

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.07.022

# 基于 Illumina Miseq 平台分析胆囊结石及黏膜微生物群落的多样性\*

黄洁,张捷<sup>△</sup>

(昆明医科大学第二附属医院肝胆胰外科三病区,昆明 650101)

**[摘要]** **目的** 探讨胆囊结石患者胆囊内结石及黏膜微生物群落的多样性。**方法** 选取 2014 年 1—12 月该院胆囊切除术的胆囊结石患者 60 例(病例组)和肝右前叶血管瘤患者 11 例(对照组)的胆囊黏膜样本行细菌培养,将培养结果为阴性的患者结石及黏膜进行 Illumina Miseq 测序分析。**结果** 71 例患者纳入研究,对照组中样本均未检测出微生物群落 DNA,病例组中微生物群落 DNA 提取率为 94.2%。无论样本的类型,最占优势为变形细菌门。同一类型结石患者的结石和黏膜微生物群落组成比例较为一致,而不同类型的组成差异较大。**结论** 应用 Illumina Miseq 测序分析能有效评价胆囊结石患者胆囊微生物群落的多样性。

**[关键词]** 胆囊结石;黏膜;微生物;Illumina Miseq 测序

**[中图分类号]** R657.4

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2018)07-0941-03

## Analysis on microbial community diversity in gallbladder stone and mucosa based on Illumina Miseq platform\*

HUANG Jie, ZHANG Jie<sup>△</sup>

(Third Department of Liver, Biliary and Pancreatic Surgery, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650101, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the microbial community diversity in stone and mucosa from the patients with gallbladder stone. **Methods** The gall bladder mucosal samples in 60 cases(case group) of gallbladder stone treated by cholecystectomy and 11 cases (control group) of liver right anterior lobe hemangioma in this hospital from January to December 2014 were selected for conducting the bacterial culture. The stone and mucosa in the patients with negative culture results were performed the Illumina Miseq sequencing analysis. **Results** A total of 71 cases were included in the study. The microbial community DNA in the control group samples was not detected out. The bacterial DNA detection rate of samples in the case group was 94.2%; in regardless of the type of sample, the most dominant was Phylum Proteobacteria. The composition proportion of stone and mucosal microbial community in the patients with same type of stone was relatively consistent, whereas different types of composition had large difference. **Conclusion** Using the Illumina Miseq sequencing analysis can effectively evaluate the gallbladder microbial community diversity in the patients with gallbladder stone.

**[Key words]** gallbladder stones; mucosa; microorganism; Illumina Miseq sequencing

本研究利用“下一代”测序技术(NGS),首次针对不同胆囊结石类型患者的胆囊黏膜和微生物群落的 16S rDNA 进行 Illumina Miseq 检测和分析,进一步探讨胆囊结石发病机制,现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2014 年 1—12 月在本院肝胆胰外科三病区行胆囊切除术的 60 例胆囊结石患者为病例组,分胆固醇、胆色素和混合性结石组 3 组,每组各 20 例。选取肝右前叶血管瘤切除胆囊的 11 例患者为对照组。术后胆汁培养和厌氧菌培养阳性的病例不纳入本次研究,所有样本均经病理证实。所有患者均知情同意,本研究通过医院伦理委员会批准。

### 1.2 方法

**1.2.1 采集** 完成胆囊切除术,切开并取出结石,对结石表面附着物用生理盐水冲洗。用无菌组织剪剪取胆囊黏膜 1 块,大小约 2.0 cm×2.0 cm。无菌螺口离心管收集样本,完成后立即放置于-80℃液氮瓶中储存。

**1.2.2 DNA 提取** 从-80℃的冰箱中取出样本并解冻,用无菌刀片将结石均分成 4 份。收集每份的核心部分,烘干至

37℃后粉碎,取 180~220 mg 提取细菌 DNA,余下的样本用于胆固醇含量测定;称取患者及对照者的黏膜各 180~200 mg;分别放置于 2 mL 离心管(含 200 μL 0.1 mm 氧化锆/硅珠),加入 2 mL 缓冲液 ATL(由 QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit 提供的细胞裂解液),均质化后,首先 20℃下物理破碎 2 min,6 000 r/min 离心 1 min,95℃裂解 5 min。DNA 提取的试剂使用 OMEGA E. Z. N. A. 土壤 DNA 提取试剂盒进行微生物 DNA 的提取。

**1.2.3 PCR 扩增** 使用带有样本特异标签序列(barcode)的 PCR 引物对(341F/805R),对每个样本进行 16S rRNA 基因 V3~V4 可变区进行扩增。341F 引物:CCT ACA CGA CGC TCT TCC GAT CTN(barcode)CCT ACG GGN GGC WGC AG;805R 引物:GAC TGG AGT TCC TTG GCA CCC GAG AAT TCC AGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C。其中 barcode 为各样本的条形码,用于后续 Raw Data 的分配。

**1.2.4 文库构建及 Miseq 测序** 使用 Illumina 自带的 Miseq Control Software (MCS)软件进行监控和原始数据的校检。主要包含以下 5 个步骤:制作样本数据表,解冻试剂盒,加载

\* 基金项目:云南省卫生和计划生育委员会内设机构研究基金项目(2014NS060)。 作者简介:黄洁(1981—),主治医师,博士,主要从事肝胆胰疾病的基础与临床研究。 △ 通信作者,E-mail:huangjietdg@126.com。

DNA 文库到试剂盒,上样,设置程序参数并按照 MCS 的提示进行操作和监控。

**1.2.5 细菌分类单元(Operational Taxonomic Units,OTU)的鉴定** 采用 QIIME1.9.1 软件进行分类单元的鉴定和生物多样性的评估分析。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS20.0 和 R 软件包进行数据分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用组间比较采用  $t$  检验;计数资料用率表示,组间采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。计量优势细菌 OTU 的频率可视化通过公开来源的统计软件(版本 R 2.14.2)的热图产生,使用 METAGENassist 制作热图等可视化图形。

## 2 结果

**2.1 研究样本基本情况** 3 组胆囊结石患者性别、年龄比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),胆固醇含量比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 不同类型胆囊结石患者基本条件的比较

| 组别                         | 胆固醇结石          | 胆色素结石           | 混合性结石          |
|----------------------------|----------------|-----------------|----------------|
| 男/女(n/n)                   | 6/14           | 8/12            | 9/11           |
| 年龄( $\bar{x} \pm s$ ,岁)    | 56 $\pm$ 15    | 55 $\pm$ 13     | 53 $\pm$ 12    |
| 胆固醇含量( $\bar{x} \pm s$ ,%) | 93.5 $\pm$ 2.4 | 45.5 $\pm$ 13.0 | 81.0 $\pm$ 5.6 |

表 2 样本的测序情况汇总表

| 项目                                       | 胆固醇组               |                     | 胆色素组                |                     | 混合性组                |                     |
|--|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|  | 结石                 | 黏膜                  | 结石                  | 黏膜                  | 结石                  | 黏膜                  |
| 总序列数                                     | 294 477            | 506 514             | 264 534             | 538 507             | 319 907             | 253 124             |
| 序列数/样本( $\bar{x} \pm s$ )                | 17 322 $\pm$ 9 263 | 26 659 $\pm$ 11 070 | 18 895 $\pm$ 11 608 | 28 342 $\pm$ 9 889  | 26 659 $\pm$ 13 729 | 15 820 $\pm$ 10 023 |
| OTU 数/样本( $\bar{x} \pm s$ ) <sup>a</sup> | 2 980 $\pm$ 1 524  | 6 110 $\pm$ 2 799   | 3 568 $\pm$ 2 363   | 6 480 $\pm$ 2 492   | 4 765 $\pm$ 2 678   | 3 027 $\pm$ 2 036   |
| 香农指数( $\bar{x} \pm s$ )                  | 4.78 $\pm$ 0.64    | 5.69 $\pm$ 1.06     | 5.03 $\pm$ 1.4      | 5.54 $\pm$ 1.02     | 4.92 $\pm$ 1.15     | 4.56 $\pm$ 0.74     |
| ACE 指数( $\bar{x} \pm s$ ) <sup>a</sup>   | 9 547 $\pm$ 5 435  | 27 154 $\pm$ 13 690 | 14 669 $\pm$ 10 648 | 33 960 $\pm$ 13 828 | 19 777 $\pm$ 12 265 | 13 981 $\pm$ 10 862 |
| Chao1 指数( $\bar{x} \pm s$ ) <sup>a</sup> | 6 616 $\pm$ 3 688  | 16 320 $\pm$ 7 823  | 8 866 $\pm$ 6 255   | 18 949 $\pm$ 7 415  | 11 978 $\pm$ 7 188  | 8 133 $\pm$ 5 938   |
| Good' Coverage( $\bar{x} \pm s$ )        | 0.89 $\pm$ 0.03    | 0.85 $\pm$ 0.03     | 0.88 $\pm$ 0.05     | 0.84 $\pm$ 0.03     | 0.88 $\pm$ 0.04     | 0.87 $\pm$ 0.03     |
| Simpson( $\bar{x} \pm s$ )               | 0.13 $\pm$ 0.09    | 0.07 $\pm$ 0.11     | 0.11 $\pm$ 0.1      | 0.11 $\pm$ 0.08     | 0.15 $\pm$ 0.09     | 0.13 $\pm$ 0.07     |

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$

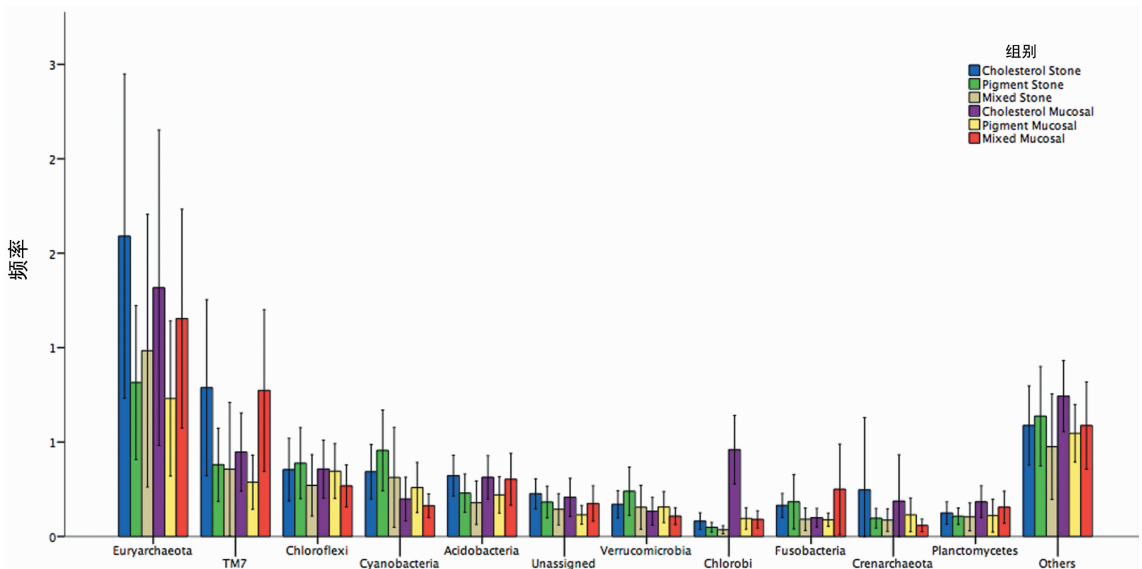


图 1 不同类型的胆结石、不同部位的属的分布(显示前 11 个属和其他)

**2.2 胆囊结石和黏膜样本的 DNA 提取结果** 对照组中未检测出细菌微生物群落 DNA。病例组结石样本中有 6 例未提取出微生物群落 DNA,1 例黏膜样本未提取出微生物群落 DNA,总微生物群落 DNA 提取率为 94.2%。

**2.3 Miseq 测序数据结果** 各组样本的测序情况,3 组 OTU 数/样本、ACE 指数、Chao1 指数比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。丰度最高的为变形细菌门(Proteobacteria),其余丰度最多的 3 个门分别为厚壁菌门(Firmicutes),拟杆菌门(Bacteroidetes)和放线菌门(Actinobacteria)。占比超过 1% 的其他稀有细菌门类群中,同一类型的结石患者的结石和黏膜成比较为一一致,而不同类型的组成差异较大,见图 1、2。

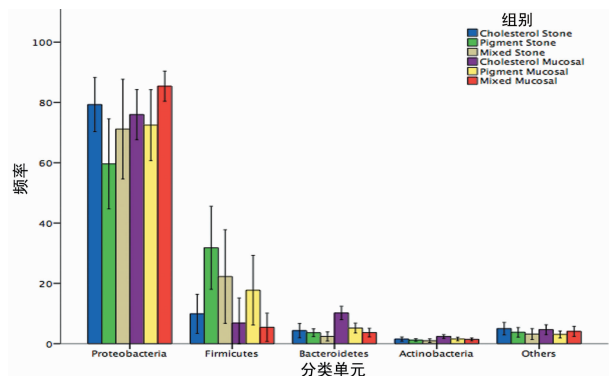


图 2 不同类型的结石黏膜优势菌门的分布

所有的样本进行热图分析,可看出样本主要分两类,结石和黏膜样本分别聚集在不同支,且在不同细菌类群上有明显差异分布。细菌分布较集中的是胆固醇结石,在大多数差异大的类群有较高的分布,而胆色素结石的细菌主要集中在 *Pseudomonas, stutzeri* 和 *Enterococcus* 类群,见图 3。

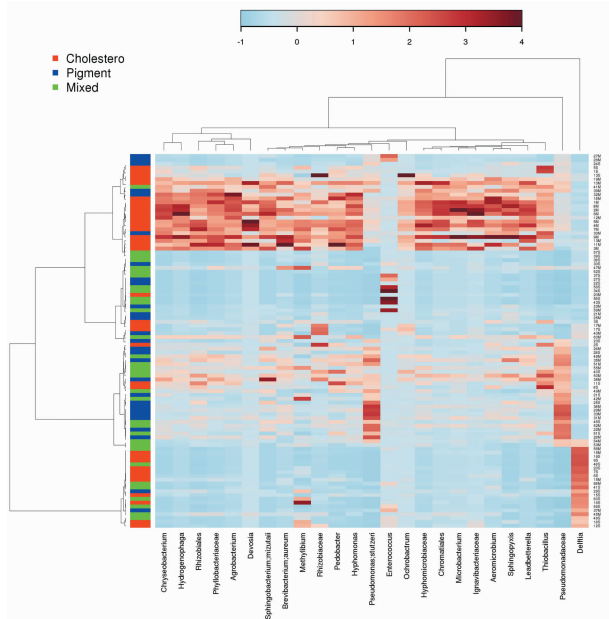


图 3 全部 OTU 水平进行热图分析

### 3 讨 论

本研究通过 Illumina Miseq 测序对胆囊内微生物群落样本进行分析,发现香农指数、Chao1 指数和 ACE 指数在不同类型结石组间,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且同一类型结石组黏膜和微生物群落 ACE 指数和 Chao1 指数差异也有统计学意义( $P < 0.05$ )。同一组内结石和黏膜样本,微生物群落菌群多样性都有明显的个体差异。总体规律为,在胆固醇结石和胆色素结石组胆囊黏膜样本的生物多样性指数显著高于其对应的结石样本,而混合性结石组则相反。

同一类型患者的结石和黏膜胆囊微生物群落多样性构成比较相似,而不同类型患者的结石和黏膜胆囊微生物群落多样性构成比差异较大。在微生物门、纲、目这些较高分类水平上结石和黏膜微生物群落多样性分布并不是很高,而在属种水平则表现出了丰富的多样性。笔者发现,由于稀有菌群比例较大,导致即使在胆固醇含量高于 90% 的胆固醇结石和黏膜中,胆囊微生物群落也显示多样性分布,且有极为复杂的群落分布。根据 Illumina Miseq 测序分析,由于个体变异性的存在可能导致胆囊微环境中的微生物群落有着极大的分散性和差异性。但由于样本量较小,还需大样本量去证实。而目前惟一能够肯定的是由于胆囊对胆汁的浓缩功能,胆汁中含有一些物质,如胆汁酸盐、胆固醇和微量元素,可作为电子受体或营养物

质支持细菌生长代谢,并使结石细菌群落表现出多样性<sup>[2-10]</sup>。

本研究尚有许多不足之处:(1)未将与胆囊微生物群落密切相关的肠道微生物群落纳入研究,进行关联分析。(2)未探讨胆囊结石形成过程中胆囊微生物群落的动态变化过程。(3)未涉及胆囊微生物群落与宿主的相互关系。

低浓度的微生物群落通过局部免疫机制对胆囊黏膜微环境产生影响,可进一步研究结石形成及发生、发展过程中胆囊微生物群落的生态作用。

### 参考文献

[1] PORTINCASA P, DI CIAULA A, WANG H H, et al. Medicinal treatments of cholesterol gallstones: old, current and new perspectives[J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(12):1531-1542.

[2] TOLLER I M, NEELSEN K J, STEGER M, et al. Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(36):14944-14949.

[3] SALAMA N R, HARTUNG M L, MUELLER A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori* [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(6):385-399.

[4] WU T, ZHANG Z G, LIU B, et al. Gut microbiota dysbiosis and bacterial community assembly associated with cholesterol gallstones in large-scale study[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1):669.

[5] 杨斌,张捷,刘斌,等.高通量测序分析胆囊结石患者基因表达谱差异[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2014, 20(9):683-685.

[6] 徐鹏,甘明宇,高谦.二代测序技术在结核分枝杆菌研究中的应用进展[J]. *微生物与感染*, 2015, 10(1):54-60.

[7] 黄飞燕,李莉,周燕,等.基于 denovo 测序分析 Bt 菌株 S3299-1 基因组特征[J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 6(2):28-29.

[8] 陈重,李多云,程航,等.一株肠致病性大肠杆菌的全基因组序列分析[J]. *中国热带医学*, 2015, 15(5):525-528.

[9] 黄继续,黄浩南.胆道感染患者 196 例胆道细菌培养及耐药分析[J/CD]. *中华普通外科学文献(电子版)*. 2014, 6(12):14.

[10] 黄洁,丁绍晖,孙敏,等.胆囊结石患者结石成分及微生物群落结构的多样性[J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 1(7):418-422.

(收稿日期:2017-06-25 修回日期:2017-08-26)

(上接第 940 页)

factor (VEGF)-loaded poly (DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol)microspheres using a solid encapsulation/single emulsion/solvent extraction technique[J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 51(3):383-390.

[11] DANHIER F, ANSORENA E, SILVA J M, et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications[J]. *J Control Release*, 2012, 161(2):505-522.

[12] SALVADOR A, SANDGREN K J, LIANG F, et al. Design and evaluation of surface and adjuvant modified PLGA microspheres for uptake by dendritic cells to improve vaccine responses[J]. *Int J Pharm*, 2015, 496(2):371-381.

(收稿日期:2017-06-26 修回日期:2017-09-06)