

让肠道告诉你...

都润肠讯

都润肠道健康研究中心主办

新观点：人体肠道菌群的多样性、稳定性和弹性 (I)

作为益生菌的产芽孢菌的应用

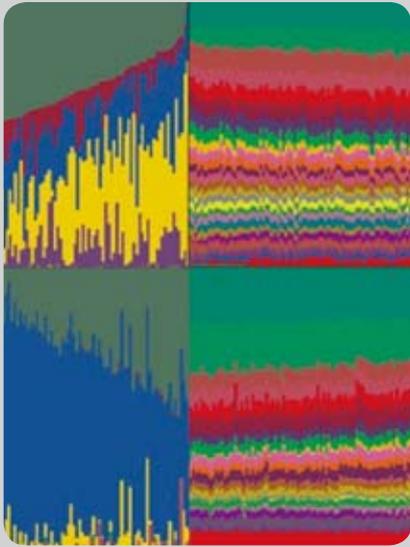
07

第七期



dorun^o
for the real health

contents



基础理论:

新观点: 人体肠道菌群的多样性、稳定性和弹性 (I) ----- **03**



专家观点: ----- **14**



作为益生菌的产芽孢菌的应用 ----- **07**

基础理论

新观点：人体肠道菌群的多样性、稳定性和弹性（I）

上万亿的微生物栖息在人体的肠道内，形成一个复杂的生态菌群结构，通过菌群代谢活动和宿主之间的相互作用影响正常生理和对疾病的易感性。了解肠道菌群的组成和功能的变化，将有助于针对它的治疗。这个目标是艰巨的。肠道菌群是多样化的，存在个体差异的，并随着时间的推移而变化，尤其是在疾病及其早期发展情况下。从生态角度观看针对临床治疗中的微生物菌群，可以洞察其如何促进机体健康。

大多数肠道微生物或是对宿主无害或有益。肠道菌群保护机体免受病原菌的侵害，从宿主的食糜中摄取营养和能量，并有助于正常的免疫功能。肥胖、营养过剩、肠炎、神经系统错乱、癌症等因素都将导致肠道菌群和宿主之间的正常平衡的紊乱。了解肠道菌群如何影响机体健康和疾病，需要将重点从个别病原体转向以菌群作为一个整体的生态研究方法。

了解肠道微生物和宿主之间的共生关系的第一步是正常健康情况下的微生物群和与疾病情况下

的差异特征。欧洲的人体肠道宏基因组学项目(MetaHIT)和美国的人类微生物群系项目(HMP)取得实质性进展。一旦健康的菌群结构和组成确定,是什么疾病导致的菌群平衡被破坏就可以确定。然而,微生物菌群的复杂性,菌群之间和之内的变化在概念上很难定义。

生态原则可以帮助理解宿主—微生物相互作用和肠道菌群的具体功能。测序方法技术的改进如蛋白质组学和代谢组学,加上代谢网络模型,表明宿主和环境因素影响肠道微生物生态。肠道微生物群落的组成、多样性及其功能有可能揭示不同个体营养和药物治疗机制。

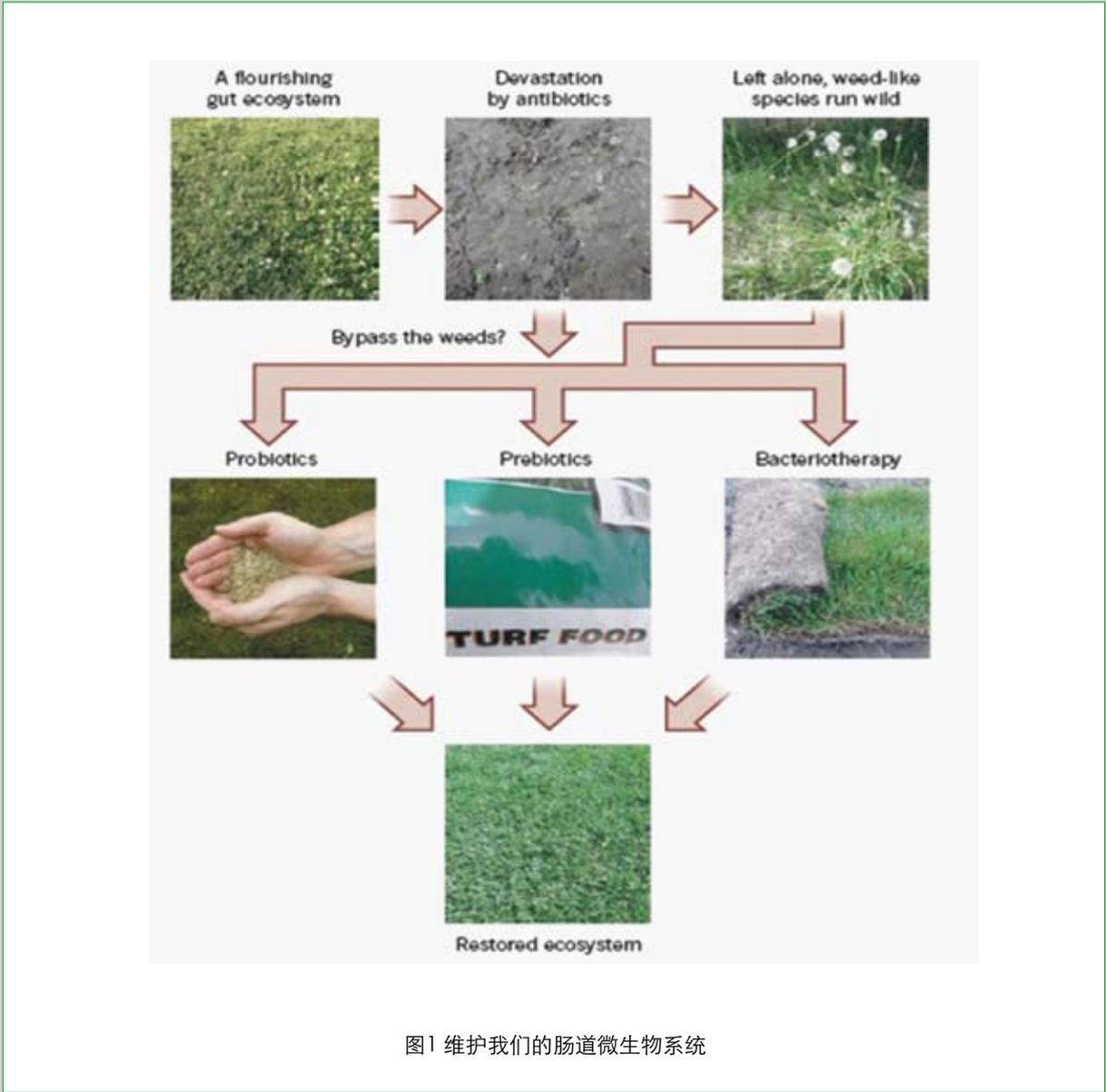


图1 维护我们的肠道微生物系统

在某些方面，保持肠道健康就像是护理一块丰厚的菌群草坪：严重干预可以使土地寸草不生。多种策略可以恢复生态系统：补充微生物（益生菌）、添加化合物，是可以促进有益微生物的生长和整个微生物生态系统回复的。使用特定药物，例如有针对性的抗生素，即针对致病微生物群落。

健康肠道菌群多样性

纯培养技术揭示了健康的人的肠道微生物菌群是相似的。例如，大多数人体内都有大肠埃希氏菌。然而，测序研究表明随着时间的推移和个体不同，微生物多样性是高度可变的。我们每个人体内都定植超过1000种不同水平的系统发育型：小亚基核糖体RNA基因的基因序列簇有很大变化。拟杆菌和厚壁菌通常在成人中占主导地位，而放线菌，变形菌和疣微菌门虽然在很多人体内发现，但一般组成比例较小（图3）。产甲烷古菌、真核生物（主要是酵母菌）和病毒（主要是噬菌体）也存在。这些肠道菌群主要成分一致，但在个体间的相对比例差别很大。成人的微生物物种发育系统图已经确定了几种菌，包括梭菌群，肠杆菌、单型拟杆菌，但个别情况下他们的含量可能低于0.5%。发展中国家4-21岁的一个核心微生物群的概念变更不可能。

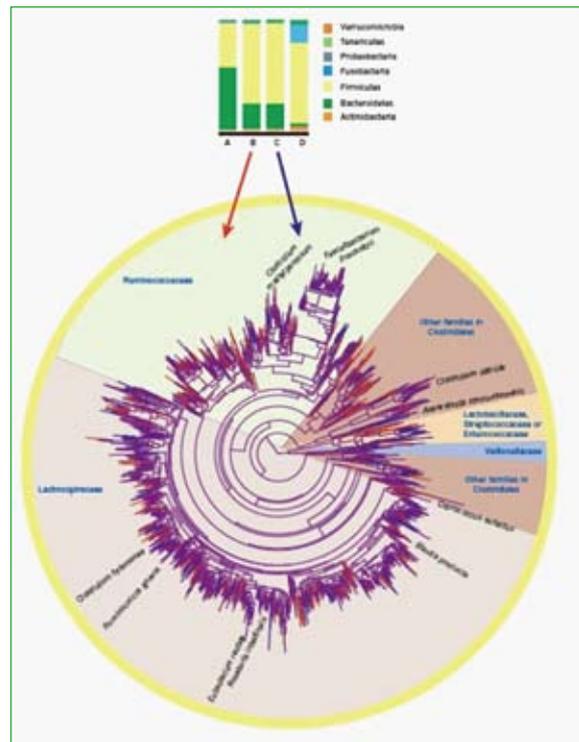


图2在不同进化尺度人体菌群多样性

健康肠道中功能多样性

了解微生物群落的组成并不代表理解功能。功能信息来自从培养分中的得到的基因组内容和菌株表型，以及菌群DNA测序。鸟枪法宏基因组学的功能筛选依赖于总微生物群落DNA序列分析，包括未培养微生物，匹配已知序列功能的基因。确定在特定的代谢途径有关的基因，可以预测基因功能，但若无信使RNA、蛋白质和代谢物的分析，这些都只是预测。随着人体肠道微生物基因组测序和翻译，短基因序列图谱的绘制和生物功能的确定，使越

来越多的互补性“组学”数据集成为可能。

尽管不同的个体肠道菌群组成多样，功能基因分布十分相似（图4）。据报道，一项对18位女性的研究表明93%以上的酶水平官能团是一致的。

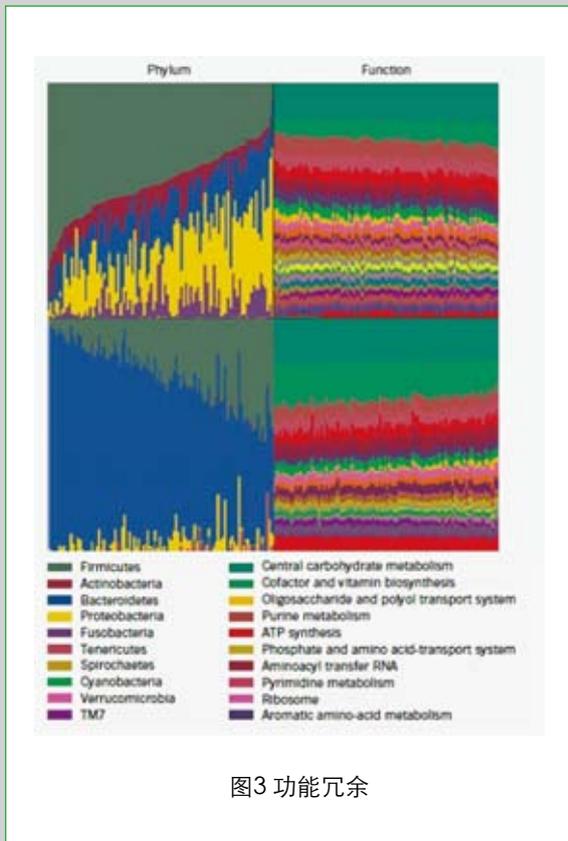


图3 功能冗余

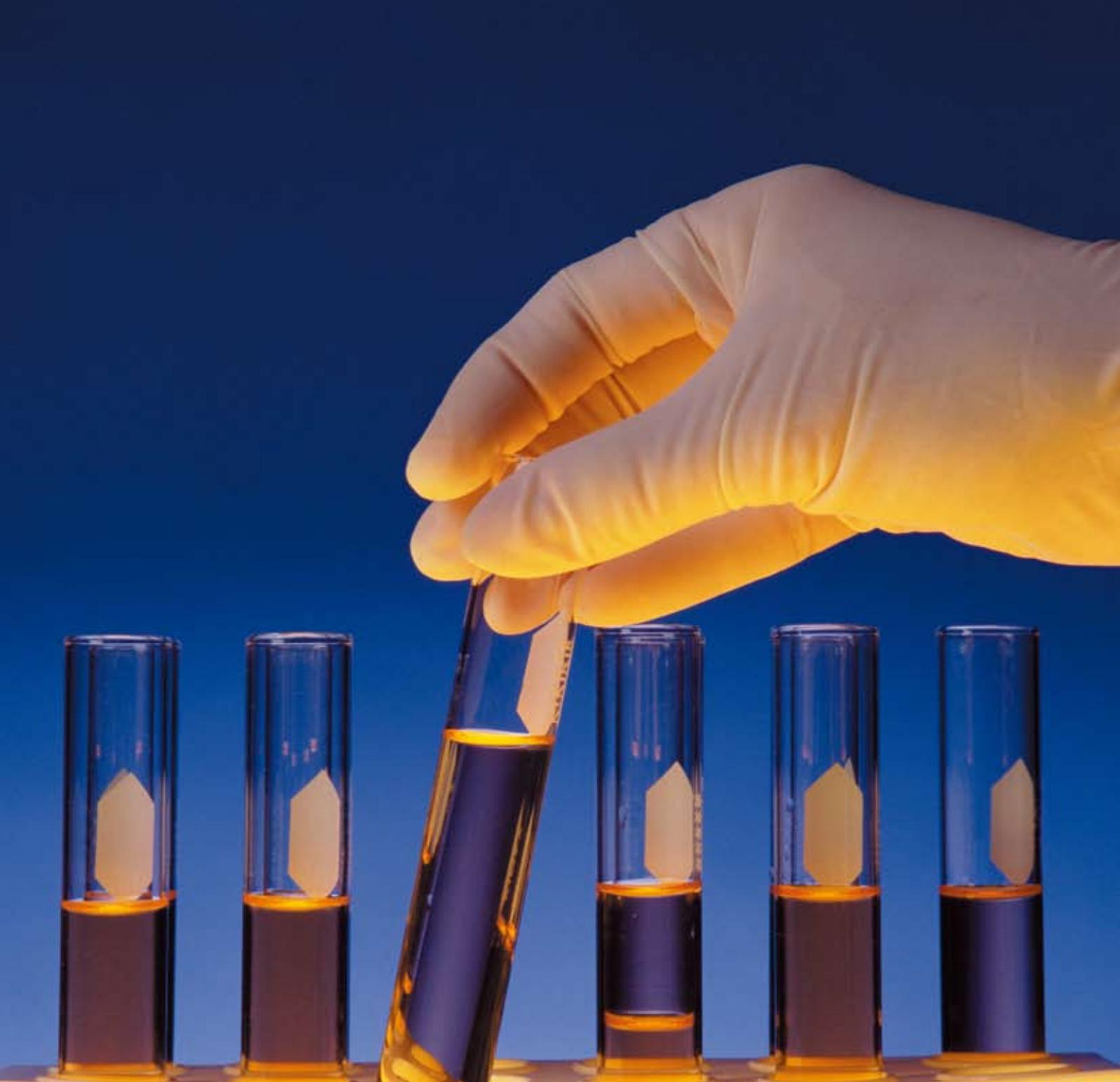
肠道菌群包含中心循环、碳水化合物和氨基酸代谢途径。然而，并非所有的途径都已经了解，广泛的基因功能类别分组可以掩

盖更精细的个体之间的功能差异。某些功能是种属特性，可能是由于食谱和治疗机制决定，包括致病岛，维生素和药物代谢，运动和营养的运输。

许多基因只在特定条件下表达。用鸟枪测序法检测mRNA水平或鸟枪蛋白质组学可能不能覆盖在疾病和不同饮食。例如已发现，与碳水化合物代谢和能量生成有关的基因表达的蛋白比从宏基因组数据的预测蛋白要高，表明这些过程的重要性。

我们享有同一个核心微生物组，但在大生态环境下核心菌群不同，其有相同的功能，但是不同的独立进化物种。肠道生态学研究面临的挑战是要了解那些菌群成员具备类似的功能和哪些可以相互替代。按照分类划分组成比按照官能基因组成变化更多，但一些研究已经显示了两者的相关性。生物分类变化还没有很好地解释功能基因组的变化，这表示系统发育将组合类似功能，并在根据生理状态的改变中识别和理解功能组成是至关重要的。

注：上述内容参考自“Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota”



作为益生菌的产芽孢菌的应用



简介

共生，不是一个新概念，但直到最近人们才开始对其产生日益浓厚的科学兴趣。益生菌通常被定义为活的微生物饲料添加剂用来改善宿主肠道平衡。益生菌分成两大类，动物用和人用产品。在动物饲料中，益生菌被视为替代抗生素（并因此作为生长促进剂）类产品。2000年丹麦在养猪业中全面禁止使用抗生素作为生长促进剂；2006年欧洲通过议案全面禁止抗生素在动物饲料中的应用。在可行性方案中选择抗生素将冒着极大风险，因此新的益生菌类产品被允许在动物上使用引起相当大的兴趣。然而，随着益生菌在动物中大量使用，抗生素耐药性在细菌之间发生转移引起人们的关注。据估计，在

欧洲获得动物饲料中新益生菌产品的许可证需要超过1400000欧元。另一方面，人类使用的益生菌受限较小（可以作为一种新型的食品或膳食补充剂）并且有许多不同的形式。在超市中通常出售含有活菌乳类产品，保健食品店里有由冻干制剂的细菌胶囊或片剂，促进肠道的健康。互联网上有些产品作为胃肠道疾病（通常是腹泻）的口服类细菌治疗准药物来出售。

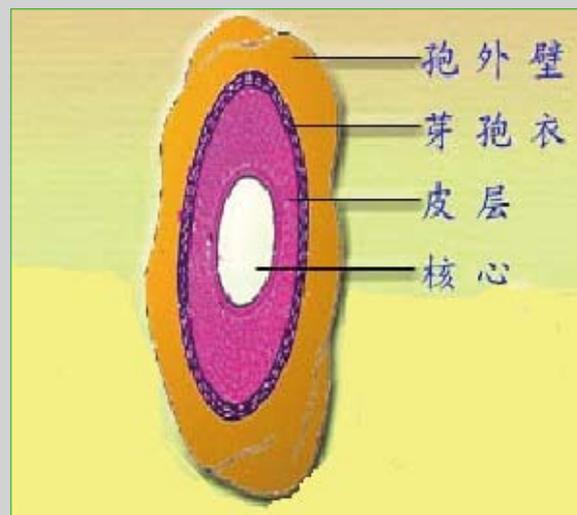
目前，在现有条件下尚没有普遍的益生菌，乳酸菌被认定是最常见的菌种类型（例如乳杆菌属）。这些细菌通常存在于人类和动物胃肠道中（GIT），这些原籍或共生微生物可以恢复肠道自然的微生物菌群。第二种微生物通常不会在肠道中被发现。例如酵

母，它已被证实在防治艰难梭菌复发引起的伪膜性结肠炎和大肠杆菌拮抗实验中有作用效果。目前销售的酵母菌类产品是人用的。这类外来益生菌产生孢子，通常属于芽孢杆菌属，其有效产品为孢子形态，从而有较长的保质期。但在使用中也带来了一些问题。例如，菌种是非肠道原籍菌，它们如何发挥有益的作用？由于孢子的自然生命周期涉及的孢子萌发，增殖和营养耗尽后再生孢子，问题是产品是因为孢子萌发（即营养细胞）产生的益生作用还是孢子本身的作用？如果前者模型是正确的就表明益生菌是一个统一的行动模式，涉及到肠道中活的细菌。

基于已发表的研究内容，本文将芽孢在动物体内的存活、增殖做一阐述。事实上，在动物肠道中，虽然没有明确的证据表明菌群间是共生关系，但芽孢在动物体内形成具有独特的双重生命周期得以存活，并对动物机体产生益生作用。

自然条件下的芽孢杆菌

是革兰氏阳性菌腐生，常见于土壤，水，灰尘和空气中。他们还参与食品的腐烂（例如，变质牛奶的蜡样芽孢杆菌菌株）。一般认为这些细菌是外来的，通过食品进入肠道。



图为枯草芽孢杆菌芽孢形态

肠道中的芽孢杆菌

由于芽孢杆菌的芽孢在土壤中很容易被发现，人们认为产芽孢的菌种首先来源于土壤中，但这种说法被证明是毫无根据的，当然，芽孢分散在灰尘和水中等各种介质中。所以，芽孢不单单来源于土壤、水体中。文献表明，芽孢杆菌常常在动物和昆虫肠道中，并在粪便样品中常常出现。所以，不管是芽孢或者是营养体的形态都是可能在动物肠道和土壤中同时出现杆菌的地方。芽孢杆菌菌属的出现跟细菌的摄入和土壤相关，无论是作为孢子或营养细胞的形态。现在，关于杆菌在宿主内能暂时存活和增殖的共生关系理论出现了。



人的小肠和大肠中占主导地位的菌群是乳酸杆菌，链球菌，肠杆菌，拟杆菌、双歧杆菌和梭状芽胞杆菌，芽胞杆菌也有。一项研究表明，人类粪便中分离出的芽胞杆菌（枯草芽胞杆菌和地衣芽胞杆菌）的数量为 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$ CFU/g 粪便。同时，拟杆菌在 $10^{11} \sim 10^{12}$ CFU/g 粪便之间，链球菌在 $10^3 \sim 10^{10}$ CFU/g 粪便之间。另一项研究表明，枯草芽胞杆菌在中老年人和婴幼儿体内数量很高。

在小鼠模型中，通过控制饮食，^{16S} rRNA 基因分析总基因组 DNA，在小鼠的小肠中识别出蕈状芽胞杆菌（蜡样芽胞杆菌广义种组）。另外还有很多不可培养微生物依然可以在动物体内存活和增殖。

还有报告表明从鱼类和甲壳类动物中分离出很多芽胞杆菌菌种并在其鳃、皮肤和肠道中存活。

孢子萌发和增殖

芽孢可以在动物肠道中进行萌发，首先是在兔结扎回肠循环的实验中发现的。现在更深入的体外实验研究是利用小鼠模型。枯草芽胞杆菌 py79 以不同剂量的芽孢（从 10^8 到 10^{10} ）进行小鼠群体实验。每只小鼠单独饲养，使用网格笼地板，每隔 1-2 天收集粪便。研究表明，首次芽孢检出是在饲喂后 3 小时；18 小时后，排泄物中的孢子大量增加。5-7 天后，孢子基本不可检测出，但芽孢总数为饲喂量的 6 倍。检测数量比对照饲喂剂量增加的唯一解释是，芽孢在动物体内进行萌发，增殖并再次形成孢子。枯草芽胞杆菌被认为是一种兼性好氧菌，为什么在肠道缺氧条件下生存？最近的研究表明，在适当的条件下，好氧的枯草芽胞杆菌可以在无氧环境下生长，并利用硝酸盐或亚硝酸盐作为电子受体的情况下进行发酵。

首先，芽孢是以休眠体的生命形式存在，并且小肠上游营养丰富，能诱导芽孢萌发，这个过程不需要合成蛋白质。其次，实验证实有些芽胞杆菌可以在肠道中生长和增殖，最显着的就是蜡样芽胞杆菌，芽孢萌发、复制和再成孢往复循环。肠道中也不是严格缺氧，特别是在小肠，这一微环境足够枯草杆菌的生长。例如，幽门弯曲菌就可以在胃肠道中很容易成长。枯草杆菌不是唯一可以在肠道中萌发的菌种。最近的研究表明蜡样芽胞杆菌的变种，也可以在家禽和猪上

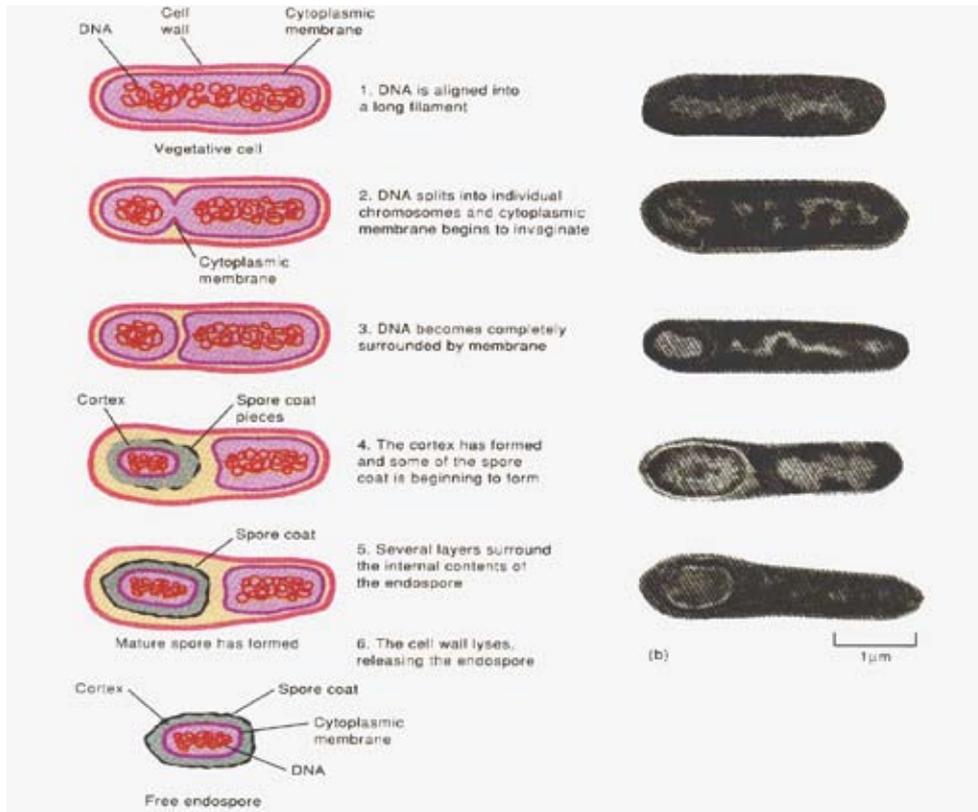


图2芽孢杆菌芽孢的形成过程

有趣的是,在饲喂仔猪 10^8 营养细胞22小时后开始萌发,食糜中芽孢含量为 10^7 /克。同一研究在肉鸡上获得了相似的结果。这些结果表明,蜡样芽孢杆菌的营养细胞本质上是既耐胃液和胆汁盐。类似的研究中,乳酸菌和乳球菌益生菌株只有口服剂量的7%可以在小肠中存活。纳豆芽孢杆菌也可以在小鼠的肠道中萌发。

这些研究表明,孢子是在空肠萌发的。虽然孢子萌发已经得到证实,但枯草芽孢杆菌孢子萌发的水平是不清楚的,尽管研究认为萌发数量可能低于接种量的1%。研究计算孢子在

粪便中的排出量增加的研究还未发表过,表明宿主的生理条件(例如饮食)可能会影响孢子的萌发和增殖。

消化液耐受情况

体外研究表明,凝结芽孢杆菌对胃液敏感(pH值为2-3),可耐受0.3%胆盐,其最小抑菌浓度大于1%。体外两项研究表明,枯草芽孢杆菌菌体对胃液和胆盐(0.2%)是极其敏感的,1小时内几乎完全丧失活力。进一步

的研究表明胆盐对枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度为0.4%，另有两个益生菌，蜡样芽孢杆菌IP5832 (*Bactisubtil*) 和克劳氏芽孢杆菌 (*Enterogermina*) 分别为0.2%和0.05%。与此相反，枯草芽孢杆菌的芽孢是完全耐胃液和胆盐的，虽然枯草芽孢杆菌萌发时会被胆盐部分抑制。有研究表明，并不是所有芽孢耐胃液和胆盐。具体而言，某蜡状芽孢杆菌的芽孢对胃液和胆盐极其敏感，而其他蜡状芽孢杆菌菌株的芽孢可以完全抵抗。一种解释是，芽孢可能受到酸诱导从而激活孢子萌发（相对于热诱导萌发的影响）。芽孢萌发是一个非常迅速的过程，酸诱导芽孢萌发产生大量可以被胃液杀死的营养细胞。这些芽孢也很敏感，但对胆盐敏感性小一些。体内研究表明，饲喂枯草芽孢杆菌芽孢 2×10^8

的小鼠几乎所有的孢子都可以通过胃部，并可以从小肠回收到菌体。相反，营养细胞在胃中几乎没有存活，只有一小部分能够生存 ($<0.00016\%$)，存活下来的营养细胞假定它们是包埋在食糜中或抱团成群生存下来的。

这些研究表明，除了少数例外，芽孢杆菌营养细胞对胃液是敏感的，胃部是对菌来讲是一道障碍。而芽孢则不受影响。人和小鼠的胃部生理是不同的（例如，胃的pH值较高）。孢子需要萌发、生存和增殖，细胞必须找到一种方式来逃避的胃液的破坏。通过胃部和小肠后胆盐的威胁减弱但结肠中是更严格的厌氧环境。食糜或菌群抱团是一种屏蔽，提供一些保护。或者粘附于肠道粘膜与肠道菌群生物膜混合形成一个临时培养基。



定植

目前，尚无非致病性芽孢形成菌可以在胃肠道中永久定植的文献。但这依赖于宿主条件、特定芽孢形成菌以及其他生理和饮食因素。即便是致病性蜡样芽孢杆菌的感染也是暂时性的（约24小时），24-48小时后完全脱落。

雏鸡研究表明，单一枯草芽孢杆菌芽孢（含量 2.5×10^8 ）在禽类小肠中可以持续到36天。芽孢杆菌类益生菌菌株在小鼠肠道的时间表明，单一剂量芽孢，15天后在粪便中活菌数几乎不可检出。实验室菌株枯草芽孢杆菌（168型菌株的衍生物）的平行实验中6天之内完全脱落，这表明作为益生菌的芽孢杆菌在小鼠肠道内持续时间更久。可能发生这种情况的机理尚不清楚，但可能出现像致病性蜡样芽孢杆菌的营养细胞粘附粘膜上皮细胞的情况。

大多数肠道菌群存附着于粘膜上皮细胞的生物膜上，或者食物颗粒上，枯草芽孢杆菌被证实产生多细胞结构和生物膜。这些功能强大的结构可作为芽孢形成位点。芽孢杆菌类菌株在表皮层的相互作用的机制现在仍不清楚。

在细胞中散布和最终的命运

益生菌安全性评价的一个重要方面是它是否能穿过粘膜上皮，散布到目标组织和器官，甚至增殖。最近有一项实验室的关于枯草芽孢杆菌的研究。近交系小鼠连续5天每天饲喂

10^9 芽孢的剂量。在派伊尔淋巴结和肠系膜淋巴结内检测到了数量比较少，但也有活性的芽孢杆菌（大多为芽孢）。虽然没有传播到器官（肝，肾），观察结果表明，相当比例的孢子穿过了黏膜屏障。抗原呈递细胞中含有丰富的派伊尔淋巴结，特别是树突状细胞，树突状细胞是Th1和Th2细胞反应的效应。一项体外研究已经表明，小鼠巨噬细胞（RAW264.7细胞系）在枯草芽孢杆菌孢子的存在下共同培养，其能有效地吞噬孢子。令人惊讶的是，被吞噬后芽孢可以萌发，并启动活性基因表达和蛋白质的合成。不过，萌发的芽孢不能继续生长和分裂，约5小时后，被巨噬细胞的溶酶体融合。而炭疽芽孢杆菌可以在巨噬细胞内发芽，增殖并分泌毒素，从而导致细胞溶解。与枯草芽孢杆菌不同，炭疽杆菌的营养细胞被包裹在芽孢囊内，保护它免受细胞吞噬。细胞内孢子萌发可能是巨噬细胞杀灭菌体的第一个步骤，巨噬细胞提供一个适当的信号刺激芽孢发芽。有趣的是，芽孢杆菌中与萌发相关的基因保守性强，也就是说萌发过程本身在物种之间的可能是相似的。这项研究很重要，因为它表明运送到小肠大量摄入芽孢与肠道相关淋巴组织（GALT）相互关联，是一种高效的刺激免疫系统的机制，这也是益生菌具备的益生机制。

注：上述内容参考自“The use of bacterial spore formers as probiotics”

专家观点：

2006年后，断奶后2周乳仔猪饲料分成美系和欧洲系两派别：美系以追求断奶后最大生长速度为目标设计仔猪料；欧洲系以避免引起肠道消化负担及紊乱为目标。欧洲派断奶仔猪料以追求断奶后肠道健康为目标，大幅降蛋白含量，不追求断奶后的生产性能，将适中的采食量、适中生长速度作为仔猪料设计的重要指标。采用全营养的方法调控抗腹泻，即零药物+低锌的配方。这种配方从长期看来猪只的长势较好，适用于中国中小型饲料企业。

——赵昕红博士 猪营养技术专家 2013年上海国内外教槽料发展高峰论坛



肠精灵[®]

守护肠道健康

肠精灵[®] 家族



肠优[®]

猪专用枯草芽孢杆菌



肠佳[®]

蛋禽专用枯草芽孢杆菌



肠悦[®]

肉禽专用枯草芽孢杆菌



肠爽[™]

水产专用枯草芽孢杆菌



同源筛分

Homologous
screening



合生发酵

Synbiotic
fermentation

dorun[®]
for the real health

更多信息请致电 400-652-6899 或登录 www.dorunbio.com

都润 只为真健康

更多资讯请拨打“真健康”专线：400-652-6899
或登录 www.dorunbio.com



北京都润科技有限公司

地址：北京市海淀区中关村南大街12号农科院饲料所科研辅助楼505(100081)
电话：010-62159219 62159129 传真：010-62158831

Beijing Dorun Science & Technology Co., Ltd

Add.:No. 505 Feed affiliated building in Chinese Academy of Agricultural Sciences,
12 ZhongGuanCun South Avenue, Haidian District, Beijing(100081)
Tel: 010-62159219 62159129 Fax:010-62158831