

研究报告



不同身体质量指数人群肠道菌群结构及共存网络解析

袁维维 王鸿超* 陈宇涛 戎一格 陆文伟 赵建新 张灏 陈卫

江南大学食品学院 江苏 无锡 214122

摘要:【背景】人体能量稳态失衡表现为体重过轻、超重和肥胖,肠道菌群与人体能量稳态的维持有关,但不同身体质量指数(Body Mass Index, BMI)人群的肠道菌群特征仍需进一步探究。【目的】基于美国肠道计划公开数据库,解析4类BMI人群肠道菌群的特征,并探究4类BMI人群肠道菌群共存网络特征及差异,为基于肠道菌群来干预肥胖及体重过轻等不健康状态提供新的理论依据。【方法】从美国肠道计划数据集中筛选具有BMI信息的肠道菌群样本,并根据世界卫生组织规定的BMI划分标准将筛选后的样本分为4类:体重过轻($BMI < 18.5 \text{ kg/m}^2$),正常体重($18.5 \text{ kg/m}^2 < BMI < 25 \text{ kg/m}^2$),超重($25 \text{ kg/m}^2 < BMI < 30 \text{ kg/m}^2$),肥胖($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$);通过计算和比较肠道菌群的 α 多样性和 β 多样性探究4类BMI人群肠道菌群的整体结构特征及差异;通过多元线性回归模型对不同BMI分类与肠道菌群进行相关性分析,并且将地域、年龄、性别因素作为混杂因素加入到模型中进行校正;采用SparCC分别计算4类BMI人群肠道菌群中菌属相关性,并分别构建肠道菌群共存网络。【结果】经过Wilcoxon秩和检验,发现体重过轻、超重、肥胖人群的肠道菌群 α 多样性都显著低于正常体重人群; β 多样性分析结果表明4类BMI人群肠道菌群的整体结构存在显著差异;4类BMI人群肠道中厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的相对含量无显著差异;通过MaAsLin分析,并且将地域、年龄、性别因素作为混杂因素加入到模型中进行校正,共得到49个与BMI类型显著相关的物种;4类BMI人群肠道菌群共存网络的拓扑结构具有一定差异,体重过轻和正常体重人群肠道菌群共存网络的复杂度较高,超重和肥胖人群肠道菌群共存网络的复杂度较低。【结论】4类BMI人群肠道菌群的多样性、整体结构和共存网络间均存在差异。

关键词: 肠道菌群, 共存网络, 身体质量指数, 16S rRNA 基因

Feature and co-occurrence network of gut microbiota in different body mass index (BMI) populations

YUAN Weiwei WANG Hongchao* CHEN Yutao RONG Yige LU Wenwei

ZHAO Jianxin ZHANG Hao CHEN Wei

School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: [Background] The imbalance of human energy homeostasis is characterized by underweight, overweight and obesity. Gut microbiota is related to the maintenance of human energy homeostasis, but

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2019YFF0217601)

*Corresponding author: E-mail: hcwang@jiangnan.edu.cn

Received: 24-12-2020; Accepted: 09-02-2021; Published online: 09-03-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFF0217601)

*通信作者: E-mail: hcwang@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-12-24; 接受日期: 2021-02-09; 网络首发日期: 2021-03-09

the feature of gut microbiota in different body mass index (BMI) populations need to be further explored. **[Objective]** To explore the feature and the co-occurrence network of gut microbiota of four BMI groups based on the American gut project (AGP), and to provide new theoretical basis for intervention of obesity and underweight based on gut microbiota. **[Methods]** Screen the gut microbiota samples with BMI information from AGP dataset, and divide the screened samples into four categories according to the BMI classification standards set by the World Health Organization: underweight ($\text{BMI} < 18.5 \text{ kg/m}^2$), normal weight ($18.5 < \text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$), overweight ($25 < \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$), obesity ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$). By calculating and comparing the alpha diversity and beta diversity of gut microbiota, the overall feature and differences of gut microbiota in four BMI groups were explored. Use Microbiome Multivariable Association with Linear Models (MaAsLin) to analyze the correlation between different BMI groups and gut microbiota, and add geographical, age, and gender factors as confounding factors to the model for correction. SparCC was used to calculate the correlation of gut microbiota among the four BMI groups, and the gut microbiota co-occurrence network of four groups was constructed. **[Results]** The decreasing trend of alpha diversity in the underweight, overweight and obese population compared to the normal weight population was observed after the Wilcoxon-rank-sum analysis. As for the beta diversity, the significant difference of the structure of gut microbiota between the four BMI groups was found. There was no significant difference in the relative contents of *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. Through MaAsLin analysis, and adding geographical, age, and gender factors as confounding factors to the model for correction, a total of 49 bacteria that were significantly related to BMI types were obtained. The topological structure of the co-occurrence network of the four groups of BMI populations were different. The networks of underweight and normal-weight population were more complex, while the networks of overweight and obese populations were less complex. **[Conclusion]** There were differences in the diversity, overall feature and co-occurrence network of the gut microbiota among the four BMI groups.

Keywords: gut microbiota, co-occurrence network, body mass index, 16S rRNA gene

人体能量稳态与健康状况息息相关, 能量稳态的维持是通过能量摄入和能量消耗的协同调节实现的^[1]。当能量摄入超过能量消耗则表现为身体质量指数(Body Mass Index, BMI)增加, 进而导致肥胖和机体代谢紊乱, 反之则表现为由营养不良引起的体重过轻。当今世界, 肥胖已经成为西方发达国家巨大的健康负担, 许多发展中国家面临着超重和体重过轻的双重负担^[2]。肥胖作为一种迅速发展的流行病, 不仅给人们的生活带来诸多不便, 而且增加了其他疾病的风险, 如心脑血管疾病、II型糖尿病、冠心病等^[3]。体重过轻主要与营养不良有关, 与正常体重人群相比, 体重过轻人群的传染病率和死亡率均较高^[4-5]。

人体中约存在 3.9×10^{13} 个细菌, 其中大部分细菌分布在肠道中, 每克湿粪便中约含有 10^{11} 个细菌^[6]。研究表明, 人体肠道中已经鉴定出近 1 000 万条非冗余基因, 是人体自身基因组的 150 倍, 因

而人体肠道微生物组又被形象的称为“人体第二基因组”^[7-8]。因此, 人体肠道菌群是一个具有独特微环境的生态系统, 肠道菌群的代谢能力远远超过人体细胞的代谢能力, 在人类健康中发挥着重要作用。国内外许多研究表明, 人体的消化、营养、代谢和免疫等方面与肠道微生态息息相关, 肠道菌群的失调与很多疾病之间存在关联^[9-10]。

肠道菌群失调与肥胖及体重过轻之间存在因果关系。多项动物实验表明, 宿主肠道菌群在能量的获取和储存中发挥作用, 因而可能导致肥胖或体重过轻。例如, 食用高脂肪饮食无菌小鼠的体重增加率低于食用高脂肪饮食的普通小鼠^[11], 接受肥胖人群粪移植的无菌小鼠表现出肥胖症状^[12], 接受营养不良儿童的菌群的小鼠出现发育不良和体重过轻等症^[13]。众多研究表明, 与正常体重的成年人相比, 肥胖成年人肠道菌群的组

成、多样性均发生了改变^[14-15]。然而,相比于正常体重人群,肥胖人群肠道菌群中厚壁菌门/拟杆菌门(*Firmicutes/Bacteroidetes*)比值变化存在不一致的结论^[16]。因此,肥胖人群肠道菌群特征仍需要进一步研究。国内一项研究表明,超重、正常体重及体重过轻 3 类人群的肠道菌群组成无明显差异,但超重人群及体重过轻人群的肠道菌群 α 多样性显著低于正常体重人群^[17]。近期发表的一项临床研究结果表明,厌食症患者在发病期间(体重过轻)有严重的肠道菌群紊乱^[18]。然而,截至目前,关于体重过轻人群肠道菌群特征的研究较少,仍需进一步探究。

本研究从美国肠道计划的公开数据库中选取体重过轻、正常、超重、肥胖人群的肠道菌群样本。在大量样本的基础上,从 α 多样性、 β 多样性、物种组成及差异等多方面系统地解析肥胖人群肠道菌群的特征,并构建 4 类人群肠道菌群共存网络,探究其互作关系。通过对不同 BMI 人群肠道菌群的结构及共存网络解析,以期为基于肠道菌群干预肥胖及体重过轻等不健康身体状态提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 肠道数据来源

从美国肠道计划的公开数据集^[19]中筛选出最终有效测序序列在 1 250 条以上的肠道菌群样本,之后再从中筛选具有 BMI 信息的肠道菌群样本,并根据世界卫生组织规定的 BMI 划分标准将筛选后的样本分为 4 类: 791 个体重过低样本, $\text{BMI} < 18.5 \text{ kg/m}^2$; 5 189 个正常体重样本, $18.5 \text{ kg/m}^2 < \text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$; 2 055 个超重样本, $25 \text{ kg/m}^2 < \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$; 898 个肥胖样本, $\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$ 。 α 多样性指数(Observed OTUs 指数、Faith PD 指数和 Shannon 指数)、 β 多样性指数(Unweighted UniFrac 和 Weighted UniFrac 距离)和 OTU 表格均源于美国肠道计划基于 QIIME 分析平台得来。

1.2 数据分析方法

基于 AGP 数据集中全部样本的 Unweighted UniFrac 距离矩阵,通过置换多元方差分析(Permutational Multivariate Analysis of Variance Using Distance Matrices, PERMANOVA 或 Adonis)方法来判定包括经地域、年龄、性别、BMI 分类等在内的 41 种宿主背景信息与其肠道菌群的相关性。通过 R 语言中 Vegan 程序包(V2.5-6)中的 Adonis 函数,置换检验 1 000 次,计算每个宿主背景信息对于肠道菌群差异的解释度(R^2)和判断结果的显著性($P < 0.05$ 则认为具有统计学意义)。基于 OTU 表,利用 Vegan 程序包(V2.5-6)的 Diversity() 函数计算 α 多样性的 Simpson 指数。基于 Unweighted 和 Weighted UniFrac 距离,采用 Kruskal-Wallis 检验探究 4 类 BMI 人群肠道菌群总体结构的差异。基于门、科、属水平 OTU 表,利用 Amplicon 程序包的 Tax_stackplot() 函数计算门、科、属水平的物种组成并绘制物种组成堆叠图^[20]。使用 R 中的 Maaslin2 程序包(<http://huttenhower.sph.harvard.edu/maaslin>),通过多变量相关线性模型来计算不同 BMI 类别与具体肠道菌群物种之间的相关性。为了降低假阳性率,将未在 10% 样本中出现的物种删除。根据 Adonis 分析结果及背景信息覆盖度,选取地域、年龄、性别作为模型校正的混杂因素,并设置 Q 值的阈值为 0.05 作为相关性物种的选取标准。

1.3 肠道菌群共存网络分析方法

基于物种丰度组成数据进行相关性分析可识别肠道菌群中微生物相互作用。然而,由于测序获得的物种丰度为相对丰度,并未进行绝对定量,可能会产生虚假相关性。SparCC 是一种适合测序数据特征的相关性分析方法,可以推断物种之间的相关性,以及构建微生物物种相互作用网络。本研究选取相对丰度在至少一个样本中大于 0.1% 的属进行相关性分析。基于筛选后的属水平物种丰度表作为原始数据集,使用 SparCC 分别计算 4 类 BMI 人群肠道菌群中菌属相关性。通过

Bootstrap 方法对原数据集重抽样 100 次, 获得 100 个随机数据集。对随机数据集中菌属的相关程度进行计算, 获得随机数据集的相关性矩阵, 从而计算并生成 P 值矩阵。 P 值矩阵代表两两菌属之间的相关程度的显著性, P 值越低则菌属之间的相关程度越显著($P < 0.05$ 则认为有统计学意义)。筛选出相关系数绝对值大于 0.35 且 P 值小于 0.05 的相关关系构建 4 类人群肠道菌群的共存网络。

采用 R 语言中的 Igraph 程序包(V1.2.5)中的相关函数计算并获得一系列基础的网络参数, 以更好了解所构建网络的拓扑结构。网络的基础结构参数包括节点数(Number of Vertices)、边数(Number of Edges)、连接性(Connectance)、平均度(Average Degree)、平均路径长度(Average Path Length)、直径(Diameter)、聚集系数(Clustering Coefficient)、度中心性(Centralization Degree)、介数中心性(Centralization Betweenness)、中心紧密度(Centralization Closeness)、模块性(Modularity)和模块数(Number of Modules)。基于网络节点的平均度及连接性, 对网络节点进行重要性排序, 获得在 4 类人群肠道菌群共存网络中的关键菌属。

1.4 统计分析方法

统计分析主要基于 R 3.6.2 (<https://www.r-project.org/>)平台, 利用 Wilcoxon 秩和检验进行 4 类 BMI 人群肠道菌群之间的 α 多样性和门水平物种差异性分析, $P < 0.05$ 则认为有显著差异; 利用 Kruskal-Wallis 检验进行 4 类 BMI 人群肠道菌群之间的 β 多样性差异分析, $P < 0.05$ 则认为有显著差异。

2 结果与分析

2.1 肠道菌群与宿主背景信息的相关性分析

基于 Unweighted UniFrac 距离矩阵, 通过基于距离矩阵的 Adonis 方法计算了宿主肠道菌群的变化与不同宿主背景(如年龄、性别、BMI 类别、地域等)之间的关联。结果表明, 许多宿主背景因素与肠道菌群显著相关($P < 0.05$), 按照不同宿主背景信息对肠道菌群差异的解释度(R^2 值)进行宿

主背景信息排序(图 1)。其中, 宿主所在地域与肠道菌群的差异之间存在较强的关联。年龄、性别、饮食类型、艰难梭菌感染(Clostridium Difficile Infection, CDI)、炎症性肠病(Inflammatory Bowel Disease, IBD)、自闭症(Autistic Spectrum Disorder, AD)、肠易激综合征(Irritable Bowel Syndrome, IBS)、癌症、阿尔兹海默症(Alzheimer Disease, AD)、糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)等宿主背景信息也与肠道菌群显著相关。此外, 还发现 BMI 类别对肠道菌群的差异的解释度也较大, 表明体重过轻、正常体重、超重和肥胖人群肠道菌群之间可能存在显著差异, 值得进一步探究。

2.2 α 多样性分析

采用 Observed OTUs、Faith PD、Shannon 和 Simpson 这 4 种 α 多样性指数探究 4 类 BMI 人群肠道菌群的丰富度和均匀度(图 2)。Observed OTUs 指数主要用来表示某一群落中的物种丰富度, Faith PD 指数则主要反应物种进化上的多样性, Shannon 指数和 Simpson 指数则反映群落中物种的

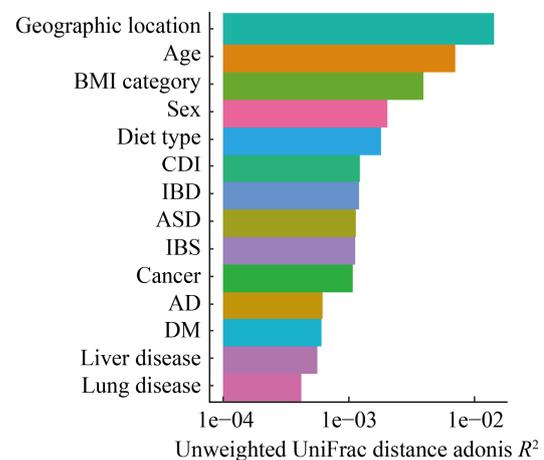


图 1 基于 Unweighted UniFrac 距离的 Adonis 相关性分析

Figure 1 Adonis analysis based on the Unweighted UniFrac distance matrix

注: CDI: 艰难梭菌感染; IBD: 炎症性肠病; ASD: 自闭症; IBS: 肠易激综合征; AD: 阿尔兹海默症; DM: 糖尿病

Note: CDI: Clostridium difficile infection; IBD: Inflammatory bowel disease; ASD: Autistic spectrum disorder; IBS: Irritable bowel syndrome; AD: Alzheimer disease; DM: Diabetes mellitus

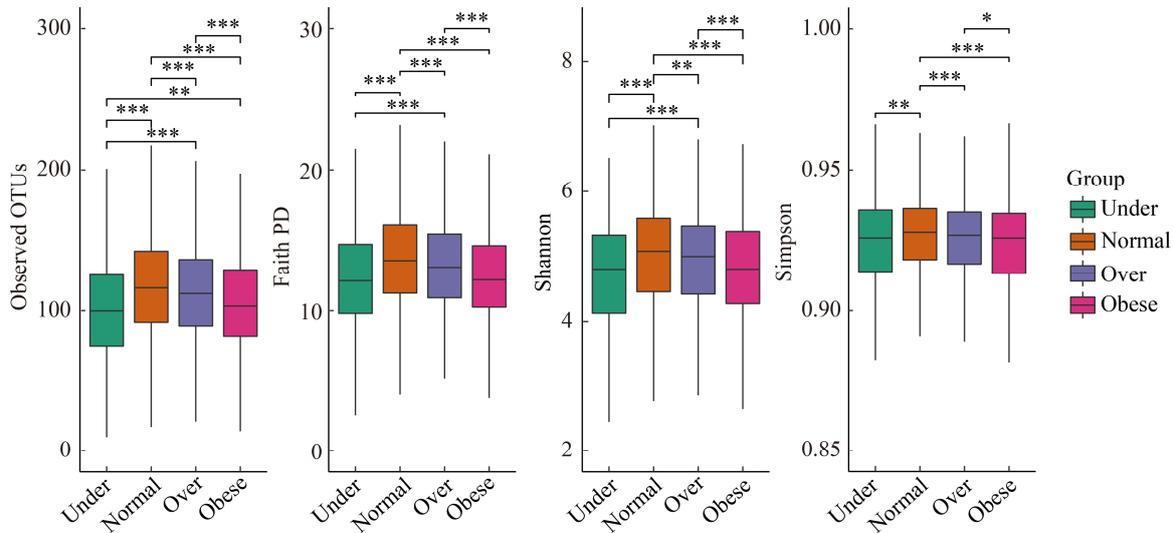


图 2 α 多样性比对

Figure 2 The comparison of alpha diversity

注: Under: 体重过轻; Normal: 正常体重; Over: 超重。***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$

Note: Under: Underweight; Normal: Normalweight; Over: Overweight. ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$

丰富度及均匀度。通过 Wilcoxon 秩和检验对 4 类 BMI 人群肠道菌群的多样性进行分析, 与正常体重人群相比, 4 种 α 多样性指数在体重过轻、超重、肥胖人群中均显著降低, 表明体重过轻、超重、肥胖人群中的肠道微生物的丰富度和均匀度都显著低于正常体重人群。此外, 肥胖人群肠道菌群的 α 多样性显著低于超重人群, 但与体重过轻人群肠道菌群的 α 多样性无显著差异, 表明肥胖人群肠道菌群丰富度和均匀度显著低于超重人群, 但与体重过轻人群肠道菌群的丰富度及均匀度相似。

2.3 β 多样性分析

基于 2 种不同的 β 多样性距离(Unweighted UniFrac 和 Weighted UniFrac)对 4 类 BMI 人群肠道菌群的整体结构进行分析(图 3A、3B)。UniFrac 距离需要通过各个 OTU 间的进化树, 基于系统发育关系来计算样本间的距离, 从而反映不同样本基于进化树的肠道菌群差异, 以探究 2 个样本肠道菌群的系统发育关系是否相似。Unweighted UniFrac 距离不进行丰度加权, 即仅考虑 OTU 在微生物群落中是否存在, 而不考虑其丰度高

低。Weighted UniFrac 距离进行丰度加权, 即不仅仅考虑到 OTU 序列的存在与否, 而且将 OTU 丰度纳入计算。UniFrac 距离的值介于 0 和 1 之间, 当 UniFrac 距离的值为 0 时表明 2 个样本肠道菌群的种类和数量完全一致, 当 UniFrac 距离的值为 1 时表明 2 个样本肠道菌群的种类和数量完全不同。通过 Kruskal-Wallis 检验, 4 类 BMI 人群肠道菌群的 Unweighted UniFrac、Weighted UniFrac 距离均存在显著差异($P < 2.2e-16$), 表明 4 类 BMI 人群肠道菌群的种类和数量存在显著差异。此外, Adonis 分析结果也表明, 4 类 BMI 人群肠道菌群的整体结构存在显著差异(Unweighted UniFrac, $P = 0.001$; Weighted UniFrac, $P = 0.001$)。

2.4 物种组成分析

对 4 类 BMI 人群肠道菌群的门、科、属水平进行物种组成分析, 并计算厚壁菌门/拟杆菌门比值。在门水平上, 4 类 BMI 人群肠道菌群均主要由厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和疣微菌门(*Verrucomicrobia*)构成(图 4A)。对 4 类

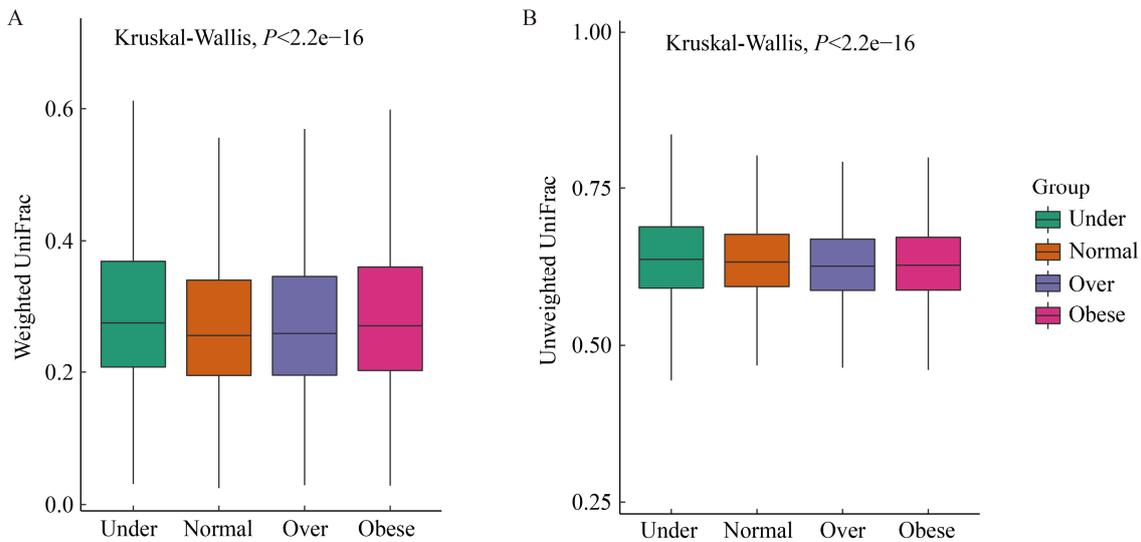
图3 β 多样性距离比对

Figure 3 The comparison of beta diversity distance

注: Under: 体重过轻; Normal: 正常体重; Over: 超重

Note: Under: Underweight; Normal: Normalweight; Over: Overweight

BMI 人群肠道中的厚壁菌门/拟杆菌门(*Firmicutes/Bacteroidetes*)比值进行 Wilcoxon 秩和检验, 发现 4 类 BMI 人群肠道中的厚壁菌门/拟杆菌门(*Firmicutes/Bacteroidetes*)比值无显著差异(图 4B)。在科水平上, 在 4 类 BMI 人群肠道中优势物种主要有: 拟杆菌科(*Bacteroidaceae*)、瘤胃菌科(*Ruminococcaceae*)、毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)、普雷沃氏菌科(*Prevotellaceae*)、*Porphyromonadaceae*(图 4C)。在属水平上, 在 4 类 BMI 人群肠道中拟杆菌属(*Bacteroides*)、粪杆菌属(*Faecalibacterium*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、*Parabacteroides*、布劳特氏菌属(*Blautia*)等菌属的相对丰度较高(图 4D)。

2.5 相关性物种分析

通过 MaAsLin 对不同 BMI 分类与肠道菌群进行相关性分析, 并且将地域、年龄、性别因素作为混杂因素加入到模型中进行校正, 共得到 49 个与 BMI 类型显著相关的物种(图 5)。在门水平上, 放线菌门(*Actinobacteria*)的相对丰度显著高于正常体重人群; 正常体重人群肠道中柔膜菌门(*Tenericutes*)的相对丰度显著高于其他 3 类人群。

在纲水平上, 体重过轻人群的放线菌门(*Actinobacteria*)显著高于正常体重人群; 正常体重人群肠道中柔膜菌纲(*Mollicutes*)相对丰度显著高于其他 3 类人群; 肥胖人群肠道中产芽胞菌纲(*Erysipelotrichi*)和红螯菌纲(*Coriobacteriia*)相对丰度显著高于正常体重人群。在目水平上, 体重过轻人群肠道中双歧杆菌目(*Bifidobacteriales*)和巴斯德氏菌目(*Pasteurellales*)相对丰度显著高于正常体重人群; 肥胖人群肠道中丹毒丝菌目(*Erysipelotrichales*)和红螯菌目(*Coriobacteriales*)的相对丰度显著高于正常体重人群。在科水平上, 体重过轻人群肠道中双歧杆菌科(*Bifidobacteriaceae*)、梭菌科(*Clostridiaceae*)、巴斯德氏菌科(*Pasteurellaceae*)和消化链球菌科(*Peptostreptococcaceae*)的相对丰度显著高于正常体重人群, 帕拉普氏菌科(*Paraprevotellaceae*)和臭杆菌科(*Odoribacteraceae*)相对丰度显著低于正常体重人群; 肥胖人群肠道中毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)、丹毒丝菌科(*Erysipelotrichaceae*)、韦荣氏菌科(*Veillonellaceae*)和红螯菌科(*Coriobacteriaceae*)相对丰度显著高于正常体重人

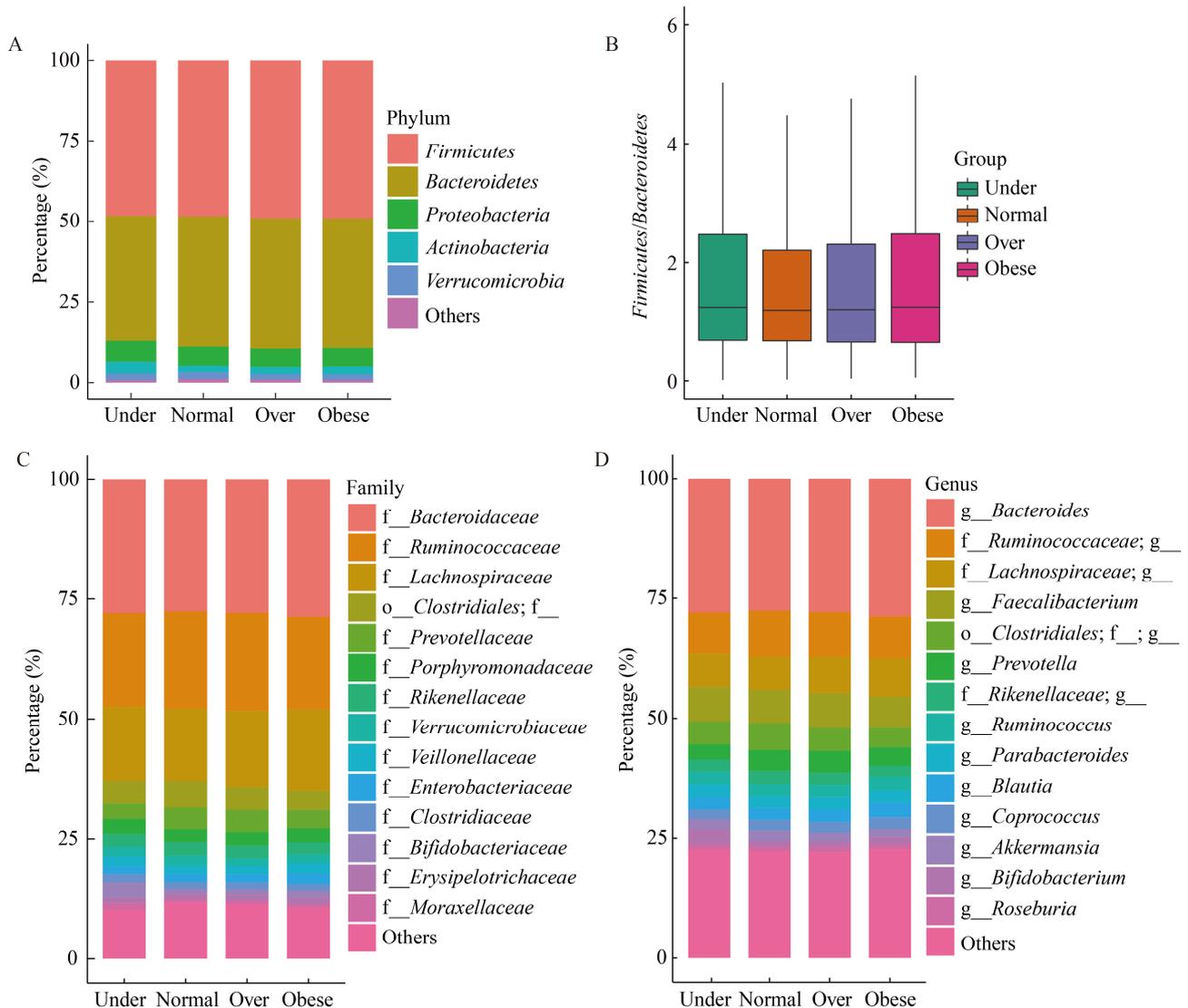


图 4 门、科、属水平物种组成与厚壁菌门/拟杆菌门比值

Figure 4 The gut microbiome composition at phylum, family and genus level and the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio

注: Under: 体重过轻; Normal: 正常体重; Over: 超重

Note: Under: Underweight; Normal: Normalweight; Over: Overweight

群, 理研菌科(*Rikenellaceae*)和 *Barnesiellaceae* 的相对丰度显著低于正常体重人群。在属水平上, 体重过轻人群肠道中双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、韦荣氏球菌属(*Veillonella*)和 *Dorea* 相对丰度显著高于正常体重人群, *Coprococcus*、帕拉普氏菌属(*Paraprevotella*)、考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)和萨特氏菌属(*Sutterella*)的相对丰度显著低于正常体重人群; 超

重人群肠道中毛螺菌属(*Lachnospira*)和 *Anaerostipes* 相对丰度显著低于正常体重人群; 肥胖人群肠道菌群中布劳特氏菌属(*Blautia*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)、巨型球菌属(*Megasphaera*)、链型杆菌属(*Catenibacterium*)、*Dorea* 等相对丰度显著高于正常体重人群, 毛螺菌属(*Lachnospira*)和 *Anaerostipes* 的相对丰度显著低于正常体重人群。

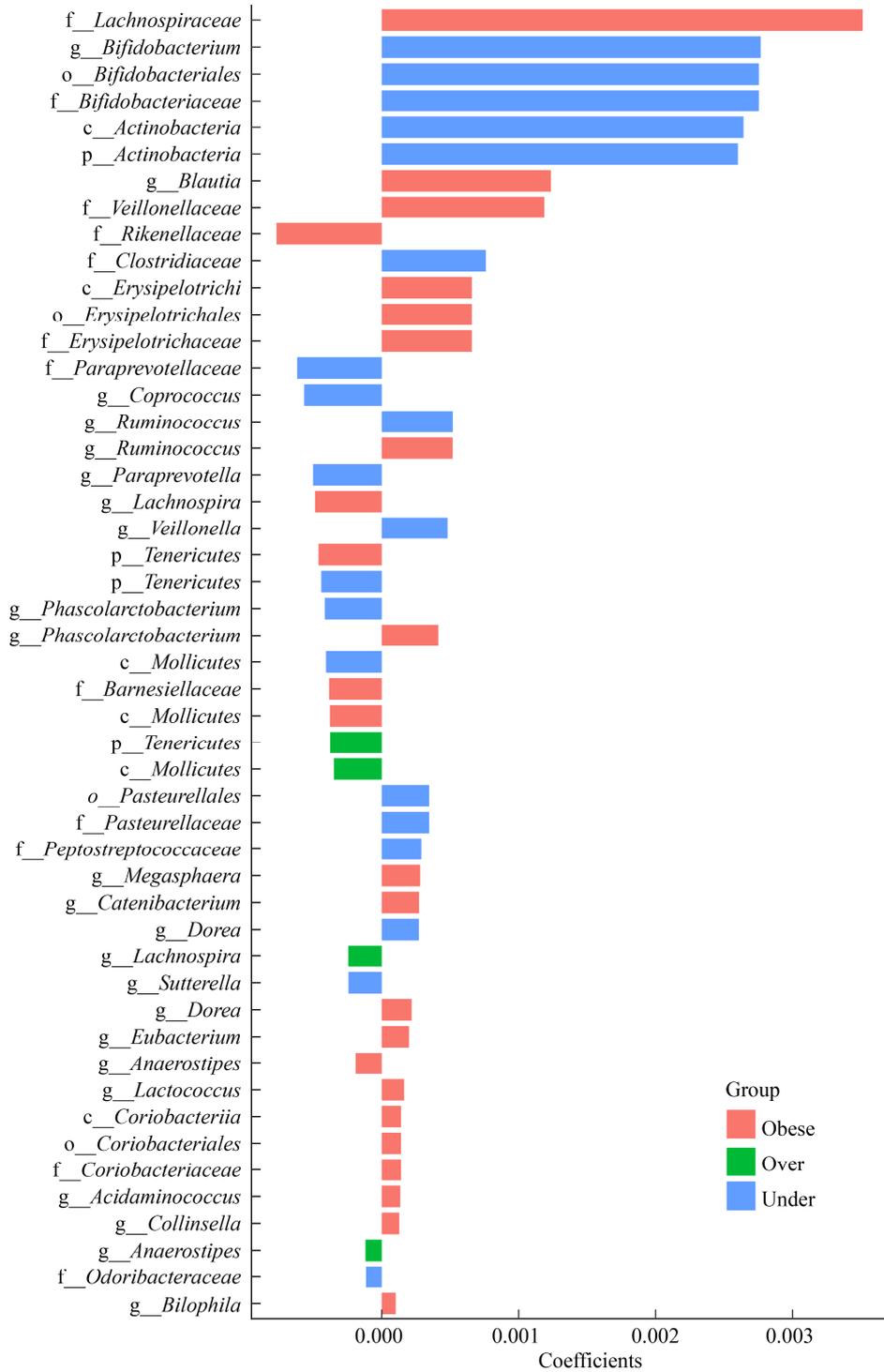


图 5 不同 BMI 人群肠道菌群相关性物种分析

Figure 5 Analysis of gut microbiota related species in different BMI populations

注: Under: 体重过轻; Normal: 正常体重; Over: 超重

Note: Under: Underweight; Normal: Normalweight; Over: Overweight

2.6 肠道菌群共存网络分析

对 4 类 BMI 人群肠道菌群共存网络的拓扑结构参数进行分析(表 1)。4 类 BMI 人群肠道菌群共存网络的节点数、边数、平均度、连接性、平均路径长度、模块性等参数均存在差异,可初步表明 4 类 BMI 人群共存网络拓扑结构复杂性之间的不同。4 类 BMI 人群肠道菌群共存网络共享 46.1% 的边(70 条)与 65.2% 的节点(43 个),表明 4 类人群肠道菌群网络之间存在一定比例相同的互作关系(图 6)。与其他 3 类人群相比,体重过轻人群肠道菌群共存网络中特有 31 条边(占其共存网络的 20.4%), 6 个节点(占其共存网络的 9.1%)。正常体重人群肠道菌群共存网络特有 4 条边(占其共存网络的 2.6%), 2 个节点(占其共存网络的 3%)。超重人群肠道菌群共存网络特有 3 条边(占其共存网络的 2%), 1 个节点(占其共存网络的 1.5%)。肥胖人群肠道菌群共存网络特有 1 条边(占其共存网络的 0.7%)。以上统计结果表明,4 类人群共存网络的边和节点上具有一定差异性,其中体重过轻人群肠道菌群共存网络结构最复杂。

表 1 网络拓扑结构参数

Table 1 The topological features of network

Parameters	Underweight	Normal	Overweight	Obese
Number of edges	134.000	108.000	91.000	92.000
Number of positive edges	133.000	107.000	90.000	91.000
Number of negative edges	1.000	1.000	1.000	1.000
Number of vertices	58.000	58.000	51.000	51.000
Connectance	0.081	0.065	0.071	0.072
Average degree	4.621	3.724	3.569	3.608
Average path length	2.329	2.470	2.549	2.306
Diameter	5.000	5.000	6.000	5.000
Clustering coefficient	0.574	0.480	0.601	0.528
Centralization degree	0.200	0.198	0.169	0.168
Centralization betweenness	0.065	0.158	0.097	0.072
Centralization closeness	0.018	0.017	0.015	0.016
Modularity	0.515	0.654	0.690	0.649
Number of modules	8.000	7.000	9.000	9.000

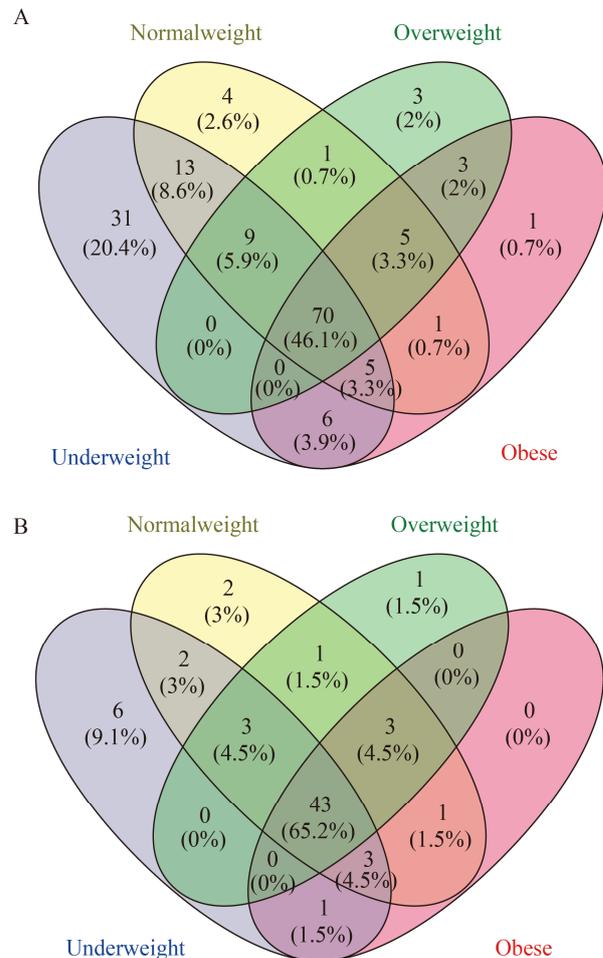


图 6 肠道菌群网络的边与节点总体差异

Figure 6 Discrepancies of edge and node between the four gut microbiome networks

注: A: 4 类 BMI 人群肠道菌群网络边的总体差异; B: 4 类 BMI 人群肠道菌群网络节点的总体差异

Note: A: Discrepancies of edge between the four gut microbiome networks; Normal: Discrepancies of node between the four gut microbiome networks

4 类 BMI 人群肠道菌群共存网络的模块性均大于 0.4, 均具有模块化结构。4 类 BMI 人群肠道菌群共存网络中绝大部分节点呈正相关, 将这些节点用模块聚类显示, 对包含 10 个及以上节点的较大模块进行分析(图 7)。体重过轻、超重和肥胖人群肠道菌群共存网络拓扑结构中分别具有 2 个较大模块(模块 A 和模块 B), 正常体重人群具有 3 个较大模块(模块 A、模块 B、模块 C)。其中 4 类 BMI 人群肠道菌群的 *Anaerococcus* 模块(模块 B)内

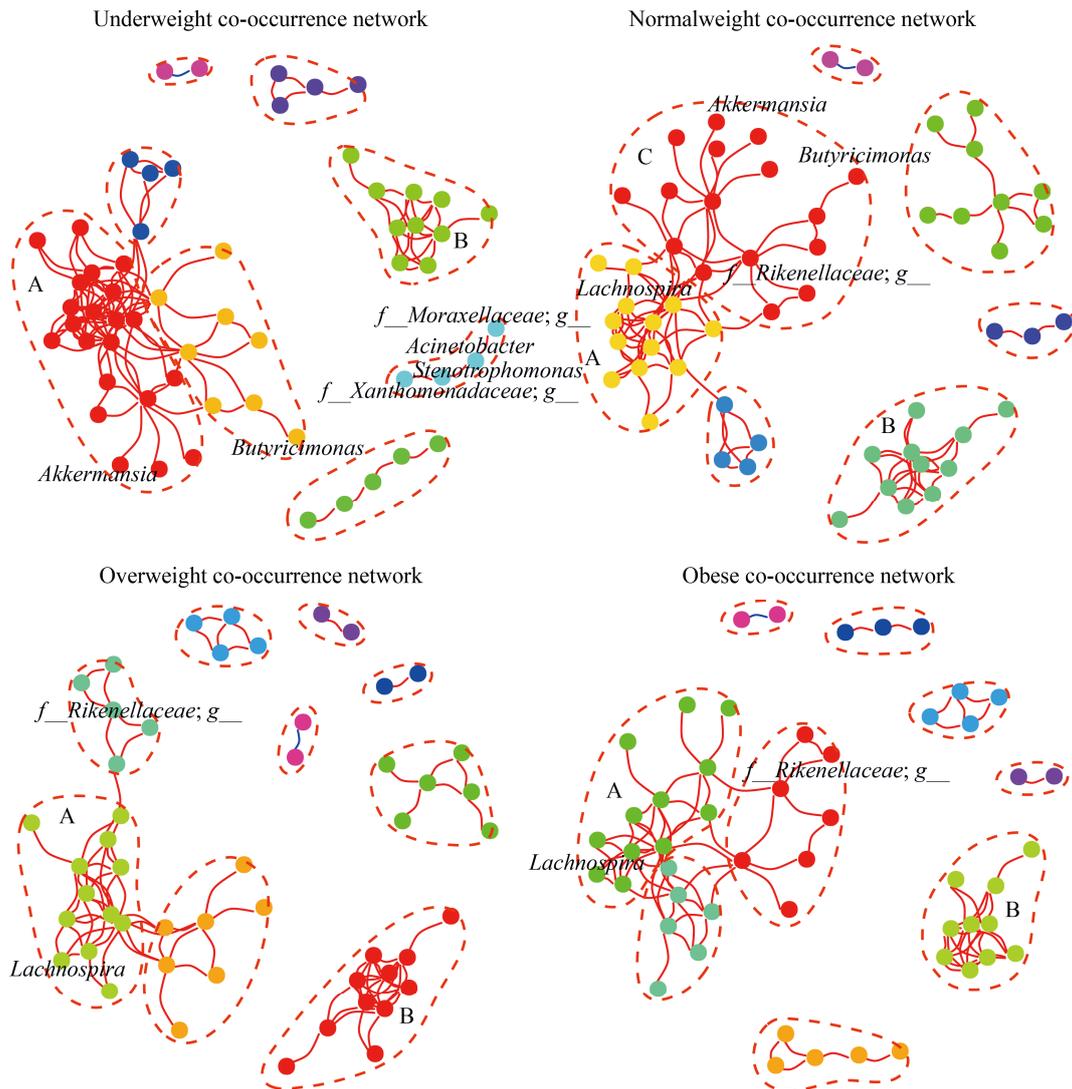


图 7 肠道菌群共存网络模块差异

Figure 7 Differences of communities of gut microbiome network

注: A: *f_Ruminococcaceae_g* 模块; B: *Anaerococcus* 模块; C: *f_Christensenellaceae_g* 模块

Note: A: *f_Ruminococcaceae_g* module; B: *Anaerococcus* module; C: *f_Christensenellaceae_g* module

物种组成及复杂程度基本相同, 互物种间的进化距离也相似, 均来自厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和放线菌门(*Actinobacteria*)。4类BMI人群肠道菌群的*f_Ruminococcaceae_g*模块(模块A)内物种组成及复杂程度有明显差异。从*f_Ruminococcaceae_g*模块的复杂程度来看, 与正常人群相比, 体重过轻人群肠道菌群共存网络中该模块的节点数量及内部复杂度更高, 而超重和肥胖人群肠道菌群共存网络中该模块的节点

数量及内部复杂度较低。从*f_Ruminococcaceae_g*模块的物种组成来看, 正常体重人群肠道菌群间的相互作用更趋向于进化距离较远的(来自不同门)菌属之间的相互作用; 体重过轻人群肠道菌群共存网络中该模块内物种数目更多, 菌群的相互作用更趋向于进化距离较近的菌属之间的相互作用; 超重和肥胖人群肠道菌群共存网络中该模块内物种数目均低于正常人群, 而且菌群间的相互作用更趋向于进化距离较近的菌属之间的相互作用。

基于节点的平均度和连接性, 分别对 4 类 BMI 人群肠道菌群共存网络节点进行重要性排序(图 8)。f_*Christensenellaceae*_g_、f_*Lachnospiraceae*_g_、布劳特氏菌属(*Blautia*)、*Coprococcus*、*Dorea*、罗氏菌属(*Roseburia*)、f_*Ruminococcaceae*_g_、*Anaerococcus* 和 *Peptoniphilus* 在 4 类 BMI 人群肠道菌群共存网络中均具有较高的度, 与其他物种的关联性较强。本研究发发现体重过轻与正常体重人群肠道菌群共存网络中的重要节点相似性较高, 超重与肥胖人群肠道菌群共存网络中的重要节点相似性较高。瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、毛

螺菌属(*Lachnospira*)和 f_*Rikenellaceae*_g_ 在体重过轻和正常体重人群肠道菌群共存网络中的重要性较高, 与其他物种的关联较紧密, 而在超重和肥胖人群肠道菌群中重要性较低。*Fingoldia*、f_*Tissierellaceae*_g_1-68 和颤螺菌属(*Oscillospira*) 在超重及肥胖人群肠道菌群共存网络中的重要性较高, 在体重过轻与正常人群肠道菌群中与其他物种的关联度较低。此外, *Butyricimonas* 与 *Akkermansia* 在体重过轻及正常体重人群肠道菌群网络中特有。在体重过轻人群肠道菌群网络中特有节点为不动杆菌属(*Acinetobacter*)、

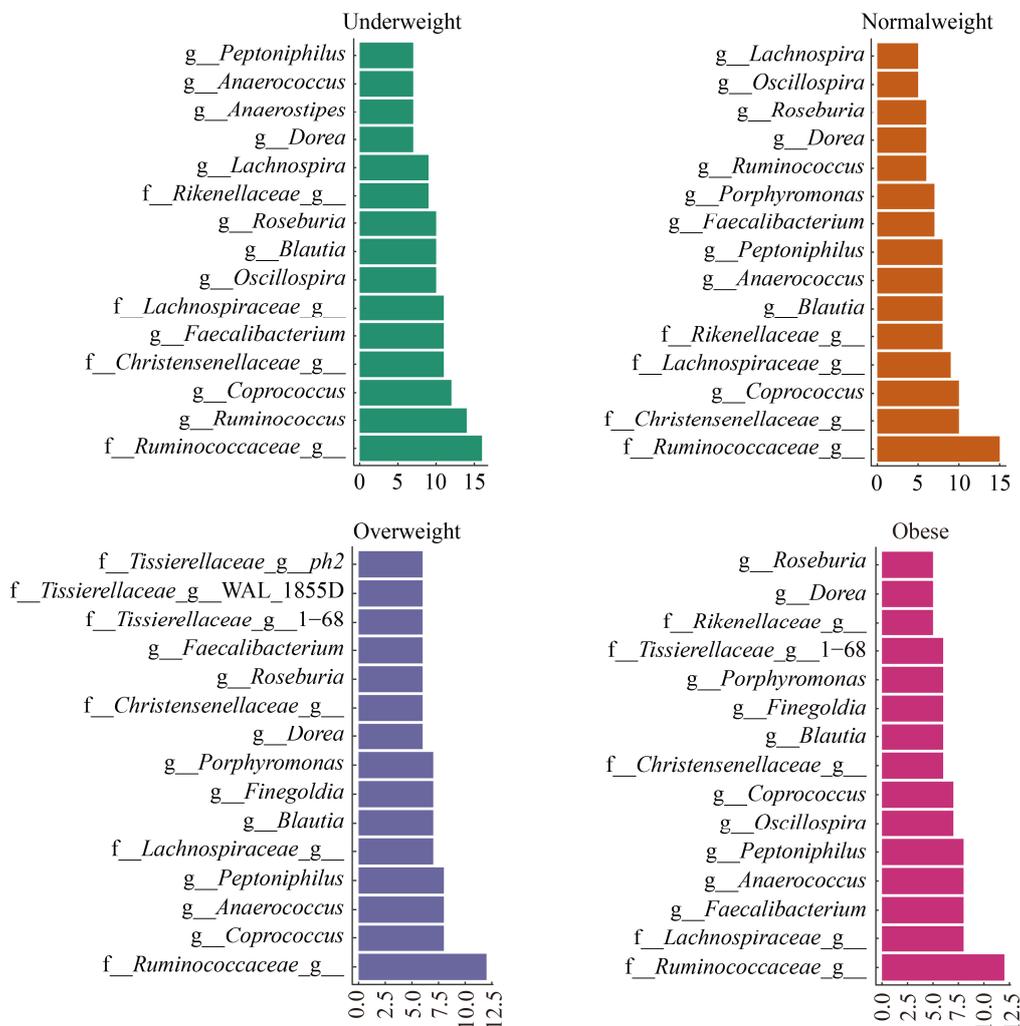


图 8 肠道菌群网络中重要性节点排序

Figure 8 Ranking of important nodes in the gut microbiome network

Stenotrophomonas、f_*Mogibacteriaceae_g*、f_*Pasteurellaceae_g*、f_*Moraxellaceae_g*、f_*Xanthomonadaceae_g*。在超重人群肠道菌群网络中特有节点为 *Salmonella*。

3 讨论与结论

近年来多个人体肠道微生物组项目表明肠道菌群在能量的储存和消耗中起到重要作用, 与人体的 BMI 状态存在关联^[14,17,21-22]。研究表明, 4 类 BMI 人群肠道菌群的 α 多样性存在显著差异, 体重过轻、肥胖和超重人群肠道菌群的 α 多样性指数显著低于正常人群, 并且肥胖人群肠道菌群的 α 多样性指数显著低于超重人群^[14,17], 本研究的结果与其一致, 表明体重过轻、超重和肥胖人群的肠道菌群多样性显著低于正常人群。4 类 BMI 人群肠道菌群的整体结构存在显著差异, 与以往研究结果一致^[14]。在门水平肠道菌群物种组成上, 4 类 BMI 人群肠道菌群均主要由厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*) 和疣微菌门 (*Verrucomicrobia*) 组成。体重过轻、正常体重、超重和肥胖人群 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 的相对含量无显著差异, 与多项研究结果相符^[14,17]。然而, 有关于肥胖人群的 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 的相对含量与健康人群相比的结论并不一致, 早期研究表明 *Firmicutes/Bacteroidetes* 在肥胖人群中增加^[23-24], 后来又有研究表明 *Firmicutes/Bacteroidetes* 在肥胖人群中降低^[25-26]。但是, 这些研究都集中于单个队列或小型数据库, 分析结果可能存在局限性。此外, 肠道菌群是一个复杂的生态系统, 同一个门水平下不同科、属、种、菌株的功能及其代谢物均存在巨大差异。因此需要在大队列背景下, 基于肠道菌群的菌株构成、代谢功能、基因转录以及蛋白表达水平等特征进行深入研究。

MaAsLin 分析结果表明, 不同 BMI 分类人群肠道中均存在显著相关性物种。理研菌科

(*Rikenellaceae*) 和 *Barnesiellaceae* 被证实是正常青少年的肠道菌群标志物^[27]。臭杆菌科 (*Odoribacteraceae*) 可分解琥珀酸, 并且研究表明肥胖患者肠道中其相对丰度显著低于非肥胖人群^[28]。在本次研究中我们也有相似的结果, 正常体重人群肠道菌群中理研菌科 (*Rikenellaceae*)、*Barnesiellaceae* 和臭杆菌科 (*Odoribacteraceae*) 相对丰度显著高于不健康 BMI 状态人群。此外, 本研究发现正常人群肠道中毛螺菌属 (*Lachnospira*) 的相对丰度显著高于其他 3 类人群。毛螺菌属 (*Lachnospira*) 被认为可促进维生素 D 合成并可产短链脂肪酸, 对人体健康有益^[29-30]。与正常体重人群相比, 体重过轻人群肠道菌群的多样性降低, 韦荣氏球菌属 (*Veillonella*) 和双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 的相对丰度均较高。Chen 等研究表明, 韦荣氏球菌属 (*Veillonella*) 被证实为条件致病菌, *Bifidobacterium* 为人体肠道中益生菌^[31]。因此, 虽然体重过轻人群肠道菌群多样性显著低于正常体重人群, 肠道中的相关条件致病菌较高, 但仍然存在一定比例的有益于健康的菌属。在本次研究中, 我们发现布劳特氏菌属 (*Blautia*) 在肥胖人群肠道菌群中相对丰度较高。Ottosson 等的研究表明, 布劳特氏菌属 (*Blautia*) 与 BMI 呈正相关^[21], 与我们的研究相一致。此外, MaAsLin 分析结果表明肥胖人群肠道菌群的特征菌还有考拉杆菌属 (*Phascolarctobacterium*) 和 *Eubacterium*。肥胖人群肠道内高丰度的考拉杆菌属 (*Phascolarctobacterium*) 被证实与减肥成功显著相关^[32]。*Eubacterium* 具有较高的系统发育多样性, *Eubacterium* 下的某些种可通过产生短链脂肪酸缓解宿主肥胖症状^[33]。这些菌属可能与肥胖干预效果相关, 或可作为基于肠道菌群对 BMI 进行干预的潜在作用靶点。此外, 本研究发现, 瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*) 和 *Dorea* 在体重过轻及肥胖人群肠道中均为显著相关菌属。Ottosson 等研究了 674 名 BMI > 20 kg/m² 的瑞典人群的肠道菌群, 结果表明

瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)和 *Dorea* 与 BMI 呈正相关^[21]。在本研究中, 瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)和 *Dorea* 的相对丰度在正常体重、超重、肥胖人群的肠道中逐渐增加, 与上述研究结果一致。我们还发现体重过轻人群(BMI<18.5 kg/m²)肠道菌群中瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)和 *Dorea* 相对丰度显著高于其他 3 类人群, 这在以往的研究中未见报道。瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)和 *Dorea* 在非酒精性脂肪肝和非酒精性脂肪肝患者肠道中的相对丰度显著高于健康人^[34]。因此, 我们推测瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)和 *Dorea* 可能与能量摄入与消耗失衡及不健康的身体状态相关。

4 组 BMI 人群肠道菌群共存网络的拓扑结构具有一定差异, 体重过轻和正常体重人群肠道菌群共存网络的复杂度较高, 超重和肥胖人群肠道菌群共存网络的复杂度较低。4 组 BMI 人群肠道菌群共存网络具有 46.1% 的相同边和 65.2% 的相同节点, 并且均具有物种组成与相互作用关系基本相同的 *Anaerococcus* 模块, 这些相同的模块、节点及相互作用关系可能是人体肠道菌群的基础结构。在我们的研究中, *Butyricimonas* 与 *Akkermansia* 是体重过轻及正常体重人群肠道菌群共存网络中的特有节点, 在网络中与其他菌属存在直接或间接的正相关(图 7)。Rodriguez 等研究表明, *Butyricimonas* 和 *Akkermansia* 均与降低肝脏脂质积累有关, 并且 *Akkermansia* 可驱动菊粉应答者的 BMI 降低^[35]。在超重和肥胖人群肠道菌群共存网络中不存在这 2 个节点, *Butyricimonas* 和 *Akkermansia* 与其他菌属的相互作用关系的缺失或弱化可能是超重或肥胖的诱因。此外, MaAsLin 分析结果表明, 毛螺菌属(*Lachnospira*)和 *Rikenellaceae* 为超重及肥胖的显著负相关物种。与正常人群相比, 超重及肥胖肠道菌群共存网络 *Lachnospira* 和 *f__Rikenellaceae_g__* 与其他菌属的互作程度也较低。因此, 与健康相关菌属及其相互作用关系的弱化或缺失, 或许是超重及肥胖肠道菌群共存网络复杂

度较低的原因。与其他 BMI 状态人群相比, 体重过轻人群的肠道菌群共存网络复杂度最高。存在由不动杆菌属(*Acinetobacter*)、*Stenotrophomonas*、*f__Moraxellaceae_g__* 和 *f__Xanthomonadaceae_g__* 组成的特有独立模块, 模块 A 的复杂度也最高(图 7)。总之, 不同 BMI 状态肠道菌群共存网络复杂度的差异可能是由于特定节点及相互作用关系的改变造成的, 这需要进行进一步的实验来验证。

然而, 我们的研究存在一些不足。首先, 宿主背景因素的复杂性是肠道微生态研究领域的重点和难点, 地域、年龄、性别、BMI 以及疾病等因素对人体肠道菌群都具有不同程度的影响^[36], 这也与本研究的分析结果一致。宿主背景因素会对本研究的分析结果产生一定的影响, 现有研究并不能完全排除宿主背景混杂因素对疾病与肠道菌群关系的影响^[36]。在本研究中, 我们校正了地域、年龄、性别因素的影响, 在后续的研究中可通过将不同 BMI 人群的数据集分成考虑地域、年龄因素的子集进行进一步分析。其次, 本文数据库所采用的扩增子测序技术存在一定局限性, 只能精确到属水平的微生物, 无法精确反映样品中精确的菌群结构。因此需要采用宏基因组测序数据进行深入分析, 以研究种水平甚至菌株水平的菌群特征。此外, 还可扩展数据库进行基因转录和代谢产物层面的研究探索, 更加深入解析肠道菌群与不同 BMI 状态人群的关联。

总之, 我们通过大样本量的肠道菌群分析, 全面探究了 4 类 BMI 人群肠道菌群的特征, 同时基于肠道菌群共存网络探究了 4 类 BMI 人群肠道菌群共存网络的结构差异及其内部相互作用关系, 为基于肠道菌群来精准干预肥胖及体重过轻等不健康身体状态提供新的理论基础。

REFERENCES

- [1] Krashes MJ, Lowell BB, Garfield AS. Melanocortin-4 receptor-regulated energy homeostasis[J]. *Nature Neuroscience*, 2016, 19(2): 206-219
- [2] Mendez MA, Monteiro CA, Popkin BM. Overweight

- exceeds underweight among women in most developing countries[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, 81(3): 714-721
- [3] GBD 2015 Obesity Collaborators, Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, Lee A, Marczak L, Mokdad AH, Moradi-Lakeh M, et al. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years[J]. *New England Journal of Medicine*, 2017, 377(1): 13-27
- [4] Dobner J, Kaser S. Body mass index and the risk of infection - from underweight to obesity[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2018, 24(1): 24-28
- [5] Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity[J]. *JAMA*, 2007, 298(17): 2028-2037
- [6] Sender R, Fuchs S, Milo R. Are we really vastly outnumbered? revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans[J]. *Cell*, 2016, 164(3): 337-340
- [7] Li JH, Jia HJ, Cai XH, Zhong HZ, Feng Q, Sunagawa S, Arumugam M, Kultima JR, Prifti E, Nielsen T, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(8): 834-841
- [8] Qin JJ, Li RQ, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. *Nature*, 2010, 464(7285): 59-65
- [9] Shen TCD. Diet and gut microbiota in health and disease[J]. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 2017, 88: 117-126
- [10] Sánchez-Tapia M, Tovar AR, Torres N. Diet as regulator of gut microbiota and its role in health and disease[J]. *Archives of Medical Research*, 2019, 50(5): 259-268
- [11] Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(3): 979-984
- [12] Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng JY, Duncan AE, Kau AL, Griffin NW, Lombard V, Henriksat B, Bain JR, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice[J]. *Science*, 2013, 341(6150): 1241-1244
- [13] Blanton LV, Charbonneau MR, Salih T, Barratt MJ, Venkatesh S, Ilkaveya O, Subramanian S, Manary MJ, Trehan I, Jorgensen JM, et al. Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children[J]. *Science*, 2016, 351(6275): aad3311
- [14] Yun Y, Kim HN, Kim SE, Heo SG, Chang Y, Ryu S, Shin H, Kim HL. Comparative analysis of gut microbiota associated with body mass index in a large Korean cohort[J]. *BMC Microbiology*, 2017, 17(1): 151
- [15] Sun LJ, Ma LJ, Ma YB, Zhang FM, Zhao CH, Nie YZ. Insights into the role of gut microbiota in obesity: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic perspectives[J]. *Protein & Cell*, 2018, 9(5): 397-403
- [16] Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G, Quraishi MN, Kinross J, Smidt H, Tuohy KM, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier[J]. *Gut*, 2016, 65(2): 330-339
- [17] Wan Y, Yuan JH, Li J, Li H, Yin KH, Wang FL, Li D. Overweight and underweight status are linked to specific gut microbiota and intestinal tricarboxylic acid cycle intermediates[J]. *Clinical Nutrition*, 2020, 39(10): 3189-3198
- [18] Monteleone AM, Troisi J, Fasano A, Dalle Grave R, Marciello F, Serena G, Calugi S, Scala G, Corrivetti G, Cascino G, et al. Multi-omics data integration in anorexia nervosa patients before and after weight regain: a microbiome-metabolomics investigation[J]. *Clinical Nutrition*, 2021, 40(3): 1137-1146
- [19] McDONALD D, HYDE E, DEBELIUS JW, MORTON JT, GONZALEZ A, ACKERMANN G, AKSENOV AA, BEHSAZ B, BRENNAN C, CHEN YF, et al. American gut: an open platform for citizen science microbiome research[J]. *mSystems*, 2018, 3(3): e00031-e00018
- [20] Zhang JY, Zhang N, Liu YX, Zhang XN, Hu B, Qin Y, Xu HR, Wang H, Guo XX, Qian JM, et al. Root microbiota shift in rice correlates with resident time in the field and developmental stage[J]. *Science China Life Sciences*, 2018, 61(6): 613-621
- [21] Ottosson F, Brunkwall L, Ericson U, Nilsson PM, Almgren P, Fernandez C, Melander O, Orho-Melander M. Connection between BMI-related plasma metabolite profile and gut microbiota[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2018, 103(4): 1491-1501
- [22] Gao XF, Zhang MR, Xue JM, Huang JD, Zhuang RH, Zhou XL, Zhang HY, Fu Q, Hao Y. Body mass index differences in the gut microbiota are gender specific[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1250
- [23] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1027-1031
- [24] Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1022-1023
- [25] Schwiertz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, Hardt PD. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects[J]. *Obesity: Silver Spring, Md*, 2010, 18(1): 190-195
- [26] Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2008, 88(4): 894-899
- [27] Del Chierico F, Abbatini F, Russo A, Quagliariello A, Reddel S, Capoccia D, Caccamo R, Ginanni Corradini S, Nobili V, De Peppo F, et al. Gut microbiota markers in

- obese adolescent and adult patients: Age-dependent differential patterns[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1210
- [28] Serena C, Ceperuelo-Mallafré V, Keiran N, Queipo-Ortuño MI, Bernal R, Gomez-Huelgas R, Urpi-Sarda M, Sabater M, Pérez-Brocal V, Andrés-Lacueva C, et al. Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(7): 1642-1657
- [29] Qian XB, Liu YX, Ye XH, Zheng WJ, Lv S, Mo MJ, Lin JJ, Wang WQ, Wang WH, Zhang XN, et al. Gut microbiota in children with juvenile idiopathic arthritis: characteristics, biomarker identification, and usefulness in clinical prediction[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 286
- [30] Bosman ES, Albert AY, Lui H, Dutz JP, Vallance BA. Skin exposure to narrow band ultraviolet (UVB) light modulates the human intestinal microbiome[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2410
- [31] Chen J, Chia N, Kalari KR, Yao JZ, Novotna M, Paz Soldan MM, Luckey DH, Marietta EV, Jeraldo PR, Chen XF, et al. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28484
- [32] Muñoz Pedrego DA, Jensen MD, Van Dyke CT, Murray JA, Woods JA, Chen J, Kashyap PC, Nehra V. Gut microbial carbohydrate metabolism hinders weight loss in overweight adults undergoing lifestyle intervention with a volumetric diet[J]. *Mayo Clinic Proceedings*, 2018, 93(8): 1104-1110
- [33] Mukherjee A, Lordan C, Ross RP, Cotter PD. Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health[J]. *Gut Microbes*, 2020, 12(1): 1802866
- [34] Del Chierico F, Nobili V, Vernocchi P, Russo A, De Stefanis C, Gnani D, Furlanello C, Zandonà A, Paci PL, Capuani G, et al. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach[J]. *Hepatology*, 2017, 65(2): 451-464
- [35] Rodriguez J, Hiel S, Neyrinck AM, Le Roy T, Pötgens SA, Leyrolle Q, Pachikian BD, Gianfrancesco MA, Cani PD, Paquot N, et al. Discovery of the gut microbial signature driving the efficacy of prebiotic intervention in obese patients[J]. *Gut*, 2020, 69(11): 1975-1987
- [36] He Y, Wu W, Zheng HM, Li P, McDonald D, Sheng HF, Chen MX, Chen ZH, Ji GY, Zheng ZDX, et al. Regional variation limits applications of healthy gut microbiome reference ranges and disease models[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(10): 1532-1535