

DOI:10.13350/j.cjpb.230605

• 论著 •

醋酸泼尼松长期治疗对阿霉素肾病大鼠肠道菌群的影响*

云舒^{1,2}, 张静², 屈伟², 谷丽^{1,3}, 黄文彦², 朱光华², 杨蓉^{3**}, 康郁林^{2**}

(1. 安徽理工大学医学院, 安徽淮南 232001; 2. 上海市儿童医院, 上海交通大学医学院附属儿童医院肾脏风湿科; 3. 同济大学医学院附属第十人民医院儿科)

【摘要】 目的 观察醋酸泼尼松长期治疗对阿霉素肾病大鼠肠道菌群结构的影响。方法 取SD大鼠16只,通过尾静脉注射阿霉素(7.5 mg/kg 体重)构建阿霉素肾病大鼠模型。随机将阿霉素肾病大鼠分为对照组和醋酸泼尼松治疗组,醋酸泼尼松治疗组采用10 mg/kg 体重的醋酸泼尼松连续6周灌胃治疗,收集大鼠粪便进行16S rRNA基因测序及生物信息学分析,比较两组大鼠肠道微生物丰度及多样性变化,并进行差异菌属的鉴定。结果 16S rRNA基因测序显示,醋酸泼尼松治疗后,阿霉素肾病大鼠肠道微生物群的丰度和多样性与对照组比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。在肠道微生物群门水平,醋酸泼尼松治疗组软壁菌门相对丰度增加($P < 0.05$);在属水平,治疗组芽孢杆菌属相对丰度升高($P < 0.05$),双歧杆菌属、拟普雷沃菌属和施氏菌属相对丰度下降(均 $P < 0.05$)。对肠道微生物群的功能进行预测分析,醋酸泼尼松长期治疗后阿霉素肾病大鼠肠道菌群与内分泌代谢、癌症通路、萜类和聚酮化合物的代谢、细菌侵袭上皮细胞、限制性内切酶等相关的代谢通路均显著增强(均 $P < 0.05$);寄生虫、脂质代谢、免疫疾病、异生物素的生物降解和代谢、环境适应、其他次生代谢产物的生物合成等代谢通路均显示减弱(均 $P < 0.05$)。结论醋酸泼尼松长期治疗对阿霉素肾病大鼠肠道菌群的丰度和多样性无显著影响,但部分肠道有益菌减少,异杆菌属丰度增加,这提示肠道菌群结构的改变可能与醋酸泼尼松的疗效及毒副作用相关。

【关键词】 醋酸泼尼松;肾病综合征;大鼠;肠道菌群;代谢组学

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)06-0643-07

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jun;18(6):643-649.]

The compositional alteration of gut microbiota in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome after long-term prednisone treatment

YUN Shu^{1,2}, ZHANG Jing², QU Wei², GU Li^{1,3}, HUANG Wenyan², ZHU Guanghua², YANG Rong³, KANG Yulin² (1. Anhui University of Science and Technology, School of Medicine, Huainan 232001, Anhui; China; 2. Department of Nephrology and Rheumatology, Shanghai Children's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University; 3. Department of Pediatrics, Shanghai Tenth People's Hospital, School of Medicine, Tongji University) **

【Abstract】 **Objective** To investigate the compositional changes of gut microbiota in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome after long-term prednisone treatment. **Methods** Sixteen SD rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome established by single injection of adriamycin (7.5 mg/kg) in tail vein were randomly divided into Control and Prednisone groups. Rats in Prednisone group was treated with prednisone (10 mg/kg) by gavage for 6 consecutive weeks. Thereafter, the stool samples were collected for gut microbiota analysis by using 16S rRNA sequencing assay and bioinformatics analysis. The intestinal microbial abundance and diversity were compared between the two groups. The differential abundant bacteria were identified by performing metastats analysis. **Results** The 16S rRNA sequencing results showed that there were no significant differences in the abundance and diversity of the gut microbiota between Control and Prednisone group ($P > 0.05$). The relative abundance of *Tenericutes* at the phylum level increased significantly after prednisone treatment ($P < 0.05$). At the genus level, the relative abundance of *Allobaculum* increased, while *Bifidobacterium*, *Alloprevotella* and *Schwartzia* decreased after prednisone treatment ($P < 0.05$). Furthermore,

* **【基金项目】** 上海市科委医学创新研究专项项目(No. 21Y11904400);上海交通大学“医工交叉研究基金”项目(No. YG2016MS34);上海市儿童医院临床研究培育重点项目(No. 2020YLYZ02)。

** **【通讯作者】** 康郁林, E-mail: kangyulinmed@126.com; 杨蓉, E-mail: leexuechun1@126.com

【作者简介】 云舒(1995-),女,江苏人,研究生,主要研究方向为儿童肾脏相关疾病。E-mail: 2535086078@qq.com

the data of PICRUSt showed that the activity of endocrine and metabolic pathways, pathways in cancer, metabolism of terpenoids and polyketides, bacterial invasion of epithelial cells, and restriction endonuclease pathways were significantly enhanced than the Control group after prednisone treatment ($P < 0.05$). In contrast, the metabolic pathways related to parasites, lipid metabolism, immune diseases, biodegradation and metabolism of xenobiotics, environmental adaptation, and biosynthesis of other secondary metabolites were weakened comparing to the Control group ($P < 0.05$). **Conclusion** There were no significant changes in the abundance and diversity of gut microbiota between Control and Prednisone groups. However, the relative abundance of some beneficial bacteria decreased, while *Allobaculum* increased. The compositional alteration of gut microbiota might be associated with the efficacy and adverse events of prednisone.

【Key words】 prednisone; nephrotic syndrome; rats; intestinal flora; metabolomics

原发性肾病综合征 (primary nephrotic syndrome, PNS) 是儿童常见的肾小球疾病之一, 通常表现为水肿、大量蛋白尿、低蛋白血症和高脂血症^[1]。肾小球滤过屏障是由带窗孔的内皮细胞、肾小球基底膜和高度分化的脏层上皮细胞 (通常称为足细胞) 组成。足细胞发生肌动蛋白骨架重排、凋亡等损伤是 PNS 主要的病理生理特点。微小病变肾病综合征 (minimal change nephrotic syndrome, MCNS) 被认为与 Th17/Treg 细胞的失衡相关^[2]。研究表明, 多种肠道菌属可促进 Treg 及 Th17 细胞的生成, 并维持 Th17/Treg 的平衡, 如脆弱拟杆菌及梭状芽孢杆菌可诱导生成 iTreg 细胞^[3-5]。按照 2021 年 KDIGO 肾小球肾炎临床实践指南, 糖皮质激素 (如醋酸泼尼松) 是治疗 PNS 的一线用药^[6]。醋酸泼尼松对 PNS 儿童的临床疗效及其副作用具有一定的个体差异。约 90% 的 PNS 患儿在使用醋酸泼尼松治疗后可达到完全缓解, 但 80% 的患儿会出现一次或多次复发。此外, 大约 10% 的 NS 儿童对类固醇激素耐药^[7]。糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 具有抗炎和免疫抑制作用, GC 的药效作用由基因和非基因机制介导。基因机制通过细胞溶质中 GC 受体 (GR) 发挥作用, 即扩散到细胞膜中的 GC 会与细胞质中 GC 受体 (GR) 结合, GC/GR 复合物被转移到细胞核, 并与 DNA 上的 GC 反应元件 (GREs) 结合, 从而降低炎症因子的表达^[8]。非基因作用机制是独立于核基因转录或翻译, 尚未如基因组效应被广泛研究^[7]。糖皮质激素是否通过调节肠道菌群而发挥治疗作用仍属未知。此外, 长期使用糖皮质激素可导致 PNS 患者出现肥胖、高血压、精神症状和血脂异常等毒副作用, 肠道菌群变化是否参与其中尚不清楚。肠道微生物群是寄生于肠道中所有微生物的总称, 是一个高度复杂的微生物生态系统, 人体肠道内寄生约 100 万亿个细菌, 拟杆菌、厚壁菌和放线菌是其中的三大优势菌群, 这些菌群的功能涵盖食物消化、维生素合成、胆汁酸代谢和免疫系统调控等。肠道菌群结构易受药物、饮食、年龄、性别、种族、环境和宿主基因背景的影响^[9-10], 这些细菌的代谢产物对宿主会产生影响, 如短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFAs)

对肠黏膜具有营养及抗炎作用, 在炎症性肠病中起到保护肠道的作用。SCFAs 中的丁酸盐主要是梭菌产生的, 可激活受体 GPR109A/HCA2 从而介导 Tregs 的发育^[11]。激素依赖型 PNS 儿童肠道微生物群中产丁酸盐菌属所占比例显著下降, 并且随着疾病的缓解而升高^[12]。肠道微生物群产生的部分毒素, 包括吲哚、氨和氧化三甲胺, 会促进慢性肾病的进展^[13]。因此, 研究肠道菌群有助于进一步了解激素对 PNS 的治疗效应及其毒副作用的产生机制。

阿霉素 (adriamycin, ADR) 是一种广谱抗肿瘤药物, 通过注射阿霉素构建的肾病综合征大鼠模型已被广泛应用于肾病综合征发病机制和药物疗效的探索研究。本实验通过观察长期醋酸泼尼松治疗对肾病综合征大鼠肠道微生物群结构的影响, 以丰富糖皮质激素的相关作用机制。

材料与方法

1 动物和实验设计

动物实验取得上海市儿童医院/上海交通大学医学院附属儿童医院实验动物伦理委员会的许可 (编号 SHCH-IACUC-2021-XMSB-53)。SPF 级雄性 SD (sprague-dawley) 大鼠, 5 周龄, 体质量 (200 ± 20) g, 购于上海杰思捷实验动物有限公司。所有 SD 大鼠均在标准实验室条件下饲养 (随意进食和饮水, 环境温度 22 ~ 25 °C, 相对湿度 50% ~ 60%, 光照 12 h 和黑暗 12 h 循环)。在适应性饲养 10 d 后, 取 16 只 SD 大鼠尾静脉注射阿霉素 (7.5 mg/kg, 辉瑞) 的方法制备阿霉素肾病大鼠模型^[14], 14 d 后测定模型鼠尿蛋白水平。将肾病模型大鼠随机分为对照组 (CON 组, 8 只) 和醋酸泼尼松组 (PRED 组, 8 只), 其中 PRED 组每天通过灌胃法给予大鼠 10 mg/kg 体重的醋酸泼尼松 (中国上海信义制药公司生产) 治疗。CON 组大鼠给予与 PRED 组相同体积的生理盐水灌胃。PRED 组有 1 只大鼠在干预第 4 周后死亡, 故弃去。连续干预 6 周后收集大鼠新鲜的粪便标本, -80 °C 下保存。

2 肠道微生物 DNA 提取

使用 QIAampDNA 粪便试剂盒 (德国 Qiagen 公

司产品)提取总细菌DNA。用NanoDrop2000分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司生产)测定DNA浓度和纯度,并通过1%琼脂糖凝胶电泳评估DNA的完整性。

3 16S rRNA 基因测序

通用引物序列:正向引物1(5'-CCTACGGG-NGGCWGCAG-3')和反向引物2(5'-GACTAC-HVGGGTATCTAATCC-3')扩增细菌16S rRNA基因的V3-V4区域^[15]。PCR使用Gene Amp PCR-System 9700(美国应用生物系统公司生产)。PCR反应总体积为25 μ L,其中2.5 μ L 10 \times PCR缓冲液II,0.5单位HerculaseII DNA Polymerase High Fidelity(美国安捷伦科技公司产品),每种引物0.4 μ mol/L,10 ng模板DNA。热循环条件:95 $^{\circ}$ C初始变性2 min;95 $^{\circ}$ C 20 s,55 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,共25个循环;72 $^{\circ}$ C 3 min。通过1%琼脂糖凝胶电泳检查扩增产物的质量,并使用AgencourtAMPure XP试剂盒(美国贝克曼库尔特有限公司产品)进行纯化。16S rRNA基因扩增子的测序采用2 \times 250 bp双末端方法,使用Illumina MiSeq平台进行测序^[16]。样品测序均由中国上海天昊基因科技有限公司完成。

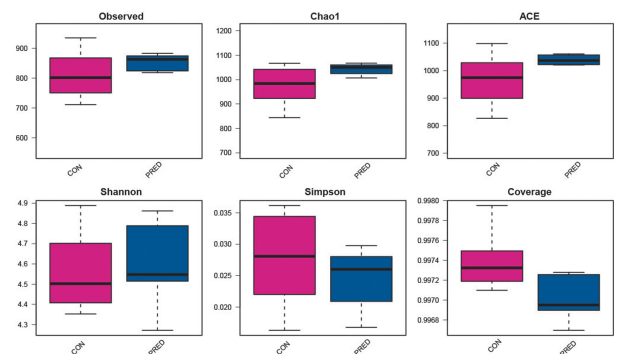
4 生物信息学分析

通过分析物种累积曲线估计样本量,并表明15个大鼠符合样本量计算。通过UPARSE通道以97%的相似性截止值聚类成操作分类单元(OTU)。根据核糖体数据库项目(RDP)对OTU进行分类,使用Mothur软件计算 α 多样性用来评估微生物的丰度,包括Chao1和ACE指数,以及Shannon、Simpson和Coverage指数。使用R Project(Vegan package, V3.3.1)计算 β 多样性,包括Bray-Curtis、Jaccard、Unweighted UniFrac、Weighted UniFrac距离,主坐标分析(PCoA)以及非度量多维尺度(NMDS)。PCoA通过创建散点图,显示个体肠道微生物群之间基于系统发育树的距离。unweighted UniFrac定性测量每个分类单元的个体间的差异性,weighted UniFrac定量分析每个分类单元个体间相对丰度的差异性。采用Metastats方法分析不同分类水平的肠道菌群组成变化。PICRUS2的工作流程包括基因内容推断和宏基因组推断。即根据16S rRNA基因拷贝数对OTU进行标准化,然后在输入标准化的OTU表后,推断微生物群落宏基因组并将其分类到京都基因和基因组百科全书(KEGG)途径中。生物信息学分析由上海天昊基因科技有限公司完成。

结 果

1 肠道菌群物种多样性

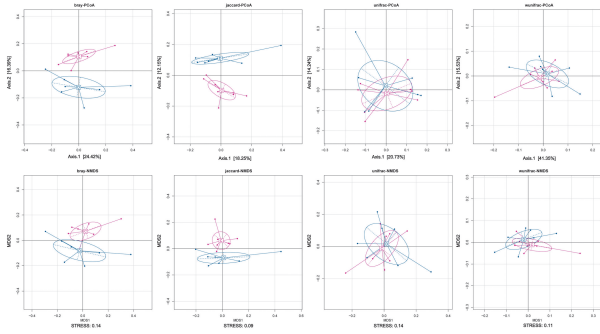
共检测到1 925个OTU。对两组肠道菌群的丰度和多样性进行分析,其中 α 多样性分析包括计算Chao1丰度指数、Observed_species指数、ACE指数、Shannon多样性指数、Simpson指数以及Coverage深度指数箱线图,结果如图1,对照组(CON组)与醋酸泼尼松组(PRED组)比较肠道菌群的丰度及多样性差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。物种丰度分布差异程度分析采用 β 多样性分析,即Bray-Curtis、Jaccard、Unweighted UniFrac、Weighted UniFrac距离。绘制的PCoA和NMDS结果显示,CON组和PRED组之间的粪便微生物群落组成呈明显分离状态(图2),表明醋酸泼尼松治疗肾病综合征大鼠肠道微生物群落与对照组比较显著不同。在门水平,厚壁菌门、拟杆菌门、变形杆菌门、放线菌门、疣微菌门在肠道微生物群中占主导地位(图3);在属水平,相对丰度由高到低依次为乳杆菌属、普氏菌属、异杆菌属、双歧杆菌属、副沙门氏菌属、酪酸梭菌属、艾森伯格菌属、拟杆菌属、经粘液真杆菌属、拉氏普鲁威登菌属、厌氧菌和梭菌属IV群。采用Metastats方法分析不同分类水平下的差异菌,PRED组相对于CON组在门水平上软壁菌门(*Tenericutes*)的相对丰度上升,在属水平上异杆菌属(*Allobaculum*)相对丰度升高,双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、拟普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*)和施氏菌属(*Schwartzia*)相对丰度下降(均 $P<0.05$)(图4)。



注: Observed、Chao1、ACE指数代表肠道菌群的丰度;Shannon、Simpson和Coverage指数反映肠道微生物群的多样性。上述指标PRED组(醋酸泼尼松治疗组)与CON组(对照组)比较差异均无统计学意义(均 $p>0.05$)。

图1 醋酸泼尼松对阿霉素肾病大鼠肠道菌群丰度及多样性的影响
Notes: The Observed, Chao1 and ACE indexes represented the abundance of intestinal flora, while Shannon, Simpson and Coverage indexes reflected the diversity of intestinal flora. There was no significant difference in the above indexes ($p>0.05$). Abbreviations: CON, control group; PRED, prednisone acetate treatment group.

Fig. 1 Changes in the abundance and diversity of gut microbiota in adriamycin-induced nephropathy rats treated with prednisolone acetate

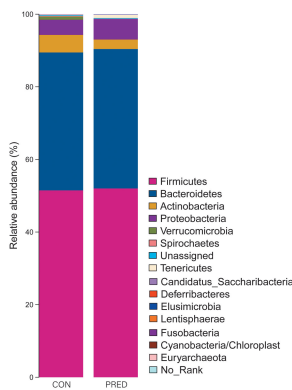


注: Bray-Curtis, Jaccard, unweighted 和 weighted UniFrac 分析醋酸泼尼松治疗阿霉素肾病大鼠肠道微生物群落分布呈明显分离状态(每个点代表一个样品。C: 对照组; D: 醋酸泼尼松治疗组)。

图 2 基于 OTU 的肠道微生物多样性 PCoA 和 NMDs 分析

Notes: The results of Bray-Curtis, Jaccard, unweighted, and weighted UniFrac analyses showed that the distribution of intestinal microbial communities in adriamycin-induced nephropathy rats was significantly separated after prednisone acetate treatment. Each point represents a sample. Abbreviations: C, control group (CON group). D, prednisone acetate treatment group (PRED group).

Fig. 2 OTU-based PCoA and NMDs analysis of gut microbial diversity



注: Metastats 分析厚壁菌、拟杆菌、放线菌和变形菌在门水平上占主导地位(CON: 对照组; PRED: 醋酸泼尼松治疗组)。

图 3 醋酸泼尼松治疗 6 周后, 阿霉素肾病大鼠肠道菌群门水平的组成变化

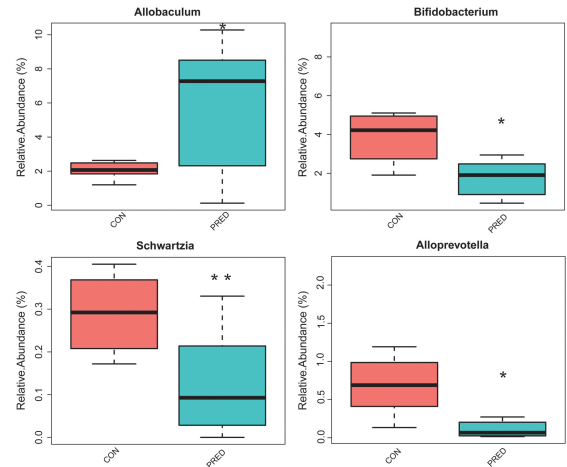
Notes: The results of Metastats analysis showed that Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, and Proteobacteria were dominant at the phylum level. Abbreviations: CON, control group; PRED, prednisone acetate treatment group.

Fig. 3 Changes in the composition of the gut microbiota at the phylum level in adriamycin-induced nephropathy rats after 6 weeks of prednisone acetate treatment

2 肠道菌群 PICRUSt 功能预测

为了探索大鼠粪便中微生物相关代谢途径的变化, 采用 PICRUSt 法分析肠道微生物群的功能特征。通过与 KEGG 数据库比对, 并从 7 类生物代谢途径进行分析, 包括代谢 (Metabolism), 遗传信息处理 (Genetic Information Processing), 环境信息处理 (Environmental Information Processing), 细胞过程 (Cellular Processes), 生物体系统 (Organismal Systems), 人类疾病 (Human Diseases), 药物开发 (Drug Development)。CON 组和 PRED 组间共有 14

条代谢通路存在统计学差异(均 $P < 0.05$)。长期醋酸泼尼松治疗后, 阿霉素肾病大鼠肠道微生物群与 II 型糖尿病、癌症通路、细菌侵袭上皮细胞、限制性内切酶、安沙霉素的生物合成相关的代谢通路显著增强(均 $P < 0.05$), 美洲锥虫病、非洲锥虫病、系统性红斑狼疮、类固醇生物合成、类固醇激素生物合成、线粒体中的脂肪酸延伸作用、咖啡因代谢、昼夜节律、氟苯甲酸酯的降解等代谢通路显著减弱(均 $P < 0.05$) (图 5)。



注: 采用 Metastats 方法鉴定出 4 个具有差异性的菌属。相对于 CON 组(对照组), PRED 组(醋酸泼尼松治疗组) 异杆菌属相对丰度显著升高 ($P < 0.05$), 双歧杆菌属、施氏菌属和拟普雷沃氏菌属相对丰度显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

图 4 醋酸泼尼松治疗 6 周后, 阿霉素肾病大鼠肠道菌群属水平的组成变化

Notes: Four bacterial genera with significant differences were identified using the Metastats method. Compared with the CON group, the relative abundance of Allobaculum in the PRED group was significantly increased, while the relative abundance of Bifidobacterium, Schwartzia and Alloprevotella decreased. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Abbreviations: CON, control group; PRED, prednisone acetate treatment group.

Fig. 4 Changes in the composition of the genus-level gut microbiota in adriamycin-induced nephropathy rats after 6 weeks of prednisone acetate treatment

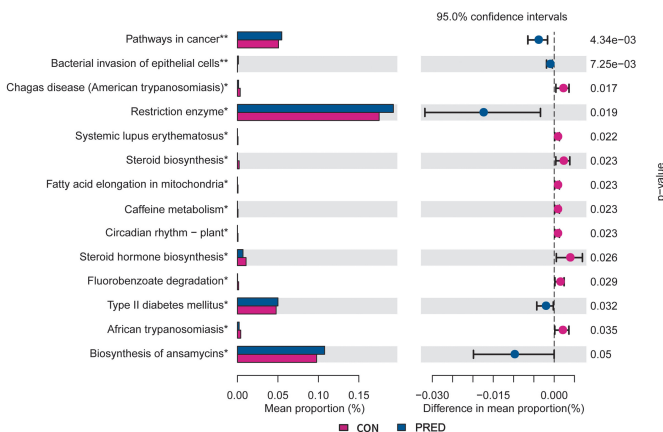
讨论

迄今 PNS 尚无特效的治疗方法, 糖皮质激素仍是儿童 PNS 的一线治疗药物^[7]。研究表明, 肠道微生物及其代谢产物所构成的肠道微环境可影响宿主的免疫系统。本研究采用阿霉素构建肾病动物模型后, 使用醋酸泼尼松对阿霉素肾病大鼠模型进行长期干预, 该处理方案模拟原发性肾病综合征患者接受糖皮质激素治疗的临床状态。观察发现, 长期使用醋酸泼尼松改变了阿霉素肾病大鼠肠道菌群的结构。

本研究结果显示, 醋酸泼尼松治疗 6 周后阿霉素肾病大鼠肠道菌群的多样性及丰度与对照组相比无显著改变。Kang 等^[17] 也获得了类似结果, 即儿童 PNS 经过激素等诱导缓解治疗后肠道菌群的多样性和丰度并无显著变化。有研究发现家犬在连续 2 周口服 1

mg/kg 体重泼尼松龙后亦出现类似结果^[18]。然而,雄性 Wistar 大鼠在使用 0.05 mg/kg 地塞米松磷酸钠 (DEX) 灌胃 7 周后,其体内微生物群的丰度和多样性降低^[19]。Porter 等^[20]报道厚壁菌门可通过促进多糖发酵而维持肠道菌群平衡。而厚壁菌门/拟杆菌门 (F/B) 被认为是反映肠道菌群紊乱的重要指标。此外,F/B 与小鼠肥胖呈正相关^[21-22]。本研究中肠道菌群物种组成及差异比较分析结果显示,阿霉素肾病大鼠在醋酸泼尼松治疗后软壁菌门 (*Tenericutes*) 丰度增加,而厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 丰度无显著变化 (均 $P > 0.05$)。表明醋酸泼尼松治疗 6 周后阿霉素肾病大鼠肠道微生物群的整体生态系统仍较稳定。亦有研究发现,泼尼松龙治疗 2 周后的 C57BL/6 小鼠肠道菌群在门水平上表现为拟杆菌门相对丰度降低和厚壁菌门相对丰度增加,梭菌属相对丰度下降^[23]。Wu 等^[19]报道在使用地塞米松灌胃 7 周后, Wistar 大鼠肠道菌群中厚壁菌门、拟杆菌门、 α -变形菌门、 γ -变形菌门和放线菌门的相对丰度降低。以实验结果不一致的原因可能与糖皮质激素的类型、给药方式、剂量及使用时间、肠道菌群的宿主种属,以及是否患病有关。

机制可能与肠道菌群中菌属的变化相关。异杆菌属、双歧杆菌、拟普雷沃氏菌属均是可产生 SCFAs 的有益菌。SCFAs 是由肠道微生物群产生的代谢产物,包括乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐。丁酸盐和丙酸盐通过直接或间接途径激活 Keap1-Nrf2 信号通路以发挥抗氧化作用^[24]。丁酸盐和丙酸盐诱导结肠 Treg 细胞分化,抑制效应 T 细胞,以提升对自身抗原的耐受^[11]。与糖皮质激素类似,他克莫司可使 C57BL/6 小鼠肠道菌群中的异杆菌属显著增加,这可能促进了 Tregs 的生成,从而抑制小鼠的免疫功能^[25]。施氏菌属是唯一能发酵琥珀酸并产生丙酸的菌属^[26]。异杆菌属是活跃的葡萄糖利用者,在葡萄糖代谢过程中主要产生乳酸和丁酸^[27]。异杆菌属也是本实验中唯一丰度上升、且变化幅度最高的差异菌属。有研究表明 SCFAs 水平与异杆菌属丰度成正比^[28]。因此,本实验中糖皮质激素使用后导致的异杆菌属相对丰度增高,可能使得 SCFAs 增加,从而促进 Treg 细胞生成进而发挥免疫抑制等作用。有研究通过相关性分析证实异杆菌属的丰度与回肠、结肠中血管生成素样蛋白 4 (ANGPTL4) 的表达呈正相关,ANGPTL4 是肠道脂肪消化酶,可防止肠道细胞中过多的脂肪酸摄入和脂质超载,小鼠高脂饮食后异杆菌属的相对丰度和 ANGPTL4 的表达水平显著增加^[29]。Ren 等^[30]报道发酵黑苦荞可能通过促进异杆菌属等有益物种来增加槲皮素的水平,从而实现降脂。因此长期使用糖皮质激素可能通过肠道菌群减轻 PNS 产生的高脂血症。双歧杆菌的丰度与肠道通透性、代谢性内毒素血症和低度炎症呈负相关,肠道中的双歧杆菌可减少炎症发展^[29,31]。拟普雷沃氏菌与个体健康呈正相关,炎症等肠道紊乱将导致人和小鼠粪便中拟普雷沃氏菌水平下降^[32]。本研究结果显示,SD 大鼠用糖皮质激素治疗后肠道中的双歧杆菌和拟普雷沃氏菌属均减少,这对机体可能是不利的,但是升高更为明显的异杆菌属可能部分抵消了这些不利影响。以上结果表明,长期使用醋酸泼尼松使得肠道菌群发生了变化,这种变化可能与糖皮质激素的部分药理作用机制相关。



注:PICRUSt 方法预测获得的肠道菌群通路变化显示,CON 组(对照组)和 PRED 组(醋酸泼尼松治疗组)间共有 14 条代谢通路差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

图 5 阿霉素肾病大鼠接受醋酸泼尼松治疗后,肠道菌群的功能预测分析

Notes: The pathway changes of gut microbiota predicted by PICRUSt method showed that there were 14 metabolic pathways with statistically significant differences between the CON group and the PRED group ($P < 0.05$). Abbreviations: CON, control group; PRED, prednisone acetate treatment group.

Fig. 5 Functional prediction analysis of gut microbiota in adriamycin-induced nephropathy rats after prednisone acetate treatment

阿霉素肾病大鼠接受长期糖皮质激素治疗后,异杆菌属 (*Allobaculum*) 相对丰度上升,双歧杆菌 (*Bifidobacterium*)、拟普雷沃氏菌属 (*Alloprevotella*) 和施氏菌属 (*Schwartzia*) 的相对丰度下降。糖皮质激素具有抗炎和免疫抑制等作用,其

肠道菌群代谢通路分析显示,在经过糖皮质激素治疗后细菌侵袭上皮细胞代谢通路、限制性内切酶和安沙霉素的生物合成代谢通路增强。许多病原菌可侵入细胞并在细胞内定植,进而播散到其他细胞。肠上皮细胞是抵御肠道病原体的第一道防线,但部分细菌病原体(如单核细胞增生李斯特菌)可突破这一屏障。有研究表明李斯特菌粘附蛋白(LAP)诱导肠上皮屏障功能障碍以促进细菌易位并形成全身传播^[33]。肠道通透性以及细菌易位是全身慢性炎症的重要因素,如果不及时修复肠道屏障,将会导致机体自身的持续炎

症刺激^[34]。这种持续炎症刺激可能诱导肾病综合征复发,而复发后则需要进一步使用糖皮质激素抑制免疫反应,这可能与肾病综合征的激素依赖现象相关。限制性核酸内切酶的生理意义是提高身体的防御能力,它通过消化噬菌体 DNA 限制病毒作用,与相应的 DNA 甲基转移酶活性相结合,从而保护宿主 DNA 的完整性^[35]。安沙霉素类化合物具有抗菌、抗肿瘤等生物活性^[36]。另一方面,在阿霉素肾病大鼠经过连续 6 周醋酸泼尼松龙治疗后,线粒体中的脂肪酸伸长率、类固醇生物合成和类固醇激素生物合成以及昼夜节律等代谢通路减弱,这可能与临床上肾病综合征患儿长期使用糖皮质激素后可能出现例如肥胖、高血压、精神症状等毒副作用相关^[7]。昼夜节律是一种内源性节律系统,周期约为 24 h,主要协调生物的活动时间和外部环境。昼夜节律对人体生理稳态和健康至关重要,肠道微生态失衡或宿主昼夜节律紊乱可能导致精神疾病^[37]。而临床上患儿使用激素后出现易激惹等表现,与昼夜节律代谢通路减弱有关。内源性糖皮质激素是由肾上腺皮质在昼夜节律和压力的控制下产生的一类类固醇激素,可抑制小鼠活动期的炎症细胞因子和趋化因子的表达,调节组织炎症的昼夜节律^[38]。以上结果表明糖皮质激素的分泌和昼夜节律可以相互影响。类固醇的合成代谢减少表明长期使用外源性糖皮质激素将改变内源性糖皮质激素的产生,这是一种常见的负反馈调节,也可能是外源性糖皮质激素通过减少昼夜节律代谢通路的结果。由于 PICRUST 功能预测分析的局限性,本研究仅初步预测了相关细菌的功能。在此基础上使用宏基因组学等方法作进一步验证,有利于更好地了解糖皮质激素对肠道菌群的影响。

综上所述,阿霉素肾病大鼠长期使用醋酸泼尼松龙治疗后肠道菌群的丰度和多样性未发生显著改变。但菌群属水平差异分析表明,异杆菌属丰度增加,这可能增加 SCFAs,诱导 Treg 细胞生成,进而产生免疫抑制等作用,也可能参与缓解高脂血症。肠道菌群中细菌侵袭上皮细胞代谢通路增强以及生物节律代谢通路减弱,可能与长期使用糖皮质激素后出现激素依赖或易激惹等副作用有关。关于醋酸泼尼松龙治疗后产 SCFAs 的肠道菌群对免疫状态的影响,肠道菌群变化的代谢物对肾脏损伤预后的影响,以及诱导肾病综合征缓解的特定肠道菌株的分离培养等有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Wang CS, Greenbaum LA. Nephrotic syndrome[J]. *Pediatr Clin North Am*, 2019, 66(1): 73-85.
- [2] Shao XS, Yang XQ, Zhao XD, et al. The prevalence of Th17 cells and FOXP3 regulate T cells (Treg) in children with primary nephrotic syndrome[J]. *Pediatr Nephrol*, 2009, 24(9): 1683-1690.
- [3] Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 axis: a dynamic balance regulated by the gut microbiome[J]. *Front Immunol*, 2015(6): 639.
- [4] Ruotula T, De Goffau MC, Nieminen JK, et al. Maturation of gut microbiota and circulating regulatory T cells and development of IgE sensitization in early life[J]. *Front Immunol*, 2019(10): 2494.
- [5] Zhang D, Zhu C, Fang Z, et al. Remodeling gut microbiota by *Clostridium butyricum* attenuates intestinal injury in burned mice[J]. *Burns*, 2020, 46(6): 1373-1380.
- [6] Kidney disease: improving global outcomes glomerular diseases work group. KDIGO 2021 clinical practice guideline for the management of glomerular diseases[J]. *Kidney Int*, 2021, 100(4S): S1-S276.
- [7] Schijvens AM, Ter Heine R, De Wildt SN, et al. Pharmacology and pharmacogenetics of prednisone and prednisolone in patients with nephrotic syndrome[J]. *Pediatr Nephrol*, 2019, 34(3): 389-403.
- [8] Adcock I M. Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2000, 13(3): 115-126.
- [9] Zhang C, Yin A, Li H, et al. Dietary modulation of gut microbiota contributes to alleviation of both genetic and simple obesity in children[J]. *EBioMedicine*, 2015, 2(8): 968-984.
- [10] Yamada T, Takahashi D, Hase K. The diet-microbiota-metabolite axis regulates the host physiology[J]. *J Biochem*, 2016, 160(1): 1-10.
- [11] D'amelio P, Sassi F. Gut microbiota, immune system, and bone[J]. *Calcif Tissue Int*, 2018, 102(4): 415-425.
- [12] Tsuji S, Suruda C, Hashiyada M, et al. Gut microbiota dysbiosis in children with relapsing idiopathic nephrotic syndrome[J]. *Am J Nephrol*, 2018, 47(3): 164-170.
- [13] Vaziri ND, Zhao YY, Pahl MV. Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: the nature, mechanisms, consequences and potential treatment[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2016, 31(5): 737-746.
- [14] Pereira WDF, Brito-Melo GEA, De Almeida CAS, et al. The experimental model of nephrotic syndrome induced by Doxorubicin in rodents: an update[J]. *Inflamm Res*, 2015, 64(5): 287-301.
- [15] Riva A, Borgo F, Lassandro C, et al. Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in Firmicutes populations[J]. *Environ Microbiol*, 2017, 19(1): 95-105.
- [16] Li C, Huang Q, Yang R, et al. Gut microbiota composition and bone mineral loss-epidemiologic evidence from individuals in Wuhan, China[J]. *Osteoporos Int*, 2019, 30(5): 1003-1013.
- [17] Kang Y, Feng D, Law HKW, et al. Compositional alterations of gut microbiota in children with primary nephrotic syndrome after initial therapy[J]. *BMC Nephrol*, 2019, 20(1): 434.
- [18] Igarashi H, Maeda S, Ohno K, et al. Effect of oral administration of metronidazole or prednisolone on fecal microbiota in dogs[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107909.
- [19] Wu T, Yang L, Jiang J, et al. Chronic glucocorticoid treatment

