

中枢性性早熟女童肠道菌群分析

王格, 张雪荣, 刘雁云, 段云雁, 沈鹤霄

基金项目:湖北省中医药管理局 2023~2024 年度中医药面上项目(ZY2023M065);湖北省中医药管理局中医药重点学科建设项目(鄂中医通[2023]2号);湖北中医药大学“十四五”优秀学科团队建设项目(100702020803)

作者单位:430065 武汉,湖北中医药大学基础医学院 2021 级中医诊断学专业研究生(王格);湖北中医药大学,湖北时珍实验室(张雪荣,刘雁云);430060 武汉,湖北中医药大学附属医院(湖北省中医院)儿科,中医肝肾研究及应用湖北省重点实验室(张雪荣,段云雁);430206 武汉,美益添生物医药(武汉)有限公司(沈鹤霄)

作者简介:王格(1993—),女,湖北中医药大学 2021 级硕士研究生在读。研究方向:中医药治疗儿童内分泌系统疾病

通信作者:张雪荣,E-mail:1251635860@qq.com

【摘要】目的 分析中枢性性早熟(CPP)女童肠道菌群的多样性、结构及功能特征,挖掘其与同年龄段健康女童的差异菌群及潜在功能。**方法** 选择 2023 年 11~12 月在湖北省中医院儿科门诊就诊并确诊为 CPP 的女童 20 例为 CPP 组,同期选取同年龄段健康女童志愿者 20 例为对照组。收集两组粪便样本进行 16S rRNA 测序,分析两组肠道菌群组成结构及功能差异。**结果** 两组肠道菌群的 α 多样性比较差异无统计学意义($P>0.05$)。CPP 组肠道菌群的 β 多样性显示出明显的分离趋势,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。CPP 组的基因富含内分泌和代谢疾病、核苷酸代谢、氨基酸代谢、细胞加工及信号转导等功能。**结论** CPP 女童与健康女童在肠道菌群数目、种类多样性、分布均匀性方面差异不大,但在结构上存在显著差异;预测内分泌和代谢疾病、核苷酸代谢、氨基酸代谢、细胞加工及信号转导等功能与 CPP 有潜在相关性。

【关键词】 中枢性性早熟; 肠道菌群; 功能预测; 儿童

doi:10.3969/j.issn.1674-3865.2024.05.013

【中图分类号】 R585 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3865(2024)05-0419-06

Analysis of intestinal flora of girls with central precocious puberty

WANG Ge¹, ZHANG Xuerong^{1,2,3}, LIU Yanyun^{1,2}, DUAN Yunyan³, SHEN Hexiao⁴

- [33] Kaya Y, Saka S, Tuncer D. Effect of hippotherapy on balance, functional mobility, and functional independence in children with Down syndrome: randomized controlled trial[J]. Eur J Pediatr, 2023, 182(7): 3147-3155.
- [34] Lima CRG, Pavão SL, de Campos AC, et al. Sit-to-stand movement in children with cerebral palsy and relationships with the International classification of functioning, disability and health: A systematic review[J]. Res Dev Disabil, 2020, 107: 103804.
- [35] Aisen ML, Kerkovich D, Mast J, et al. Cerebral palsy: clinical care and neurological rehabilitation[J]. Lancet Neurol, 2011, 10(9): 844-852.
- [36] Tekin F, Kavlak E, Cavlak U, et al. Effectiveness of Neuro-Developmental Treatment (Bobath Concept) on postural control and balance in Cerebral Palsied children[J]. J Back Musculoskelet Rehabil, 2018, 31(2): 397-403.
- [37] Ahmed Hassanin M, Aly MG, et al. Task-oriented training for upper limb functions in patients with multiple sclerosis: Systematic review and meta-analysis[J]. Mult Scler Relat Disord, 2023, 73: 104625.
- [38] Damiano DL, Longo E. Early intervention evidence for infants with or at risk for cerebral palsy: an overview of systematic reviews[J]. Dev Med Child Neurol, 2021, 63(7): 771-784.
- [39] Salazar AP, Pagnussat AS, Pereira GA, et al. Neuromuscular electrical stimulation to improve gross motor function in children with cerebral palsy: a meta-analysis[J]. Braz J Phys Ther, 2019, 23(5): 378-386.
- [40] Campos DR, Bueno TBC, Anjos JS GG, et al. Early neuromuscular electrical stimulation in addition to early mobilization improves functional status and decreases hospitalization days of critically ill patients[J]. Crit Care Med, 2022, 50(7): 1116-1126.
- [41] Yuksel E, Unver B, Karatosun V. Comparison of kinesio taping and cold therapy in patients with total knee arthroplasty: A randomized controlled trial[J]. Clin Rehabil, 2022, 36(3): 359-368.
- [42] Ries AJ, Schwartz MH. Ground reaction and solid ankle-foot orthoses are equivalent for the correction of crouch gait in children with cerebral palsy[J]. Dev Med Child Neurol, 2019, 61(2): 219-225.
- [43] Choo YJ, Chang MC. Effectiveness of an ankle-foot orthosis on walking in patients with stroke: a systematic review and meta-analysis[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 15879.

(收稿日期:2024-03-25)

¹Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; ²Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China; ³Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine, Hubei Key Laboratory of theory and application research of liver and kidney in traditional Chinese medicine, Wuhan 430060, China; ⁴Meiyitian Biopharmaceutical (Wuhan) Co., Wuhan 430206, China

Corresponding author: ZHANG Xuerong, E-mail: 1251635860@qq.com

【Abstract】 Objective To analyze the diversity, structure and functional characteristics of the intestinal flora of girls with central precocious puberty (CPP), and to explore the differential flora and potential functions of them with those of healthy girls of the same age. **Methods** We selected 20 girls who attended the pediatric outpatient clinic of Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine from November to December 2023 and were diagnosed with CPP as the CPP group, and 20 healthy girls volunteers of the same age during the same period were included as the control group. Stool samples were collected for 16S rRNA sequencing to analyze the differences in the composition, structure and function of the intestinal flora between the two groups. **Results** The difference in α -diversity of intestinal flora between the two groups was not statistically significant ($P > 0.05$). The β -diversity of intestinal flora in the CPP group showed a clear tendency to segregate, and the difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$). Genes in the CPP group were enriched for endocrine and metabolic disorders, nucleotide metabolism, amino acid metabolism, cellular processing, and signal transduction. **Conclusion** Differences between girls with CPP and healthy girls are not significant in terms of the number, species diversity, and distributional homogeneity of intestinal flora, but there are significant structural differences; the functions in predicting endocrine and metabolic diseases, nucleotide metabolism, amino acid metabolism, cellular processing, and signaling are potentially correlated with CPP.

【Keywords】 Central precocious puberty; Intestinal flora; Function prediction; Child

中枢性性早熟(central precocious puberty, CPP)是儿童常见的一种内分泌疾病,其由于下丘脑-垂体-性腺轴功能提前启动,促性腺激素释放激素增加,而导致女孩 7.5 岁前、男孩 9 岁前出现内外生殖器官快速发育及第二性征呈现^[1]。由于青春期提前启动,患儿会出现发育提前,发育速度过快,而导致骨骺提前闭合,对成年后的终身高造成影响。此外,还会使其患糖尿病、心血管疾病等的风险增加。随着人们生活、经济文化,以及营养水平的提高, CPP 逐渐成为社会关注的热点。全球多国 CPP 的发病率各不相同,但均呈现逐年升高的趋势,以及存在青春发育启动年龄提前的现象,且女童发病率约为男童的 5~10 倍^[2]。

肠道菌群是肠道微生物的集合体,通过微生物代谢产物激活肠道神经系统,影响人体内分泌系统^[3]。各种研究都强调了肠道菌群和内分泌疾病之间的关系,如肥胖和糖尿病。有研究表明 CPP 与肥胖存在关联^[4-6],但肠道菌群和 CPP 之间的关系还未可知。有研究表明,肥胖和青春期之间密切相关,体质指数与性早熟的风险呈正相关^[6]。有研究指出,肥胖患者会出现菌群失调现象^[7]。因此,可以合理地假设,肠道菌群可能与 CPP 存在一定的相关性,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择 2023 年 11~12 月在湖北省中医院儿科门

诊就诊并确诊为 CPP 的女童 20 例作为 CPP 组,同期选取同年龄段健康女童志愿者 20 例为对照组。CPP 组平均年龄为(7.65±1.14)岁;平均体质指数为 16.02±1.56。对照组平均年龄为(7.65±1.14)岁;平均体质指数为 16.18±1.24。两组女童在年龄、体质指数方面比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

本研究经湖北省中医院伦理委员会审批同意(批号:HBZY2023-C60-02)。

1.2 诊断标准

参照《中枢性性早熟诊断与治疗专家共识(2022)》中关于 CPP 的诊断标准^[1]。

1.3 纳入标准

(1)符合 CPP 的诊断标准;(2)年龄 6~10 周岁,骨龄<12.5 岁的女童;(3)所有受试者近 4 周内未使用抗生素、益生菌或益生元等;(4)监护人知情同意。

1.4 排除标准

(1)因先天性甲状腺功能或中枢神经系统器质性疾病导致的 CPP;(2)外周性性早熟;(3)伴有严重的心、肾、肝、造血系统疾病;(4)异性性早熟;(5)患有糖尿病或其他内分泌系统疾病;(6)患有肠易激综合征或其他消化系统疾病;(7)患有免疫系统疾病或处于免疫缺陷状态;(8)患有抑郁症或神经系统疾病等;(9)近期已参加其他临床试验而影响结果判定或近

期使用过性激素类药物、抗生素或中药者。

1.5 方法

1.5.1 样品采集

分别收集两组受试者的新鲜粪便样本。由受试者在家中用预先标记的无菌粪便采样管收集粪便。采样管中收集的粪便在 12 h 内送检,然后储存在 -80°C 冰箱保存。样品交由美益添生物医药(武汉)有限公司进行检测。

1.5.2 DNA 提取、PCR 扩增、扩增子文库构建和测序

从粪便中提取微生物基因组 DNA,用 Qubit 检测 DNA 浓度,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA 完整性。按指定测序区域(341F:5'-CCT ACG GGN GGC WGC AG-3';805R:5'-GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC-3'),合成带有 barcode 的特异引物,随机选取具有代表性的样本进行预实验,确保在最低循环数中使绝大多数样本能够扩增出浓度合适的产物。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,从第二步开始 25 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增完成后,用磁珠对产物进行纯化,用 Qubit 检测产物浓度,并用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物大小是否与预期相符。对扩增好的 PCR 产物进行混样建库,加上测序接头,进行 PCR 扩增后用磁珠分选去掉引物二聚体等小片段,并记录文库 index 信息。反应条件:98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 45 s;98 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,8 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。使用 Qubit 或 qPCR 对文库浓度进行定量并计算浓度,并进行质控。文库检测合格后,使用 Illumina Miseq 扩增子测序平台,用 PE250 测序策略对文库进行测序。

1.5.3 生物信息学分析

下机数据经过数据拼接、质控过滤、去嵌合体等得到有效数据,在 R 中使用 DADA2 软件包生成扩增子序列变体,生成物种序列的聚类单元;分析 α 多样性指数,其中菌落的丰富度指标主要包括 Chao1 和基于丰度的覆盖估计值(abundance-based coverage estimator, ACE)指数,菌落的均匀度指标主要包括 Shannon 和 Simpson 指数,分析并得出两组在整体菌群丰富度和均匀度的差异;通过 PCoA 分析对两组间肠道微生物的构成进行 β 多样性分析,来评估肠道微生物群落结构的差异,PCoA 分析用 4 种度量计算样品之间的距离矩阵:bray-curtis、binary-jaccard、weighted-unifrac、unweighted-unifrac,使用 Qiime(v. 1.9.1) 计算 PCoA,并使用 R 包 ggplot2 绘制如下 PCoA 图;对物种丰度差异分析使用秩和

检验;采用线性判别分析效应量(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)分析寻找具有统计学差异的生物标识;使用 PICRUST2 软件对样本中的肠道菌群进行功能预测,并分析两者差异。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 27.0 软件进行数据分析,计数资料采用 χ^2 检验。符合正态分布的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采取独立样本 t 检验;偏态分布时采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 α 多样性分析

通过计算 Chao1 和 ACE 指数(菌群的丰富度)、Shannon 和 Simpson 指数(菌群的均匀度)等 α 多样性指数反映微生物群落的丰度和多样性。两组肠道菌群的 α 多样性比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 β 多样性分析

采用 bray-curtis、binary-jaccard、unweighted-unifrac、weighted-unifrac 算法对两组间肠道微生物群落组成结构的距离矩阵进行分析。主坐标分析(图 1)显示 CPP 女童和健康儿童肠道菌群结构差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 物种丰度差异分析

秩和检验统计得到两组肠道微生物在属水平上存在丰度差异的菌群有 24 种。其中在 CPP 女童中相对丰度升高的有毛螺菌属、乳梭菌属、微小单胞菌属、草酸杆菌属、肠道单胞菌属、Lachnospiraceae UCG-004、Raoultella, Family XIII UCG-001、Tuzzerella、DTU089。而小杆菌属、多尔氏菌属、粪球菌属、别样杆菌属、吡啉单胞菌属、帕拉普氏菌属、双歧杆菌属、Family XIII AD3011 group、Paludicola、UBA1819、[Ruminococcus] gauvreauii group、Phoceia、Lachnospiraceae UCG-001、Lachnospiraceae UCG-008 在 CPP 女童中相对丰度降低。

在种水平上存在丰度差异的菌群有 13 种。其中在 CPP 女童中相对丰度升高的有普氏栖粪杆菌、诺德拟杆菌、Anaerotruncus sp.、埃氏巨型球菌。而灵巧粪球菌、鸟肠球菌、多氏拟杆菌、单形巨单胞菌、产甲酸草酸杆菌、副普氏菌、Alistipes sp.、Clostridium celatum、Monocercomonoides sp. 在 CPP 女童中相对丰度降低。

2.4 LEfSe 分析

通过 LEfSe 分析(图 2)得到有差异的菌属有 8 种,与物种丰度差异分析结合,发现以下菌属在两组儿童的肠道微生物中存在差异:粪球菌属、多尔氏菌属、乳梭菌属、毛螺菌属、Lachnospiraceae ND3007 group、Lachnospiraceae UCG-004。其中在

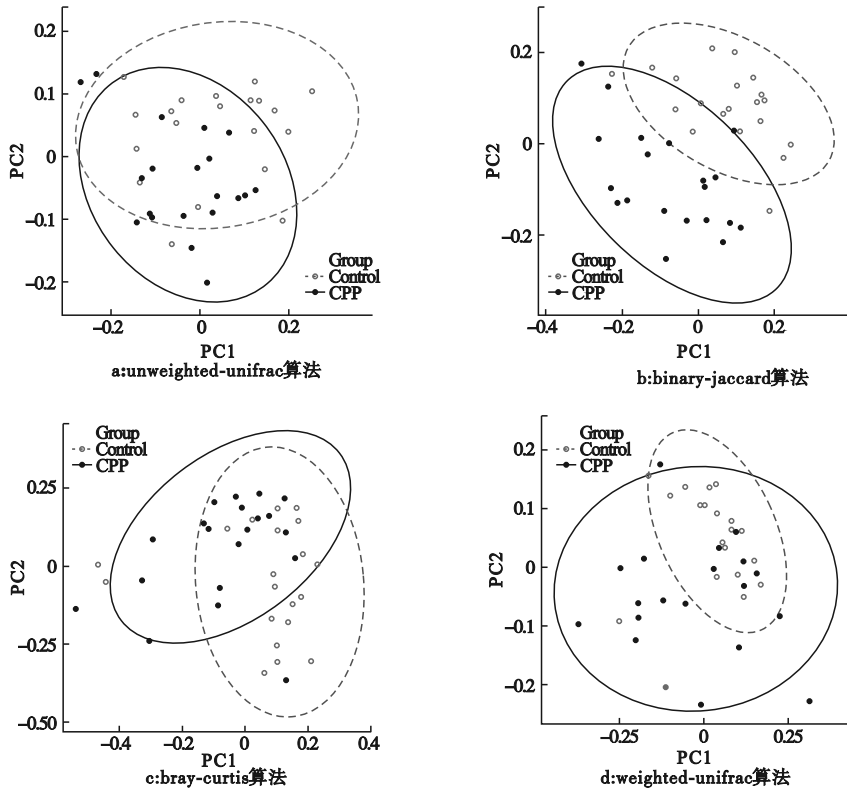


图 1 主坐标分析图

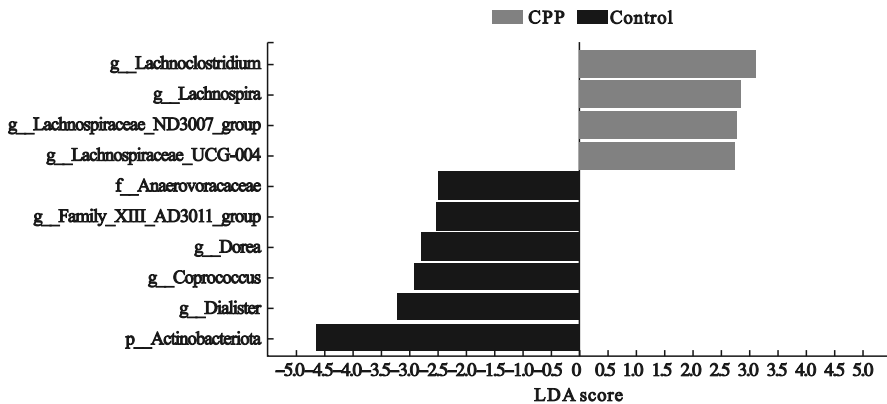


图 2 线性判别分析效应量分析 (LEfSe)

CPP 女童中显著富集的有乳梭菌属、毛螺菌属、Lachnospiraceae ND3007 group、Lachnospiraceae UCG-004。而在 CPP 女童中相对丰度降低的有粪球菌属、多尔氏菌属。

2.5 功能预测

通过 PICRUSt 预测和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 功能基因标注, 共得到 51 个功能类别。通过 KEGG pathway 的相对丰度, 发现两组之间有 21 个差异富集的功能类别 ($P < 0.05$, 图 3)。11 个在 CPP 组中显著富集, 包括细胞加工及信号转导、原

核生物、膜运输、传染性疾病、内分泌和代谢疾病、癌症、核苷酸代谢、氨基酸代谢、神经系统、内分泌系统、和恢复再生的微生物功能。这些结果表明, CPP 女童的肠道菌群潜在功能发生了变化。

3 讨论

肠道菌群作为人体的“内分泌器官”, 在调节宿主的新陈代谢、免疫系统以及行为中起着重要作用^[8], 同时通过微生物的代谢产物激活肠道神经系统, 影响人体的内分泌系统^[9]。同时肠道菌群与人体健康密切相关, 其具有数量巨大、多样化、复杂性和动态性的特点, 在质和量上形成一种生态平衡,

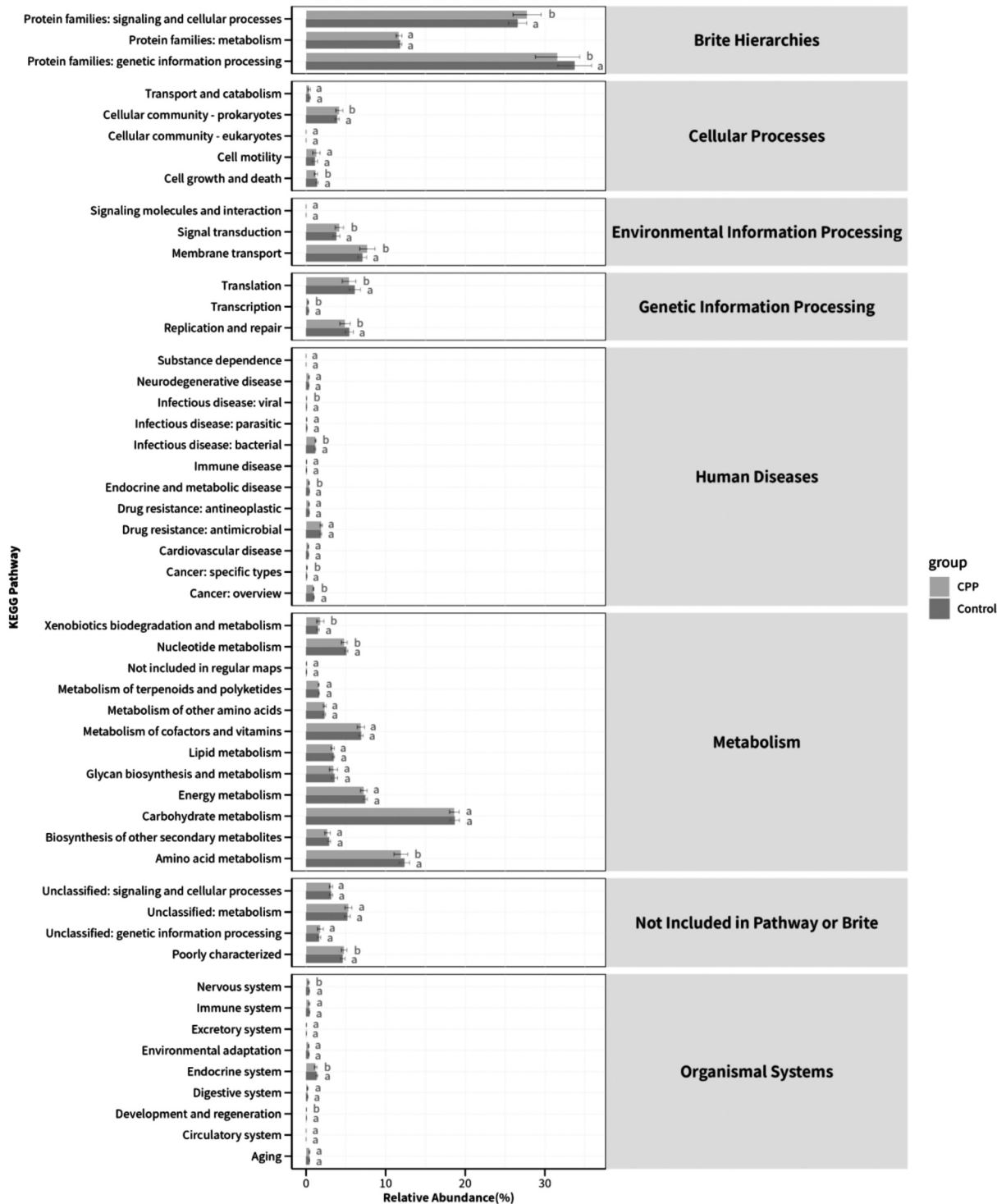


图 3 功能预测 KEGG 分类图

与人体互利共生形成稳态^[10]。在本项研究中,我们通过分析 CPP 女童肠道菌群的多样性、结构及功能特征,挖掘其与同年龄段健康女童的差异菌群及潜在功能,探讨了 CPP 女童和健康女童之间肠道菌群的差异。研究表明,在菌群数目、种类多样性、分布均匀性上, CPP 组与对照组无明显差异,这与 Yuan 等^[11]研究发现也是一致的;但是在菌群结构

上,两组存在明显差异,提示肠道菌群结构紊乱可能是导致女童 CPP 发生的潜在因素。

通过物种丰度差异分析与 LEfSe 分析,发现毛螺菌属、乳梭菌属、Lachnospiraceae ND3007 group、Lachnospiraceae UCG-004 在 CPP 女童中显著富集,为 CPP 女童的优势菌。其中毛螺菌属可以产生乙酸、丁酸为宿主提供能量,参与多种碳水化合物的

代谢,抑制炎症和调节肠黏膜免疫^[12]。而乳梭菌属能利用单糖和双糖产生乙酸,常在肠炎病变、肠道肿瘤,肝脏脂肪变性和代谢性疾病中相对丰度增加。有研究表明,乳梭菌属与多种代谢性疾病的发生密切相关,包括肥胖、高血压、糖尿病等^[13]。Peng 等^[14]研究发现乳梭菌属的丰度与肠道内乙酸水平呈正相关。而乙酸可以通过抗炎和免疫抑制作用有效地稳定肠道内环境,丁酸在激素调节、体质量维持机制中发挥重要作用^[15],这些短链脂肪酸可通过免疫、内分泌、迷走神经及其他通路调节食欲、学习、记忆和情绪等,从而对代谢性疾病的进程产生影响^[16]。因此推测 CPP 女童肠道菌群的变化可能通过参与其体内乙酸等短链脂肪酸的形成,影响机体物质能量代谢,而与 CPP 的发病潜在相关。

同时,肠道菌群可以通过产生短链脂肪酸,促进肠道嗜铬细胞的合成,从而增加 5-羟色胺的合成与释放。有研究表明,5-羟色胺可以通过调控细胞内的钙水平,从而刺激下丘脑促性腺激素释放激素的释放,对于维持黄体生成素、卵泡刺激素分泌和正常生殖功能十分重要^[17]。Xie 等^[18]在临床研究发现, CPP 受试者尿液中 5-羟色胺的直接前体 5-羟色氨酸水平升高,表明在 CPP 患儿中存在 5-羟色胺代谢通路上调的现象。因此合理推测机体肠道菌群的异常改变,使产生短链脂肪酸的肠道菌群增多,从而导致机体短链脂肪酸浓度升高,进而促使 5-羟色胺分泌增加,作用于下丘脑促性腺激素释放激素神经元,调控下丘脑-垂体-性腺轴,影响青春期时相,参与 CPP 发生发展。可以在后续的研究中进一步挖掘产生短链脂肪酸的肠道菌群与 CPP 可能存在的关联。

4 结论

通过功能预测,发现与内分泌和代谢疾病、核苷酸代谢、氨基酸代谢、细胞加工及信号转导等功能相关的肠道微生物在 CPP 女童中差异富集,提示该功能与 CPP 可能存在潜在相关性。

本研究亦存在一定的不足,包括研究周期较短,样本量有限,在反映真实情况方面可能不充分。期待在后续的研究中进一步完善,并探索 CPP 肠道菌群中的优势菌或者差异菌,从而对 CPP 的发生机制提供新的思路。

参考文献

- [1] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组,中华儿科杂志编辑委员会.中枢性早熟诊断与治疗专家共识(2022)[J].中华儿科杂志,2023,61(1):16-22.
- [2] 吴洁,朱丽萍,吴久玲,等.女性性早熟的诊治共识[J].中国妇幼保健研究,2018,29(2):135-138.
- [3] Evans JM, Morris LS, Marchesi JR. The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host[J]. J Endocrinol, 2013, 218(3):R37-47.
- [4] 郭金鑫,卢昱,刘改燕,等.儿童超重肥胖与中枢性早熟关系的病例对照研究[J].中国妇幼保健研究,2023,34(3):1-5.
- [5] Adair LS, Gordon-Larsen P. Maturational timing and overweight prevalence in US adolescent girls[J]. Am J Public Health, 2001, 91(4):642-644.
- [6] Chen C, Zhang Y, Sun W, et al. Investigating the relationship between precocious puberty and obesity: a cross-sectional study in Shanghai, China[J]. BMJ Open, 2017, 7(4):e014004.
- [7] Dalby MJ, Ross AW, Walker AW, et al. Dietary uncoupling of gut microbiota and energy harvesting from obesity and glucose tolerance in mice[J]. Cell Rep, 2017, 21(6):1521-1533.
- [8] Neuman H, Debelius JW, Knight R, et al. Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system[J]. FEMS Microbiol Rev, 2015, 39(4):509-521.
- [9] 徐翰南,蔡征真,王云,等.肠道菌群对肠道神经-内分泌-免疫系统的影响及其病理生理意义[J].生理学报,2020,72(3):347-360.
- [10] 喻琴,刘宇,熊家玲,等.特发性中枢性早熟女童肠道菌群研究[J].健康之友,2021(24):154.
- [11] Yuan X, Chen R, Zhang Y, et al. Gut microbiota: effect of pubertal status[J]. BMC Microbiol, 2020, 20(1):334.
- [12] 符欢.人粪便中短链脂肪酸的快速分析方法建立和验证及其临床应用[D].长春:长春工业大学,2020.
- [13] 王钰铭.大柴胡汤通过调节肠道菌群和血清代谢产物改善高脂饮食引起的非酒精性脂肪性肝病[D].天津:天津中医药大学,2022.
- [14] Peng M, Wang L, Su H, et al. Ginsenoside Rg1 improved diabetes through regulating the intestinal microbiota in high-fat diet and streptozotocin-induced type 2 diabetes rats[J]. J Food Biochem, 2022, 46(10):e14321.
- [15] Neuman H, Debelius JW, Knight R, et al. Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system[J]. FEMS Microbiol Rev, 2015, 39(4):509-521.
- [16] 郭慧慧,申浩然,韩燕星,等.短链脂肪酸:肠-器官轴调控疾病的信号使者[J].药理学报,2023,58(3):593-604.
- [17] Yano JM, Yu K, Donaldson GP, et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis[J]. Cell, 2015, 161(2):264-276.
- [18] Xie Y, Hu F, Xiang D, et al. The metabolic effect of gut microbiota on drugs[J]. Drug Metab Rev, 2020, 52(1):139-156.

(收稿日期:2024-01-03)

欢迎订阅

欢迎投稿