

IgA 肾病与膜性肾病患者肠道微生物菌群结构分析

赵娟^{#1}, 马志刚^{#2}, 黄文辉¹, 李莹屏¹, 李小丽^{*1}, 齐雪婷¹, 钱睿¹

1 甘肃省人民医院, 甘肃 兰州 730000

2 香港大学第二附属医院, 广东 深圳 518000

赵娟, 马志刚, 黄文辉, 李莹屏, 李小丽, 齐雪婷, 钱睿. IgA 肾病与膜性肾病患者肠道微生物菌群结构分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 632-643.

ZHAO Juan, MA Zhigang, HUANG Wenhui, LI Yingping, LI Xiaoli, QI Xueting, QIAN Rui. Intestinal microflora changes in patients with immunoglobulin A nephropathy and membranous nephropathy[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 632-643.

摘要: 【背景】越来越多的证据表明肠道失衡与免疫介导的疾病相关, 但肠道菌群和免疫介导的肾脏疾病之间的关系仍不清楚。【目的】通过 Illumina 高通量测序方法对 IgA 肾病(immunoglobulin A nephropathy, IgAN)、膜性肾病(membranous nephropathy, MN)患者和健康人群的肠道菌群进行比较。【方法】回顾性选择 2020 年 9 月–2021 年 12 月期间, 在甘肃省人民医院肾内科行肾穿刺活检并诊断为 IgAN 及 MN 患者的新鲜粪便标本, 分别编号为 IgAN 组和 MN 组, 收集体检中心健康人群粪便标本作为健康对照组, 每组样本为 10 例。采用高通量测序技术对粪便样本中所有细菌的 16S rRNA 基因 V3–V4 区进行 DNA 测序, 然后进行分类操作单元(operational taxonomic units, OTU)、物种分类、 α 多样性、 β 多样性等分析, 比较 3 组之间的肠道菌群差异。【结果】与健康对照组相比, 门水平上 IgAN 组的变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)比例明显增高, 分别为 18% vs. 4%和 18.3% vs. 5%; 属水平上 IgAN 组大肠杆菌-志贺氏菌和双歧杆菌属丰度显著增加(14.1% vs. 2.1%和 17.5% vs. 4.7%), 而粪杆菌属(11% vs. 20.5%)、拟杆菌属(8.0% vs. 21%)、巨单胞菌属(1.8% vs. 8.0%)丰度降低。与健康对照组相比, 门水平上 MN 组的变形菌门丰度增加(20% vs. 4%); 属水平上 MN 组的埃舍里奇-志贺氏菌(13.8% vs. 2.1%)丰度增加, 而双歧杆菌属(3.2% vs. 4.7%)、粪杆菌属(18% vs. 20.5%)、拟杆菌属(14.3% vs. 21%)、巨单胞菌属(1% vs. 8%)丰度降低。 α 多样性分析结果显示, 肾病组丰富度指数低于健康对照组, 多样性指数高于健康对照组。通过相似性分析(analysis of similarities, ANOSIM)发现 IgAN 组与健康对照组之间肠道菌群构成的差异具有统计学意义($R=0.19$, $P=0.013$), MN 患者和健康对照组肠道菌群构成存在差异, 但结果不具有统计学意义($R=0.08$, $P=0.08$)。线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)差异贡献分析发现, 3 组之间共有 14 个物种存在显著

资助项目: 甘肃省自然科学基金(21JR7RA625, 22JR5RA654)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province (21JR7RA625, 22JR5RA654).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: lxl_0329@163.com

Received: 2022-05-16; Accepted: 2022-08-12; Published online: 2022-11-01

差异。【结论】IgAN 和 MN 患者的肠道微生物特征与健康对照组不同。

关键词: IgA 肾病; 膜性肾病; 肠道菌群; 16S rRNA 基因

Intestinal microflora changes in patients with immunoglobulin A nephropathy and membranous nephropathy

ZHAO Juan^{#1}, MA Zhigang^{#2}, HUANG Wenhui¹, LI Yingping¹, LI Xiaoli^{*1}, QI Xueting¹, QIAN Rui¹

1 Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, Gansu, China

2 The Second Affiliated Hospital, the University of Hong Kong, Shenzhen 518000, Guangdong, China

Abstract: [Background] There is increasing evidence that intestinal imbalance is associated with immune-mediated disease. However, the mechanistic link between intestinal flora and immune-mediated kidney disease remains unclear. **[Objective]** To compare the intestinal flora by using high throughput 16S ribosomal RNA (rRNA) gene sequencing between patients with immunoglobulin A nephropathy (IgAN) and membranous nephropathy (MN) and healthy people. **[Methods]** Fresh fecal samples from patients with IgAN and MN who underwent renal biopsy in the Department of Nephrology of Gansu Provincial Hospital from September 2020 to December 2021 were retrospectively selected and divided into an IgAN group and a MN group, and the fecal samples from healthy people in the physical examination center were collected as a healthy control group, with 10 cases in each group. The 16S rRNA gene V3–V4 region of all bacteria in fecal samples was sequenced by high-throughput sequencing technology, and then biodiversity analysis was performed, including operational taxonomic units (OTU) analysis, species classification analysis, alpha diversity analysis, beta diversity analysis, etc., to compare the intestinal flora differences among the three groups. **[Results]** As compared with the healthy control group, *Proteobacteria* and *Actinobacteria* at phylum level in the IgAN group were significantly increased (18% vs. 4% and 18.3% vs. 5%, respectively). The abundance of *Escherichia-Shigella* and *Bifidobacterium* at genus level was significantly higher in the IgAN group (14.1% vs. 2.1% and 17.5% vs. 4.7%, respectively), while the abundance of *Faecalibacterium* (11% vs. 20.5%), *Bacteroides* (8.0% vs. 21%), and *Megomonas* (1.8% vs. 8.0%) was significantly lower. The abundance of *Proteobacteria* at phylum level increased in the MN group as compared with the healthy control group (20% vs. 4%). At genus level, the abundance of *Escherich-Shigella* increased in the MN group (13.8% vs 2.1%), the abundance of *Bifidobacteria* (3.2% vs. 4.7%), *Faecalibacterium* (18% vs. 20.5%), *Bacteroides* (14.3% vs. 21%), and *Megomonas* (1% vs. 8%) decreased. Alpha diversity analysis showed that the richness index of the IgAN and MN groups was lower than that of the healthy control group, and the diversity index was higher than that of the healthy control group. Principal coordinates analysis (PCoA) showed statistically significant differences in the composition of intestinal flora between the IgAN group and the healthy control group (ANOISM, $R=0.19$, $P=0.013$). There were differences in the composition of intestinal

flora between the MN group and the healthy control group, but the results were not statistically significant (ANOISM, $R=0.08$, $P=0.08$). Linear discriminant analysis (LDA) for differential contribution revealed that 14 species had significant differences among the three groups. **[Conclusion]** The intestinal microbiome characteristics of patients with IgAN and MN are different from those of healthy people.

Keywords: immunoglobulin A nephropathy; membranous nephropathy; intestinal flora; 16S rRNA gene

人类肠道菌群是一个复杂的微生态系统, 不仅和肠道上皮细胞通信, 而且细胞与宿主之间可以相互作用, 在免疫应答调节和防御感染、营养吸收和代谢、炎症和细胞增殖中起到重要作用^[1]。正常情况下, 肠道菌群和人体处于“动态平衡”状态, 相互影响、相互制约, 打破平衡可能会引起胃肠道疾病或肠外疾病的发生^[2]。有研究提出, 肠道与肾脏之间通过“肠-肾轴”^[3]相互影响, 所以肠道菌群结构及功能的改变与肾脏病的发生及发展过程紧密联系。

IgA 肾病 (immunoglobulin A nephropathy, IgAN) 是目前全球发病率最高的一种原发性肾小球疾病^[4], 约占原发性肾小球肾炎的 36.9%–45.3%, 以中青年受累为主, 其主要病理特征是以免疫球蛋白 A1 (immunoglobulin A1, IgA1) 为主的免疫球蛋白在肾小球系膜区沉积^[5-6]。肠道屏障功能的改变可促进脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 的吸收, 增加循环中 LPS 水平, 进而激活黏膜相关淋巴组织 (mucosal-associated lymphoid tissue, MALT), 使机体处于亚临床炎症状态^[7], 产生大量糖基化 IgA1, 形成循环免疫复合物沉积于肾小球系膜区, 导致 IgAN 的发生, 因此推测肠道菌群失调在 IgAN 的发病机制中起着重要作用。

膜性肾病 (membranous nephropathy, MN) 是引起成人肾病综合征最常见的病因, 是一种以肾小球足细胞抗原为靶点的自身抗体循环引起的特异性自身免疫性疾病, 其病理学特征为肾小球脏层上皮细胞下弥漫的免疫复合物沉积。有研究^[8-9]发现, 部分 MN 患儿体内存在阳离子牛血

清白蛋白 (ovine serum albumin, BSA), 其在未分解时可能透过患儿未成熟的肠黏膜屏障吸收入血, 肾组织学发现带阳离子的牛血清白蛋白与肾小球基底膜 (glomerular basement membrane, GBM) 上带负电荷部位结合, 在原位形成免疫复合物, 导致 MN 的发生^[10], 所以 MN 患者是否存在肠黏膜屏障损伤, 以及肠黏膜损伤与 MN 的发病关系, 需要进一步探究。

本研究通过 16S rRNA 基因测序技术对肾病患者与健康人的肠道菌群进行比较, 探讨 IgAN 和 MN 组患者肠道菌群的变化, 发现与肾病相关的肠道特异性细菌, 以期对 IgAN 和 MN 的早期诊断和治疗提供线索。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取 2020 年 9 月–2021 年 12 月期间在甘肃省人民医院肾内科住院并确诊为 IgAN 及 MN 的患者各 10 例, 收集正常对照组 10 例。纳入标准: (1) 经肾组织病理活检为 IgAN、MN 患者; (2) 年龄 15–75 岁, 性别不限; (3) 近期末服用糖皮质激素或免疫抑制剂; (4) 近期无严重感染因素 (包括发热、呼吸道及胃肠道感染等); (5) 采样前 2 周内未服用抗生素或益生元等微生态制剂; (6) 自愿参加本研究并签署知情同意书。排除标准: 年龄小于 18 岁或大于 75 岁者; 为继发性肾脏疾病患者 (包括糖尿病肾病、系统性红斑狼疮肾炎、过敏性紫癜肾炎、乙型肝炎病毒相关性肾炎、肾淀粉

样变性、骨髓瘤性肾病等); 有其他严重疾病者; 于采样前 2 周内服用过抗生素或益生元等微生物生态制剂; 采样前 2 周内患有腹泻等胃肠道疾病。

1.2 主要试剂和仪器

CTAB 裂解酶, 诺莱博德公司; Lysozyme 溶菌酶溶液、RNA 消化酶, Tiangen 公司; Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer、Phusion[®] High-Fidelity DNA polymerase, New England Biolabs 公司; 核酸纯化试剂盒, Qiagen 公司; 引物, 上海欧易生物医学科技有限公司合成。梯度 PCR 仪、凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 电泳仪, 北京市六一生物科技有限公司; 微量分光光度计, Thermofisher 公司; MiSeq 测序仪器, Illumina 公司。

1.3 样本采集及 DNA 提取

患者入院确诊后, 在未经药物治疗时采集粪便标本, 并于同期采集健康对照组粪便标本, 留取清晨空腹的第 1 次新鲜粪便标本至少 5 g, 盛于无菌干燥便盒中, 编号后立即放置于-80 °C 冰箱保存备用。采用 CTAB 法提取样本 DNA, 检测 DNA 的浓度和纯度, 根据浓度, 用无菌水稀释样本 DNA 至 1 μg/μL。

1.4 PCR 扩增

使用带 barcode 的特异性引物 341F (5'-CCT ACGGGNGGCWGCAG-3')和 805R (5'-GACTAC HVGGGTATCTAATCC-3')、Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶 PCR 扩增 16S rRNA 基因 V3-V4 区。PCR 反应体系(50 μL): 10×KOD buffer 15 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 5 μL, 正、反向引物(6 μmol/L)各 1.5 μL, KOD 聚合酶(5 U/μL) 1 μL, 模板 DNA (ng/μL) 10 μL, ddH₂O 补足 50 μL。PCR 反应条件: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。

1.5 微生物多样性建库和测序

基于 Illumina Nova 测序平台测序, 构建

PCR-free 文库, 然后进行双末端(paired-end)测序。通过对 reads 拼接, 平均每样品测得 83 346 条 tags, 经过质控平均得到 76 167 条有效数据, 质控有效数据量达 51 156, 质控有效率达 61.33%。以 97%的一致性(identity)将序列聚类成为分类操作单元(operational taxonomic units, OTU), 共得到 937 个 OTU, 使用 Silva138 数据库对 OTU 序列进行物种注释。注释结果中, 共有 584 个 (62.33%) OTU 注释到属水平。根据物种注释情况, 进一步进行 α 多样性、β 多样性分析以及组间物种差异的比较, 揭示不同处理或环境下群落结构的差异特征。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 19.0 和 R-2.15.3 对实验数据进行整理分析。正态分布的计量资料用 $\bar{X} \pm SD$ 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较采用最小显著性差异法(least significant difference, LSD)检验, 非正态分布资料先行对数转换, 转换为正态分布资料后再行方差分析; 两组间比较采用两独立样本 *t* 检验, 非正态分布资料采用非参数检验; 计数资料用“率”(%)表示, 采用卡方检验; PCoA 统计方法为 ANOISM; 检验水准 $P=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 临床指标比较

我们招募了 10 例 IgAN 组患者、10 例 MN 组患者和 10 例健康对照组, 所有患者均经肾活检诊断。患者与健康对照组之间的年龄、性别和身体质量指数(body mass index, BMI)相匹配, IgAN 组患者的血清肌酐及血清 IgA 水平高于健康对照组, 血清白蛋白水平低于健康对照组; MN 组患者的血清白蛋白水平明显低于健康对照组, 60%的 MN 组患者血清抗 PLA2R 抗体阳性; IgAN 及 MN 组 24 h 尿蛋白高于健康对照组, 尤其 MN 组较明显(表 1)。

表 1 IgAN 组、MN 组和健康对照组的临床指标

Table 1 General data of IgAN, MN and healthy control group

Items	IgAN (n=10)	NC (n=10)	$t/\chi^2/W$	P	MN (n=10)	NC (n=10)	$t/\chi^2/W$	P
Age (year)	39.50±8.07	41.30±10.17	-0.438	0.666	50.10±8.17	41.30±10.17	1.790	0.090
Sex (male/female)	6/4	7/3	0.220	0.639	5/5	7/3	0.833	0.650
BMI (kg/m ²)	23.28±2.65	19.96±6.52	1.493	0.153	22.08±2.72	19.96±6.52	0.950	0.355
Cr (μmol/L)	81.97±49.31	61.60±6.50	83.500	0.104	69.97±17.77	61.60±6.50	1.399	0.179
IgA (g/L)	4.09±0.97	1.39±0.42	8.047	0.000	-	-	-	-
C3 (g/L)	0.96±0.17	1.26±0.11	-4.497	0.000	-	-	-	-
Proteinuria (g/24 h)	2.08±1.73	0.079±0.034	55.000	0.000	4.15±2.19	0.079±0.034	5.862	0.000
ALB (g/L)	35.73±6.62	45.79±1.45	-4.689	0.000	27.43±6.83	45.79±1.45	-8.322	0.000
eGFR (mL/(min·1.73 m ²))	99.61±10.47	107.86±3.33	-2.376	0.029	45.79±1.45	107.86±3.33	-1.553	0.138
Anti-PLA2R antibody positivity (RU/mL)	-	-	-	-	6 (60%)	0 (0)	-	-

t 表示 t 检验的统计值; χ^2 表示卡方检验的统计值; W 表示非参数检验的统计值. 正态分布的计量资料采用 t 检验; 非正态分布资料采用非参数检验; 计数资料采用卡方检验; -: 未检测

t represents the statistical value of t test; χ^2 represents the statistical value of chi-square test; W represents the statistical value of nonparametric test. t -test is used for the measurement data of normal distribution; nonparametric test is used for the non-normal distribution data; Chi-square test is used for the counting data; -: Not detected.

2.2 肠道菌群物种注释

通过与数据库 Silva138 比对进行物种注释, 对不同分类层级统计后发现共有 937 个 OTU, 其中, 能够注释到数据库的 OTU 数目为 927 (98.93%), 注释到界水平的比例为 98.93%, 门水平的比例为 92.42%, 纲水平的比例为 92.32%, 目水平的比例为 90.72%, 科水平的比例为 83.24%, 属水平的比例为 62.33%, 种水平的比例为 20.17. 3 组共享的 OTU 有 456 个, 其中 54 个是 IgAN 组患者唯一的, 106 个是 MN 组患者特异性的, 如图 1 所示。这意味着 IgAN 组患者和 MN 组患者的肠道菌群分布较健康对照组有所不同。

2.3 肠道菌群差异性

在门水平上, 3 组肠道微生物群以厚壁菌门 (*Firmicutes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、疣微菌门 (*Verrucomicrobia*) 为主; 在属水平上的优势物种为大肠杆菌志贺氏菌属 (*Escherichia-Shigella*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、粪杆菌

属 (*Faecalibacterium*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*) 以及巨单胞菌属 (*Megamonas*) (图 2)。与健康对照组比较, IgAN 组在门水平上, 变形菌门和放线菌门比例明显增加, 增加比率分别为 45.0% 和 36.6%; 在属水平上大肠杆菌-志贺氏菌和双歧杆

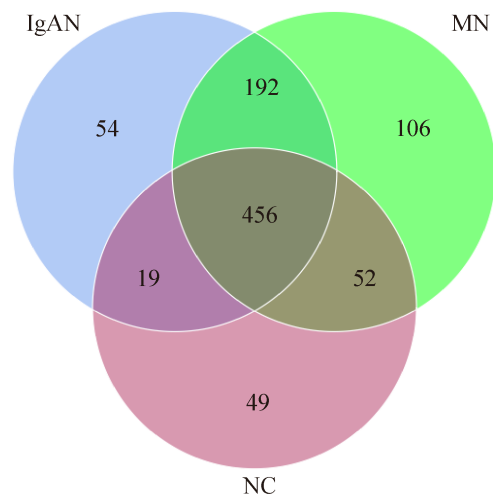


图 1 IgAN 组、MN 组和健康对照组 OTU 的韦恩图

Figure 1 Venn diagram of OTU in IgAN group, MN group and healthy control group.

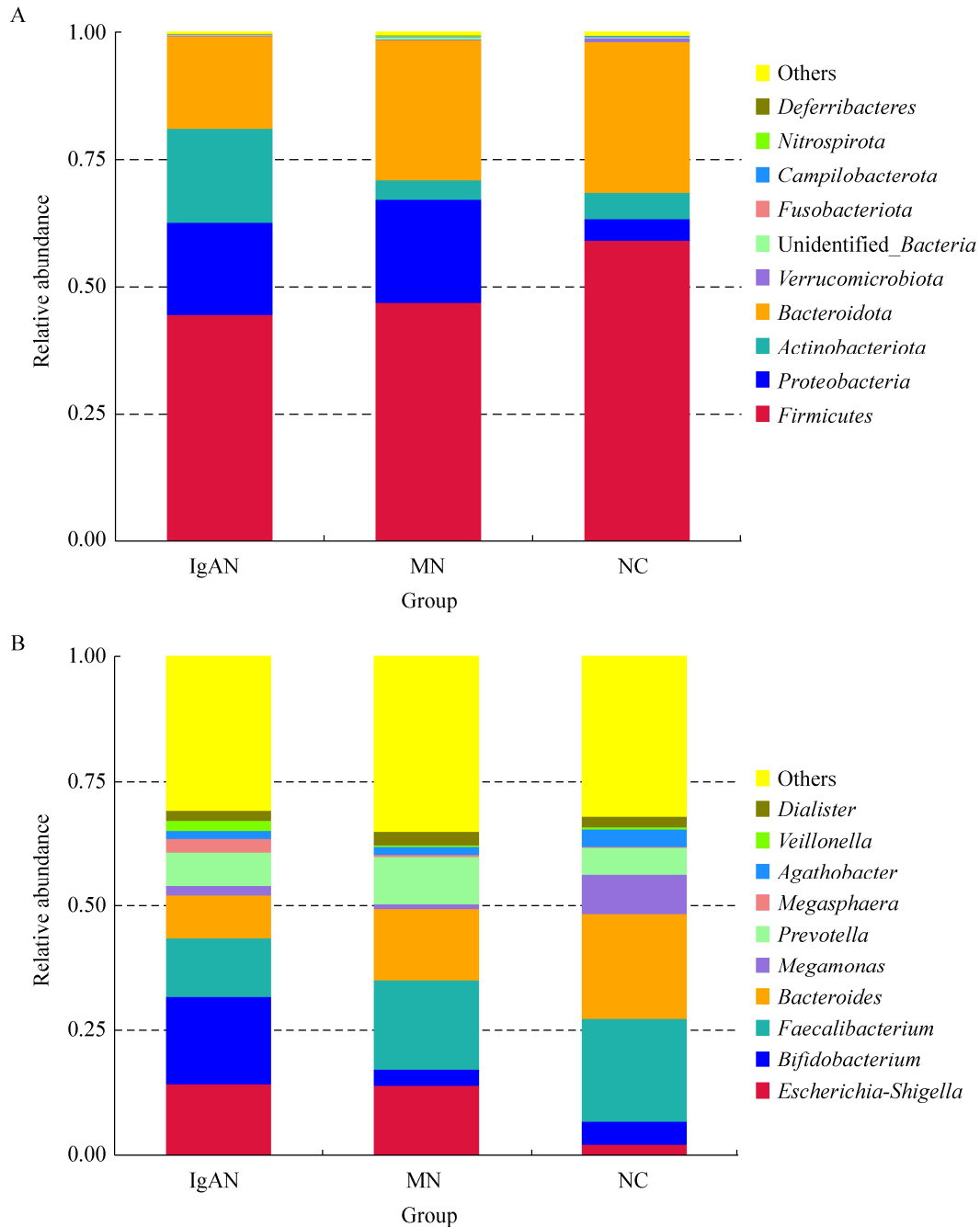


图 2 门水平(A)及属水平(B)上菌群相对丰度比较图

Figure 2 Comparison of relative abundance of phylum (A) and genus (B).

菌属明显丰富,增加比率分别为 67.1%和 37.2%,而粪杆菌属、拟杆菌属及巨单胞菌属丰度降低,降低比率分别为 18.6%、26.2%和 44.0%。与健康对照组相比, MN 组在门水平上变形菌门丰度

增加,增加比率为(50%);属水平上大肠杆菌-志贺氏菌丰度增加,增加比率为 65.7%;而双歧杆菌属、粪杆菌属、拟杆菌属和巨单胞菌属丰度降低,降低比率分别为 14.6%、11.3%、14.7%和 80.0%。

2.4 α 多样性分析

α 多样性分析结果显示, 肾病组丰富度指数低于健康对照组, 多样性指数高于健康对照组。物种数在 IgAN 和 MN 两组间具有显著差异 ($P=0.0173 < 0.05$)。测得的物种数在 IgAN 和 NC、MN 和 NC 两组间无显著差异 ($P > 0.05$)。Shannon 指数在 IgAN 和 MN、IgAN 和 NC、MN 和 NC 两组间无显著差异 ($P > 0.05$)。Simpson 指数在 IgAN 和 MN、IgAN 和 NC、MN 和 NC 两组间无显著差异 ($P > 0.05$)。Chao1 在 IgAN 和 MN 两组间具有显著差异 ($P=0.0422 < 0.05$), 在 IgAN 和 NC、MN 和 NC 两组间无显著差异 ($P > 0.05$)。所有样本的稀释曲线和等级聚类曲线均趋于平稳, 表明测序深度可以全面分析肠道微生物的组成(图 3A, 表 2)。

2.5 IgAN 组、MN 组及健康对照组 LEfSe 分析

通过对 IgAN 组、MN 组及 NC 组进行多级物种线性判别分析(LDA effect size, LEfSe), LDA 值 (LDA score) > 4 的菌群共有 14 个。在 IgAN 组中变形菌(*Proteobacteria*)、肠杆菌(*Enterobacteriales*)、 γ -原生细菌(*Gammaproteobacteria*)、肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)为差异菌属。在 MN 组中放线菌属(*Actinobacteriota*)、双歧杆菌(*Bifidobacteriales*)、双歧杆菌科(*Bifidobacteriaceae*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、放线菌(*Actinobacteria*)、大肠杆菌-志贺氏菌(*Escherichia-Shigella*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)为差异菌属, 差异具有统计学意义(图 4)。

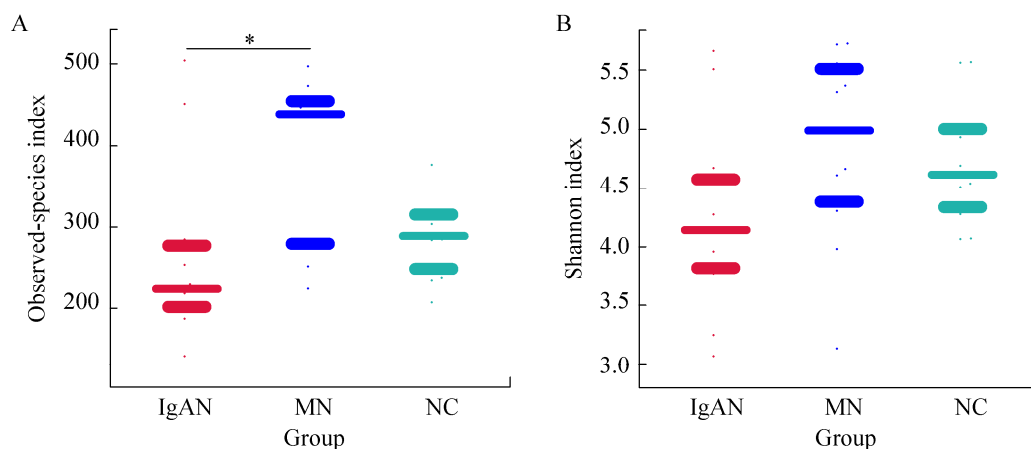


图 3 Observed-species 指数(A)及 Shannon 指数(B)组间差异蜜蜂群图

Figure 3 Bee colony diagram of Observed-species index (A) and Shannon index (B). * indicates significant difference between the two groups ($P < 0.05$), and ** indicates extremely significant difference between the two groups ($P < 0.01$).

表 2 IgAN 组、MN 组和健康对照组的 α 多样性分析($\bar{X} \pm SD$)

Table 2 Alpha diversity analysis of IgAN group, MN group and healthy control group

Group	Observed-species index	Shannon index	Simpson index	Chao1 index
IgAN ($n=10$)	267.30 \pm 117.890	4.25 \pm 0.85	0.85 \pm 0.08	274.28 \pm 1.50
MN ($n=10$)	378.90 \pm 105.378	4.84 \pm 0.86	0.87 \pm 0.09	412.48 \pm 1.41
NC ($n=15$)	310.70 \pm 104.830	4.72 \pm 0.55	0.89 \pm 0.05	310.38 \pm 1.22
<i>F</i> value	4.126	1.694	0.719	4.059
<i>P</i> value	0.027	0.203	0.496	0.029

Chao1 和 Observed 指数反映物种丰富度; Shannon 和 Simpson 指数反映物种多样性

Chao1 and Observed-index reflect species richness; Shannon and Simpson indices reflect species diversity.

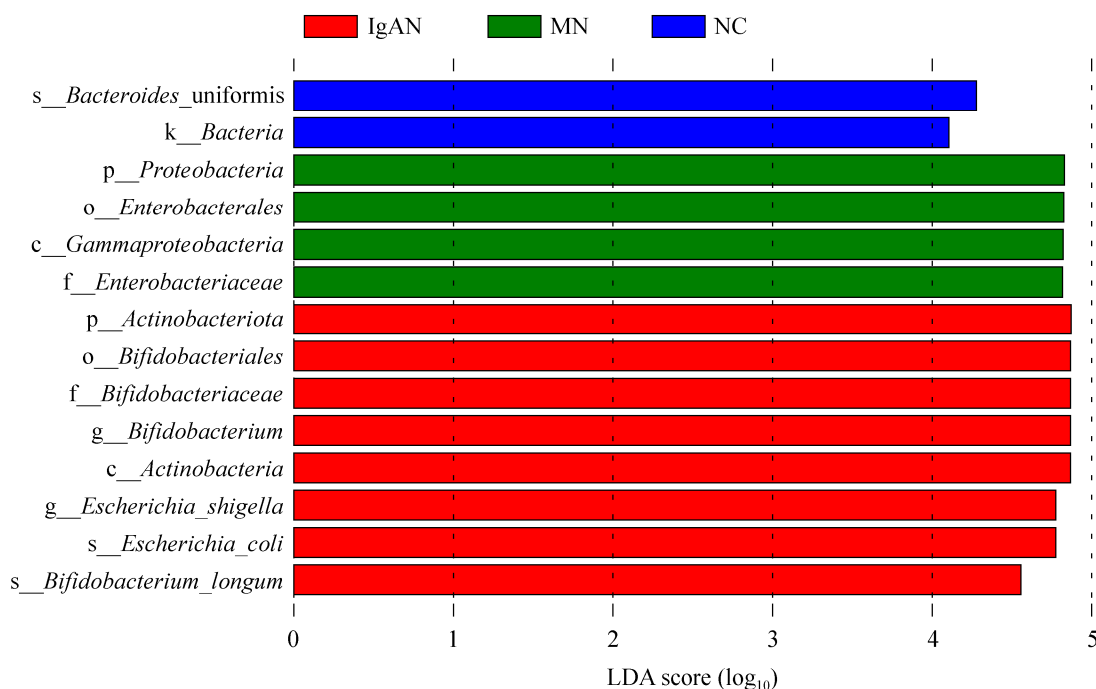


图4 LDA 值分布柱状图

Figure 4 Histogram of LDA value distribution.

2.6 β 多样性分析

基于 Unweighted UniFrac 距离来进行 PCoA 分析, 本研究结果发现, IgAN 组与健康对照组之间肠道菌群构成的差异具有统计学意义 (ANOISM, $R=0.19$, $P=0.013$), MN 组和健康对照组肠道菌群构成存在差异, 但结果不具有统计学意义 (ANOISM, $R=0.08$, $P=0.08$) (图 5)。

2.7 IgAN 组及 MN 组患者的差异性肠道菌群与临床指标的相关性

采用 Pearson 相关分析法进一步观察 IgAN 组和 MN 组患者具有显著差异性的肠道菌群与临床指标的相关性。在属水平上, 大肠杆菌志贺菌属与 24 h 尿蛋白 ($P=0.0019$) 呈正相关, 与血清白蛋白 ($P=0.0038$) 呈负相关; 双歧杆菌与 24 h 尿蛋白 ($P=0.016$) 和血清 IgA ($P=0.004$) 呈正相关; 拟杆菌属与肾小球滤过率 (estimated glomerular filtration rate, eGFR) ($P=0.047$) 呈正相关, 而与血清 IgA ($P=0.022$) 呈负相关; 不动杆菌与血清白

蛋白 ($P=0.044$)、血肌酐 ($P=0.036$) 呈正相关, 与 BMI ($P=0.005$) 呈负相关。MN 组大肠杆菌志贺菌属与 24 h 尿蛋白 ($P=0.0025$) 呈正相关, 与血清白蛋白 ($P=0.0059$) 呈负相关; 巨单胞菌属与 24 h 尿蛋白 ($P=0.049$) 呈负相关; 巨球形菌与 PLA2R ($P=0.088$) 呈负相关 (图 6)。

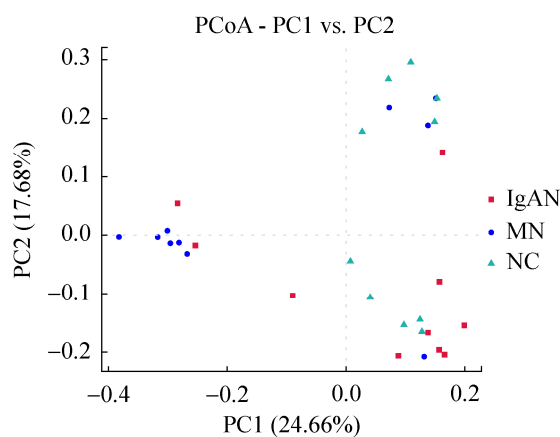


图5 非加权 UniFrac 距离的 PCoA 分析

Figure 5 Unweighted UniFrac PCoA analysis.

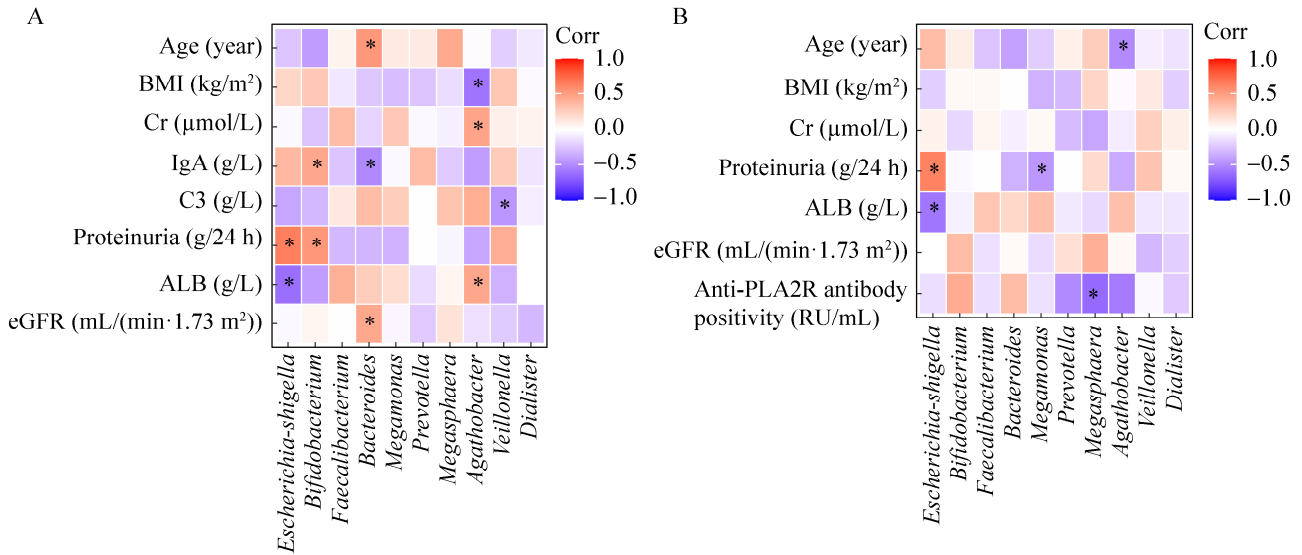


图6 IgAN组及MN组患者肠道菌群与临床指标的Pearson相关性分析 A: 在属水平上IgAN组患者肠道菌群与临床指标的Pearson相关性分析. B: 在属水平上MN组患者肠道菌群与临床指标的Pearson相关性分析. *: $P < 0.05$

Figure 6 Pearson correlation analysis of intestinal microbiota and clinical indicators in IgAN and MN patients. A: Pearson correlation analysis between intestinal microbiota and clinical indicators in IgAN patients at genus level. B: Pearson correlation analysis between intestinal microbiota and clinical indicators in MN patients at the genus level. *: $P < 0.05$.

3 讨论

本研究利用16S rRNA基因高通量测序方法对IgAN和MN这两种最常见的肾小球肾炎及健康人群的肠道微生物菌群进行了全面检测,结果显示,IgAN组和MN组患者的特征粪便微生物群的组成发生了改变,而且IgAN组和MN组患者之间的微生物群落不相似。

3.1 IgAN组患者肠道菌群变化分析

本研究发现,与健康对照组相比,IgAN组患者肠道菌群的丰富度指数及多样性指数均下降。在门水平上,IgAN组患者的放线菌门和变形菌门相对丰度显著增加,而厚壁菌门、拟杆菌门相对丰度显著降低;在属水平上,IgAN组患者的大肠杆菌-志贺氏菌、双歧杆菌属相对丰度显著增加,而粪杆菌属、拟杆菌属相对丰度显著

降低。早在2014年有研究发现^[11],IgAN组患者肠道菌群的丰富度指数及多样性指数均下降,而且肠道菌群中厚壁菌门丰度明显减少,与上述结果一致。厚壁菌门是特异性的产丁酸盐菌,其在抗肠道炎症方面的作用被广泛认识。产丁酸菌在肠道中产生丁酸,可以为结肠上皮细胞提供能量,可以通过发挥抗炎作用维持肠道健康^[12-13];同时影响调节性T细胞(Treg)作用,参与IgAN的发病机制^[14]。因此,本研究中产丁酸盐菌的减少可能参与IgAN发病,而IgAN组的拟杆菌门和拟杆菌属相对丰度减低,与Wu等^[15]结果一致。

本研究中,IgAN组患者显著增加的菌属是大肠杆菌-志贺氏菌和双歧杆菌。条件致病菌大肠杆菌-志贺氏菌的增加主要发生在糖尿病肾病^[16]和克罗恩病^[17]患者中,其可通过降低丁酸

盐的生物合成和增加氧化应激以穿透肠道上皮屏障,从而加剧肠道渗漏^[18]。双歧杆菌作为益生菌对健康有益,有提高机体免疫能力、增强细胞活性和抗感染功能,以及监视患者免疫功能的作用^[19]。但先前的一项研究表明双歧杆菌在免疫缺陷宿主中具有侵袭潜力^[20],另一项研究发现溃疡性结肠炎患者中的双歧杆菌丰度高于健康对照组^[21]。因此,本研究认为一些物种可能是疾病特异性的,需要进一步研究它们对肠道内稳态的影响。粪杆菌属的不足与炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)^[22]和肥胖^[23]有关。在体外,粪杆菌培养上清已被证明可以抑制核因子- κ B (nuclear transcription factor kappa B, NF- κ B)的激活,而 NF- κ B 的激活参与了 IgAN 的发病机制^[24]。

3.2 MN 患者肠道菌群变化分析

与健康对照组相比, MN 组患者的变形菌门、大肠杆菌-志贺氏菌的丰度增加。据报道,大肠杆菌-志贺氏菌可以产生脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)^[25],引发各种病理生理级联反应^[26]。高水平的 LPS 激活 NF- κ B 通路,导致促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 的产生^[27],与此一致的是,大肠杆菌的高丰度增加了促炎细胞因子如 TNF- α 和 IL-6 的循环水平,这些细胞因子的遗传多态性与 MN 的发病有关^[28]。

与健康对照组相比, MN 组患者的放线菌门、双歧杆菌属、疣微菌门、巨单胞菌属、粪杆菌属、拟杆菌属丰度减少。巨单胞菌属具有预防和治疗炎症相关疾病、类风湿性关节炎、心血管疾病的作用。粪杆菌属是目前新发现的一种肠道益生菌,其为短链脂肪酸的产生菌属和人体结肠中最重要的产丁酸菌。拟杆菌属为肠道优势菌种,具有提高机体免疫力^[29]、维持肠道菌群平衡^[30]等重要作用,有研究提示炎症性肠病患者肠道拟杆菌减少,而且在炎症活动期时表现得

为明显^[31]。

3.3 IgAN 组和 MN 组患者的差异性肠道菌群对相关临床指标影响及分析

本研究分析了临床生化指标与肠道菌群的关系,结果显示, IgAN 组中双歧杆菌、拟杆菌属与血清 IgA 显著相关,拟杆菌属与 eGFR 相关。进一步证实肠道菌群通过炎症因子、免疫蛋白影响 IgA 肾病的进展,而且肾病患者的肾小球滤过功能障碍,导致大量物质和毒素在体内蓄积,通过肠壁进入肠腔,造成肠道菌群失调^[32]。本研究结果显示,大肠杆菌志贺菌属、双歧杆菌与尿蛋白相关,这与 Chemouny 等^[33]的研究结果相似,该研究表明,粪便细菌负荷与蛋白尿相关,进一步证实了细菌引起黏膜感染导致的自身免疫反应在 IgAN 发病机制中的作用。本研究结果显示, MN 组中大肠杆菌志贺菌属和巨单胞菌属与 24 h 尿蛋白呈正相关;巨球型菌与 M 型磷脂酶 A2 受体(phospholipase A2 receptor, PLA2R)呈负相关。M 型磷脂酶 A2 受体(PLA2R)是导致膜性肾病的致病性靶抗原,在 MN 的诊断中特异性高,约 70%的 IMN 患者血清中可检测出 PLA2R 抗体,而本研究结果显示在 MN 组中巨球型菌与 PLA2R 显著相关,对于巨球型菌是否能作为 MN 的潜在诊断生物标志物,有待更多的证据进一步证实。

4 结论

本研究结果表明, IgAN 组和 MN 组患者的肠道微生物特征与健康对照组不同,并且从不同分类水平的变化中得到证明,这提示肠道微生物失调可能与 IgAN 和 MN 的发病机制有关,但这些特异性微生物是否可以作为 IgAN 和 MN 的潜在诊断生物标志物和治疗靶点,还需要更多更全面的实验研究来探讨。就本实验来说存在一定的局限性,首先,本研究入选样本量较少且性别比

例存在差异, 后续实验需要更大的队列, 以全面研究肠道微生物群的作用, 进一步验证这些发现; 其次, 本研究只分析了粪便微生物群, 这不能完全反映黏膜微生物群的特征。

REFERENCES

- [1] SATO D, SUZUKI Y, KANO T, SUZUKI H, MATSUOKA J, YOKOI H, HORIKOSHI S, IKEDA K, TOMINO Y. Tonsillar TLR9 expression and efficacy of tonsillectomy with steroid pulse therapy in IgA nephropathy patients[J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2012, 27(3): 1090-1097.
- [2] PURCHIARONI F, TORTORA A, GABRIELLI M, BERTUCCI F, GIGANTE G, IANIRO G, OJETTI V, SCARPELLINI E, GASBARRINI A. The role of intestinal microbiota and the immune system[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2013, 17(3): 323-333.
- [3] COPPO R. The gut-kidney axis in IgA nephropathy: role of microbiota and diet on genetic predisposition[J]. *Pediatric Nephrology*, 2018, 33(1): 53-61.
- [4] 李明, 余学清. IgA 肾病全基因组关联分析研究[J]. *中国实用内科杂志*, 2014, 34(3): 220-222.
LI M, YU XQ. Genome-wide association study in IgA nephropathy[J]. *Chinese Journal of Practical Internal Medicine*, 2014, 34(3): 220-222 (in Chinese).
- [5] HERLITZ LC, BOMBACK AS, STOKES MB, RADHAKRISHNAN J, D'AGATI VD, MARKOWITZ GS. IgA nephropathy with minimal change disease[J]. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 2014, 9(6): 1033-1039.
- [6] XIE JY, KIRYLUK K, WANG WM, WANG ZH, GUO SM, SHEN PY, REN H, PAN XX, CHEN XN, ZHANG W, LI X, SHI H, LI YF, GHARVI AG, CHEN NL. Predicting progression of IgA nephropathy: new clinical progression risk score[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38904.
- [7] COPPO R. The intestine-renal connection in IgA nephropathy[J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2015, 30(3): 360-366.
- [8] BOBART SA, de VRIESE AS, PAWAR AS, ZAND L, SETHI S, GIESEN C, LIESKE JC, FERVENZA FC. Noninvasive diagnosis of primary membranous nephropathy using phospholipase A2 receptor antibodies[J]. *Kidney International*, 2019, 95(2): 429-438.
- [9] AVERSHINA E, FRISLI T, RUDI K. *de novo* semi-alignment of 16S rRNA gene sequences for deep phylogenetic characterization of next generation sequencing data[J]. *Microbes and Environments*, 2013, 28(2): 211-216.
- [10] NOVAL RIVAS M, BURTON OT, WISE P, ZHANG YQ, HOBSON SA, GARCIA LLORET M, CHEHOUD C, KUCZYNSKI J, de SANTIS T, WARRINGTON J, HYDW ER, PETROSINO JF, GERBER GK, BRY L, OETTGEN HC, MAZMANIAN SK, CHATILA TA. A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2013, 131(1): 201-212.
- [11] ANGELIS MD, MONTEMURNO E, PICCOLO M, VANNINI L, LAURIERO G, MARANZANO V, GOZZI G, SERRAZANETTI D, DALFINO G, GOBBETTI M, GESUALDO L. Microbiota and metabolome associated with immunoglobulin A nephropathy (IgAN)[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99006.
- [12] GEIRNAERT A, CALATAYUD M, GROOTAERT C, LAUKENS D, DEVRIESE S, SMAGGHE G, de VOS M, BOON N, van de WIELE T. Butyrate-producing bacteria supplemented *in vitro* to Crohn's disease patient microbiota increased butyrate production and enhanced intestinal epithelial barrier integrity[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 11450.
- [13] ZHAO JB, LIU P, WU Y, GUO PT, LIU L, MA N, LEVESQUE C, CHEN YQ, ZHAO JS, ZHANG J, MA X. Dietary fiber increases butyrate-producing bacteria and improves the growth performance of weaned piglets[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(30): 7995-8004.
- [14] RUSZKOWSKI J, LISOWSKA KA, PINDEL M, HELENIAK Z, DĘBSKA-ŚLIZIEN A, WITKOWSKI JM. T cells in IgA nephropathy: role in pathogenesis, clinical significance and potential therapeutic target[J]. *Clinical and Experimental Nephrology*, 2019, 23(3): 291-303.
- [15] WU HW, TANG DE, ZHENG FP, LI SS, ZHANG XZ, YIN LH, LIU FN, DAI Y. Identification of a novel interplay between intestinal bacteria and metabolites in Chinese patients with IgA nephropathy via integrated microbiome and metabolome approaches[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2021, 9(1): 32.
- [16] TAO SB, LI LZ, MA L, FU P. fp511 understanding the gut-kidney axis among biopsy-proven diabetic nephropathy, type 2 diabetes mellitus and healthy controls: an analysis of the gut microbiota composition[J].

- Nephrology Dialysis Transplantation, 2019, 34(supplement_1): ggz106.FP511.
- [17] PASCAL V, POZUELO M, BORRUEL N, CASELLAS F, CAMPOS D, SANTIAGO A, MARTINEZ X, VARELA E, SARRABAYROUSE G, MACHIELS K, VERMEIRE S, SOKOL H, GUARNER F, MANICHANH C. A microbial signature for Crohn's disease[J]. Gut, 2017, 66(5): 813-822.
- [18] CROXEN MA, LAW RJ, SCHOLZ R, KEENEY KM, WLODARSKA M, FINLAY BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2013, 26(4): 822-880.
- [19] 胥振国, 蔡玉华, 刘修树, 范高福, 戴银. 双歧杆菌研究进展及应用前景[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(2): 215-220.
- XU ZG, CAI YH, LIU XS, FAN GF, DAI Y. Research progress and application prospect of *Bifidobacterium*[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2017, 30(2): 215-220 (in Chinese).
- [20] ESAIASSEN E, HJERDE E, CAVANAGH JP, SIMONSEN GS, KLINGENBERG C. Norwegian study group on invasive bifidobacterial infections. *Bifidobacterium* bacteremia: clinical characteristics and a genomic approach to assess pathogenicity[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2017, 55(7): 2234-2248.
- [21] FORBES JD, van DOMSELAAR G, BERNSTEIN CN. The gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1081.
- [22] SOKOL H, SEKSIK P, FURET JP, FIRMESSE O, NION-LARMURIER I, BEAUGERIE L, COSNES J, CORTIER G, MARTEAU P, DORÉ J. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2009, 15(8): 1183-1189.
- [23] TURNBAUGH PJ, BÄCKHED F, FULTON L, GORDON JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome[J]. Cell Host & Microbe, 2008, 3(4): 213-223.
- [24] LOUIS P, FLINT HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 294(1): 1-8.
- [25] WEXLER HM. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2007, 20(4): 593-621.
- [26] DARNAUD M, FAIVRE J, MONIAUX N. Targeting gut flora to prevent progression of hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Hepatology, 2013, 58(2): 385-387.
- [27] de VADDER F, KOVATCHEVA-DATCHARY P, ZITOUN C, DUCHAMPT A, BÄCKHED F, MITHIEUX G. Microbiota-produced succinate improves glucose homeostasis via intestinal gluconeogenesis[J]. Cell Metabolism, 2016, 24(1): 151-157.
- [28] CHEN SY, CHEN CH, HUANG YC, CHUANG HM, LO MM, TSAI FJ. Effect of IL-6 C-572G polymorphism on idiopathic membranous nephropathy risk in a Han Chinese population[J]. Renal Failure, 2010, 32(10): 1172-1176.
- [29] HOOPER LV. Bacterial contributions to mammalian gut development[J]. Trends in Microbiology, 2004, 12(3): 129-134.
- [30] SEARS CL. A dynamic partnership: celebrating our gut flora[J]. Anaerobe, 2005, 11(5): 247-251.
- [31] ZHOU YT, ZHI FC. Lower level of *Bacteroides* in the gut microbiota is associated with inflammatory bowel disease: a meta-analysis[J]. BioMed Research International, 2016, 2016: 5828959.
- [32] 唐余燕, 贺海东. 肠道菌群失调在 IgA 肾病发病机制中的研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2020, 40(5): 951-954.
- TANG YY, HE HD. Research progress of intestinal microbiota dysregulation in the pathogenesis of IgA nephropathy[J]. International Journal of Urology and Nephrology, 2020, 40(5): 951-954 (in Chinese).
- [33] CHEMOUNY JM, GLEESON PJ, ABBAD L, LAURIERO G, BOEDÉ E, le ROUX K, MONOT C, BREDEL M, BEX-COUDRAT J, SANNIER A, DAUGAS E, VRTOVSNIK F, GESUALDO L, LECLERC M, BERTHELOT L, BEN MKADDEM S, LEPAGE P, MONTEIRO RC. Modulation of the microbiota by oral antibiotics treats immunoglobulin A nephropathy in humanized mice[J]. Nephrology Dialysis Transplantation, 2019, 34(7): 1135-1144.