

让肠道告诉你...

都润肠讯

都润肠道健康研究中心主办

抗生素、菌群失调与疾病的关系 (II)

微生物和固有免疫 (I)

30
第三十期



dorun
for the real health

contents



03

基础理论:

抗生素、菌群失调
与疾病的关系 (II)



09

研究进展:

微生物和固有免疫 (I)



13

方法探讨:

猪胃肠道内溶解氧的
研究方法

基础理论

抗生素、菌群失调与疾病的关系（II）

影响微生物组发育的其它主要因素

饮食在现代婴幼儿消化道微生物定殖过程起到重要的作用，这是由于人的乳汁与婴幼儿配方乳品存在较大成分差异。母乳喂养的婴儿与配方乳品喂养的婴儿微生物群系的显著差异是母乳喂养的婴儿双歧杆菌、乳酸杆菌占主导，而配方乳品喂养的婴儿消化道内存在着更多肠球菌和肠杆菌。当观察母乳喂养和配方乳品喂养的双胞胎时，还能发现两者菌群组成存在一个显而易见的差别。母乳可以通过母乳中微生物菌群、刺激细菌生长的因子（如益生元）和抑制细菌生长的因子（如抗生素）等有效调控婴儿肠道内菌群定殖，这一现象在配方乳品喂养的婴儿上没有发现。母乳微生物菌群主要存在变形菌门和厚壁菌门，在母乳样品中可发现核心分类单位，包括葡萄球菌、链球菌、沙雷氏菌、假单胞菌、棒状



杆菌、劳尔氏菌、丙酸菌属、鞘氨醇单胞菌和慢生根瘤菌。母乳微生物菌群会随着时间变化，这取决于母亲的体重。例如，魏斯氏菌、明串珠菌、葡萄球菌、链球菌、乳球菌在刚刚出生时占主导，肥胖母亲母乳中比体

瘦母亲母乳中的变化要小。这些摄入的细菌提供了一个持续的、有利于消化道定殖的菌群组成来源。乳源性益生菌会调节消化道中的细菌，其包括人乳低聚糖——由糖产生仅供微生物消耗。其中也包括“最初”的人乳

低聚糖——双歧因子，其可以刺激两歧双歧杆菌和大量的其它糖类（是一类还原端包含乳糖的非结合多聚糖）主要来自促进长双歧杆菌婴儿亚种的生长。人乳中的抗生素会影响消化道的微生物，包括分泌型免疫球蛋白A——SIgA（提供针对母体所接触微生物的抗原特异性保护）和固有免疫蛋白，如具有杀菌活性的乳铁蛋白和溶解酶。早产儿的母亲乳汁中细胞因子和免疫球蛋白的浓度在出生时最高，这进一步说明了早期母乳喂养的重要性。

分娩方式会影响婴儿的微生物菌群，顺产婴儿的整个微生物菌群（包括皮肤、口腔、鼻咽分泌物及胎便）与母体阴道、肠道中微生物菌群相似；而剖腹产婴儿的微生物菌群与母体皮肤微生物菌群相似。特别要指出的是，顺产婴儿的微生物菌群主要包含乳酸菌、普氏菌、奇异菌和纤毛菌，反之，剖

腹产婴儿的微生物菌群包含葡萄球菌和少量的双歧杆菌。

儿科菌群失调和相关疾病的研究框架

儿科菌群失调的机理健康的影响很复杂，受到多种因素控制。如果考虑婴儿的发育（包括肠道微生物菌群、免疫系统及其相互作用）则更加难懂。我们通过系统方法可认为有五个相互关联的框架用来了解菌群失调，这集中于致病机理的不同方面。我们从其相对清晰的优点、对组织的潜能和表达多因子疾病途径的能力这几方面探讨这些概念框架。既然到目前为止应用于儿童的抗生素最多的是普通型，那么我们将该研究假设限定在抗生素的一个或更多不连续使用过程对健康的长期影响这一范围之内。每一个观点都会强化概括儿科菌群失调特定方面的能

力。总之，我们找到了以研究菌群失调为中心和研究疾病为中心这两种观点的结合，这些观点对探讨疾病机制非常有用。

以菌群失调为中心的观点

肠道菌群是持续波动的，菌落组成不断适应所处环境和宿主发育过程的变化。这种适应能力对保持肠道稳态是必需的，但是诸如抗生素诱发的剧烈变化可能导致对机体健康产生负面影响。我们这里讨论的四种显著类型的儿科菌群失调可以用微生物菌落的剧烈变化进行描述。广谱抗生素一般用于消除多种细菌种类，肠道菌群可能受到以下因素影响——（1）对保持稳态或适当的宿主发育（如免疫系统）起决定作用的基础菌群意外损失；（2）生物多样性的整体损失，这存在固有的、对其自身健康的风险（如卫生保健假说），而且会导致其它失调类型出现。类

群从所在生态位消除后留下的空缺由以下填补；（3）病原菌和病理生物的增殖。甚至当婴儿肠道菌群从失调状态下恢复并达到某种形式的稳态，不恰当或局部恢复还会导致如下情况发生；（4）功能性的改变——比如，在提取能量过程变得更为高效。这些失调类型有时候会重叠，进而增加系统的复杂性以及为了研究儿科菌群失调而建立统一概念框架的挑战性。从不同失调类型的多个视角来观察儿科失调对于理解相对简单的婴儿肠道多么小的变化是特别重要的，婴儿肠道可以显示出类似成人阶段的较大反应。这样一个失调类型的框架对理解肠道微生物群落失调是相对重要的，但是同时受限于其简单描述多个因子的能力，这些因子包括婴儿的年龄、失调类型的重叠和转变、失调类型和疾病表型之间的多种关联以及免疫系统的平行发育。



以疾病为中心的观点

在宿主发育的不同方面和特定种类影响的情况下，之前所描述的儿科菌群失调类型会引发一系列的健康问题。用自上而下的方法解析健康的结果是另外一种理解失调的框架。在这种以疾病为中心的框架中，健康是以疾病的种类以及特定作用机制、框架子系统间的互作为特征的。例如，此种框架下那

些肥胖症相关的儿科菌群失调始于出生2年内的任一时间点抗生素的使用。生物多样性在治疗过程中是减少的，但是在治疗结束后还会重新恢复，这包括分类组成的巨大变化。在肥胖症发生的情况下，组成的变化还会导致影响新陈代谢的功能性变化。微生物菌群在提取能量过程——这一过程指从多个来源及随后主要从宿主体转向肥胖状态——变

得效率更高。幼龄的时候使用抗生素加剧了疾病倾向，而复合干扰则可能会导致非预期的结果。其它疾病类别可能包括过敏症和特异性疾病、自体免疫疾病、糖尿病以及传染病。这一框架在解释时序因素的同时囊括了各种疾病类型间的主要相互作用。以疾病为中心的观点的主要缺点是其不易对疾病间一般作用机制进行综合。

以年龄为中心的观点

菌群失调问题可随着菌群彻底恢复并对宿主产生最小影响而得到解决，或者取决于宿主发育阶段而带来严重的、意想不到的后果。微生物组和宿主免疫系统的发育状态可以很方便地进行阶段划分——尽管有时候只是大概那么区分——一般为四个阶段，即0-6月、6-12月，12-24月和24月之后。

以应答为中心的观点

在应对抗生素时，肠道菌群的变化分为数个阶段——抗生素治疗前、治疗阶段、恢复阶段和长时间的停滞期。在治疗阶段出现的菌群失调类型包括主要类群的损失和短期的代谢变化，这两方面均伴随抗生素应用的多个阶段。抗生素治疗阶段一结束，肠道菌群即进入恢复阶段，但是此时会出现多个潜在并发症。由抗生素引发的多样性缺失可能

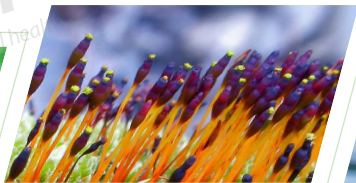
导致致病菌和致病有机体的爆发。适应性免疫系统可能发育并不完善，主要类群尚未恢复（进一步延缓了免疫系统发育），代谢过程的变化此刻也可能会发生。最终肠道菌群达到一个停滞期，这可能与治疗前还是有差别的。在停滞期，可能形成永久性的代谢变化，致病有机体增多所引发的生物多样性的

缺失或许继续存在，宿主可能易患传染病。尽管应对抗生素的群落结构动力学对识别短期缺陷、菌群失调在每阶段的典型发生及其它阶段的终止机制是有效的，这使得此种框架让人感到混乱，难以进行研究应用。

以恢复为中心的观点

尽管成人的肠道微生物每天经历着变化，但其与婴儿肠道菌群相比还保持着相对稳定。婴儿肠道菌群的一个重要特点就是分类组成存在巨大的变化，特别是在出生后的第一年。尽管是看似随机的变化，当评估生物多样性和特定类群相对丰度时，婴儿肠道微生物群落中存在着清晰的健康发展轨迹。该框架在描述微生物组是怎样恢复至这一轨迹时是这么定义微生态失衡的——快速恢复、缓慢恢复或不完全恢复。在快速恢复阶段，可能存在短期的多样性缺失但是关键类





群保持下来，肠道微生物快速恢复至日常状态，对宿主产生极小的影响。在缓慢恢复阶段、与免疫系统发生互作的关键时刻，存在关键类群的缺失，因而引发免疫发育延迟。生物多样性比较低，并且可能需要经历一些时间后，关键类群能够重新建立并与免疫系统相互作用，然后再回到正常轨迹。宿主在这种长时间的恢复期中极易感染传染性疾病，因为此时免疫系统不成熟且微生物多样

性较低。尽管最终健康的肠道微生物类群恢复并重新建立，适应性免疫系统可能会在较长的恢复期产生对抗共生体的抗体，使宿主易患自身免疫性疾病。在不完全恢复期，微生物组成的变化非常激烈以至于肠道微生物处于全新的停滞状态，微生物类群处于一个完全不同于预期的轨迹。这一系列变化会伴随着肠道微生物的功能和代谢变化，并伴随着自身出现疾病的风险。该框架中的这种恢

复类型不是相互独立，因为快速或缓慢的恢复速率可能会导致不完全恢复，这是很可能出现的。该框架也并没有指出恢复类型是怎样取决于一个特定的发展阶段，诸如以年龄为中心的观点中所考虑的那样。

注：文章参考自“Antibiotics, Pediatric Dysbiosis, and Disease”, *Cell Host & Microbe*, 2015: 553–564.

研究进展

微生物和固有免疫 (I)

肠道菌群是一个信号中心，整合环境信号（如饮食、遗传）和免疫信号影响宿主的代谢、免疫以及对感染的反应。固有免疫系统的造血和非造血细胞适当分布在宿主和微生物表面。这些细胞具有感知微生物或其代谢产物的能力，并将这些信号转化为宿主生理反应调节微生态。固有免疫系统和肠道菌群之间的通讯异常可能导致复杂的疾病。

过去的二十年里见证了我们对宿主-微生物相互作用认识的一场革命，这就导致了哺乳动物共生体的概念，即真核和原核微生物部分协同进化的结果。这场革命需要两次转变，在各自领域有巨大的影响。第一次发生在上世纪90年代末，随着固有免疫系统中模式识别受体（PRRs）的发现，通过保守的分子结构来感知微生物。一些PRRs家族及其信号通路现在已知，包括Toll样受体（TLRs），NOD样受体（NLRs），RIG-I样受体，C型凝集素受体，缺少的黑色素瘤2（AIM2）样受体和OAS样受体。这些受体由多种细胞区室表达，并构成连续监测系统监测组织中存在的微生物。

第二次转变发生在不到10年以后，由微生物组（定植于人体的全部微生物和它们的基因组）的免培养特征来驱动。由于定殖在身体表面（皮肤和消化道、呼吸道和泌尿生殖道）的微生物数量巨大，固有免疫对微生物的识别可能伴随着针对它们的免疫反应立即启

动，没有导致明显的、机体广泛的炎症及其破坏作用似乎是不大可能的。因此推测，人体表面的微生物感知需要严格控制，以确保宿主及其固有共生微生物之间的共生关系，同时也为消灭侵入到非定殖部位微生物的免疫反应快速启动留有余地。在认识到缺乏识别共生微生物的固有免疫时宿主-微生物共生体丧失对健康有不利的影响，这一观点得到进一步深化。固有免疫和微生物之间的相互作用是目前已知的远远超出对共生微生物的耐受和对病原体免疫之间达到的精准平衡。微生物融合到整个有机体的生理并通过它对固有免疫系统的作用影响机体稳态的多个方面。因此，通过该系统的感知可作为对微生物代谢活性、接触的饮食和外源性物质，以及存在的粘膜感染的调节器。收集到信息接着在不同的生理水平上进行处理，动态调节宿主的活动，以适应周围微生物生态系统的状态。相反，固有免疫系统在将固

有微生物群落和生态塑造成可被宿主耐受的结构，并有利于其代谢活性方面起着重要的作用。这种复杂的宿主和微生物之间的双向互动对人类健康有重要作用。许多以前被认为是特异性的“多因素”疾病，可能因此会受到影响或甚至通过改变稳态期间固有免疫系统和微生物菌群发生的密切相互作用来驱动的。在这篇综述中，我们阐述了固有免疫系统和肠道菌群之间相互作用的机制，以及这个通讯网中的任何一方出现偏差如何促成常见的多因素疾病的分子病因。由于病毒、真菌和寄生虫的作用已在其他地方做了总结，我们集中于固有免疫系统和细菌微生物之间的相互作用。

生理功能

这个相互作用网络描述了固有免疫系统和微生物菌群之间的相互依存关系。两个系统互相影响来协调整个机体的生理功能。



上皮细胞

虽然不典型地被认为是固有免疫系统的真正细胞，但肠上皮细胞拥有广泛的固有免疫受体谱（图1）。这些受体的表达和活性信号转导对微生物的识别是肠道稳态的关键，因为它们的上皮特异性缺失导致上皮屏障破坏，使共生细菌和肠固有层之间的空间分离，从而诱发组织自发性炎症。参与TLR信号的成分已被阐明，包括髓样细胞分化蛋白MyD88，TNF受体相关因子6（TRAF6）和NF- κ B必需调节因子（NEMO）4,10-12，以及参与细胞凋亡的因子如受体相互作用的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1（RIPK1）、FAS相关凋亡结构域蛋白（FADD）和凋亡蛋白酶-8。

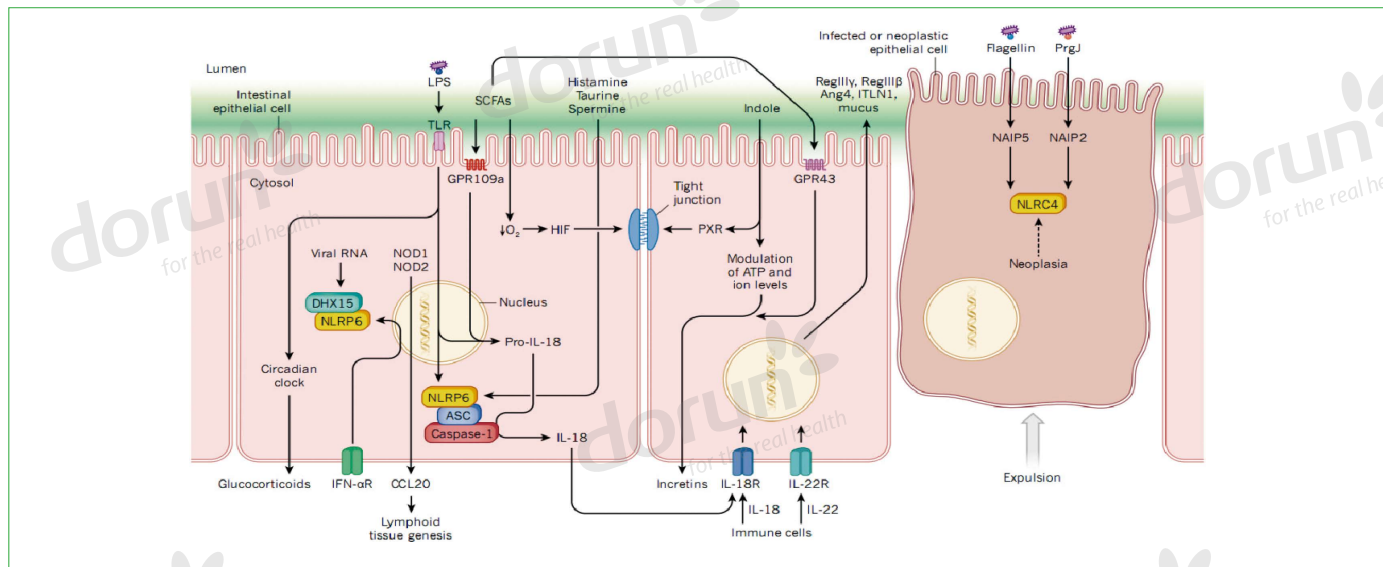


图1. 肠上皮细胞调节宿主和微生物之间的相互作用

肠上皮细胞通过微生物细胞组分和代谢物的识别来调节它们的抗菌程序和代谢平衡。PRRs的活化（如TLRs和NOD样受体NOD1、NOD2）直接与抗菌肽（包括ReiII γ 、ReiII β 、Ang4和Itln1）和粘液的产生相偶联。IL-18通过自身分泌在这一过程中起重要作用。上皮IL-18的分泌需要TLRs或G蛋白偶联受体GPR109a的转录激活和NLRP6炎症体的转录后裂解。NLRP6也可由I型干扰素诱导起病毒DNA传感器的作用，该DNA具有前mRNA剪接因子ATP依赖性RNA解旋酶DHX15。来源于免疫细胞的IL-18和IL-22也有助于调节上皮细胞的抗菌反应。来源于上皮细胞NOD1信号下游的CCL20，参与淋巴组织的发生。NLRP4促进肿瘤或感染细胞从肠上皮细胞排出。PRR信号也介导肠上皮细胞内的生物节律钟，并调节上皮衍生的代谢激素如糖皮质激素的分泌。上皮细胞也对微生物调节代谢产物的水平作出反应，如SCFAs（乙酸、丁酸、丙酸）、多胺（精胺）、以及氨基酸和来自它们的产物（牛磺酸、组胺、吲哚）。牛磺酸、组胺和精胺调节炎症体组分NLRP6的活性。吲哚调节肠促胰岛素分泌的水平并通过PXR促进上皮屏障功能，有助于加强细胞间紧密连接。SCFAs作为上皮细胞的能量来源，也通过HIF来支持屏障功能。（ASC，含有CARD的凋亡相关斑点蛋白；R_v受体）

NOD2在小肠潘氏细胞中高度表达，是由微生物肽聚糖激活并产生细胞反应，包括分泌细胞因子，诱导自我吞噬，细胞内的囊泡运输，上皮细胞再生以及产生抗菌肽，从而影响了微生物菌群的组成。上皮NOD1蛋白调节孤立淋巴滤泡产生C-C类趋化因子20（CCL20），对肠道细菌定殖稳态至关重要。

上皮PRRS对于消除病原菌感染是同样重要的。上皮细胞表达的炎性体形成NLR家族CARD结构域包含蛋白4（NLRC4），是鞭毛蛋白和细菌分泌系统的传感器，促进感染的肠上皮细胞脱落，从而有助于消除肠道病原体。NLRC4也保护宿主免受肠道癌变，这为统一的模型提供了证据，在这个模型中上皮NLRC4通过识别并去除已经受到损害的细胞来保护上皮细胞层。

肠上皮细胞中的NACHT-、LRR-和PYD-结构域包含蛋白NLRP6信号是由肠腔中的氨基酸和多胺水平来调节的。通过产生

炎性白细胞介素(IL)-18和下游抗菌肽的表达调节宿主和微生物之间的界面，同时也控制杯状细胞分泌粘液。NLRP6不足导致微生物菌群的组成和功能紊乱，微生物生存环境发生改变，对肠道感染的易感性也增加。此外，NLRP6被描述为肠道抗病毒免疫调节剂，这表明它在控制微生物组中细菌和病毒部分可能的功能。

其他受体也整合微生物信号来调节IL-18的水平，包括羟基酸受体2（或G蛋白偶联受体109A），这是一个丁酸和烟酸的受体，其DNA感知干扰素诱导蛋白AIM2和NLRP3炎性成分。因此，这些受体的基因缺失导致肠道炎症、肿瘤和对肠道感染的易感性，这表明上皮IL-18在调节肠道宿主-微生物之间的核心作用。

有趣的是，微生物对肠上皮细胞的影响远远超出了这些细胞的传统免疫功能。共生定殖菌群可能在肠上皮细胞的代谢中起主要

作用。微生物产生的短链脂肪酸（SCFAs）为上皮细胞提供能量来源，它们影响耗氧和缺氧诱导因子（HIF）介导的上皮屏障防御。微生物代谢产物吲哚通过孕烷X受体（PXR；也被称为核受体亚族1组I成员2（NR1I2））促进屏障功能并增加胰高血糖素样肽-1（GLP-1）（一种对宿主代谢影响深刻的肠促胰岛素）的分泌。在肠上皮细胞，微生物诱导的TLR信号转导也通过生物钟的协调带动肠激素的产生，这是一个转录因子网络，可以有节奏地控制昼夜连续的细胞代谢活性。微生物本身在组成和功能上都有节律性的波动，这表明不同水平的微生物对固有免疫系统的影响可能是一天中明显波动的基础。

总的来看，肠上皮细胞将微生物信号整合到由粘液和抗菌肽组成的宿主-微生物协作界面，动态调节细胞代谢（图1）。

注：文章参考自：“The microbiome and innate immunity” Nature, 2016 (535): 65–74.



dorun
for the real health

dorun
for the real health

方法探讨

猪胃肠道内溶解氧的研究方法

用电极和膜进气质谱（membrane-inlet mass spectrometric）的方法测定麻醉后仔猪内脏中溶解氧的浓度。在肠道内观察到高浓度的氧气，十二指肠和空肠中接近空气中的氧饱和度。结合之前关于肠道内厌氧菌分布的研究结果可知，溶解氧浓度可能是决定猪肠道微生物菌群繁殖和组成的重要因素。猪肠道菌群的性质表明，猪内脏中溶解氧浓度可能大于胃内的溶解氧浓度。实验用微型溶解氧探针和便携式四极质谱仪的膜入口探针测量仔猪内脏中溶解氧的浓度。

dorun
for the real health

dorun
for the real health

dorun
for the real health



一、材料和方法

1、实验动物

选取3周龄的仔猪。以哺乳仔猪为对照动物。实验仔猪饲喂日粮6天，最初添加量100 g/d。仔猪麻醉后，做中线切口暴露胃肠道。在每个位点设置一个很小的切口（可以容纳探针的尖端）将氧气探头轻轻地插入到至少2厘米的长度（防止空气进入）。探头留在原位，直到达到稳定的读数(3分钟)。此外，还通过膜质谱法测定未断奶仔猪溶氧值的测量结果。

2、溶解氧的测量

微型溶解氧探头(Lazar研究实验室有限公司、美国)用零氧溶液、20°C和37°C饱和空气蒸馏水来校准(汉娜仪器,英国)。便携式四极质谱仪(HAL 100;Hiden analysis, Warrington, UK)具备膜入口探测器。由于溶解氧的测量受到硫化物离子的影响，所以同时用质谱仪测量硫化物的浓度(根据m/z 34的峰值)，从而对硫化物的干扰进行校正。

二、结果与分析

通过微型溶解氧探头测得在尚未断奶小猪胃中的溶解氧浓度为108 $\mu\text{mol/L}$ ，空肠前段188 $\mu\text{mol/L}$ ，随后结肠的中段逐渐下降到85 $\mu\text{mol/L}$ ，即从胃到结肠溶解氧呈现减少趋势。这一趋势在仔猪饲喂断奶饲料后中表现明确，胃肠道溶解氧从140 $\mu\text{mol/L}$ 下降到66 $\mu\text{mol/L}$ 。饲喂日粮后小猪后胃肠道的溶解

氧明显下降。不同饲料差别不明显，除了空肠和回肠端 ($P > 0.1$)。由于饮食对消化道内溶解氧浓度几乎没有影响，推断出这是由于生理上血流扩散的结果

仔猪肠道中高浓度的溶解氧使厌氧细菌无法存活，而在盲肠和结肠中厌氧菌的增殖明显。产甲烷菌很容易从动物的内脏和粪便中分离出来。兼性和耐氧菌的优势在猪小肠段中，可能与溶解氧浓度高和食糜流动快相关，而这些条件抑制了厌氧菌的繁殖。盲肠和结肠的氧浓度比胃中高得多，食糜流速大大降低。厌氧菌的存活可能取决于厌氧微粒的存在。有实验表明，在一种被激活的趋化因子培养基中同时成功地维持了好氧和厌氧细菌，但只有当氧气供应率接近兼性细菌的吸氧率时，厌氧生物的数量才得以稳定维持。当肠道模型系统中加入氧气，将严重影响实验数据。实验为肠道中好氧和厌氧微生物之间相互作用提供了新的见解。

dorun
for the real health

dorun
for the real health
肠精灵®

dorun
for the real health

守护肠道健康

肠精灵® 家族



肠优®

猪用益生菌发酵饲料



肠佳®

鸡用益生菌发酵饲料



肠悦®

肉鸡用益生菌发酵饲料



肠爽®

水产用益生菌发酵饲料



同碳酶分
Homocarbonyl
enzyme



合生发酵
Co-bio-fermentation
technology

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

dorun
for the real health

唯精 只为精健

更多資訊請撥打“真健康”電話：400-882-0888
或訪問 www.dorunbio.com

dorun
for the real health

dorun
for the real health

dorun
for the real health

dorun
for the real health

dorun
for the real health

北京都潤科技有限公司

地址：北京市海澱區中关村大街12號中國農科院作物研究所100081
電話：010-82158219 82158128 傳真：010-82158831

Beijing Dorun Science & Technology Co., Ltd

Add.: No. 303 Feed affiliated building in Chinese Academy of Agricultural Sciences,
12 ZhongGuanCun South Avenue, Haidian District, Beijing(100081)

Tel: 010-82158219 82158128 Fax: 010-82158831

dorun
for the real health

dorun
for the real health