• 401 •

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.03.001

# ・基础研究・

# Cidec 基因敲除小鼠肠道菌群的特征

金美君 李亮魁 李域琪 盛园园 徐 俐<sup>△</sup> (清华大学生命科学学院 北京100084)

摘要目的:探究 Cidec 敲除(CIDEC-KO)小鼠肠道菌群的结构。方法:随机分别挑选体重相近、2月龄5只野生型和5只 Cidec 敲除的雄性小鼠,收集两种基因型小鼠经高脂饲料 16周喂养前后的新鲜粪便。提取粪便中的细菌基因组,对菌群基因组 16S rRNA 基因 V4 高变区进行测序,对数据进行 PCOA 分析、Alpha 多样性分析及 LEfSe 分析。结果:属水平下的 LEfSe 分析显示,在普通饲料喂养条件下,Cidec 缺失小鼠对比野生型小鼠粪便中 Prevotellacea\_UCG\_001 属丰度显著上升,Blautia 属、Streptococcus 属、Lachnospiraceae\_UCG\_006 属丰度显著下降。与同月龄同高脂喂养的野生型小鼠比,Cidec 敲除小鼠粪便中 Ruminococcaceae\_UCG\_014 属丰度显著下降。进一步比较同一种基因型下饮食对肠道菌群的改变,发现在喂养高脂饲料后,某些属的丰度 Q在 Cidec 缺失小鼠中发生显著变化,但是在野生型小鼠中未发现有显著变化,这些属包括:Alistipes 属、Bacteroides 属、Paraprevotella 属、Streptococcus 属、Lachnospiraceae\_UCG\_006 属丰度 DAG 006 属丰度显著上升。而喂养高脂后,仅在野生型小鼠中发现 Peptococcus 属和 Ruminococcus\_torques\_group 属丰度的显著上升,以及 Tyzzerella\_3 属、Ruminiclostidium\_6 属和 A2 属丰度的显著下降,在 Cidec 缺失小鼠为道菌群中丰度显著上升。

关键词:肠道菌群;Cidec;高脂饮食

中图分类号:R-33;R589 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)03-401-07

# Composition of Gut Microbiota in Cidec-deficient Mice

JIN Mei-jun, LI Liang-kui, LI Yu-qi, SHENG Yuan-yuan, XU Li<sup>A</sup> (School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the composition of gut microbiota in Cidec-deficient mice. **Methods:** Five wild-type (WT) and five *Cidec*-deficient (CIDEC-KO) male C57/B6J mice with same age (8-week-old) and similar weight were randomly selected. Fresh feces were collected before and after fed with high fat diets (HFD) for 16 weeks. Gut bacteria genome DNA was extracted for 16S rRNA V4 region sequencing. Principal Coordinates Analysis (PCoA), Alpha diversity and LEfSe analysis were performed. **Results:** LEfSe analysis revealed that in genus level, under normal diets (ND) condition, the abundance of the genus *Blautia, Streptococcus,* and *Lachnospiraceae\_UCG\_006* in the feces of CIDEC-KO mice was lower, and the abundance of the *genus Ruminococcaeae\_UCG\_014* was lower in the feces of CIDEC-KO mice. To further compare the changes of intestinal flora after fed with HFD in CIDEC-KO mice, we found that the increase in the abundance of the genus *Alistipes, Bacteroides, Paraprevotella, Streptococcus* and *Lachnospiraceae\_UCG\_006* could only be detected in the feces of CIDEC-KO mice but not in WT mice. Oppositely, the increase in the abundance of the genus *Pyzzerella\_3, Ruminiclostidium\_6* and A2 could only be detected in WT mice, but not in CIDEC-KO mice after HFD. **Conclusion:** After fed with HFD for 16 weeks, the significant increase of several genera that were positively correlated with the metabolic syndrome could only be detected in the intestinal flora of CIDEC-KO mice after HFD for 16 weeks, the significant increase of several genera that were positively correlated with the metabolic syndrome could only be detected in the fece.

Key words: Gut microbiota; Cidec; High fat diet

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R589 Document code: A Article ID: 1673-6273(2020)03-401-07

## 前言

代谢综合征(Metabolic Syndrome, MS)是由于自身代谢紊

乱所造成的一系列疾病,如肥胖、心脑血管疾病、非酒精性脂肪 肝等<sup>11</sup>,受遗传和环境因素共同影响。作为肠道微环境的重要组 成部分,肠道菌群主要通过影响宿主的能量储存<sup>12</sup>及免疫反应<sup>13</sup>

△ 通讯作者:徐俐,硕士生导师,副研究员,主要研究方向:生物化学和分子生物学,E-mail: xulilulu@tsinghua.edu.cn,电话:010-62797133 (收稿日期:2019-08-18 接受日期:2019-09-13)

作者简介:金美君,硕士研究生,主要研究方向:生物学,E-mail: 18800116070@163.com

两个方面对宿主糖脂代谢进行调控。以未消化完全的食物为主 要原料,肠道菌群能够产生大量短链脂肪酸(Short Chain Fatty Acids, SCFAs),这些产物不仅能够被小肠上皮直接吸收作为能 量来源<sup>14</sup>,也能够通过激活游离脂肪酸受体 2(FFAR2)调控 PYY(Peptide YY)和胰高血糖素样肽 -1(GLP-1)这两种肠道激 素的水平<sup>[5]</sup>,进而调节胰岛素的分泌,参与血糖稳态的调节过 程6%。作为促进机体脂肪及脂溶性成分吸收的重要代谢产物77, 胆汁酸也需要肠道菌群的参与,从而完成由初级向次级的转化 以及结合型胆汁酸的水解过程<sup>18</sup>,最终通过肝肠循环影响胆汁 酸池的大小及组成<sup>19</sup>。不仅如此,伴随肥胖一般会发生的慢性轻 度炎症反应也同肠道菌群相关[18],研究表明当肠道中革兰氏阴 性菌死亡后,外膜的脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS)会被释放 并作为一种内毒素进入宿主血液中,然后与脂多糖结合蛋白 (Lipopolysaccharide Binding Protein,LBP)、CD14 蛋白结合形 成复合物<sup>[10]</sup>,该复合物会激活 TLR-4 并介由 Kupfer 细胞的呈 递引发炎症级联反应<sup>[11]</sup>。除了对肠道微生物结构改变的研究之 外,肠道微生物的代谢过程及其对宿主健康调控的分子机制, 是现阶段肠道微生物与宿主健康关系研究的重要方向。

CIDE(Cell death-inducing DFF45-like effector)家族蛋白包 括 CIDEA、CIDEB 和 CIDEC 三个成员,它们除了能够在细胞 凋亡过程中发挥功能<sup>121</sup>,也能够作为脂滴表面蛋白,影响脂肪 细胞、肝细胞、乳腺细胞以及其它腺体细胞中脂肪的储存与分 泌,从而调控机体系统的脂稳态<sup>[13]</sup>。其中在脂肪细胞中高表达 的 CIDEC 蛋白主导脂滴的融合生长和单一大脂滴的形成,促 进脂肪的储积<sup>[14]</sup>。正常饮食条件时, Cidec 缺失小鼠会增强基础 脂肪分解能力并使得白色脂肪具有棕色化(Browning)的性质, 小鼠体内的炎症反应减轻,胰岛素敏感性增强发生[15];当长期 喂养高脂饲料后, Cidec 缺失小鼠依然能够抵抗高脂诱导的肥 胖,由于脂肪组织的储脂能力不足,过多的脂肪转移到肝脏和 褐色脂肪细胞,导致脂肪肝、胰岛素抵抗等问题的发生,可是能 够观察到的是血液中及白色脂肪组织中中的炎症因子显著降 低以及血液中脂联素(Adiponectin, ADPN)显著升高<sup>10</sup>。在人体 内,先天性 Cidec 缺乏症患者表现为脂肪代谢障碍(Lipodystrophy),脂肪异位储存于肝脏而产生非酒精性脂肪肝(Nonalcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD)以及伴随着胰岛素抵抗的糖 尿病<sup>[17]</sup>。炎症往往与糖尿病的发生有关<sup>[18]</sup>,但 Cidec 缺失小鼠表 现出的与炎症解偶联的胰岛素抵抗,与炎症引起胰岛素抵抗不 吻合。那么, Cidec 缺失小鼠是否通过介导肠道微生物改变机体 的系统代谢,有待深入研究。本文通过 16S rRNA 测序方法从 菌群的结构、多样性、显著差异的菌群标记物入手,来探究 Cidec 基因敲除在不同的饲养条件下粪便中菌群的变化。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料和试剂

试验所用 Cidec 全身敲除种鼠由 Shen Yon Toh 等人构建<sup>[13]</sup>, 遗传背景为 C57BL/6。随机选取体重相近的 2 月龄 Cidec 全身 敲除及野生型雄性小鼠各 5 只,在清华大学实验动物平台 SPF 级环境饲养,自由进水与取食。普通繁殖饲料和高脂饲料均来 自北京华阜康生物科技股份有限公司,其中高脂饲料 60%能量 由脂肪提供。收取粪便时,在当天的上午 10:00-10:30,将小鼠单 只置于不同的干净笼子中,收集新鲜的粪便0.1g左右于灭菌 EP管中,并通过适当刺激小鼠肛门周围补充不足的粪便量。剩 余粪便及时于-80℃冰箱进行保存。粪便基因组提取试剂盒(货 号DP328,北京天根生化科技有限公司),提取的基因组由北京 诺禾致源公司进行后续测序分析。

#### 1.2 主要仪器

美国 Beckman Coulter 公司台式低温高速离心机;美国 Bio-rad 公司 PCR 扩增仪;美国 Thermofisher 公司 NanoDrop One / OneC 超微量紫外 - 可见光分光光度计;美国 Bio-rad 公司凝胶电泳仪。

#### 1.3 方法

1.3.1 粪便基因组的提取 使用北京天根粪便基因组提取试 剂盒提取小鼠粪便基因组。具体方法:称取 180-220 mg 粪便样 本,加入 500 µL 缓冲液 SA,100 µL 缓冲液 SC,15 µL Proteinase K 及 0.25 g 的研磨珠后涡旋混匀, 70℃孵育 15 min。 12000 rpm 离心 3 min,转移上清至新的离心管中,加入 10 μL 的 RNase A, 震荡混匀后室温放置 5 min。加入 200 μL 缓冲液 SH,震荡混匀后置冰上 5 min, 12000 rpm 离心 3 min。转移上清 至新的离心管并加入等体积缓冲液 GFA,所得溶液加入到置 于收集管中的吸附柱中,12000 rpm 离心 30 sec, 倒掉废液,将 吸附柱放回收集管,重新向吸附柱中加入 500 µL 缓冲液 GD, 12000 rpm 离心 30 sec, 倒掉废液,将吸附柱放回收集管。向吸 附柱中加入 700 µL 漂洗液 PW, 12000 rpm 离心 30 sec, 倒掉废 液,重复此步骤一次。12000 rpm 离心 2 min,倒掉废液。将吸附 柱置于室温放置数分钟并彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液 后转入一个干净的离心管中,向吸附膜滴加 50 µL 洗脱缓冲液 TB,室温放置 2-5 min, 12000 rpm 离心 2 min, 收集溶液到离心 管中。所得溶液即提取好的基因组溶液,可用于接下来送到诺 禾致源公司进行后续 PCR 扩增、数据建库以及测序分析。

1.3.2 PCR 扩增和数据建库 通过琼脂糖凝胶电泳检测所得 基因组溶液浓度,取适量溶液,稀释至 1 ng/μL 作为模板,引物 选用带 Barcode 的 16S V4 区(515F 和 806R)特异引物,使用 NewEngland Biolabs 公司的 Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 以及高效高保真酶进行 PCR,产物用 2%浓 度的琼脂糖凝胶进行电泳检测,对目的条带用 Qiagen 公司的 胶回收试剂盒回收产物。最后使用 TruSeq<sup>®</sup> DNA PCR-Free Sample preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建,并进过 Qubit 和 Q-PCR 定量分析检验,合格后使用 HiSeq2500 PE250 进行 上机测试。

1.3.3 16S rRNA 数据分析 使用 FLASH(version 1.2.7)软件, 通过 overlap 对每个样品的 reads 进行拼接,得到的拼接序列即 原始 Tags 数据(Raw Tags);使用 Trimmomatic(version 0.33)软件,对拼接得到的 Raw Tags 进行过滤,得到高质量的 Tags 数据(Clean Tags);使用 UCHIME(version 4.2)软件,鉴定并去除 嵌合体序列,得到最终有效数据(Effective Tags)。

使用 QIIME(version 1.8.0<sup>109</sup>软件中的 UCLUST <sup>100</sup>对 Tags 在 97%的相似度水平下进行聚类、获得 OTU,并基于 Silva(细菌)和 UNITE(真菌)分类学数据库对 OTU 进行分类学注释。在 97%的相似度水平下,得到了每个样品的 OTU 个数,对 OTU 进行去低含量筛除即去掉含有极低丰度的 OTU (物种丰

度小于 0.005%),得到最终的 OTU 列表并统计出各样品中各 等级的注释到物种的 tags 数。使用 Mothur(version 1.30)软件, 对各个样品的 Alpha 多样性指数(包括 OTU、Chaol、Ace、 Shannon、Simpson)<sup>[21]</sup>进行评估。为比较样品间的多样性指数, 分析时将样品所含序列数进行标准化。使用 QIIME 软件进行 Beta 多样性(Beta diversity)分析,并基于 Beta 多样性分析得到 的距离矩阵,使用 R 语言工具绘制 PCoA 分析结果图。使用 LEfSe 软件进行 LEfSe 分析,挑选所有的菌属(Genus)水平进 行分析比较,LDA score 默认值设为 3。

#### 2 结果

#### 2.1 数据预处理及质量监控

对小鼠粪便基因组 16S rRNA 的 V4 区进行扩增,并将纯 化后的产物通过使用 Illumina HiSeq PE250 进行测序,所得到 的双端 reads 数即为 PE Reads,经过拼接以及进一步过滤优化 得到 Clean Tags,最后过滤嵌合体后得到 Effective Tags 即有效 序列数用于后续分析。数据处理过程中各步骤得到的统计结果 见表 1。其中每个样品均得到 48000 条以上的有效数据,原始 数据的有效率均达到 90%以上。

Sample ID	PEReads	Raw Tags	Clean Tags	Effective Tags	AvgLen (bp)	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	Effective (%)
+/+ ND1	84664	79683	79656	79643	253	55.96	99.14	97.77	94.07
+/+ ND2	52229	48792	48779	48759	252	55.40	99.11	97.73	93.36
+/+ ND3	88114	82882	82775	82760	254	55.78	99.03	97.54	93.92
+/+ ND4	60480	57099	57067	57063	253	55.56	99.08	97.68	94.35
+/+ ND5	92969	89204	89170	89147	252	55.47	99.10	97.75	95.89
+/+ HFD1	80739	78055	78026	78000	252	55.16	99.02	97.57	96.61
+/+ HFD2	94333	90799	90752	90715	253	54.63	99.12	97.76	96.16
+/+ HFD3	66054	62886	62671	62640	259	56.69	98.74	97.15	94.83
+/+ HFD4	82245	78834	78789	78756	252	54.98	99.08	97.65	95.76
+/+ HFD5	85946	82489	82465	82440	252	55.02	99.12	97.76	95.92
Cidec-ND1	92906	89147	89117	89104	252	55.51	99.10	97.72	95.91
Cidec-ND2	87854	83558	83467	83454	254	55.88	99.02	97.56	94.99
Cidec-ND3	85237	79099	78923	78915	256	55.96	99.01	97.49	92.58
Cidec <sup>4</sup> ND4	95715	89342	89308	89294	252	56.24	99.19	97.86	93.29
Cidec <sup>-/-</sup> ND5	95861	89695	89669	89659	252	56.13	99.16	97.80	93.53
Cidec-HFD1	86002	82304	82265	82239	253	55.17	99.09	97.63	95.62
Cidec <sup>-/</sup> HFD2	94368	86633	85738	85707	258	55.22	98.86	97.25	90.82
Cidec-'HFD3	90857	86993	86975	86934	252	55.03	99.10	97.66	95.68
Cidec <sup>.,</sup> HFD4	85496	80923	80562	80527	259	55.24	98.78	97.11	94.19
Cidec <sup>4</sup> HFD5	93237	89661	89600	89569	253	55.02	99.08	97.67	96.07

表1 数据预处理表格 Table 1 Data process and quality control

#### 2.2 饮食是影响小鼠肠道菌群变化的主要因素

使用 Mothur 软件对小鼠粪便样品中的菌群多样性进行评估,结果以箱型图形式展示,如图 1 所示,其中 A 图的 OTU 代表观察到的物种数目,B 图和 C 图中的 ACE 和 Chao1 指数衡量物种的丰度即物种数量的多少,D 图和 E 图中的 Simpson 和 Shannon 指数用于衡量物种的多样性,并分别受样品菌群中物种的均匀度和丰度的影响。结果显示可观察到的 OTU 以及 Chao1、ACE 在四组样本中均无显著差异,但是在普通饲料条件下的 Cidec 缺失小鼠肠道菌群对比其他三组样品 Simpson 数值显著升高,Shannon 数值显著降低,说明普通饲料条件下的 Cidec 缺失小鼠同其他三组相比菌群多样性低且是分布更

均匀。

用 Weighted\_UniFrac 进行 PCoA 聚类分析,结果如图 2 所示,其中第一主坐标贡献 62.50%,第二主坐标贡献 16.13%。在相同的饮食条件下能看到野生型和 Cidec 敲除小鼠的明显聚类。很显然,橙色标识的正常饮食下的野生型和 Cidec 敲除小鼠聚为一类,而蓝色标识的高脂饮食下的野生型和 Cidec 敲除小鼠聚为另一类,但是同一饮食条件下的两种基因型小鼠聚类不显著。进一步表明,饮食是影响肠道菌群变化的主要饮食,而基因型对菌群结构影响不显著。

# 2.3 普通饲料喂养条件下野生型小鼠和 Cidec 敲除小鼠粪便中 的差异物种

普通饲料喂养条件下,通过LEfSe分析属水平上野生型和 Cidec 敲除小鼠肠道之间的具有统计学差异的菌群,结果如图 3 所示。相较于野生型,Cidec 敲除小鼠粪便中 Prevotel*lacea\_UCG\_001* 属丰度显著上升; *Blautia* 属、*Streptococcus* 属、 *Lachnospiraceae\_UCG\_006* 属丰度显著下降。



图 1 Alpha 多样性分析高脂及普通饲料喂养条件下野生型以及 Cidec 敲除小鼠肠道菌群 Fig.1 Alpha diversity analysis of gut bacterial communities of WT and Cidec-deficient mice under ND and HFD Note: Data was expressed as boxplot, n=5.\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001.







# 2.4 高脂饲料喂养条件下野生型小鼠和 Cidec 敲除小鼠粪便中 的差异物种

在高脂饲料喂养后,通过 LEfSe 分析比较野生型和 Cidec 敲除小鼠在属水平下的差异物种,结果如图 4 所示相较于野生型, Cidec 敲除小鼠粪便中只有 Ruminococcaceae\_UCG\_014 属丰度显著下降。

2.5 野生型小鼠及 Cidec 缺失小鼠在高脂饲料喂养前后粪便中的差异物种





通过 LEfSe 进一步分析比较同一种基因型下饮食对肠道 菌群的改变,图 5 和图 6 分别显示高脂喂养前后的野生型及 *Cidec* 缺失小鼠粪便中在属水平下显著变化的菌群,并根据 LEfSe 分析结果绘制两个基因型的肠道菌群在高脂喂养后变 化菌属的韦恩图如图 6 所示。

图 7 中黄色及蓝色圆圈的交集部分即野生型小鼠以及 Cidec 缺失小鼠在喂养高脂后粪便中丰度显著变化一致的属, 结果显示两个基因型小鼠粪便中均上升的有 Blautia 属、Oscillibacter 属、Eubacterium\_coprostanoligenes\_group 属、Ruminiclostridium属、Ruminiclostridium\_9属、Desulfovibrio 属、Faecalibaculum 属、Ruminococcaceae\_UCG\_009 属、Marvinbryantia 属、Bilophila 属、Odoribacter 属、Intestinimonas 属、Tyzzerella 属,丰度均显著下降的有 Lachnospiraceae\_NK4A136\_group 属、 Lachnospiraceae\_UCG\_001 属、Lachnospiraceae\_UCG\_009 属、 Roseburia 属、Ruminococcus\_1 属、Prevotellaceae\_UCG\_001 属。 除此之外,图 7 中只在蓝色圆圈中出现的即只在 Cidec 敲除小 鼠粪便中发现有显著变化而在野生型小鼠粪便中未发现的属 包括:Alistipes 属、Bacteroides 属、Paraprevotella 属、Streptococcus 属、Lachnospiraceae\_UCG\_006 属丰度上升。

而图 7 中只在黄色圆圈中显示的表示只在野生型小鼠未 在 Cidec 敲除小鼠粪便中发现有显著变化的属包括:Peptococcus 属和 Ruminococcus\_torques\_group 属丰度上升,Tyzzerella\_3 属、Ruminiclostidium\_6属和 A2 属丰度下降。



图 4 LEfSe 分析鉴定高脂喂养条件下 Cidec 敲除同野生型小鼠肠道菌 群显著差异的属

Fig.4 LEfSe analysis at the genus level of WT and Cidec-deficient mice





#### 3 讨论

在普通饲料喂养条件下,属水平的LEfSe结果显示相较于野生型小鼠,Cidec 敲除小鼠粪便中Prevotellacea\_UCG\_001 属丰度显著上升,Blautia 属、Streptococcus 属、Lachnospiraceae\_UCG\_006 属丰度显著下降。研究发现在通过饮食 中添加菊粉来缓解肥胖及相关疾病的实验中,Prevotellacceae\_UCG\_001 属同糖脂代谢紊乱标志物呈负相关并在这一过 程中帮助膳食纤维的发酵<sup>[22]</sup>。Blautia 属丰度的增加同糖脂代谢 的稳态呈显著正相关<sup>[23]</sup>。有研究发现,对比健康人群,在肝硬化 人群中含量增加最多的 20 种肠道菌中有 4 种属于 Streptococcus 属,提示在肝硬化发展过程中 Streptococcus 属可能扮演了 重要的角色<sup>[24]</sup>。在饮食诱导肥胖小鼠的模型中,Lach-



图 6 LEfSe 分析 Cidec 敲除小鼠在属水平下高脂饲料喂养前后的肠道 差异

Fig.6 LEfSe analysis of the changed genera in feces of *Cidec*-deficient mice after HFD

nospiraceae\_UCG\_006 属被发现同肥胖相关指数如白色脂肪组织重量、血清总胆固醇含量等呈正相关<sup>[25]</sup>。

在喂养高脂饲料后,相较于野生型,LEfSe结果显示在属 水平下,Cidec 敲除小鼠粪便中只有 Ruminococcaceae\_UCG\_014 属丰度随着饮食的改变显著下降。Ruminococcaceae\_UCG\_014 属作为已知的能够产丁酸的主要菌属<sup>[26]</sup>,能够通过提高丁酸含 量来重塑肠道菌群结构,进而有效缓解高脂饮食所导致的脂肪 肝等同肥胖相关的疾病<sup>[27]</sup>,而该菌属丰度的下降与 Cidec 敲除 后高脂条件下脂肪肝更严重的表型相吻合。

通过 LEfSe 分析进一步比较同一种基因型下饮食对肠道 菌群的改变所得结果发现,在属水平下,13 个属的丰度在两个 基因型小鼠肠道内均显著上升,6 个属的丰度均显著下降。除 此之外,有若干只在野生型或只在 Cidec 敲除小鼠肠道中有显 著变化的属,对这几个属进行进一步的分析。

只在 Cidec 敲除小鼠粪便中发现而在野生型小鼠粪便中 未发现的有显著变化的属包括 Alistipes 属、Bacteroides 属、 Parapre votella 属 Streptococcus 属 和 Lachnospiraceae\_UCG\_006 属丰度的上升。一项以中国人群作为实 验对象的研究发现高脂饮食同 Alistipes 属和 Bacteroides 属的 增加相关,且能够发现2型糖尿病患者肠道中这两个属的比例 相比于糖脂代谢正常的人群更为丰富[28]。在早期肝癌患者菌群 中发现包括 Paraprevotella 在内共 13 个属的丰度显著高于肝 硬化患者相比<sup>[29]</sup>。前文提到了 Streptococcus 同肝硬化的发生有 着内在联系<sup>[24]</sup>。而 Lachnospiraceae\_UCG\_006 属也在前文提到 了同肥胖相关指数的正相关性[25]。整体来看,高脂只在 Cidec 敲 除小鼠肠道诱导丰度显著上升的五个属在现有的研究中均发 现同代谢综合征有着正相关性。

除此之外,高脂诱导的显著变化的属只在野生型小鼠未在 Cidec 敲除小鼠粪便中观察到的包括:Peptococcus 属和 Ruminococcus\_torques\_group 属丰度上升,Tyzzerella\_3 属、Ruminiclostidium\_6 属和 A2 属丰度下降。Peptococcus 属作为条件 致病菌,常在呼吸道感染、皮下及软组织感染、龋齿等疾病中发 现<sup>[30]</sup>。Ruminococcus\_torques\_group 属能够通过降解肠道粘膜<sup>[31]</sup> 而造成胃肠道紊乱诱发炎症反应引起相关疾病如克罗恩病<sup>[52]</sup>。 Tyzzerella\_3 属在胃癌患者体内含量显著低于健康人群<sup>[33]</sup>。研究 发现高脂饮食会抑制 Ruminiclostidium\_6 属的生长<sup>[34]</sup>。对 A2 属 的研究还不够清楚,在高脂喂养后野生型小鼠高于 Cidec 缺失 小鼠的炎症反应可能与这些属有关。





在本研究中,普通饲料喂养下的 Cidec 缺失小鼠对比野生型小鼠肠道菌群多样性低但分布更均匀;高脂喂养 16 周后 Cidec 缺失小鼠同野生型小鼠肠道菌群多样性无显著差异。但 是有若干属只在 Cidec 缺失小鼠粪便中发现对比高脂前后有 显著变化,且同高脂喂养后 Cidec 缺失小鼠发生的脂肪肝及血 脂含量高等代谢综合征的生理表型相吻合。总之,缺失 Cidec 给小鼠的粪便肠道菌群的结构与组成带来了一定的影响,随着 饮食的改变,也发生了相应的变化,而这些变化同相应代谢表 型的相关性还有待进一步的验证。

#### 参考文献(References)

- DeVallance E, Branyan K W, Lemaster K C, et al. Exercise training prevents the perivascular adipose tissue-induced aortic dysfunction with metabolic syndrome[J]. Redox Biol, 2019, 26: 101285
- [2] Cani P D, Van Hul M, Lefort C, et al. Microbial regulation of organismal energy homeostasis[J]. Nat Metab, 2019, 1(1): 34-46
- [3] Fritsch J, Abreu M T. The Microbiota and the Immune Response: What Is the Chicken and What Is the Egg?[J]. Gastrointest Endosc Clin N Am, 2019, 29(3): 381-393
- [4] Liu H Y, Walden T B, Cai D, et al. Dietary Fiber in Bilberry Ameliorates Pre-Obesity Events in Rats by Regulating Lipid Depot, Cecal Short-Chain Fatty Acid Formation and Microbiota Composition [J]. Nutrients, 2019, 11(6): 1350
- [5] Christiansen C B, Gabe M, Svendsen B, et al. The impact of

short-chain fatty acids on GLP-1 and PYY secretion from the isolated perfused rat colon [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2018, 315(1): G53-G65

- [6] Behary P, Tharakan G, Alexiadou K, et al. Combined GLP-1, Oxyntomodulin, and Peptide YY Improves Body Weight and Glycemia in Obesity and Prediabetes/Type 2 Diabetes: A Randomized, Single-Blinded, Placebo-Controlled Study [J]. Diabetes Care, 2019, 42 (8): 1446-1453
- [7] Petrov P D, Garcia-Mediavilla M V, Guzman C, et al. A Network Involving Gut Microbiota, Circulating Bile Acids, and Hepatic Metabolism Genes That Protects Against Non-Alcoholic Fatty Liver Disease[J]. Mol Nutr Food Res, 2019, e1900487
- [8] Sun L, Pang Y, Wang X, et al. Ablation of gut microbiota alleviates obesity-induced hepatic steatosis and glucose intolerance by modulating bile acid metabolism in hamsters [J]. Acta Pharm Sin B, 2019, 9 (4): 702-710
- [9] Jergens A E, Guard B C, Redfern A, et al. Microbiota-Related Changes in Unconjugated Fecal Bile Acids Are Associated With Naturally Occurring, Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Dogs [J]. Front Vet Sci, 2019, 6: 199
- [10] Yang X, He F, Zhang Y, et al. Inulin Ameliorates Alcoholic Liver Disease via Suppressing LPS-TLR4-Mpsi Axis and Modulating Gut Microbiota in Mice[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2019, 43(3): 411-424

- [11] Mobarak E, Haversen L, Manna M, et al. Glucosylceramide modifies the LPS-induced inflammatory response in macrophages and the orientation of the LPS/TLR4 complex in silico [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 13600
- [12] Slayton M, Gupta A, Balakrishnan B, et al. CIDE Proteins in Human Health and Disease[J]. Cells, 2019, 8(3): 238
- [13] Xu L, Zhou L, Li P. CIDE proteins and lipid metabolism [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(5): 1094-1098
- [14] Wang J, Yan C, Xu C, et al. Polybasic RKKR motif in the linker region of lipid droplet (LD)-associated protein CIDEC inhibits LD fusion activity by interacting with acidic phospholipids[J]. J Biol Chem, 2018, 293(50): 19330-19343
- [15] Toh S Y, Gong J, Du G, et al. Up-regulation of mitochondrial activity and acquirement of brown adipose tissue-like property in the white adipose tissue of fsp27 deficient mice [J]. PLoS One, 2008, 3 (8): e2890
- [16] Zhou L, Park S Y, Xu L, et al. Insulin resistance and white adipose tissue inflammation are uncoupled in energetically challenged Fsp27-deficient mice[J]. Nat Commun, 2015, 6: 5949
- [17] Rubio-Cabezas O, Puri V, Murano I, et al. Partial lipodystrophy and insulin resistant diabetes in a patient with a homozygous nonsense mutation in CIDEC[J]. EMBO Mol Med, 2009, 1(5): 280-287
- [18] Amin M N, Hussain M S, Sarwar M S, et al. How the association between obesity and inflammation may lead to insulin resistance and cancer[J]. Diabetes Metab Syndr, 2019, 13(2): 1213-1224
- [19] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nat Methods, 2010, 7(5): 335-336
- [20] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461
- [21] Capone K A, Dowd S E, Stamatas G N, et al. Diversity of the human skin microbiome early in life [J]. J Invest Dermatol, 2011, 131(10): 2026-2032
- [22] Song X, Zhong L, Lyu N, et al. Inulin Can Alleviate Metabolism Disorders in ob/ob Mice by Partially Restoring Leptin-related Pathways Mediated by Gut Microbiota[J]. Genom Proteom Bioinf, 2019, 17(1): 64-75
- [23] Tong X, Xu J, Lian F, et al. Structural Alteration of Gut Microbiota during the Amelioration of Human Type 2 Diabetes with Hyperlipidemia by Metformin and a Traditional Chinese Herbal Formula: a

Multicenter, Randomized, Open Label Clinical Trial [J]. MBio, 2018, 9(3): e2317-e2392

- [24] Qin N, Yang F, Li A, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis[J]. Nature, 2014, 513(7516): 59-64
- [25] Li T, Gao J, Du M, et al. Bovine alpha-lactalbumin hydrolysates ameliorate obesity-associated endotoxemia and inflammation in high-fat diet-fed mice through modulation of gut microbiota [J]. Food Funct, 2019, 10(6): 3368-3378
- [26] Shao T, Shao L, Li H, et al. Combined Signature of the Fecal Microbiome and Metabolome in Patients with Gout [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 268
- [27] Wlodarska M, Willing B P, Bravo D M, et al. Phytonutrient diet supplementation promotes beneficial Clostridia species and intestinal mucus secretion resulting in protection against enteric infection [J]. Sci Rep, 2015, 5: 9253
- [28] Wan Y, Wang F, Yuan J, et al. Effects of dietary fat on gut microbiota and faecal metabolites, and their relationship with cardiometabolic risk factors: a 6-month randomised controlled-feeding trial [J]. Gut, 2019, 68(8): 1417-1429
- [29] Ren Z, Li A, Jiang J, et al. Gut microbiome analysis as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for early hepatocellular carcinoma [J]. Gut, 2019, 68(6): 1014-1023
- [30] Xu L, Chen X, Wang Y, et al. Dynamic Alterations in Salivary Microbiota Related to Dental Caries and Age in Preschool Children With Deciduous Dentition: A 2-Year Follow-Up Study [J]. Front Physiol, 2018, 9: 342
- [31] Hoskins L C, Agustines M, McKee W B, et al. Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins[J]. J Clin Invest, 1985, 75(3): 944-953
- [32] Joossens M, Huys G, Cnockaert M, et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives [J]. Gut, 2011, 60(5): 631-637
- [33] Qi Y F, Sun J N, Ren L F, et al. Intestinal Microbiota Is Altered in Patients with Gastric Cancer from Shanxi Province, China [J]. Dig Dis Sci, 2019, 64(5): 1193-1203
- [34] Tang W, Yao X, Xia F, et al. Modulation of the Gut Microbiota in Rats by Hugan Qingzhi Tablets during the Treatment of High-Fat-Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 7261619