

链脲佐菌素诱导的1型糖尿病雄性NOD小鼠肠道菌群谱特征研究

刘 军¹, 赵玉琼¹, 牛苗苗¹, 郭 超¹, 齐晏永²¹解放军总医院医学创新研究部, 北京 100853; ²解放军总医院京中医疗区, 北京 100120

摘要:背景 雌性非肥胖型糖尿病(non-obese diabetic, NOD)小鼠常用于自发性1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)动物模型的构建, 使用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导雄性NOD小鼠1型糖尿病的研究较少, STZ对雄性NOD小鼠肠道菌群谱的影响尚不清楚。目的 分析STZ诱导雄性NOD小鼠1型糖尿病肠道菌群谱的变化。方法 14只雄性NOD小鼠随机分为模型组(T1DM组, n=8)和对照组(CON组, n=6)。T1DM组小鼠每天注射50 mg/kg的STZ, 连续5 d; CON组小鼠每天腹腔注射同等剂量的0.9%氯化钠注射液, 连续5 d。在造模0 d、7 d、35 d时记录小鼠体质量和空腹血糖。35 d时收集新鲜粪便进行16S rRNA基因V3-V4区测序, 分析雄性NOD小鼠在1型糖尿病(T1DM)状态下肠道菌群的多样性、组成特征、差异菌群以及功能预测。结果 与CON组相比, T1DM组小鼠在35 d时体质量降低, 血糖升高(P 均 <0.05)。T1DM组小鼠肠道菌群的Observed OTUs指数、Chao1指数、Simpson指数和Shannon指数都高于CON组(P 均 <0.05)。T1DM组和CON组小鼠肠道菌群的NMDS分析($P=0.006$, Stress=0.09)、PCoA分析($P=0.003$)和PCA分析($P=0.002$)有显著的离散距离。与CON组相比, T1DM组小鼠肠道的拟杆菌门、酸杆菌门、脱硫杆菌门和蓝菌门上调, 而厚壁菌门下调(P 均 <0.05); 在属水平上, T1DM组的未分类鼠杆菌科、鼠杆菌属、候选糖单胞菌属、脱硫弧菌属和另枝菌属上调, 而联合乳杆菌属下调(P 均 <0.05); T1DM组小鼠肠道菌群的厚壁菌门/拟杆菌门和厚壁菌门/变形菌门的比值降低(P 均 <0.05)。主要差异菌联合乳杆菌和单球菌属与空腹血糖呈负相关, 鼠杆菌属、另枝菌属、候选糖单胞菌属和嗜性真杆菌属与空腹血糖呈正相关(P 均 <0.05)。T1DM小鼠肠道菌群在核苷酸代谢、糖酵解代谢、氨基酸代谢、脂代谢途径中发生显著改变(P 均 <0.05)。结论 链脲佐菌素诱导使雄性NOD小鼠T1DM模型的肠道菌群多样性增加, 菌群构成发生改变, 雄性NOD小鼠T1DM的进展可能与链脲佐菌素诱导的肠道菌群结构和功能紊乱相关。

关键词:1型糖尿病; 肠道菌群; NOD小鼠; 链脲佐菌素; 雄性

中图分类号:R587.1; R574.62

文献标志码:A

文章编号:2095-5227(2025)08-0792-09

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.25042701

引用本文: 刘军, 赵玉琼, 牛苗苗, 等.链脲佐菌素诱导的1型糖尿病雄性NOD小鼠肠道菌群谱特征研究 [J].解放军医学院学报, 2025, 46 (8): 792-800.

Characteristics of gut microbiota profile in male NOD mice induced by streptozotocin in type 1 diabetes mellitusLIU Jun¹, ZHAO Yuqiong¹, NIU Miaomiao¹, GUO Chao¹, QI Yanyong²¹Medical Innovation Research Department of PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ²Central Medical Branch of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100120, China

Corresponding author: QI Yanyong. Email: 1131250225@qq.com

Abstract: Background Female non-obese diabetic (NOD) mice are commonly used for constructing animal models of spontaneous type 1 diabetes mellitus (T1DM), while research on using streptozotocin (STZ) to induce T1DM in male NOD mice is limited, and the impact of STZ on the gut microbiota profile of male NOD mice remains unclear. **Objective** To analyze the changes in gut microbiota profiles in STZ-induced T1DM in male NOD mice. **Methods** Fourteen male NOD mice were randomly divided into model group (T1DM group, n=8) and control group (CON group, n=6). The mice in the T1DM group were injected with 50 mg/kg of STZ every day for 5 consecutive days. The mice in the CON group were injected with the same dose of normal saline intraperitoneally every day for 5 consecutive days. The weights and fasting blood glucose of mice were recorded at 0 day, 7 days, and 35 days of modeling. At 35 days, fresh feces were collected for 16S rRNA gene V3-V4 region sequencing to analyze the diversity, composition, differential bacterial screening, and functional prediction of the gut microbiota in male NOD mice with

收稿日期: 2025-04-27

基金项目: 省部级课题

第一作者: 刘军, 硕士, 主管技师。Email: 15701574619@163.com

通信作者: 齐晏永, 学士, 医师。Email: 1131250225@qq.com

T1DM. Results Compared with the CON group, the body weight of mice in the T1DM group was significantly reduced at 35 day, and the blood glucose was significantly increased (all $P < 0.05$). The Observed OTUs index, Chao1 index, Simpson index and Shannon index of the gut microbiota of the T1DM group were all higher than those of the CON group (all $P < 0.05$). The NMDS analysis ($P = 0.006$, Stress = 0.09), PCoA analysis ($P = 0.003$) and PCA analysis ($P = 0.002$) of the gut microbiota in mice of the T1DM group and the CON group showed obvious discrete distances. Compared with the CON group, the *Bacteroidota*, *Patescibacteria*, *Desulfobacterota*, and *Cyanobacteria* in the gut microbiota of mice in the T1DM group were significantly up-regulated, while the *Firmicutes* was significantly down-regulated (all $P < 0.05$). At the genus level, the *Muribaculaceae_unclassified*, *Muribaculum*, *Candidatus_Saccharimonas*, *Desulfovibrio* and *Alistipes* in the T1DM group were significantly up-regulated, while the *Ligilactobacillus* was significantly down-regulated (all $P < 0.05$). The ratios of *Firmicutes/Bacteroidota* and *Firmicutes/Proteobacteria* in the gut microbiota of mice in the T1DM group were significantly decreased (all $P < 0.05$). The main differential bacteria *Ligilactobacillus* and *Monoglobus* were negatively correlated with fasting blood glucose, while *Muribaculum*, *Alistipes*, *Candidatus_Saccharimonas*, and *Eubacterium_siraeum_group* were positively correlated with fasting blood glucose (all $P < 0.05$). Significant changes were observed in the gut microbiota of T1DM mice in pathways related to nucleotide metabolism, glycolysis, amino acid metabolism, and lipid metabolism (all $P < 0.05$). **Conclusion** Streptozotocin induction increases the diversity of gut microbiota and alters its composition in male NOD mice with T1DM. The progression of T1DM in male NOD mice may be associated with streptozotocin-induced structural and functional disturbances in the gut microbiota.

Keywords: type 1 diabetes mellitus; gut microbiota; NOD mice; streptozotocin; male

Cited as: Liu J, Zhao YQ, Niu MM, et al. Characteristics of gut microbiota profile in male NOD mice induced by streptozotocin in type 1 diabetes[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(8): 792-800.

糖尿病是一组以血糖水平增高为特征的常见慢性代谢性疾病,是由于胰岛素分泌和(或)作用缺陷所引起。2021年全球有5.37亿糖尿病患者,预计到2050年全球的糖尿病患者将增加到13.1亿人,极大增加了全球公共卫生负担^[1-2]。2022年全球1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)患者有875万人,其中20岁以下的T1DM患者由2021年的120万人增加到152万,严重影响儿童和青少年的身体健康^[1]。T1DM是一种复杂的自身免疫性内分泌疾病,其主要特点是自身的免疫细胞异常浸润胰岛并破坏胰岛β细胞,导致胰岛素分泌障碍,引起体内胰岛素绝对缺乏从而导致血糖持续升高,出现糖尿病^[3]。尽管研究人员对T1DM进行了广泛的研究,但其确切发病机制仍不清楚,其病因主要与自身免疫反应、遗传易感性、表观遗传、内源性逆转录病毒激活、外源性病毒感染和肠道菌群等因素的复杂相互作用有关^[4]。

肠道菌群可通过多种复杂的因素影响T1DM的发病机制,如调节对饮食抗原的耐受性、调节肠道炎症、改变肠道通透性和肠道生态失调等。观察性研究表明,在婴儿出生后的一个月内口服乳酸杆菌可以降低T1DM的发病风险,而口服拟杆菌则增加患T1DM的易感性,通过使用不同的肠道细菌对宿主进行干预,发现其对T1DM的进展截然不同^[5]。单次大剂量或多次小剂量STZ诱导雄性C57BL/6J小鼠T1DM是常用的动物模型^[6];而NOD小鼠是自发性T1DM动物模型,在12~15周龄时90%的胰岛β细胞已经破坏并出现糖尿病症状,30周龄时的雌性小鼠累积发病率达到60%~

80%,而雄性小鼠发病率不到20%~30%^[7]。研究发现,口服双酚A加速了雌性NOD小鼠T1DM的发生,但延缓了雄性小鼠T1DM的发病进程,且治疗组的雄性NOD小鼠的拟杆菌门与厚壁菌门的比值显著升高^[8]。STZ联合雄性NOD小鼠的复合模型,可同时触发化学性β细胞损伤与自身免疫攻击,弥补单一模型的不足并可缩短雄性NOD小鼠的发病周期,提高雄性小鼠T1DM的发病率,但其对雄性NOD小鼠肠道菌群谱的影响尚不清楚。本实验使用低剂量STZ加速诱导雄性NOD小鼠T1DM,采集其新鲜洁净的粪便进行16S rRNA扩增子测序,初步分析STZ诱导雄性NOD小鼠T1DM模型肠道菌群的特征,为研究T1DM肠道菌群谱的改变对病程进展的影响提供参考。

1 材料与方法

1.1 药品、主要仪器与设备

2-16NL高速冷冻离心机(美国Sigma公司);血糖仪及血糖检测试纸(E1909004E, 4876706, 强生中国医疗器械有限公司);链脲佐菌素(1018B022, 美国Sigma公司);0.1M柠檬酸钠缓冲液(20231227, 北京索莱宝科技有限公司);粪便微生物DNA提取试剂盒(德国QIAGEN公司);NanoDrop2000分光光度计(美国Thermo Scientific公司);T100 PCR扩增仪(美国Bio-Rad公司);电子天平(中国上海花潮实业有限公司);静脉可视小鼠尾注固定器(中国济南益延科技发展有限公司);戊二醛癸甲溴铵溶液(山东琳可生物科技有限公司);小鼠代谢笼(山东新华医疗器械有限公司)。

1.2 实验动物

14只6~8周龄初始体质量为22~24 g左右的雄性SPF级NOD小鼠,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010]。NOD小鼠饲养于解放军总医院医学创新研究部的实验动物屏障设施内。本实验在解放军总医院实验动物福利伦理委员会的监督下(伦理审批号:2022-x18-130)进行模型建立。

1.3 实验动物分组和处理

14只雄性NOD小鼠适应性喂养1周,按照随机数字表法分为2组:CON组6只,T1DM组8只。T1DM组小鼠每天腹腔注射链脲佐菌素50 mg/kg,连续注射5 d。CON组小鼠以相同方式注射同等剂量生理盐水,连续5 d。造模过程中观察两组小鼠饮水进食情况,使用静脉可视小鼠尾注固定器固定小鼠尾部,使用血糖仪检测两组小鼠在造模0 d、7 d、8 d、35 d的空腹血糖,使用电子天平称量两组小鼠在造模0 d、7 d、35 d的体质量。造模第7 d和第8 d的两次空腹血糖都大于16.7 mmol/L,提示NOD小鼠1型糖尿病模型造模成功^[9]。

1.4 粪便样本收集和处理

建模5周后,使用1:2 000的戊二醛癸甲溴铵溶液浸泡代谢笼30 min,使用清水冲洗干净并晾干后经紫外线消毒1 h待用,将每只小鼠单独放入消毒的代谢笼内,让其自由活动1 h,收集代谢笼粪便管中的新鲜粪便并置于无菌离心管中,将装有粪便的无菌管放入液氮中暂存,所有粪便样品收集完后集中存放于-80℃冰箱待用。

1.5 粪便样品细菌DNA提取和16S rRNA扩增子建库测序

使用凯杰粪便细菌DNA提取试剂盒提取小鼠粪便细菌总DNA,采用琼脂糖凝胶电泳检测提取的粪便DNA的浓度和纯度,使用移液器吸取适量DNA于1.5 mL离心管中并稀释定量到1 ng/μL。使用稀释后的DNA为模版,使用带有barcode标记的上下游特异引物(341F: CCTACGGGNGGCWGCAG和805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC)、Pusion热启动灵活型2×浓缩预混液和高保真酶等扩增粪便细菌的16S rRNA基因的V3-V4区。用2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,用安普瑞XT磁珠核酸纯化试剂盒回收纯化目的条带。将合格的纯化目的DNA产物进行建库,文库合格后,采用NovaSeq 6000测序仪进行2×250 bp的双端测序。

1.6 生物信息学分析

使用QIIME2软件对ASVs特征序列和丰度表进行多样性分析、物种注释和高级分析。其中Alpha多样性主要通过Observed OTUs、Shannon、Simpson、Chao1等指数对两组小鼠肠道菌群的组内多样性进行评估;Beta多样主要通过计算加权的unifrac距离的主成分分析(Principal component analysis, PCA)、主坐标分析(Principal coordinates analysis, PCoA)和非度量多维尺度分析(Multidimensional scaling, NMDS)分析对两组小鼠肠道菌群的组间多样性进行评估。物种注释是根据ASV序列文件采用SILVA和NT-16S数据库进行肠道菌群的物种注释,并根据ASVs丰度表对各物种在两组中的丰度进行统计,注释置信度阈值为0.7。高级分析是基于得到的物种丰度信息,使用microeco分析包进行LEfSe分析,本研究将LDA值≥3.8进行两组比较,筛选两组间的差异性生物标志物(Biomarker);基于测序数据,使用Picrust2软件对两组小鼠肠道菌群进行功能通路的预测分析。

1.7 统计学分析

采用SPSS 26.0软件进行统计分析,GraphPad Prism 9.5.1软件做图。计量资料使用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对两组数据进行Shapiro-Wilk检验,对正态数据两组比较采用独立样本 t 检验,筛选阈值以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠体质量和血糖的变化

实验过程中,CON组小鼠的一般状态良好,T1DM组小鼠造模后精神萎靡、出现耸毛、活动减少,在造模一周后T1DM组8只小鼠死亡2只(死亡率为25%)。与CON组相比,T1DM组在造模开始后的第7 d和8 d的血糖都大于16.7 mmol/L,说明NOD小鼠的T1DM模型构建成功(表1),成模率为100%。在造模成功后,T1DM组小鼠开始出现多饮、多食、多尿的糖尿病症状;与CON组相比,T1DM组小鼠体质量在35 d时降低($P < 0.05$,图1A);该组小鼠血糖持续升高,在35 d时血糖最高(P 均 < 0.05 ,图1B)。

2.2 16S rRNA基因扩增子测序原始数据分析

CON组和T1DM组共12份小鼠粪便样本,16S rRNA测序共观察到8 007个独特的扩增子序列变异(ASVs)数目,CON组特有1 864个ASVs,T1DM组特有887个ASVs,两组共有698个ASVs

表 1 两组小鼠在造模第 7 d 和 8 d 的血糖结果
Tab.1 Blood glucose results of mice in the two groups on the 7th and 8th days of modeling

时间	CON 组	T1DM 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
7 d	8.020±0.616	19.978±2.108	-13.339	<0.001
8 d	8.573±1.020	22.677±2.719	-11.898	<0.001

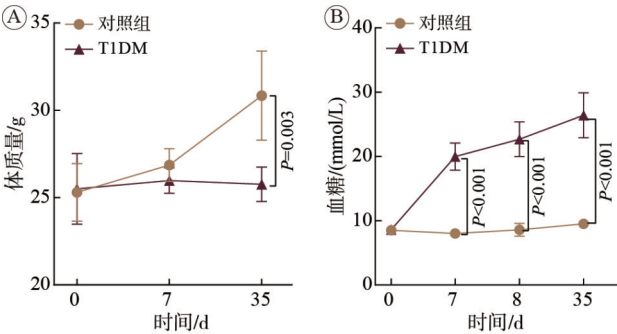


图 1 两组小鼠体质量(A)和血糖(B)的变化
Fig. 1 The changes in the body weight (A) of the two groups and the changes in blood glucose (B)

(图 2A)。平均每个样品测序序列数为 76 642 条, 序列长度在 400 ~ 500 bp 范围内的数量为 919 294 条占比 99.96%, 与 16S rRNA V3-V4 区域序列长度吻合, 符合后续结果分析(图 2B)。CON 组平均每个样品获得 537 个 ASVs, T1DM 组平均每个样品获得 798 个 ASVs; 与 CON 组相比, T1DM 组的 ASVs 数显著增加 ($P=0.012$, 图 2C)。Goods coverage 是指微生物覆盖率, 数值越高表明样本中新物种没有被测出的概率越低, 该指数实际反映测序结果代表样本的真实情况, 两组小鼠的该指数均值都为 1, 说明本次测序结果可靠(图 2D)。

2.3 肠道菌群 α -多样性分析

本研究中的 α -多样性是指 CON 组和 T1DM 组小鼠肠道菌群在两组内的多样性。Observed OTUs 和 Chao1 指数主要用来评估两组所包含的物种数目即菌群的丰富度; Simpson 和 Shannon 指数主要用

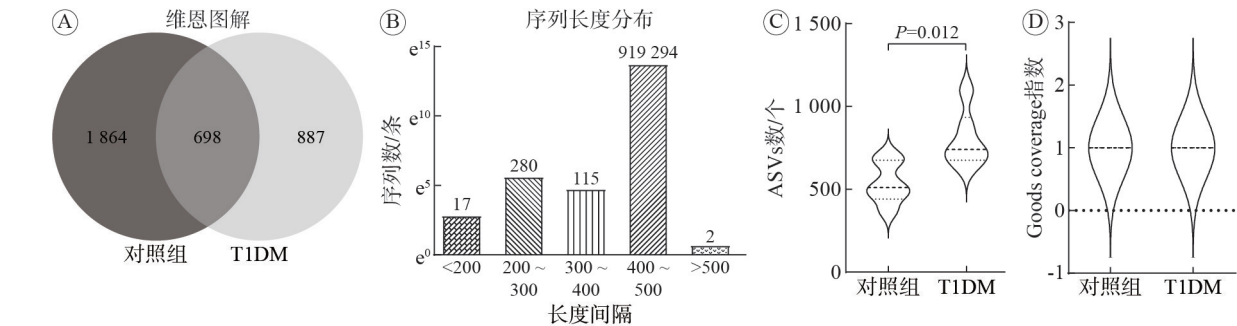
来评估两组内物种的多样性, 其值越大多样性越高。与 CON 组相比, T1DM 组小鼠肠菌群的 Observed OTUs 指数 ($P=0.012$)、Chao1 指数 ($P=0.012$)、Simpson 指数 ($P=0.011$) 和 Shannon 指数 ($P<0.001$) 都升高。T1DM 组和 CON 组小鼠肠道菌群的丰富度和多样性有差异, STZ 诱导 NOD 小鼠 T1DM 对小鼠肠道菌群的丰富度和多样性有影响。见图 3。

2.4 肠道菌群 β -多样性分析

β -多样性分析通常由计算两组间的距离矩阵开始, 本研究主要通过 NMDS 分析、PCoA 分析和 PCA 分析评估 T1DM 组与 CON 组小鼠的肠道菌群的构成差异。NMDS 分析 ($P=0.006$, Stress=0.09)、PCoA 分析 ($P=0.003$) 和 PCA 分析 ($P=0.002$) 结果都显示两组间的聚类距离较远且无重叠, 说明两组小鼠的肠道菌群构成上不同。结果表明, STZ 诱导 NOD 小鼠 T1DM 使其肠道菌群构成发生改变。见图 4。

2.5 两组小鼠肠道菌群物种组成和变化

在门水平上, CON 组小鼠前 5 位的菌门组成, 包括厚壁菌门 (*Firmicutes*, 62.44%)、拟杆菌门 (*Bacteroidota*, 28.39%)、疣微菌门 (*Verrucomicrobiota*, 6.63%)、变形菌门 (*Proteobacteria*, 1.45%) 和放线菌门 (*Actinobacteriota*, 0.90%), 这 5 个菌门的占比为 99.81%; T1DM 组小鼠前 5 位的菌门组成, 包括拟杆菌门 (*Bacteroidota*, 48.24%)、厚壁菌门 (*Firmicutes*, 44.05%)、变形菌门 (*Proteobacteria*, 2.21%)、髌骨细菌门 (*Patescibacteria*, 1.91%) 和疣微菌门 (*Verrucomicrobiota*, 1.11%), 这 5 个菌门的占比为 97.53%。与 CON 组相比, T1DM 组的拟杆菌门 (*Bacteroidota*)、髌骨细菌门 (*Patescibacteria*)、脱硫杆菌门 (*Desulfobacterota*) 和蓝菌门 (*Cyanobacteria*) 的相对丰度增加, 而厚壁菌门



A: 两组小鼠特有和共有 ASVs 数; B: 测序序列分布; C: 两组间 ASVs 数的比较; D: Goods coverage 指数。

图 2 两组小鼠粪便测序得到的 ASVs 数量和菌群覆盖度

Fig. 2 The number of ASVs and the community coverage obtained by fecal sequencing of the two groups

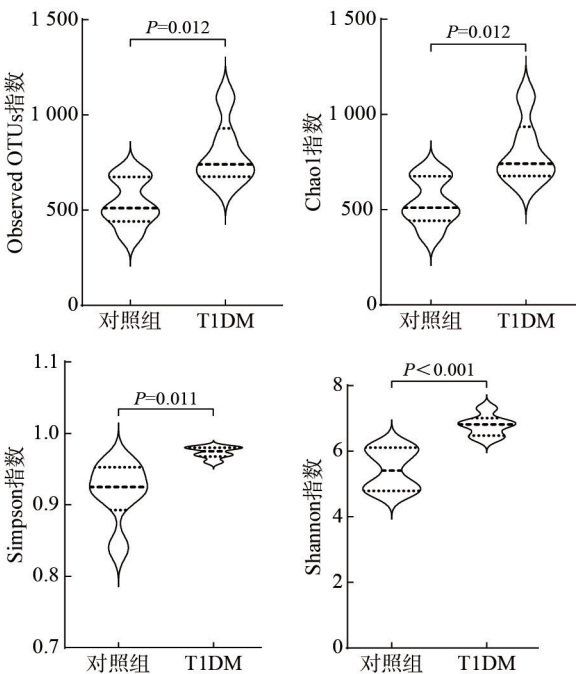


图3 两组小鼠肠道菌群α-多样性比较

Fig. 3 Comparison of gut microbiota α-diversity between the two groups

(Firmicutes)的相对丰度减少(P 均 <0.05 , 图5A)。

厚壁菌门所属细菌具有合成短链脂肪酸来稳定肠道屏障的作用, 研究发现, 厚壁菌门/拟杆菌门(Firmicutes/Bacteroidota)和厚壁菌门/变形菌门(Firmicutes/Proteobacteria)比率的逐渐降低与肝硬化的进展显著相关^[10]。在本研究中, 与CON组相比, T1DM组F/B的比值降低($P=0.008$, 图5A)。厚壁菌门与变形菌门比率(Firmicutes/Proteobacteria)的改变与宿主肠道微生态相关; 嗜酸乳杆菌EG004喂食8周对小鼠的认知能力有积极的影响, 其F/P的比值也显著提高^[11]; 与CON组相比, T1DM组F/P的比值降低($P=0.013$, 图5A)。

在属水平上, 与CON组相比, T1DM组的未分类鼠杆菌科(Muribaculaceae_unclassified)、鼠杆

菌属(Muribaculum)、候选糖单胞菌属(Candidatus_Saccharimonas)、脱硫弧菌属(Desulfovibrio)和另枝菌属(Alistipes)的相对丰度增加, 而联合乳杆菌属(Ligilactobacillus)的相对丰度减少(P 均 <0.05 , 图5B)。

2.6 肠道菌群差异标志物的筛选分析

进化分枝图结果显示, CON组和T1DM组小鼠的肠道菌群的系统发育明显不同(图6A)。采用线性判别分析效应值 ≥ 3.8 (LDA effect size, LEfSe)在两组间共鉴定出34个有差异的物种条目(图6B)。T1DM组中增加的差异菌属是鼠杆菌属(Muribaculum)、候选糖单胞菌属(Candidatus_Saccharimonas)、另枝菌属(Alistipes)、嗜果胶拟杆菌群(Bacteroides_pectinophilus_group)和惰性真杆菌群(Eubacterium_siraeum_group); CON组增加的差异菌属是联合乳杆菌属(Ligilactobacillus)和单球菌属(Monoglobus)(图6B)。

2.7 主要差异菌与空腹血糖的相关性

有几个菌属被鉴定为主要的功能差异菌, 这些主要差异菌, 包括联合乳杆菌(Ligilactobacillus)和单球菌属(Monoglobus)与空腹血糖呈负相关, 鼠杆菌属(Muribaculum)、另枝菌属(Alistipes)、候选糖单胞菌属(Candidatus_Saccharimonas)和惰性真杆菌组(Eubacterium_siraeum_group)与空腹血糖呈正相关(P 均 <0.05 , 图7)。这些相关性分析表明, T1DM关键的主要功能菌积极参与了小鼠血糖水平的调节。

2.8 两组小鼠肠道菌群功能预测分析

为了进一步评估T1DM组小鼠肠道菌群的功能及作用, 通过使用PICRUST2软件对两组小鼠肠道菌群的16S rRNA基因进行功能通路的预测。肠道菌群功能通路预测的结果显示, CON组和T1DM组小鼠中共有30条代谢通路发生改变。与

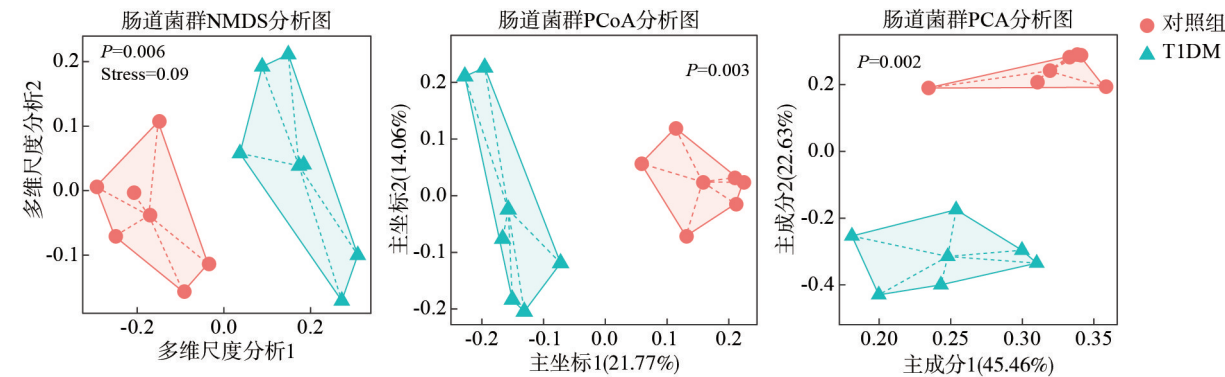
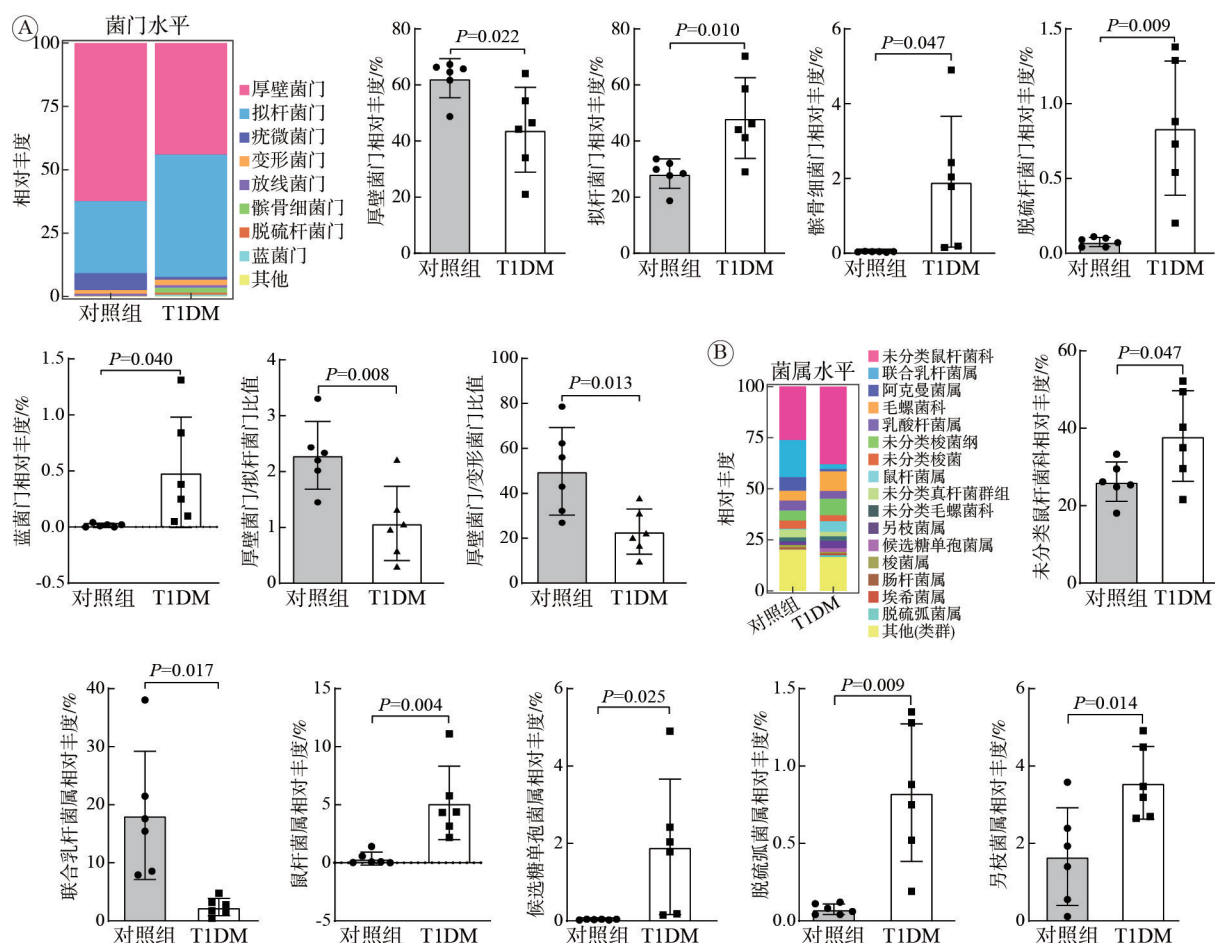


图4 两组小鼠肠道菌群β-多样性比较

Fig. 4 Comparison of gut microbiota β-diversity between the two groups



A: 门水平菌群及主要差异菌门; B: 属水平菌群及主要差异菌属。

图5 两组小鼠肠道菌群在门和属水平的物种构成和差异

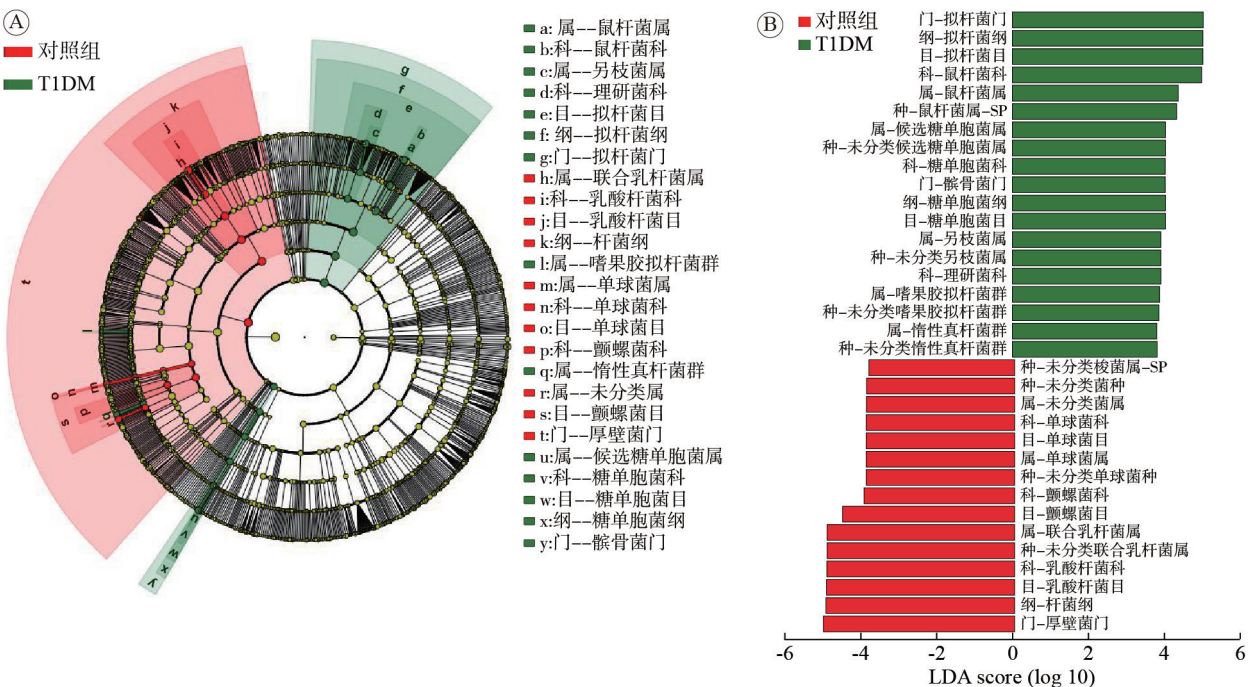
Fig. 5 Composition and differences of the gut microbiota of the two groups at the phylum and genus

CON组相比,有17条通路在T1DM组小鼠中表达上调,其余13条通路表达下调($P<0.05$,图8)。这些通路集中在以核苷酸代谢、糖酵解代谢、氨基酸代谢、脂代谢为主的代谢途径中(图8)。T1DM组小鼠肠道菌群涉及多条代谢途径的改变,其中4条糖代谢途径表达上调,包括糖酵解和恩特纳-杜多洛夫的超途径(superpathway of glycolysis and Entner-Doudoroff)、糖酵解代谢和降解的超途径(superpathway of glycol metabolism and degradation)、还原性三羧酸循环I(reductive TCA cycle I)和D-葡萄糖醛酸内酯降解I(D-glucarate degradation I),提示它们可能在T1DM的发生发展中发挥了关键作用。

3 讨论

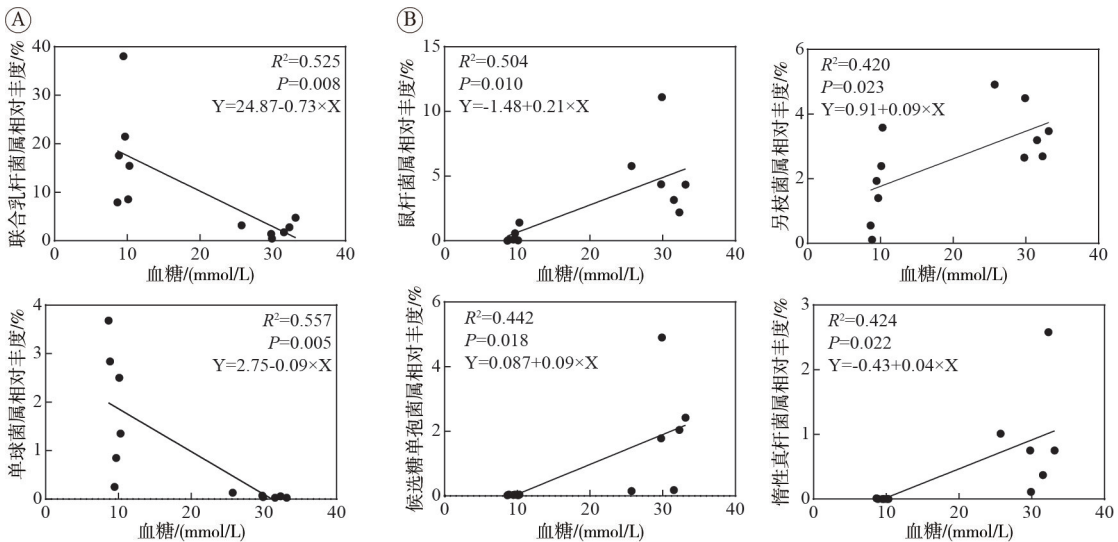
人体中存在数万亿微生物组成的各种微生物群落定居在人体的不同部位,这些微生物群落在维持人类健康方面发挥着关键作用,它们通过刺激免疫系统、抵御病原体、也可作为代谢性疾病

的触发器和驱动因素对宿主产生深远的影响^[12]。肠道微生物群紊乱与多种疾病相关,如1型和2型糖尿病^[4,13]、心血管疾病^[14]、自身免疫性疾病和胃肠道疾病等^[12]。因此,了解宿主与肠道菌群之间的相互作用对于明确各种疾病的病因和实施针对性的治疗有着至关重要的作用。一项观察性研究表明,在人类出生后的第一个月服用乳酸杆菌可以减轻T1DM的发病风险,而服用拟杆菌则增加了患T1DM的敏感性,乳酸杆菌在T1DM的进展中起到保护作用^[5];益生菌可以通过提高T淋巴细胞和抗炎细胞因子水平来提高肠粘膜连接蛋白和黏蛋白的水平增强屏障完整性和减少氧化应激^[15]。使用有益菌对紊乱的肠道菌群进行干预可能是治疗T1DM的潜在途径。本研究重点探索STZ诱导雄NOD小鼠T1DM模型的肠道菌群谱的变化及主要差异菌,发现T1DM组的单球菌属和联合乳杆菌属减少,鼠杆菌属、另枝菌属、候选糖单胞菌属和嗜性真杆菌增加,结果相关性分析发现这些



A: 门到种的进化分支图; B: LDA 值分布柱状图(LDA 评分≥3.8)。

图 6 LefSe 分析
Fig. 6 LefSe analysis



A: 对照组小鼠的主要差异菌; B: T1DM 组小鼠的主要差异菌。

图 7 1 型糖尿病肠道菌群中的主要差异菌与空腹血糖的相关性

Fig. 7 The correlation between key bacteria in the gut microbiota of type 1 diabetes and fasting blood glucose

肠道差异菌与 T1DM 密切相关。

本实验结果显示，T1DM 组小鼠的肠道菌群 α -多样性指数 Observed OTUs、Chao1、Simpson 和 Shannon 指数 (P 均 <0.05) 都高于 CON 组， β -多样性指数的 NMDS 分析、PCoA 分析和 PCA 分析结果显示两组的菌群组成不同 (P 均 <0.05)，进一步分析发现 T1DM 组小鼠的肠道菌群多样性增加，本研究结果与下述人类研究结果基本一致。Liu 等^[16]

通过对中国 51 例 T1DM 儿童和 47 例年龄和性别匹配的健康对照者中获取的粪便样本进行 16S rRNA 基因测序，发现 T1DM 儿童粪便的 Shannon 和 Simpson 指数高于 Control 组，基于加权 UniFrac 算法的 PCoA 不能将两组划分为不同的聚类，更深层次的测序分析结果表明 T1DM 儿童的粪便微生物多样性增加。Huang 等^[17]通过收集中国汉族的 10 例健康人和 12 例 T1DM 受试者的粪便样本进行

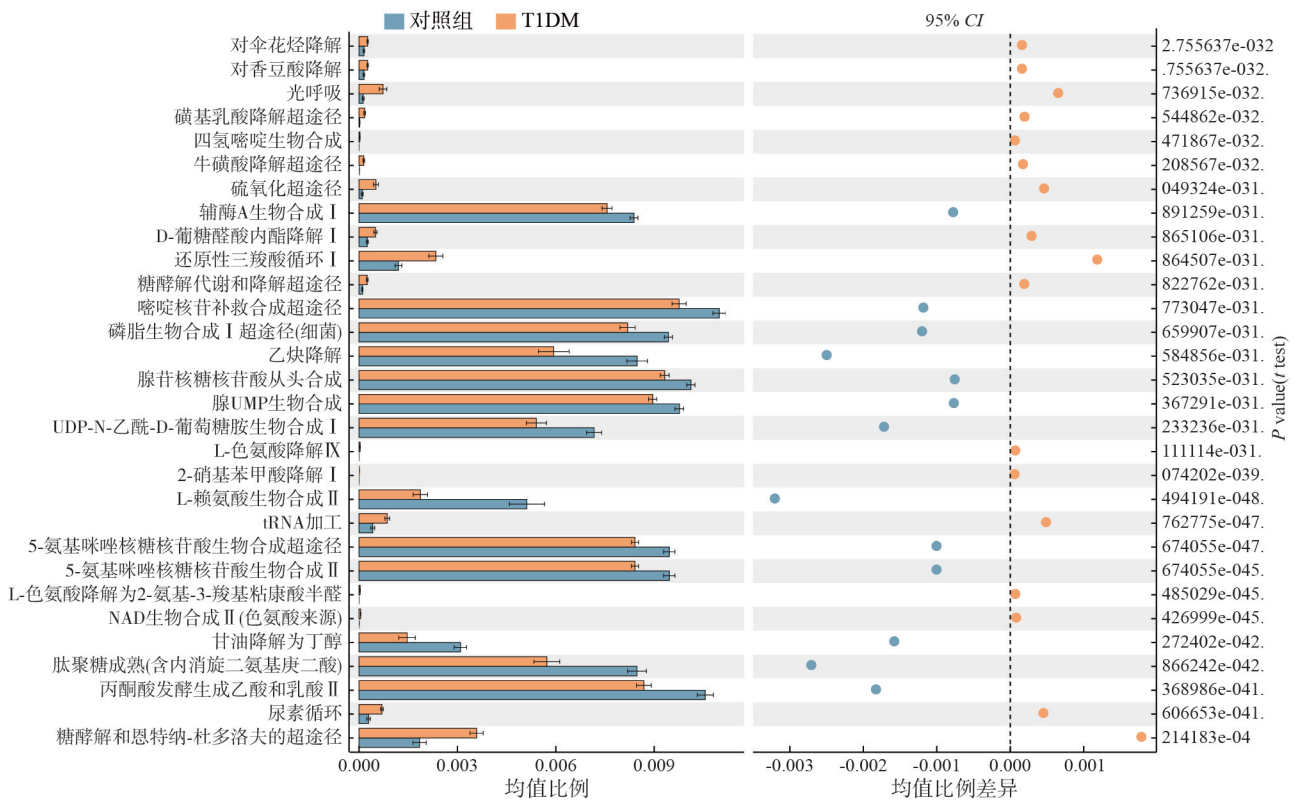


图 8 两组小鼠肠道菌群的PICRUSt2 功能预测结果分析
Fig. 8 The predictive analysis of PICRUSt2 function of gut microbiome in the two groups

16S rRNA 基因测序发现，T1DM 患者的 PCA 分析显示了健康对照组和 T1DM 患者单独聚类，说明两组间的肠道微生物组成存在显著差异；在门水平上，T1DM 组患者的前 3 门分别为拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门，T1DM 患者的优势门为拟杆菌门，健康对照者的优势菌门为厚壁菌门，T1DM 患者的壁菌门减少，拟杆菌门增加，厚壁菌门与拟杆菌门的比值显著降低。

在本研究中，T1DM 组和 CON 组小鼠肠道中的优势菌门都是厚壁菌门和拟杆菌门，两者总占比分别为 92.29% 和 90.84%，T1DM 组的 F/B 比值降低，T1DM 组小鼠肠道菌群的 F/P 比值显著降低 ($P<0.05$)。健康人和正常小鼠的肠道菌群主要由拟杆菌门和厚壁菌门构成，两菌门总占比约在 90% 以上，其比例在一定范围内保持稳定即为肠道微生态平衡，这种平衡有利于宿主健康^[18-19]。厚壁菌门是以革兰阳性菌为主，该门所属的菌株产生大量短链脂肪酸如乙酸、丙酸和丁酸等具有抗炎特性、增加调节性 T 细胞的功能降低炎症细胞因子来提高肠道完整性^[20-21]；拟杆菌门是以革兰阴性菌为主，该门所属细菌可以产生大量的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 可诱导慢性低度炎症来增

加肠道通透性并破坏肠道屏障功能，拟杆菌门数量的增加与丁酸产量的降低显著相关，而丁酸对 T1DM 的发展具有保护作用^[22]。厚壁菌门和拟杆菌门比例失衡与代谢性疾病紧密关联，随着厚壁菌门与拟杆菌门(F/B)比例的增加，炎症反应也随之增加，使代谢发生紊乱，进而导致多种疾病的发生^[23]。变形菌门所属细菌多数属于致病菌，如沙门菌和志贺菌等菌在宿主体内增多时可以诱导剧烈的炎症反应，研究发现变形菌门的增加与内毒素和代谢性疾病的发展有显著相关性^[24]。

本研究发现，T1DM 组小鼠肠道中的 *Ligilactobacillus* 菌属显著降低，而 *Candidatus_Saccharimonas* 菌属显著升高；通过 LEfSe 分析发现 CON 组小鼠肠道的差异菌是 *Ligilactobacillus*，T1DM 组小鼠肠道的差异菌是 *Candidatus_Saccharimonas* 菌属。肠道菌群参与 T1DM 的可能机制如下：拟杆菌门和变形菌门的革兰阴性菌增加导致宿主体能的 LPS 水平升高，LPS 是一种细菌内毒素可能是连接肠道菌群、炎症和 T1DM 的分子桥梁。一项病例对照研究证实，与非糖尿病对照组相比，T1DM 患者的循环 LPS 水平升高；LPS 已被证明会损害胰腺 β 细胞的功能，并增加促炎细

胞因子的水平, 这表明 LPS 与糖尿病的发生发展有关^[4]。葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎模型在口服 *Ligilactobacillus salivarius* Li01 治疗 14 天后可促进肠道微生物群的快速恢复, 并显著降低促炎细胞因子 IL-6, 升高抑炎细胞因子 IL-10 的水平, *Ligilactobacillus salivarius* Li01 治疗可促进肠道屏障和菌群快速恢复^[25]。研究发现, *Candidatus_Saccharimonas* 菌属在一项由高脂肪饮食诱导的肥胖大鼠肠道中明显增加, 该菌增加与炎症性疾病如牙龈炎和其他牙周功能障碍有关^[26]。*Candidatus_Saccharimonas* 在 T1DM 组小鼠肠道中显著升高并有促进炎症反应的作用, 未来有可能成为 T1DM 进展的生物标志物。

由于雌性 NOD 小鼠的自发性 T1DM 发病率高, 发病周期短的优势, 现大多研究使用雌性 NOD 小鼠进行 T1DM 的研究, 而采用雄性 NOD 小鼠进行 T1DM 肠道菌群的研究较少, 本研究基于雄性 NOD 小鼠的这些缺点联合注射 STZ 建立 T1DM 模型来研究其肠道菌群谱的特征。有研究发现, 一组暴露于双酚 S 的雄性 NOD 小鼠在饲喂含植物雌激素的大豆饲料, 发现该组小鼠表现出胰岛素抵抗增加和血糖水平波动; 另一组小鼠暴露于双酚 S 且饲喂不含植物雌激素的大豆饲料, 该组小鼠的葡萄糖耐量有所改善, 胰岛素抵抗减少^[27]。雌激素水平可能是导致雌性和雄性 NOD 小鼠 T1DM 发病率的一个主要原因。

本研究结果表明, T1DM 小鼠 16S rRNA 基因功能预测结果显示主要的代谢途径为核苷酸代谢、糖酵解代谢、氨基酸代谢、脂代谢等图 8), 与下述 T1DM 的研究基本一致。研究发现, 使用 STZ 诱导的 1 型糖尿病(C57BL/6 和 FVB)小鼠在出现糖尿病症状 6 周后, 两品系小鼠肠道菌群谱和代谢谱发生显著不同, 但其肠道菌群的功能通路主要集中在氨基酸代谢、糖代谢和核苷酸代谢途径中^[28]。

本研究的优势是使用雄性 NOD 小鼠联合多次低剂量注射 STZ 建立复合模型来研究 T1DM 肠道菌群的变化, 该模型可更全面反映 T1DM 的雄性、遗传易感性与环境触发因素对 NOD 小鼠肠道菌群的影响, 弥补单一模型不足对肠道菌群的影响, 并缩短雄性 NOD 小鼠的发病周期, 提高雄性 NOD 小鼠 T1DM 的发病率。本研究的局限性是未使用雌性 NOD 小鼠联合多次低剂量注射 STZ 的复合模

型作为对照来检测其肠道菌群谱的特征, 后续我们将通过进一步的实验来研究性别对 NOD 小鼠 T1DM 的肠道菌群、代谢和机体免疫的影响。

综上所述, 链脲佐菌素诱导雄性 NOD 小鼠 T1DM 模型具有发病周期短、成模率高、体质量减轻和血糖升高的病变特点, 该模型的雄性 NOD 小鼠 T1DM 肠道菌群谱发生显著改变, 这为深入了解雄性 NOD 小鼠肠道菌群改变在 T1DM 进展中的机制, 可以更好地为雄性 T1DM 个体在使用肠道菌群作为治疗靶点提供参考。

作者贡献 刘军: 实验操作, 数据整理, 统计分析, 文章撰写和修订; 赵玉琼、牛苗苗、郭超: 模型制备, 样品收集; 齐晏永: 实验操作, 数据收集整理, 研究指导, 文章修订。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本篇论文相关数据可依据合理理由从作者处获取, Email: 15701574619@163.com。

参考文献

- 1 IDF Diabetes Atlas 2025 [EB/OL]. <https://diabetesatlas.org/resources/idf-diabetes-atlas-2025>.
- 2 Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021 [J]. *Lancet*, 2023, 402 (10397): 203-234.
- 3 Syed FZ. Type 1 Diabetes Mellitus [J]. *Ann Intern Med*, 2022, 175 (3): ITC33-ITC48.
- 4 Du MH, Li SH, Jiang J, et al. Advances in the pathogenesis and treatment strategies for type 1 diabetes mellitus [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 148: 114185.
- 5 Redondo MJ, Gignoux CR, Dabelea D, et al. Type 1 diabetes in diverse ancestries and the use of genetic risk scores [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2022, 10 (8): 597-608.
- 6 Marino F, Salerno N, Scalise M, et al. Streptozotocin-induced type 1 and 2 diabetes mellitus mouse models show different functional, cellular and molecular patterns of diabetic cardiomyopathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (2): 1132.
- 7 符楠楠. OX40 分子在 NOD 小鼠 T_H 细胞上的表达特性及其生物学意义 [D]. 苏州: 苏州大学, 2021.
- 8 Xu J, Huang GN, Nagy T, et al. Sex-dependent effects of bisphenol A on type 1 diabetes development in non-obese diabetic (NOD) mice [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93 (4): 997-1008.
- 9 李凤, 邢英, 伊力多斯·艾合他木夫. 细粒棘球蚴抗原 B 对 NOD 小鼠 1 型糖尿病的预防作用 [J]. *医学综述*, 2014, 20 (13): 2425-2427.
- 10 Mantovani A, Longo L, Thoen RU, et al. Firmicutes/Bacteroidetes and Firmicutes/Proteobacteria ratios are associated with worse prognosis in a cohort of Latin American patients with cirrhosis [J]. *Clinics*, 2024, 79: 100471.
- 11 Jeon S, Kim H, Kim J, et al. Positive effect of *Lactobacillus acidophilus* EG004 on cognitive ability of healthy mice by fecal microbiome analysis using full-length 16S-23S rRNA metagenome sequencing [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10 (1): e0181521.