

胃肠道微生物及其分子生态学技术研究进展

许波^{1,2,3,4} 杨富亚¹ 慕跃林^{1,2,3,4} 李俊俊^{1,2,3,4} 唐湘华^{1,2,3,4} 杨云娟^{1,2,3,4}
黄遵锡^{1,2,3,4*}

(1. 云南师范大学 生命科学学院 云南 昆明 650500)

(2. 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心 云南 昆明 650500)

(3. 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室 云南 昆明 650500)

(4. 云南师范大学 酶工程重点实验室 云南 昆明 650500)

摘要: 由于与人类健康和疾病密切相关, 胃肠道微生物研究已成为当今的热点研究领域。目前研究的分子手段已经从单纯的分析微生物群落结构组成, 发展到通过宏转录组学、宏蛋白质组和代谢组学等“组学”技术揭示胃肠道微生物群落的相应功能。本文结合我们的研究工作, 综述了国内外胃肠道微生物及其分子生态学技术的研究进展。

关键词: 胃肠道, 微生物, 分子生态, 技术

Molecular ecology applied to gastrointestinal tract microorganisms

XU Bo^{1,2,3,4} YANG Fu-Ya¹ MU Yue-Lin^{1,2,3,4} LI Jun-Jun^{1,2,3,4} TANG Xiang-Hua^{1,2,3,4}
YANG Yun-Juan^{1,2,3,4} HUANG Zun-Xi^{1,2,3,4*}

(1. School of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China)

(2. Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Kunming, Yunnan 650500, China)

(3. Key Laboratory of Yunnan for Biomass Energy and Biotechnology of Environment, Kunming, Yunnan 650500, China)

(4. Key Laboratory of Enzyme Engineering, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China)

Abstract: For health and disease, the gut microbial community of humans has received significant attention from researchers. The application of 16S rRNA-based molecular technology enables researchers to study the microbial composition in the gut ecosystem. Developments in “omics” approaches have made it possible to reveal the function of microbes in the gastrointestinal tract. In this paper, combined with our own findings, we summarized advances in molecular ecology applied to studying gastrointestinal tract microorganism.

Keywords: Gastrointestinal tract, Microorganism, Molecular ecology, Technology

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30960165, 31160229, 31360268)

*通讯作者: Tel: 86-871-65920830; Fax: 86-871-65920952; ✉: huangzunxi@163.com

收稿日期: 2013-01-27; 接受日期: 2013-03-07; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

动物胃肠道内存在大量微生物,它们与动物机体生理功能密切相关,被认为是地球上最为密集的微生物生态系统。这些微生物区系之间及微生物与动物宿主之间形成了相互依存、相互作用的不可分割的整体。正常状态下菌群和宿主之间相互交换能量物质、传递信息,对宿主有营养、免疫、刺激生长和生物颌颌等作用,在胃肠道系统中起重要作用^[1]。胃肠道中的内源性微生物类群在种类、数量和定位等方面保持相对稳定,形成了胃肠道的微生态平衡,是动物机体内环境中不可缺少的组成部分。最近由我国科学家参与完成的人体肠道宏基因组研究计划 (European metagenomics of the human intestinal tract, MetaHIT) 证明,人体肠道细菌群约有300万个基因,是人体基因数量的约150倍^[2]。这对诠释肠道细菌和人体健康的关系,研究肠道细菌在疾病发生中的作用,监控、预防、干预肠道细菌,开发新药都具有重要意义。因此,一个研究人体及动物胃肠道微生物的高潮正在兴起,本文将对胃肠道的微生物及其分子生态学研究技术进展做一综述。

1 胃肠道主要微生物类型

分子生物学研究表明,哺乳动物的胃肠道由高度复杂的微生物群落所组成,包括了细菌、古菌、真菌、原生动物和病毒。据估计,人类肠道中微生物的总数在 10^{12} – 10^{14} 之间,是宿主细胞数量的 10 倍^[3]。

细菌是动物胃肠道中最主要的微生物,基于多样本、高通量测序的研究表明^[2,4],成年人胃肠道中超过99%的基因都来自细菌,其中存在约1 000种主要的细菌类型,主要分布在Bacteroidetes和Firmicutes,而Actinobacteria、Proteobacteria和Verrucomicrobia是胃肠道菌群的次要组成成分。尽管不同研究中胃肠道微生物的主要组成是一致的,但其相对比例和存在物种在不同个体间却存在明显差异。虽然在成人胃肠道微生物菌群中找到了包括*Faecalibacterium prausnitzii*、*Roseburia intesti-*

*nalis*和*Bacteroides uniformis*在内的几种“核心”物种,但在一些个体中,这些“核心”物种所占比例不足0.5%^[2],而且这一差异在来自不同国家、不同年龄个体间也同样存在^[5],因此要定义胃肠道微生物群落中存在“核心”物种已越来越不现实。

利用荧光原位杂交技术 (FISH) 对人类的研究表明^[6],真菌在粪便菌群中所占比例不足0.3%。与传统培养方法的研究相比,Scanlan和Marchesi利用未培养技术发现人类末端肠道中存在更为多样的真菌物种,包括*Saccharomyces*、*Gloeotinia*、*Penicillium*、*Candida*和*Galactomyces*^[7]。类似的真菌类型如*Candida*、*Cladosporium*、*Penicillium*和*Saccharomyces*在患有炎症性肠病病人及作为参照的健康人的粪便样品中也检测到的^[6]。

细菌在动物胃肠道生态系统中占有绝对优势,也是目前的主要研究对象,但其它不占优势的肠道微生物也会对宿主和其它菌群产生重要影响。例如甲烷菌 (主要是*Methanobrevibacter smithii*) 是存在人胃肠道中典型的古菌代表,位于多糖加工代谢链中最后一环,可以消耗氢气从而激活环境,促进多糖发酵细菌的生长,因此对维持肠道内环境的稳定性和菌落的多样性具有重要意义^[8-9]。

最近对人类粪便中病毒DNA的宏基因组分析发现^[10],大量可识别的序列都属于噬菌体。利用溶原性和复制,噬菌体会通过调节人类胃肠道微生物群落从而影响食物消化,噬菌体也可能通过控制入侵的病原体而有助于人类健康,因此非细胞形态的噬菌体也是肠道生态系统中不可忽视的要素。

2 胃肠道菌群分布

细菌存在于人类的整个胃肠道系统中,然而由于消化道不同部位pH、存在的免疫因子和消化酶类等存在差异,使其中微生物的数量和组成有所差异^[11]。胃内的酸性环境极大地抑制了微生物的繁殖,减少了进入小肠的微生物数目,除了幽门螺杆菌或相关的菌种外,大多数是耐酸性的需氧或兼性厌氧菌,如链球菌、葡萄球菌、乳酸杆菌和念珠菌

等,细菌浓度通常 $<10^4$ CFU/mL。通过胃以后,由于胆碱的作用,十二指肠的微生物相对较少,含菌浓度为 10^3 – 10^4 CFU/mL,主要菌种与胃的相似,是革兰氏阳性的需氧菌或兼性厌氧菌,包括链球菌、葡萄球菌和乳酸杆菌。十二指肠之后进入空肠,随着肠段的延续,细菌数量不断增加,含菌浓度为 10^3 – 10^5 CFU/mL。乳酸杆菌和双歧杆菌是小肠的最优势菌,其次为消化球菌、肠杆菌、小梭菌和葡萄球菌,而且小肠前段细菌少,后段数量逐渐增加。在远端回肠中,革兰氏阴性菌开始超过革兰氏阳性菌,经常存在大肠杆菌类和厌氧菌,含菌浓度为 10^7 – 10^8 CFU/mL。盲肠和结肠是食物停滞的主要部位,细菌浓度迅速增加,达到 10^{10} – 10^{11} CFU/mL,优势菌为严格厌氧菌,主要的菌种是拟杆菌、真杆菌、双歧杆菌以及厌氧的革兰氏阳性球菌。

3 胃肠道菌群的来源及变化

哺乳动物天生是无菌的,但随着出生人类胃肠道开始有外来微生物栖息并定殖。研究表明,胃肠道微生物的组成在出生后一年内就已建立^[12],而出生时暴露于环境的方式及直接接触的微生物可以影响肠道菌群的发展。胎儿胃肠道在子宫内是无菌的,如何暴露于环境由生产方式决定。证据表明,阴道分娩婴儿的肠道菌群与母亲阴道的菌群相似^[13],而剖宫产婴儿与阴道分娩婴儿的肠道微生物组成却不相同^[14]。针对婴儿进行的研究表明,其胃肠道中占主导地位的菌群是 Proteobacteria、Bacteroidetes、Firmicutes、Actinobacteria 和 Verrucomicrobia^[12,15]。

新生儿出生 1–2 d 内,兼性厌氧菌(大肠杆菌和链球菌)迅速定殖于胃肠道中,并达到每克粪便 10^8 – 10^{10} ,而厌氧微生物直到出生后第 2 个月才开始出现^[16]。出生 6 个月时,人的粪便微生物就以 Bacteroidetes 和 Firmicutes 为主,Proteobacteria 和需氧革兰氏阴性菌的丰度一般较低^[12]。在出生后的第一年内,肠道菌群初步建立,并因不同个体及时间变化而有所差异^[13]。此外,不同的喂养方式

也会影响到婴儿的肠道菌群,母乳喂养使婴儿胃肠道中以 Bifidobacteria 为主,而奶瓶喂养使其肠道菌群组成更多样,包括了 Bacteroidetes 和 Clostridia^[17]。一年以后,婴儿的肠道菌群就与成人相似并保持稳定,当然也可能会受到饮食、用药等影响而发生短暂的变化。进入老年后,人类胃肠道微生物中 Bifidobacterium 和 Lactobacillus 的数量和多样性会降低,而 Bacteroidetes 和 Clostridia 会增加^[18]。

4 胃肠道微生物研究的分子方法

4.1 测序方法

4.1.1 16S rRNA 全长基因测序:在生物进化的漫长过程中,rRNA 分子保持相对恒定的生物学功能和保守的碱基排列顺序,同时也存在着与进化过程相一致的突变率,被认为是细菌系统分类学研究中最有用和最常用的分子钟。该技术的基本原理是利用微生物样本中的 16S rRNA 基因片段,通过克隆、构建文库后测序获得 16S rRNA 基因序列信息,通过与数据库中的序列进行比较,确定其在进化树中的位置,从而鉴定样本中可能存在的微生物种类。应用此方法,人、猪、牛、马、羊、老虎、禽类和非人灵长类等多种动物的胃肠道微生物多样性得到了研究^[4,19–28]。其中,2005 年 Eckburg 等利用 16S rRNA 全长基因测序法(Sanger 测序),通过分析 13 355 条 rRNA 基因序列,对健康人类的胃肠道微生物多样性进行了首次深入而系统的研究^[4],为进一步研究其在人类健康和疾病方面的作用奠定了基础。然而,研究中所采用分子手段(如核苷酸的提取及 PCR 所用引物、条件等)的不统一,使得难以将不同研究获得的数据进行比较分析,此外还存在着由克隆及 PCR 所带来的实验偏向性。

动物胃肠道存在着大量的微生物群落,构成了动物消化道微生物区系,这些微生物群落是动物长期进化的结果。非人灵长类动物与人类在系统进化上关系较近,因此研究其胃肠道微生物组成对于进一步认识和了解人类及其胃肠道微生物的进化具

有重要意义,然而目前对非人灵长类动物胃肠道微生物的研究较少,且主要集中在猩猩等高等灵长类动物^[26-27]。因此,本实验室采用 16S rRNA 基因测序法对一种低等灵长类动物——倭蜂猴的肠道菌群多样性首次进行了研究^[28],在其粪便中发现了大量尚未鉴定的细菌。

4.1.2 焦磷酸测序(Pyrosequencing): Sanger 测序用于微生物群落研究最大的限制就是速度慢、通量低、成本高,Pyrosequencing 技术是其通量的 100 倍,一次测序运行 4 h 即可获得 2.5×10^7 碱基的数据量,测序准确性达 99% 以上^[29]。该技术通过扩增微生物菌群的小亚基核糖体 RNA (SSU rRNA) 基因或 16S rRNA 基因的可变区域,然后对 PCR 产物直接测序,省去了传统 16S rRNA 全长基因测序所需的耗时的文库构建步骤,并采用 Bar-coded 引物,因此大大拓宽了测序的深度(每个样本测序获得的数据量)和宽度(一次测序运行中可同时测序的样本数目),使动物胃肠道复杂微生物群落的研究更为深入。同时,也使同等测序条件下完成多样本间的测序,并进行比较分析成为可能。

2009 年,Turnbaugh 等运用 454 技术对 154 例肥胖和瘦的双胞胎胃肠道菌群进行了比较研究^[30],通过对 16S rRNA 基因的 V2 和 V6 区测序发现,肠道菌群的组成个体差异性非常大,肥胖人群的肠道菌群在多样性上低于非肥胖人群。2010 年,Yildirim 等对 3 种非人灵长类动物粪便样品的 SSU rRNA 进行 Pyrosequencing 测序^[31],结果表明同种灵长类动物间微生物群落的组成比不同种灵长类动物间更为相似。应用 454 技术 Middelbos 等对不同饮食喂养的狗粪便微生物 16S rRNA 基因的 V3 区测序发现^[32],胃肠道微生物组成受到宿主饮食摄入的影响,喂食纤维类食物会使微生物群落中 Fusobacteria 的数量降低,而 Firmicutes 的数量增加。2011 年,Nam 等采用 454-pyrosequencing 技术对 20 名健康韩国人胃肠道微生物进行了 16S rRNA 基因 V1-V3 区的测序^[33],结果发现了 43 种

核心的韩国人胃肠道微生物菌群,同美国、日本和中国人胃肠道微生物的比较表明,人类肠道菌群的组成具有国别差异。通过分析 454 测序获得的 16S rRNA 基因的 V4-V5 区,Steelman 等研究了马粪便样品中微生物的多样性^[34],发现患有慢性蹄叶炎的马的粪便菌群多样性更高。2012 年,Wang 等通过对健康人体和结肠直肠癌患者肠道细菌 16S rRNA 基因的 V3 区测序发现^[35],丁酸生产菌的减少和条件致病菌的增加是人类结肠直肠癌患者肠道菌群的一个显著特征。

虽然高通量的测序技术为胃肠道微生物多样性的研究方法带来了变革,并取得了很多研究成果,但是由于其测序的样本是 PCR 扩增产物,而 PCR 过程所用的“通用引物”并不能对所有微生物进行等效扩增,因此仍存在一定的偏向性。

4.2 指纹图谱(Fingerprinting)技术

4.2.1 变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE): 其原理是在碱基序列上存在差异的不同等长 DNA(例如 16S rDNA)在同一含有变性剂的凝胶中进行电泳,会表现不同的电泳速度,因此通过对 DNA 染色可将不同的 DNA 区分开。1993 年,Muyzer 及其同事首先将 DGGE 应用到分子微生物生态学领域^[36],并证实了这种技术在揭示自然界微生物区系的遗传多样性和种群差异方面具有独特的优越性。此后,该方法及类似的几种技术,如 TGGE (Temperature gradient gel electrophoresis)、TTGE (Temporal temperature gradient gel electrophoresis)被广泛地应用于人、猪、牛、狗、鼠和鸡等动物胃肠道微生物系统的研究^[37-42]。

4.2.2 末端限制性片段长度多态性分析(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP): 其原理是采用一端荧光标记的引物进行 PCR,扩增全长 16S rRNA 基因,然后用合适的限制性内切酶消化 PCR 产物,由于不同菌的 16S rRNA 基因序列存在差异,因此酶切后会产生不同长度特征的限制性片段^[43]。酶切后的产物用 DNA 测序仪进行分析,通过扫描得到含有荧光标记的片

段,而没有标记荧光的片段没有办法识别,所以没有显示。图谱中波峰的多少表明了群落的复杂程度,峰面积的大小代表该片段的丰度,最后通过分析揭示微生物的群落结构、功能及动态变化。虽然该技术应用相对较少,但已被证明是一种监测胃肠道微生物群落的有用的指纹图谱技术^[44-45]。

4.2.3 核糖体基因间隔区分析(Ribosomal intergenic spacer analysis, RISA): 该技术虽然早以被用于环境复杂微生物群落的生态研究,但是在胃肠道微生物领域的应用却相对较新^[46-47]。其原理是通过PCR扩增16S与23S核糖体亚基之间的转录间隔区(Intergenic spacer, IGS),由于该片段比核糖体大小亚基DNA表现出更明显的长度特异性,因此可以在变性的条件下用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,从而形成微生物群落特异性长度多态性图谱^[48]。

4.3 基因芯片技术(DNA microarrays)

它是在分子杂交技术基础上发展起来的一种新型分子生物学技术,采用光导原位合成或微量点样等方法,将大量DNA探针如基因、PCR产物、人工合成的寡核苷酸等有序地固定在载体表面,形成储存有大量信息的高密度DNA微阵列。该微阵列与标记的核酸样品杂交后,能快速、准确、大规模地获取样品核酸序列信息,从而应用于各种生态系统的菌群研究。2002年,Wang等较早设计DNA芯片应用于胃肠道微生物系统的研究^[49],事实证明该技术在胃肠道微生物中的应用越来越广泛和深入。Palmer等^[12,50]在研究人类结肠和胃微生物生态系统时,所设计芯片中的探针能检测到359个微生物物种和316个新的OTUs。最近由Paliy等制备出的基因芯片则更为灵敏,可检测出人类肠道中775个微生物物种^[51]。

4.4 FISH和qPCR

4.4.1 荧光原位杂交技术(Fluorescent in situ hybridization, FISH): 荧光原位杂交技术是常用的以小亚基rRNA为目标的定量环境样品中细菌的免培养技术,根据已知微生物不同分类级别上种群特异的DNA序列,以利用荧光标记的特异寡聚核苷

酸片段作为探针,与环境基因组中DNA分子杂交,从而检测该特异微生物种群的存在与丰度。目前该技术已越来越多地被应用于胃肠道微生物组成的研究,所获得的一些探针已经能用于对胃肠道中的*Bacteroides*、*Fibrobacter*、*Bifidobacterium*、*Streptococcus*、*Lactobacillus*、*Collinsella*、*Eubacterium*、*Fusobacterium*、*Clostridium*、*Veillonella*和*Ruminococcus*^[52-58]等多个属的细菌进行定量。应用此技术,一组15个的FISH探针就能够检测到约90%的人类常规肠道微生物^[53]。

4.4.2 实时荧光定量PCR技术(Real-time quantitative PCR, qPCR): 该技术是指在PCR反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个PCR过程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。该技术与其它分子生物学技术相结合,可以定性、定量的研究微生物区系的变化,深入了解微生物菌群与环境之间的相互作用及其动态变化过程,为全面、快速、准确分析鉴定复杂环境中微生物菌群提供了一种新的技术手段。目前,该技术已成功应用于鉴定来自牛瘤胃、人、猪和老鼠等的样本^[59-62]。

4.5 着眼于功能的“组学”技术

基于胃肠道细菌群落组成和数量的研究,促进了我们对胃肠道中丰富微生物多样性的认识。然而,微生物的组成和其功能紧密相关,上述研究方法仅能为胃肠道环境中微生物群落的生理功能及其地位提供非常有限的信息。因此,采用更为有效的方法,全面了解胃肠道微生物组的生态和功能,对于评价胃肠道微生物功能对其宿主的贡献至关重要。

4.5.1 宏基因组学(Metagenomics): 宏基因组是指环境样品中微生物群落的基因组总和,既包含了可培养的又包含了未可培养的微生物基因。该技术不依赖于特定基因的克隆和测序,而是对存在于某一特定微生物群落中所有基因的研究,同时着眼于微生物群落的结构组成和功能。在宏基因组学研究中,借助于大规模测序和生物信息学分析,能够发

现大量过去无法得到的未知微生物新基因或新的基因簇,这对于了解胃肠道微生物的群落组成、进化历程和代谢特点,挖掘具有应用潜力的新基因具有重要意义。近年来,随着第二代测序技术的发展,宏基因组技术开始被应用于人类^[2,30,63-64]及鸡、狗、猪、猫和骆驼^[65-69]等动物的胃肠道微生物群落结构和功能研究。

2006年, Gill等^[63]首次对两个健康人的微生物宏基因组进行了比较,并提出了“Superorganism”的概念。Kurokawa等^[64]分析来自成人、儿童和婴儿的13个肠道微生物组发现,婴儿的微生物组在基因组成和功能上表现出显著的个体间变异,而成人和断奶儿童的微生物组则表现出高水平的功能冗余性,从而为人类胃肠道中存在“核心微生物组”提供了证据。这些结果后来被Turnbaugh等证实^[30],他们对一组肥胖和瘦的双胞胎的微生物组研究证明,健康个体间存在有一系列的“核心”基因。2010年, MetaHIT项目组发表了从124位健康、超重和肥胖的成年人以及炎症患者提取的人肠道微生物菌落的基因目录^[2],根据由这些基因所编码的各种不同功能,研究人员有可能确定最小的肠道宏基因组和最小的肠道细菌基因组。

本实验室以低等灵长类动物倭蜂猴为研究对象,通过宏基因组随机测序对其肠道微生物结构组成及其潜在功能进行了研究^[70],结果在倭蜂猴粪便中鉴定出了更为丰富的微生物类群和物种;同时,比较宏基因组研究发现,虽然倭蜂猴和小鼠肠道系统的功能有差异,但其微生物群落结构确最为相似,并在倭蜂猴中发现了相对高丰度和多样性的芳香族化合物代谢系统,上述研究充分证明了宏基因组学技术在研究胃肠道环境中微生物群落组成及其生理功能方面比传统的分子生态学研究方法更全面和有效。

4.5.2 宏转录组学(Metatranscriptomics): 随着宏基因组学的发展,越来越多的动物胃肠道微生物宏基因组测序已完成,但随之而来的问题是基因功能

无法获知,基因调控和基因间互作不清楚。虽然 mRNA 不是基因表达的最终产物,但转录是最开始的一步,研究转录组信息有助于理解基因调控网络。因此,在挖掘微生物所有基因的同时,更应注重其基因功能的分析。宏转录组学是在宏基因组学之后兴起的一门新学科,是针对所有微生物细胞产生的全部转录本或 mRNA 而提出的术语,也是目前应用于动物胃肠道微生物群落研究最新的“组学”技术之一。其研究方法类似于宏基因组学,同样是依赖于高通量的测序技术,但是测序的对象不同,宏基因组学针对的是 DNA,而宏转录组学的测序对象是 RNA。

Gosalbes等对10名健康志愿者的肠道微生物进行了宏转录组研究^[71],16S转录本的分析表明 Lachnospiraceae、Prevotellaceae、Ruminococcaceae、Bacteroidaceae和Rickenellaceae是活性微生物中占优势的群落,同时也揭示了肠道微生物的主要功能是碳水化合物代谢、能量生成及细胞成分合成。利用高通量的Illumina测序平台,Xiong等^[72]对老鼠盲肠样本的微生物RNA进行了测序,高达16%的Reads序列可与已知的细菌基因相匹配,系统发育分析表明 *Bacteroides* 或 *Clostridium* 是其中的优势微生物。

4.5.3 宏蛋白组学(Metaproteomics): 宏蛋白质组学是对给定位点的环境微生物群落的所有蛋白质组成进行的即时的大规模的分析,近年来开始被用于分析人类肠道微生物的复杂蛋白质组^[73-75]。2007年,宏蛋白质组学第一次应用于婴儿肠道排泄物的微生物谱系研究^[73]。2009年, Verberkmoes 等运用非定向的“鸟枪法”评估人类胃肠道中宏蛋白质组的多样性和丰度^[74],将来自不同粪便样品的宏蛋白组和宏基因组^[63]研究结果进行比较发现,人类粪便样品中鉴定出的蛋白质与用宏基因组方法所预测的蛋白质明显不同,从而说明功能基因的分析与基因表达水平之间不存在必然联系。利用一个全面的宏蛋白组研究工作流程和鉴定平台, Kolmeder 等对 3

个健康个体肠道微生物宏蛋白组的组成和时间稳定性进行了持续研究^[75],通过比较发现人类粪便微生物的宏蛋白组具有个体特异性并且在一年内保持稳定,在每个个体中都鉴定出约 1 000 种稳定的核心蛋白质,说明存在一个与碳水化合物的转运、降解相关的功能核心;此外,同一样本的宏蛋白组和微生物组成聚类的高度相似也说明,个体的微生物组成决定了其不同的微生物功能活性。

4.5.4 代谢组学(Metabolomics): 代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后应运而生并得以发展起来的,同时进行定性和定量分析某一生物或细胞在某一特定生理时期内所有低分子量代谢产物(MW<1 000)的一门新学科^[76]。基因组学、转录组学和蛋白质组学分别从 DNA、mRNA 和蛋白质层面探寻生命的活动,而实际上细胞内许多生命活动是发生在代谢物层面的,如细胞信号释放、能量传递和细胞间通信等都受代谢物的调控^[77]。结合肠道微生物的宏基因组指纹,Li 等应用基于 ¹H NMR 的代谢组学方法研究了人体尿液的代谢物^[78],发现胃肠道中普遍、占优势的微生物 *Faecalibacterium prausnitzii* 与 8 种尿液代谢物密切相关,并参与了许多系统代谢途径。2009 年,代谢组学被用于研究小鼠肠道菌群对血液代谢产物的影响,表明肠道菌群对宿主代谢产生复杂的系统性影响^[79]。

可见,用于动物胃肠道微生物研究的分子生态学方法很多,应根据用于研究的样本类型、具体的研究目的以及研究条件等选择适合的方法(图 1)。当然,如果能以 16S rRNA 基因为对象的核苷酸研究方法与蛋白质组学、转录组学和代谢组学等技术结合起来,将能更好的研究特定微生物在胃肠道生态系统中的真正地位或功能,这也正是生态学研究的目标。

5 展望

由于与人类的健康和疾病密切相关,胃肠道微生物生态研究已成为当今的前沿领域,并且从单纯的微生物群落结构研究逐步过渡到功能研究,采用的方法也从基于 16S rRNA 基因的相关技术逐步转变为着眼于宏观层面的多种“组学”技术。然而,要想深入了解胃肠道生态系统中特定微生物的实际地位或作用,及其对整个代谢过程的具体贡献,从而实现肠道菌群与宿主间的“Cross-talk”,仅仅关注胃肠道微生物群落的结构组成和功能还远远不够。只有彻底弄清二者在更深层面的互作机制,才能最终为预防或治疗人类的某些疾病提供有力的策略。当然,这一目标的最终实现离不开包括细胞生物学家、免疫学家、功能基因组学和生物信息学专家以及应用数学家等在内的多个领域研究者的共同参与和努力。

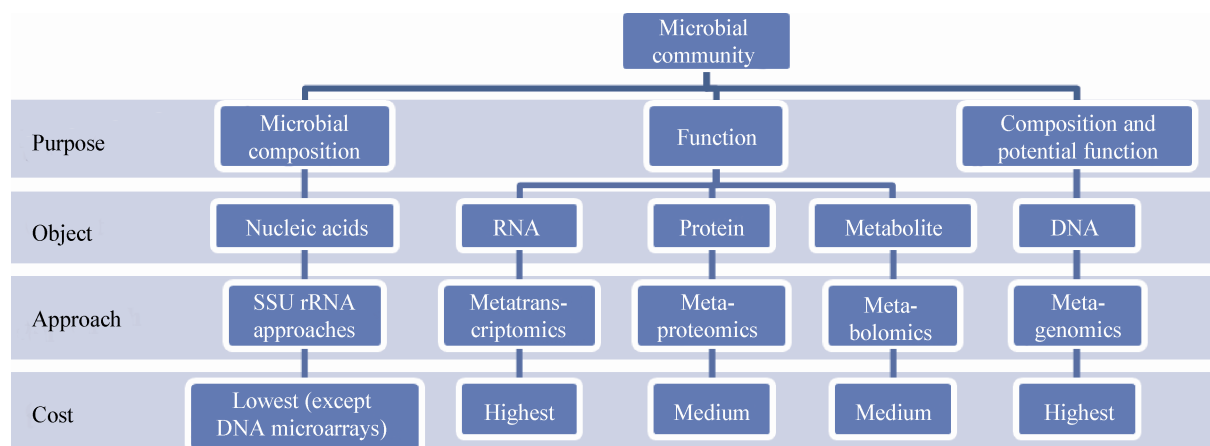


图 1 胃肠道微生物研究方法比较

Figure 1 Comparison of the approaches of the gastrointestinal tract microbiota

参 考 文 献

- [1] Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(5): 431-438.
- [2] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing[J]. *Nature*, 2010, 464(7285): 59-65.
- [3] Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine[J]. *Cell*, 2006, 124(4): 837-848.
- [4] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal flora[J]. *Science*, 2005, 308(5728): 1635-1638.
- [5] Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography[J]. *Nature*, 2012, 486(7402): 222-227.
- [6] Ott SJ, Kuehbach T, Musfeldt M, et al. Fungi and inflammatory bowel diseases: alterations of composition and diversity[J]. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2008, 43(7): 831-841.
- [7] Scanlan PD, Marchesi JR. Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces[J]. *The ISME Journal*, 2008, 2(12): 1183-1193.
- [8] Stocchi A, Furne JK, Ellis CJ, et al. Competition for hydrogen by human faecal bacteria: evidence for the predominance of methane producing bacteria[J]. *Gut*, 1991, 32(12): 1498-1501.
- [9] Stocchi A, Furne J, Ellis C, et al. Methanogens outcompete sulphate reducing bacteria for H₂ in the human colon[J]. *Gut*, 1994, 35(8): 1098-1101.
- [10] Reyes A, Haynes M, Hanson N, et al. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers[J]. *Nature*, 2010, 466(7304), 334-338.
- [11] Ouwehand A, Vesterlund S. Health aspects of probiotics[J]. *Idrugs*, 2003, 6(6): 573-580.
- [12] Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, et al. Development of the human infant intestinal microbiota[J]. *PLoS Biology*, 2007, 5(7): e177.
- [13] Mandar R, Mikelsaar M. Transmission of mother's microflora to the newborn at birth[J]. *Biology of the Neonate*, 1996, 69(1): 30-35.
- [14] Huurre A, Kalliomaki M, Rautava S, et al. Mode of delivery: effects on gut microbiota and humoral immunity[J]. *Neonatology*, 2008, 93(4): 236-240.
- [15] Koenig JE, Spor A, Scalfone N, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(S1): 4578-4585.
- [16] Thompson-Chagoyán OC, Maldonado J, Gil A. Colonization and impact of disease and other factors on intestinal microbiota[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2007, 52(9): 2069-2077.
- [17] Penders J, Vink C, Driessen C, et al. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 243(1): 141-147.
- [18] Mueller S, Saunier K, Hanisch C, et al. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(2): 1027-1033.
- [19] Hold GL, Pryde SE, Russell VJ, et al. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 39(1): 33-39.
- [20] Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, et al. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(2): 673-690.
- [21] 毛华明, 马松成, 陈静, 等. 大额牛瘤胃细菌16S rRNA 基因序列分析[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(11): 3769-3775.
- [22] Daly K, Stewart CS, Flint HJ, et al. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 38(2/3): 141-151.
- [23] Koike S, Yoshitani S, Kobayashi Y, et al. Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 229(1): 23-30.
- [24] 图雅, 朱伟云, 陆承平. 东北虎粪细菌区系16S rRNA 基因序列分析[J]. *微生物学报*, 2005, 45(5): 671-674.
- [25] Lu J, Domingo JS. Turkey fecal microbial community structure and functional gene diversity revealed by 16S rRNA gene and metagenomic sequences[J]. *Journal of Microbiology*, 2008, 46(5): 469-477.
- [26] Frey JC, Rothman JM, Pell AN, et al. Fecal bacterial diversity in a wild gorilla[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3788-3792.
- [27] Uenishi G, Fujita S, Ohashi G, et al. Molecular analyses of the intestinal microbiota of chimpanzees in the wild and in captivity[J]. *American Journal of Primatology*, 2007, 69(4): 367-376.
- [28] Xu B, Huang ZX, Wang XY, et al. Phylogenetic analysis of the fecal flora of the wild pygmy loris[J]. *American Journal of Primatology*, 2010, 72(8): 699-706.
- [29] Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors[J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 376-380.
- [30] Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins[J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 480-484.
- [31] Yildirim S, Yeoman CJ, Sipos M, et al. Characterization of the fecal microbiome from non-human wild primates reveals species specific microbial communities[J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e13963.
- [32] Middelbos IS, Vester Boler BM, Qu A, et al. Phylogenetic characterization of fecal microbial communities of dogs fed diets with or without supplemental dietary fiber using 454 pyrosequencing[J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9768.
- [33] Nam YD, Jung MJ, Roh SW, et al. Comparative analysis of Korean human gut microbiota by barcoded

- pyrosequencing[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e22109.
- [34] Steelman SM, Chowdhary BP, Dowd S, et al. Pyrosequencing of 16S rRNA genes in fecal samples reveals high diversity of hindgut microflora in horses and potential links to chronic laminitis[J]. BMC Veterinary Research, 2012, 8: 231.
- [35] Wang T, Cai G, Qiu Y, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers[J]. The ISME Journal, 2012, 6(2): 320-329.
- [36] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.
- [37] Zoetendal EG, Akkermans ADL, de Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3854-3859.
- [38] Konstantinov SR, Zhu WY, Williams BA, et al. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 43(2): 225-235.
- [39] Kocherginskaya S, Aminov RI, White BA. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches[J]. Anaerobe, 2001, 7(3): 119-134.
- [40] Simpson JM, Martineau B, Jones WE, et al. Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber[J]. Microbial Ecology, 2002, 44(2): 186-197.
- [41] Deplancke B, Hristova KR, Oakley HA, et al. Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 2166-2174.
- [42] Zhu XY, Zhong T, Pandya Y, et al. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(1): 124-137.
- [43] Osborn AM, Moore ER, Timmis KN. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics[J]. Environmental Microbiology, 2000, 2(1): 39-50.
- [44] Kaplan CW, Astaire JC, Sanders ME. 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment pattern analysis of bacterial communities in faeces of rats fed *Lactobacillus acidophilus* NCFM[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1935-1939.
- [45] Nagashima K, Hisada T, Sato M, et al. Application of new primer-enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial populations in human feces[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2): 1251-1262.
- [46] Banks JC, Cary SC, Hogg ID. The phylogeography of Adelie penguin faecal flora[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(3): 577-588.
- [47] Jami E, Mizrahi I. Similarity of the ruminal bacteria across individual lactating cows[J]. Anaerobe, 2012, 18(3): 338-343.
- [48] Fisher MM, Triplett EW. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(10): 4630-4636.
- [49] Wang RF, Beggs ML, Robertson LH, et al. Design and evaluation of oligonucleotide- microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 213(2): 175-182.
- [50] Palmer C, Bik EM, Eisen MB, et al. Rapid quantitative profiling of complex microbial populations[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(1): e5.
- [51] Paliy O, Kenche H, Abernathy F, et al. High-throughput quantitative analysis of the human intestinal microbiota with a phylogenetic microarray[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(11): 3572-3579.
- [52] Schwiertz A, Le Blay G, Blaut M. Quantification of different *Eubacterium* spp. in human fecal samples with species-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 375-382.
- [53] Harmsen HJ, Raangs GC, He T, et al. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(6): 2982-2990.
- [54] Zoetendal EG, Ben-Amor K, Harmsen HJM, et al. Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in human fecal samples by fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4225-4232.
- [55] Rigottier-Gois L, Rochet V, Garrec N, et al. Enumeration of Bacteroides species in human faeces by fluorescent in situ hybridization combined with flow cytometry using 16S rRNA probes[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2003, 26(1): 110-118.
- [56] Cilieborg MS, Boye M, Mølbak L, et al. Preterm birth and necrotizing enterocolitis alter gut colonization in pigs[J]. Pediatric Research, 2011, 69(1): 10-16.
- [57] Bezirtzoglou E, Tsiotsias A, Welling GW. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH)[J]. Anaerobe, 2011, 17(6): 478-482.
- [58] Gómez-Gallego C, Collado MC, Ilo T, et al. Infant formula supplemented with polyamines alters the intestinal microbiota in neonatal BALB/cOlaHsd mice[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2012, 23(11): 1508-1513.
- [59] Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, et al. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(6): 2766-2774.
- [60] Collier CT, Smiricky-Tjardes MR, Albin DM, et al. Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters[J]. Journal of

- Animal Science, 2003, 81(12): 3035-3045.
- [61] Delroisse JM, Boulvin AL, Parmentier I, et al. Quantification of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in rat fecal samples by real-time PCR[J]. Microbiological Research, 2008, 163(6): 663-670.
- [62] 丁俊荣, 张秋香, 刘小鸣, 等. 江苏无锡健康与肠病人群肠道脱硫弧菌数量及肠道菌群多样性[J]. 微生物学报, 2012, 52(8): 1033-1039.
- [63] Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome[J]. Science, 2006, 312(5778): 1355-1359.
- [64] Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, et al. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes[J]. DNA research, 2007, 14(4): 169-181.
- [65] Qu A, Brulc JM, Wilson MK, et al. Comparative metagenomics reveals host specific metaviromes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome[J]. PLoS One, 2008, 3(8): e2945.
- [66] Swanson KS, Dowd SE, Suchodolski JS, et al. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice[J]. The ISME Journal, 2011, 5(4): 639-649.
- [67] Lamendella R, Domingo JW, Ghosh S, et al. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut[J]. BMC Microbiology, 2011, 11: 103.
- [68] Tun HM, Brar MS, Khin N, et al. Gene-centric metagenomics analysis of feline intestinal microbiome using 454 junior pyrosequencing[J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 88(3): 369-376.
- [69] Bhatt VD, Dande SS, Patil NV, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiome in the forestomach fluid from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*)[J]. Molecular Biology Reports, 2013, DOI 10.1007/s11033-012-2411-4.
- [70] Xu B, Xu W, Yang F, et al. Metagenomic analysis of the pygmy loris fecal microbiome reveals unique functional capacity related to metabolism of aromatic compounds[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56565.
- [71] Gosalbes MJ, Durbán A, Pignatelli M, et al. Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17447.
- [72] Xiong X, Frank DN, Robertson CE, et al. Generation and analysis of a mouse intestinal metatranscriptome through Illumina based RNA-sequencing[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e36009.
- [73] Klaassens ES, de Vos WM, Vaughan EE. Metaproteomics approach to study the functionality of the microbiota in the human infant gastrointestinal tract[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(4): 1388-1392.
- [74] Verberkmoes NC, Russell AL, Shah M, et al. Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota[J]. The ISME Journal, 2009, 3(2): 179-189.
- [75] Kolmeder CA, de Been M, Nikkilä J, et al. Comparative metaproteomics and diversity analysis of human intestinal microbiota testifies for its temporal stability and expression of core functions[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e29913.
- [76] Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, et al. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data[J]. Trends in Biotechnology, 2004, 22(5): 245-252.
- [77] Wang QZ, Wu CY, Chen T, et al. Integrating metabolomics into a systems biology framework to exploit metabolic complexity: strategies and applications in microorganisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(2): 151-161.
- [78] Li M, Wang B, Zhang M, et al. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(6): 2117-2122.
- [79] Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(10): 3698-3703.