

· 论著 ·

基于 16S 核糖体 RNA 高通量测序的严重烧伤患者早期肠道菌群变化分析及代谢功能预测的前瞻性研究

郭在文¹ 宋明明¹ 章杰¹ 刘璐² 杨云稀¹ 邵一鸣¹ 李林斌¹ 孙炳伟¹¹南京医科大学附属苏州医院烧伤整形科 215002; ²江苏大学附属医院烧伤整形科, 镇江 212001

通信作者: 孙炳伟, Email: sunbinwei@hotmail.com

【摘要】 **目的** 基于 16S 核糖体 RNA (16S rRNA) 高通量测序分析严重烧伤患者早期肠道菌群变化并进行代谢功能预测。 **方法** 本前瞻性观察性研究将 2018 年 1 月—2019 年 12 月江苏大学附属医院烧伤整形科收治的 48 例符合入选标准的严重烧伤患者纳入烧伤组, 将同时期于江苏大学附属医院体检中心进行健康检查的符合入选标准的 40 名健康志愿者纳入健康组。收集烧伤组患者入院后 1 周左右的粪便标本及健康组志愿者体检当天粪便标本, 进行 16S rRNA V4 区基因测序, 分析各类菌属的相对丰度; 应用 Mothur 软件进行操作分类单元 (OTU) 划分, 分析优势菌群; 通过 QIIME1.9.0 软件分析粪便菌群 OTU 数目、Chao1 指数、Ace 指数、Shannon 指数; 采用 Canoco Software 5.0 对粪便菌群相对丰度做主成分分析; 采用京都基因和基因组数据库预测粪便菌群代谢功能。对数据行独立样本 *t* 检验、Mann-Whitney *U* 检验。 **结果** 烧伤组患者粪便中拟杆菌属、肠球菌属、不动杆菌属、巨球型菌属、葡萄球菌属相对丰度明显高于健康组志愿者 ($Z=-5.20, -2.37, -5.17, -4.41, -6.03, P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而健康组志愿者粪便中未分类的毛螺杆菌科、普氏菌属、盲杆菌属、未分类的瘤胃球菌科、假丁酸弧菌属、布劳特菌属、未分类的消化链球菌科 ($Z=-8.03, -3.21, -7.63, -5.88, -8.05, -8.05, -6.77, P<0.01$) 等 19 种菌属的相对丰度明显高于烧伤组患者。健康组志愿者粪便菌群多样性优于烧伤组患者, 其主要优势菌群为拟杆菌属、未分类的毛螺杆菌科、普氏菌属、未分类的肠杆菌科、布劳特菌属、副拟杆菌属和大肠志贺杆菌属等, 而烧伤组患者粪便主要优势菌群为拟杆菌属、普氏菌属、未分类的肠杆菌科和副拟杆菌属。烧伤组患者粪便菌群 OTU 数目、Ace 指数、Chao1 指数、Shannon 指数分别为 (149 ± 47) 个、 199 ± 45 、 190 ± 45 、 2.0 ± 0.9 , 显著少/低于健康组志愿者的 (266 ± 57) 个、 323 ± 51 、 318 ± 51 、 3.8 ± 0.5 ($t=10.325, 11.972, 12.224, 11.662, P<0.01$)。健康组志愿者和烧伤组患者粪便菌群相对丰度在主成分 1 被清晰地区分为 2 个群体, 主成分 1 贡献率为 32.50%, $P<0.01$; 健康组志愿者粪便菌群在主成分 2 上较为集中, 烧伤组患者粪便菌群在主成分 2 上散布较大, 主成分 2 贡献率为 13.44%, $P>0.05$ 。烧伤组患者粪便菌群氨基酸中丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸-精氨酸-脯氨酸-半胱氨酸-蛋氨酸-甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸-苯丙氨酸-色氨酸-酪氨酸以及碳水化合物中三羧酸循环、果糖和甘露糖、半乳糖、酵解/糖异生、淀粉和蔗糖代谢水平显著低于健康组志愿者 ($Z=-4.75, -4.54, -4.75, -4.62, -3.71, -3.28, -4.19, -3.82, -4.72, -4.35, -4.75, -4.71, P<0.01$), 硫辛酸代谢和辅酶 Q 合成水平明显高于健康组志愿者 ($Z=-6.07, -4.51, P<0.01$), 花生四烯酸代谢水平与健康组志愿者相近 ($P>0.05$)。 **结论** 基于 16S rRNA 高通量测序得出, 严重烧伤患者早期肠道菌群和健康人群存在明显差异, 烧伤患者肠道菌群种类减

DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200916-00414

本文引用格式: 郭在文, 宋明明, 章杰, 等. 基于 16S 核糖体 RNA 高通量测序的严重烧伤患者早期肠道菌群变化分析及代谢功能预测的前瞻性研究 [J]. 中华烧伤杂志, 2021, 37(12): 1122-1129. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200916-00414.

Guo ZW, Song MM, Zhang J, et al. Prospective study on the analysis of intestinal microflora changes and prediction on metabolic function in severe burn patients at early stage by 16S ribosomal RNA high-throughput sequencing [J]. Chin J Burns, 2021, 37(12): 1122-1129. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200916-00414.



少,多样性降低,营养代谢水平降低。

【关键词】 烧伤; 高通量核苷酸测序; 肠道菌群; 菌群多样性; 16S核糖体RNA; 营养与代谢

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81772135、82072217);江苏省社会发展重点项目(BE2017695);江苏省苏州市科技计划(sys2018086)

Prospective study on the analysis of intestinal microflora changes and prediction on metabolic function in severe burn patients at early stage by 16S ribosomal RNA high-throughput sequencing

Guo Zaiwen¹, Song Mingming¹, Zhang Jie¹, Liu Lu², Yang Yunxi¹, Shao Yiming¹, Li Linbin¹, Sun Bingwei¹

¹Department of Burns and Plastic Surgery, Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou 215002, China; ²Department of Burns and Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China

Corresponding author: Sun Bingwei, Email: sunbinwe@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To analyze the changes of intestinal microflora and to predict the metabolic function of intestinal microflora in severe burn patients at early stage by 16S ribosomal RNA (rRNA) high-throughput sequencing. **Methods** In this prospective observational study, 48 patients with severe burns who met the inclusion criteria were admitted to Department of Burns and Plastic Surgery of Affiliated Hospital of Jiangsu University from January 2018 to December 2019 were included in burn group, and 40 healthy volunteers who met the inclusion criteria and underwent physical examination at the Physical Examination Center of Affiliated Hospital of Jiangsu University in the same period were included in healthy group. Fecal samples were collected from patients in burn group in about 1 week after admission and from volunteers in healthy group on the day of physical examination. The 16S rRNA V4 gene sequencing was performed in the feces of patients in burn group and volunteers in healthy group to analyze the relative abundance of various bacteria. The operational classification unit (OTU) was divided by Mothur software to analyze the dominant bacteria. The OTU number, Chao1 index, Ace index, and Shannon index of fecal microflora were analyzed by QIIME1.9.0 software. The principal component analysis for relative abundance of fecal microflora was performed by Canoco Software 5.0. The metabolic function of fecal microflora was predicted by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Data were statistically analyzed with independent sample *t* test, and Mann-Whitney *U* test, and Bonferroni correction. **Results** The relative abundance of *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Macrococcus*, and *Staphylococcus* in feces of patients in burn group was significantly higher than that of volunteers in healthy group ($Z=-5.20, -2.37, -5.17, -4.41, -6.03, P<0.05$ or $P<0.01$), and the relative abundance of *unclassified-Helicobacillae*, *Prevotella*, *Cecobacteria*, *unclassified-Rumencocci*, *Pseudobutyribrio*, *Brautia*, and *unclassified-Digestive Streptococcaceae* ($Z=-8.03, -3.21, -7.63, -5.88, -8.05, -8.05, -6.77, P<0.01$) and other 12 species of bacteria in the feces of volunteers in healthy group was significantly higher than that of patients in burn group. The diversity of fecal microflora of volunteers in healthy group was better than that of patients in burn group, the main dominant microflora of volunteers in healthy group were *Bacteroides*, *unclassified-Helicobacillae*, *Prevotella*, *unclassified-Enterobacteriaceae*, *Brautia*, *Parabacteroides*, *Escherichia coli*, etc., and the main dominant microflora of patients in burn group were *Bacteroides*, *Prevotella*, *unclassified-Enterobacteriaceae*, and *Parabacteroides*. The OTU number, Ace index, Chao1 index, and Shannon index of fecal microflora of patients in burn group were $149\pm 47, 199\pm 45, 190\pm 45, 2.0\pm 0.9$, which were significantly lower than $266\pm 57, 323\pm 51, 318\pm 51, 3.8\pm 0.5$ of volunteers in healthy group ($t=10.325, 11.972, 12.224, 11.662, P<0.01$). The relative abundance of fecal microflora of patients in burn group and volunteers in healthy group was clearly divided into two groups by principal component 1, and the contribution rate of principal component 1 was 32.50%, $P<0.01$. The fecal microflora of volunteers in healthy group were more concentrated on principal component 2, the fecal microflora of patients in burn group were dispersed in principal component 2, and the contribution rate of principal component 2 was 13.44%, $P>0.05$. The metabolic levels of alanine-aspartate-glutamate, arginine-proline, cysteine-methionine, glycine-serine-threonine, phenylalanine, tryptophan, and tyrosine in amino acid, tricarboxylic acid cycle, glucose and mannose, galactolipin, glycolysis/gluconogenesis, starch and sucrose in carbohydrate of fecal microflora of patients in burn group were significantly lower than those of volunteers in healthy group ($Z=-4.75, -4.54, -4.75, -4.62, -3.71, -3.28, -4.19, -3.82, -4.72, -4.35, -4.75, -4.71, P<0.01$). The levels of lipoic acid metabolism and coenzyme Q synthesis of fecal microflora of patients in burn group were significantly higher than those of volunteers in healthy group ($Z=-6.07, -4.51, P<0.01$). The metabolic level of arachidonic acid of fecal microflora of patients in burn group was similar to that of volunteers in healthy group ($P>0.05$). **Conclusions** There are significant differences in intestinal

microflora between severe burn patients at the early stage and healthy people, and the species and diversity of microflora are decreased, and the nutrient metabolism level is decreased in burn patients by 16S rRNA high-throughput sequencing.

【Key words】 Burns; High-throughput nucleotide sequencing; Intestinal microflora; Microbial diversity; 16S ribosomal RNA; Nutrition and metabolism

Fund program: General Program of National Natural Science Foundation of China (81772135, 82072217); Key Project of Social Development of Jiangsu Province of China (BE2017695); Science and Technology Planning Project of Suzhou of Jiangsu Province of China (sys2018086)

肠道微生态对机体营养物质代谢、发育、免疫及疾病的产生等均起到极其重要的作用^[1-3]。严重烧伤后肠道内微生物和 LPS 可通过受损的肠黏膜屏障侵入到体循环,导致细菌易位和内毒素血症^[4]。与轻度烧伤患者相比,重度烧伤患者肠道菌群中肠杆菌科类的“有害菌”比例显著升高。一般认为,核糖体 RNA(rRNA)基因广泛存在于所有细胞生物体中,由于很少发生大规模的横向基因迁移或基因突变,适合用于微生物分类信息的确定。原核生物(细菌、古菌)rRNA 按核酸的沉降系数分类可分为 3 种,即 5S、16S 和 23S。16S rRNA 基因存在于所有细菌染色体基因组中,参与生物蛋白质的合成过程,并在生物进化的漫长历程中保持一定的遗传保守性,是细菌系统分类研究中最有用和最常用的分子标记^[5]。16S rRNA 编码基因序列 V4~V6 区数据库信息全、特异性好,是细菌多样性分析的常用目标区域。随着高通量测序技术的不断发展和参考数据库的不断更新,利用核糖体操纵子作为 DNA 标记可以揭示不同生态系统中的微生物多样性和组成^[6]。本研究旨在通过 16S rRNA 高通量测序,比较 48 例严重烧伤患者伤后早期和 40 名健康志愿者肠道微生物菌群种类及代谢功能差异,初步揭示严重烧伤早期肠道微生态的变化。

1 对象与方法

本前瞻性观察性研究经江苏大学附属医院生物医学研究伦理委员会批准,批号:SWYXLL20170925,烧伤患者和健康志愿者均签署知情同意书。

1.1 主要试剂与仪器来源

粪便 DNA 快速提取试剂盒购于德国 QIAGEN 公司,GoTaq[®]热启动混合母液高效高保真酶购于美国 Promega 公司。Qubit3.0 型荧光定量检测仪购于美国 Molecular Device 公司,Illumina MiSeq 型基因测序仪购于美国 Illumina 公司,OneDrop OD-1000 型紫外/可见分光光度计购于南京五义科技有限公司。

1.2 研究对象入选标准

烧伤患者纳入标准:(1)年龄 18~75 岁,性别不

限;(2)热液及火焰烧伤;(3)符合严重烧伤诊断标准,包括烧伤总面积>50%TBSA 或Ⅲ度烧伤面积>20%TBSA;(4)伤后 24 h 内入院。排除标准:(1)合并严重心、肺、肝、肾、神经系统疾病,有肠道基础疾病,或明确有其他系统恶性肿瘤、糖尿病、自身免疫性疾病者;(2)有明显的精神障碍、癫痫等症状者;(3)研究者判断不能完成或不宜参加本研究者。

健康志愿者纳入标准:(1)饮食正常,无吸烟、饮酒等,每日排便 1 次或 2 次;(2)3 个月内无抗生素服用史;(3)无严重心、肺、肝、肾、神经系统疾病,无肠道基础疾病,无其他系统恶性肿瘤、糖尿病、自身免疫性疾病者;(4)无明显精神障碍、癫痫等。

1.3 研究对象资料和标本采集

将 2018 年 1 月—2019 年 12 月江苏大学附属医院烧伤整形科收治的 48 例符合入选标准的严重烧伤患者纳入烧伤组,其中男 31 例、女 17 例,年龄(42±4)岁,烧伤总面积(79±10)%TBSA,Ⅲ度烧伤面积(28±7)%TBSA。观察期间严重烧伤患者进行烧伤常规治疗,患者伤后不同阶段应用不同抗生素,并根据创面分泌物或血细菌培养结果及药物敏感试验结果进行调整。烧伤总面积>50%TBSA 患者休克期予以禁食,以肠外静脉营养为主,随后逐步恢复流质饮食,减少静脉营养量,随着病情的稳定逐渐过渡到普通饮食。采集患者入院后 1 周左右的粪便标本并规范保存。

将 2018 年 1 月—2019 年 12 月于江苏大学附属医院体检中心进行健康检查的符合入选标准的 40 名健康志愿者纳入健康组,其年龄为 40~60 岁,男、女性均为 20 名。采集体检当日粪便标本并规范保存。

1.4 粪便 16S rRNA 测序及扩增流程

选用粪便 DNA 快速提取试剂盒提取烧伤患者和健康志愿者粪便样本基因组 DNA,进行高通量 16S rRNA 基因测序分析,主要步骤如下。(1)粪便样本总 DNA 的提取与质检:粪便均质—收集菌体—菌体保存—细胞裂解—DNA 抽提—DNA 沉淀收集—DNA 质检。(2)PCR 扩增及产物纯化:采用 16S rRNA

基因 V4 区通用引物,上游引物 515F 5'-GTGCCAGC MGCCGCGTAA-3',下游引物 806R 5'-GGACTA-CHVGGTWTCTAAT-3'(美国 Life 公司)。(3)上机测序:采用荧光定量检测仪进行定量,然后使用基因测序仪测序。

1.5 菌群结构及功能预测分析

(1)基因序列通过质量检查后,应用核糖体数据库项目分类算法 2.3 将样本序列与 Silva 数据库 (<https://www.arb-silva.de/>) 进行序列比对,确定样本中每条序列的分类等级(界、门、纲、目、科、属、种)^[7],记录各样本的菌群分类信息,分析各类菌属在样本中的相对丰度。(2)应用 Mothur 软件 (<https://mothur.org/>) 进行操作分类单元(OTU)划分,以序列相似性 97% 为标准,绘制粪便菌群结构热力图,分析优势菌群。(3)通过 QIIME1.9.0 软件 (<http://www.qiime.org>) 进行样本菌群 OTU 数目分析,计算样本菌群 α 多样性指数^[8],包括丰度指数(Chao1 指数和 Ace 指数)、多样性指数(Shannon 指数)。(4)基于样本菌群的相对丰度,应用 Canoco Software 5.0 (<http://www.canoco5.0com/>) 对样本做主成分分析(PCA),找出样本中对组间差异贡献较大的因素^[9],运用方差分解将 2 组菌群相对丰度的差异降维分析为不相关的变量线性组合,以散点图的形式反映在二维坐标图上,以百分数的形式体现主成分主要影响程度^[10-11]。(5)通过京都基因和基因组数据库^[12]对样本菌群基因测序结果进行氨基酸、碳水化合物、脂质、辅助因子及维生素合成等代谢功能预测^[13]。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行分析。计量资料中符合正态分布的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验;不符合正态分布的数据采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较行 Mann-Whitney *U* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 健康志愿者和严重烧伤患者伤后早期粪便菌群相对丰度差异

除未分类的肠杆菌科、乳杆菌属、副拟杆菌属 ($P > 0.05$) 外,烧伤组患者粪便中拟杆菌属、肠球菌属、不动杆菌属、巨球形菌属、葡萄球菌属相对丰度明显高于健康组志愿者 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而健康组志愿者粪便中未分类的毛螺杆菌科、普氏菌属、盲杆菌属、未分类的瘤胃球菌科、假丁酸弧菌

属、布劳特菌属、未分类的消化链球菌科等 19 种菌群的相对丰度明显高于烧伤组患者 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 健康志愿者和严重烧伤患者伤后早期粪便菌群结构热力图

健康组志愿者粪便菌群多样性优于烧伤组,其主要优势菌群分别为拟杆菌属、未分类的毛螺杆菌科、普氏菌属、未分类的肠杆菌科、布劳特菌属、副拟杆菌属和大肠志贺杆菌属等,而烧伤组患者粪便主要优势菌群为拟杆菌属、普氏菌属、未分类的肠杆菌科和副拟杆菌属。见图 1。

2.3 健康志愿者和严重烧伤患者伤后早期粪便菌群 OTU 数目及 α 多样性指数差异

烧伤组患者粪便菌群 OTU 数目、Ace 指数、Chao1 指数、Shannon 指数显著少/低于健康组志愿者 ($t = 10.325, 11.972, 12.224, 11.662, P < 0.01$)。见图 2。

2.4 健康志愿者和严重烧伤患者伤后早期粪便菌群 PCA

主成分 1 和主成分 2 是造成健康组志愿者和烧伤组患者粪便菌群差异较大的 2 个因素。2 组粪便菌群相对丰度可以在主成分 1 被清晰地区分为 2 个群体,主成分 1 贡献率为 32.50%, $P = 0.002$ 。健康组志愿者粪便菌群聚类在主成分 2 上较为集中,烧伤组患者粪便菌群聚类在主成分 2 上散布较大,主成分 2 贡献率为 13.44%, $P > 0.05$ 。见图 3。

2.5 健康志愿者和严重烧伤患者伤后早期粪便菌群代谢功能预测

烧伤组患者粪便菌群氨基酸、碳水化合物代谢水平显著低于健康组志愿者 ($P < 0.01$),烧伤组患者硫辛酸代谢和辅酶 Q 合成水平明显高于健康组志愿者 ($P < 0.01$),烧伤组患者花生四烯酸代谢水平与健康组志愿者相近 ($P > 0.05$)。见表 2。

3 讨论

长期以来,临床对于严重烧伤的救治主要集中在肺脏、肾脏、皮肤等重要的脏器和组织^[14-16]。由于肠道疾病在烧伤早期不易出现明显症状,致使早期的临床治疗忽视了肠道微生态在严重烧伤发生发展过程中的重要性。肠道菌群数量庞大,它们对肠道营养的摄取、免疫功能的维持以及肠黏膜生物屏障的保护都有重要的作用^[17-19]。严重烧伤可严重影响肠道的微环境,从而导致肠道菌群的失衡^[20]。严重烧伤导致机体体液大量流失,肠道组织长期灌注

表 1 健康组健康志愿者和烧伤组严重烧伤患者伤后早期粪便菌群科或属水平相对丰度比较[% , M(P₂₅, P₇₅)]

组别	人数/ 例数	拟杆菌属	未分类的毛 螺杆菌科	普氏菌属	未分类的 肠杆菌科	副拟杆菌 属	盲杆菌属	肠球菌属	未分类的瘤 胃球菌科	大肠志贺 杆菌属
健康组	40	12.65(6.88, 20.56)	11.38(8.10, 18.79)	1.38(0.22, 2.23)	0.36(0.12, 1.68)	0.69(0.22, 1.48)	3.89(2.33, 10.24)	0.01(0, 0.04)	3.52(1.91, 5.37)	0.87(0.31, 2.98)
烧伤组	48	51.82(24.89, 81.99)	0.06(0.04, 1.25)	0.16(0.08, 0.68)	1.51(0.16, 3.97)	1.78(0.16, 7.50)	0.04(0.02, 0.25)	0.06(0.01, 0.13)	0.05(0.03, 0.68)	0.32(0.09, 1.00)
Z 值		-5.20	-8.03	-3.21	-1.47	-1.69	-7.63	-2.37	-5.88	-3.37
P 值		<0.001	<0.001	0.002	0.152	0.103	<0.001	0.022	<0.001	0.001

组别	人数/ 例数	假丁酸弧 菌属	布劳特 菌属	未分类的消化 链球菌科	链球菌属	双歧杆菌属	不动杆 菌属	瘤胃球菌属	小杆菌属	考拉杆菌属
健康组	40	4.31(1.71, 6.25)	8.03(4.47, 15.55)	2.47(1.50, 3.23)	0.46(0.18, 0.58)	2.16(0.56, 4.21)	0	1.60(0.87, 1.92)	0.20(0.04, 0.30)	0.39(0.15, 0.56)
烧伤组	48	0.01(0, 0.03)	0.02(0.01, 0.08)	0.02(0.01, 0.11)	0.05(0.02, 0.33)	0.01(0, 0.03)	0.02(0, 0.06)	0.01(0, 0.02)	0	0.02(0.01, 1.30)
Z 值		-8.05	-8.05	-6.77	-4.17	-7.28	-5.17	-7.40	-7.00	-3.74
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

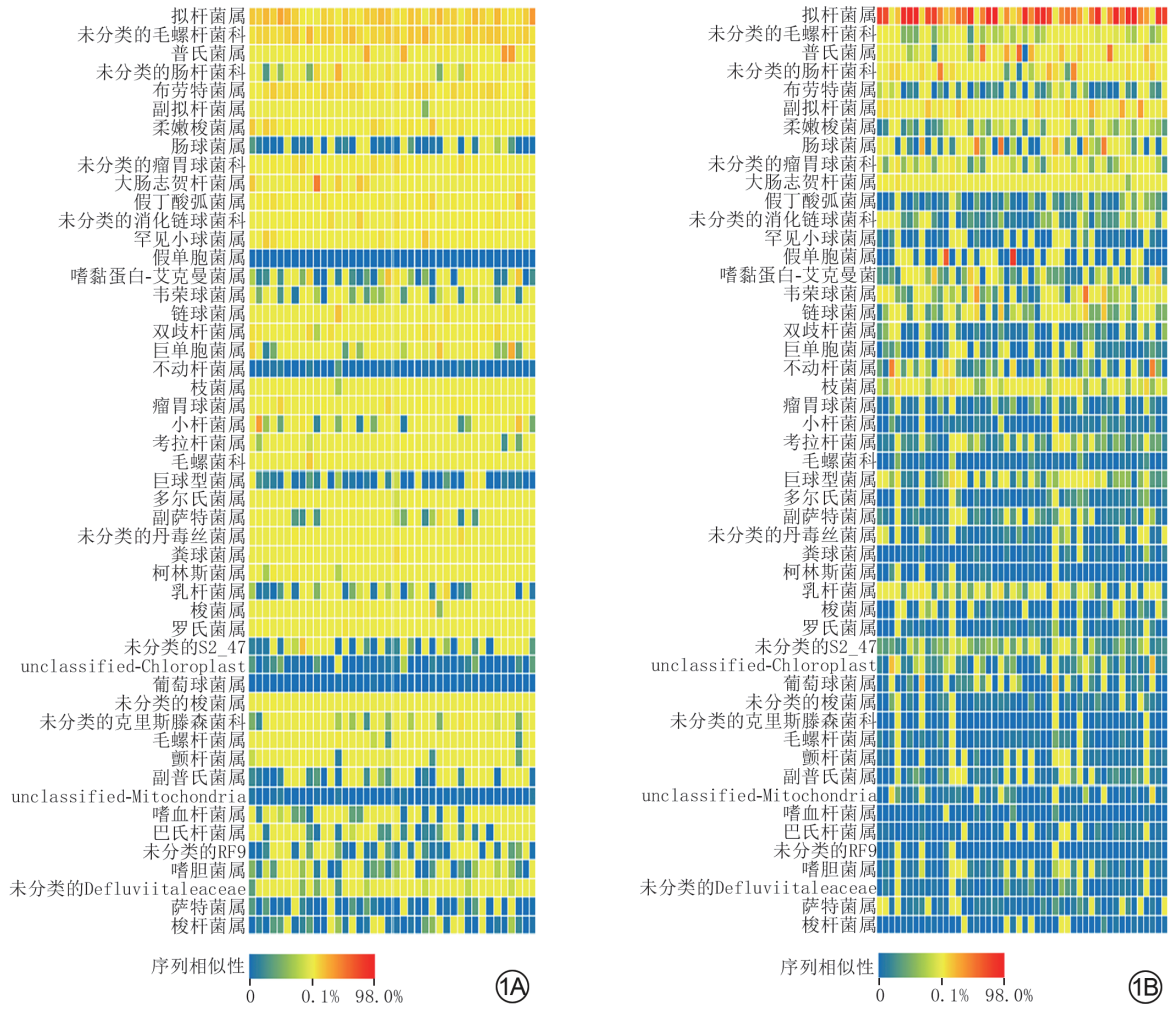
组别	人数/ 例数	巨球型 菌属	粪球菌属	放线菌科杆 菌属	乳杆菌属	罗氏菌属	葡萄球 菌属	未分类的梭 菌属	毛螺杆菌属	嗜血杆菌属
健康组	40	0.01(0, 0.07)	0.95(0.72, 3.61)	1.21(0.43, 2.63)	0.05(0.01, 0.25)	1.12(0.41, 1.53)	0	0.58(0.26, 1.04)	0.32(0.22, 0.48)	0.12(0.03, 0.26)
烧伤组	48	0.03(0.01, 0.97)	0	0	0.11(0.02, 0.41)	0	0.01(0, 0.07)	0	0	0
Z 值		-4.41	-8.10	-7.63	-1.47	-7.94	-6.03	-6.87	-7.42	-7.72
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	0.154	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:罕见小球菌属、嗜黏蛋白-艾克曼菌属、萨特菌属等 23 种菌群相对丰度太小,未列出

不足以及烧伤诱导的促炎介质的剧增都可能导致肠黏膜上皮萎缩、凋亡,肠道细胞间的间隙变大,从而提高肠道的通透性^[21]。严重烧伤患者处于高分解代谢状态,机体糖利用的抑制、内源性脂肪分解的加速、机体蛋白质分解的增强都给肠道稳态的维持带来巨大挑战^[22]。感染是大面积烧伤患者最常见的并发症^[23-24],为防止严重烧伤早期感染发展成危及患者生命的脓毒症,临床中往往会使用大量的广谱抗生素,而广谱抗生素没有辨别“好菌”和“坏菌”的能力,会将大部分不耐药的菌群杀死,从而破坏肠道菌群的稳态^[25]。

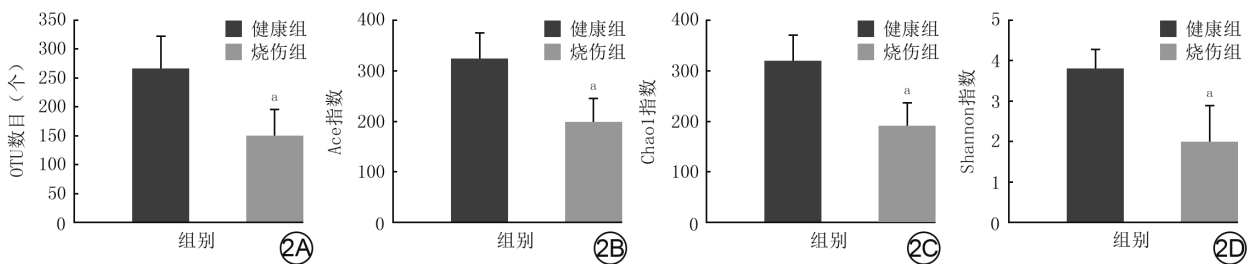
越来越多的研究在逐步阐明烧伤和肠道菌群失衡的联系。本研究证实,严重烧伤患者肠道菌群种类、数量和多样性均受到了影响,处于严重的失衡状态。健康志愿者肠道优势菌群主要为拟杆菌属、未分类的毛螺杆菌科、普氏菌属、未分类的肠杆菌科、布劳特菌属、副拟杆菌属、大肠志贺杆菌属等厚壁菌门,说明肠道中需要更多的专性厌氧菌(厚壁菌门和拟杆菌门为主)参与营养物质的吸收和代谢。严重烧伤患者肠道拟杆菌属、肠球菌属、不动

杆菌属、巨球型菌属、葡萄球菌属相对丰度明显高于健康志愿者。拟杆菌属是人和动物体内大量存在的正常菌群,但是当其含量超过正常水平就会对机体产生不利影响。有研究表明,直肠癌、2 型糖尿病以及溃疡性结肠炎患者肠道菌群中拟杆菌属的比例明显增加^[26],提示减少拟杆菌属含量可能是维持肠道菌群稳态的重要治疗方法。未分类的毛螺杆菌科、大肠志贺杆菌属、未分类的瘤胃球菌科、假丁酸弧菌属等菌属中很多成员被认为是丁酸产生菌^[27],本研究中严重烧伤患者肠道菌群中假丁酸弧菌属的相对丰度远低于健康人群。丁酸具有一定的抗炎和保护脏器的功能,烧伤患者丁酸产生菌的减少可导致肠道微血管内皮细胞收缩和细胞间隙增宽,进而使内皮屏障遭受破坏,血管内液体向组织内渗出,引起组织水肿和器官功能障碍。 α 多样性是指单个样品内部的 5 种多样性分析,常用的指标包括 OTU 数目、Ace 指数、Chao1 指数、Shannon 指数等,这些数据越大说明该样本的物种越丰富。本研究结果显示,健康人群的肠道菌群多样性及稳定性高,而严重烧伤患者肠道菌群种类减少、多样性



注: 1A、1B中每行从左到右的40、48个色块代表40名健康志愿者和48例烧伤患者的样本

图1 健康组40名健康志愿者和烧伤组48例严重烧伤患者伤后早期粪便菌群结构热力图。1A.健康组;1B.烧伤组



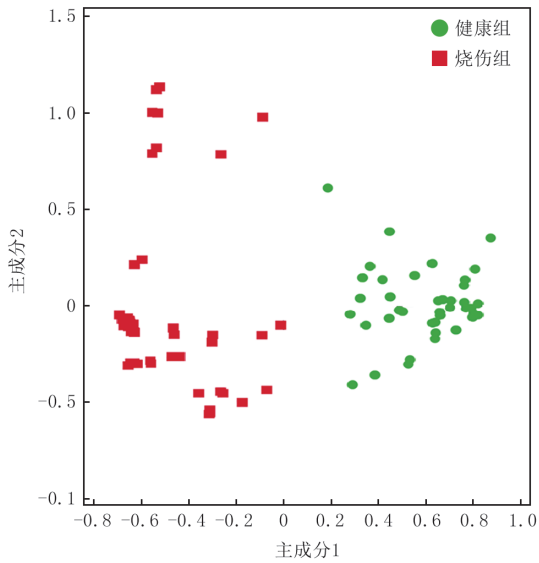
注:与健康组相比, $a P < 0.01$

图2 健康组40名健康志愿者和烧伤组48例严重烧伤患者伤后早期粪便菌群操作分类单元(OTU)数目及 α 多样性指数比较($\bar{x} \pm s$)。2A. OTU数目;2B. Ace指数;2C. Chao1指数;2D. Shannon指数

降低,这与本研究中菌群结构差异的结果一致。

PCA是一种研究数据相似性或差异性的可视化方法,采取降维的思想,PCA可以找到距离矩阵中最主要的坐标,把复杂的数据用一系列的特征值和特征向量进行排序后,选择前几位主要特征值,来表示样品之间的关系,通过PCA可以观察个体或群体间的差异。PCA中的百分数表示对应特征向

量对数据的解释量,此值越大说明样本在这一向量中的聚集度越高^[28]。本研究将PCA用于分析菌群丰度差异与烧伤这一因素之间的关系^[26],结果表明健康人群肠道菌群相似度较高,而严重烧伤患者因伤后肠道菌群结构出现不同程度的失衡,菌群结构差异较大。不同程度肠道菌群失衡与烧伤面积、深度及合并的复合伤,如吸入性损伤、脏器损伤等均



注:每个色块代表一个样本,每个色块分别垂直于横、纵坐标上的距离代表样本受主成分1和主成分2影响的程度,样本间越聚集,说明相识程度越高

图3 健康组40名健康志愿者和烧伤组48例严重烧伤患者伤后早期粪便菌群主成分分析图

存在一定联系,但这些因素在肠道菌群失衡中的具体作用需进一步研究。

严重烧伤患者机体处于强烈的应激状态下,各种物质的代谢都处于高水平的紊乱之中。有研究显示,早期肠内营养对急性胰腺炎和卒中患者肠道菌群的失调以及患者的营养状态有显著的改善作用^[29]。本研究中粪便菌群功能预测结果显示,严

重烧伤患者早期各类氨基酸、碳水化合物的代谢水平明显低于健康志愿者,硫辛酸代谢和辅酶Q合成水平明显高于健康志愿者。蛋白质及氨基酸是生命活动的重要物质及体内代谢活性物质(激素、酶、免疫抗体)的主要成分,是组织更新、修补的原料,谷氨酸是氨基酸合成过程中关键的氨基供体,丝氨酸、甘氨酸、半胱氨酸是细菌中多种氨基酸的重要代谢产物和前体,也是鞘脂、叶酸、甲烷和丙酮酸等的代谢前体,丝氨酸还参与嘌呤和嘧啶的生物合成,氨基酸代谢水平的降低会对机体各种功能产生影响。研究表明,短链脂肪酸是肠道微生物群重要的能量来源^[30],可调节宿主肠道免疫,降低炎症反应,烧伤患者碳水化合物代谢的降低会减少短链脂肪酸的合成,影响肠黏膜屏障功能,这提示对烧伤患者伤后早期进行适当肠内营养可补充缺少的短链脂肪酸,进而保障肠内的碳水化合物代谢。

本研究揭示了严重烧伤早期患者肠道菌群处于失衡状态,而肠道菌群的结构异常以及代谢紊乱会增加患者并发感染、营养不良等概率。临床上及时、动态地调节患者肠道菌群结构及代谢(如氨基酸的代谢),减少广谱抗生素的使用,适宜的肠内营养,逐步增加饮食等会改善患者肠道微环境,对于改善患者的预后具有重要意义。目前粪菌移植已经被报道用于难辨梭状芽孢杆菌感染、炎症性肠病、顽固性便秘、代谢病、肠道免疫缺陷、肠道过敏

表2 健康组健康志愿者和烧伤组严重烧伤患者伤后早期粪便菌群代谢水平比较[% ,M(P₂₅,P₇₅)]

组别	人数/ 例数	氨基酸代谢						
		丙氨酸-天冬氨酸- 谷氨酸代谢	精氨酸-脯氨酸 代谢	半胱氨酸-蛋氨酸 代谢	甘氨酸-丝氨酸- 苏氨酸代谢	苯丙氨酸代谢	色氨酸代谢	酪氨酸代谢
健康组	40	2.14(1.59,2.75)	2.53(1.97,3.22)	1.85(1.50,2.41)	1.59(1.30,2.00)	0.34(0.28,0.44)	0.25(0.17,0.31)	0.63(0.52,0.83)
烧伤组	48	1.22(1.09,1.31)	1.29(1.08,1.50)	0.91(0.81,0.99)	0.84(0.72,0.93)	0.22(0.19,0.26)	0.10(0.09,0.17)	0.35(0.31,0.42)
Z值		-4.75	-4.54	-4.75	-4.62	-3.71	-3.28	-4.19
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001

组别	人数/ 例数	碳水化合物代谢				
		三羧酸循环	果糖和甘露糖代谢	半乳糖代谢	糖酵解/糖异生	淀粉和蔗糖代谢
健康组	40	1.00(0.85,1.26)	1.96(1.42,2.58)	1.58(1.24,2.08)	2.16(1.74,2.78)	2.05(1.54,2.72)
烧伤组	48	0.76(0.66,0.86)	1.07(0.94,1.19)	0.95(0.76,1.12)	1.10(0.99,1.24)	1.09(0.95,1.22)
Z值		-3.82	-4.72	-4.35	-4.75	-4.71
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

组别	人数/例数	花生四烯酸代谢	硫辛酸代谢	辅酶Q合成
健康组	40	0.03(0.02,0.05)	0.04(0.03,0.05)	0.22(0.15,0.28)
烧伤组	48	0.04(0.03,0.05)	0.08(0.06,0.10)	0.32(0.27,0.37)
Z值		-1.59	-6.07	-4.51
P值		0.125	<0.001	<0.001

等疾病的治疗^[31],希望通过本研究能够为严重烧伤患者粪菌移植治疗提供参考。当然文中只分析了小样本患者某个时间点的菌群结构变化,本课题组后续将继续进行相关研究,实现对烧伤发展的早期预测及干预,为严重烧伤患者的肠道微生态失衡的治疗提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(10): 605-616. DOI:10.1038/s41575-019-0173-3.
- [2] Wang C, Li Q, Ren J. Microbiota-immune interaction in the pathogenesis of gut-derived infection[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1873. DOI:10.3389/fimmu.2019.01873.
- [3] Wallace TC, Guarner F, Madsen K, et al. Human gut microbiota and its relationship to health and disease[J]. *Nutr Rev*, 2011, 69(7): 392-403. DOI:10.1111/j.1753-4887.2011.00402.x.
- [4] Beckmann N, Pugh AM, Caldwell CC. Burn injury alters the intestinal microbiome's taxonomic composition and functional gene expression[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0205307. DOI: 10.1371/journal.pone.0205307.
- [5] 张军毅,朱冰川,徐超,等.基于分子标记的宏基因组 16S rRNA 基因高变区选择策略[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(11): 3545-3553.
- [6] 吴悦妮,冯凯,厉舒祯,等.16S/18S/ITS 扩增子高通量测序引物的生物信息学评估和改进[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(9): 2897-2912. DOI:10.13344/j.microbiol.china.200054.
- [7] Park S, Choi HS, Lee B, et al. hc-OTU: a fast and accurate method for clustering operational taxonomic units based on homopolymer compaction[J]. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform*, 2018, 15(2): 441-451. DOI:10.1109/TCBB.2016.2535326.
- [8] 黄树武,闵凡贵,王静,等.常见 SPF 级小鼠和大鼠肠道菌群多样性研究[J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(2): 229-235. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.016.
- [9] 罗亚,唐贇,张丁,等.不同年龄大熊猫肠道菌群及其酶活特征分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(4): 763-771. DOI:10.11843/j.issn.0366-6964.2020.04.012.
- [10] Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. *Genome Biol*, 2011, 12(6): R60. DOI: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.
- [11] Ramette A. Multivariate analyses in microbial ecology[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, 62(2): 142-160. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x.
- [12] Hu J, Bao Y, Zhu Y, et al. The preliminary study on the association between PAHs and air pollutants and microbiota diversity[J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2020, 79(3): 321-332. DOI:10.1007/s00244-020-00757-4.
- [13] 袁林,李万利,杜晨红,等.黄连解毒散和黄霉素对不同日龄肉鸡回肠菌群结构的影响[J]. *河南农业科学*, 2020, 49(2): 142-149. DOI:10.15933/j.cnki.1004-3268.2020.02.019.
- [14] 陈宾,况芳,李孝建,等.四例严重烧伤患者并发早期急性肾损伤的原因及治疗方法分析[J]. *中华烧伤杂志*, 2019, 35(2): 110-115. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2019.02.006.
- [15] 刘峰,黄正根,彭毅志,等.严重烧伤早期行连续性血液净化治疗的可行性及疗效随机对照临床试验[J]. *中华烧伤杂志*, 2016, 32(3): 133-139. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.03.002.
- [16] 李晓亮,肖宏涛,李延仓,等.柠檬酸对行连续性肾脏替代治疗的严重烧伤并发急性肾损伤患者的影响[J]. *中华烧伤杂志*, 2019, 35(8): 568-573. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2019.08.003.
- [17] Sebastián Domingo JJ, Sánchez Sánchez C. From the intestinal flora to the microbiome[J]. *Rev Esp Enferm Dig*, 2018, 110(1): 51-56. DOI:10.17235/reed.2017.4947/2017.
- [18] Lynch SV, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(24): 2369-2379. DOI:10.1056/NEJMra1600266.
- [19] Kataoka K. The intestinal microbiota and its role in human health and disease[J]. *J Med Invest*, 2016, 63(1/2): 27-37. DOI:10.2152/jmi.63.27.
- [20] Huang G, Sun K, Yin S, et al. Burn injury leads to increase in relative abundance of opportunistic pathogens in the rat gastrointestinal microbiome[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1237. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01237.
- [21] Zhang DY, Qiu W, Jin P, et al. Role of autophagy and its molecular mechanisms in mice intestinal tract after severe burn[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2017, 83(4): 716-724. DOI: 10.1097/TA.0000000000001624.
- [22] Tapking C, Popp D, Herndon DN, et al. Cardiac dysfunction in severely burned patients: current understanding of etiology, pathophysiology, and treatment[J]. *Shock*, 2020, 53(6): 669-678. DOI:10.1097/SHK.0000000000001465.
- [23] Savetama A. Infection in elderly burn patients: what do we know? [J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2021, 22(1): 65-68. DOI: 10.1089/sur.2020.322.
- [24] Salyer CE, Bomholt C, Beckmann N, et al. Novel therapeutics for the treatment of burn infection[J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2021, 22(1): 113-120. DOI:10.1089/sur.2020.104.
- [25] Liu J, Liu Y, Liu S, et al. Hypocoagulation induced by broad-spectrum antibiotics in extensive burn patients[J/OL]. *Burns Trauma*, 2019, 7: 13[2020-09-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31058197/>. DOI:10.1186/s41038-019-0150-7.
- [26] 王泽臣. 烧伤患者创面菌群分布变化及创面感染影响因素分析[D]. 天津:天津医科大学, 2015.
- [27] 张莎莎,吴振聪,杨转,等.利用 Illumina Miseq 测序技术研究鲍内脏多肽对小鼠肠道微生物的影响[J]. *安徽农业科学*, 2019, 47(8): 93-97. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.08.024.
- [28] Ojuederie OB, Balogun MO, Akande SR, et al. Intraspecific variability in agro-morphological traits of African yam bean *Sphenostylis stenocarpa* (Hochst ex. A. Rich) harms[J]. *Journal of Crop Science & Biotechnology*, 2015, 18(2): 53-62. DOI: 10.1007/s12892-014-0109-y.
- [29] 雍和礼,刘宓,宁磊.重症胰腺炎患者感染病原菌耐药及相关因素分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2015, 10(11): 1035-1039. DOI:10.13350/j.cjpb.151118.
- [30] 王津,刘爽,邹妍,等.膳食纤维和肠道微生物及相关疾病的研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(11): 201-207. DOI: 10.12161/j.issn.1005-6521.2020.11.033.
- [31] Quraishi MNN, Yalchin M, Blackwell C, et al. STOP-colitis pilot trial protocol: a prospective, open-label, randomised pilot study to assess two possible routes of faecal microbiota transplant delivery in patients with ulcerative colitis[J]. *BMJ Open*, 2019, 9(11): e030659. DOI: 10.1136/bmjopen-2019-030659.

(收稿日期:2020-09-16)