

基于16S rRNA测序分析糖尿病尿路感染者尿液菌群特征

尹九湖^{1,4} 卢晓明^{1,5} 孙科² 易忠权³ 沈园园¹ 刘亚东^{1,4,5}

【摘要】目的 探讨16S rRNA测序技术在糖尿病尿路感染者尿液菌群特征分析中的应用。**方法** 收集于2021年3月至2021年9月盐城市第三人民医院泌尿外科、内分泌科门诊及住院患者的尿液样本,对糖尿病尿路感染者(DI)(12例)及非尿路感染人群(DNI)(12例)、正常人群(NOR)(9例)及单纯尿路感染者(UTI)(7例)尿液菌群16S保守区V3、V4进行测序分析。利用Alpha和Beta多样性指数分析尿液菌群的丰度和均匀度及组间差异。对不同分组进行菌群物种组成分析,利用R软件包绘制菌群间相关性热图。利用BugBase软件分析预测各组菌群表型。**结果** 在Alpha多样性分析中,DI组与NOR组患者observed species指数、香农指数(shannon)、辛普森指数(simpson)以及chao1指数4个指标差异均有统计学意义($t = 2.833$ 、 $P = 0.011$, $t = 3.619$ 、 $P = 0.002$, $t = 2.82$ 、 $P = 0.011$, $t = 2.69$ 、 $P = 0.017$)。PCoA分析4组间Beta多样性差异无统计学意义($F = 1.71$ 、 $P = 0.071$)。DI与DNI组菌群组成差异有统计学意义($F = 2.56$ 、 $P = 0.031$)。在物种组成分析中,在门水平,厚壁菌门在DI组与DNI组患者尿液样本中差异有统计学意义($Z = -2.425$ 、 $P = 0.014$) ; 在属水平,乳酸菌属(Lactobacillus)($Z = -2.175$ 、 $P = 0.03$)、Negativicoccus($Z = -2.685$ 、 $P = 0.007$)、理研菌属(Rikenella)($Z = -2.134$ 、 $P = 0.033$) ; 卟啉单胞菌属等14类菌属在DI组与NOR组差异均有统计学意义(P 均 < 0.05) ; Vulcaniibacterium属在DI组与UTI组患者尿液样本差异有统计学意义($Z = -2.405$ 、 $P = 0.019$)。菌群相关性分析结果显示,DI组患者中变形菌门与放线菌门($r = -0.73$ 、 $P = 0.007$)、厚壁菌门($r = -0.67$ 、 $P = 0.017$)呈负相关。菌群表型预测结果显示,DI组与DNI组患者生物膜形成表型差异有统计学意义($Z = -2.456$ 、 $P = 0.014$)。**结论** DI组患者菌群丰度与均匀度较NOR组显著下降。变形菌门和放线菌门、厚壁菌门的菌群失衡,可能导致生物膜形成表型差异,进而引起糖尿病患者尿路感染易感性增加。

【关键词】 糖尿病; 尿路感染; 菌群; 16S rRNA

Microbiota characteristics of urine microbiota in patients with diabetic urinary tract infection based on 16S rRNA gene sequencing analysis Yin JiuHu^{1,3}, Lu Xiaoming^{1,4}, Sun Ke², Yi Zhongquan¹, Shen Yuanyuan¹, Liu Yadong^{1,3,4}. ¹Department of Urology, ²Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, ³Department of Central Laboratory, The Third People's Hospital of Yancheng, Yancheng 224000, China; ⁴Yancheng Hospital, the Affiliated Hospital of Jiangsu Vocational College of Medicine⁴, Yancheng 224000, China; ⁵Affiliated Hospital 6 of Nantong University, Yancheng 224000, China
Corresponding author: Liu Yadong, Email: billups0123@163.com

【Abstract】Objective To explore the application of 16S rRNA sequencing on analysis of the microbiota characteristics of urine flora in diabetic urinary tract infections. **Methods** The urine samples of patients with diabetic urinary tract infection (DI) (12 cases), patients with diabetic non-urinary tract infection (DNI) (12 cases), normal population (NOR) (9 cases) and patients with urinary tract infection (UTI) (7 cases) were collected from outpatients and inpatients in the Department of Urology and Endocrinology of the Third People's Hospital of Yancheng from March 2021 to September 2021, and were sequenced and analyzed by the conserved region V3 and V4 of 16S rDNA. The indices Alpha was used to analyze the abundance and evenness of urine microbiota.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2023.03.004

基金项目: 江苏省卫生健康委医学科科研项目 (No. Z2021024); 盐城市医学科技发展计划项目 (No. YK2020075); 江苏医药职业学院临床医学院科研项目 (No. 20209110)

作者单位: 224000 盐城市, 盐城市第三人民医院泌尿外科¹、内分泌科²、中心实验室³; 224000 盐城市, 江苏医药职业学院临床医学院⁴; 224000 盐城市, 南通大学第六附属医院泌尿外科⁵

通信作者: 刘亚东, Email: billups0123@163.com

The flora species composition of different groups was analyzed by beta diversity, and the heat map of correlation between the flora was drawn by R software. The phenotypes of different groups were forecasted by BugBase software. **Results** In Alpha diversity analysis, there were significant differences in observed species, shannon, simpson, chao1 between DI group and NOR group ($t = 2.833, P = 0.011$; $t = 3.619, P = 0.002$; $t = 2.82, P = 0.011$; $t = 2.69, P = 0.017$). In Beta diversity comparison, PCoA analysis showed no significant difference among the four groups ($F = 1.71, P = 0.071$), while patients in DI group and DNI group had significant difference in PCoA analysis ($F = 2.56, P = 0.031$). During the analysis of species composition, at the phylum level, Firmicutes were significantly different between DI group and DNI group ($Z = -2.425, P = 0.014$). At the genus level, 3 genera including *Lactobacillus*, *Negativicoccus*, *Rikenella* showed significant differences in the urine samples between DI group and DNI group ($Z = -2.175, P = 0.03$; $Z = -2.685, P = 0.007$; $Z = -2.134, P = 0.033$). Total of 14 genera including *Porphyromonas* were significantly different between DI group and NOR group (all $P < 0.05$). *Vulcaniibacterium* were significantly different in the urine samples of DI group and UTI group ($Z = -2.405, P = 0.019$). In the analysis of microbiota correlation, Proteobacteria were negatively correlated with Actinobacteria ($r = -0.73, P = 0.007$) and Firmicutes ($r = -0.67, P = 0.017$) in DI group. In the study of microbiota phenotype, biofilm formation phenotype were significantly different between DI group and DNI group ($Z = -2.456, P = 0.014$). **Conclusions** The abundance and evenness of microbiota in DI group were significantly lower than those in NOR group. The imbalance of Proteobacteria, Actinomycetes and Firmicutes may lead to differences in biofilm formation phenotypes, and thus increase the susceptibility to urinary tract infections of diabetic patients.

【Key words】 Diabetes mellitus; Urinary tract infection; Microbiota; 16S rRNA

尿路感染 (urinary tract infection, UTI) 是临床最常见的感染性疾病之一, 全球每年约1.3亿~1.75亿人患病^[1]。有研究表明, 约60.4%女性一生中至少出现1次尿路感染^[2]。尿路感染发生比例很高, 给社会造成较大的经济负担^[3]。流行病学表明糖尿病患者更易出现尿路感染且更易复发^[4-5], 同时耐药性易增加^[6], 但相关机制尚未明确。以往观点认为下尿路为无菌环境, 尿培养提示细菌存在即考虑感染发生。但常规尿培养阳性率低, 且因为培养条件限制, 并不能发现部分特殊致病菌, 给临床诊断及治疗带来诸多挑战^[7-8]。但随着分子生物学技术的发展, 如16S rRNA等测序技术的出现, 证实健康人群尿液中也存在细菌^[9]。进一步研究还发现泌尿道中常驻微生物菌群和菌群多样性可能对维持健康或导致某些疾病进展具有重要意义^[10-11]。但目前为止糖尿病尿路感染者菌群特征研究较少, 且其易感性机制未完全建立。因此, 本研究基于16S rRNA测序从菌群多样性、菌群的物种组成、菌群的相关性以及菌群的表型预测等几个方面进行分析, 为进一步研究糖尿病尿路感染及其易感性提供理论依据, 现报道如下。

资料与方法

一、样本来源

纳入2021年3月至2021年9月盐城市第三人民

医院泌尿外科、内分泌科门诊及住院患者和同期体检人群为对照组共41例, 其中糖尿病尿路感染组 (diabetes urinary tract infection, DI) 12例, 糖尿病非尿路感染组 (diabetes non-urinary tract infection, DNI) 12例, 正常对照组 (normal, NOR) 9例, 单纯尿路感染组 (urinary tract infection, UTI) 8例。参与人员均知情同意并签署同意书, 该项目已通过盐城市第三人民医院伦理委员会批准 (批号: 2020-075)。

二、患者纳入与排除标准

1. 纳入标准: 糖尿病诊断标准基于世界卫生组织标准: 空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L, 或餐后2 h血糖 ≥ 11.1 mmol/L^[12]。尿路感染诊断: 尿白细胞 > 25 个/ μ l或中段尿沉渣白细胞数 ≥ 5 个高倍镜视野, 或中段尿细菌计数 $> 10^5$ CFU/ml (检测设备: 日本希森美康UF-5000 + UC-3500), 同时伴有尿路刺激症状。

2. 排除标准: 合并泌尿系结石、肿瘤以及解剖学畸形的患者。近1个月曾使用过抗菌药物或长期服用激素等影响菌群药物的患者。糖尿病以外的慢性代谢性疾病或自身免疫性疾病患者。

三、样本收集

患者手卫生及自行外阴清洁后, 开启4支50 ml 无菌离心管用肥皂水或清水再次清洗外阴, 男性缩回包皮。接取尿液时, 皮肤尽量不接触管子或盖子

的内部或顶部边缘。收集的新鲜尿液在30 min内离心(3 000 r/min、10 min、离心半径 $r = 16$ cm),弃上清,尿沉渣加裂解缓冲液500 μ l后转移至2 ml无菌离心管中,最后放置于 -80°C 冰箱保存,备用。

四、样本分析

将尿沉渣与裂解液的混合物解冻,4 000 r/min离心10 min,收集沉淀物。将沉淀物悬浮在约150 μ l的裂解缓冲液(Sigma)中,在 37°C 孵育30 min。接着,加入4 μ l RNase(100 mg/ml)(上海源叶生物科技有限公司),在室温下($22\sim 25^{\circ}\text{C}$)静置2 min。25 μ l蛋白酶K(Sigma)和缓冲液(200 μ l)加入混合物,在 56°C 孵育30 min。与200 μ l乙醇混合后,将混合物涂在柱上。后续净化工艺按照制造商说明进行。从微生物基因组DNA中扩增16S rRNA基因V3~V4区(正向引物,5'-ACTCCTACGGGAGGCGAGCAG-3';反向引物,5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')^[13]。测序后的原始数据(Illumina测序平台250PE)利用overlap将两端数据拼接,并质控、去除嵌合体,获得高质量的cleandata。DADA2(Divisive Amplicon Denoising Algorithm)去重去噪,然后使用ASVs(Amplicon Sequence Variants)概念构建类OTU(operational taxonomic units),最后进一步多样性分析、物种分类注释和差异分析等分析。QIIME软件通过将OTU的代表序列与数据库中的模板序列进行比对分析,获得每一个OTU的分类信息。利用基于2013年8月13日Greengenes数据库的PiCRUST分析预测尿液微生物区系^[14]。以序列相似性为97%为基础,利用QIIME计算alpha多样性指数。Beta多样性采用未加权的UniFrac距离测量,同时采用QIIME计算。进行分层聚类,并使用R统计包中开发的定制脚本生成相关性统计图。使用Statistical Analysis of Metagenomic Profiles软件包(版本2.1.3)进一步分析输出文件^[14]。

五、统计学处理

数据采用SPSS 23.0软件包进行统计学分析。计量资料中菌群丰度及均匀度指数(chao1、Observed species、goods_coverage、shannon、Simpson)比较,采用Mann-Whitney U 检验;Beta多样性比较采用PCoA主成分分析;菌群门与属细菌构成差异及两组间细菌表型预测分析,采用Mann-Whitney U 检验。利用R软件(4.1.0)制作堆叠图及菌群相关性热图等。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、四组患者的一般资料

尿液微生物多样性研究共纳入样本41例,经质控后40例样本进入后续研究。其中DI组12例,NOR组9例,UTI组7例,DNI组12例。四组患者男女构成比($\chi^2 = 1.38$ 、 $P = 0.773$)和年龄($F = 2.258$ 、 $P = 0.098$)差异均无统计意义,具有可比性。

二、测序数据量及质量控制

质控后序列长度分布见图1,图中可见序列长度主要集中与400~500,可用于后续分析。

三、共有OTU分析

DI组共包含726个OTUs,NOR组共包含1172个OTUs,DNI组共包含1045个OTUs,UTI组共包含611个OTUs,具体见图2。其中NOR组与DI组共有268个OTUs,UTI组与DI组共有230个OTUs,DNI组与DI组共有292个OTUs。

四、Alpha多样性分析

1. 样本菌群多样性:Alpha多样性是指对单个样本内物种多样性情况的分析,主要用来反映物种丰度和均匀度以及测序深度。目前反映样本丰度和均匀性指标主要包括chao1指数、observed species指数、goods_coverage指数、shannon指数和simpson指数每组样本的Alpha多样性指标如下图。不同分组间比较发现仅DI组与NOR组的observed species指数、shannon指数、simpson指数、chao1指

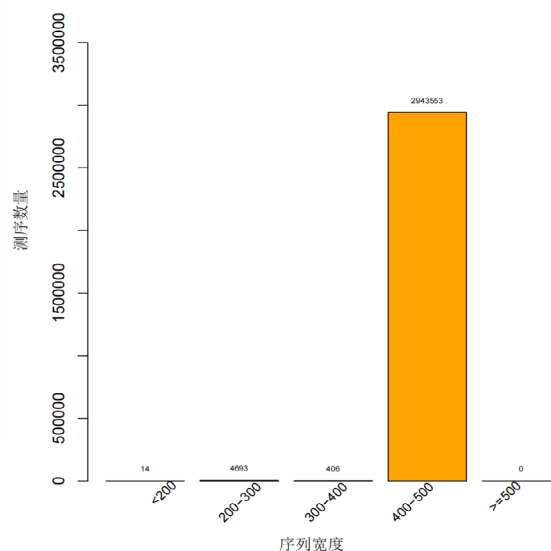
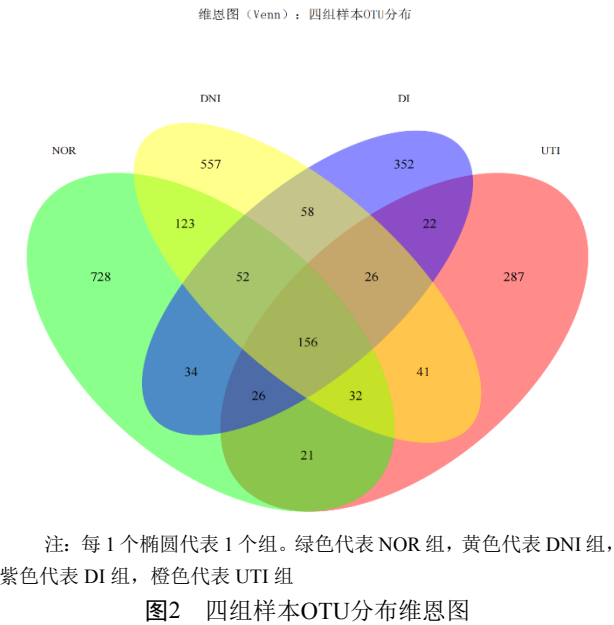


图1 测序序列长度分布

数4个指标差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05) ,
表明菌群丰度和均匀性有差异, 具体见表1。



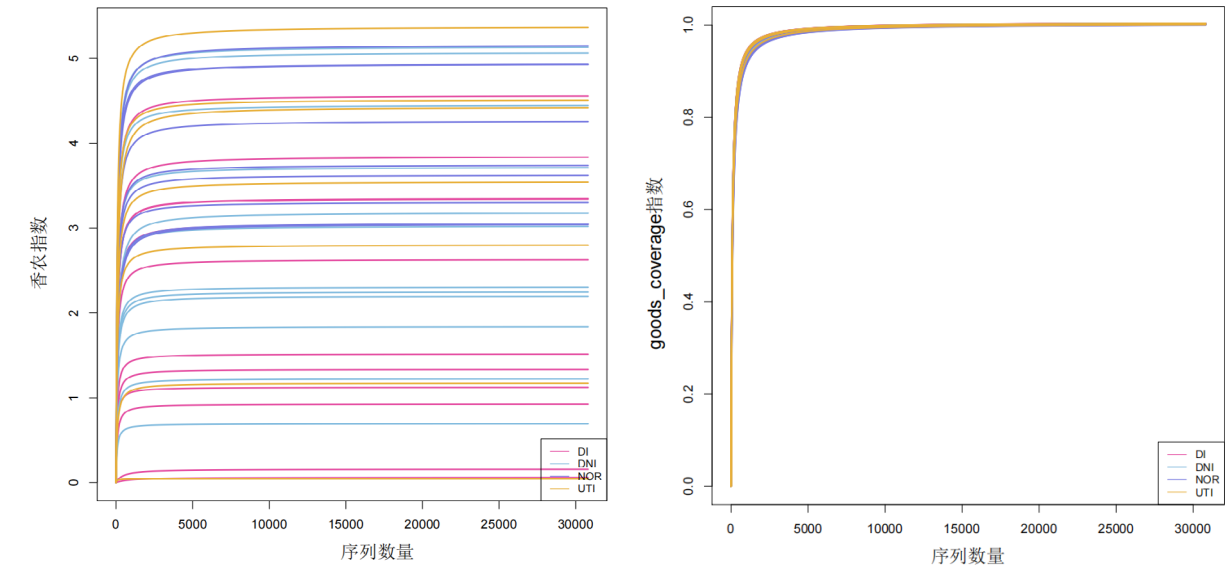
2. 样本测序深度: 稀释曲线 (rarefaction curve)
可反映测序数据量的合理性和样品中物种的丰富程度。曲线趋向平坦说明测序数据量渐进合理, 更多数据量只会产生少量新的物种。下图显示本研究测序深度良好可以用于进一步分析 (图3)。

3. Beta多样性分析: Beta多样性分析是研究不同样本间物种差异性的分析, 通过计算不同样品间距离矩阵差异得出相关分析结果。DI、DNI、UTI与NOR差异无统计学意义 ($F = 1.71$ 、 $P = 0.07$)。DI组与其他组比较见图4: DI组与NOR组 ($F = 0.79$ 、 $P = 0.769$) , DI组与DNI组 ($F = 2.56$ 、 $P = 0.031$) , DI组与UTI组 ($F = 1.58$ 、 $P = 0.165$)。

4. 物种组成分析: (1) 门水平物种组成: 根据检测物种丰度和物种注释表, 对丰度最高的30个门的细菌进行展示 (图5)。在门水平, 最具优势的5个门的菌群分别是厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和梭杆菌门 (Bacteroidetes)。对可鉴定出的菌门进行组间比较, 结果显示厚壁菌

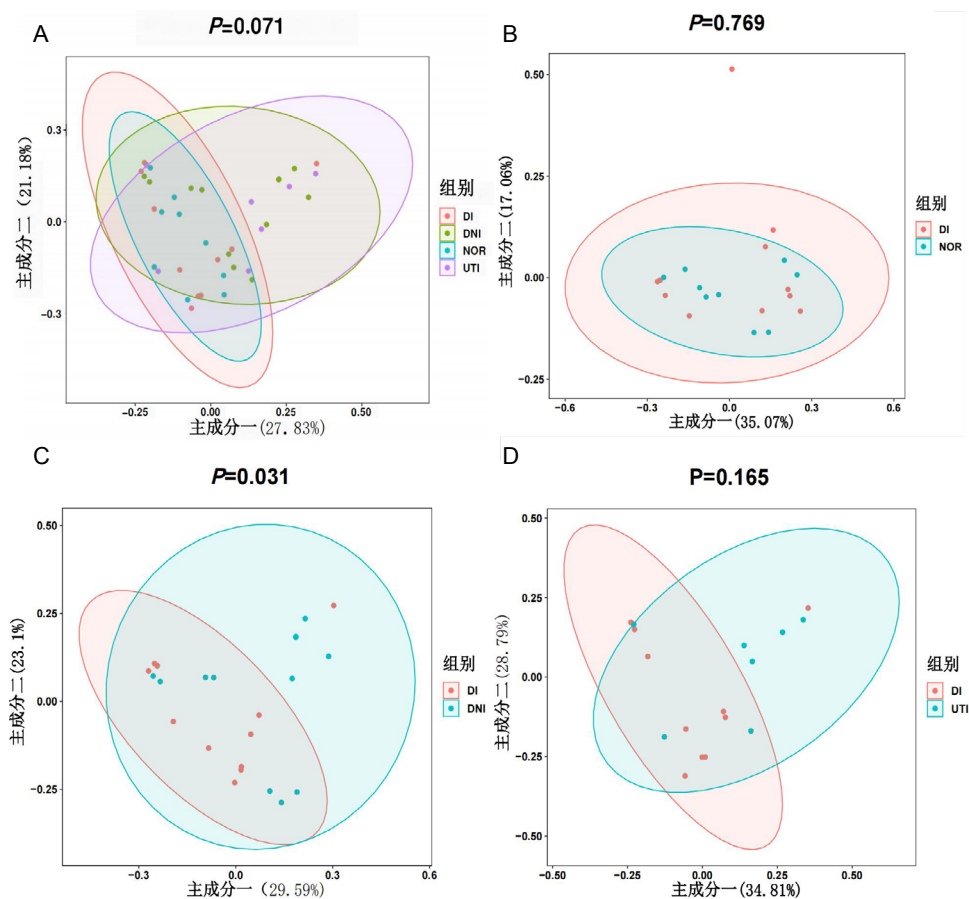
表1 DI 组与 NOR 组 α 多样性指标 [M (P25, P75)]

α 多样性指标	DI组	NOR组	Z值	P值
observed species	76 (27.50, 117.50)	156 (111.50, 295.00)	-2.879	0.004
shannon	2.06 (0.97, 3.34)	3.75 (3.19, 4.93)	-2.595	0.009
simpson	0.62 (0.28, 0.78)	0.87 (0.73, 0.91)	-2.737	0.006
chao1	77.84 (31.25, 115.09)	159.88 (113.43, 313.38)	-2.843	0.004



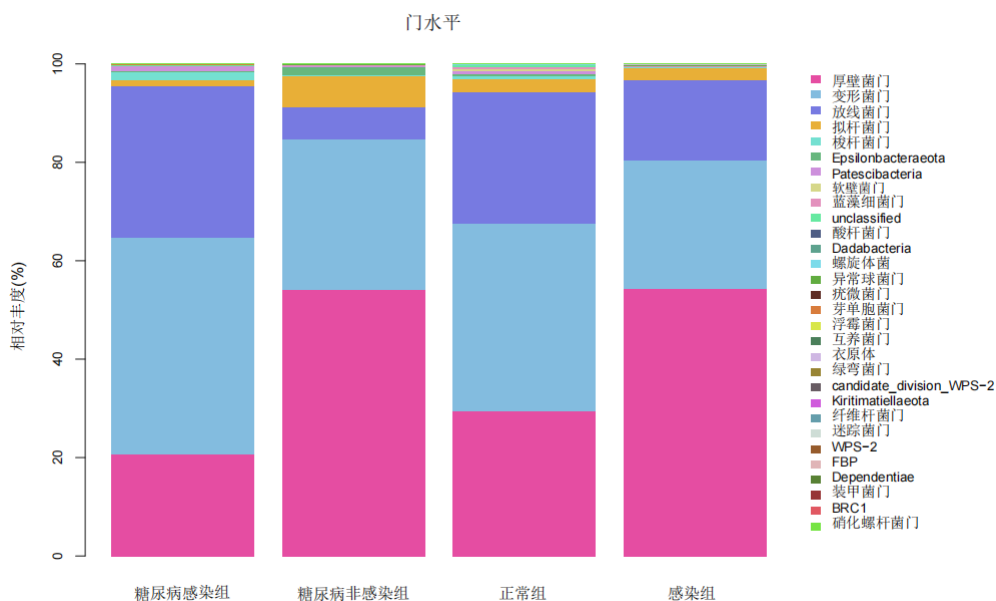
注: 香农指数 (shannon) 稀释曲线走势趋于平坦时, 说明测序数量足够, 能够反应样本中绝大多数微生物群落信息。goods _coverage 稀释曲线走势趋于平坦时, 说明低丰度的微生物也已经被覆盖, 能够反应样本中微生物群落覆盖率良好

图3 observed species指数和香农 (shannon) 指数



注: A: 四组样本菌群分布, B: DI与NOR组, C: DI与DNI组, D: DI与UTI组

图4 菌群分布PCoA图



注: 柱状堆叠图显示DI、DNI、NOR及UTI 4组患者尿液, 在门水平丰度最高的前30门细菌。其中最具优势的5个门的菌群分别是厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和梭杆菌门 (Bacteroidetes)

图5 门水平物种组成

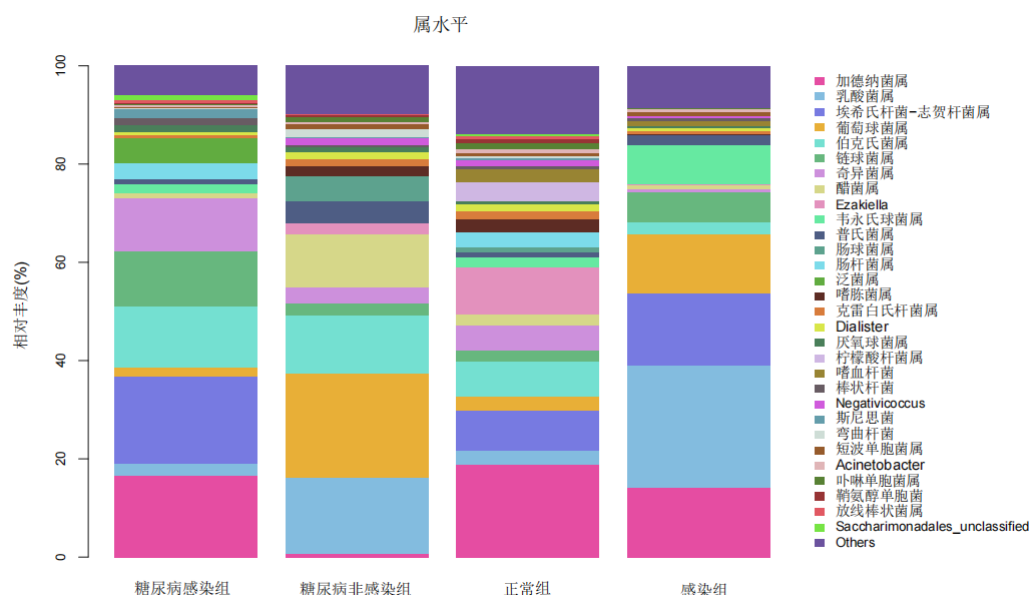
门 (Firmicutes) 在DI组与DNI组尿液样本差异有统计学意义 ($Z = -2.425$ 、 $P = 0.014$)；拟杆菌门 (Bacteroidetes) 在DI组与NOR组中尿液样本差异有统计学意义 ($Z = -1.991$ 、 $P = 0.046$)；但DI组与UTI组未见显著差异菌群。

(2) 属水平物种组成：进一步在细菌属水平分析并对丰度最高的30个属的细菌进行展示 (图6)。结果显示，4组中最具优势的5个菌属分别为加德纳菌属 (Gardnerella)、乳酸菌属 (Lactobacillus)、埃希菌属 (Escherichia-Shigella)、葡萄球菌属 (Staphylococcus) 和伯克霍尔德菌属 (Burkholderia)。

可鉴别的菌属组间比较显示，乳酸菌属 (Lactobacillus) ($Z = -2.175$ 、 $P = 0.03$)、Negativicoccus ($Z = -2.685$ 、 $P = 0.007$)、理研菌属 (Rikenella) ($Z = -2.134$ 、 $P = 0.033$) 在DI组与DNI组尿液样本差异有统计学意义。卟啉单胞菌属 (Porphyromonas)、动弯杆菌属 (Mobiluncus)、Ezakiella、Negativicoccus、W5053、丛毛单胞菌属 (Comamonas)、慢生根瘤菌 (Bradyrhizobium)、Murdochella、红蜡菌属 (Coriobacteriaceae)、Gallicola、隐秘杆菌属 (Arcanobacterium)、Tissierella以及黄杆菌属 (Flavobacterium) 在DI组与NOR组差异有统计学

意义 (P 均 < 0.05)，见表2；Vulcaniibacterium属在DI组与UTI组尿液样本差异有统计学意义 ($Z = -2.405$ 、 $P = 0.016$)。

5. 菌群DI组门水平菌群微生物相关性：通过不同菌群在各组人群尿液中的丰度及变化关系计算出菌群间的相关性，找到有关联的菌群。在DI组门水平 (对于目前可以鉴别出的菌门) 呈正相关的菌群包括：拟杆菌门与Epsilonbacteraeota ($r = 0.588$ 、 $P = 0.044$)，Patescibacteria ($r = 0.599$ 、 $P = 0.040$)、Tenericutes ($r = 0.672$ 、 $P = 0.017$) 呈正相关；软壁菌门与蓝藻菌门 ($r = 0.665$ 、 $P = 0.018$)、螺旋菌门 (Spirochaetes) ($r = 0.631$ 、 $P = 0.028$)、Verrucomicrobia ($r = 0.608$ 、 $P = 0.036$)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) ($r = 0.854$ 、 $P = 0.0004$)、浮霉菌门 (Planctomycetes) ($r = 0.586$ 、 $P = 0.045$) 呈正相关；蓝藻菌门与螺旋菌门 (Spirochaetes) ($r = 0.632$ 、 $P = 0.027$)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) ($r = 0.817$ 、 $P = 0.001$)、绿弯菌门 (Chloroflexi) ($r = 0.859$ 、 $P = 0.0003$) 呈正相关；酸杆菌门 (Acidobacteria) 与Dadabacteria ($r = 0.852$ 、 $P = 0.0004$)、Gemmatimonadetes ($r = 0.678$ 、 $P = 0.015$)、Planctomycetes ($r = 0.871$ 、 $P = 0.0002$)



注：柱状堆叠图显示DI、DNI、NOR及UTI4组患者尿液，在属水平丰度最高的前30细菌。其中最具优势的5个菌属分别是加德纳菌属 (Gardnerella)、乳酸菌属 (Lactobacillus)、埃希菌属 (Escherichia-Shigella)、葡萄球菌属 (Staphylococcus) 和伯克霍尔德菌属 (Burkholderia)

图6 属水平物种组成

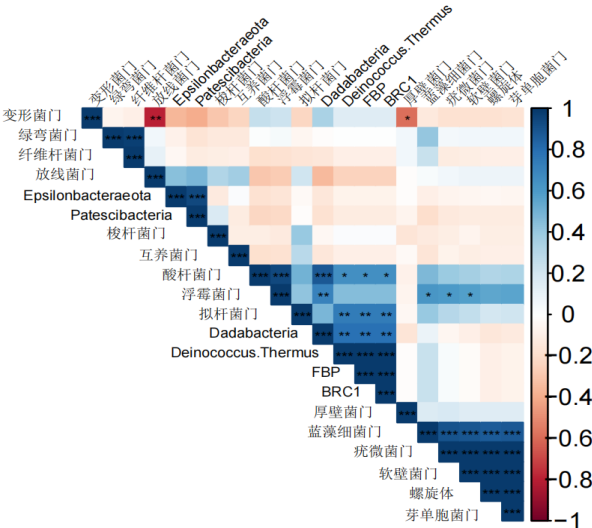
呈正相关；Dadabacteria与Deinococcus_Thermus ($r = 0.631$ 、 $P = 0.028$)、FBP ($r = 0.631$ 、 $P = 0.028$)、BRC1 ($r = 0.631$ 、 $P = 0.028$) 呈正相关；Spirochaetes与Gemmatimonadetes呈正相关 ($r = 0.739$ 、 $P = 0.006$)；异常球菌(Deinococcus_Thermus)与Gemmatimonadetes呈正相关 ($r = 0.604$ 、 $P = 0.037$)；疣微菌门(Verrucomicrobia)与Gemmatimonadetes呈正相关 ($r = 0.776$ 、 $P = 0.003$)；Gemmatimonadetes与Planctomycetes ($r = 0.732$ 、 $P = 0.007$)、Chloroflexi ($r = 0.587$ 、 $P = 0.045$)、FBP ($r = 0.604$ 、 $P = 0.037$)、BRC1 ($r = 0.604$ 、 $P = 0.037$) 呈正相关；Planctomycetes与

Chloroflexi呈正相关 ($r = 0.700$ 、 $P = 0.011$)。呈负相关的菌群为变形菌门与放线菌门 ($r = -0.73$ 、 $P = 0.007$) 和厚壁菌门 ($r = -0.67$ 、 $P = 0.017$) (相关性热图见图7)。

6. 菌群表型预测：微生物群落特征对人类健康有较大影响，目前最常见的菌群表型主要包括9类，分别为革兰阴性、革兰阳性、生物膜形成、需氧、厌氧、含移动元素、兼性厌氧、潜在致病性和耐应激性。本研究利用BugBase软件对4组样本微生物表型进行鉴别。结果显示，DI组与DNI组生物膜形成表型差异有统计学意义 ($Z = -2.456$ 、 $P = 0.014$)。

表2 DI组与NOR组中存在差异的菌属[M(P25, P75)]

菌属	DI组 (12例)	NOR组 (9例)	Z值	P值
卟啉单胞菌属	0.00 (0.00, 0.02)	0.24 (0.00, 2.95)	-2.245	0.025
动弯杆菌属	0.00 (0.00, 0.00)	0.01 (0.00, 0.58)	-2.444	0.015
Ezakiella	0.00 (0.00, 0.01)	0.58 (0.01, 12.90)	-2.758	0.006
Negativicoccus	0.00 (0.00, 0.00)	0.14 (0.00, 2.19)	-2.494	0.013
W5053	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 1.04)	-2.488	0.013
丛毛单胞菌属	0.00 (0.00, 0.13)	0.15 (0.06, 0.50)	-2.318	0.020
慢生根瘤菌属	0.01 (0.00, 0.16)	0.09 (0.03, 0.33)	-2.160	0.031
Murdochella	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.48)	-2.101	0.036
红蜡菌属	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.03)	-2.101	0.036
Gallicola	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.75)	-2.101	0.036
隐秘杆菌属	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.02)	-2.101	0.036
肠杆菌属	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.02)	-2.101	0.036
Tissierella	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.02)	-2.101	0.036
黄杆菌属	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.02)	-2.489	0.013



注：蓝色代表正相关，橘红色代表负相关。*：P < 0.05，**：P < 0.01，***：P < 0.001

图7 糖尿病感染组 (DI) 门水平相关性热图

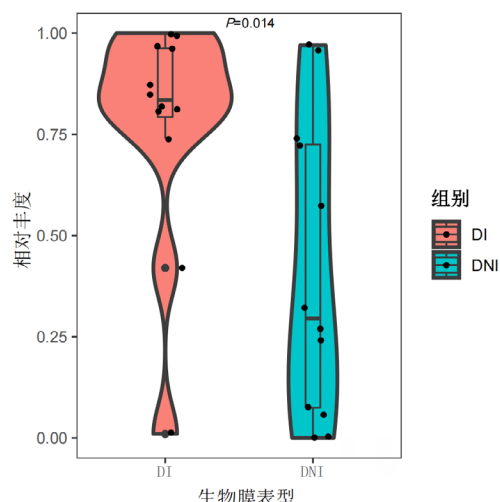


图8 DI与DNI组生物膜表型差异

讨 论

泌尿道微生物是泌尿系感染、结石以及肿瘤等疾病发生进展的重要因素之一^[15-17],已成为国内外研究热点。丰度和均匀性是衡量菌群结构的重要指标。孙宇焱等^[18]研究发现糖尿病患者的尿液微生物多样性、shannon指数、谱系多样性和菌种丰度指数均低于健康组。陈嘉炜等^[19]研究认为糖尿病组尿液菌群的chao1指数和observed species指数显著低于对照组($P < 0.01$),提示糖尿病组菌群丰度低于对照组;shannon指数和simpson指数提示两组菌群多样性差异无统计学意义($P > 0.05$)。而一项对女性糖尿病患者泌尿系统感染的危险因素分析中,汪琳姣等^[20]发现糖尿病感染者的OUT、Sobs指数、chao指数和Ace指数显著高于未感染组(P 均 < 0.05),为女性糖尿病患者泌尿系统感染的独立因素,但两组shannon指数及simpson指数差异无统计学意义。上述菌群结构差异可能与患者选择及测序平台不同有关。本研究菌群分析显示,糖尿病患者尿液菌群多样性及丰度低于正常人群,提示菌群多样性和丰度下降为尿路感染发生的重要表现。目前研究也已证实菌群丰度、均匀度及多样性在某些结构性、代谢性及感染性疾病中均有显著差异^[21-22]。Huang等^[23]在 β 多样性研究中发现女性复发尿路感染人群与未复发人群间存在差异,提示菌群结构变化可能成为潜在的临床诊断指标。而本文 β 多样性研究利用PCoA分析发现DI组与DNI组样本结构存在差异,或许对糖尿病尿路易感性的机制研究提供依据。Penckofer等^[24]利用16S rRNA测序技

术,对糖尿病人群与正常人群的尿液菌群结构进行分析,发现糖尿病组患者尿液以乳杆菌科和肠杆菌科多见,而对照组以加德纳菌科和混合尿液类型多见。在一项对老年女性尿液菌群分析中,Liu等^[25]发现在门水平,老年糖尿病组患者的硝化螺旋菌门、疣微菌门和浮霉菌门显著低于老年非糖尿病组患者;在属水平,老年糖尿病组患者的乳酸菌属显著高于老年非糖尿病组患者。上述研究主要分析了2型糖尿病患者和健康人群尿液菌群的结构特点。在门水平和属水平,本研究未发现乳酸菌在DI组与NOR组差异,但本研究证实DI组与DNI组患者尿液样本中乳酸菌属存在显著差异,故推断乳酸菌属可能在致糖尿病患者尿路感染中发挥重要作用。

机会性致菌可作为尿道共生体而不引起任何感染,但生物菌群平衡打破则可能引起疾病。本研究菌群相关性研究发现DI组中,变形菌门与放线菌门和厚壁菌门呈负相关。但在NOR组未见呈明显负相关的菌群(结果待发表)。这表明DI组中可能存在变形菌门与放线菌门、厚壁菌门细菌的制衡。尿路感染最常见细菌为大肠埃希菌^[26],属于变形菌门;而厚壁菌门中最常见的为葡萄球菌(如金黄色葡萄球菌),乳酸菌属与链球菌属;放线菌门最常见的细菌包括棒状杆菌、分枝杆菌等。而这其中研究较多的为大肠埃希菌与乳酸菌,Ghane等^[27]在一项研究中分离出的4株乳酸菌均具有较强的抗菌活性和抗生物膜活性,可控制或预防大肠埃希菌感染,也进一步表明相互作用在治疗尿路感染中潜在的应用价值。既往研究表明,细菌产生的生物膜,可阻止免疫细胞和抗菌药物的渗透^[28],进而增加感染机会。目前,抑制病原菌生物膜形成已成为有吸引力的治疗靶点^[29]。而大肠埃希菌能够在导尿管和膀胱上皮细胞表面形成强大的生物膜^[30]。本研究也发现DI与DNI组存在生物膜形成表型差异,而差异性分析进一步发现厚壁菌门(Firmicutes)中乳酸菌属在DI组与DNI组尿液样本差异最明显(结果待发表)。结合既往研究,乳酸菌上清培养液中含有多种生物活性化合物,包括生物表面活性剂和胞外多糖,可阻止病原菌的生物膜形成^[31]。因此,推测厚壁菌门乳酸菌属可能通过影响大肠埃希菌生物膜形成表型而影响糖尿病患者尿路感染的发生或者易感。

本研究尚存在一定局限性,如样本量和尿液收集方式等,这也是尿液菌群研究常遇到的问题。

虽然通过导尿收集尿液是研究泌尿微生物群的常用方法之一,但也有研究显示导尿可能会增加感染风险^[26],因此,本研究选择了清洁外阴后排尿收集样本。增加样本量后的分层分析可能会揭示更多的菌群特征。但不可否认16S rRNA测序结果可以更好地反映尿液细菌的生物学特征,更好地为临床诊疗和科研探索提供思路。

综上,本研究主要从菌群多样性、菌群物种组成、菌群相关性以及菌群表型预测等几个方面分析糖尿病患者尿路感染的菌群特征。通过对40份尿液对比研究发现DI患者尿液菌群丰度及均匀性较正常人显著下降。同时在物种门及属水平,尿液菌群组成存在差异。相关性及生物表型差异提示菌群失衡导致生物膜形成差异,可能是引起糖尿病患者尿路感染易感因素之一。

参 考 文 献

- [1] Russo T. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem[J]. *Microbes Infect*,2003,5(5):449-456.
- [2] Foxman B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden[J]. *Infect Dis Clin North Am*,2014,28(1):1-13.
- [3] Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options[J]. *Nat Rev Microbiol*,2015,13(5):269-284.
- [4] Wilke T, Boettger B, Berg B, et al. Epidemiology of urinary tract infections in type 2 diabetes mellitus patients: An analysis based on a large sample of 456,586 German T2DM patients[J]. *J Diabetes Complicat*,2015,29(8):1015-1023.
- [5] Fu AZ, Iglay K, Qiu Y, et al. Risk characterization for urinary tract infections in subjects with newly diagnosed type 2 diabetes[J]. *J Diabetes Complicat*,2014,28(6):805-810.
- [6] 程玲玲. 糖尿病尿路感染患者尿液菌群分布及耐药性分析[J]. *临床医学*,2021,41(2):52-53.
- [7] McDonald M, Kameh D, Johnson ME, et al. A head-to-head comparative phase II study of standard urine culture and sensitivity versus DNA next-generation sequencing testing for urinary tract infections[J]. *Rev Urol*,2017,19(4):213-220.
- [8] Barnes HC, Wolff B, Abdul-Rahim O, et al. A randomized clinical trial of standard versus expanded cultures to diagnose urinary tract infections in women[J]. *J Urol*,2021,206(5):1212-1221.
- [9] Aragon IM, Herrera-Imbroda B, Queipo-Ortuno MI, et al. The urinary tract microbiome in health and disease[J]. *Eur Urol Focus*,2018,4(1):128-138.
- [10] Whiteside SA, Razvi H, Dave S, et al. The microbiome of the urinary tract-a role beyond infection[J]. *Nat Rev Urol*,2015,12(2):81-90.
- [11] Wolfe AJ, Brubaker L. "Sterile Urine" and the presence of bacteria[J]. *Eur Urol*,2015,68(2):173-174.
- [12] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2020年版)[J]. *国际内分泌代谢杂志*,2021,37(4):311-396.
- [13] Fadrosh DW, Ma B, Gajer P, et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform[J]. *Microbiome*,2014,2(1):6.
- [14] Langille M, Zaneveld J, Caporaso J, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. *Nat Biotechnol*,2013,31(9):814-821.
- [15] Brubaker L, Putonti C, Dong Q, et al. The human urobiome[J]. *Mamm Genome*,2021,32(4):232-238.
- [16] Jones-Freeman B, Chonwerawong M, Marcelino VR, et al. The microbiome and host mucosal interactions in urinary tract diseases[J]. *Mucosal Immunol*,2021,14(4):779-792.
- [17] Klein RD, Hultgren SJ. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies[J]. *Nat Rev Microbiol*,2020,18(4):211-226.
- [18] 孙宇焱, 丁三珍. 女性2型糖尿病患者尿液细菌分布及其与血清IL-6的相关性[J]. *中国微生态学杂志*,2021,33(10):1170-1175.
- [19] 陈嘉炜, 曹瑛, 陈杨, 等. 女性II型糖尿病患者尿液菌群特征与非感染性下尿路症状的关系[J]. *临床泌尿外科杂志*,2018,33(1):16-19.
- [20] 汪琳姣, 杨小华, 席巍, 等. 女性糖尿病患者泌尿系统感染的尿液菌群特征, 血清CRP水平及危险因素分析[J]. *国际泌尿系统杂志*,2022,42(2):287-290.
- [21] Thomas-White KJ, Kliethermes S, Rickey L, et al. Evaluation of the urinary microbiota of women with uncomplicated stress urinary incontinence[J]. *Am J Obstet Gynecol*,2017,216(1):55e51-55e16.
- [22] Moustafa A, Li W, Singh H, et al. Microbial metagenome of urinary tract infection[J]. *Sci Rep*,2018,8(1):4333.
- [23] Huang L, Li X, Zheng B, et al. Differential urinary microbiota composition between women with and without recurrent urinary tract infection[J]. *Front Microbiol*,2022,13:888681.
- [24] Penckofer S, Limeira R, Joyce C, et al. Characteristics of the microbiota in the urine of women with type 2 diabetes[J]. *J Diabetes Complicat*,2020,34(6):107561.
- [25] Liu F, Ling Z, Xiao Y, et al. Characterization of the urinary microbiota of elderly women and the effects of type 2 diabetes and urinary tract infections on the microbiota[J]. *Oncotarget*,2017,8(59):100678-100690.
- [26] Nitzan O, Elias M, Chazan B, et al. Urinary tract infections in patients with type 2 diabetes mellitus: review of prevalence, diagnosis, and management[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*,2015,8:129-136.
- [27] Ghane M, Babaekhou L, Ketabi S. *Escherichia coli* antibiofilm activity of kefir probiotic lactobacilli against uropathogenic (UPEC)[J]. *Avicenna J Med Biotechnol*,2020,12(4):221-229.
- [28] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms[J]. *Lancet*,2001,358(9276):135-138.
- [29] Bjarnsholt T, Ciofu O, Molin S, et al. Applying insights from biofilm biology to drug development--can a new approach be developed?[J]. *Nat Rev Drug Discov*,2013,12(10):791-808.
- [30] Eberly AR, Floyd KA, Beebout CJ, et al. Biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* is favored under oxygen conditions that mimic the bladder environment[J]. *Int J Mol Sci*,2017,18(10):2077.
- [31] Sharma D, Saharan BS. Functional characterization of biomedical potential of biosurfactant produced by *Lactobacillus helveticus*[J]. *Biotechnol Rep (Amst)*,2016,11:27-35.

(收稿日期: 2022-12-01)

(本文编辑: 孙荣华)

尹九湖, 卢晓明, 孙科, 等. 基于16S rRNA测序分析糖尿病尿路感染者尿液菌群特征[J/CD]. *中华实验和临床感染病学杂志(电子版)*, 2023,17(3):164-172.