 科水平; E. 属水平

图1 两组患者在各分类水平物种分布的分组均值

Fig. 1 Grouping mean of species distribution at each classification level in two groups

菌目则在湿热困脾组高于气阴两虚证($P<0.05$);在科水平,气阴两虚证的瘤胃球菌科、紫单胞菌科、丹毒丝菌科、克里斯滕森菌科的相对丰度显著高于湿热困脾证($P<0.05$);在属水平,气阴两虚证的副拟杆菌属、丁酸弧菌属、瘤胃梭菌属、安柔特菌属的相对丰度高于湿热困脾证,而在湿热困脾组的克雷伯菌属、巨球形菌属则高于气阴两虚证($P<0.05$)。

基于 Bray_curtis_OTU 分析,用 Anosim 分析两组样品 β 多样性的分组差异,差异具有统计学意义 ($R=0.02, P<0.05$)。

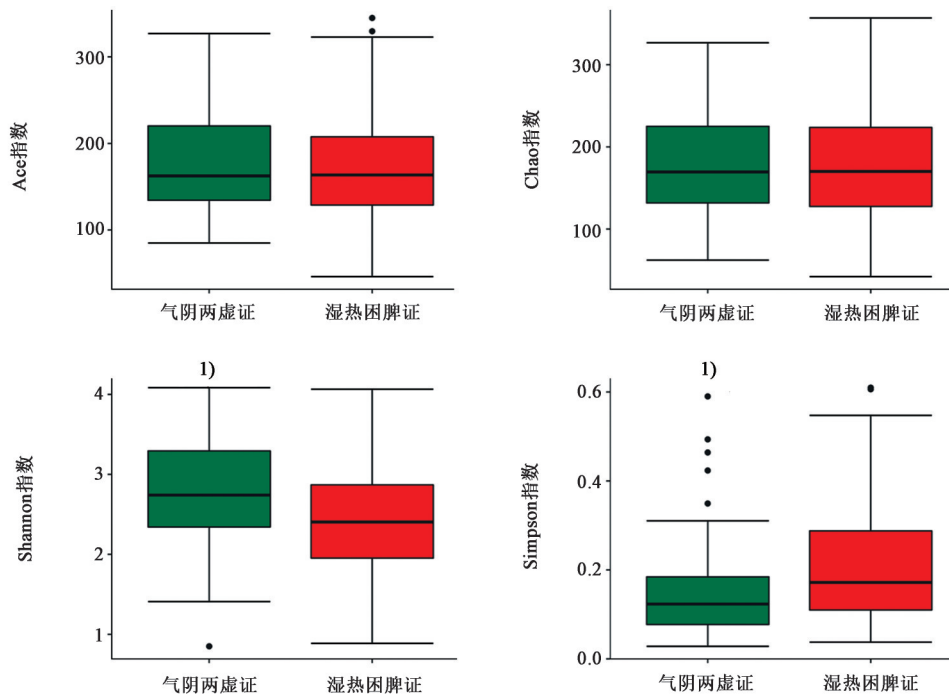
3.4 OTU 水平的 Venn 分析 122 个样本共得到 693 个 OTU,其中两组共有的 OTU 为 597 个,湿热困脾证和气阴两虚证患者分别 49,47 个。

3.5 两组患者菌群 Alpha 多样性分析 基于所采集 122 例样本中 OTU 种类及丰度,统计分析两组患者 OTU 的 Alpha 多样性,其中 Shannon, Simpson 指数反映群落的多样性,Chao, Ace 指数反映样品中群落的丰富度。结果显示,两组间 Shannon, Simpson 指数差异均具有统计学意义 ($P<0.05$),气阴两虚证患者的肠道微生物多样性高于湿热困脾证患者。Ace, Chao 指数差异无统计学意义,说明两组样本的微生物丰富度没有差异。见图 2。

3.6 两组菌属间菌群 LEfSe 分析 LEfSe 分析可用

以筛选关键的生物标志物。以线性判别分析 (LDA)=2 为阈值,筛选了 2 种证型的特征性菌群。通过 LEfSe 分析发现,湿热困脾证显著高丰度菌群为克雷伯菌、巨球形菌属、气单胞菌目 3 种菌群,气阴两虚证显著高丰度菌群为瘤胃梭菌属、伯克氏菌科、劳氏菌属、丁酸弧菌属、丹毒丝菌目、丹毒丝菌科、丹毒丝菌纲、克里斯滕森菌科、瘤胃球菌科、副拟杆菌属、紫单胞菌科、梭菌目、梭菌纲等 14 种菌群。见图 3。

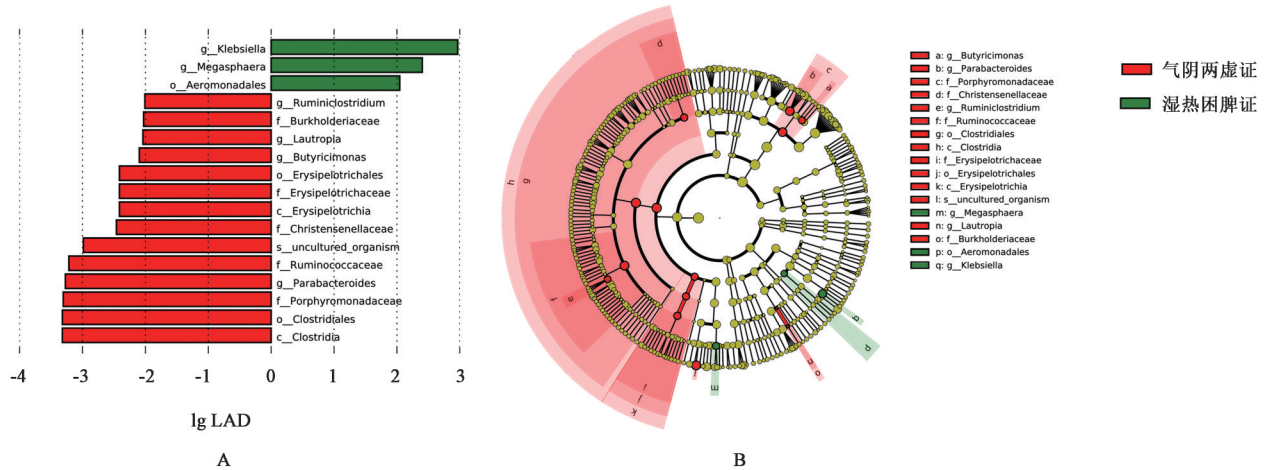
3.7 两证型菌群功能注释及分析 利用 PICRUSt 2 软件对测序结果进行功能预测,在京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库共富集到 326 个功能通路。其中湿热困脾证明显高于气阴两虚证患者的代谢通路有 9 个 ($P<0.05, P<0.01$),包括精氨酸和脯氨酸代谢、苯甲酸降解、叶酸合成、脂多糖生物合成、烟酸和烟酰胺代谢、核黄素代谢、硫酸代谢、托烷、哌啶和吡啶生物碱的生物合成等。气阴两虚证明显高于湿热困脾证患者的代谢通路有 10 个 ($P<0.05, P<0.01$),包括阿卡波糖和缬草毒素生物合成,胰高血糖素信号通路, NOD 样受体信号通路,戊糖磷酸途径,苯丙烷生物合成,聚酮糖单元生物合成等。见图 4。



与湿热困脾证组比较¹⁾ $P < 0.05$

图2 两组患者Alpha多样性分析

Fig. 2 Alpha diversity analysis of two groups



A. LDA条形图,两个组别当中有显著作用的微生物类群通过LDA分析(线性回归分析)后获得的LDA分值; B. LefSe树状图,红色区域和绿色区域分别代表气阴两虚证和湿热困脾证,树枝中红色节点和绿色分别表示在气阴两虚证、湿热困脾证中起到重要作用的菌群,黄色节点表示的是在两组中均无重要作用的菌群

图3 LefSe分析

Fig. 3 LefSe analysis

4 讨论

对于T2DM患者肠道菌群差异的报道逐年增加,研究发现,在健康人群肠道中厚壁菌与拟杆菌占肠道菌群的比例分别64%和23%^[17],而与健康人群相比,T2DM患者拟杆菌丰度增加,厚壁菌丰度下降;其他如瘤胃球菌、梭杆菌和布氏杆菌与糖尿病呈正相关^[18]。本研究结果显示两种中医分型的患者中,厚壁菌比例明显下降,拟杆菌比例明显上升,

瘤胃球菌等与糖尿病相关菌群分布与丰度与多数报道一致,提示其符合T2DM患者肠道菌群紊乱的一般规律。

肠道菌群影响T2DM的发生、发展主要通过以下机制实现。①短链脂肪酸代谢。短链脂肪酸(SCFAs),包括乙酸、丙酸和丁酸,为肠道上皮细胞提供能量来源,还可通过调节胃肠道激素分泌来改善胰岛素敏感性和降低血糖,肠道菌群紊乱导致

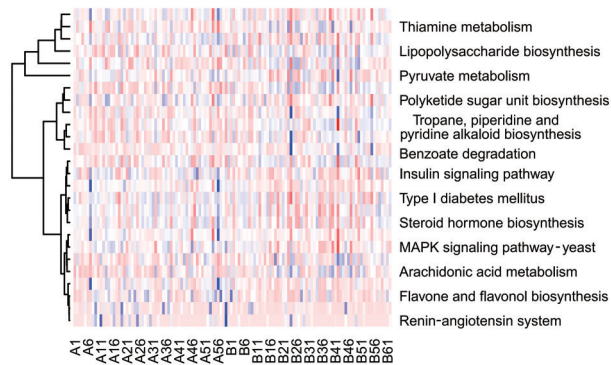


图4 KEGG信号通路热图

Fig. 4 KEGG signaling pathway heat map

SCFAs水平明显降低,进一步引发糖尿病^[19]。②胆汁酸代谢。肠道菌群与之相互影响,肠道菌群将初级胆汁酸转变为及次级胆汁酸,介导完成对糖、脂及能量代谢调节的部分作用^[20],相反胆汁酸也可调控肠道菌群稳态,防止肠道内细菌移位^[21]。③脂多糖等内毒素引起的慢性炎症反应。其主要表现为产生丁酸盐菌减少,而含脂多糖的革兰阴性菌数量增多,过多的脂多糖(LPS)诱导机体产生持续的低水平慢性炎症,进一步导致胰岛β细胞结构受损和功能障碍^[22]。

随着对肠道菌群与T2DM相关性的认识逐步深入,中医药学界对于该领域也有一定研究,于斌等^[11]研究发现T2DM痰湿热互结证患者的菌群菌种属等方面的差异,肠道菌群的多样性降低。这对于揭示T2DM的中医辨证内涵和客观化有着举足轻重的作用和意义。但是目前研究多就一种证型进行研究,而回答T2DM患者不同中医证型间肠道菌群是否存在差异,以及存在何种差异的研究未见报道。

本研究通过高通量测序方法发现本病湿热困脾和气阴两虚证患者,在纲、目、科、属水平上的肠道菌群均存在显著差异,各证型均具有独有的OUT,且通过α多样性分析发现湿热困脾证患者肠道菌群的多样性低于气阴两虚证。此外,本研究中也同时验证了,相较于气阴两虚证,湿热困脾证T2DM患者普遍存在超重和肥胖,更高的FPG及2h PBG,以及更为严重的脂代谢紊乱和胰岛素抵抗情况,与黄亚华^[23]所报道的研究结果相似。

在众多胰岛素抵抗的发生机制中,肠道菌群的作用越来越引起学者重视。研究表明,在超重和肥胖人群中,肠道菌群失调可影响胰岛素分泌^[24-25]及靶器官对胰岛素敏感性^[26-27],对于T2DM患者,QIN等^[8]研究肠道菌群失调可导致患者肠壁

通透性增加,从而使大量肠道细菌迁移入血及组织液,造成胰岛素抵抗。肠道菌群紊乱导致胰岛素抵抗的机制

本研究发现,湿热困脾证患者在目水平下的气单胞菌目、属水平下的克雷伯菌属、巨球形菌属的相对丰度高于气阴两虚证,且通过LEfSe分析提示克雷伯菌、巨球形菌属、气单胞菌目3种菌群或可作为T2DM患者湿热困脾证关键的生物标志物。陈明月等^[28]从新疆哈萨克族T2DM患者粪便中分离并培养气单胞菌,将其回接到小鼠体内,结果发现小鼠出现糖耐量受损,胰岛素敏感性下降,作者推测气单胞菌与炎症反应及肥胖、糖尿病之间可能存在联系。一项2021年发表的纳入262例丹麦和印度前驱糖尿病人群的肠道菌群特征研究发现了来自巨球形菌属、克雷伯菌属等菌属的144个OTU富集,并发现巨球形菌属与糖耐量受损的关联在印度人中更显著^[29]。巨球形菌属、及克雷伯菌属或可被认为是本证型早期诊断的生物标志物。而瘤胃梭菌属、伯克氏菌科、劳特罗普氏菌属、丁酸弧菌属、丹毒丝菌目等14个菌种可作为气阴两虚证的生物标志物。

本研究功能预测分析发现,湿热困脾证与气阴两虚证两组患者在KEGG功能预测存在差异。湿热困脾证主要涉及氨基酸、脂多糖、B族维生素(叶酸、核黄素、硫胺)等物质的合成及代谢通路;而气阴两虚证则主要涉及胰高血糖素信号通路,NOD样受体信号通路,戊糖磷酸途径,阿卡波糖生物合成等通路。这些通路的差异,可能造成了两组患者在证型表现的不同,这一假说需进一步在临床中加以验证。

综上所述,与气阴两虚证相比,T2DM湿热困脾证患者胰岛素抵抗更为明显,糖脂代谢情况更差,两组患者的肠道菌群在物种组成、分布及其功能预测方面具有明显差异。本研究结果一方面可作为T2DM湿热困脾证和气阴两虚证患者的辨证参考和中医药治疗靶点;另一方面也可从肠道菌群层面揭示两种证患者不同临床特征的发生机制,为进一步进行临床和实验研究提供依据的方向。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] WU Y, DING Y, TANAKA Y, et al. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention[J]. Int J Med Sci, 2014, 11(11):1185-1200.

- [2] CHO N H, SHAW J E, KARURANGA S, et al. IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 138:271-281.
- [3] SCHOFIELD C J, SUTHERLAND C. Disordered insulin secretion in the development of insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Diabet Med*, 2012, 29(8):972-979.
- [4] WEYER C, FUNAHASHI T, TANAKA S, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(5):1930-1935.
- [5] REAVEN G M. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease [J]. *Panminerva Med*, 2005, 47(4):201-210.
- [6] LARSEN N, VOGENSEN F K, VAN DEN BERG F W, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2):e9085.
- [7] LEY R E, BACKHED F, TURNBAUGH P, et al. Obesity alters gut microbial ecology [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(31):11070-11075.
- [8] QIN J, LI Y, CAI Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2012, 490(7418):55-60.
- [9] KARLSSON F H, TREMAROLI V, NOOKAEW I, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control [J]. *Nature*, 2013, 498(7452):99-103.
- [10] 刘小溪, 李小娟, 石岩, 等. 益气补脾法配合二甲双胍干预脾虚证2型糖尿病患者肠道菌群的临床研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(11):2311-2313.
- [11] 于斌, 王敏, 李丹, 等. 2型糖尿病痰湿热互结证患者肠道菌群特征分析 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2020, 15(11):2102-2107.
- [12] 冯新格, 严育忠, 曾艺鹏, 等. 葛根芩连汤对2型糖尿病湿热证肠道菌群的影响 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2016, 11(8):1110-1112.
- [13] 曾艺鹏, 冯新格, 谷成英, 等. 葛根芩连汤治疗对2型糖尿病湿热证肠道菌群影响 [J]. *河北医学*, 2016, 22(10):1731-1734.
- [14] 王晶, 汪晓敏, 岳仁宋. 半夏泻心汤对2型糖尿病(脾弱胃强证)患者细胞免疫及其肠道菌群的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(9):2163-2166.
- [15] WHO. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus* [M]. Geneva: World Health Organization, 1999:58-59.
- [16] 郑筱萸. *中药新药临床研究指导原则(试行)* [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002, 233-234.
- [17] ZITVOGEL L, AYYOUB M, ROUTHY B, et al. Microbiome and anticancer immunosurveillance [J]. *Cell*, 2016, 165(2):276-287.
- [18] GURUNG M, LI Z, YOU H, et al. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology [J]. *EBioMedicine*, 2020, 51:102590.
- [19] SAWICKI C M, LIVINGSTON K A, OBIN M, et al. Dietary fiber and the human gut microbiota: application of evidence mapping methodology [J]. *Nutrients*, 2017, 9(2):125-145.
- [20] CHASSAING B, LEY R E, GEWIRTZ A T. Intestinal epithelial cell toll-like receptor 5 regulates the intestinal microbiota to prevent low-grade inflammation and metabolic syndrome in mice [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(6):1363-1377.
- [21] 朱英倩, 雷涛. 肠道菌群紊乱与2型糖尿病相关性探究 [J]. *医学综述*, 2017, 23(19):3873-3877.
- [22] CANI P D, AMAR J, IGLESIAS M A, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2007, 56(7):1761-1772.
- [23] 黄亚华. 2型糖尿病中医辨证与胰岛素抵抗的相关性研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2004.
- [24] KREZNAR J H, KELLER M P, TRAEGER L L, et al. Host genotype and gut microbiome modulate insulin secretion and diet-induced metabolic phenotypes [J]. *Cell Rep*, 2017, 18(7):1739-1750.
- [25] 桑婷婷, 郭铨洁, 郭丹丹, 等. 中医药通过调节肠道菌群抑制肥胖和炎症相关疾病的进展研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(16):3235-3242.
- [26] CHAMBERS E S, BYRNE C S, MORRISON D J, et al. Dietary supplementation with inulin-propionate ester or inulin improves insulin sensitivity in adults with overweight and obesity with distinct effects on the gut microbiota, plasma metabolome and systemic inflammatory responses: a randomised cross-over trial [J]. *Gut*, 2019, 68(8):1430-1438.
- [27] NADERPOOR N, MOUSA A, GOMEZ-ARANGO L F, et al. Faecal microbiota are related to insulin sensitivity and secretion in overweight or obese adults [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(4):452.
- [28] 陈明月, 王焯, 王蟾月, 等. 从新疆哈萨克族2型糖尿病患者粪便中分离的气单胞菌对小鼠的作用研究 [J]. *中国微生态学杂志*, 2017, 29(2):125-129.
- [29] PINNA N K, ANJANA R M, SAXENA S, et al. Trans-ethnic gut microbial signatures of prediabetic subjects from India and Denmark [J]. *Genome Med*, 2021, 13(1):36.

[责任编辑 王鑫]