

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_  
U D C \_\_\_\_\_ 编号 \_\_\_\_\_

# 南方医科大学

## 硕士 学位 论文

2型糖尿病和糖尿病肾病状态下肠道菌群失衡模式研究及  
血清质谱组学分析

Study on the unbalanced pattern of intestinal flora and serum mass  
spectrometry analysis in type 2 diabetes mellitus and diabetic  
nephropathy

暴旭广

导 师 姓 名 周宏伟 教授  
专 业 名 称 劳动卫生与环境卫生学  
培 养 类 型 学术型  
论 文 提 交 日 期 2019年5月

南方医科大学 2016 级硕士学位论文

## 2 型糖尿病和糖尿病肾病状态下肠道菌群失衡模式研究及血清质谱组学分析

**Study on the unbalanced pattern of intestinal flora and serum mass spectrometry analysis in type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy**

课题来源：导师指定

学 位 申 请 人	暴旭广
导 师 姓 名	周宏伟
专 业 名 称	劳动卫生与环境卫生学
培 养 类 型	学术型
培 养 层 次	硕士研究生
所 在 学 院	公共卫生学院
答 辩 委 员 会 主 席	陈 茶 主任技师
答 辩 委 员 会 成 员	胡 波 主任技师
	林勇平 主任技师
	徐邦牢 主任技师
	曾方银 主任医师

2019 年 5 月 14 日 广州

# 2型糖尿病和糖尿病肾病状态下肠道菌群失衡模式研究及血清质谱组学分析

硕士研究生：暴旭广

指导教师：周宏伟

## 摘要

糖尿病（Diabetes mellitus, DM）是一组以长时间血清葡萄糖升高导致出现各种各样并发症的慢性疾病，主要病因是由于胰岛素缺乏和（或）胰岛素生物作用障碍导致血清葡萄糖代谢出现紊乱，可伴有脂肪、蛋白质、水、电解质等各种物质代谢障碍，糖尿病可同时并发眼底、肾脏、神经系统及心血管系统等多脏器或多系统出现慢性损害。我国人口基数大是糖尿病大国，根据今年来国际糖尿病联盟（IDF）发布的最新糖尿病数据显示，中国糖尿病患者已达 1.14 亿人左右，居世界首位。2 型糖尿病（Type 2 diabetes mellitus, T<sub>2</sub>DM）也叫成人发病型糖尿病，是一种多基因遗传性疾病，发病机制涉及多种原因，包括遗传、环境等因素，其发病原因为胰岛素抵抗和分泌不足，发病年龄多在 35~40 岁之后发病，占糖尿病患者的 90%-95%。糖尿病肾病（Diabetic nephropathy, DN）是糖尿病临床常见的三大并发症之一，在我国的发病率目前呈现出快速发展的趋势，已经成为终末期肾脏疾病非常重要的病因，仅次于临床各种病因导致的肾小球肾炎。1 型糖尿病病人出现糖尿病肾病并发症大多在起病 10~15 年左右，而 2 型糖尿病病人发生糖尿病肾病的时间则更短，可能与年龄大同时合并较多其他基础疾病有关。近年来肠道菌群的研究越来越受到人们的关注，诸多证据表明，肠道菌群在人类多种复杂疾病的发生、发展中发挥着重要作用，大量科学研究表明，健康和环境因素与肠道菌群的构成和功能变化相关，肠道菌群的可修饰性可能有助于疾病的预防和治疗。肠道菌群与糖尿病关系密切，肠道菌群可以

## 摘要

---

影响机体对糖类及能量的吸收，促进脂肪的合成及存储，肠道屏障功能障碍为细菌内毒素入侵机体血液提供了可能的途径，从而可能诱发低度炎症及胰岛素抵抗，中国人群研究显示糖尿病患者肠道菌群较健康对照组显著改变，与血糖代谢明显相关，表现为有益菌比例降低及菌种多样性的减少而潜在致病菌增多。飞行时间质谱是一种能够分析血清、尿液、唾液、组织等多种复杂样品的技术，随着技术的成熟及分析成本的降低，飞行时间质谱在基因分型分析、生物标志物鉴定、病原体鉴定、质谱成像等方面得到广泛的应用，质谱技术的发展为我们进一步研究糖尿病和糖尿病肾病患者的蛋白组学和多肽组学的变化提供了一种有效的途径。

### 研究目的和意义

观察 2 型糖尿病（Type 2 diabetes mellitus, T<sub>2</sub>DM）和糖尿病肾病（Diabetic nephropathy, DN）患者相对于健康对照人群肠道菌群失衡模式及功能变化，寻找两种疾病患者肠道菌群一致和特异性的变化信号并分析肠道菌群与血清炎症指标间的关系，同时探究 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者血清蛋白及多肽组学的特征。其意义在于分析两种疾病状态下肠道菌群的失衡模式及功能变化，尝试找出促使 T<sub>2</sub>DM 病患者进展为 T<sub>2</sub>DM 的关键危险菌株，同时建立通过肠道菌群区分 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者的分类算法模型，并通过网络分析探究对 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者肠道生态系统最具影响力的类群；通过血清质谱组学分析，建立 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者的诊断模型及鉴别诊断模型，尝试提出一种新的疾病诊断方法。

### 研究方法

1. 以南方医科大学珠江医院住院部患者为研究对象，选取 2 型糖尿病患者 30 例，糖尿病肾病患者 25 例，另外选取正常体检者 30 例作为对照，采集静脉血同时收集患者入院后 48 小时内粪便标本。
2. 采用 Illumina 高通量测序技术对粪便样本中所有细菌的 16S rDNA-V4 区进行 DNA 测序，使用 QIIME (v1.9.1) 对原始序列进行处理、分析。与 Greengenes (v13\_8) 数据库进行对比，按照 97% 的一致性操作分类单元 (operational

taxonomic unit, OTU) 聚类, 分析菌群结构及菌群多样性。

3. 采用 Roche E601 分析仪及配套试剂测定血清 IL-6, 采用 SIEMENS BNP 分析仪及配套试剂测定血清 CRP, 统计分析两种疾病与对照组差异。

4. 采用飞行质谱仪 Quan TOF (青岛融智生物) 对去除蛋白后的血清样本在 1000-10000 范围内的  $m/z$  值进行检测, 并使用 PCoA (主成分分析) 分析各组数据, 随机森林建立模型。

### 统计方法

采用 R 3.3.2 软件与 SPSS20.0 作数据统计。组间年龄比较运用 t 检验, 性别构成比运用  $\chi^2$  检验, 组间非参数检验用 Wilcoxon 秩和检验, 大于两组的非参数资料用 kruskal waills 检验, PCoA 统计学分析方法使用 Adonis, R 软件作图。P<0.05 为差异有统计学意义。

### 研究结果

2 型糖尿病和糖尿病肾病患者肠道菌群多样性与健康对照组明显不同 ( $P<0.05$ )。T<sub>2</sub>DM 和 DN 组肠道有较多一致的变化信号, 如毛螺旋菌属、柔嫩梭菌属、罗斯氏菌属和粪球菌属显著下降 ( $P<0.05$ ), 但两者间也存在疾病特异性的菌群失衡模式, T<sub>2</sub>DM 患者 Bacteroides 显著增多, DN 患者 Lactobacillus, Slackia, Anaerotruncus, Haemophilus 和 Enterococcus 显著增多。功能预测也证实, T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者肠道有较多一致性功能变化; 2 型糖尿病和糖尿病肾病组血清炎症指标显著高于健康对照, 提示 T<sub>2</sub>DM 和 DN 有益菌的减少可能是导致血清炎症指标上升的原因; 血清质谱组学分析发现 2 型糖尿病和糖尿病肾病患者血清质谱组学不同于健康对照组, 并且 2 型糖尿病和糖尿病肾病患者血清质谱组学也不相同。

### 研究结论

2 型糖尿病和糖尿病肾病患者肠道菌群存在一致的变化均为产丁酸菌减少, 但两者之间也有疾病特异性的变化, 血清质谱组学分析提示使用质谱组学分析的方法区分 2 型糖尿病、糖尿病肾病和健康对照具有一定的可行性, 为进一步

## 摘要

---

研究通过肠道菌群和血清质谱组学方法评估糖尿病患者肾病发生风险提供了数据基础。

关键词：2型糖尿病；糖尿病肾病；肠道菌群；高通量测序；质谱

# **Study on the unbalanced pattern of intestinal flora and serum mass spectrometry analysis in type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy**

**Name: Xueguang Bao**

**Supervisor: Prof. Hongwei Zhou**

## **ABSTRACT**

Diabetes mellitus (DM) is a set of long-term high blood sugar as the main features of the metabolic syndrome, which is due to a lack of insulin and (or) insulin biological function disorder lead to glucose metabolic disorder. DM, at the same time, is accompanied by fat, protein, water, electrolyte metabolic disorders, and can concurrent chronic damaging disease of organs such as eyes, kidney, nerve cardiovascular. According to the latest diabetes map released by the international diabetes federation (IDF) in 2017, the number of people with diabetes in China has reached 114 million, ranking the first place in the world. Type 2 diabetes mellitus ( $T_2DM$ ), also known as adult-onset diabetes mellitus, is a polygenic genetic disease, whose pathogenesis involves genetic and environmental factors. Its pathogenesis is insulin resistance and insufficient secretion, and its onset age is usually after 35 years old. Diabetic nephropathy (Diabetic nephropathy, DN) is one of the three major clinical common complications of diabetes. It has become the second cause of end-stage renal disease after glomerulonephritis. The incidence of diabetic nephropathy is also rising in China. Diabetic nephropathy usually occurs in patients

## ABSTRACT

---

with type 1 diabetes mellitus for about 10 to 15 years. While diabetic nephropathy occurs in patients with type 2 diabetes mellitus for a short period, which may be related to aging and many other basic diseases at the same time. Recent years, of intestinal flora got more and more attention, a lot of evidences show that gut bacteria in a variety of complex diseases play an important role in occurrence and development. Large number of scientific studies have shown that health and environmental factors associated with the structure and function changes of intestinal flora. The modification of intestinal flora may contribute to the prevention and treatment of disease. Intestinal flora closely associated with diabetes. Gut bacteria can affect body's absorption of sugar and energy, promote the synthesis and storage of fat. The intestinal barrier dysfunction for bacterial endotoxin invasion of the body's blood provides in a possible way, which could induce low-grade inflammation and insulin resistance. Chinese population studies have shown that people with diabetes intestinal flora significant change compared with healthy people. The intestinal flora associated with blood glucose metabolism, characterized that good bacteria ratio is reduced and the decrease of species diversity and potential pathogens. Time of flight mass spectrometry is a kind of a variety of complex technology, which can analyze the serum, urine, saliva, and organize. With mature of technology and decreasing analysis cost, time of flight mass spectrometry is widely used in aspects such as genotyping analysis; compose a biomarker identification, and pathogen identification. The development of mass spectrometry provides an effective way for our further study on diabetes and diabetic nephropathy in patients with changes in proteomics and polypeptide comics.

### **Research purpose and significance**

Type 2 diabetes mellitus (T<sub>2</sub>DM) and Diabetic nephropathy (Diabetic nephropathy, DN) patients compared to healthy controls group intestinal flora

imbalance pattern and function change. We are looking for two kinds of disease with intestinal flora consistent and specific changes in the signal and analyze intestinal flora and the relationship between serum inflammation indexes. At the same time, we explore the Type 2 diabetes mellitus and Diabetic nephropathy patients serum protein and peptide groups learning characteristics.

Its significance is that we are trying to find out the key dangerous strains which prompt progress for patients with type 2 diabetes mellitus to diabetic nephropathy. At the same time we set up through the intestinal flora to distinguish classification algorithm model of patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy. Through the network analysis, we also explore the most influential groups of the ecosystems in patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy. Furthermore, through the analysis of serum mass spectrometry, the diagnosis model and differential diagnosis model of type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy were established.

### **The research methods**

1. We selected from the inpatient department of Zhujiang hospital of southern medical university as the study subjects. There are 30 patients with type 2 diabetes mellitus and 25 patients with diabetic nephropathy. Meanwhile, 30 healthy subjects were selected as the control group to collect venous blood and fecal specimens within 48 hours after admission.
2. We used illumina high-throughput sequencing technology to sequence the 16S rdna-v4 region of all bacteria in fecal samples. QIIME (v1.9.1) was used to process the original sequence. Compared with the Greengenes (v13\_8) database, the operational taxonomic unit (OTU) was used to cluster to analyze the diversity and flora structure.
3. We statistically analyze the differences between the two disease groups and the

## ABSTRACT

---

control group. Serum IL-6 was determined by Roch E601 analyzer and supporting reagents. Serum CRP was determined by SIEMENS BNP analyzer and supporting reagents.

4. The m/z values in the range of 1000-10000 of the serum samples after protein removal were detected by the Quan TOF mass spectrometer ( Intelligene Biosystems of QingDao ) . We analyzed the data of each group by principal component analysis (PCoA), and then the random forest model was established.

### Statistical methods

We use software R 3.3.2 and SPSS20.0 to do the data statistics. Two independent sample t tests were used for age comparison between the two groups, and chi-square test was used for gender composition ratio. Wilcoxon rank-sum test was used for nonparametric test of the two groups. Kruskal-waiills test was used for nonparametric data greater than that of the two groups, and Adonis was used for PCoA statistical analysis. We also use R for drawing. P<0.05 was considered statistically significant.

### Results

The intestinal flora diversity of T<sub>2</sub>DM and DN patients is significantly different from the healthy control group (P<0.05). T<sub>2</sub>DM and DN patients harbored lots of similar changes. For example, there is a significant decrease in Lachnospira, Faecalibacterium, Roseburia and Coprococcus(P<0.05). However, there is also a disease-specific pattern of imbalance between the two diseases. There is a significant increase in Bacteroides in T<sub>2</sub>DM patients. However, DN patients have significant increasing in Lactobacillus, Slackia, Anaerotruncus, Haemophilus and Enterococcus. Functional prediction is also confirmed that T<sub>2</sub>DM and DN patients had more consistent changes. Serum inflammatory markers of T<sub>2</sub>DM and DN are significantly higher than those of healthy controls, which might caused by the decrease of beneficial bacteria in T<sub>2</sub>DM and DN. Serum mass spectrometry analysis reveals that

the serum mass spectrometry of patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy is different from that of healthy controls, and the serum mass spectrometry of patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy is also different.

### **Conclusion**

T<sub>2</sub>DM and DN patients have similar changes in intestinal flora----a decrease of bacteria producing butyrate. However, there is also a disease-specific change between the two diseases. The analysis of serum mass spectrometry suggests that it is feasible to distinguish type 2 diabetes mellitus, diabetic nephropathy and healthy control by using the method of mass spectrometry analysis. It also provides data basis for further study to evaluate the risk of diabetic nephropathy by intestinal flora and serum mass spectrometry.

**KEYWORDS:** Type 2 diabetes mellitus; Diabetic nephropathy; Intestinal flora;  
High throughput sequencing; Mass spectrometry

## 目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	i
前 言.....	1
第一部分 2 型糖尿病和糖尿病肾病状态下肠道菌群失衡模式研究.....	11
1.材料和方法 .....	11
2.结果 .....	16
3.讨论 .....	29
4.小结 .....	31
第二部分 2 型糖尿病和糖尿病肾病患者血清质谱组学分析 .....	33
1.材料与方法 .....	34
2.结果 .....	35
3.讨论 .....	41
全文结论.....	43
参考文献.....	44
中英文对照缩略词表.....	49
攻读学位期间成果.....	51
致 谢.....	52
南方医科大学学位论文原创性声明.....	53

## 前 言

糖尿病（DM, Diabetes mellitus）是一种全球非常普遍的疾病，是一种由于胰岛素分泌缺陷或胰岛素作用障碍所致的以持续性高血糖为特征的代谢性疾病，是一种慢性损害性疾病。持续高血糖与长期代谢紊乱等导致全身组织器官，特别是眼、肾、心血管及神经系统的损害及其功能障碍和衰竭。严重者可引起失水，电解质紊乱和酸碱平衡失调等急性并发症酮症酸中毒和高渗昏迷。糖尿病为终身性内分泌疾病，目前临幊上尚无有效的根治措施<sup>[1]</sup>，无论是生活方式干预还是药物治疗均无法彻底治愈糖尿病。因此，糖尿病现已成为目前威胁全球人类健康的最重要的慢性疾病之一。

2010 年，中国国家疾病控制中心（CDC）和中华医学会内分泌病学分会采用世界卫生组织(WHO, World Health Organization) 1999 年的诊断标准，对中国 18 岁以上人群的糖尿病患病情况进行了调查，结果显示：过去 30 年来，中国糖尿病患病率急剧增加，其中老年人、男性、城市居民、经济发达地区居民、超重和肥胖者的糖尿病患病率更高。在中国 20 岁以上的成人糖尿病患病率已为 9.7%，中国糖尿病人目前已达 9240 千万，这其中 90%-95% 是 T2DM，若同时以糖化血红蛋白（HbA1c） $\geq 6.5\%$  作为糖尿病诊断标准，则其患病率为 11.6%；根据国家卫健委最新的数据表明，我国目前有 50.1% 的成年人正处于糖尿病前期，约为 1.48 亿人，这部分人每天都有可能变成新的糖尿病患者。而根据国际糖尿病联盟（IDF, International Diabetes Federation）统计，2017 年全球糖尿病患者人数已达 4.25 亿，到 2045 年全球将会有近 6.29 亿糖尿病患者，这些调查结果表明：中国的糖尿病患者人数现已在全球位列第一。

目前我国采用 WHO(1999 年)提出的病因学分型体系对糖尿病进行分型，分型的基础主要根据病因学证据，根据这一分型体系糖尿病共分 4 型：1 型糖尿病（T<sub>1</sub>DM, Type 1 diabetes mellitus）、2 型糖尿病（T<sub>2</sub>DM, Type 2 diabetes mellitus）、妊娠糖尿病和特殊类型糖尿病。其中 T<sub>2</sub>DM 也叫成人发病型糖尿病，是一种多

## 前 言

---

基因遗传性疾病,发病机制涉及遗传和环境因素,其发病原因为胰岛素抵抗和分泌不足,发病年龄多在 35~40 岁之后发病,占糖尿病患者总数的 90%-95%。其发病的主要特征是由于  $\beta$  细胞代偿不足导致慢性胰岛素抵抗,生活方式干预是 T<sub>2</sub>DM 的基础治疗措施,应贯穿于糖尿病治疗的始终,如果单纯的生活方式干预不能实现血糖控制达标的目的,就应开始辅以药物治疗。

糖尿病肾病 (DN, Diabetes nephropathy) 属于一种微血管病变,是糖尿病最常见也是最重要的三大微血管并发症之一,是糖尿病并发症导致残疾、死亡的重要原因。在我国 DN 的发病率也呈现出逐渐上升的趋势,可能的原因是随着医疗卫生条件的改善糖尿病患者得倒规范治疗,存活时间得以延长,另外随着经济条件的改善糖尿病的发病率也明显上升,所以糖尿病导致的糖尿病慢性肾脏疾病也逐年增加。哈佛大学研究报告指出超过 10 年糖尿病史的糖尿病患者并发 DN 的发病率是 30%,而 DM 患者在并发 DN 后平均生存期为 10 年左右,在 10 年的生存期中,有约四分之一的糖尿病肾病患者会在 6 年时间内出现尿毒症,有约四分之三的糖尿病肾病患者在 10 时间内出现尿毒症<sup>[2]</sup>。肾脏血流动力学改变、遗传因素、高血糖导致的内分泌系统代谢功能紊乱、血管活性物质增加和机体血压升高等多种因素是导致糖尿病患者进展为糖尿病肾病的重要原因<sup>[3,4,5]</sup>,早期糖尿病肾脏血流量增加使糖尿病患者尿白蛋白丢失增加,另外文献报道 DN 的发病原因与遗传因素密切相关,高血糖还可通过多种机制使肾小球的基底膜变厚,另外高血压和血管活性物质代谢异常也会使部分糖尿病患者诱发 DN。组织学肾损伤已经从经典 DN 向糖尿病性慢性肾脏疾病 (DKD) 引入了变化的概念, DN 概念基于结节性或弥漫性肾小球硬化症,而 DKD 涵盖管状间质性和/或血管性病变。由于 DN 早期的临床表现隐匿导致很难引起人们注意,因此会对临床的诊断造成了一定的困难。DN 患者可出现肾脏功能不全、贫血、高血压、蛋白尿、血清低蛋白导致的水肿等临床症状<sup>[6]</sup>,因此患者确诊糖尿病后应定期到检测尿白蛋白含量,筛查频率随年龄的增大而增加。当患者有 5 年以上糖尿病史且出现视力逐渐下降、末梢循环障碍的现象时应每 3 个月进行一次尿白蛋白检测<sup>[7]</sup>。

DN 在发病过程中根据病理学特点不同进行分期，第一期为发病初期，初次确诊 DN 前三年由于肾小球的通透性增大导致患者的肾脏体积不断增大，在发病初期肾脏可通过自身代偿对水、电解质进行平衡；第二期为平静期，由于 DN 患者肾脏长时间的代偿导致肾小球结构发生变化，肾脏代偿功能无法完全维持机体正常的水、电解质平衡，患者进行少量运动后即可出现血压升高和蛋白尿；第三期为糖尿病肾病早期，患者肾小球结构破坏严重，出现大量蛋白尿，尿白蛋白排泄率轻度升高；第四期为糖尿病肾病临床期，患者糖尿病肾病临床症状明显，如可出现贫血、大量蛋白尿、水肿及高血压等症状，患者肾小球逐渐硬化从而导致功能丧失，尿白蛋白排泄率明显升高，少部分患者可能因感知本身身体状况变化出现负面心理效应；第五期为终末期肾衰竭，患者肾脏功能基本丧失因而处于严重的肾衰竭状态并逐渐发展为尿毒症<sup>[8]</sup>。大量文献报道糖尿病肾病患者处于前三期才有治疗价值，虽然目前临床尚无彻底治愈 DN 的药物，但正规治疗仍可以提高 DN 晚期患者生活质量及延长 DN 患者生存期。

研究表明糖尿病是一种自然免疫和低度炎症性疾病，血管中存在的炎症因子所导致的血流动力学的改变会导致糖尿病患者发生心脑血管并发症，主要病理原因是高血糖加重机体末梢循环功能障碍从而进一步促进动脉粥样硬化的发生发展，这被认为是糖尿病患者合心脑血管疾病的重要原因。白细胞介素 6 (IL-6) 和超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 均为炎症因子，与血管炎症反应有关并被确定为心脑血管疾病的危险因素。C 反应蛋白 (CRP) 是在肝细胞中合成的一种炎症物质，大量研究表明 C 反应蛋白水平在初诊及已确诊的糖尿病患者中显著升高，而在仅空腹血糖升高的患者中正常<sup>[9]</sup>，同时国外及国内大量文献报道表明超敏 C 反应蛋白与 2 型糖尿病的发生发展以及预后情况均有非常密切的关系<sup>[10]</sup>。hs-CRP 是心脑血管疾病的独立危险因素之一，其作为炎症物质参与了血管动脉粥样硬化过程，国内研究报道也表明住院期间的脑梗患者神经系统功能恢复不良与 hs-CRP 的水平密切相关，hs-CRP 的水平也是脑梗患者诱发心脑血管不良事件发生的独立危险<sup>[11]</sup>，究其原因，文献报道考

虑有以下几种可能性：持续高浓度的 CRP 水平表明患者体内存在动脉粥样硬化斑块的不稳定；高浓度的 CRP 水平可能激活体内凝血物质从而导致机体处于高凝状态；另外 CRP 还可能激活补体系统<sup>[12]</sup>。

白细胞介素 6 也叫白介素 6(IL-6)，属于白细胞介素家族的一种。白细胞介素 (interleukin，IL) 是一类功能和分子结构已基本明确的细胞因子，可以作用于多种细胞，最初是由白细胞产生所以得名白细胞介素。它和血细胞生长因子同属细胞因子，两者相互协调，相互作用，共同完成各种生理功能。IL 在激活细胞免疫、传递信号、介导淋巴细胞增殖与分化等各种免疫反应中起着非常重要的作用。IL 的功能主要是调节免疫反应，这种调节有来源于淋巴细胞或巨噬细胞等的许多因子参与。来源于淋巴细胞的有淋巴细胞活素，来源于巨噬细胞的称为单核因子 (monokine)，其中的各个因子的生物活性各有不同（例如巨噬细胞活化，促进 T 细胞繁殖等），因子自身的物理化学性质多不清楚。1979 年这方面的研究团体提出了在淋巴细胞活素及巨噬细胞因子 (monokine) 中，已作为一种分子提纯并弄清了性质的称为白细胞间杀菌素。最初测定的为 IL-1 和 IL-2。IL-1 属于 monokine，以前曾以淋巴细胞活化因子 (lymphocyte activating factor) 命名。细胞促进蛋白质 (mitogenic protein) 以及 B 细胞活化因子 (B cell—activating factor) 等七种名称称之。而 IL-2 属于淋巴细胞活素，以前曾以胸腺细胞刺激因子 (thymocyte stimulating factor) 、T 细胞生长因子 (T cell growth factor) 等六种名称称之。在对免疫应答的研究过程中，在丝裂原刺激的细胞培养上清中发现了许多具有生物活性的分子，研究者各以自己测得的活性进行命名，十几年报道了近百种因子。后来借助分子生物学技术进行比较研究发现，以往许多以生物活性命名的因子实际上是具有多效性的同一物质。为了避免命名的混乱，1979 年第二届国际淋巴因子专题会议将免疫应答过程中白细胞间相互作用的细胞因子统一命名为白细胞介素 (interleukin, IL)，在名称后加阿拉伯数字编号以示区别，例如 IL-1、IL-2……，新确定的因子依次命名。只有取得克隆化的基因、明确产物的性质和活性才能得到国际会议的认可。白细胞介素是非常重要的细胞因

子家族，截至 2013 年，得到承认的成员已达 29 个；它们在免疫细胞的成熟、活化、增殖和免疫调节等一系列过程中均发挥重要作用，此外它们还参与机体的多种生理及病理反应。白介素 6 是一种多肽，人类 IL-6 基因位于第 7 号染色体上；IL-6 分子量在 21~30KD 之间，其差异是由于肽链的糖基化和磷酸程度不同所致。IL-6 由 2 条糖蛋白链组成；1 条为  $\alpha$  链，分子量 80kd；另 1 条为  $\beta$  链，分子量 130kd。 $\alpha$  链缺少胞内区，只能以低亲合性与 IL-6 结合，所形成的复合物迅即与高亲和性的  $\beta$  链结合，通过  $\beta$  链向细胞内传递信息。IL-6 作用的靶细胞很多，包括巨噬细胞、肝细胞、静止的 T 细胞、活化的 B 细胞和浆细胞等；其生物效应也十分复杂，曾称为 B 细胞刺激因子 2 (bsf-2)、26KD 蛋白、B 细胞分化因子 (bCDF)、肝细胞刺激因子 (hsf) 等。白细胞介素 6 主要有以下功能：①促进 T 细胞表面 IL-2r 的表达，增强 IL-1 和 TNF 对 TH 细胞的致有丝分裂作用。②作为肝细胞刺激因子，在感染或外伤引起的急性炎症反应中诱导急性期反应蛋白的合成，其中以淀粉状蛋白 a 和 c-反应蛋白增加尤为明显。③促进 B 细胞增殖、分化并产生抗体；多发性骨髓瘤的恶变 B 细胞既能产生 IL-6，又能对 IL-6 发生应答，提示 IL-6 可能作为这些细胞的自分泌性生长因子。④IL-6 还能有效地促进 TNF 和 IL-1 诱导的恶病质；促进糖皮质激素合成；刺激破骨细胞活性和角质细胞生长；还能促进骨髓造血的功能。IL-6 不能刺激相应细胞分泌其它细胞因子，在生理浓度下对免疫细胞的自分泌作用亦比较弱，提示其主要免疫学功能是加强其它细胞因子的效果。IL-6 可由多种细胞合成，包括活化的 T 细胞和 B 细胞、单核—巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞以及成纤维细胞等。IL-1、TNF-a, PDGF、病毒感染、双链 RNA 及 cAMP 等，均可诱导正常细胞产生白介素 6。白介素 6 能够刺激参与免疫反应的细胞增殖、分化并提高其功能[4]。IL-6 在炎性瀑布反应中起重要作用，可趋化、活化中性粒细胞和单核细胞，刺激血管内皮细胞第 III 凝血因子的释放，干扰脂质代谢过程，诱导细胞凋亡，并可通过增加血管内皮细胞黏附分子的表达来加快其他炎症递质的释放，对于炎性反应发展有重要促进作用。IL-6 检测采用 Roche 公司电化学发光分析仪 601，测定原理是双抗

## 前 言

---

体夹心法，总检测时间约 18 分钟。检测过程中，先吸取待测样本和生物素化的 IL-6 单克隆抗体以及钌复合物标记的抗 IL-6 单克隆抗体一起孵育，形成夹心复合物；再加入亲和素包被的微粒进行第二次孵育，待测物与微粒通过生物素与亲和素作用相结合形成抗原抗体复合物；然后将反应体系全部吸入检测池，微粒通过磁铁吸附到电极上，未结合的物质通过洗液被去除，电极加电压后产生化学发光，通过光电倍增管进行测定，检测结果由机器自动从标准曲线上查出。

白细胞介素-6 (IL-6)采用罗氏 Cobas e601 全自动电化学发光免疫分析系统进行检测，该型号分析系统是罗氏公司于 2006 年推出的电化学发光免疫分析模块，它是由具备管理功能的管理模块和具备控制功能的控制模块连接而成，它的检测原理是电化学发光免疫分析技术。电化学发光免疫测定法 (Electrical chemiluminescent immunoassay, ECLIA) 发展于 1996 年，它的原理是在发光反应中加入了电化学反应，是继放免、酶免、化学发光免疫技术之后发展起来的新一代免疫测定技术，是电化学发光技术与免疫测定技术相结合的测定方法。电化学发光免疫分析方法包括几项关键技术：电化学发光技术、磁性微粒子固相技术和亲和素-生物素间接包被技术。电化学发光技术原理是三联吡啶钌和三丙胺(TPA) 在电极阳极表面同时失去电子发生氧化反应，2 价的三联吡啶钌标记物被氧化成 3 价的三联吡啶钌的标记物，三丙胺(TPA) 被氧化成阳离子自由基 TPA<sup>+</sup>，TPA<sup>+</sup>很不稳定，自发地失去一个质子而形成自由基 TPA<sup>\*</sup>，其为强还原剂，将一个电子传给 3 价的三联吡啶钌，使其成为激发态的三联吡啶钌，而三丙胺(TPA) 自身被氧化成氧化产物。激发态的三联吡啶钌衰减时发射一个波长为 620nm 的光子，重新形成基态的三联吡啶钌，这一过程在电极表面周而复始进行，产生许多光子。磁性微粒子固相技术是指包被抗体的载体是直径最小 (2.8μm)，表面积大而均一的微珠，微珠表面凸凹不平使包被面积极联式放大从而能包被最大量的链霉亲和素；磁珠载体悬浮于反应体系中，使异相反应成类似均相反应，大大加快反应速度，由于带有磁性，在游离标记物与结合标记物分

离时，只需用磁铁吸引，方便迅速。亲和素-生物素间接包被技术是指链霉亲和素与生物素是最特异及牢固的结合，因此可以达到牢固和均一的包被效果，一个链霉亲和素可以与四个生物素结合，可以成倍的抗原（抗体）的结合量，具有信号放大的作用，提高了检测灵敏度。白 IL-6 检测采用 Roche 公司电化学发光分析仪 601，测定原理是双抗体夹心法，总检测时间约 18 分钟。检测过程中，先吸取待测样本和生物素化的 IL-6 单克隆抗体以及钌复合物标记的抗 IL-6 单克隆抗体混匀一起孵育，形成夹心复合物，再加入亲和素包被的微粒进行第二次孵育，待测物与微粒通过生物素与亲和素作用相结合形成抗原抗体复合物；然后将反应体系全部吸入检测池，微粒通过磁铁吸附到电极上，未结合的物质通过洗液被去除，电极加电压后产生化学发光，通过光电倍增管进行测定，检测结果由机器自动从标准曲线上查出。电化学发光免疫测定法可有效的保证白细胞介素 6 检测结果的准确度和精密度。

C-反应蛋白 (C-Reactive Protein)，简称 CRP，是一类正急性时相反应蛋白，随着损伤、炎症或各类疾病的发生迅速增加，在感染性炎症或非感染性炎症过程中，它在血液中的浓度会升高。1930 年 Tillet 和 Francis 发现一种能在  $\text{Ca}^{2+}$  存在时与肺炎链球菌的荚膜 C 多糖结合的物质，这种物质被称为 C 反应素。1941 年 Avery 等人通过检测发现这种物质是一种蛋白质，故称为 C 反应蛋白(CRP)。CRP 的检测作为炎症和组织损伤的非特异性标志物大量应用于临床，近年来，由于检测技术的更新，检测的灵敏度大大提高，使 CRP 更延伸到心肌梗塞、手术创伤、放射性损伤等疾病的辅助诊断中，在临床应用领域大大增加。CRP 在肝脏中合成，正常情况下，血液中的含量极少，在机体出现感染、损伤或各种炎症时 CRP 在血液中的含量可能会升高，一般能达到达到  $20 \sim 500 \text{ mg/L}$ 。由于 CRP 的升高通常与病理变化有关，因此检测 CRP 可为疾病的诊断及疗效观察和监控提供非常重要的信息。但是 C-反应蛋白值的升高并不是特异性的，在没有完整的临床病史及其他辅助检查的情况下，不可据此做出诊断性结论。大量研究证明血液中 C-反应蛋白含量是评估心血管疾病风险的预测指标，另有研究表明与 C-反应蛋

## 前 言

---

白同时检测能提高其他评价心血管疾病的标记物对心血管疾病的预测能力。CRP 测定方法采用免疫散射比浊法，基本原理是乳胶颗粒聚苯乙烯表面包被抗 CRP 单克隆抗体，与含有 CRP 的样本混合后形成抗原抗体复合物进而产生凝集形成一定的浊度，光线通过后检测散射光的亮度，已知浓度的标准曲线比较换算成 CRP 的浓度。C 反应蛋白是由细胞因子(IL-1, IL-6, TNF)刺激肝细胞和上皮细胞，在肝细胞内持续合成的，也可由活化的吞噬细胞（巨噬细胞）释放，分泌至各种体液中。生理情况下机体每天产生 1-10mg C 反应蛋白，急性炎症时每天的合成量可大于 1000mg。C 反应蛋白半衰期为 19h，受影响因素少，不受生理活动、放化疗和激素治疗的影响，不耐热，65℃ 30min 可被破坏，不能通过胎盘，在机体血液、胸水、心包积液及关节腔液中均可检出。CRP 反应敏感快速，病理状态可升高 1-1000 倍，在急性期 6h 就可升高，约 48h 后达到峰值，随着机体恢复其浓度也快速下降。在细菌感染时 CRP 增高，而病毒感染时没有标志性升高。CRP 浓度变化与疾病进展程度同步，CRP 上升速度、幅度及持续时间与病情及组织损伤的严重程度密切相关。

CRP 测定采用免疫散射比浊法，比浊法测定技术是一种快速、自动、微量测定血浆蛋白的新手段，比浊法也分以下两大类型：直接比浊法和散射比浊法。直接比浊法是一种早期的测定技术，大多数情况下用于全自动自动生化分析仪和部分简单的即时检验（POCT, point-of-care testing）仪器，它采用一般的比浊计测定反应体系中的颗粒复合物浓度，由于是测定光线直接通过反应系统的变化量，方法比较粗糙，干扰因素比较多，不一定比原有定性方法更准确，但其方法简便，还是受到基层单位欢迎；散射比浊法是最近十几年发展起来的一种被人们广泛采用的一种探测技术，其检测结果的浓度范围，从微克/升到克/升，非常适合检测血浆蛋白，可用来检测包括脑血清、血浆、脊液和尿液等体液中的大多数蛋白物质。乳胶免疫测定法(Latex Immuno-Assay)是近些年来出现的一种微量非同位素检测技术，该方法是利用微小的乳胶颗粒 ( $1\mu\text{m}\pm$ ) 联接抗体后在反应体系中与抗原结合后形成携带乳胶颗粒的抗原抗体复合物产生一定的浊度，检测光通过后出现散射光的变化来换算成待测抗原浓度。乳胶免疫测定法利用了胶乳

颗粒结合散射法，可以大大提高血蛋白检测的灵敏度，所以这种技术成为目前血蛋白检测的标准技术。一般来说，散射法好过透射法（直接比浊法），这是因为样本的光吸收度不仅取决于复合物的浓度，还受到其交联区域的很大影响，所以由于透射法光探测技术的限制，光强度既不能太高也不能太低，所以测定范围较窄；其使用较短波长得到的结果也会明显高于使用较长波长。尤其是散射法结合使用乳胶增强技术时，其灵敏度可以提高 1000 倍以上，同时其受到非特异性反应的影响也大大减少，因而精确度和重复性皆较好。乳胶增强散射免疫比浊法还大大减少抗原过量造成的临床假阴性结果，因为动态散射法的主要优点是可以获得更宽的测定范围，通常可以覆盖到 32 或 64 倍的初始范围，可以满足各种生理或病理状态下血浆蛋白浓度的测定要求，并能将重测的要求和抗原过量的危险降到最低。此外，使用乳胶增强技术可以进一步保证减少抗原过量的危险，这些多价试剂的 Heidelberger-Kendall 曲线具有更宽的等价区，更容易保证反应条件的最优化；同时乳胶增强散射免疫比浊法还能减少内源性和外源性复合物的干扰，如溶血，黄疸，高脂血，异嗜性抗体，类风湿因子，细胞/颗粒，药物等。而由溶血，黄疸和有色药物造成的光谱干扰，都不会影响免疫比浊法的结果。而由异嗜性抗体，人抗鼠抗体（hAMA，human anti-mouse antibody），类风湿因子（RF，rheumatoid factor）等造成的干扰可以通过项目程序的优化设计将其减至最小：如采用高样本稀释度和封闭试剂等方法。由高脂血（高甘油三酯血）造成的潜在干扰可以通过以下方式将其减至最小：高样本稀释度，和/或在项目混合物中包含去污剂。最后由颗粒产生的散射光的稳定偏差可以用动力学的评价进行补偿（定时或速率）。在特定蛋白检测系统上使用的上述这些措施都是为了进一步保证蛋白检测结果的准确性，排除非特异性反应的干扰。血浆蛋白的检测具有十分重要的临床意义。在某些慢性疾病的诊断方面，血浆蛋白检测的实验室项目仍然是目前最早期的诊断指标，如慢性肾病等。随着检测技术的发展，有越来越多要求更高灵敏度的新项目被开发出来并投入到临床检验实践中，造福于广大的患者和临床专家。而生化检测仪由于使用透射比浊法，其精度受到相应的限制，最高检测灵敏度难以达到临床检测要求。

## 前 言

---

随着技术的改进，很多生化检测仪增加了免疫项目的测定，如生理浓度含量较大的免疫球蛋白和白蛋白等；大多数厂商提供的可以在生化检测仪上做的免疫项目都大同小异。但由于人体内的血浆蛋白数量众多，临床价值各异，相应的生理含量从 g/ml 到 ng/mL，形成的免疫复合物也各有特点，所以由于受限于使用的方法学，认为生化检测系统可以完成对血浆蛋白的测定任务在目前是不现实的。比较认可的专业的特种蛋白检测系统是散射法，它可以将检测灵敏度提高到 ng/mL，从而增加了很多具有独特临床价值的蛋白检测项目，如超敏 C-反应蛋白，SAA，Cystatin C，尿 a1-微球蛋白，脑脊液检测等。

C-反应蛋白（CRP）采用西门子 BN ProSpec 特定蛋白分析系统进行检测，西门子公司是全球由国际临床化学和实验室医学联盟（IFCC, International Federation of Clinical Chemistry and laboratory medicine）唯一指定的蛋白标准参考品（CRM470）生产厂家，西门子 BN ProSpec 特定蛋白分析系统是专门设计用于检测血浆蛋白的仪器，它使用经典的散射比浊法，使用蛋白检测所需的特定稀释度（1:1 到 1:64000），可以进行抗原过量检测，可以标记非特异性反应异常的样本，例如使用浊度标记（X），具有广泛的测定范围，从而系统地适用于检测广泛的血浆、血清、脑脊液和尿液等；此外，它还有专门配套设计的试剂，保证了结果的质量标准。而非特定的分析仪不是设计用于检测血浆蛋白指标，它使用更早期的吸收度改变原理，例如透射法；使用直接添加小样本量来进行稀释（不能保证反应基质的一致）；大多数没有抗原过量监测功能；标记主要设计用于临床化学指标，不能涵盖蛋白检测的要求；主要针对生化参数，所以蛋白检测菜单很少，如用于脑脊液和尿液的检测灵敏度不够要求；由于多种原因的影响，例如灵敏度不够，造成测定范围过窄等。所以一台专业的使用散射法的特定蛋白仪器既符合实验室免疫检测和临床发展的需要，也适合流程管理和质量系统的优化。本课题研究采用 BN ProSpec 特定蛋白分析系统检测分析 C-反应蛋白（CRP）能有效保证结果的准确度和精密度。

# 第一部分 2型糖尿病和糖尿病肾病状态下肠道菌群失衡模式研究

近年来，众多研究证实 2 型糖尿病（Type 2 diabetes mellitus, T<sub>2</sub>DM）患者肠道微生物的组成和结构发生了变化<sup>[13, 14]</sup>，欧洲的一项研究表明，2 型糖尿病患者肠道菌群的失衡模式表现为产丁酸菌罗斯氏菌和优杆菌属显著降低<sup>[15]</sup>。Junjie Qin 教授团队通过研究我国糖尿病患者肠道菌群发现中国糖尿病患者肠道菌群发生了紊乱，表现为产丁酸盐细菌，如柔嫩梭菌属、Clostridiales sp. SS3 / 4 及罗斯氏菌等显著降低而机会致病菌如大肠埃希菌等显著增加<sup>[16]</sup>。目前研究认为肠道菌群紊乱参与糖尿病发生发展的机制是，肠道菌群的改变导致了慢性低度炎症，进而导致胰岛素抵抗，进一步促进糖尿病的发生<sup>[17, 18]</sup>。

糖尿病肾病（Diabetic nephropathy, DN）是一种微血管病变，是 2 型糖尿病的严重并发症之一。哈佛大学研究报告指出超过 10 年糖尿病史的糖尿病患者并发 DN 的发病率是 30%，而 DM 患者在并发 DN 后平均生存期为 10 年左右<sup>[19]</sup>。目前研究认为，肠道菌群产物（如短链脂肪酸）通过影响肾素-血管紧张素系统（renin angiotensin system, RAS）影响肾脏的功能，DN 患者肠道菌群也存在产短链脂肪酸细菌减少的现象<sup>[20]</sup>。T<sub>2</sub>DM 患者和 DN 患者都存在肠道菌群的失调，但是，两者的失衡程度以及区别和联系，目前还未见研究报道。本研究通过观察 T<sub>2</sub>DM 患者和 DN 患者的肠道菌群，旨在探究两种疾病状态下肠道菌群的失衡模式及功能变化，同时建立了通过肠道菌群区分 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者的分类算法模型，并通过网络分析探究对 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者肠道生态系统最具影响力的类群。

## 1. 材料和方法

### 1.1 研究对象与样品处理

2018 年 11 月至 2019 年 2 月期间，以南方医科大学珠江医院为中心纳入 30 例 2 型糖尿病患者、25 例糖尿病肾病患者，以及 30 例健康对照，详细的人口学

信息见表一。纳入标准：住院部诊断的 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者，并纳入来院进行健康查体且身体健康、无胃肠道症状、近 1 个月内未服用抗菌药物的人群作为健康对照（Healthy control, HC）。我们采用世界卫生组织（WHO）1999 年提出糖尿病诊断标准：有糖尿病症状加随机血糖≥11.1mmol/L 或空腹血糖≥7.0mmol/L 或葡萄糖负荷后 2h 血糖≥11.1mmol/L（无糖尿病症状者改日复查）；同时根据临床症状及血清 C 肽和抗谷氨酸脱羧酶抗体（GAD）进行糖尿病分型。同时我们采用中华医学会糖尿病分会微血管并发症学组提出的工作建议作为糖尿病肾病诊断标准：在大部分糖尿病患者中出现以下任何一条者考虑其肾脏损伤由糖尿病引起：(1)大量蛋白尿，(2)糖尿病视网膜病变伴任何一期慢性肾脏病(CKD)，(3)在 10 年以上糖尿病病程的 1 型糖尿病中出现微量白蛋白尿。排除标准：患有肠道疾病或者进行过腹部手术，年龄<18 岁，处于怀孕期或哺乳期，近 1 个月内使用过抗菌药物。

疾病组于入院 48 小时内采集新鲜粪便标本，健康对照组采集当天新鲜粪便标本。无菌操作采集粪便中心部分 (10±5) g，放入无菌 EP 管后立即-80℃保存备用。采用 Minkagene Stool DNA Kit (深圳微芯生物公司) 粪便 DNA，方法如下：从-80℃冰箱中取出冻存的样本，室温下解冻半小时，使用高压无菌枪头在 2mL 的离心管中称取 100mg-200mg 固体粪便，加入 700μL Stool DNA Buffer A，充分振荡约 5min 左右，使粪便完全混匀在 Stool DNA Buffer A 中，200g 离心 1min，从中取出 50μL 上清至于新的 2mL 离心管中，再加入 Lysis-Binding Buffer 900μL 并漩涡振荡进行混匀，将金属加热板调至 90℃，待温度达到后，取样品放在金属加热板上裂解 5min，吸取上清液置于无菌的 1.5mL EP 管中。样本在进行完预处理操作程序后，在进行如下操作：1. 将磁珠混匀，取 20μL 加入样品中，漩涡器充分振荡混匀 30s 后，室温静置 4min；2. 将 EP 管置于磁力架上，室温静置 20s 后去掉上清液；3. 再加入 500μL Wash Buffer W1，漩涡再次充分振荡混匀 15s 后静置室温 3min；4. 再将 EP 管置于磁力架上，室温静置 20s 后去掉上清液；5. 然后再重复一次步骤 3-4 后尽量弃去 EP 管中所有的液体；6. 在 EP 管

中加入 750 $\mu$ L 无水乙醇，室温漩涡器充分振荡 15s 后静置 3min；7. 再将 EP 管置磁力架上，室温静置 20s 后尽量弃去 EP 管中所有液体；8. 重复一次上述步骤 6-7 后尽量弃去 EP 管中所有的液体；9. 打开 EP 管盖，将金属浴温度调节至 65℃，待温度达到 65℃后，将 EP 管置于金属浴中，干燥约 7-10min；10. 最后加入 50 $\mu$ L Elution Buffer，盖上 EP 管管盖后室温漩涡器充分振荡 60s；11. 将金属浴调节至 56℃，待温度达到 56℃，将 EP 管置于金属浴中，温浴 10min，期间需要漩涡振荡一次；12. 取出 EP 管室温漩涡器充分振荡 10s 后再置于磁力架上，室温静置 2min，收集所有上清液于收集管中，放-30℃冰箱保存。

### 1.2 16S rDNA-V4 区 DNA 扩增及测序

用提取的总 DNA 作为模板，通过实时定量 PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)扩增细菌 16S rDNA-V4 可变区。PCR 扩增体系采用 20 $\mu$ L: 2xMaster Mix (瑞士罗氏) 10 $\mu$ L, 引物各 0.4 $\mu$ L, 模板 2 $\mu$ L, 灭菌双蒸水 7.2 $\mu$ L (如果模板 DNA 浓度较低则不加灭菌双蒸水而加等体积模板)。操作步骤: 94℃预变性 2min, 94℃ 30S, 52℃ 30S, 72℃ 30S, 30 个循环，最后 72℃延伸 10min，保存在 10℃下。反应结束回收纯化产物，按照试剂盒 (IlluminaTruseqTM DNA) 说明书进行操作，对 PCR 扩增产物进行测序前准备，将纯化后的产物在 Illumina 高通量测序平台进行测序。实验阴参质控证实实验过程无污染，得到的菌群结构与以往的研究相似，以拟杆菌门、厚壁菌门、变形菌门以及放线菌门为主，说明质量可靠。

### 1.3 血清学指标检测

采用 Roche E601 仪器及配套试剂测定血清 IL-6，试剂批号 36459901；采用 SIEMENS BNP 仪器及配套试剂测定血清 CRP 和 TRF，试剂批号 167568C 和 153477E，检测时仪器误差在质量控制允许范围内。

### 1.4 检测数据处理与菌群多样性及菌群结构分析

使用 QIIME (v1.9.1) 对原始序列进行处理。与 Greengenes (v13\_8) 数据库进行对比，按照 97%的一致性进行操作分类单元 (operational taxonomic unit,

OTU) 聚类, 同时生成 BIOM 文件 (生物观察矩阵模式), 用于分析肠道菌群  $\alpha$  多样性和肠道菌群结构:  $\alpha$  多样性(alpha diversity)也称其为生境内的多样性 (within habitat diversity), 是对单个生物样本中的物种多样性进行分析。有数十种指标可用于评估肠道菌群  $\alpha$  多样性, 不同的评价指标依据其不同的意义在不同方面反应样本内物种信息, 常用的如: Chao1, 它是依据低丰度物种的个数对总体菌群多样性进行评估; Observed OTU 是依据所有物种的个数对总体菌群多样性进行评估; PD\_whole\_tree 是依据物种所覆盖的进化树范围对总体菌群多样性进行评估; Shannon 是依据物种所占比例计算其分布的平均程度, 进而对总体菌群多样性进行评估。本研究选用 Observed OTU 对样品  $\alpha$  多样性进行评估, 即只反映细菌群落物种总的数量, 而不考虑细菌群落中每个物种的丰度情况。 $\beta$  多样性(beta diversity)也被称为生境间多样性(betweenhabitatdiversity), 它反映了不同生物样本在物种多样性方面存在的差异程度的大小。通过对生物样本中各类群的含量进行分析, 计算得出不同生物样本间  $\beta$  多样性的值。这样, 每个生物样本与其他生物样本之间都形成一个距离, 所以说  $\beta$  多样性在数据形式上, 实际是高维度的距离矩阵形式。将高维度的数据距离矩阵降维处理, 使其展示在二维或者三维的空间中, 就可以直观的观察样品间的差异。 $\beta$  多样性常用的分析方法主要包括主成份分析(principal components analysis, PCA)和主坐标分析(principal coordinates analysis, PCoA)分析。前者是指是基于原始物种组成的矩阵直接进行排序分析, 而 PCoA 分析则是, 在根据由物种组成计算得到距离矩阵后在进行分析。在 PCoA 分析中, 常用的计算距离矩阵的方法包括 Bray. Curtis, Jaccard, Euclidean, unweighted UniFrac 以及 weighted UniFrac 等。本实验中, 我们使用主坐标分析的方法对高维数据距离矩阵进行降维处理后展示样本间的差异。主坐标分析是一种将研究数据相似性或者是差异性进行可视化处理的一种方法, 通过分析可以观察到研究数据的相似性和差异性。简单来说就是先对一系列数据的特征值和特征向量排序, 选择排名靠前的特征值, 然后在距离矩阵中找出最主要的坐标, 这种方法只是对数据距离矩阵进行了旋转并没有改变样品之间的相对位置。 $\beta$  多样性对样本间差异的展示方法主要是通过样本之间的

距离来实现，这个差异用 0-1 之间的数据表示，数据越偏向于 0 表示两个样本越相似，偏向于 1 表示两个样品之间的差异越大。本研究中，我们选择 UniFrac 距离<sup>[22]</sup>评估样品间的  $\beta$  多样性，根据是否对数据进行了加权，UniFrac 距离可以分为加权距离(Weighed UniFrac)和非加权距离(UnweightedUniFrac)，前者是指不仅考虑物种有无的变化，同时还考虑物种丰度的变化，而后者表示仅考虑物种有无的变化。LEfSe 是一种能够找到组间在丰度上有统计学差异物种的统计学方法<sup>[23]</sup>，其采用线性判别分析(linear discriminative analysis, LDA)来表示每个微生物丰度对组间差异影响大小的程度进行评估，实现了多个分组之间的比较，从而找出具有统计学显著差异的 Biomarker。该方法有别于传统的统计方法，LEfSe 是通过线性判别来分析多个分组之间有差异的生物标志物，该方法的本质是将高维微生物样本模式投影到最佳的鉴别矢量空间，以实现压缩特征空间维数和抽取分类信息的效果，以最小的组内距离和最大的组间距离为原则将模式样本投影在新的子空间中，即模式样本在该空间中有最佳的可分离性。采用此方法对疾病组与健康对照组有统计学差异的肠道细菌进行比较。建立模型：随机森林是一种集成的机器学习方法，利用 bootstrap 随机抽样，用给定的特征进行分类，建立多个决策树模型，通过投票得到最终分类结果。给定 OTU 数据作为特征，用 R caret 训练，建立随机森林分类模型。重复 5 次 10 倍交叉验证。模型分类效率用工作特征曲线 ROC 的曲线下面积 AUC 进行评估。肠道菌群功能预测分析：对 16s rRNA 的基因序列进行 PICRUSt<sup>[24]</sup> (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) 宏基因组功能预测。并与京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 数据库进行比对，然后对比对结果进行统计学分析。

### 1.5 统计学分析

采用 R 3.3.2 软件与 SPSS20.0 作数据统计。间间年龄比较用 t 检验，性别构成比用  $\chi^2$  检验，组间非参数检验用秩和检验，大于两组的非参数资料用 kruskal waills 检验，PCoA 统计学分析方法使用 Adonis。R 做图软件作图。P<0.05 为有统计学意义。

表 1-1 研究对象人口学信息

Tab.1-1 Demographic information of the subjects

分组	年龄（均数±标准差）	性别（男/女）	标本类型	样品例数
T <sub>2</sub> DM	62±13.3	14/16	粪便与血清	30
DN	63.7±13.3	16/9	粪便与血清	25
C	60.2±9.7	16/14	粪便与血清	30

各分组性别、年龄等一般资料差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )，具有可比性。

## 2. 结果

### 2.1 T<sub>2</sub>DM 与 DN 患者肠道菌群多样性及菌群结构

如图一，各研究组在门水平上菌群的构成情况与以往的人类肠道细菌研究相一致，各个研究组与健康对照组肠道门水平上主要的菌是厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和变形菌门 (Proteobacteria)，还有少量的梭杆菌门 (Fusobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobia) 等。健康对照组、2型糖尿病组和糖尿病肾病组肠道菌群厚壁菌门所占比例分别达到 71.7%、56.4% 和 57.1%；健康对照组、2型糖尿病组和糖尿病肾病组肠道菌群拟杆菌门所占比例分别达到 5.6%、11.8% 和 12.2%。健康对照组、2型糖尿病组和糖尿病肾病组肠道菌群放线菌门所占比例分别达到 8.6%、15.8% 和 13.1%。健康对照组、2型糖尿病组和糖尿病肾病组肠道菌群变形菌门所占比例分别达到 11.6%、14.3% 和 11.2%。健康对照组、2型糖尿病组和糖尿病肾病组肠道菌群疣微菌门所占比例分别达到 1.7%、0.8% 和 4%。健康对照组、2型糖尿病组和糖尿病肾病组肠道菌群梭杆菌门所占比例分别达到 0.3%、0.2% 和 0.7%。厚壁菌门与拟杆菌门的比值 (厚壁菌门/拟杆菌门) 常用来评估肠道菌群门水平上的变化，本研究中 2型糖尿病组和糖尿病肾病组厚壁菌门与拟杆菌门的比例要低于健康对照组，2型糖尿病组厚壁菌门与拟杆菌门的比例要高于糖尿病肾病组。

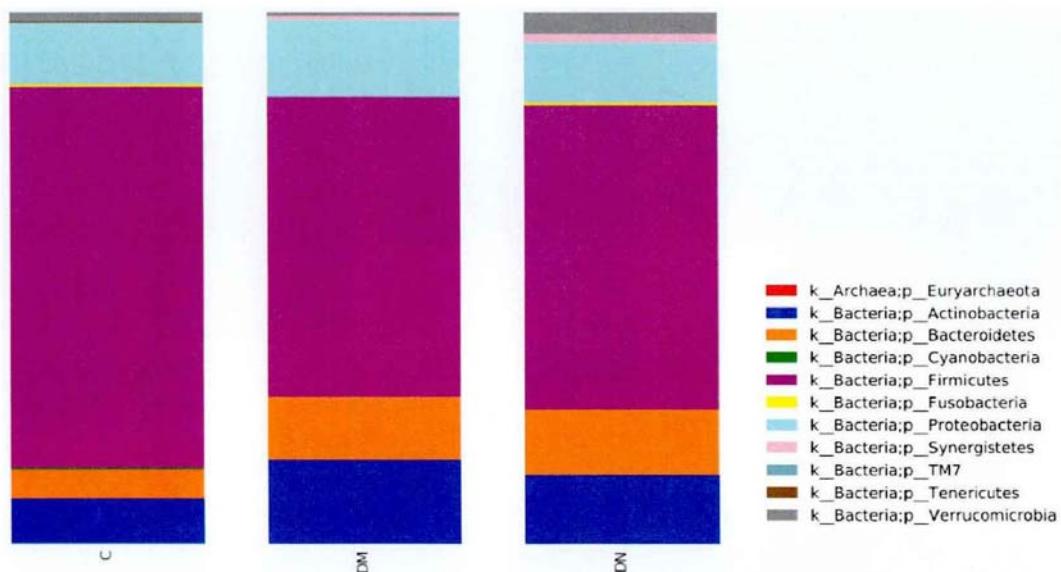


图 1-1 T<sub>2</sub>DM 与 DN 和健康对照肠道菌群门水平构成 (DM: 2 型糖尿病, DN: 糖尿病肾病, C: 健康对照)

Fig.1-1 Composition of phylum level intestinal flora component in each disease group and healthy control group ( DM: Diabetes mellitus, DN: diabetic nephropathy, control: healthy control)

如图二,选用 Observed OTU 和 PD\_whole\_tree 指数评估 2 型糖尿病患者和糖尿病肾病患者相对于健康对照组  $\alpha$  多样性的变化,发现 2 型糖尿病组和糖尿病肾病组肠道菌群  $\alpha$  多样性较健康对照组显著降低 ( $P<0.05$ ) ,而 2 型糖尿病和糖尿病肾病患者肠道菌群  $\alpha$  多样性无统计学差异。PD\_whole\_tree 指数显示, T<sub>2</sub>DM 和 DN 与健康对照有统计差异, T<sub>2</sub>DM 和 DN 无统计学差异。

如图三,选用主坐标分析 (PCoA) 可以观察到 2 型糖尿病患者和糖尿病肾病患者是否存在菌群的整体偏移。图中的每个点代表一个样品,点之间的距离表示菌群结构的差异,本研究中,我们使用这种方法基于 Unifrac 距离<sup>[24]</sup>分析各研究组肠道菌群相对于健康对照以及 2 型糖尿病和糖尿病肾病患者肠道菌群的偏移是否存在统计学差异,基于 Weighted unifrac 距离, 2 型糖尿病组和糖尿病肾病组肠道菌群结构与健康对照组均存在统计学差异 ( $P<0.05$ ), 2 型糖尿病和糖尿病肾病两组间肠道菌群结构不存在统计学差异 ( $P>0.05$ )。

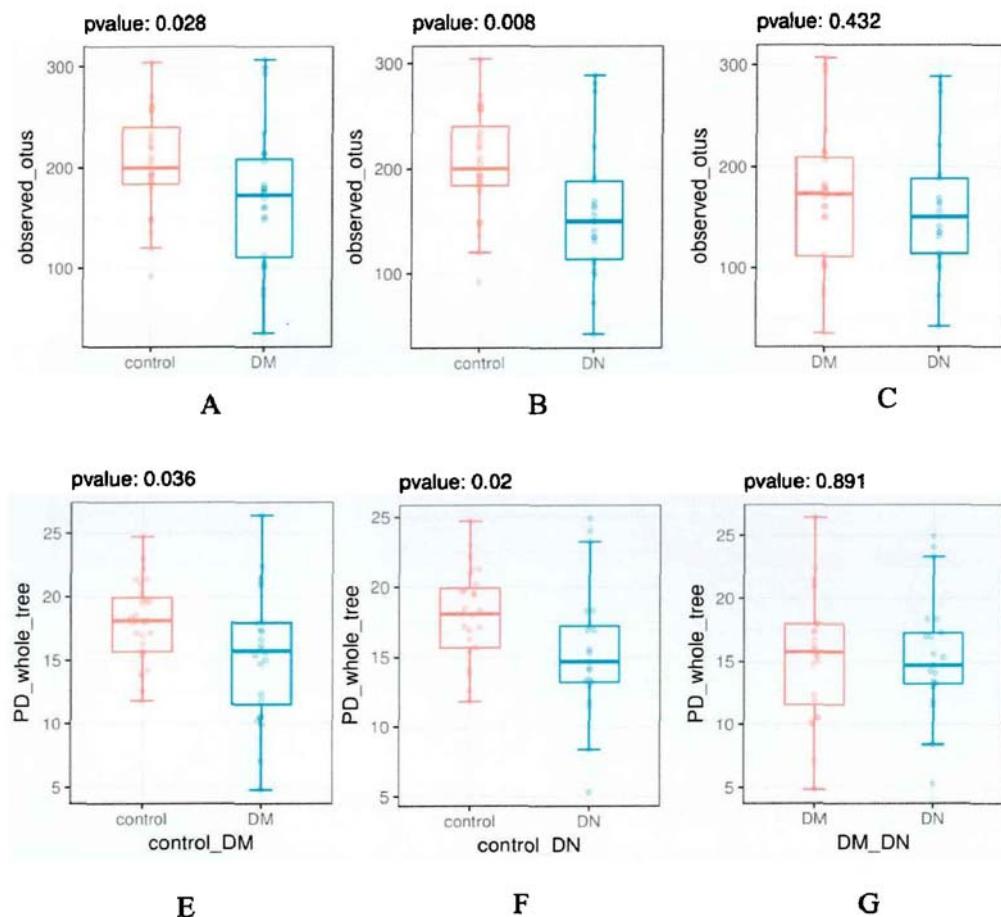


图 1-2 a 多样性对比: (observed\_otu: A : 2 型糖尿病与健康对照; B: 糖尿病肾病与健康对照; C: 2 型糖尿病与糖尿病肾病。PD\_whole\_tree: E: 2 型糖尿病与健康对照; F: 糖尿病肾病与健康对照; G: 2 型糖尿病与糖尿病肾病。)

Fig . 1-2 Comparison of intestinal flora  $\alpha$  diversity in each disease group and healthy control group (observed\_otu: A, Type 2 diabetes mellitus from healthy control B,Diabetic nephropathy from healthy control C,Diabetic nephropathy from Type 2 diabetes mellitusdiversity.  
 PD\_whole\_tree: E, Type 2 diabetes mellitus from healthy control F,Diabetic nephropathy from healthy control G,Diabetic nephropathy from Type 2 diabetes mellitusdiversity.)

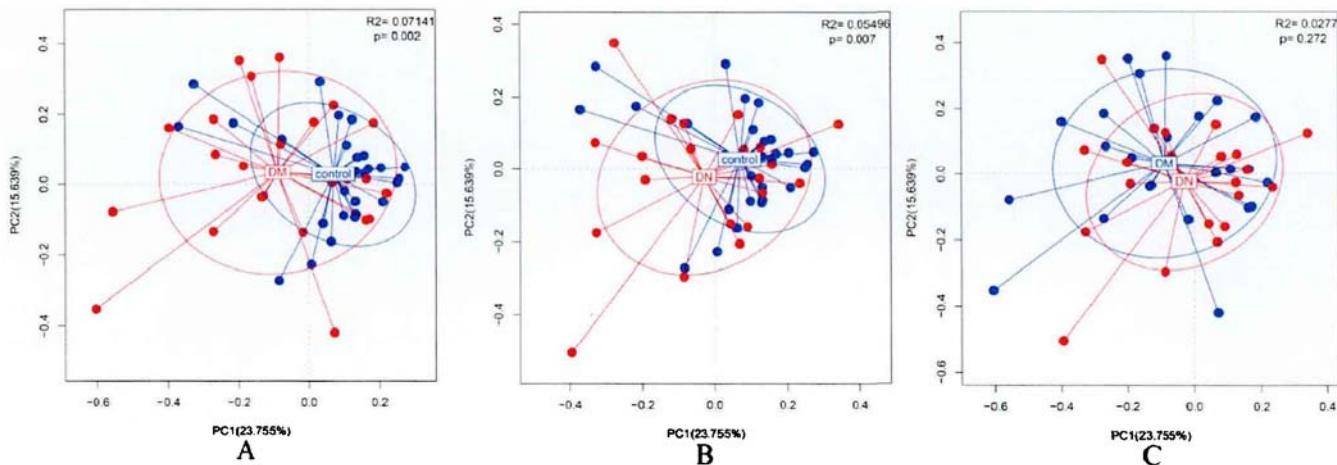


图 1-3  $\beta$  多样性对比 (A: 2 型糖尿病与健康对照; B: 糖尿病肾病与健康对照; C: 2 型糖尿病与糖尿病肾病)

Fig.1-3 Comparison of intestinal flora  $\beta$  diversity in each disease group and healthy control group (A, Type 2 diabetes mellitus from healthy control B,Diabetic nephropathy from healthy control C,Diabetic nephropathy from Type 2 diabetes mellitusdiversity.)

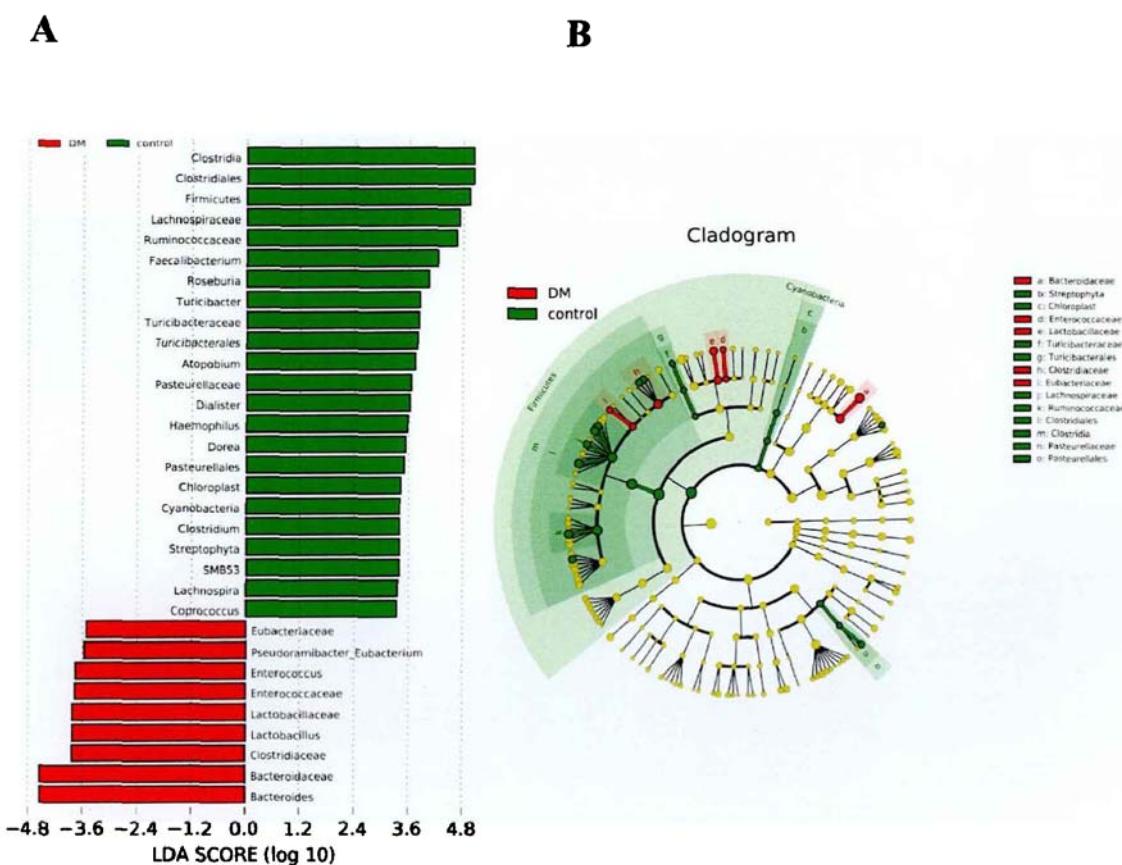
## 2.2 $T_2DM$ 与 DN 患者肠道菌群一致的变化信号与疾病特异性失衡模式

LEfSe 分析各研究组肠道菌群变化特征,发现 2 型糖尿病组和糖尿病肾病组肠道菌群存在很多一致的变化,且这些一致的变化信号多表现为有益菌的减少,如图四 A 和 C,在门水平上,厚壁菌门和蓝藻细菌门在糖尿病组和糖尿病肾病组肠道中显著减少,在属水平上,毛螺旋菌属 (*Lachnospira*)、*Turicibacter*、柔嫩梭菌属 (*Faecalibacterium*)、罗斯氏菌 (*Roseburia*) 和粪球菌属 (*Coprococcus*) 在糖尿病组和糖尿病肾病组肠道中显著减少 ( $P<0.05$ )。科水平上,毛螺旋菌科 (*Lachnospiraceae*) 在糖尿病和糖尿病肾病患者肠道中显著减少 ( $P<0.05$ ),乳杆菌科 (*Lactobacillaceae*) 在  $T_2DM$  和 DN 患者肠道中显著增多 ( $P<0.05$ ),是在两种疾病间一致增多的信号。

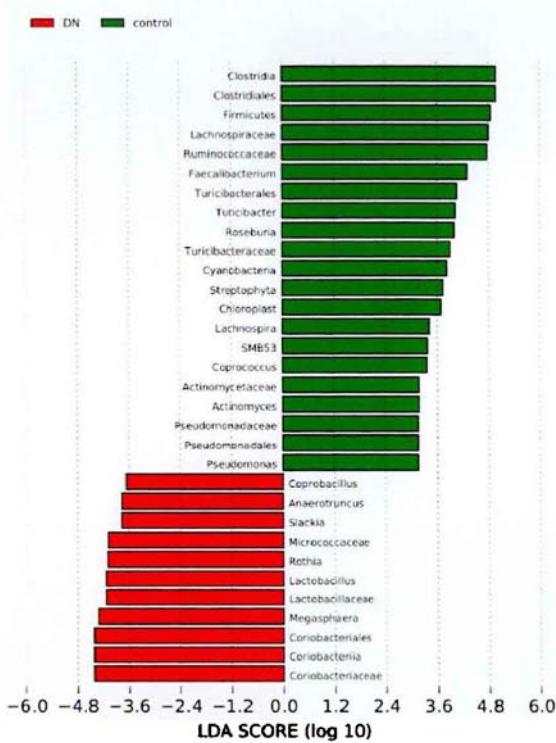
虽然 2 型糖尿病和糖尿病肾病两组间肠道菌群存在一致的变化信号,但同时也有其特异性的菌群失衡模式。如图四 B,在属水平上,肠球菌属

(*Enterococcus*) 在 2 型糖尿病组中显著增多，而奇异菌属 (*Atopobium*)、小类杆菌属 (*Dialister*)、梭菌属 (*Clostridium*)、*Dorea* 显著降低。如图四 D，在属水平上，糖尿病肾病组与健康对照组相比，粪芽孢菌属 (*Coprococcus*)、*Anaerotruncus*、*Rothia*、*Slackia* 显著增多 ( $P<0.05$ )。

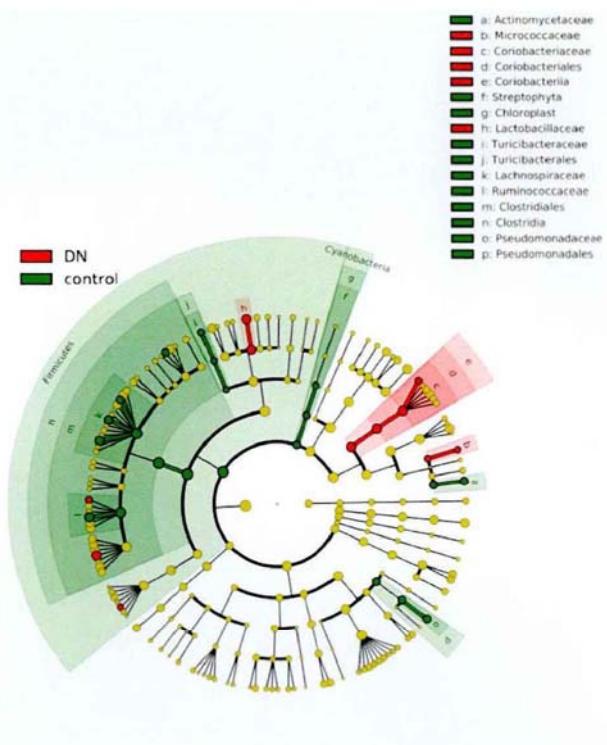
我们进一步分析了 2 型糖尿病和糖尿病肾病肠道菌群的差异，如图四 E 和 F，发现相对于 2 型糖尿病组，糖尿病肾病组肠道有更多的伊格尔兹氏菌 (*Eggerthella*)、奇异菌属 (*Atopobium*)、韦荣氏球菌科 (*Veillonellaceae*)、*Synergistaceae*、红蝽菌科 (*Coriobacteriaceae*) 及互养菌门 (*Synergistetes*)，提示这些菌可能是糖尿病患者发生糖尿病肾病的危险菌株。



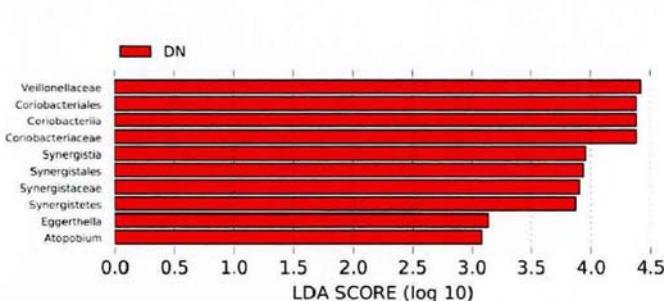
C



D



E



F

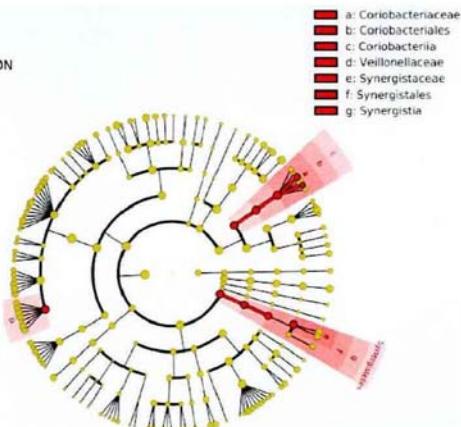


图 1-4 LEfSe 统计比较各组间差异菌属 (A 和 B: 2 型糖尿病与健康对照; C 和 D: 糖尿病肾病与健康对照; E 和 F: 2 型糖尿病与糖尿病肾病)

Fig.1-4 Differential gut bacterial determined by linear discriminant analysis effect size (A and B: Type 2 diabetes mellitus from healthy control; C and D: Diabetic nephropathy from healthy control; E and F:Diabetic nephropathy from Type 2 diabetes mellitusdiversity)

### 2.3 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者肠道菌群分类模型

以 2 型糖尿病组和糖尿病肾病组以及健康对照组肠道菌群数据分别建立能够区分 2 型糖尿病与健康对照和糖尿病肾病与健康对照的分类算法模型，如图五，相应的 AUC 分别达到 89.90% 和 92.44%，各个疾病模型均能较好的区分疾病组与健康组。同时，我们进一步观察了对建立各个疾病分类模型贡献较大的 OTU，如图六，在对建立 2 型糖尿病疾病和健康对照的分类模型贡献最大的前十个 OTU 中有五个属于毛螺旋菌科。在对建立糖尿病肾病和健康对照的分类模型贡献最大的前十个 OTU 中有五个属于毛螺旋菌科，两个属于瘤胃球菌科。提示以有益菌的减少作为疾病模型的分类参考，能获得准确性较高的分类模型。

通过前面的分析我们发现，T<sub>2</sub>DM 患者和 DN 患者有疾病特异性的肠道菌群结构失衡模式，那么是否可以通过肠道菌群建立区分 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者的算法分类模型呢？我们使用 T<sub>2</sub>DM 和 DN 肠道菌群数据建立里能够区分 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者的算法分类模型，如图五 C，模型 AUC 为 93.5%，通过此模型能很好的区分 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者。图七展示了，对建立此模型贡献最大的前十个 OTU，包括两个肠杆菌科的 OTU: 614182 和 782953; 两个瘤胃球菌科: 207126 和 175148; 三个毛螺旋菌科: 186022、190502 和 125624。

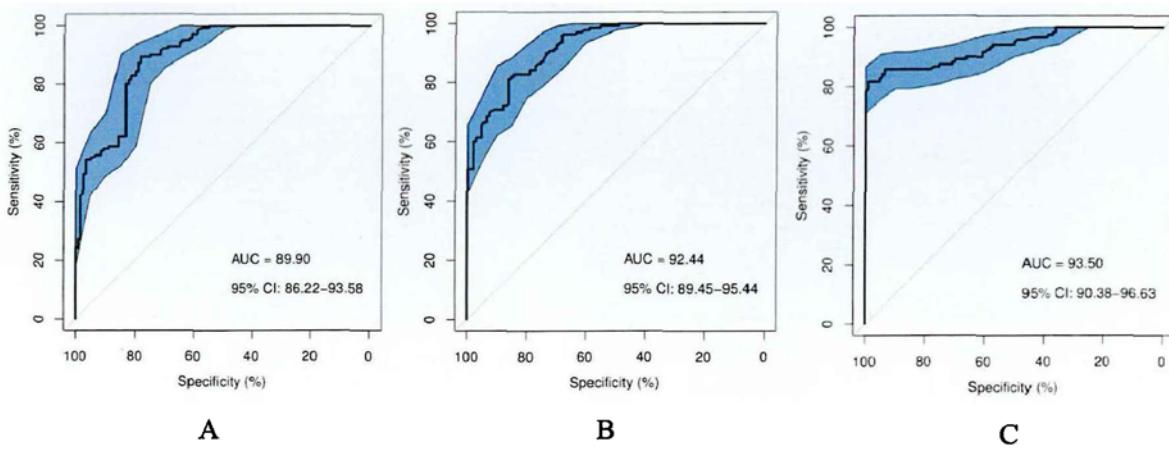


图 1-5 随机森林方法建立模型(A: 区分 2 型糖尿病和健康对照的分类模型；B: 区分糖尿病肾病与健康对照的分类模型；C 区分 2 型糖尿病和糖尿病肾病的模型)

Fig.1-5 Prediction model (A : classification model to distinguish Type 2 diabetes mellitus from

healthy control . B: classification model to distinguish diabetic nephropathy from healthy control . C: classification model to distinguish diabetic nephropathy from Type 2 diabetes mellitus .)

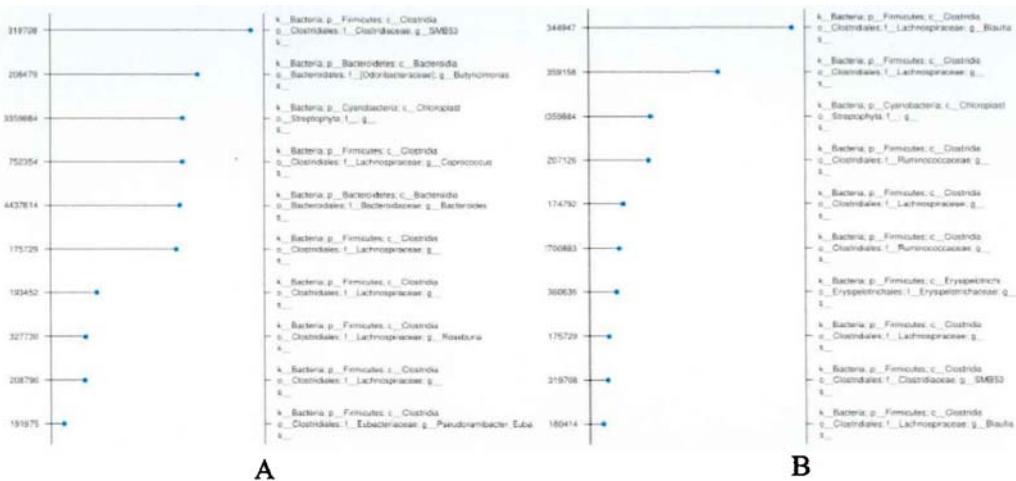


图 1-6 对建立疾病分类模型贡献最大的前 10 个 OTU (A: 区分 2 型糖尿病和健康对照的建模 OTU; B: 区分糖尿病肾病与健康对照的建模 OTU)

Fig.1-6 The top 10 OTU that contributed the most to the establishment of the disease classification model(A:The top OTU to distinguish type 2 diabetes mellitus from healthy control ; B: The top OTU to distinguish diabetic nephropathy from healthy control )

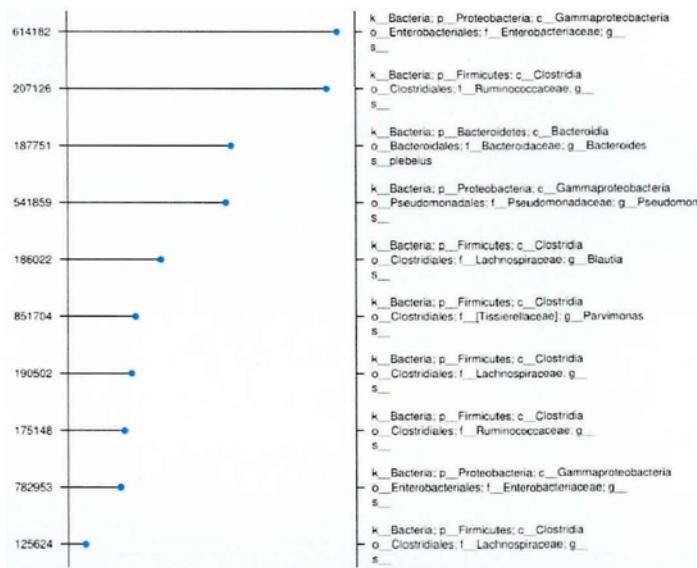


图 1-7 对区分 T<sub>2</sub>DM 和 DN 算法模型贡献最大的前十個 OTU

Fig.1-7 The top 10 OTU that contributed the most to distinguish T<sub>2</sub>DM and DN

## 2.4 T<sub>2</sub>DM 与 DN 患者肠道菌群网络分析

人类肠道中单个类群会影响到整个肠道菌群生态系统<sup>[13-15]</sup>，因此我们使用网络分析<sup>[28]</sup>寻找对 2 型糖尿病和糖尿病肾病患者肠道生态系统最具影响力的类群，我们使用两个参数对网络中的节点（菌）进行评估：度中心性（Degree Centrality）：与一个节点直接相连的节点的个数，包括点入度和（Indegree）点出度（Outdegree），点出度是指从此节点发出的边的个数。中介中心性（Betweenness Centrality）：是指网络中经过某点并连接这两点的最短路径与这两点之间的最短路径线总数之比。在菌群网络中具有高点出度中心性（即，能影响较多的菌）和低中介中心性（即，不受其他菌的影响）的菌被认为是对整个菌群网络影响力越大的菌。我们发现在 2 型糖尿病患者肠道中对整个菌群生态网络影响力较大的类群依次是：*Salmonella*, *Anaerococcus*, *Cloacibacillus* 和 *Neisseria*。在糖尿病肾病患者肠道中对整个生态系统影响力较大的类群依次是：*Aggregatibacter*, *Catenibacterium*, *Salmonella* 和 *lachnospira*。在菌群网络中具有较大影响力的大部分类群与在 2 型糖尿病和糖尿病肾病患者肠道中增加或减少的菌并不相同。*Salmonella* 在 2 型糖尿病和糖尿病肾病患者肠道菌群网络中都占有重要的作用。综合上面的分析，T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者肠道菌群的失衡模式总结如表 1-2。

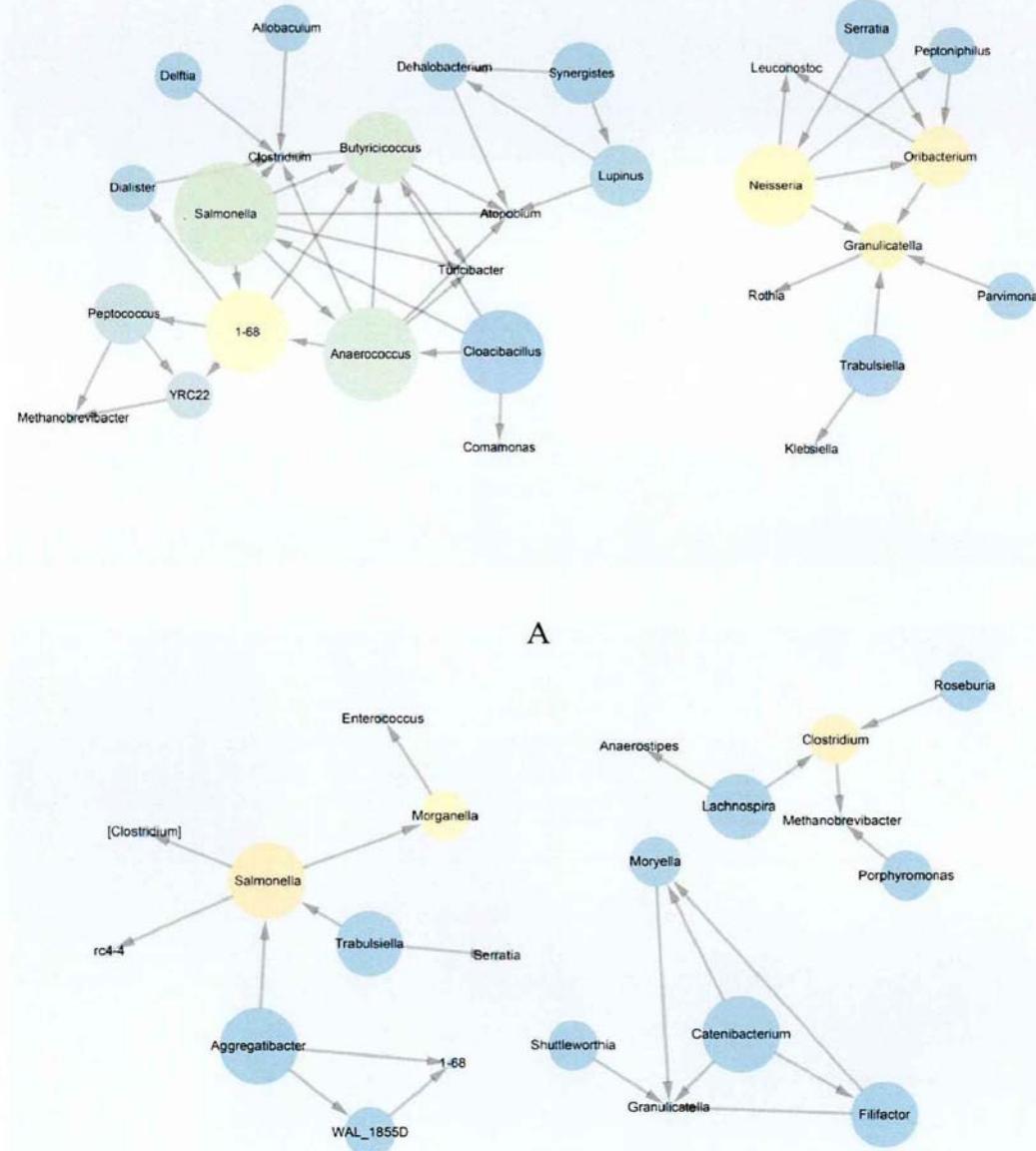


图 1-8 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者肠道菌群网络分析：A 2 型糖尿病患者；B 糖尿病肾病患者

Fig . 1-8 Network analysis of intestinal flora in T<sub>2</sub>DM and DN (Betweenness Centrality: keystone species within each ecosystem, low values to dark colors. Outdegree: number of edges originating in a node, low values to small sizes. A: T<sub>2</sub>DM intestinal flora network . B: DN intestinal flora network)

表 1-2 T<sub>2</sub>DM 与 DN 患者肠道菌群变化一致和特异性信号

Tab. 1-2 The changes of intestinal flora in T<sub>2</sub>DM and DN

patients were consistent and specific

Taxonomy	T <sub>2</sub> DM	DN
Lachnospiraceae		
<i>Lachnospira</i>		
<i>Faecalibacterium</i>		
<i>Roseburia</i>		
<i>Coprococcus</i>		
Lactobacillaceae		
<i>Lactobacillus</i>		
<i>Megasphaera</i>		
<i>Enterococcus</i>		
<i>Atopobium</i>		
<i>Clostridium</i>		
<i>Coprobacillus</i>		
<i>Anaerotruncus</i>		
<i>Slackia</i>		

注：红色：相对于 HC 增多的菌，蓝色：相对于 HC 减少的菌，灰色表示无变化的菌

## 2.5 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者肠道菌群功能变化

通过功能预测对各个疾病肠道菌群功能相对于健康对照的变化进行分析，2型糖尿病组和糖尿病肾病组有较多一致的功能变化，在2型糖尿病组和糖尿病肾病组肠道中萘降解、氨基糖和核苷糖代谢、谷胱甘肽代谢、蛋白质折叠和相

关处理和链霉素生物合成功能显著增强 ( $P<0.05$ )，甘油磷酸酯代谢、细菌趋药性、信号传导机制、细胞骨架蛋白、孢子形成和泛酸盐和辅酶 A 生物合成在 2 型糖尿病和糖尿病肾病患者肠道中显著下降 ( $P<0.05$ )。而糖尿病肾病相较于糖尿病患者肠道中糖异生、鞘糖脂生物合成、糖基转移酶、三羧酸循环、色氨酸代谢、缬氨酸亮氨酸和异亮氨酸降解、脂多糖生物合成蛋白及脂多糖生物合成、聚糖生物合成、氨基苯甲酸酯降解、细菌毒素、糖胺聚糖降解、无机物的运输和代谢、细胞运动和分泌、金黄色葡萄球菌感染、丙酸代谢、膜和细胞内结构分子、霍乱弧菌感染、磷酸转运系统、抗坏血酸和醛酸代谢和香叶醇代谢等功能显著增强，而硫胺素代谢、卟啉代谢、赖氨酸生物合成、苯丙素生物合成、RNA 转运、钙信号通路、苯丙氨酸酪氨酸和色氨酸生物合成和甲烷代谢功能显著下降 ( $P<0.05$ )。

## 2.6 T<sub>2</sub>DM 和 DN 血清炎症指标

血清白介素 6 (IL-6) 和血清 C 反应蛋白 (CRP) 可反映患者全身的炎症情况<sup>[29, 30]</sup>，我们对比了 2 型糖尿病组和糖尿病肾病组血清白介素 6 和 C 反应蛋白的浓度，如图九，发现与健康对照相比，糖尿病肾病组血清白介素 6 和血清 C 反应蛋白显著高于健康对照组 ( $P<0.05$ )，同时，2 型糖尿病组血清白介素 6 和血清 C 反应蛋白也显著高于健康对照组 ( $P<0.05$ )。

我们进一步探究了血清两种炎症指标与肠道菌群的关联性，如图 1-9，红蝽菌科 (Coriobacteriaceae) 与血清 IL-6 和 CRP 两种指标呈现出正相关；而 Lachnospiraceae、Roseburia、Streptophyta、Clostridium 和 Veillonellaceae 与血清 IL-6 和 CRP 两种指标呈现出负相关关系。此外 [Clostridium] 和 Acidaminococcus 与血清 IL-6 水平呈现出正相关的关系；Blautia、Coprococcus 和 Haemophilus 与血清 IL-6 水平呈现出负相关的关系。Faecalibacterium、Erysipelotrichaceae 和 *Lachnospira* 与血清 CRP 呈现出负相关关系。

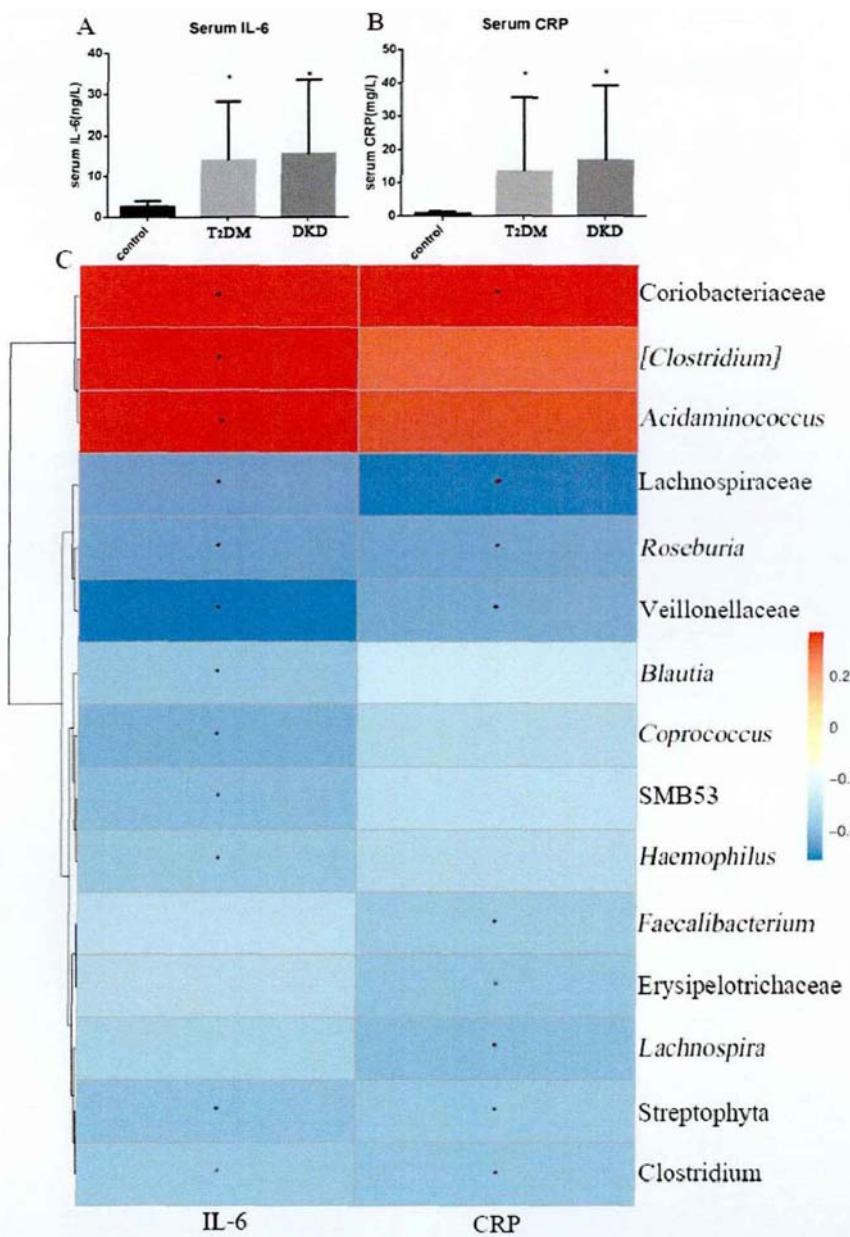


图 1-9 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者血清炎症指标和菌群相关性分析, A: 血清 IL-6, B: 血清 CRP, C: 相关性分析, \* : P<0.05

Fig. 1-9 Correlation analysis of serum inflammatory indicators and bacterial flora in Type 2 diabetes mellitus and Diabetic nephropathy patients (A: serum CRP. B: serum IL-6. C: correlation analysis. \* : P<0.05)

### 3. 讨论

本研究通过对 2 型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus, T<sub>2</sub>DM) 和糖尿病肾病 (Diabetic nephropathy, DN) 患者肠道菌群的研究发现, T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者肠道菌群与健康对照相比  $\alpha$  多样性指数显著降低, 这与 J.F.Tanti 等研究报道相一致 [31]。由于代谢性疾病的菌群失衡模式受地区因素影响较大, 不同地区代谢性疾病患者肠道菌群的失衡模式存在差异<sup>[32]</sup>, 也有研究发现糖尿病患者肠道菌群  $\alpha$  多样性升高的现象<sup>[33]</sup>。此外, 众多研究报道糖尿病患者肠道菌群厚壁菌门比例下降, 而拟杆菌门比例上升<sup>[34, 35]</sup>, 本研究中 2 型糖尿病患者和糖尿病肾病患者肠道菌群厚壁菌门/拟杆菌门的比例要低于健康对照组, 且这个比例在糖尿病肾病患者肠道中更低。但 PCoA 分析发现 2 型糖尿病患者和糖尿病肾病患者肠道肠道菌群结构无统计学差异, 这可能是因为 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者肠道菌群除厚壁菌门/拟杆菌门比例外, 其他变化都比较相似, 如, 在门水平上, 厚壁菌门和蓝藻细菌门在 2 型糖尿病和糖尿病肾病患者肠道中显著减少, 在属水平上, 毛螺旋菌属、柔嫩梭菌属、罗斯氏菌和粪球菌属在 2 型糖尿病和糖尿病肾病患者肠道中显著减少, 在科水平上, 乳杆菌科在 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者肠道中显著增多( $P<0.05$ ), 这些变化也多被之前的研究所报道, F.H.Karlsson 等发现, 在糖尿病患者肠道菌群中出现 *Lactobacillus* sp. 的富集和 *Clostridium* sp. 的减少[36], Junjie Qin 等研究发现糖尿病患者肠道菌群中产丁酸盐细菌如柔嫩梭菌属 (*Faecalibacterium*) 、*Clostridiales* sp. SS3 / 4 及罗斯氏菌属 (*Roseburia*) 等显著降低, 而机会致病菌如多枝梭菌、共生梭菌、粪拟杆菌、迟缓埃格特菌及大肠埃希菌显著增加; Kasahara, K 等的研究发现高植物多糖饮食加罗斯氏菌的定植使肠道中的丁酸水平升高, 进而减少血清及主动脉的炎症因子水平在一定程度上减少动脉粥样硬化斑块大小<sup>[37]</sup>, 本课题组的研究也发现间歇性饮食大鼠肠道内罗斯氏菌的上升<sup>[38]</sup>。在肠道菌群功能变化方面 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者也存在众多的一致变化, 如萘降解、氨基糖和核苷糖代谢、谷胱甘肽代谢、蛋白质折叠和相关处理和链霉素

生物合成功能显著增强，甘油磷酸酯代谢、细菌趋药性、信号传导机制、细胞骨架蛋白、孢子形成和泛酸盐和辅酶 A 生物合成的显著下降，提示，T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者肠道菌群功能变化较为相似。

虽然 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者肠道内有较多一致的变化信号，但两者的菌群失衡模式仍然存在差异。如，在属水平上，肠球菌属在糖尿病组中显著增多，而奇异菌属、小类杆菌属、梭菌属、*Dorea* 显著降低。在属水平上，糖尿病肾病组与健康对照组相比，粪芽孢菌属等特异性增多。通过对比 T<sub>2</sub>DM 和 DN 的菌群变化我们发现，糖尿病肾病有更多的伊格尔兹氏菌、奇异菌属、韦荣氏球菌科、红蝽菌科及互养菌门，提示，这些菌可能是糖尿病患者发生糖尿病肾病的危险菌株。此外，我们建立的区分 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者的算法模型，该模型的优势在于 AUC 较高，达到 93.50%，能很好的区分 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者。对模型贡献最大的 OTU 包括肠杆菌科、瘤胃球菌科、*plebelus*、假单胞菌属和布劳特氏菌属等，说明通过 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者肠道菌群特异性的菌群失衡模式，能够对 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者进行鉴别诊断。当然，本模型没有排除研究对象 BMI、初发年龄等因素的影响，此外，模型也没有在其他队列中进行验证，进一步的研究需要排除混杂因素的影响，并在较大规模的人群队列中对模型进行验证。同时，网络分析发现，对 2 型糖尿病和糖尿病肾病患者肠道生态系统最具影响力的类群也不相同，进一步证实两者菌群失衡模式的不同。

宿主本身不能吸收的部分碳水化合可经过肠道菌群分解代谢转化为短链脂肪酸（Short Chain Fatty Acids, SCFAs），短链脂肪酸不仅能为宿主提供能量，而且能为细菌生长和繁殖提供所需的营养物质，此外，短链脂肪酸能通过改善肠道的酸性环境来抑制有害菌的过度繁殖，并维持水电解质平衡，抑制细胞促炎因子的大量生成从而有利于肠道黏膜炎症的修复。短链脂肪酸还可作为调节能量的信号分子，通过刺激消化道黏膜壁 L 细胞促进脑肠肽的分泌，通过 L 细胞表面的 G 蛋白偶联受体 Gpr (G-protein-coupled receptors, Gpr) 43 和 Gpr41 发挥降低机体血糖的功能<sup>[39]</sup>，另外动物实验发现缺乏 SCFAs G 蛋白偶联受体的

小鼠比野生型小鼠的体重会更轻<sup>[40]</sup>, 适当补充丁酸盐 (SCFAs 的主要成分) 的高脂食物可对大鼠的胰岛素抵抗状态产生明显的改善作用<sup>[41]</sup>, 因此肠道菌群紊乱可使机体短链脂肪酸降低, 从而导致肠道抗炎症能力下降, 脑肠肽激素分泌也会降低, 从而引起胰岛细胞功能受损、胰岛素抵抗等情况的发生。在本研究中, 的确观察到 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者肠道中毛螺旋菌属柔嫩梭菌属、罗斯氏菌和粪球菌属显著减少, 而这些菌属于具有产短链脂肪酸能力的毛螺旋菌科和瘤胃球菌科<sup>[42]</sup>, 同时 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者血清中白介素 6 和 C 反应蛋白的浓度显著高于健康对照组, 另外, 通过炎症指标与菌的关联分析也发现, 血清 CRP 与 Lachnospiraceae、Roseburia、Lachnospira 和 Faecalibacterium (具有产短链脂肪酸能力, 而被认为是益生菌) 存在负相关关系, 血清 IL-6 与 Lachnospiraceae、Roseburia 和 Coprococcus 也存在负相关的关系, 提示 2 型糖尿病患者和糖尿病肾病患者产短链脂肪酸细菌的减少可能是造成血清炎症指标上升的原因。

本研究属于单中心小规模人群横断面研究, 其结果和结论具有一定的局限性, 后续多中心人群队列相互验证具有必要性, 且 T<sub>2</sub>DM 和 DN 选用了相同的健康体检者作为健康对照, 只分析了血清炎症指标的变化, 产生短链脂肪酸细菌的减少是否是导致血清炎症指标上升的关键因素有待进一步的研究。过往报道药物会影响肠道菌群[, 本研究中大部分病人都服用了不同类型的降糖或降压药, 因此菌群变异的结果也可能是药物所导致的, 未来的研究若能纳入初诊未服药病人, 则结果更加具有指导意义。此外, T<sub>2</sub>DM 和 DN 组患者初诊时间的差异也会对结果产生一定的影响。本研究通过对 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者肠道菌群及血清炎症指标的分析, 发现 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者肠道菌群有较多一致的变化信号, 但相对于 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者有特异型增多的细菌, 这为预测疾病的并发症提供了初步的数据参考。

#### 4. 小结

本研究观察 2 型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus, T<sub>2</sub>DM) 和糖尿病肾病 (Diabetic nephropathy, DN) 患者相对于健康对照 (Healthy Control, HC) 肠道

菌群失衡模式及功能变化，寻找两种疾病患者肠道菌群一致和特异性的变化信号。纳入2型糖尿病人群30例、糖尿病肾病人群25例作为研究组，同时选取年龄、性别相匹配的健康体检者30例作为阴性对照组，严格按照纳入和排除标准收集研究组和对照组粪便及血清标本，采用高通量测序技术对粪便标本16S rDNA-v4区测序，采用电化学发光法和免疫比浊法分别检测静脉血白细胞介素-6(IL-6)和C反应蛋白(CRP)。使用微生物组分析软件QIIME(v1.9.1)分析肠道菌群多样性指标及肠道菌群结构，使用LEfSe分析软件分析研究组与对照组有统计学差异的肠道菌群标志物，尝试用随机森林法建立疾病诊断模型，PICRUSt宏基因组功能预测对所得序列进行肠道菌群功能变化预测。 $T_2DM$ 和DN患者肠道菌群多样性与健康对照组明显不同( $P<0.05$ )。 $T_2DM$ 和DN患者肠道有较多一致的变化信号，如毛螺旋菌属、柔嫩梭菌属、罗斯氏菌属和粪球菌属显著下降( $P<0.05$ )，但两者间也存在疾病特异性的菌群失衡模式。功能预测也证实， $T_2DM$ 和DN患者肠道有较多一致功能变化。 $T_2DM$ 和DN血清炎症指标显著高于健康对照，提示 $T_2DM$ 和DN有益菌的减少可能是导致血清炎症指标上升的原因。 $T_2DM$ 和DN患者肠道菌群存在一致的变化—有益菌减少，但两者之间也有疾病特异性的变化，为进一步研究通过肠道菌群评估糖尿病患者肾病发生风险提供了数据基础。

## 第二部分 2型糖尿病和糖尿病肾病患者血清质谱组学分析

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱是一种能够分析血清、尿液、唾液、组织等多种复杂样品的技术，同时具有快速、低成本的优点<sup>[43, 44]</sup>。近年来，飞行时间质谱在基因分型分析、生物标志物鉴定、病原体鉴定、质谱成像等方面得到应用。其原理是首先使待测样品与基质形成共结晶薄膜，然后用激光照射进行，当基质吸收道激光的能量后传递给待测样品（蛋白、多肽、核酸、微生物等）中的分子，使待测样品的分子发生电离；电离是将质子转移到生物分子或者是从生物分子中得到质子。飞行时间检测的原理就是离子在电场的作用下经过飞行管到达检测器，而不同质量的离子在电场的作用下到达检测器的时间并不相同，依据时间区分离子的质量。质谱图谱中的峰对应蛋白、多肽等物质解析产生的离子。

在本文第一章中，我们检测了 2 型糖尿病和糖尿病肾病以及健康查体人群血清标本中的炎症指标，那么，与健康人群相比疾病患者血清中蛋白组学和多肽组学是否发生了变化呢？T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者蛋白、多肽组学变化是否相同呢？为了探究 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者血清蛋白组学及多肽组学的特征（后文称其为质谱组学），并通过血清质谱组学建立 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者的疾病诊断模型，以及建立 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者的鉴别诊断模型，我们应用 Quan TOF（融智飞行质谱仪）对血清标本进行了检测分析。Quan TOF 采用了 5000Hz 以上的半导体激光器，结合快速二维移动平台控制及高速离子探测与数据采集，可以在相同时间内完成几万到几十万次的激光照射，电离分析靶点上的大部分样品，减少了样品数量变化和分布不均造成的影响。此外，Quan TOF 消除了靶板边缘电场的波动，进一步提高了质谱光谱的重现性。这一改进使质量检测的均一性会更好，特别对需要在空间维度上进行扫描的质谱成像应用有更大的意义。同时 Quan TOF 通过激光照射光学系统，离子光学系统，延迟离子提取，离子聚焦传输及混合离子检测器的创新设计及全面改进，实现了质谱分析在全质量范围内的分辨率、灵

敏度的同步性能提升，提高了质谱定量检测分析的重现性。

## 1. 材料与方法

### 1.1 研究对象与样品采集保存

2018年11月至2019年2月期间，以南方医科大学珠江医院为中心纳入30例2型糖尿病患者、25例糖尿病肾病患者，以及30例健康对照。纳入标准：住院部诊断的T<sub>2</sub>DM和DN患者，并纳入来院进行健康查体且身体健康、无胃肠道症状、近1个月内未服用抗菌药物的人群作为健康对照（Control, C）。排除标准：患有肠道疾病或者进行过腹部手术，年龄<18岁，处于怀孕期或哺乳期，近1个月内使用过抗菌药物。外周静脉血要求采集3ml置于无抗凝剂采血管中，以3000r/min离心10分钟分离血清置于新的EP管中，储存于-80℃冰箱。

### 1.2 样品前处理-有机溶剂去除白蛋白

血清中的白蛋白分子量较大，会干扰到其他较小分子量蛋白和多肽的质谱结果，故采用有机溶剂的办法去除白蛋白。从-80℃去除血清标本，置于碎冰上融化。用移液枪移取15ul纯乙腈至0.6ml EP管中，然后加入10ul血清样本，即血清：纯乙腈=1:1.5(v/v)，涡旋30s，4℃下，12000×g离心10min，取上清液5ul与15ul CHCA（ $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸，融智公司）基质液混合，即上清液：基质液1=1:3(v/v)，制得二级稀释液。取2ul二级稀释液直接点靶（做三个点样重复），室温待样本完全干燥结晶后上机测试。

### 1.3 质谱分析

使用飞行质谱仪Quan TOF（融智）对样品1000-10000范围内的m/z值进行检测，同时，通过外标（融智，多肽校准试剂盒，）对质量轴进行校正。按照30倍的信噪比输出m/z值对应峰强度的两列数据文件，使用R包对原始数据进行归一化（按照总离子流进行归一化操作），得到每个样品在1000-10000范围内的信噪比大于30的m/z值（即图谱的峰）的相对强度。使用PCoA（主成分分析）分析各组数据。随机森林建立模型。

## 2. 结果

### 2.1 仪器的重现性与操作重现性

为了验证仪器的重现性, 样品与基质液混合后在靶板上点 6 个重复孔, 以 3253、5047、7641 和 9100 峰值 ( $m/z$ ) 作为参考, 计算峰绝对强度的变异系数。如图 2-1 A, 四个参考峰的绝对强度的变异系数分别为 6%、2.33%、4.57% 和 8.67%。

为了验证实验操作的重现性, 对一份样品从与有机溶剂混合开始, 重复操作 6 次, 以 3253、5047、7641 和 9100 峰值 ( $m/z$ ) 作为参考, 计算峰绝对强度的变异系数。如图 2-1 B, 四个参考峰的绝对强度的变异系数分别为 9.65%、6.24%、0.64% 和 4.91%。

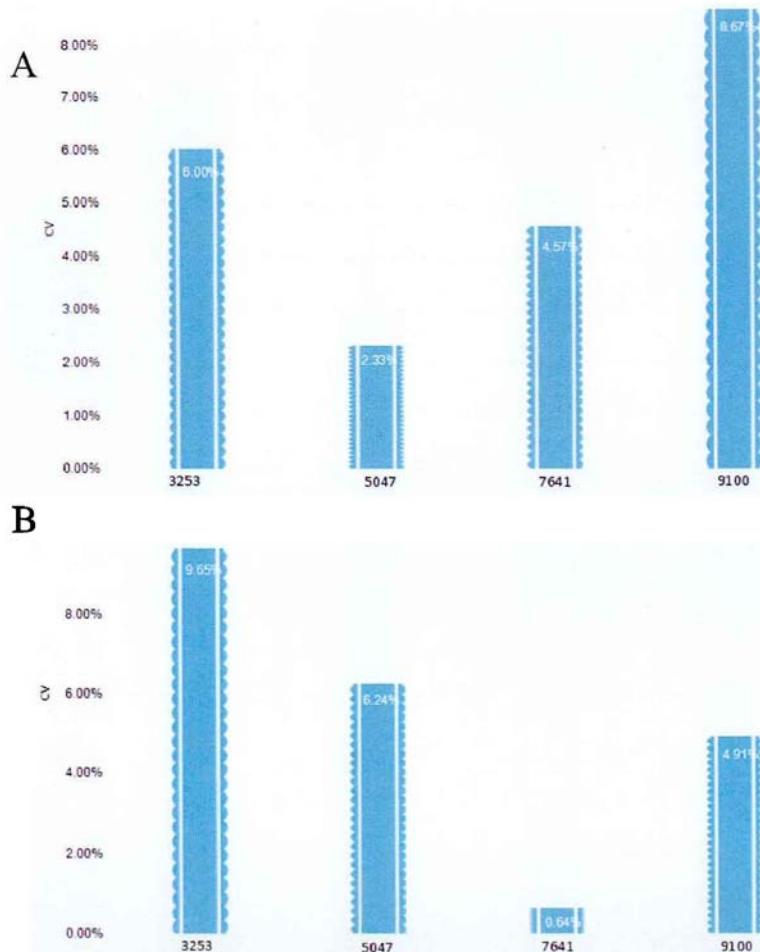


图 2-1 峰绝对强度变异系数

Fig . 2-1 Variation coefficient of peak absolute strength

## 2.2 T<sub>2</sub>DM、DN 患者与健康对照质谱组主坐标分析

在 1000-2000 范围内，有较多基质液形成的峰，因此我们提取 2000-10000 范围内且信噪比大于 30 的峰进行分析，共提取到 508 个有效峰，其频数分布如图 2-2，横轴为提取到峰（m/z 值），纵轴表示峰的数量，在 2000-5000 范围内有 335 个峰，占所有峰的 65.9%，而 6000-10000 范围的峰所占比例较低。

我们基于 bray\_curtis 距离对各组样品数据进行 PCoA 分析，如图 2-3A，T<sub>2</sub>DM 患者与健康体检者血清质谱组在 bray\_curtis 距离上显著分开，如图 2-3B，DN 患者与健康对照血清质谱组在 bray\_curtis 距离上也显著分开，提示 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者血清质谱组学不同于健康对照组。此外，如图 2-3C，T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者的血清质谱组学也显著分开，提示 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者血清质谱组学也不相同。

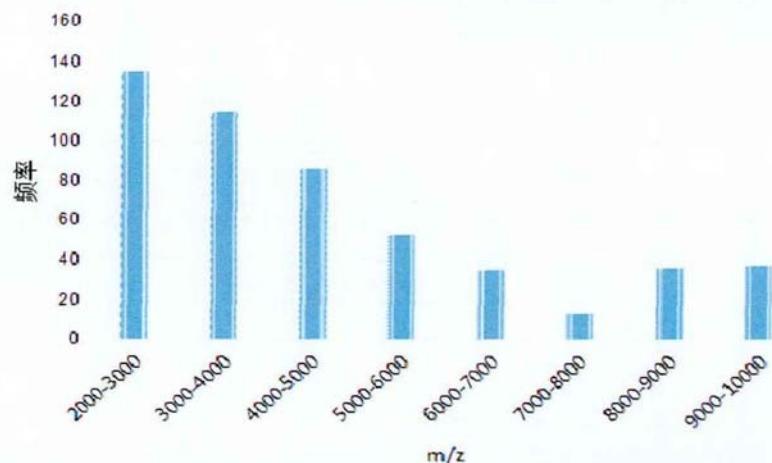


图 2-2 所有样品有效峰区段频数分布

Fig. 2-2 The frequency distribution of the effective peak range of all samples

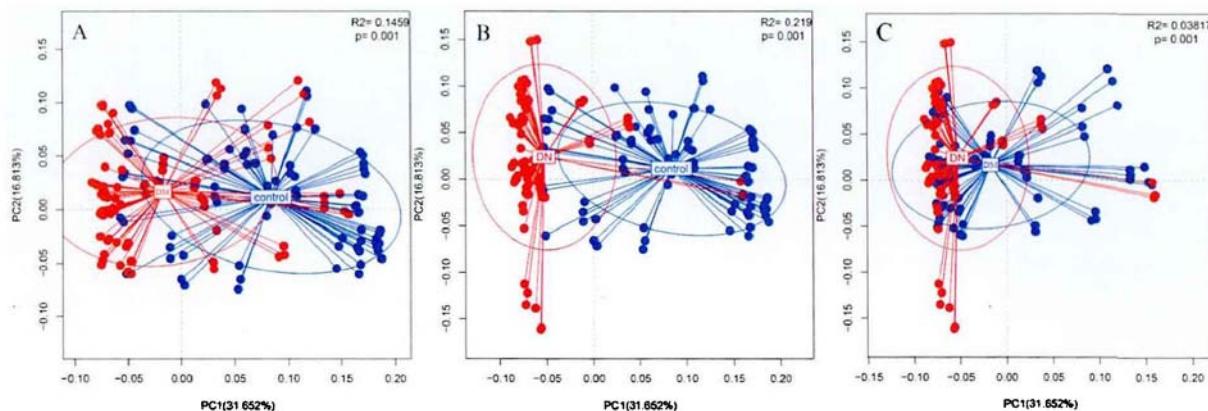


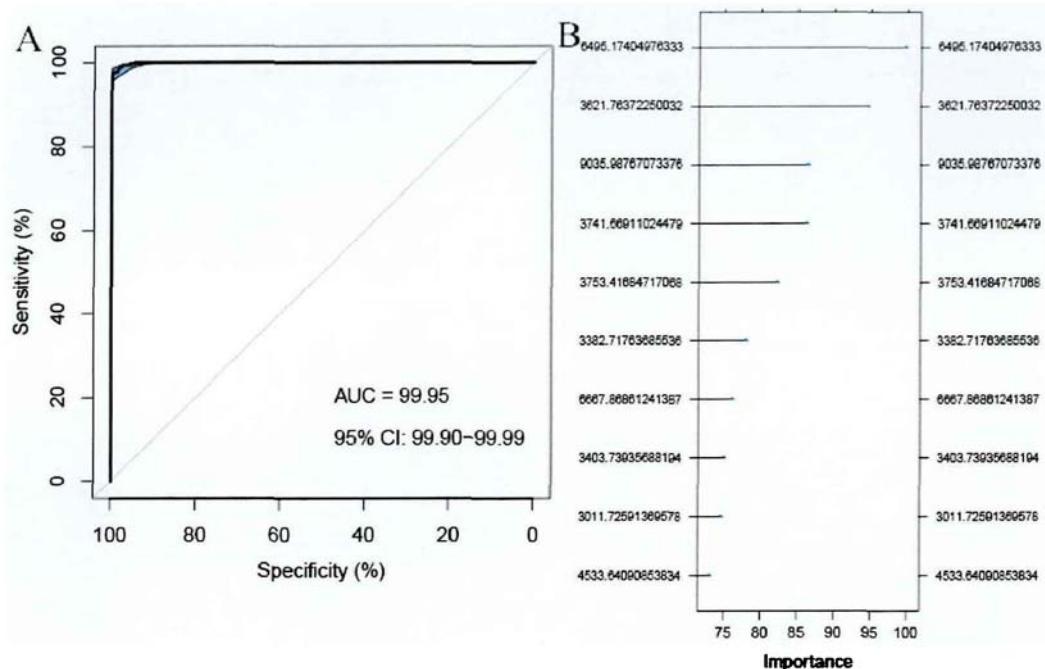
图 2-3 bray\_curtis 距离 (T<sub>2</sub>DM: 2 型糖尿病, control: 对照, DN: 糖尿病肾病)

Fig. 2-3 Bray\_curtis distance (T<sub>2</sub>DM: Type 2 diabetes mellitus, C: Control, DN: Diabetic nephropathy)

### 2.3 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者血清质谱组学分类模型

在 bray\_curtis 距离上我们观察到 2 型糖尿病与健康对照以及糖尿病肾病与健康对照都呈现出明显的差异，因此，我们进一步通过随机森林的方法使用 T<sub>2</sub>DM 患者和健康对照血清质谱组学数据建立了区分 T<sub>2</sub>DM 与健康对照的分类模型。如图 2-4 A，其 AUC 达到 99.95%，图 2-4 B，展示的是对建立区分 T<sub>2</sub>DM 与健康对照的分类模型（糖尿病模型）贡献最大的前 10 个峰，其中属于 2000-5000 范围的峰有 7 个。同时我们也使用 DN 患者和健康对照血清质谱组学数据建立了区分 DN 患者与健康对照的分类模型（糖尿病肾病模型）。如图 2-4 C，其 AUC 达到 99.99%，图 2-4 D，展示的是对建立区分 DN 患者与健康对照的分类模型贡献最大的前 10 个峰，其中属于 2000-5000 范围的峰有 8 个。在 T<sub>2</sub>DM 模型和 DN 模型中，3621.76 和 3753.42 两个峰都有较为重要的作用。使用 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者血清质谱组学数据建立了区分 T<sub>2</sub>DM 和 DN 的分类模型（2 型糖尿病和糖尿病肾病鉴别诊断模型）。如图 2-4 E，其 AUC 达到 99.98%，图 2-4 F 展示的是对建立区分 T<sub>2</sub>DM 患者与 DN 患者分类模型贡献最大的前 10 个峰，其中属于 2000-5000 范围的峰有 8 个。

2型糖尿病模型共使用了327个峰，糖尿病肾病模型使用了328个峰，而有326个峰是两个模型共有的峰，这些峰对于模型的贡献排序不同。提示，2型糖尿病和糖尿病肾病患者血清质谱组相对于健康对照变化基本是相同的。2型糖尿病和糖尿病肾病鉴别诊断模型共使用了335个峰，在2型糖尿病和糖尿病肾病鉴别诊断模型、2型糖尿病患者模型和糖尿病肾病患者诊断模型中有273个峰为三个模型所共有。



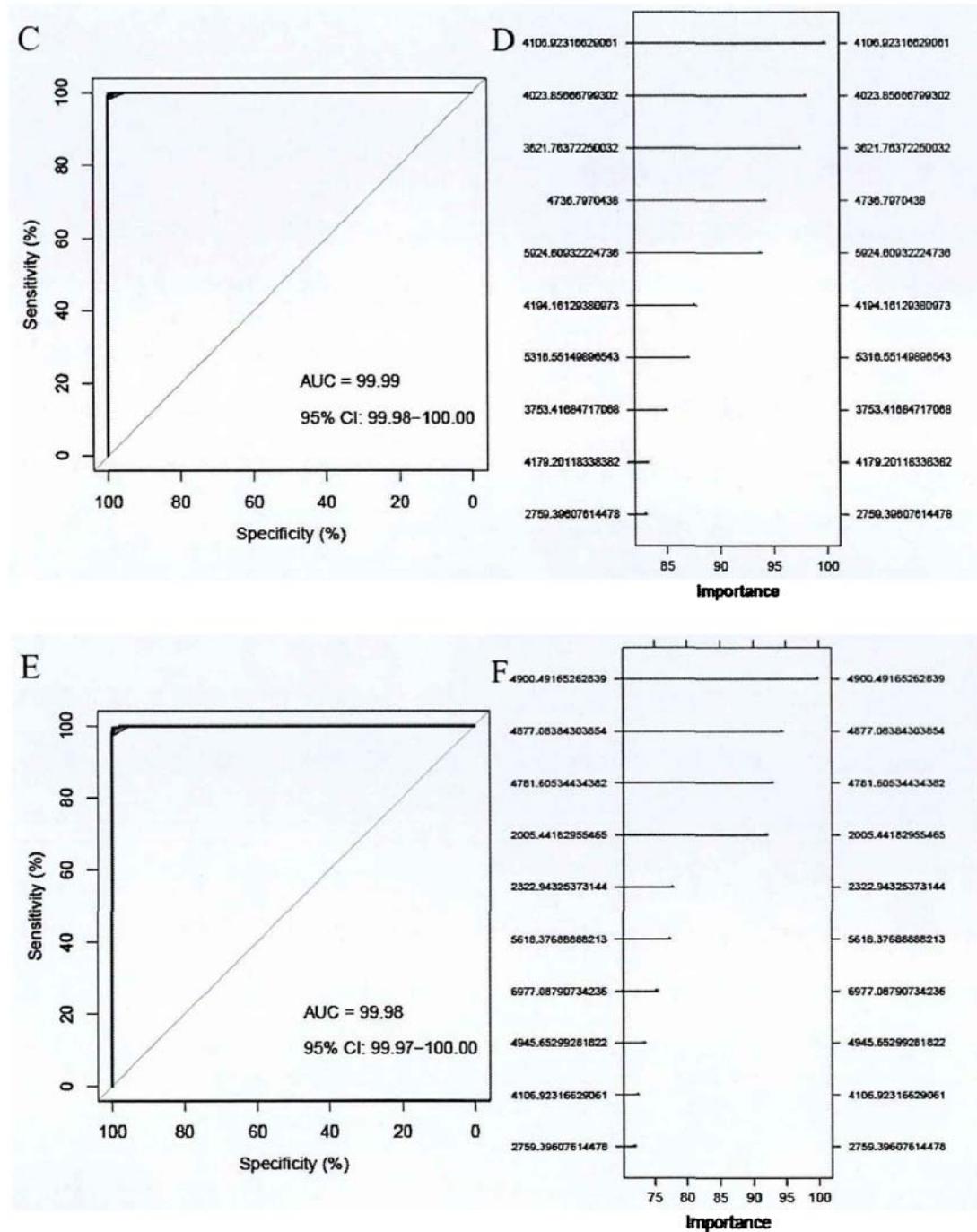


图 2-4 随机森林模型。A: T<sub>2</sub>DM 模型; C: DN 模型; E: T<sub>2</sub>DM 和 DN 鉴别模型; B: 对 T<sub>2</sub>DM 模型贡献最大的前十个峰; D: 对 DN 模型贡献最大的前十个峰; F: 对鉴别模型贡献最大的前十个峰

Fig . 2-4 Prediction model .A: T<sub>2</sub>DM model; C: DN model; E: T<sub>2</sub>DM and DN authentication model; B: The top ten peaks that contribute the most to T<sub>2</sub>DM model; D:

The top ten peaks that contribute the most to DN model; F: The top ten peaks that contribute the most to the identification model.

## 2.4 关键峰相对强度在各组间的比较

本研究根据总离子流对各组数据进行了归一化的处理，将峰的绝对强度变为了相对强度，使各个组间的峰强度能够在数值上进行比较。基于这项数据处理，我们建立了区分 2 型糖尿病和健康对照的分类模型，如图 2-5 A、B 和 C 展示了对建立 2 型糖尿病模型贡献最大的前三个峰在 2 型糖尿病患者、糖尿病肾病患者和健康对照者血清中的相对强度，6495.17、3621.76 和 9035.98 处的峰在 2 型糖尿病和糖尿病肾病患者血清中的相对强度显著高于健康对照。如图 2-5 D、E 和 F 展示了对建立糖尿病肾病分类模型贡献最大的前三个峰在 2 型糖尿病患者、糖尿病肾病患者和健康对照血清中的相对强度，4106.92 处的峰在糖尿病肾病患者血清中的相对强度显著高于健康对照，4023.85 处的峰在糖尿病肾病患者血清中的相对强度显著高于健康对照，3621.76 处的峰在糖尿病肾病患者血清中的相对强度显著高于健康对照。如图 2-5 G、H 和 I 展示的是对建立 2 型糖尿病和糖尿病肾病鉴别诊断模型贡献最大的前三个峰在 2 型糖尿病患者、糖尿病肾病患者和健康对照血清中的相对强度，4900.49 处的峰在糖尿病肾病患者血清中的相对强度显著高于 2 型糖尿病患者，4877.08 处的峰在糖尿病肾病中患者血清中的相对强度显著高于 2 型糖尿病患者，4781.69 处的峰在糖尿病肾病中患者血清中的相对强度显著低于 2 型糖尿病患者。

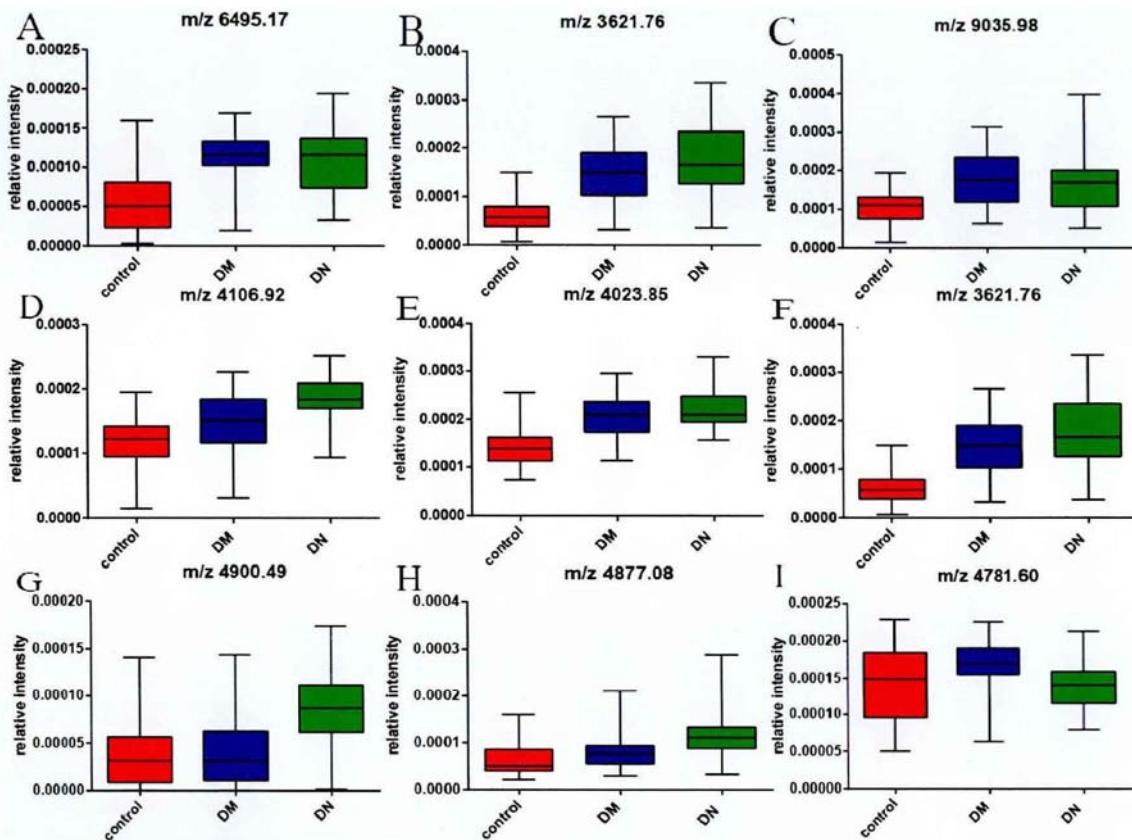


图 2-5 峰在各组间的相对强度 (A、B、C: 对建立 2 型糖尿病模型贡献最大的前三个峰在 T<sub>2</sub>DM、DN 和健康对照血清中的相对强度; D、E、F: 对建立糖尿病肾病分类模型贡献最大的前三个峰在 T<sub>2</sub>DM、DN 和健康对照血清中的相对强度; G、H、I: 对建立 2 型糖尿病和糖尿病肾病鉴别诊断模型贡献最大的前三个峰在 T<sub>2</sub>DM、DN 和健康对照血清中的相对强度)

Fig . 2-5 The relative strength of peaks between groups (A、B、C: The first three peaks, which contributed the most to the establishment of type 2 diabetes mellitus model, showed relative strength in T<sub>2</sub>DM, DN and healthy control serum ; D、E、F: The first three peaks that contributed the most to the establishment of the classification model of diabetic nephropathy were the relative strength of T<sub>2</sub>DM, DN and healthy control serum; G、H、I: The relative strength of the first three peaks in T<sub>2</sub>DM, DN and healthy control serum contributed the most to the establishment of the differential diagnosis model of type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy)

### 3.讨论

本研究使用有机溶剂的方法去除掉人血清标本中的白蛋白，从而能更好的观

察到血清样品中小分子蛋白和多肽。同时仪器的重现性和实验操作的重现性均较好，点样重复的 CV 值和操作重复的 CV 值均在 10% 以下，提示本研究对血清样品的前处理能较为适合血清质谱组学分析。在去除掉大分子蛋白的干扰后，我们发现人类血清的质谱组主要集中在 2000-5000 m/z 范围内，T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者血清与健康对照质谱组的差异也主要集中在 2000-5000 的 m/z 范围内，此范围内的变异是区分疾病与健康的关键 m/z 区段。主坐标分析也发现 T<sub>2</sub>DM 患者与健康对照在 bray\_curtis 距离上明显的区分开，也证实 T<sub>2</sub>DM 患者与健康对照血清蛋白和多肽的构成存在差异。DN 患者和健康对照在 bray\_curtis 距离上明显的区分开，证实 DN 患者与健康对照血清蛋白和多肽的构成的确存在差异。此外，T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者血清质谱组学在 bray\_curtis 距离上明显的区分开，证实 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者血清蛋白和多肽的构成存在差异。

本研究的优点在于根据总离子流对各组数据进行了归一化的处理，将峰的绝对强度变为了相对强度，使各个组间的峰强度能够在数值上进行比较。基于这项数据处理，我们建立了区分 T<sub>2</sub>DM 患者与健康对照的分类模型，其 AUC 达 99.95%，能非常好的区分 T<sub>2</sub>DM 和健康查体的血清样品。建立的区分 DN 患者与健康对照的分类模型，其 AUC 达 99.99%，也能很好的区分 DN 患者和健康查体的血清样品。此外，我们建立了 T<sub>2</sub>DM 和 DN 的鉴别诊断模型，其 AUC 达 99.98%，能很好的区分 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者的血清样品。通过分类模型的研究，提示使用质谱组学分析的方法区分 2 型糖尿病、糖尿病肾病和健康对照具有一定的可行性，为疾病的人群筛查提供了一种简便、高效、低成本的方法。

同样，本研究的不足在于为单中心的研究，且 2 型糖尿病和糖尿病肾病选用了相同的健康体检者作为健康对照，未对分类模型进行外推检验，仅初步探索了 2 型糖尿病和糖尿病肾病状态下患者血清质谱组的改变。本研究观察到 T<sub>2</sub>DM 和 DN 患者血清质谱组相对于健康对照的变化，但这些特征峰对应的蛋白或者多肽需要进一步的研究去探索。

## 全文结论

1.  $T_2DM$  和 DN 患者肠道菌群多样性与健康对照组明显不同 ( $P<0.05$ )。2 型糖尿病组和糖尿病肾病组肠道菌群有较多一致的变化信号，如毛螺旋菌属、柔嫩梭菌属、罗斯氏菌属和粪球菌属显著下降 ( $P<0.05$ )，但两者间也存在疾病特异性的菌群失衡模式，2 型糖尿病患者 *Bacteroides* 显著增多，糖尿病肾病患者 *Lactobacillus*, *Slackia*, *Anaerotruncus*, *Haemophilus* 和 *Enterococcus* 显著增多。功能预测也证实， $T_2DM$  和 DN 患者肠道有较多一致功能变化。
2.  $T_2DM$  和 DN 血清炎症指标显著高于健康对照，提示  $T_2DM$  和 DN 有益菌的减少可能是导致血清炎症指标上升的原因。
3.  $T_2DM$  和 DN 患者血清与健康对照质谱组学分析发现，人类血清的质谱组主要集中在 2000-5000 m/z 范围内， $T_2DM$  和 DN 患者血清与健康对照质谱组的差异也主要集中在 2000-5000 的 m/z 范围内，此范围内的变异是区分疾病与健康的关键 m/z 区段。主坐标分析也发现三者在血清蛋白和多肽的构成上存在差异，对数据进行了归一化的处理后建立的分类算法模型能很好的区分三者的不同，其中  $T_2DM$  与健康对照的分类模型 AUC 达 99.95%，能非常好的区分  $T_2DM$  与健康查体的血清样品；DN 与健康对照的分类模型 AUC 达 99.99%，能很好的区分 DN 患者与健康查体的血清样品； $T_2DM$  和 DN 的鉴别诊断模型 AUC 达 99.98%，能很好的区分  $T_2DM$  和 DN 患者的血清样品。上述结果提示使用质谱组学分析的方法区分 2 型糖尿病、糖尿病肾病和健康对照具有一定的可行性。

## 参考文献

- [1] Leehey DJ,Zhang JH,Emanuele NV,et al.BP and Renal Outcomes in Diabetic Kidney Disease:The Veterans Affairs Nephropathy in Diabetes Trial.Clin J Am Soc Nephrol,2015,10(12):2159-2169.
- [2] Dong Y,Wang WP,Lin P,et al.Assessment of renal perfusion with contrast-enhanced ultrasound: Preliminary results in early diabetic nephropathies. Clin Hemorheol Microcirc,2015,62(3): 229-238.
- [3] 刘菊.糖尿病肾病的发病机制研究进展.黔南民族医专学报,2015,31(4):305-307.
- [4] Zilisteau DS,Atasie T,Voiculescu M.Efficacy of long-term low dose sulodexide in diabetic and non-diabetic nephropathies.Rom J Intern Ed,2015,53(2): 161-169.
- [5] Lee MJ,Jung CH,Kang YM,et al.Serum Ceruloplasmin Level as a Predictor for the Progression of Diabetic Nephropathy in Korean Men with Type 2 Diabetes Mellitus. Diabetes Metab J, 2015, 39 (3) : 230-239.
- [6] 郭广琪.中医药治疗糖尿病肾病研究进展.内蒙古中医药,2015,34(12):94-95.
- [7] Badshah II,Baines DL,Dockrell ME.Erk5 is a mediator to TGFbeta1-induced loss of phenotype and function in human podocytes.Front Pharmacol,2014,(5):71.
- [8] 黄学卿.终末期糖尿病肾病临床治疗研究进展.深圳中西医结合杂志,2015,25(23):195-196.
- [9] ES Ford.Body mass index,diabetes, and C-reactive protein among U.S. adults[J].Dabtetes care,1999,22(12):1971-1977.
- [10] 吕海莉,王彦辉,炎症因子与 2 型糖尿病动脉粥样硬化[J].中国实用内科杂志,2005,25(4):370-372.

- [11] 黄晓敏,王立志,邓宇平.超敏 C-反应蛋白与脑梗死短期预后的关系,吉林医学 ,2010,10(31)30,5282-5284.
- [12] 刘丽华,罗培.冠心病合并 2 型糖尿病患者主要生理指标分析及阿托伐他汀钙的应用价值[J].现代中西医结合杂志,2015,24(16):1756-1758.
- [13] Sohail Muhammad U., Althani Asmaa, Anwar Haseeb, et al. Role of the Gastrointestinal Tract Microbiome in the Pathophysiology of Diabetes Mellitus[J]. Journal of Diabetes Research, 2017,2017:1-9.
- [14] Sabatino A., Regolisti G., Cosola C., et al. Intestinal Microbiota in Type 2 Diabetes and Chronic Kidney Disease[J]. Curr Diab Rep, 2017,17(3):16.
- [15] Lu C. C., Ma K. L., Ruan X. Z., et al. Intestinal dysbiosis activates renal renin-angiotensin system contributing to incipient diabetic nephropathy[J]. Int J Med Sci, 2018,15(8):816-822.
- [16] Qin J., Li Y., Cai Z., et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes[J]. Nature, 2012,490(7418):55-60.
- [17] Han J. L., Lin H. L. Intestinal microbiota and type 2 diabetes: from mechanism insights to therapeutic perspective[J]. World J Gastroenterol, 2014,20(47):17737-17745.
- [19] He C., Shan Y., Song W. Targeting gut microbiota as a possible therapy for diabetes[J]. Nutr Res, 2015,35(5):361-367.
- [20] Dong Y., Wang W. P., Lin P., et al. Assessment of renal perfusion with contrast-enhanced ultrasound: Preliminary results in early diabetic nephropathies[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2016,62(3):229-238.
- [21] Lu C. C., Ma K. L., Ruan X. Z., et al. Intestinal dysbiosis activates renal renin-angiotensin system contributing to incipient diabetic nephropathy[J]. Int J Med Sci, 2018,15(8):816-822.
- [22] 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.
- [23] Segata N., Izard J., Waldron L., et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. Genome Biol, 2011,12(6):R60.
- [24] Langille M. G., Zaneveld J., Caporaso J. G., et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. Nat Biotechnol, 2013,31(9):814-821.
- [25] Lozupone C., Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities[J]. Appl Environ Microbiol, 2005,71(12):8228-8235.
- [26] Arumugam M., Raes J., Pelletier E., et al. Enterotypes of the human gut microbiome[J]. Nature, 2011,473(7346):174-180.
- [27] Schloissnig S., Arumugam M., Sunagawa S., et al. Genomic variation landscape of the human gut microbiome[J]. Nature, 2013,493(7430):45-50.
- [28] Sartor R. B., Wu G. D. Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches[J]. Gastroenterology, 2017,152(2):327-339.
- [29] Palm N. W., de Zoete M. R., Cullen T. W., et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease[J]. Cell, 2014,158(5):1000-1010.
- [30] Lu J., Xu B. B., Zheng Z. F., et al. CRP/prealbumin, a novel inflammatory index for predicting recurrence after radical resection in gastric cancer patients: post hoc analysis of a randomized phase III trial[J]. Gastric Cancer, 2018.
- [31] Nguyen D. P., Li J., Tewari A. K. Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6)[J]. BJU Int, 2014,113(6):986-992.
- [32] Tanti J. F., Ceppo F., Jager J., et al. Implication of inflammatory signaling

- pathways in obesity-induced insulin resistance[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2012,3:181.
- [33] He Yan, Wu Wei, Zheng Hui-Min, et al. Regional variation limits applications of healthy gut microbiome reference ranges and disease models[J]. Nature Medicine, 2018,24(10):1532-1535.
- [34] Larsen N., Vogensen F. K., van den Berg F. W., et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults[J]. PLoS One, 2010,5(2):e9085.
- [35] Allin K. H., Nielsen T., Pedersen O. Mechanisms in endocrinology: Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Eur J Endocrinol, 2015,172(4):R167-R177.
- [36] Peng J., Narasimhan S., Marchesi J. R., et al. Long term effect of gut microbiota transfer on diabetes development[J]. J Autoimmun, 2014,53:85-94.
- [37] Karlsson F. H., Tremaroli V., Nookaew I., et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control[J]. Nature, 2013,498(7452):99-103.
- [38] Kasahara K., Krautkramer K. A., Org E., et al. Interactions between Roseburia intestinalis and diet modulate atherosclerosis in a murine model[J]. Nat Microbiol, 2018,3(12):1461-1471.
- [39] 容祖华 梁少聪 路浚齐 何彦 罗月梅. 间歇性断食对老年前期肥胖大鼠肠道菌群及代谢的影响[J]. 南方医科大学学报, 2017.
- [40] Samuel B. S., Shaito A., Motoike T., et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008,105(43):16767-16772.

## 参考文献

---

- [41] Mestdagh R., Dumas M. E., Rezzi S., et al. Gut microbiota modulate the metabolism of brown adipose tissue in mice[J]. *J Proteome Res*, 2012,11(2):620-630.
- [42] Duncan S. H., Belenguer A., Holtrop G., et al. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007,73(4):1073-1078.
- [43] Yilmaz Bahtiyar, Juillerat Pascal, Øyås Ove, et al. Microbial network disturbances in relapsing refractory Crohn's disease[J]. *Nature Medicine*, 2019.
- [44] Schwartz S A, Weil R J, Thompson R C, et al. Proteomic-based prognosis of brain tumor patients using direct-tissue matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry[J]. *Cancer Res*, 2005,65(17):7674-7681.DOI:10.1158/0008-5472.CAN-04-3016
- [45] Yanagisawa K, Shyr Y, Xu B J, et al. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer[J]. *Lancet*, 2003,362(9382):433-439.DOI:10.1016/S0140-6736(03)14068-8

## 中英文对照缩略词表

英文缩略词	英文全称	中文全称
A		
AGEs	Advanced glycationend products	糖基化终末代谢产物
B		
	BMI	身体质量指数
	B cell—activating factor	B 细胞活化因子
C		
CIS	Cerebral ischemic stroke	缺血性脑卒中
CRP	C -Reactive Protein	C-反应蛋白
CDC	Chinese Center For Disease Control And Prevention	中国国家疾病控制中心
D		
DM	Diabetes mellitus	糖尿病
DN	Diabetes nephropathy	糖尿病肾病
DKD	Diabetic kidney disease	糖尿病性慢性肾脏疾病
E		
ECLIA	electrochemiluminescence immunoassay	电化学发光免疫测定法
H		
HbA1c		糖化血红蛋白 A1c
hAMA	human anti-mouse antibody	人抗鼠抗体
	Heidelberger-Kendall	免疫沉淀曲线
I		
IDF	International Diabetes Federation	国际糖尿病联盟
IL	interleukin	白细胞介素
IL-6	Interleukin-6	白细胞介素 6

中英文对照缩略词表

---

IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and laboratory medicine	国际临床化学和实验室医学联盟
L		
LADA	Latent autoimmune diabetes in adults	成人迟发性自身免疫性糖尿病
	lymphocyte activating factor	淋巴细胞活化因子
	Latex Immuno-Assay	胶乳免疫测定法
M		
	monokine	单核因子
	mitogenic protein	细胞促进蛋白质
P		
POCT	point-of-care testing	即时检验
R		
RF	rheumatoid factor	类风湿因子
RAS	renin angiotensin system	肾素-血管紧张素系统
T		
T <sub>2</sub> DM	Type 2 diabetes mellitus	2型糖尿病
	thymocyte stimulating factor	胸腺细胞刺激因子
	T cell growth factor	T细胞生长因子
TNF	Tumor Necrosis Factor	肿瘤坏死因子
TPA	tripropylamine	三丙胺
W		
WHO	World Health Organization	世界卫生组织

---

## 攻读学位期间成果

1. 暴旭广, 王钟伟, 何彦, 等. 2 型糖尿病和糖尿病肾病状态下肠道菌群失衡模式研究[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(6)

## 致 谢

---

### 致 谢

本课题的全部工作在我导师周宏伟教授的悉心指导下完成，值此论文完成之际向尊敬的导师致以最诚挚的感谢。

能有周宏伟教授这样的老师和领导，我感到十分荣幸和自豪，周教授渊博的知识、严谨的治学态度、敏锐的科研思维、宽厚的待人方式、崇高的品格修养、豁达的处事原则和对科学知识孜孜不倦的探索精神让我受益匪浅，在此衷心祝您身体健康、工作顺利、家庭幸福美满。

衷心感谢珠江医院检验医学部的彭永正教授、余楠教授、江凌晓教授及各位老师和同事对我学习和工作中给予的热情和无私的帮助。

衷心感谢珠江医院检验医学部课题组的王忠伟、何彦、王珊、李泽文、李攀等同学，在课题完成过程中对我的支持，课题的顺利完成离不开你们的帮助。

衷心感谢我的家庭，我在学习和工作上取得的每一点进步都是他们给予的动力。

最后，衷心感谢各位专家评阅论文、参加答辩汇报并给予批评指正。

## 南方医科大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的论文是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写的成果作品。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。除与外单位合作项目将予以明确方式规定外，本研究已发表与未发表成果的知识产权均归属南方医科大学。

本人承诺承担本声明的法律效果。

作者签名：

聂加宁

日期：2019年5月21日

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权南方医科大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于（请在以下相应方框内打“√”）：

1、保密，在\_\_\_\_年解密后适用本授权书。

2、不保密

作者签名：

聂加宁

日期：2019年5月21日

导师签名：

聂加宁

日期：2019年5月22日