

让肠道告诉你...

都润肠讯

都润肠道健康研究中心主办

肠道微生物菌群和宿主代谢的功能关联 (I)

人类微生物菌群基因组的研究方法

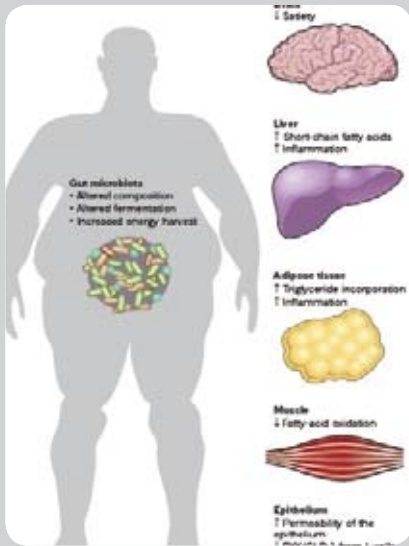
09

第九期



dorun[®]
for the real health

contents



基础理论:

肠道微生物菌群和宿主代谢的功能关联 (I)

03



人类微生物菌群基因组的研究方法

09



专家观点:

14

基础理论

肠道微生物菌群和宿主代谢的功能关联 (I)

人体肠道微生物与肥胖、心血管疾病和代谢综合症（如II型糖尿病）等疾病之间的联系越来越清晰。然而，由于微生物菌群的复杂性，两者间的功能相关性了解较少。在小鼠和人体上的实验都表现出肠道微生物菌群通过改善从食物中摄取能量、调节饮食结构或者改变宿主代谢途径的宿主源性化合物，作用于宿主的代谢途径。通过对微生物菌群和宿主间作用机制的研究，我们可以更好地开发治疗代谢性疾病的措施。

名词术语

生活方式的改变和高能食物是全球肥胖症的罪魁祸首。肠道微生物菌群的组成也会影响机体代谢（如从食物中能量的摄取）应该要作为考虑的环境因素，其会导致肥胖和并发症(如糖尿病和心血管疾病)。

以不可培养的方法来研究微生物菌群增加了我们对人类肠道微生物菌群的了解(框1)。通过16S RNA和基因序列测序的方法分析粪便微生物群表明，人类的肠道微生物群是一个复杂的菌群组成，100万亿古菌和细菌细胞超过1000个种。细菌占主要部分，超过90%的种属于厚壁菌门和拟杆菌门。每个人都有一个独特的和高度可变的微生物群，以及一个保守的肠道微生物菌群定植(核心肠道微生物群)和基因(核心微生物)来保证肠道正常运作。

无菌小鼠是指在无菌环境下出生、养殖的，提供了解肠道微生物群如何影响宿主的生理功能的工具。通过从小鼠或者人类集体内提取特定微生物物种或整个菌群在小鼠体内的定植来研究生理和病理表型，并测试在特定微生物菌群中扮演什么样的角色。肠道微生物群与小鼠骨质密度的调节，脂肪存储的促进、肠血管的生成和免疫反应的发育相关联。本综述讨论了宏基因组和肠道微生物菌群在能量代谢以及与肥胖的联系。

肠道微生物分型(enterotype)：代表微生物菌群的多变性。数据表明肠道菌群包含有一个核心的微生物菌群，它们导致成年肠道菌群的变化，而且首要影响特异性微生物的丰度而不是存在种类。

无菌或限菌生物(Gnotobiotics)：研究动物在无菌或者已知菌繁殖等特定环境中生活的科学。

炎症小体(inflammasomes)：由胞浆内模式识别受体(PRRs)参与组装的多蛋白复合物，包含有胞内传感器(如核苷酸结合寡聚化域受体(NOD), procaspase-1前体和ASC(凋亡相关蛋白斑点像包含半胱天冬酶的激活)蛋白质。识别微生物源性和宿主源性的炎症信号，微生物相关分子模式和损伤相关的分子模式，及其活化炎症因子的成熟(如interleukin-1 β 和白介素18)。天然免疫系统的重要组成部分，也可能与代谢性疾病相关，如肥胖、II型糖尿病和动脉粥样硬化。

总DNA(Metagenome)：可以从环境中提取。人类总DNA是宿主和微生物菌群DNA的总和。

宏基因组(Metagenomics)：研究微生物总DNA。宏基因组学可以是有针对性的(通常是16S rRNA)或非靶向性的(鸟枪法测序)。

微生物菌群(Microbiota)：微生物菌体在一个特定的环境中定植的总体。细胞密度随着肠道延伸而增加，结肠微生物最为密集和多样化。

微生物组(Microbiome)：是肠道中的微生物组成的基因组。表明总遗传能力。

优势微生物

人类的肠道微生物菌群主要由五种细菌类群(厚壁菌门、拟杆菌、放线菌、变形菌门和疣微菌门)和一个古菌门组成。其他细

菌包括蓝细菌门、梭杆菌门、黏胶球形菌门、螺旋体属等。

厚壁菌门包含瘤胃球菌属、梭状芽孢杆菌、乳酸菌(其中几株益生菌),产丁酸菌,*Faecalibacterium*和罗斯氏菌。

拟杆菌门中有拟杆菌、普氏菌和降解多聚糖的*Xylanibacter*。

放线菌门包括*Collinsella*和双歧杆菌(益生菌)。普通变形菌门有大肠杆菌(肠杆菌科家族)和脱硫弧菌属(包含硫酸盐还原细菌)。最近被发现,疣微菌门包括*Akkermansia*(专门用于粘液退化)。古菌门包含甲烷短杆菌(参与肠道甲烷生成)。

肥胖

肥胖人的肠道微生物群组成随着体重的变化有所改变。遗传性肥胖由于编码促进激素——瘦素的基因突变导致贪食。小鼠盲肠的微生物相较其野生型的同胞包含更多的厚壁菌门和更少的拟杆菌,甚至当饲喂同样低脂,多糖的饮食时。类似的变化也出现在人类肥胖者的粪便微生物酸群中。体重减轻,拟杆菌水平提高,或者脂肪或碳水化合物限制饮食,表明拟杆菌可能影响能量的吸收。尽管肥胖和能量摄入会影响微生物的组成,但肠道微生物菌群对人类肥胖起作用尚

不清楚。

胃旁路手术促进体重持续减少,减少肥胖者糖尿病和心血管疾病的风险。这使得微生物群和肥胖之间的关系得到进一步的探索。胃旁路手术后,糖尿病在病人开始体重下降前即可以解决表明这种类型的外科治疗有直接抗糖尿病的效果。实际上这个过程是如何发生的还不清楚,但人类的粪便微生物群表明胃旁路手术后肠道微生物群有助于改善机体代谢表型。原本在肥胖症和糖尿病患者体内较少的有益微生物*Faecalibacterium prausnitzii*在手术后增加。*F. prausnitzii*的水平与炎症标记物呈负相关,表明该菌可以调节全身炎症(在糖尿病和肥胖患者上常见)和有助于改善糖尿病。此外,无菌小鼠不依赖食源性肥胖,肥胖老鼠以抗生素治疗来减少肥胖和脂肪炎症,改善糖代谢,这进一步支持微生物群组成变化所带来的好处。

能量

碳水化合物是人类与微生物细胞重要的能量来源。人类酶不能降解大多数复杂的碳水化合物和植物多糖。相反,不可消化碳水化合物,包括纤维素、抗性淀粉和菊粉,在结肠微生物菌群发酵产生能量使得微生物生长,并产生短链脂肪酸(SCFAs)等发酵产物

(图1),主要是乙酸,丙酸,丁酸盐, 作为能量来源和验证调节器等, 对肠道健康有深远的影响。此外, SCFAs在结肠上皮(酯)和周边组织(乙酸和丙酸酯)可作为能量物质。肠道微生物发酵模式, SCFAs产生形式和含量的多少,取决于碳水化合物的消耗和肠道微生物群的构成。例如,当无菌小鼠体内有多形拟杆菌, 并伴随史氏甲烷短杆菌定植时, 食

物中果聚糖的发酵也增加。多形拟杆菌产生更多的亚种醋酸和甲酸, 史氏甲烷短杆菌可以利用甲酸产甲烷。菌群的相互作用促进碳水化合物的发酵, 增加肠道中能量的吸收, 导致这些小鼠比肠道中仅有多形拟杆菌的肥胖产生的几率增加。肠道微生物菌群的组成和代谢的相互关系可能影响食物的消化和能量吸收。

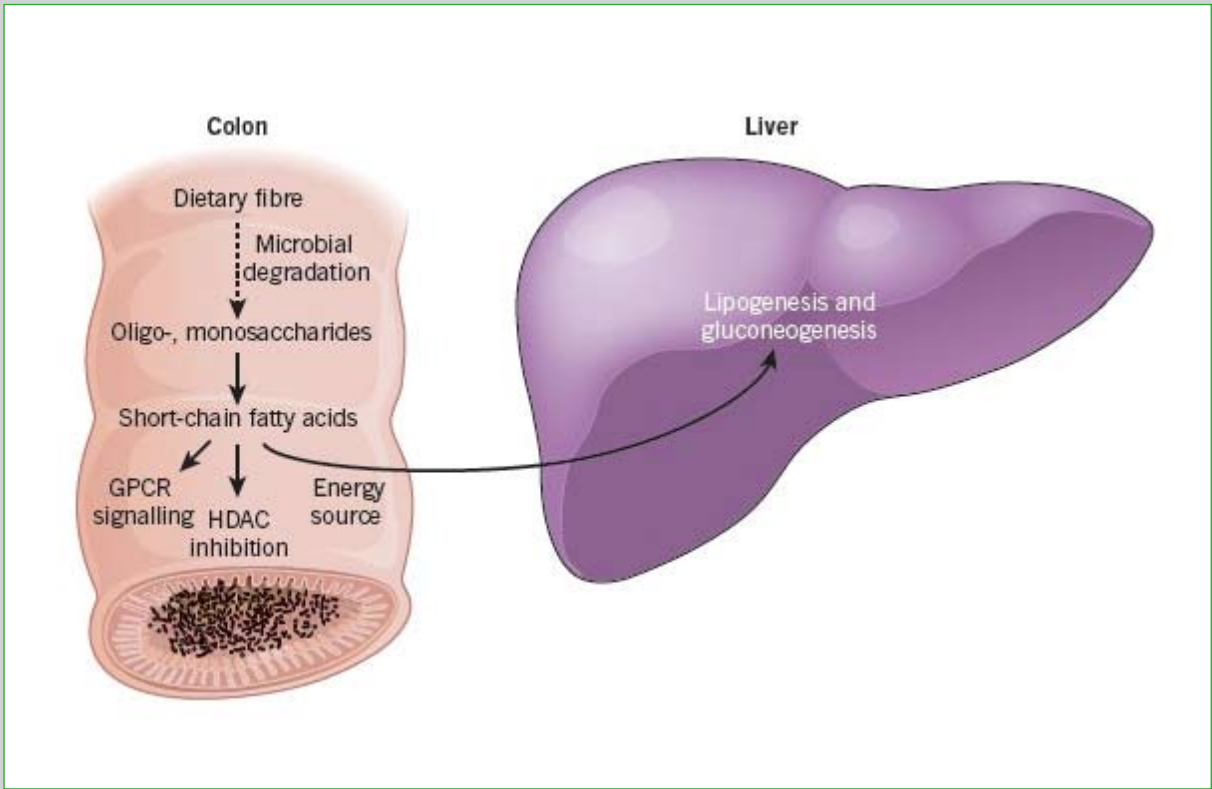


图1 影响膳食纤维结肠发酵的因素复杂碳水化合物,如膳食纤维,是由结肠微生物代谢为低聚糖和单糖,然后发酵为短链脂肪酸,主要是醋酸丙酸和丁酸,。短链脂肪酸的吸收在结肠,丁酸为结肠上皮细胞能量提供物质,乙酸和丙酸酯到达肝脏和周边器官,在那里生成糖元和脂肪。除了作为能源,短链脂肪酸通过抑制酶组蛋白去乙酰酶(HDAC)控制结肠基因表达,并由G蛋白耦合集受体(GPCRs)调节代谢的,如GPR41或GPR43。

肠道微生物菌群从饮食和脂肪中促进能量吸收在小鼠中已经证实，但是大部分人体的证据来自间接研究。例如，肥胖的人相比瘦的人在呼吸中含有更高的乙醇，表明发酵改变，粪便中短链脂肪酸含量较高会增加微生物能量的吸收。

饮食改变肠道微生物菌群

饮食可以改变人类和小鼠的肠道微生物菌群的构成。长期的饮食习惯对人类肠道微生物菌群有相当大的影响。例如，非洲农村的儿童摄入大量的植物多糖，其粪便与意大利的孩子相比较厚壁菌较少和拟杆菌水平较多——主要是普氏菌和 *Xylanibacter*——在意大利孩子的粪便中则有高水平的肠杆菌科，主要是志贺氏杆菌和大肠杆菌。普氏菌和 *Xylanibacter* 已知是降解纤维素，与粪便中脂肪酸含量增加有关，这表明生活在非洲农村孩子的肠道微生物群已适应从富含纤维的饮食中最大化吸收能量。人类肠道微生物群可以分为三种不同的菌型，每个菌型是由不同的属占主导——拟杆菌型，普氏菌型和瘤胃球菌型，不受性别、年龄或国籍的限制。拟杆菌型与饮食中富含蛋白质和动物脂肪相关，普氏菌型与饮食中碳水化合物

相关。瘤胃球菌型还为完全分离出来，部分并入拟杆菌属。一个为期10天的饮食干预并不足以改变个人的菌型，这表明可能需要长期的改变才可引发重大的微生物群组成的变化。

日常摄入碳水化合物的变化可能在很短时间内影响结肠特定群体。同样，益生元促进双歧杆菌在食源性肥胖小鼠肠道内选择性增加，这种增长与肥胖减少和微生物源性炎症分子水平相关，如脂多糖。

肠道微生物群也对膳食脂肪有所影响。饲喂高脂饮食使得小鼠拟杆菌数目减少，厚壁菌门和变形菌门增加。这一变化在24小时内迅速发生。肥胖小鼠以改变的微生物群落对食源性肥胖似乎有一些促进作用，但机制不明。

食物成分的微生物处理

微生物菌群的代谢产物作为信号分子影响宿主的代谢。微生物产品直接影响肠道功能，也可能影响到肝脏和大脑，以及脂肪和肌肉组织，从而影响肥胖程度和相关的并发症（图2）。微生物分泌的酶活动可直接作用于多糖发酵和胆汁酸的代谢，以及与宿主胆碱代谢（图3）。

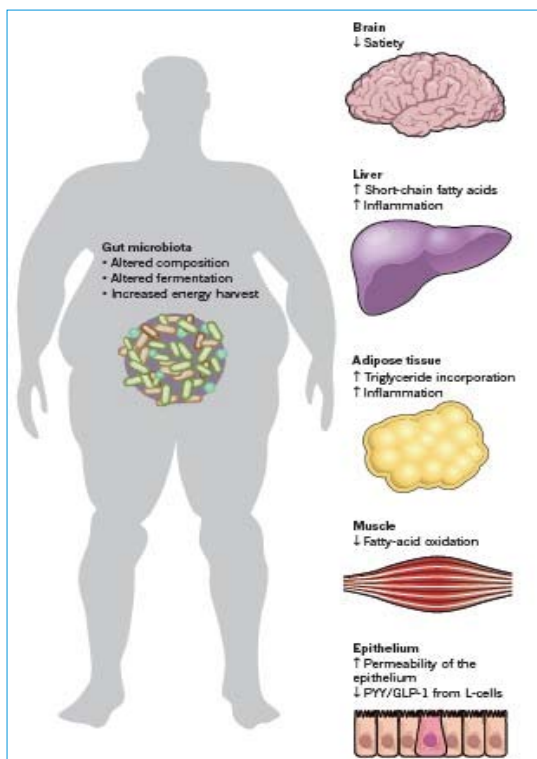


图2肠道微生物群在促进肥胖和胰岛素抵抗中的的特点

肠道微生物菌群组成和代谢能力的改变，可以影响在其周边器官促进肥胖和代谢，如大脑中饱腹感的产生；从肠道释放激素（PYY和GLP-1）；脂肪组织、肝脏和肌肉中脂质的合成、存储或代谢。微生物分子也会增加肠道通透性，导致系统性炎症和胰岛素抵抗。

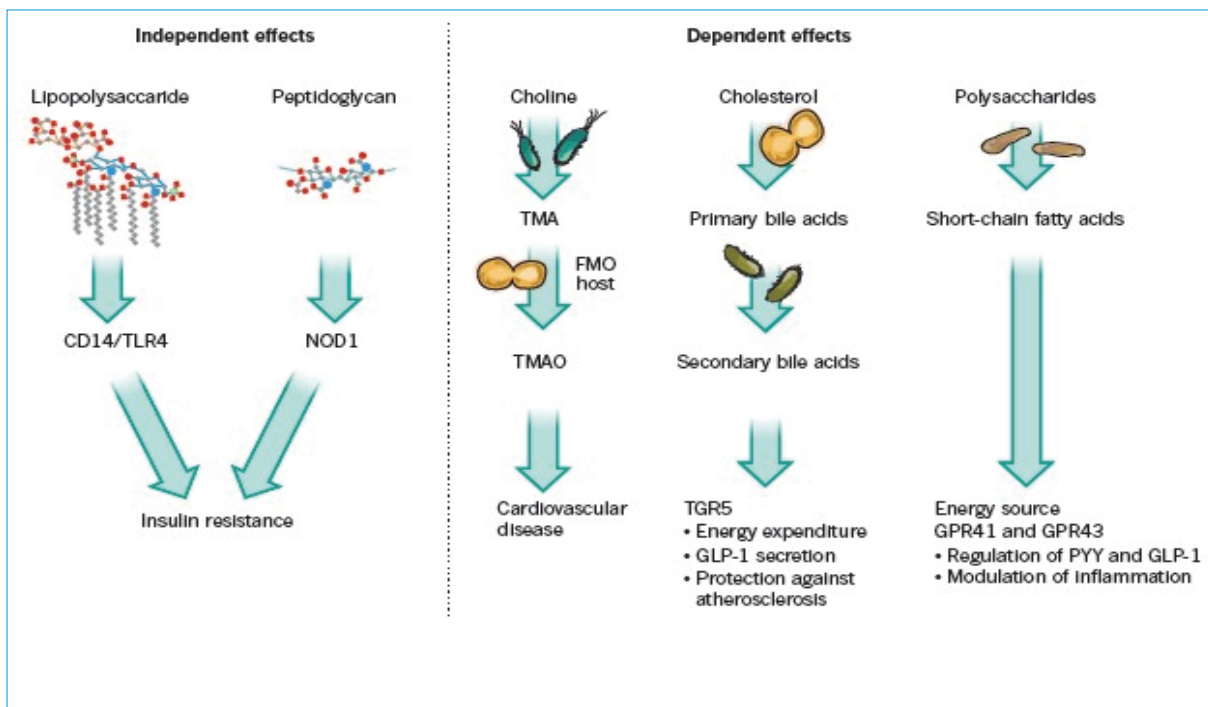



图3不依赖和依赖性饮食条件下微生物对宿主代谢的影响。肠道微生物菌群产生的促炎症因子，如脂多糖和肽聚糖，可能通过宿主产生的蛋白质影响其代谢并调节宿主免疫反应。食物中的胆碱、胆固醇和多糖经过肠道微生物菌群的代谢，或通过进一步的宿主-微生物共代谢产生生物活性物质代谢。胆碱可能导致心血管疾病，胆固醇可以激活TGR5增加能量消耗，GLP-1的分泌可防止心脏病；多糖、短链脂肪酸可以作为能源来源，与GPR41或GPR43绑定后调节激素和炎症反应。FMO，黄素单氧酶；TLR4，跨膜蛋白；TMA、三甲胺；TMAO，N-氧化三甲胺。

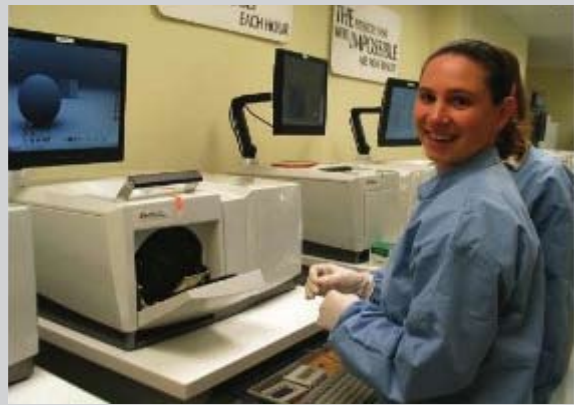


人类体内定植大量的微生物菌群,有细菌、病毒和真核微生物。由于许多微生物没有在体外得到纯培养物,所以我们将菌群作为一个整体来研究,使得本项工作具备挑战性。由于不依赖培养方法复制出DNA序列进行测序的方法出现使得我们可以进行更复杂的分析和复杂系统中系统抽样成为可能。这些方法是揭示不同位点、不同个体以及健康和患病状态下群落结构的差异,并改变我们对人类生态学的观点。

人类微生物菌群基因组的研究方法

存在于人体内的细菌统称为人类微生物菌群。由于微生物发酵产物对环境的影响及其与其它系统成为一体所以微生物菌群又被称为人类的另一大器官。或者是第二个基因库,微生物的基因组是人类基因的100倍,仅在肠道中的就超过300万个细菌。这些广泛的微生物生态系统不仅存在人类的身体中,微生物菌群在环境中以及肠道微环境中分布占主导地位。环境宏基因组学在应用于人体研究之前已经广泛,并从其他原理得到的研究方法对人类微生物组的研究有显著的影响。复杂的微生物生态系统的定义和探索微生物工作机理的开发工具是21世纪微生物研究的重点。

微生物群落的复杂性使得对微生物菌群的研究具有挑战性。这个菌群可能有成百上千种不同的种类,并且还存在着许多不可培养微生物,甚至其特殊生长条件尚不可知。此外,微生物的分布范围广泛,可以在数量级,所以深抽样需要检测数量较少的成员。用不可培养微生物方法开始对微生物菌群进行研究开始于25年前,是基于不同菌种5S和16S rRNA基因不同进行标识的。基于此段基因,新一代测序技术(NGS)的研发,以及针对16S rRNA和全基因组鸟枪法对微生物菌群的测序等更深层的分析。以不可培养微生物基因组来研究的人类微生物宏基因组的研究发展迅速,也是最重要的微生物学研究领域并在临床实践中受益。这种不依赖培养微生物广泛应用在人类微生物外部和环境微生物研究中。本文描述了新一代测序



技术对人类微生物组方法研究的改变,并提出了问题和未来的挑战。

单一的生物和微生物群落

过去,研究微生物与人类的相互作用集中在单一致病菌上。对非致病菌菌群的研究有限的,因为它们被认为是良性的,次要的存在,与病原体相比较对人体健康的影响很小。微生物的深入研究使更多专注于非致病微生物在人机体内的定植情况,以及依赖这些菌群的基因组情况来了解人类微生物组。

不同微生物菌群都有自己的菌种特点。对肠道菌群为例,高生物多样性与健康的状态相关,生物多样性的减少伴随着疾病如克罗恩氏病。为什么不同的作用位点有不同的特性,生态系统被破坏并导致疾病的机制,需要进行菌群组成以及微生物菌群作用机制的研究。

微生物群落通过营养的消化吸收和保护宿主免受感染的方面使宿主受益。抗生素治疗的干扰可改变菌群的数量和组成。这种干扰可能导致感染、抗生素耐药性的问题,例如艰难梭

状芽胞杆菌——一种通常被菌群控制的细菌——过度生长并产生对宿主的健康问题。更复杂的菌群与宿主免疫系统和炎症反应系统相关联，菌群产生的代谢产物参与到多组织混合代谢路径，包括宿主-微生物途径中。希望对这些现象的分析将用于对微生物菌群更好的利用，比如移植的微生物群落治疗梭状芽胞杆菌感染。

人体微生物生态是否可以简化为单一生物的特性尚未知。许多菌种都属于未培养微生物，可以生活在菌群环境下而不是单一培养物中。当菌种生长条件确定，就可以凭借其分泌物从其他菌群中分离出此菌种。例如，分泌型铁传递蛋白是帮助微生物清除铁的小分子，

身体内的铁限制菌种的增殖。所以可以由研究菌群来研究菌种个体。

微生物组分析

微生物菌落结构的分析侧重于有针对性的区域(如16S rRNA基因)或是由鸟枪测序基因来对其进行归类(如图1)。其他的分析包括个别菌种基因组测序来确定参照基因组目录，通过分析RNA来描述转录过程以及识别RNA病毒。非基因组分析包括蛋白质组学和代谢组学的研究，就不在这里进行讨论了。每个样本应该注释临床数据，最终得到与菌群个体表型相关的微生物遗传和菌群结构。

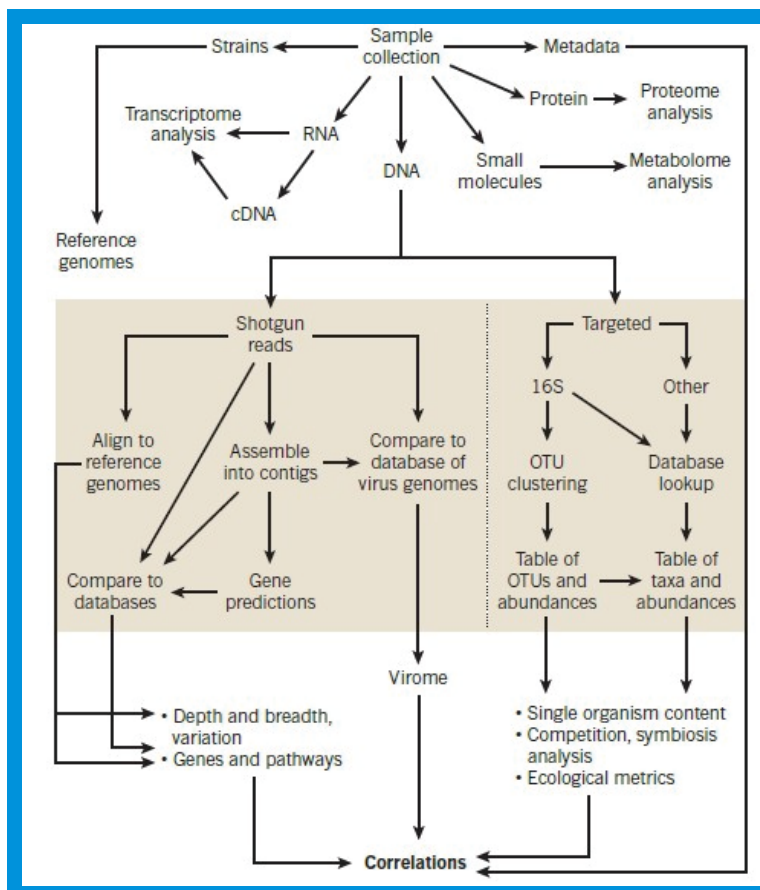


图1 微生物组分析所需数据和 workflow 分析流程。

微生物菌群样本中提取DNA、RNA和蛋白质，获得原数据和菌株。DNA可以对蛋白质组数据进行补充以及转录组分析。在初步分析中，使用鸟枪法获取DNA序列，比对参考基因组以确定变异和菌群遗传学特性，通过邻接片段的组装进行基因段预测，或与数据库相比对。另外，有针对性的测序如以16S rRNA基因测序对菌群组成进行分析，在数据库中进行比对后创建不同种属的类群和丰富度，或用软件程序分析菌群创建菌种的丰度。衍生的数据用于接下来分析生态指标或竞争性或共生性分析。此外，鸟枪法克隆基因后与参考基因组或者数据库中的基因进行比对可以用来构建途径和菌群重构。这些分析方法的综合应用将有助于理解不同菌群间和个体内部的差异。

微生物菌群中所含菌种

现代的宏基因组分析微生物菌落是从不依赖培养微生物的方法发展而来用于分析微生物菌群结构和丰度。虽然DNA复性动力学为菌群结构和多样性提供了信息,但没有考虑到样品之间菌群的差异。这个方法对于整个结构信息的获取更加有效,主要通过印迹序列来区分类群(利用杂交到待检测寡核苷酸来检测),以及通过聚合酶链反应(PCR)(如单链构象多态性或末端限制片段长度多态性)或针对PCR产物的DNA测序。16S rRNA基因是取得菌群结构组成的主要的方法,因为指纹图谱法对于低丰度菌群不能进行充分的检测。

不同细菌的16S rRNA不尽相同。所以细菌种属很难定义,但通常是以16S rRNA基因序列至少97%以上(操作分类单位OTU)相似即可以定义为属于同种属。一个16S rRNA基因序列约1500个碱基对,包括有九条短小但是高变区域从而区分出细菌类群;序列的一个或更多的这些区域有针对性。

16S rRNA基因测序的方法不需要知道样品中有哪些微生物存在,除非是有16S rRNA的基因序列相似和样品之间差异度究竟多大。在比较健康的群体和有疾病条件下微生物菌群是否存在不同,或饮食的影响,抗生素治疗或环境因素对微生物组的影响,都是关注于菌群的差异,而不是实际的分类区别。在识别过程中允许存在敏感性损失的情况,新一代测序技术在大量菌群测序中是有效的,因为需要达到在统计学上具有显著性的结论。Illumina公司测序平台已经应用于基因组的项目中,但因为这个测序平台目前只能读取100个(HiSeq系统)到150个碱基(MiSeq系统),只有一个单一的高变区可以是测序的。一个早期的应用平台是用于研究艾滋病毒患者的阴道微生物组成,分别在抗生素治疗前和之后比较患者的条件如阴道炎。由于Illumina公司平台样品序列的飞速增加和成本较低的关系,它越来越广泛用于16S rRNA基因序列分析和微生物趋势分析在低成本条件下的深入探讨方面。



鸟枪法测序对微生物进行分类

鸟枪法是一种由生物基因组提取目的基因的方法。首先利用物理方法(如剪切力、超声波

等)或酶化学方法(如限制性内切核酸酶)将生物细胞染色体DNA切割成为基因水平的许多片段,继而将这些片段与适当的载体结合,将重组DNA

转入受体菌扩增，获得无性繁殖的基因文库，再结合筛选方法，从众多的转化子菌株中选出含有某一基因的菌株，从中将重组的DNA分离、回收。其特点是绕过直接分离基因的难关，在基因组DNA文库中筛选出目的基因。由于目的基因在整个基因组中太少太小，所以人们称这个方法为“鸟枪法”或“散弹枪”实验法。

有针对性的测序对于微生物菌群中菌种的评估是一个强大的工具，但在基因功能确定和遗传信息的产生中有限制。生物体的已知基因组序列(目前有几个已经确定细菌基因组)可以用来推断菌群其他序列的基因和功能的社区。然而，许多肠道微生物没有参考序列。此外，一个参考序列不足矣完全描述生物体的基因功能。相同种属的不同菌株间基因组的变化是相当大的。两株大肠杆菌O157:H7和k-12，都有大肠杆菌特征性的16S rRNA基因序列，但依然有数百个碱基对不相同。所以，仅16S rRNA基因序列来了解微生物菌群的遗传信息就有很多的限制。

在肠道菌群中，细菌浓度可以达到 10^{11} cfu/ ml，当基因产物浓度如代谢产物或者毒素达到 10^5 cfu/ ml就可以对宿主有所影响。

Illumina公司通过粪便样品的测序，在人体肠道内宏基因组学项目 (MetaHIT)每个样品产生4 Gb (单位: gigabases) 序列，HMP项目中每个样品产生10 Gb，其中每个样品对应数千万个阅读单位。在这测序中，所占基因组组分相对小的比例，如大肠杆菌(丰度

约为1%或更低)的测序结果几乎完全，生物样本丰度更低的菌种都有其基因组代表。这种对于复杂微生物群落通过NGS方法低成本产生大量的数据来进行抽样。

除了16S rRNA基因分析，通过鸟枪法进行序列测序产生的数据可以提供微生物菌群的生物组成的信息。通过鸟枪法提取16S rRNA基因序列来确定生物序列是可能的；然而，有针对性的16S rRNA基因测序结果往往会有偏差(由于PCR对16S rRNA基因序列进行扩增或16S rRNA基因区域的选择产生)，而鸟枪法测序则不会有这种问题。鸟枪法测序中对目标rRNA测序不敏感，因为只有很小的一部分序列来自16S rRNA。另一种方法是将鸟枪法测序的基因序列与细菌基因库中的参考序列比对，用相对丰富菌种的序列来确定阅读框长度。在MetaHIT项目中已经用这种方法对粪便样品中菌群结构的基础上对不同菌种进行分类，称为构型。同样16S rRNA的分析结果显示也成这种构型。阴道微生物中通过此法被分为五组。这些观察结果表明，人类微生物组可能存在于不同的国家不同的人，虽然与环境、遗传或相关健康状况之前存在的关系尚不清楚。基于菌群中菌种从属何种菌群的未来战略性研究对于运用表型数据来确定其相关性是相当重要的。

注：上述内容参考自：“[Genomic approaches to studying the human microbiota](#)”

专家观点：

美国养猪多年的饲喂研究证实，自动饲喂系统的生产性能并不会比饲喂栏模式的养猪更好，自动饲喂系统对人员素质要求较高，投资成本更大。将来推动抗生素禁用的压力来自于政府和消费者的推动力，即公众对于食品安全的重视，而非对于生产性能的提高，所以，像微生态、酶制剂等添加剂需要有相应的技术储备。

——岳隆耀 禾丰牧业股份有限公司猪饲料研发总监于都润科技“立足当前 谋划长远”猪料产品力提升论坛(南昌)



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