

IgA 肾病肠道菌群变化的病例对照研究

田恬, 王怡, 韩世盛*

(上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院肾内科, 上海 200437)

摘要:目的 研究 IgA 肾病(IgAN)患者与健康人群(HC)肠道菌群的结构和多样性。方法 选取 2019 年 8 月—2020 年 2 月上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院及龙华医院肾内科门诊或住院患者, 病例组(IgAN 组)与健康对照组(HC 组)各 10 例。采用 16S rDNA 技术基于 Illumina NovaSeq 测序平台, 进行物种注释及丰度分析, 比较 2 组样本菌群构成和结构。结果 IgAN 组与 HC 组的肠道菌群结构存在显著差异。门分类水平, IgAN 组厚壁菌门的相对丰度较 HC 组显著增加, 拟杆菌门和放线菌门的相对丰度较 HC 组显著降低。属分类水平, IgAN 组中巨单胞菌属的相对丰度较 HC 组显著增加, 双歧杆菌属的相对丰度较 HC 组显著降低。结论 原发性 IgAN 患者的肠道菌群较健康人群发生显著变化, 可能是 IgAN 的潜在致病机制。

关键词: IgA 肾病; 肠道菌群; 16s rDNA 测序

中图分类号: R692 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-3882(2021)02-0086-05

DOI: 10.3969/j.issn.2096-3882.2021.02.002

Intestinal flora in patients with IgA nephropathy: a case control study

TIAN Tian, WANG Yi, HAN Shisheng*

(Department of Nephrology, Yueyang Hospital of Integrative Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200473, China)

Abstract: Objective To characterize intestinal flora in IgA nephropathy (IgAN) patients and healthy control (HC) subjects. **Methods** Patients with IgAN and healthy subjects who were admitted to Yueyang Hospital of Integrative Traditional Chinese and Western Medicine and Longhua Hospital were enrolled and divided into two groups ($n = 10$): an IgAN group and an HC group. Species annotation and abundance analysis were performed by 16S rDNA sequencing based on Illumina NovaSeq sequencing platform. The flora composition and structure of the two groups were compared. **Results**

The composition of intestinal flora was significantly different between the IgAN group and the HC group. At the level of phylum classification, the relative abundance of Firmicutes significantly increased in the IgAN group compared with the HC group, while the relative abundance of Bacteroidetes and Actinomycetes significantly decreased. On the level of genus classification, the number of Megamonas in the IgAN group significantly increased compared with the HC group, while the number of Bifidobacterium significantly decreased. **Conclusions** The intestinal flora in IgAN patients present significant changes compared with healthy subjects, which may be the underlying pathological mechanism of IgAN.

Key words: IgA nephropathy; intestinal flora; 16s rDNA sequencing

IgA 肾病 (immunoglobulin A nephropathy, IgAN) 是一种临床常见的原发性肾小球疾病, 发病具有地域性差异。我国 IgAN 约占原发性肾小球疾病的 35% ~ 55%^[1-2]。该疾病的临床表现为反复发作的肉眼或持续性镜下血尿, 伴有或不伴有不同程度的蛋白尿以及肾功能不全^[3]。IgAN 常见于青年人群, 多数患者在发病前合并呼吸道感染、肠道感染或皮肤感染病史。部分 IgAN 患者预后较差,

25% ~ 50% 患者进展至终末期肾衰竭^[4]。IgAN 的发病机制至今尚未阐明, 多数学者认为该病与异常糖基化 IgA 的形成及其在肾脏的沉积有关。遗传和环境因素可能是 IgAN 进展的原因^[5-6]。

研究表明, "肠-肾轴" 在 IgAN 的发生发展中发挥重要作用, 反复性感染可刺激黏膜产生免疫反应, 导致 IgA 产生, 因此被认为是 IgAN 的致病性触发因素。肠道菌群成为触发 IgAN 的潜在力量, 而

肠道菌群紊乱可能与 IgAN 的发病及进展密切相关。一项欧洲人群的研究表明,与健康人群比较,IgAN 患者双歧杆菌明显减少;相对于非进展型 IgAN,快速进展型 IgAN 患者的肠道微生物多样性极低,有害菌如大肠杆菌、放线菌等数量显著增加^[7]。因此,调节肠道菌群稳态可能是 IgAN 的潜在治疗方法之一。然而,中国人群 IgAN 患者的肠道菌群研究少有报道。本研究通过 16S rDNA 测序技术对原发性 IgAN 患者与健康人群的肠道菌群进行高通量测序分析,探讨我国 IgAN 患者肠道菌群的变化,为 IgAN 的治疗提供思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究为病例对照研究。选取 2019 年 8 月—2020 年 2 月上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院及龙华医院肾内科门诊或住院患者,病例组(IgAN 组)与健康对照组(HC 组)各 10 例。纳入标准:①经肾穿刺活检诊断符合 IgAN 的患者;②年龄 18~60 岁;③近期内未使用糖皮质激素或免疫抑制剂;④采集标本前 1 个月内未使用抗生素等影响肠道菌群的药物,以及乳果糖等影响粪便 pH 值的药物;⑤自愿参加本研究并签署知情同意书。排除标准:①患有肝硬化、系统性红斑狼疮、过敏性紫癜等疾病所致的继发性 IgAN;②心、肝等功能不全,或伴有其他脏器纤维化者;③慢性肾脏病 4~5 期患者。

1.2 样本采集 获取研究对象自然排出的新鲜粪便置于无菌弯盘,粪便样本不得混入尿液及其他异物,无菌棉签避开表面,挑取中心部分约 20 g 置入无菌冻存管,立即液氮速冻,−80℃低温冰箱冻存。

1.3 16S rDNA 测序 采用 SDS 法提取样本 DNA,然后利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度和浓度,再取适量样本 DNA 置于离心管中,使用无菌水稀释样本至 1 mg/L。以稀释后的基因组 DNA 为模板,使

用带 Barcode 的特异引物、High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer(New England Biolabs 公司)和高保真酶进行 PCR。扩增区域包括:16S rDNA V3-V4。使用 TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 进行文库构建,构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量。合格后,使用 NovaSeq6000 进行高通量测序。本研究测序委托武汉赛维尔生物科技有限公司执行。

1.4 生物信息分析 基于 Illumina Nova 平台,对所有序列进行操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)聚类分析,用 Mothur 方法按照 97% 的一致性对 OTUs 代表序列进行特种注释(设定阈值 0.8~1)。采用 α 多样性计算方法对 2 组肠道菌群的多样性指数进行分析。通过秩和检验方法检测不同分组间的差异物种。使用主坐标分析法(PCoA)和无度量多维标定法(NMDS)行组间和组内群落构成分析。通过线性判别(LEfSe 分析)评估差异物种的影响大小,即得到 LDA score,设置筛选值为 4。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。计量资料若符合正态分布则以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验分析;若不符合正态分布则以中位数(四分位数)表示,采用秩和检验比较。计数资料采用卡方检验分析。采用 R 软件分析 α 多样性,采用 Qiime 软件和 R 软件分析 β 多样性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 本研究中,IgAN 组和 HC 组各 10 例,均为中国汉族人群,2 组在年龄、性别、饮食习惯方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。肾功能检测血清尿素氮(Bun)、肌酐(Scr)和尿酸(UA)差异无统计学意义($P > 0.05$)。IgAN 组尿蛋白和尿红细胞较 HC 组显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

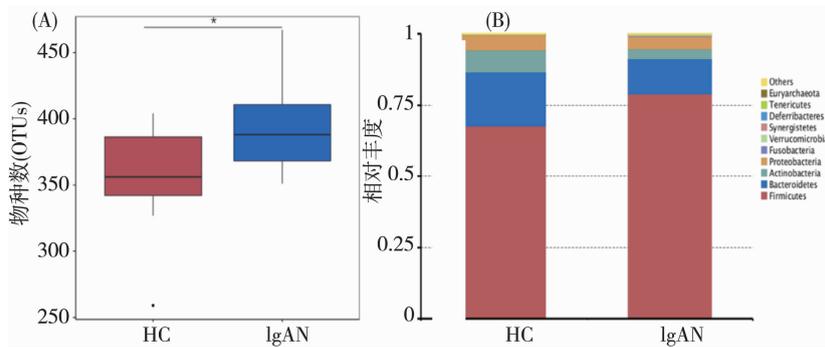
表 1 2 组患者一般特征及临床指标比较($n = 10$)

项目	HC 组	IgAN 组	<i>P</i>
性别(男/女)	3/7	3/7	1.00
年龄(岁)	42.70 ± 11.96	44.50 ± 8.54	0.70
Bun(mmol/L)	5.10 ± 1.42	5.01 ± 1.14	0.88
Scr(μmol/L)	63.48 ± 10.90	72.12 ± 14.18	0.14
UA(μmol/L)	368.50(315.00,394.00)	331.50(290.00,400.00)	0.76
尿蛋白(g/24h)	0.07 ± 0.04	1.51 ± 0.35	<0.05
尿红细胞(个/μl)	0.78 ± 0.68	8.22 ± 0.48	<0.05

2.2 肠道菌群物种注释 根据不同分类层级统计,共得到 750 个 OTUs,其中共注释 738 个 OTUs (98.40%)。结果显示,在门水平上占据主导地位的是厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、放线菌门 (Actinobacteria);在纲水平上占据主导地位的是梭菌纲 (Clostridia)、革兰阴性菌纲 (Negativicutes)、拟杆菌纲 (Bacteroidia);在目水平上的优势物种为梭菌目 (Clostridiales)、硝单胞菌目 (Selenomonadales)、拟杆菌目 (Bacteroidales);在科水平上的优势物种为韦荣氏球菌科 (Veillonellaceae)、毛螺旋菌科 (Lachnospiraceae)、瘤胃球菌科 (Ruminococcaceae);在属水平上的优势物种为巨单胞菌属 (Megamonas)、栖粪杆菌属 (Faecalibacteri-

um)、拟杆菌属 (Bacteroides);优势种为大肠埃希氏杆菌 (*Escherichia coli*)、假链状双歧杆菌 (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)、单形拟杆菌 (*Bacteroides uniformis*)。

2.3 α 多样性分析 结果显示,IgAN 组肠道菌群丰富度高于 HC 组 ($P < 0.05$) (见图 1A)。在门水平上,2 组样本均包含拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门和变形菌门。IgAN 组的厚壁菌门相对丰度较 HC 组显著增加,拟杆菌门和放线菌门的相对丰度较 HC 组显著降低 ($P < 0.05$) (见图 1B);在属水平上,2 组栖粪杆菌属均较为丰富。IgAN 组巨单胞菌属的相对丰度明显高于 HC 组,双歧杆菌属的相对丰度明显低于 HC 组 ($P < 0.05$)。

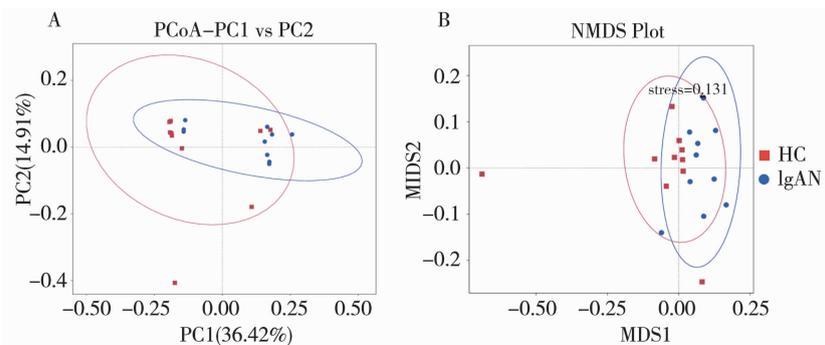


A. 物种数;B. 门水平菌群相对丰度比较

图 1 2 组间肠道菌群物种数及门水平相对丰度比较

2.4 β 多样性分析 为了研究 2 组肠道微生物菌群构成的差异,基于 Unifrac 距离的主坐标分析法 (PCoA) 及无度量多维标定法 (NMDS),降维分析 2 组间的 β 多样性。横坐标 PC1 为主成分 1,对总体菌群的代表性为 36.42%,纵坐标 PC2 为主成分 2,代表性为 14.91%。组内样本距离极近,而组间样

本距离明显高于组内,尽管 2 组间存在少量交叉,但结果仍提示组内样本相似性明显高于组间比较 (图 2A)。NMDS 分析显示,stress 值为 0.131,小于 0.2,提示本研究标本可以较为准确地反映两组间的差异程度 (图 2B)。



A. PCoA 结果;B. 基于 Unifrac 距离的 NMDS 结果

图 2 2 组肠道菌群基于 Unifrac 距离的 PCOA 和 NMDS 结果比较

2.5 组间差异性 肠道菌群 LEfSe 分析显示, IgAN 组与 HC 组肠道菌群结构之间存在显著差异。本研究中 LDA 值 >4 的菌群共有 8 个, 其中 IgAN 组巨单胞菌属为优势菌种, 相对丰度较高且差异有统计学意义 ($P < 0.05$); HC 组罗氏菌属 (*Roseburia*)、食

葡糖罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia inulinivorans*)、大肠埃希氏杆菌、不明肠杆菌科 (unidentified Enterobacteriaceae)、光冈菌属 (*Mitsuokella*)、拟杆菌科 (Bacteroidaceae)、拟杆菌属差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

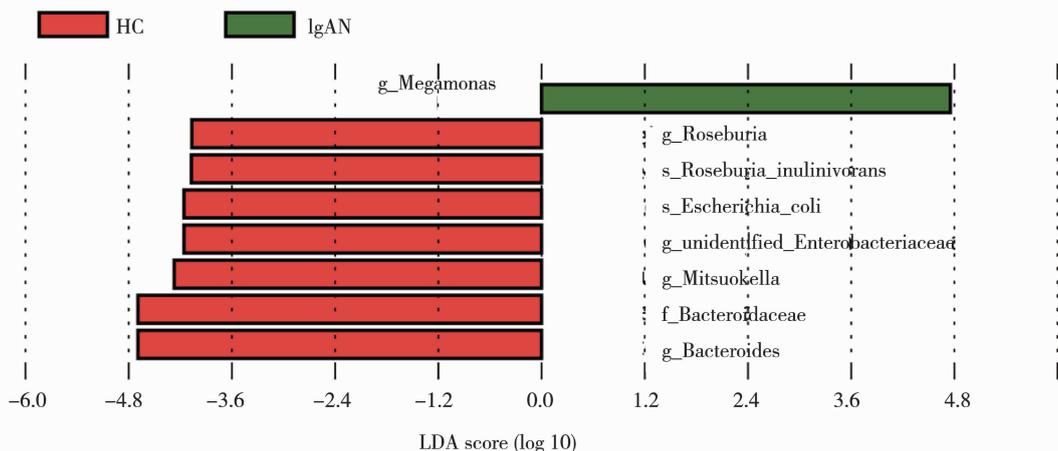


图3 2组肠道菌群的LEfSe分析

3 讨论

本研究通过临床病例 - 对照研究, 分析中国 IgAN 患者肠道菌群与疾病特征的相关性以及与健康人群的差异, 探索肠道微生态在 IgAN 发病中的可能机制。IgAN 常表现为黏膜感染后出现血尿或蛋白尿, 病理表现以系膜区 IgA 沉积为主要特征, 其确切发病机制至今仍不明确。有研究证实, IgAN 患者的肠道黏膜通透性较健康人群显著增加, 而肠道微生态对肠道免疫功能的维持具有重要作用, 肠道菌群失调可能破坏肠道黏膜屏障进而导致 IgAN 的发病。因此, 有学者提出“肠 - 肾关联”学说^[8-9]。最近一项研究表明, 在肠道回盲部靶向释放布地奈德治疗 IgAN 可有效降低蛋白尿, 提示保护肠道黏膜屏障在 IgAN 中获益^[10]。目前研究证实微生物损坏黏膜屏障, 诱导黏膜细胞分泌糖基化缺陷 IgA1, 即产生高水平半乳糖缺乏 IgA1 (galactose - deficient IgA1, Gd - IgA1), 继而进入血液循环形成免疫复合物沉积至肾脏而致病^[11], 但相关机制目前尚不清楚。而肠道菌群失调可能破坏肠道黏膜屏障, 导致肠道来源抗原侵入肠黏膜诱导黏膜免疫高反应性^[12], 因此我们猜测肠道菌群失调可能是 Gd - IgA1 分泌增加的重要始动因素, 也可能是未来重要的治疗切入点。

本研究通过 16S rDNA 高通量测序技术, 对 IgAN 患者与健康人群肠道菌群的菌落组成、丰度和差异进行比较分析。结果显示, 2 组的肠道菌群存在显著差异。门水平上, IgAN 组的厚壁菌门显著增加, 拟杆菌门和放线菌门相对丰度降低; 在属水平上 IgAN 组巨单胞菌属明显增高, 而双歧杆菌属则降低。拟杆菌门在人体肠道中主要参与脂肪、动物蛋白和各类氨基酸的代谢^[13], 双歧杆菌属等益生菌则有保护黏膜屏障和免疫增强的功效。

IgAN 发病机制与咽喉和肠道等黏膜感染有密切关联^[14]。一项对中国人群口腔唾液样本的菌群分析研究显示, IgAN 患者与健康受试者在韦荣球菌属、普雷沃氏菌属及颗粒链菌属存在明显差异^[15]。此外, 肠道菌群影响炎症肠病患者的黏膜炎症^[16]。研究显示, 对 83 名炎症性肠病患者进行肾活检, 发现 24% 的患者合并 IgAN^[17]。此外, 许多慢性肾脏病患者发生菌群失调, 表现为需氧菌群过度增殖, 双歧杆菌、类杆菌、乳杆菌等厌氧菌群明显减少^[18], 这与本研究结果类似。因此, 肠道菌群失调可能与 IgAN 的发病密切相关。

目前, 临床治疗 IgAN 时, 予以拮抗肾素 - 血管紧张素系统的降压药物作为基础治疗, 尚无针对 IgAN 病理机制的特异性治疗, 且疗效有限; 糖皮质激素被推荐用于进展型 IgAN, 且具有一定疗效, 但

严重不良反应较为明显^[19]。最近,一项国际多中心随机对照双盲研究 TESTING 及 STOP - IgAN 均提示,糖皮质激素及免疫抑制剂尽管可能有益于 IgAN 的临床缓解,然而治疗组严重不良事件较安慰剂组显著增加,尤其是重症感染^[20-21]。其他免疫抑制剂、鱼油、扁桃体切除术等治疗,目前也尚存在争议^[22-23]。因此,探寻有效安全的治疗 IgAN 药物成为临床上亟待解决的问题。本研究提示,调控肠道菌群,例如增加双歧杆菌和减少巨单胞菌属,可能是 IgAN 的潜在治疗选择。

本研究作为一项探索性研究,样本量小,未经过估算,因此统计效能较低,其证据说服力略有不足。因此,有必要进行大样本、多特征亚组人群的临床试验,以便验证肠道菌群在 IgAN 中的特征与致病机制。

综上所述,IgAN 患者与健康人群的肠道菌群构成差异显著,肠道菌群失调可能是 IgAN 致病因素之一。但目前相关研究较少,未来针对肠道菌群的研究和调控干预可能成为 IgAN 治疗新手段^[24]。

参考文献:

[1] Khwaja A. KDIGO Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney Injury [J]. 2012, 120(4):c179 - c184.

[2] Jiri M, Jan N, Zina M, et al. IgA nephropathy enigma [J]. Clin Immunol, 2016, 172:72 - 77.

[3] Thomas R, Laureline B, Alexandra C, et al. Molecular insights into the pathogenesis of IgA nephropathy [J]. Trends Mol Med, 2015, 21(12):762 - 775.

[4] Manno C, Strippoli GF, D'Itri C, et al. A novel simpler histological classification for renal survival in IgA nephropathy: a retrospective study [J]. Am J Kidney Dis, 2007, 49: 763 - 775.

[5] Glasscock RJ. The pathogenesis of IgA nephropathy [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2011, 20:153 - 160.

[6] Yu HH, Chu KH, Yang YH, et al. Genetics and immunopathogenesis of IgA nephropathy[J]. Clin Rev Allerg Immunol, 2011, 41: 198 - 213.

[7] Maria DA, Eustacchio M, Maria P, et al. Microbiota and metabolome associated with immunoglobulin A nephropathy (IgAN) [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(6): e99006.

[8] Rostoker G, Delchier J C, Marie - Thérèse C. Increased intestinal intra - epithelial T lymphocytes in primary glomerulonephritis: a role of oral tolerance breakdown in the pathophysiology of human primary glomerulonephritides? [J]. Nephrology Dialysis Transplantation, 2001, 16(3):513 - 517.

[9] Coppo R. The intestine - renal connection in IgA nephropathy [J]. Nephrology Dialysis Transplantation, 2014, 30(3): 360 - 366.

[10] Fellstrom BC, Barratt J, Cook H, et al. Targeted - release

budesonide versus placebo in patients with IgA nephropathy (NEFIGAN): a double - blind, randomised, placebo - controlled phase 2b trial [J]. Lancet,2017, 389(10084): 2117 - 2127.

[11] Suzuki H. Biomarkers for IgA nephropathy on the basis of multi - hit pathogenesis [J]. Clin Exp Nephrol,2019, 23(1): 26 - 31.

[12] He JW, Zhou XJ, Lv JC, et al. Perspectives on how mucosal immune responses, infections and gut microbiome shape IgA nephropathy and future therapies [J]. Theranostics, 2020, 10(25): 11462 - 11478.

[13] 臧凯丽,江岩,孙勇. 微生态制剂调节便秘、腹泻人群肠道菌群结构与产短链脂肪酸关键菌属的相关性 [J]. 食品科学, 2018,39(5):155 - 165.

[14] Nagasawa Y, Iio K, Fukuda S, et al. Periodontal disease bacteria specific to tonsil in IgA nephropathy patients predicts the remission by the treatment [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(1): e81636.

[15] Luan S, Zhang S, Zhong H, et al. Salivary microbial analysis of Chinese patients with immunoglobulin A nephropathy [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(3): 2219 - 2226.

[16] Distrutti E, Monaldi L, Ricci P, et al. Gut microbiota role in irritable bowel syndrome: new therapeutic strategies [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(7): 29 - 41.

[17] Ambruzs JM, Walker PD, Larsen CP. The histopathologic spectrum of kidney biopsies in patients with inflammatory bowel disease [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2014, 9(2): 265 - 270.

[18] 宋尚明,周生芬,郑功泉,等. 慢性肾功能衰竭患者肠道微生态变化及微生态制剂疗效观察 [J]. 内科急危重症杂志, 2001, 12(12): 72 - 82.

[19] 陈丁,吴杰,陈香美. IgA 肾病的治疗现状及进展 [J]. 北京医学, 2016, 38(03): 257 - 260.

[20] Lv J, Zhang H, Wong MG, et al. Effect of oral methylprednisolone on clinical outcomes in patients with IgA nephropathy: The TESTING randomized clinical trial [J]. JAMA, 2017, 318(5):432 - 442.

[21] Rauen T, Eitner F, Fitzner C, et al. Intensive supportive care plus immunosuppression in IgA nephropathy [J]. N Engl J Med, 2015, 373(23):2225 - 2236.

[22] Donadio JV, Grande JP. The role of fish oil/omega3 fatty acids in the treatment of IgA nephropathy [J]. Semin Nephrol, 2004, 24(3): 225 - 243.

[23] Liu LL, Wang LN, Jiang Y, et al. Tonsillectomy for IgA nephropathy: a meta - analysis [J]. Am J Kidney Dis, 2015, 65(1): 80 - 87.

[24] 王骞. IgA 肾病的中西医治疗进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(8): 898 - 902.

收稿日期:2020 - 08 - 31 修回日期:2020 - 12 - 11

本文编辑:郭昊