

## 基于16S rDNA测序的皮脂溢出患者肠道菌群分析

叶巧园<sup>1</sup>, 丁元林<sup>1</sup>, 朱 坚<sup>2</sup>, 江浩波<sup>2</sup>, 王 琳<sup>2\*</sup> (1. 广东医科大学, 广东东莞 523808; 2. 东莞东华医院, 广东东莞 523110)

**摘要:**目的 探讨皮脂溢出患者肠道菌群变化。方法 收集10例皮脂溢出患者(研究组)及10例健康对照者(对照组)粪便样本,提取菌群DNA,对V3-V4可变区进行扩增及文库构建,采用Illumina Miseq测序平台进行测序,对样本物种丰度和样本间门、科、属、种等水平上的差异进行统计分析,并用PICUSt软件预测差异功能通路。结果 研究组肠道微生物群落丰度、多样性相对降低。研究组梭杆菌门(*Fusobacteria*)、拟杆菌科(*Bacteroidaceae*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、布氏瘤胃球菌(*Ruminococcus bromii*)丰度显著降低,而肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、粪便杆菌属(*Faecalibacterium*)、普拉氏梭杆菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)、活泼瘤胃球菌(*Ruminococcus gnavus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)升高。5条功能通路(ATP结合盒转运蛋白、嘌呤代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、精氨酸生物合成、癌症中枢碳代谢)在两组间存在显著差异( $P<0.05$ )。结论 胃肠功能紊乱、抑郁与中年皮脂溢出可能有着密切关系。

**关键词:** 皮脂溢出; 肠道菌群; 16S rDNA

中图分类号: R758.73

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)04-0389-06

## Analysis of intestinal flora in seborrheic patients using 16S rDNA sequencing

YE Qiao-yuan<sup>1</sup>, DING Yuan-ling<sup>1</sup>, ZHU Jian<sup>2</sup>, JIANG Hao-bo<sup>2</sup>, WANG Lin<sup>2\*</sup> (1. Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 2. Donghua Hospital, Dongguan 523110, China)

**Abstract:**Objective To study the change of intestinal flora in seborrheic patients. Methods The fecal samples were collected from 10 seborrheic patients and 10 healthy controls. The V3-V4 variable region was amplified from extracted bacterial DNA, followed by library construction and Illumina Miseq sequencing. The Phyla, family, genus and species, as well as species abundance were compared between two groups. The functional pathways were predicted by PICUSt software. Results The species abundance and diversity of intestinal microflora were decreased in seborrheic patients. Compared with control group, the abundance of *Fusobacteria*, *Bacteroidaceae*, *Bacteroides*, and *Ruminococcus bromii* were lower, while *Enterobacteriaceae*, *Faecalibacterium*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus gnavus*, and *Escherichia coli* were higher in seborrheic patients. Five functional pathways (ABC transporters, purine metabolism, arginine and proline metabolism, arginine biosynthesis, and central carbon metabolism in cancer) were different between two groups ( $P<0.05$ ). Conclusion Gastrointestinal dysfunction and depression may be associated with seborrhea in middle-aged individuals.

**Key words:** seborrhea; intestinal flora; 16S rDNA

皮脂溢出是指在前额、鼻部、头皮、背部这些皮脂腺分布密集的部位油腻,其确切病因和发病机制尚未完全明了,有研究认为遗传因素及雄激素水平增高是导致皮脂腺分泌增加的核心因素<sup>[1-3]</sup>。皮脂腺细胞具有促肾上腺皮质激素释放激素、雄激素以及多种神经肽的多种受体<sup>[4-5]</sup>,精神刺激、某些疾病如抑郁症、肾上

腺肿瘤会使机体的皮脂分泌明显增加,糖尿病、动脉硬化、肥胖、乳腺癌、高脂饮食也可令皮脂分泌增加。肠道菌群失调可引起雄激素水平变化、脂质代谢紊乱,与肥胖、代谢综合征、生殖、妇科肿瘤等疾病有极为重要的关系<sup>[6-9]</sup>。为了解肠道菌群失调与皮脂溢出的联系,本研究基于16S rDNA测序的技术手段,对皮脂溢出患者及健康对照人群肠道菌群进行了初步分析。

### 1 资料和方法

#### 1.1 研究对象

纳入2019年10月-2020年4月东莞东华医院皮肤科收治的皮脂溢出患者10例(研究组),均符合以

基金项目:东莞市社会科技发展(一般)项目  
(No.2018507150461226)

收稿日期:2021-03-21; 修订日期:2021-05-10

作者简介:叶巧园(1981-),女,硕士,主治医师

通信作者:王 琳(1983-),女,硕士,主治医师, E-mail:

13688909256@qq.com

下纳入标准:面部皮肤和头发多脂、油腻鳞屑增多,同时伴有脂溢性皮炎、痤疮及毛囊炎;愿意配合研究收取合格的粪便标本;在东莞市定居超过2 a。同期随机抽取健康对照者10例(对照组),均符合以下标准:无皮脂溢出症状,在东莞定居超过2 a。两组均已排除以下人员:6个月内服用过糖皮质激素、抗生素、益生菌、免疫抑制剂、维甲酸类药物、中药者;哺乳期者;吸烟酗酒者;恶性肿瘤或严重内科疾病者;肠道疾病患者;有胃及下消化道手术史者。研究组中,男6例,女4例;年龄31~57岁,平均(44.7±5.2)岁。对照组中,男6例,女4例;年龄34~58岁,平均(45.9±5.9)岁。两组患者的性别、年龄差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 1.2 主要仪器及试剂

CR仪(美国Biorad公司)、QuantiFluor TM-ST定量仪(美国Promega)、Qubit 3.0(美国Life Invitrogen)、凝胶成像系统(美国Biorad公司)、冷冻高速离心机(德国Sigma)、核酸电泳仪(美国Biorad公司)、Illumina HiSeq测序平台(美国SeqHealth)。AxyPrep DNA凝胶提取试剂盒(美国Axygen Biosciences)、溴化乙锭(上海生工)、50×TAE电泳缓冲液(上海生工)、FastPfu高保真酶(美国NEB)、Illumina基因组DNA文库制备试剂盒(美国Illumina)。

### 1.3 粪便标本采集及DNA提取

受试人员在医院用粪便收集器采集新鲜粪便样本2~3 g,迅速放入-80℃环境中保存。采用CTAB或SDS方法对样本的基因组DNA进行提取,并对DNA的纯度和浓度进行检测。

### 1.4 16S rDNA基因扩增及高通量测序

根据测序区域的选择,使用带Barcode的特异引物和高保真DNA聚合酶对选定的V3-V4(上下游引物序列分别为5'-X-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3'和5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'可变区进行PCR扩增。PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,并对目标片段进行切胶回收,胶回收采用AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒(AXYGEN公司)。参照电泳初步定量结果,对PCR扩增回收产物用QuantiFluor TM-ST蓝色荧光定量系统(Promega公司)进行检测定量,按照每个样本的测序量要求,进行相应比例的混合。使用NEB Next® Ultra™DNA Library Prep Kit建库试剂盒进行文库构建。构建好的文库通过Agilent Bioanalyzer 2100和Qubit进行质检,文库质检合格后进行上机测序。

### 1.5 数据分析

对原始测序数据通过barcode分配reads,获取有效序列。运用Mothur软件对序列进行质量控制、过

滤、去除嵌合体,得到优化序列。通过USEARCH软件对序列进行分类单元(Operational Taxonomic Units)聚类,将序列相似度 $\geq 97\%$ 的序列归为同一OTU,然后通过OTU与数据库比对,对OTU进行物种注释。通过Alpha Diversity( $\alpha$ 多样性分析),Beta Diversity( $\beta$ 多样性分析),等数据分析手段,最终得到粪便菌群的物种丰度信息。采用独立样本 $t$ 检验(双侧)方法,对样本有效序列的群落丰富度指数和群落多样性指数进行比较分析。

## 2 结果

### 2.1 样本测序数据分析

从研究人群中获取20个粪便样本进行测序,其中研究组和对照组各10个样本。高通量焦磷酸测序共产生1 326 101条有效序列,其中,10个研究组样本共获得652 492条有效序列(平均每个样品序列数为65 249±381)。对照组10个样本获得673 609条有效序列(平均每个样品序列数为67 361±359)。

将测序得到的下机数据(Raw PE)进行拼接、质控及去嵌合体。得到 $Q_{20}$ 、 $Q_{30}$ 均在90%以上,表明质控数据良好,能够满足实验分析要求。通过Rarefaction Curve及Shannon曲线(图1~3),可以看出,样品

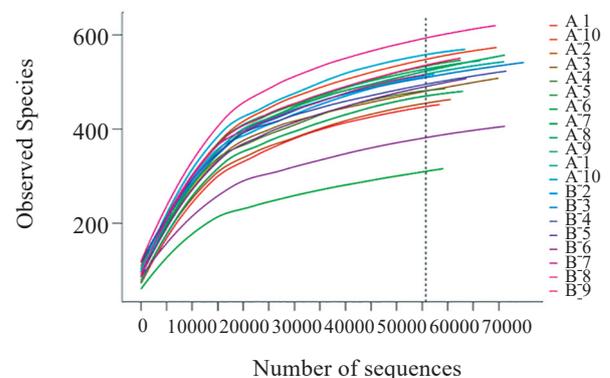


图1 RarefactionCurve 曲线

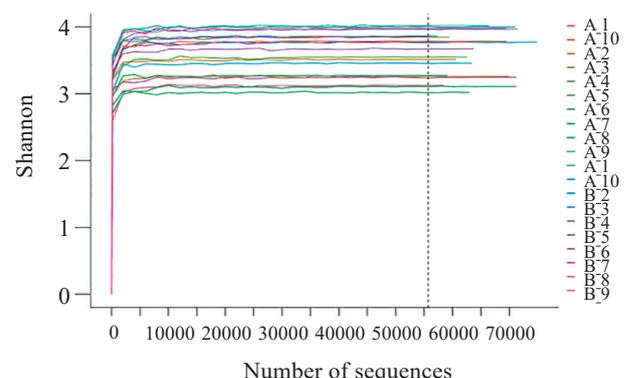


图2 Shanno 曲线

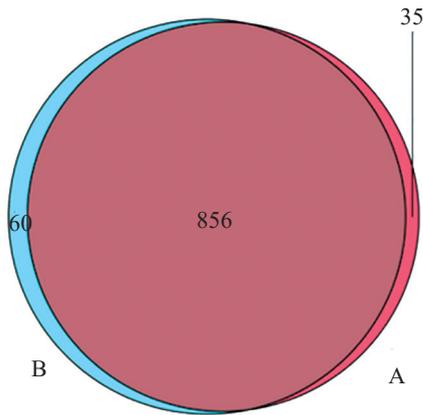


图3 研究组和对照组之间的OTUs组成

测序数据量合理,可以反映样本中绝大多数的微生物信息。图3显示研究组与对照组拥有856个相同OTUs,研究组、对照组特有的OTUs分别有35、60个。

2.2 肠道微生物α多样性分析

α多样性指标用于表征样品内的微生物群落多样性。α多样性指数包括 Observed species、ace、Chao、Shannon 和 Simpson 等5个指数。反映群落丰富度的 Observed species、ace 和 Chao 指数,以及反映群落多样性的 Shannon 和 Simpson 指数,研究组均低于对照组( $P < 0.05$ )。表1及图4~7显示研究组比对照组的肠道菌群群落丰富度和多样性均发生了一定变化。

2.3 肠道微生物β多样性分析

采用 weighted UniFrac 指数衡量β多样性。β多样性分析(β diversity)是用来比较物种多样性方面存在的差异大小。如果样品距离越接近,表示物种组成结构越相似,因此群落结构相似度高的样品倾向于聚集在一起,群落差异很大的样品则会远远分开。主坐标分析 PCoA 图显示,除个别样本存在偏差,研究组和对照组基本呈现在不同区域(图8)。

2.4 研究组与对照组间的细菌种群差异

采用 LefSe 分析法,进一步探讨各组间的分类区别。我们在研究组和对照组发现了48个差异显著的种群,所有这些分类群的 LDA 均大于2。与研究组样本相比,健康组中的细菌类群较丰富,有26条富集于健康组,20条富集于研究组(图9)。

2.5 门水平肠道菌群序列分类分析

在门水平上,厚壁菌门(*Firmicutes*)及拟杆菌门(*Bacteroidetes*)为绝对优势菌群,约占总序列数85%。研究组、对照组中肠道菌群物种丰度较高的厚壁菌门(*Firmicutes*, 74.51% vs 70.13%)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*, 10.43% vs 15.61%)、变形菌门(*Proteobacteria*, 11.64% vs 7.25%)、放线菌门(*Actinobacteria*, 3.31% vs 3.11%)差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。研究组中梭杆菌门(*Fusobacteria*)比对照组降低了84.5%(0.43% vs 2.78%,  $P < 0.05$ )(图10)。

2.6 科水平肠道菌群序列分类分析

在科水平上,螺旋藻科、瘤胃球菌科是相对优势

表1 研究组和对照组α多样性参数的比较

组别	n	Observed species	ace	chao1	shannon	simpson
对照组	10	916	644.272716	644.6306887	5.41908558	0.934222439
研究组	10	891	600.086531	599.1336158	4.975845811	0.907013265

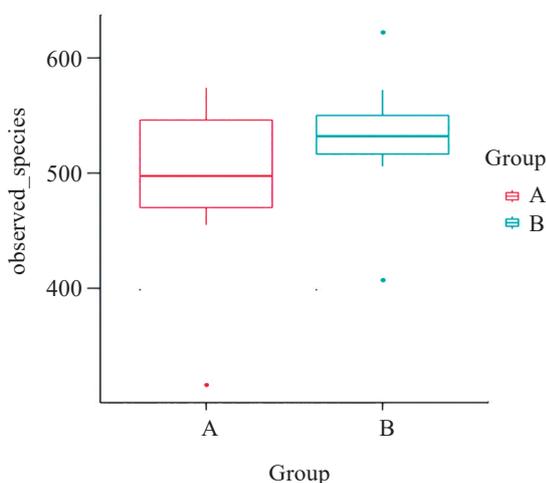


图4 Observed\_Species 指数

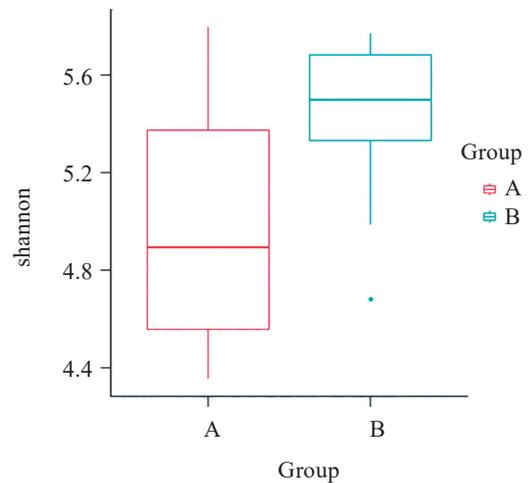


图5 Shannon 指数组间差异箱形图

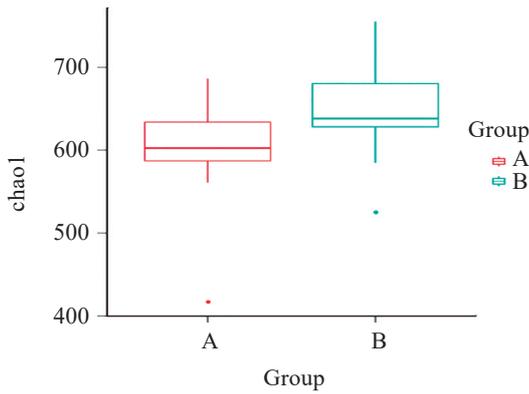


图6 Chao1 指数

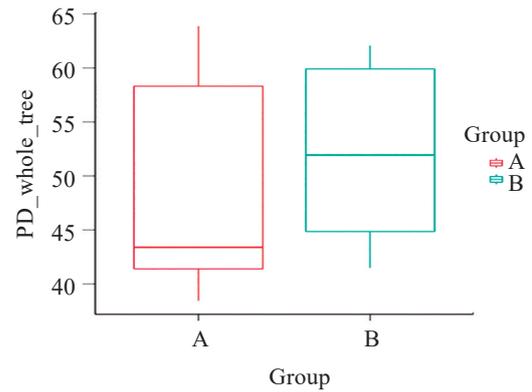


图7 PD\_whole\_tree 指数

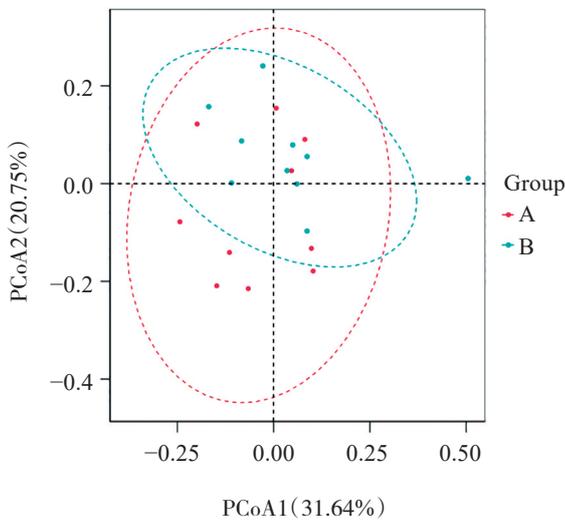


图8 基于 Weighted Unifrac 距离的PCoA 分析

菌群,约占总序列数 60%。与对照组相比,肠道菌群物种丰度较高的螺旋藻科 (*Lachnospiraceae*, 32.02% vs 32.11%)、瘤胃球菌科 (*Ruminococcaceae*, 28.61% vs 26.26%) 差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。研究组拟杆菌科 (*Bacteroidaceae*) 降低了 33.12% (7.46% vs 11.12%) 而肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 升高了 36.65% (10.15% vs 6.43%) (图 11)。

2.7 属水平肠道菌群序列分类分析

在属水平上,研究组粪杆菌属 (*Faecalibacterium*) 升高了 45.07% (18.25% vs 12.58%), 拟杆菌属 (*Bacteroides*) 降低了 32.91% (7.46% vs 11.12%), 而劳特氏菌属 (*Blautia*, 10.09% vs 9.95%)、罗斯氏菌属 (*Roseburia*, 6.19% vs 7.43%) 差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ) (图 12)。

2.8 种水平肠道菌群序列分类分析

在种水平上,研究组普拉氏梭杆菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*)、活泼瘤胃球菌 (*Ruminococcus gnavus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 分别升高了 45.07%

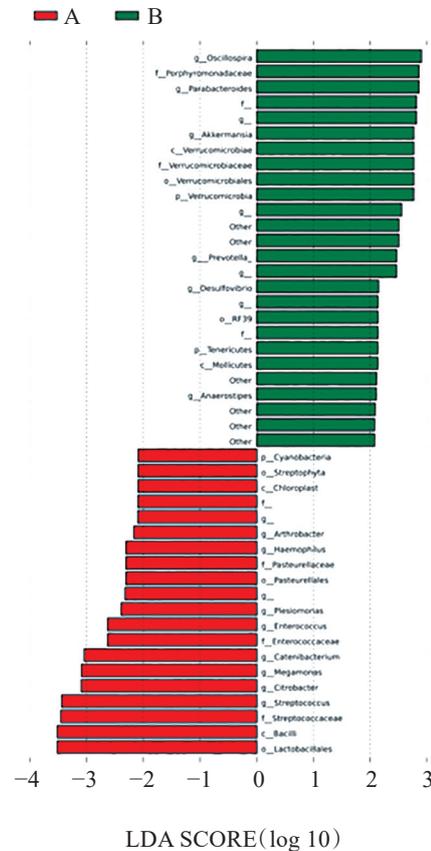


图9 LefSe 分析图

(18.25% vs 12.58%)、39.01% (3.35% vs 2.41%)、155.12% (3.98% vs 1.56%), 而布氏瘤胃球菌 (*Ruminococcus bromii*) 下降了 372.54% (0.51% vs 2.41%) (图 13)。

2.9 PICUSt 肠道菌群功能预测分析

采用 PICUSt 软件对 16S 测序样本中可能存在的各级 KEGG 通路及丰度值进行预测。研究组有 5 条通路与对照组差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ) (图 14), 分别为 ATP 结合盒转运蛋白 (ABC transporters)、嘌呤代谢 (Purine metabolism)、精氨酸和脯氨酸代谢 (Arginine and proline metabolism)、精氨酸生物合成 (Argi-

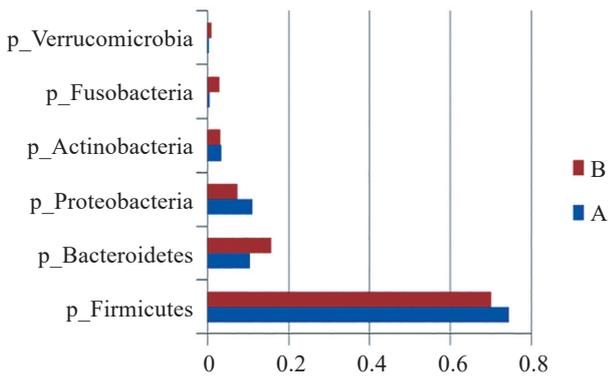


图10 门水平物种差异

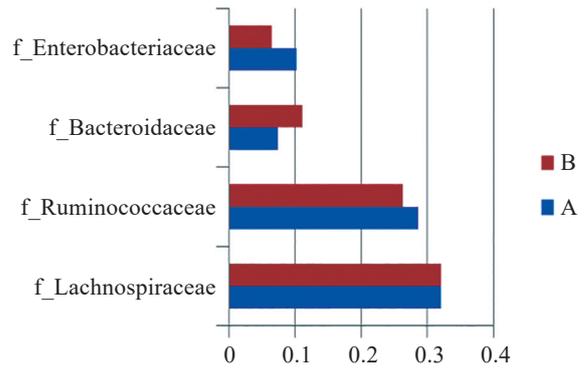


图11 科水平物种差异

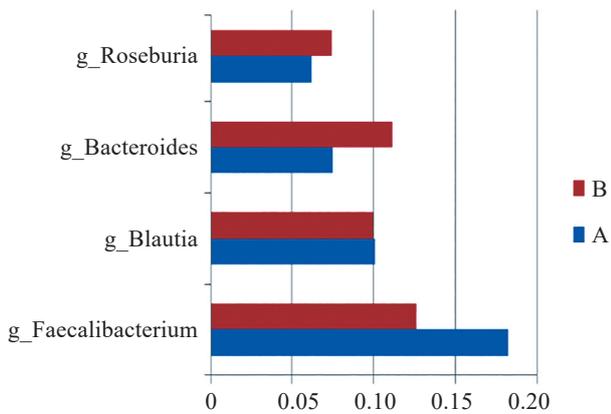


图12 属水平物种差异

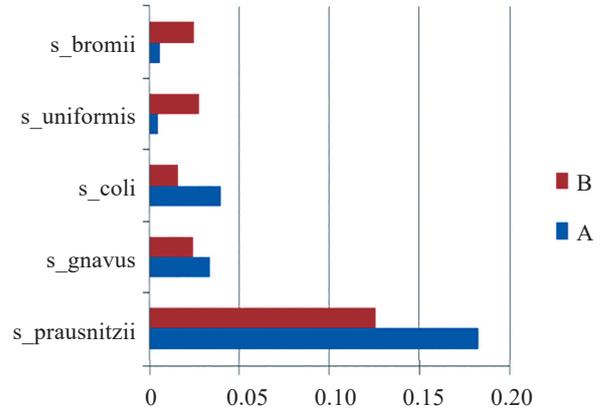


图13 种水平物种差异

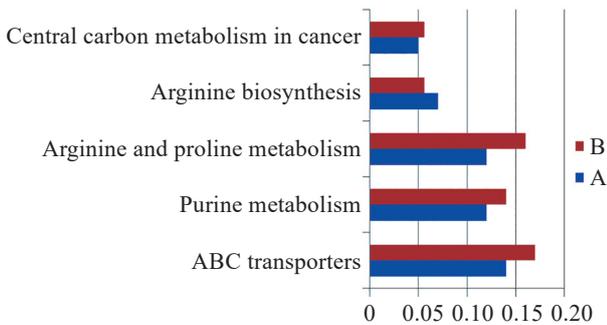


图14 差异通路图

nine biosynthesis) 和癌症中枢碳代谢(Central carbon metabolism in cancer)。

### 3 讨论

人体是由自身器官和微生物组成的超级生物体,微生物与宿主共同进化,并且与宿主之间不断地进行物质交换和信息交流,其中约有80%的微生物存在于肠道,参与了肠道营养物质的吸收、分布、代谢和排泄,微生物与宿主之间互相依存互相制约,处于一个动态平衡的状态。当肠道菌群发生改变,可引起肠道

吸收屏障的变化,引起肠道免疫系统的应答异常,从而参与多种疾病的发生及转归。肠道菌群根据对人体是否有益分为益生菌、有害菌。根据菌群代谢途径的特点,拟杆菌和瘤胃球菌属可主导蛋白质和动物脂肪的吸收,普氏菌属可提高糖类饮食的吸收<sup>[10]</sup>。根据疾病的发病结果来看,高丰度的拟杆菌门和硬壁菌可引起能量过度吸收,引起肥胖。高丰度拟杆菌、瘤胃球菌促进肠道炎症反应,而普拉梭菌、柔嫩梭菌可产生短链脂肪酸减少肠道炎症反应<sup>[11]</sup>。肠道益生菌减少,大肠杆菌增多,肠道革兰阴性菌增多、肠道菌群丰度降低与胰岛素抵抗有关<sup>[12]</sup>。

本文中,研究组的肠道菌群群落丰度和多样性均低于对照组,在门、科、属水平拟杆菌下降,表示肠道的蛋白质、脂肪以及能量吸收较对照组低。研究组的厚壁门/梭杆菌比值发生变化,说明皮脂溢出患者肠道处于病理炎症状态。但另外一方面普拉梭杆菌科升高,可产生较多短链脂肪酸,其中丁酸对肠道的有保护作用。闫慧敏等<sup>[13]</sup>对10位重度痤疮的青年患者(平均年龄24.4岁)进行16S测序结果显示厚壁门/拟杆菌比值正常,但产生丁酸盐的细菌减少,与本研

究结果恰好相反,这可能和选取的年龄阶段不一致有关,提示不同年龄阶段的皮脂溢出患者的发病原因不同。此外肠道内拟杆菌、瘤胃球菌增高的患者体内往往伴有更多的体内脂肪含量、高胰岛素血症以及血清甘油三酯和游离脂肪酸增高,肥胖、糖尿病和心血管疾病的风险增加,革兰阴性菌增加可引起胰岛素抵抗<sup>[14]</sup>。但本文结果相反,拟杆菌科下降,革兰阴性菌明显下降,提示不同基础病的皮脂溢出患者代谢通路存在差异。

革兰阴性菌丰度增加可产生大量的脂多糖,会引起肠黏膜通透性改变,产生内毒素,引起肝细胞损伤,同时脂多糖激活TLRs通路促进肝星状细胞(HSC)活化,从而导致炎症和纤维化,诱发肝硬化<sup>[15]</sup>。本文研究组的革兰阴性菌(梭杆菌门、拟杆菌属)显著下降,说明中年皮脂溢出患者的肠道中有绝对优势的革兰阳性菌群对肝脏有保护作用。但同时我们发现,研究组条件致病菌肠杆菌明显增加,肠杆菌科主要参与糖代谢,通过两条代谢途径,一方面产生有机酸,如琥珀酸、乙酸、乳酸、甲酸;另一方面代谢产生内生性的乙醇和丁二醇,对肝细胞有损伤作用。我们知道补充益生菌可抑制肠杆菌的滋生,所以我们推测中年皮脂溢出的患者,长期口服益生菌可抑制体内肠杆菌,保留了革兰阳性菌的优势,通过影响肠道菌群分布,可能会起到保肝作用。

厚壁门/拟杆菌的比值改变,肠杆菌增多,可引起肠道的炎症反应,消化道功能紊乱可影响锌、铜等微量元素吸收,当体内锌含量下降时,表皮脂类代谢障碍、表皮角化过度,皮脂分泌增多,同时嗜脂性糠秕马拉色菌繁殖增加;角质层屏障功能下降又会加重原有的皮脂溢出<sup>[16]</sup>。

我们采用PICUSt软件对16S测序样本中可能存在的各级KEGG通路及丰度值进行预测。研究组有5条通路与对照组存在差异,其中精氨酸和脯氨酸代谢通路也是抑郁症患者的肠道菌群高频代谢通路,说明不良情绪在中年皮脂溢出得发病中起着重要作用。肠道菌群通过多种途径与体内支配胃肠道的大脑神经系统发生相互作用,细菌通过直接或间接作用,参与合成激素和神经递质“脑-肠”作用,具体参与的肠道细菌种类以及代谢机理,需要进一步进行更为深入的代谢产物检测,采用大数据关联分析,以得出更为

准确、详尽的研究结果。

#### 参考文献:

- [1] 薛燕宁, 司海鹏, 谭城, 等. 皮脂腺癌7例临床及病理分析[J]. 临床皮肤科杂志, 2021, 50(3):150-153.
- [2] 蔡宛灵, 闫小宁, 杨雪圆. 脂溢性皮炎中西医结合治疗研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(29):3297-3302.
- [3] 钟彩梅, 郑秀芬, 黄桃源, 等. 宏基因组分析面部脂溢性皮炎的菌群变化[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2020, 27(4):241-246.
- [4] DIXON L J, WITCRAFT S M, MCCOWAN N K, et al. Stress and skin disease quality of life: the moderating role of anxiety sensitivity social concerns [J]. Br J Dermatol, 2018, 178(4):951-957.
- [5] 刘佳, 许德田, 王秀丽. 人皮脂腺细胞永生研究进展[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2020, 34(9):1087-1090.
- [6] 唐刚, 杜怡, 袁伟杰. 慢性肾脏病状态下肠道菌群失调对免疫及代谢的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2020, 36(11):881-884.
- [7] 孙锦程, 房立勇, 李祥, 等. 肠道菌群结构比例失调与结直肠癌的相互关系研究[J]. 现代医药卫生, 2019, 35(15):2353-2356.
- [8] 饶翀, 肖新华. 肠道菌群和脂代谢异常[J]. 中华临床医师杂志, 2016, 10(8):1053-1055.
- [9] 侯雪飞, 杨铮, 万崇华, 等. 大肠癌患者报告结局、生命质量与基因关系的初步探讨[J]. 广东医科大学学报, 2020, 38(5):543-546.
- [10] ARUMUGAM M, RAES J, PELLETIER E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome[J]. Nature, 2011, 473(7346):174-180.
- [11] ANGELBERGER S, REINISCH W, MAKRISTATHIS A, et al. Temporal bacterial community dynamics vary among ulcerative colitis patients after fecal microbiota transplantation[J]. Am J Gastroenterol, 2013, 108(10):1620-1630.
- [12] COTILLARD A, KENNEDY S P, KONG L C, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness[J]. Nature, 2013, 500:585-588.
- [13] 闫慧敏, 赵惠娟, 郭独一. 高通量测序分析重度寻常痤疮者和健康人肠道菌群差异[J]. 中华皮肤科杂志, 2017, 50(3):172-176.
- [14] LECHATELIER E, NIELSE N T, QIN J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers[J]. Nature, 2013, 500:541-546.
- [15] 沈峰, 范建高. 肠道菌群及宏基因组学与非酒精性脂肪性肝病研究现状[J]. 中华肝脏病杂志, 2013, 21(11):811-814.
- [16] ADEBAMOWO C A, SPIEGELMAN D, DANBY F W, et al. High school dietary dairy intake and teenage acne[J]. Am Acad Dermatol, 2005, 52:207-214.