

研究报告

白族成年人肠道菌群多样性研究

黄卫强 张家超 郑艺 乔健敏 张和平*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:【目的】通过研究云南白族成年人肠道菌群群落结构,探索肠道菌群结构与云南白族人健康长寿的相互关系。【方法】以43份采自云南省昆明市(Urban)和大理白族自治州洱源县农村(Rural)成年白族志愿者的粪便样品为研究对象,通过种属特异性聚合酶链式反应(定性PCR)和基于聚合酶链式反应的变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)对其中的优势菌群进行了分析,并测定样品中短链脂肪酸(SCFAs)含量。【结果】短链脂肪酸(SCFAs)含量测定结果显示,Rural和Urban志愿者的短链脂肪酸含量差异不显著;定性PCR结果显示Rural志愿者肠道内的乳杆菌属和双歧杆菌属的多样性明显区别于Urban志愿者;依据泳道轨迹光密度的不同对16S rRNA基因V3区PCR-DGGE图谱进行基于非加权平均距离聚类分析(Unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA),显示两组样品按照组别明显地聚为两簇,多样性指数分析也呈现Rural志愿者肠道菌群多样性大于Urban的趋势;进一步对Rural谱带回收克隆测序,并构建系统发育树图,结果显示样品中双歧杆菌属、肠杆菌属和肠球菌属具有较高的多样性,是Rural健康成年志愿者肠道中的优势菌群。【结论】综合上述分析,昆明城市志愿者和大理白族自治州洱源县农村志愿者肠道菌群群落结构呈现区分趋势,多样性差异不显著。该研究为后续探索宿主肠道菌群与健康长寿的相互关系提供了数据基础。

关键词:白族, 肠道菌群, 短链脂肪酸, 种属特异性聚合酶链式反应, 基于聚合酶链式反应的变性梯度凝胶电泳

The diversity of gut microbiota of Bai ethnic group

HUANG Wei-Qiang ZHANG Jia-Chao ZHENG Yi QIAO Jian-Min
ZHANG He-Ping*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: [Objective] This study chose healthy adult volunteers of Bai ethnic group at Yunnan Province as the research object, investigating the relationship between the structural intestinal flora and human health. [Methods] This study recruits 43 healthy adult volunteers of Bai ethnic group living in Kunming urban and Er Yuan rural county Dali Bai autonomous prefecture at Yunnan Province as the research object, analyzed the dominant bacterium of intestinal flora by specificity

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30660135)

*通讯作者: Tel: 86-471-4319940; Fax: 86-471-4305357; ✉: hepingdd@vip.sina.com

收稿日期: 2014-06-26; 接受日期: 2014-08-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-09-16

primer qualitative PCR and polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), and measured the content of short chain fatty acids (SCFAs) in the feces. **[Results]** Results in present study showed that although the average of SCFAs content in Rural is higher than that of Urban, the difference was not significant. The qualitative PCR results showed that, for the diversity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, these two groups have obviously differences, Unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) based on optical density was performed on the base of 16S rRNA V3 region PCR-DGGE profile, showing samples were divided into two groups as urban and rural groups. We extracted the typical bands for further cloning and sequencing, and constructing phylogenetic tree diagram the results showed that the *Bifidobacterium*, *Enterubacterium* and *Enterococcus* have a high diversity, suggesting that it was predominant in the gut of healthy volunteers living in county of Dali bai autonomous prefecture Er Yuan Xian. **[Conclusion]** To sum up, the structural intestinal flora of Bai ethnic group living in urban of Kunming and Er Yuan rural county Dali Bai autonomous prefecture at Yunnan Province has the distinguishing trend, but the difference of diversity was not significant. The current study aimed to provide certain reference for exploring the relationship between healthy host and intestinal flora.

Keywords: Bai ethnic, Intestinal flora, SCFAs, Specificity primer PCR, PCR-DGGE

随着生活水平的日益提高,人们对于健康长寿的要求日益增强。我国明代著名医学家张介宾在《类经》一书中指出:“百岁者,天年之概”。即在自然状况下,人类的正常寿命大都可达到百岁以上。因此,通过一定的方式实现个体的健康长寿具有理论上的可行性。微生物学及分子生物学的日益进步促使相关研究者把目光聚焦到人类的肠道菌群上,他们形象地把肠道菌群称之为人类的“第二器官”。研究表明,人类的肠道菌群是一个十分庞大的微生态系统,一个正常的成年人肠道中栖息着 400 多种细菌,其细胞数量(约 10^{14})约 10 倍于人体细胞数量(约 10^{13})^[1],它们通过参与人体的消化与吸收、药物代谢、疾病抵抗、免疫调节^[2-5]等诸多方面,与宿主之间既相互依赖又相互制约,对宿主的健康有重要且复杂的调控作用。

之前围绕肠道菌群展开的相关研究主要依靠传统的微生物研究手段,如研究菌落特征、菌体形态、生理生化特征、代谢产物等指标,这些建立在纯培养技术之上的传统方法很大程度上受培养条件的制约,往往造成研究结果的不稳定性,导致不能全面、客观地反映肠道菌群的真实情况。近年,分子生物学技术的快速发展为肠道菌群研究提供了全新的方法和思维,克服了传统方法的限制,使得科研工作者可以从基因水平上估计出种的丰度、

均匀度,分清楚种的变异情况,从而可以客观地认识微生物天然的生态状况。特别是宏基因组理论的提出以及与之相结合的技术的逐步问世,更是提供了成套的基于非培养的微生物研究技术^[6]。Woodmansey 等^[7]综合了传统依赖培养的经典微生物研究技术、新型的分子生物学技术和代谢组学技术对不同年龄段志愿者粪便中的肠道菌群进行了比较分析,研究发现随着年龄的递增,志愿者肠道菌群的结构也存在不同程度的变化。相对年轻志愿者而言,年长志愿者胃肠道中的拟杆菌属、普氏菌属、双歧杆菌属、乳杆菌属的多样性均有降低,而肠杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属、白色念珠菌属的多样性均有所增加。鉴于此,我们通过基于聚合酶链式反应的变性梯度凝胶电泳(Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)、种属特异性聚合酶链式反应和高效液相色谱法对采自云南省大理白族自治州洱源县农村和云南省昆明市健康成年志愿者的粪便样品进行了对比分析,以期从肠道菌群结构的角度研究大理白族自治州居民健康长寿的渊源,从而探索人类健康长寿的奥妙。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验样品的采集与志愿者信息: 本试验样品

采自随机征集的 43 名(男性 24 名,女性 19 名)健康的白族志愿者,年龄均在 18–35 周岁。其中 29 名志愿者生活在云南大理白族自治州农村,保持当地传统生活方式;14 名志愿者生活在云南昆明市,现代生活方式。所有志愿者根据饮食频率问卷调查(Food frequency questionnaire, FFQ)记录了其 3 d 内的饮食状况,以此为依据计算出志愿者每日营养物质的摄入量。志愿者将粪便排出,用一次性采样勺采集约 10 g 新鲜样品装入 50 mL 采样离心管中,用封口膜封口,立即置于液氮中冷冻 3 min 后转移到 -80°C 超低温保存备用。志愿者在样品采集前 3 个月内未使用抗生素和益生菌的相关产品。

1.1.2 主要试剂和仪器: 5×TBE 电泳缓冲液贮液(Tris 碱 54 g、硼酸 27.5 g、浓度为 0.5 mol/L EDTA 20 mL, pH 8.0, 定容至 1 000 mL); 1%的琼脂糖凝胶(1 g 琼脂糖溶于 100 mL 0.5×TBE 缓冲液贮液中); 40%聚丙烯酰胺(38 g 丙烯酰胺, 2 g N,N'-亚甲双丙烯酰胺溶解于 100 mL 蒸馏水中); 聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:N,N'-亚甲基二丙稀酰胺=37.5:1); 50×TAE 电泳缓冲液贮液(Tris 碱 242 g, 冰醋酸 57.1 mL, 浓度为 0.5 mol/L EDTA 100 mL, pH 8.0, 定容至 1 000 mL); 10%过硫酸铵(10 g 过硫酸铵加水定容至 100 mL, 贮于 4°C 备用); 20% AgNO_3 (10 g AgNO_3 在 50 mL 容量瓶定容); rTaq 酶(Taq DNA 聚合酶)、DNA 分子量标准(DL2000)、6×Loading buffer、10×Loading buffer 等购于大连宝生物工程有限公司(TaKaRa); 试验所用引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。

MLS-3751L 型全自动高压蒸汽灭菌器, Panasonic 仪器公司; ND-1000 型微量紫外分光光度计, 基因(Gene)有限公司; CDS8000 型 UPV 凝胶成像分析系统, Sagecreation 公司; PL303/01 电子天平, Mettler Toledo 公司; DYY-12 型电泳仪, 北京六一仪器厂; 变性梯度凝胶电泳仪(DCode Universal Mutation Detection System), 伯乐(Bio-Rad)公司; PCR 仪, Applied Biosystems 公司; Agilent1100 高效液相色谱仪, Agilent 公司。

1.2 方法

1.2.1 宏基因组 DNA 的提取: 采用 QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit 试剂盒提取样品宏基因组 DNA。具体试验步骤按照试剂盒的说明书步骤进行, 对宏基因组 DNA 的浓度和质量进行测定后并保存在 -20°C 。

1.2.2 短链脂肪酸的高效液相色谱测定: 分别对 43 份粪便样品预处理: 取 1 g 粪便样品溶于 15 mL PBS 中, 充分悬浮, $350\times g$ 离心 5 min, 取 1 mL 粪便上清液样品加 4 mL 浓度为 1 mol/L 的盐酸溶液振荡 30 s, $4500\times g$ 离心 10 min, 取上清液经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 膜过滤待进样分析。采用 Agilent1100 液相色谱仪对样品进行短链脂肪酸的测定, 流动相是以体积比为 3:97 的甲醇和 0.015 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 2.5), 流速为 0.5 mL/min, 在 210 nm 的紫外波长下进行检测, 检测需 $5\text{ }\mu\text{L}$ 进样量, 柱温为 35°C 。绘制测定工作曲线以峰面积(A)对质量浓度(C)。

1.2.3 利用种属特异性 PCR 对粪便优势菌属的定性分析: 利用基于 16S rDNA 的乳酸杆菌属和双歧杆菌属的种属特异性引物分别对 43 个云南人的粪便样品宏基因组 DNA 进行属内类群扩增。其中乳酸杆菌属选择了植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、唾液乳杆菌(*L. salivarius*)、干酪乳杆菌(*L. casei*)、瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)、发酵乳杆菌(*L. fermentum*)、嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*) 6 个种; 双歧杆菌属选择了长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、短双歧杆菌(*B. breve*)、青春双歧杆菌(*B. adolescentis*)和动物双歧杆菌(*B. animals*) 4 个种。作为扩增模板的宏基因组 DNA 的浓度需控制在 100 mg/L 左右, 浓度远高于该值得需要进行稀释。采用 $50\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系: $10\times\text{PCR buffer } 5\text{ }\mu\text{L}$, dNTPs mix (2.5 mmol/L) $4\text{ }\mu\text{L}$, 正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$) $1.5\text{ }\mu\text{L}$, 反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$) $1.5\text{ }\mu\text{L}$, 基因组 DNA 模板(100 mg/L) $1.5\text{ }\mu\text{L}$, TaKaRa Taq 酶(5 U/ μL) $0.5\text{ }\mu\text{L}$, 用 ddH₂O 补充至 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。扩增程序为: $95^{\circ}\text{C } 4\text{ min}$; $95^{\circ}\text{C } 1\text{ min}$, $56^{\circ}\text{C } 45\text{ s}$, $72^{\circ}\text{C } 1\text{ min}$, 共 30 个循环; $72^{\circ}\text{C } 10\text{ min}$ 。特异性引物信息如表 1、2 所示。利用琼脂

表 1 乳杆菌属内部分种的特异性引物信息				
Table 1 The information of PCR primers for detection of <i>Lactobacillus</i>				
Genus	Primer pairs (Forward/Reverse)	Sequences (5'→3')	<i>T</i> _m (°C)	Reference
<i>L. plantarum</i>	<i>F-plan</i>	TGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAT	60	[8]
	<i>R-plan</i>	TGTTCTCGGTTTCATTATGAAAAATA		
<i>L. casei</i>	<i>F-casei</i>	CTTCCTGCGGGTACTGAGATGT	59	
	<i>R-casei</i>	CTATAAGTAAGCTTTGATCCGGAGATTT		
<i>L. helveticus</i>	<i>F-helv</i>	CTCTTCTCGGTTCGCCTTG	56	
	<i>R-helv</i>	GAAGTGATGGAGAGTAGAGATTA		
<i>L. fermentum</i>	<i>F-ferm</i>	ACTTAACCTTACTGATCGTAGATCAGTCA	58	
	<i>R-ferm</i>	AACCGAGAACACCGCGTTAT		
<i>L. acidophilus</i>	<i>F-acid</i>	GAAAGAGCCCAAACCAAGTGATT	59	
	<i>R-acid</i>	CTTCCCAGATAATTCAACTATCGCTTA		
<i>L. salivarius</i>	<i>F-sali</i>	GTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGA	61	
	<i>R-sali</i>	TAAACAAAGTATTTCGATAAATGTACAGGTT		

表 2 双歧杆菌属内部分种的特异性引物信息				
Table 2 The information of PCR primers for detection of <i>Bifidobacteria</i>				
Genus	Primer pairs (Forward/Reverse)	Sequences (5'→3')	<i>T_m</i> (°C)	Reference
<i>B. longum</i>	<i>F-long</i>	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	58	[9]
	<i>R-long</i>	GGGAAGCCGTATCTCTACGA		
<i>B. breve</i>	<i>F-breve</i>	CCGGATGCTCCATCACAC	58	
	<i>R-breve</i>	ACAAAGTGCCTTGCTCCCT		
<i>B. adolescentis</i>	<i>F-adol</i>	CTCCAGTTGGATGCATGTC	59	
	<i>R-adol</i>	CGAAGGCTTGCTCCCAGT		
<i>B. animals</i>	<i>F-anim</i>	ACCAACCTGCCCTGTGCACCG	58	
	<i>R-anim</i>	CCATCACCCCGCCAACAAGCT		

糖凝胶电泳技术对扩增产物进行检测，并进行后续的定性分析。

1.2.4 基于 PCR-DGGE 的志愿者肠道菌群研究：利用 16S rRNA 基因的 V3 区通用引物(V₃F+GC 和 V₃R+GC)扩增样品宏基因组 DNA ,扩增体系和扩增程序同 1.2.3 ,引物及退火温度参考 Matto 等^[10] ,通过琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。选取有效性较好 PCR 产物进行变性梯度凝胶电泳。仪器：Bio-Rad 电泳仪，试验参数：聚丙烯酰胺凝胶的变性剂浓度为 8%，变性梯度范围为 27%–52%，电泳条件在 60 °C、200 V 运行 6 h，并采用银染的方法对进行染色并扫描获得 DGGE 图谱。应用 Quantity One 软件对 DGGE 凝胶图谱进行聚类分析。并通过该软件自动获得图谱密度剖面图，利用条带间相似度对图谱进行香农-威纳指数 (Shannon index) 和 辛普森指数 (Simpson’s diversity index)的微生物群落 α-多样性分析^[11]。

Shannon-Weiner 指数(*H'*)计算公式为：

$$H'=-\sum_{i=1}^S(P_i\ln P_i)$$

(1)

$$P_i=n_i/N$$

(2)

Simpson 指数(*D_s*)计算公式为：*D_s*=1-∑*P_i*×*P_i*
其中，*S* 为每条泳带中条带总数；*n_i* 为单一条带 *i* 的峰面积；*N* 为所有峰的总面积，*P_i* 为特定条带亮度相对于所有条带总亮度的比率。

用无菌手术刀切下 DGGE 图谱上的优势目标条带，置于 1.5 mL 灭菌离心管中，先用 100 μL 60 °C 的 ddH₂O 漂洗一遍后加入 100 μL ddH₂O，42–50 °C 水浴过夜回溶，取 2.5 μL 上清液为模板进行 16S rRNA V3 区 PCR 扩增，扩增体系及程序同 1.2.3，并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，使用凝胶回收试剂盒纯化并送往上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 志愿者营养摄入分析结果

利用软件 GraphPad Prism 5 分析志愿者营养物质的日摄入量数据，结果如图 1–3 所示。从图 1–3 中可以直观地看到，保持传统生活方式的云南大理

白族自治州农村(Rural)志愿者每日的糖类、蛋白质、脂肪三大营养物质的日摄入量均高于以现代城市生活方式为主的昆明市(Urban)志愿者。主要维生素指数图显示, Urban 志愿者维生素 C 日摄入量略高于 Rural 志愿者, 其他 3 种主要维生素 VA、VB1、Nicotinic acid (烟酸)均为 Rural 高于 Urban 志愿者。此外, 主要矿质元素指数图显示, 除钙(Ca)日摄入量 Urban 高于 Rural 志愿者外。其他 6 种主要矿质元素钾(K)、磷(P)、铁(Fe)、锌(Zn)、硒元素(Se)均为 Rural 高于 Urban 志愿者。尽管两组志愿者的三大营养物质、主要维生素和主要矿质元素日摄入量在 $P<0.05$

的水平下无显著差异, 但试验结果已然可以与短链脂肪酸(SCFAs)测定结果相吻合, 这也间接地将志愿者的饮食状况与其体内的肠道菌群联系起来。

2.2 短链脂肪酸的测定结果

肠道内短链脂肪酸指标与人类健康密切相关。由于研究对象的局限性, 实际研究中只能对粪便样品中最接近结肠持续发酵的指标中一部分未被吸收的 SCFAs 进行研究, 含量约为 76.8 mmol/kg 湿粪, 这能够在一定程度上反映出盲肠和结肠中肠道菌群消化、生产、吸收以及分泌的 SCFAs 的总和^[12]。在所有 SCFAs 产物中, 乙酸(Aceticacid)、丙酸

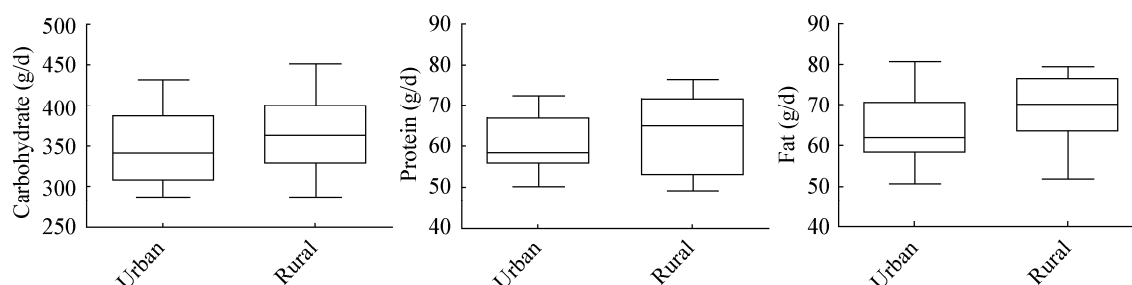


图 1 志愿者三大营养物质日摄入指数图

Figure 1 Daily intake of the carbohydrate, protein and fat

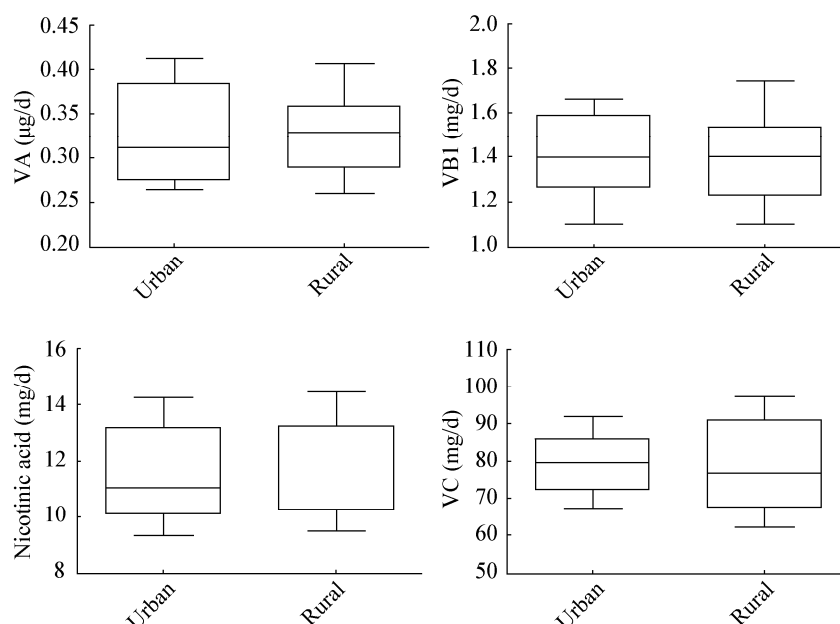


图 2 志愿者主要维生素日摄入指数图

Figure 2 Daily intake of the main vitamin

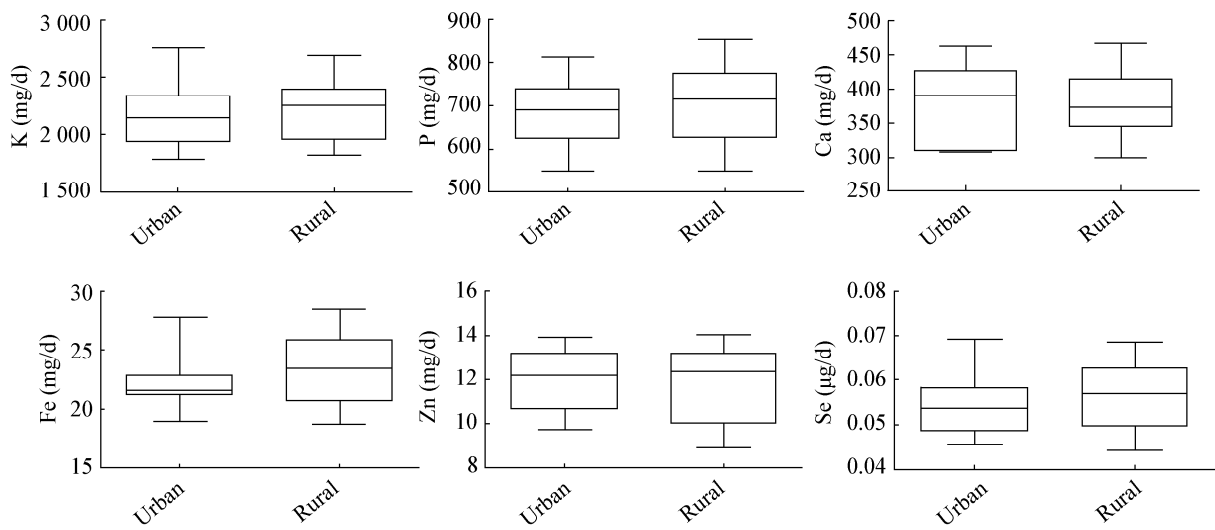


图 3 志愿者主要矿质元素日摄入量图
Figure 3 Daily intake of the main mineral element

(Propionicacid)和丁酸(Butyricacid)含量最高，约占 SCFAs 总量的 90%–95%，因此在试验过程中，运用高效液相色谱仪对大理白族自治州农村(Rural)和昆明市(Urban)的 43 份志愿者粪便样品中的这 3 种 SCFAs 进行了测定。测定结果显示，对于 Urban 样品：乙酸平均含量为(46.71±5.99) μmol/g feces；丙酸平均含量为(9.21±1.90) μmol/g feces；丁酸平均含量为(3.44±0.37) μmol/g feces，对于 Rural 样品：乙酸平均含量为(50.43±5.06) μmol/g feces；丙酸平均含量为(9.78±1.21) μmol/g feces；丁酸平均含量为(3.63±0.31) μmol/g feces。通过图 4 也可直观得出，

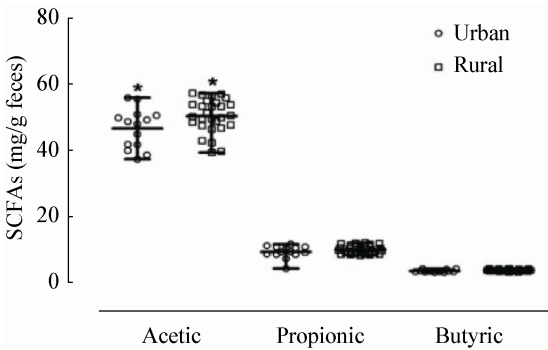


图 4 志愿者粪便的短链脂肪酸水平
Figure 4 The SCFAs of feces of volunteers

SCFAs 测定结果均为 Rural 高于 Urban，这一程度可以反映，Rural 志愿者肠道菌群代谢 SCFAs 的总和高于 Urban 志愿者。此外，就 3 种 SCFAs 整体代谢水平而言，乙酸平均含量显著($P<0.05$)高于丙酸和丁酸。丙酸平均含量高于丁酸，但差异不显著。

2.3 种属特异性 PCR 定性分析优势菌群

资料显示乳酸杆菌和双歧杆菌是人肠道的优势菌^[13]。Štšepetova 等^[8]和 Matsuki 等^[9]分别对人肠道中的乳酸杆菌属和双歧杆菌属进行了种属定性分析，证实了这一观点。鉴于此，我们设计了这两种菌的种属特异性引物，对云南省大理白族自治州洱源县农村(Rural)和云南省昆明市(Urban)的健康成年志愿者粪便样品的宏基因组 DNA 进行优势菌属特异性扩增定性分析。其中乳杆菌属检测结果如下：对于 Rural，3 个样品中检测到瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)，检出率为 10%；4 个样品中检测到发酵乳杆菌(*L. fermentum*)，检出率为 14%；19 个样品中检测到嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)，检出率为 66%；27 个样品检测到植物乳杆菌(*L. plantarum*)，检出率为 93%；28 个样品中检测到干酪乳杆菌(*L. casei*)，检出率为 97%；所有样品中都检测到唾液乳杆菌(*L. salivarius*)，检出率达到 100%。对于 Urban，1 个样

品中检测到瑞士乳杆菌(*L. helveticus*), 检出率为 7%; 2 个样品中检测到发酵乳杆菌(*L. fermentum*), 检出率为 14%; 6 个样品中检测到嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*), 检出率为 43%; 13 个样品检测到植物乳杆菌(*L. plantarum*), 检出率为 92%; 13 个样品中检测到干酪乳杆菌(*L. casei*), 检出率为 93%; 同样地, 所有样品中都检测到唾液乳杆菌(*L. salivarius*), 检出率达到 100%。如乳杆菌检出率图 3 所示, 除唾液乳杆菌(*L. salivarius*)、发酵乳杆菌(*L. fermentum*)在 Rural 和 Urban 中检出率相同, 其余 4 个种均为 Rural 高于 Urban。同时, 由图 3 可以直观得出, 植物乳杆菌(*L. plantarum*)、干酪乳杆菌(*L. casei*)、唾液乳杆菌(*L. salivarius*)含量高于其他乳杆菌。双歧杆菌属检测结果如下: 对于 Rural, 22 个样品检测到青春双歧杆菌(*B. adolescentis*) 检出率为 76%; 24 个样品检测到动物双歧杆菌(*B. animalis*), 检出率为 83%; 28 个样品检测到长双歧杆菌(*B. longum*), 检出率为 97%; 29 个样品检测到短双歧杆菌(*B. breve*), 检出率为 100%。对于 Urban, 7 个样品检测到青春双歧杆菌(*B. adolescentis*), 检出率为 50%; 8 个样品检测到动物双歧杆菌(*B. animalis*), 检出率为 57%; 11 个样品检测到长双歧杆菌(*B. longum*), 检出率为 78%; 11 个样品检测到短双歧杆菌(*B. breve*), 检出率为 78%。双歧杆菌检出率如图 5 所示, 4 种双歧杆菌均显示 Rural 高于 Urban, 且 4 种双歧杆菌含量相差不大。

2.4 PCR-DGGE 结果及胶回收测序分析

采用 1.2.4 中的条件对 43 个样品中的肠道菌 16S rRNA 基因 V3 区进行扩增, 并通过琼脂糖凝胶电泳进行扩增产物检测。选取有效性较好的 8 个 Urban 扩增产物和 9 个 Rural 扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(DGGE), 得到 DGGE 图谱。后续通过 Quantity One 软件对图谱进行背景强度去除和噪声水平设定, 并采用泳道轨迹定量法(Trace-tracking)根据不同电泳条带的光密度值绘制光密度剖面图 6, 得到 DGGE 图谱泳道信息, 将

图谱中条带数字化并转换为矩阵, 继而进行基于非加权平均距离聚类分析(Unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)得到图 7。聚类结果显示图谱条带聚为两大类, 其中 U1、U2、U4、U5、U6、U7、U8、R7 聚为一类, R1、R2、R3、R4、R5、R6、R8、R9、U3 聚为一类。尽管样品 R7、U3 未能归入相应的组, 但是大部分样品已按照实际分组的情况区分开, 说明云南昆明市和云南大理白族自治州农村志愿者的肠道菌群结构不尽相同。

此外, 利用条带间相似度对图谱进行微生物群落 α -多样性分析, 包括: 香农-威纳指数(Shannon-Wiener index)和辛普森指数(Simpson index)分析。通过上述计算公式得出 α -多样性数据表 3, 由表 3 可见, 两组样品的香农-威纳指数和辛普森指数均值的差异不显著, 但仍然清晰显示 Rural 大于 Urban。说明 Rural 样品中微生物群落的未知影响因素较多, 从而推导出 Rural 中微生物的多样性丰度较 Urban 样品高。这与基于 UPGMA 的聚类结果相吻合。然而, 运用这套分析方法只能实现粗略的肠道菌群多样性分析。为了实现对云南大理白族自治州洱源县农村健康成年志愿者的肠道菌群多样性更进一步的分析, 还需结合 PCR-DGGE 条带回收测序的相关分析。

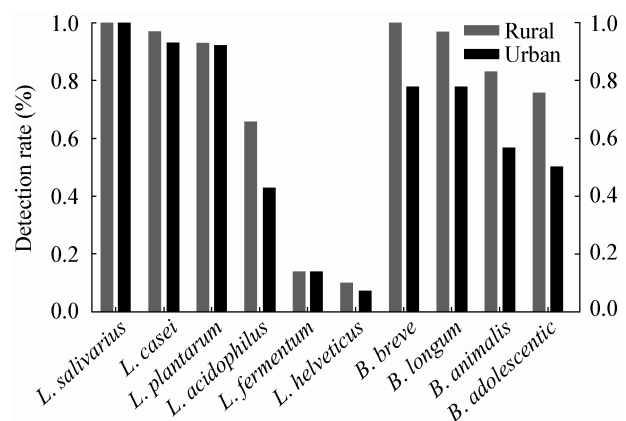


图 5 乳杆菌特和双歧杆菌异性引物 PCR 定性分析结果
Figure 5 The results of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* specificity primer PCR analysis

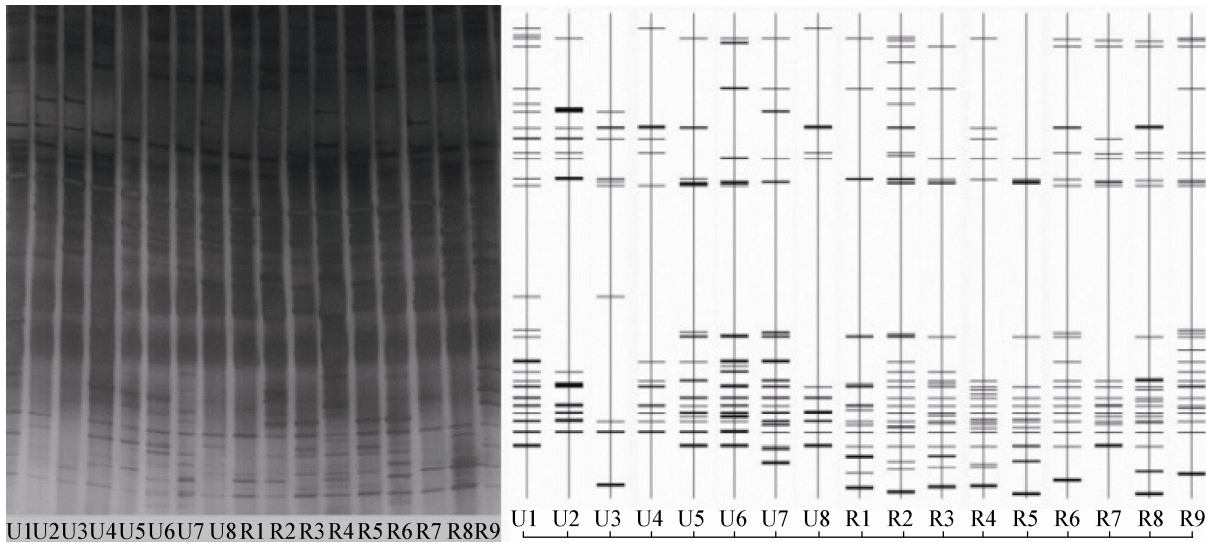


图 6 DGGE 图谱泳道信息图
Figure 6 Information of DGGE lanes

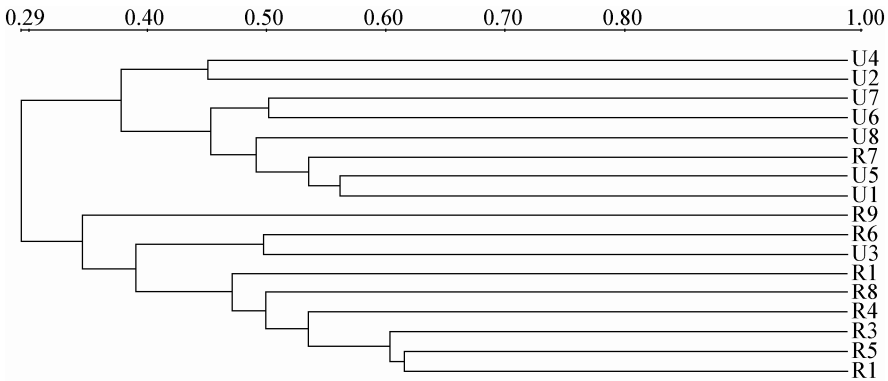


图 7 肠道总细菌 DGGE 图谱的聚类分析
Figure 7 The cluster analysis of DGGE profile of all intestinal bacteria

表 3 DGGE 图谱中微生物群落 α -多样性指数表					
Table 3 The index of α -diversity of DGGE profile of microbial communities					
Rural subject	Shannon-Wiener index	Simpson index	Urban subject	Shannon-Wiener index	Simpson index
R1	2.545	0.920	U1	2.280	0.897
R2	0.692	0.499	U2	2.174	0.885
R3	2.684	0.931	U3	1.383	0.748
R4	1.533	0.769	U4	1.067	0.663
R5	2.803	0.938	U5	1.068	0.663
R6	0.303	0.416	U6	1.068	0.663
R7	2.370	0.904	U7	1.384	0.748
R8	2.871	0.942	U8	1.259	0.734
R9	2.751	0.935	Average	1.460 ^a	0.750 ^b
Average	2.061 ^a	0.806 ^b			

注：异组间同一指标的角标字母不同表示在 $P<0.05$ 水平下差异显著。
Note: In the same column, different lowercase letters of superscript indicate significant difference at $P<0.05$ level.

在 16S rRNA 基因的 V3 区 DGGE 图上大理白族自治州洱源县农村健康成年志愿者(Rural)对应部分选取明亮条带共 30 条进行回收并克隆测序,将测定得到的序列用 BLAST 搜索与其同源性最高(除条带 5 和 14 对应的 *Hespelliaporcina* 和 *Doreaformicigenerans* 外,均 98%以上)的菌种,序列比对结果见表 4,通过比对结果可以发现,主要的共有条带为双歧杆菌(条带 19、23、24、27 和 29)、梭菌(条带 7、12 和 30)、普氏菌属(条带 4、11)、拟杆菌(条带 3)、肠杆菌和肠球菌(条带 1、2、6、8、9、15、16、17、18、20、21、22 和 28)。通过 NCBI 搜索条带回收测序得到的 16S rRNA 基因序列的相关信息,并利用软件 MEGA 5 将所有的序列进行集中分析并构建系统发育树图 8,通过系统发育树拓扑结构的分支长度直观地看到测序得出的样品中所存活的肠道菌群在进化过程中的变化程度以及相互之间的亲缘关系。同时,比对结果显示肠道菌群中双歧杆菌属、肠杆菌属和肠球菌属多样性较高,是云南省大理白族自治州洱源县农村健康成年志愿者肠道中的优势菌属。

3 讨论

3.1 肠道菌群代谢与宿主健康的联系

本试验结合高效液相色谱技术、种属特异性 PCR 技术和 PCR-DGGE 技术,对云南省大理白族自治州洱源县农村(Rural)和云南省昆明市(Urban)的健康成年志愿者肠道菌群进行了研究分析。其中 SCFAs 测定结果显示乙酸、丙酸和丁酸均为 Rural 高于 Urban,且乙酸含量显著高于丙酸和丁酸。之前有研究发现肠道菌群产生的短链脂肪酸(SCFAs)会对肠易激综合症、溃疡性结肠炎、肠癌症等疾病有所改善^[14],其中乙酸对于人体健康意义重大,不论是维持心肌、骨骼的正常功能还是保证脂肪代谢的顺利进行中都发挥重要作用^[15]。丙酸主要由肝脏吸收,对以肠发酵为主的人类来讲未发现显著作用,丁酸几乎全部被结肠上皮细胞代谢并成为其主要能量来源,对粘膜的营养、细胞的生长和分化的调节也会起到重要作用。三大类 SCFAs 对人类健康的影响不容忽视,这些也是我们将这三大类 SCFAs 作为测定指标的依据。2011 年,Shinji 等^[16]研究发现,双歧杆菌属可通过产生适量乙酸

表 4 回收条带的测序及比对结果							
Table 4 Extract band sequencing and blasting							
Bands	Closest genus/species	Similarity	NCBI	Bands	Closest genus/species	Similarity	NCBI
1	<i>Parabacteroides johnsonii</i>	100	AB261128	16	<i>Megamonas funiformis</i>	100	NR041590
2	<i>Methanosphaera cunicululi</i>	99	HE582783	17	<i>Roseburia intestinalis</i>	98	AB661435
3	<i>Bacteroides fragilis</i>	100	AB618792	18	<i>Shigella dysenteriae</i>	99	EU409294
4	<i>Prevotella albensis</i>	100	NR025300	19	<i>Bifidobacterium animalis</i>	100	AB050138
5	<i>Hespellia porcina</i>	96	AF445239	20	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	99	AY324632
6	<i>Coprococcus eutactus</i>	100	NR044049	21	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	AF390083
7	<i>Parasutterella secunda</i>	98	AB621360	22	<i>Enterobacter aerogenes</i>	100	AY825036
8	<i>Methanobrevibacter curvatus</i>	100	NR044796	23	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	99	HQ259744
9	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	100	KC686601	24	<i>Bifidobacterium breve</i>	100	AF491833
10	<i>Akkermansia muciniphila</i>	99	NR074436	25	<i>Subdoligranulum variabile</i>	98	NR028997
11	<i>Prevotella amnii</i>	99	NR042587	26	<i>Blautia coccoides</i>	100	AB571656
12	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	100	NR028961	27	<i>Bifidobacterium catenululatum</i>	99	JF340474
13	<i>Butyricicoccus pulullicaecorum</i>	100	NR044490	28	<i>Phascolarctobacterium faecium</i>	100	NR026111
14	<i>Dorea formicigenerans</i>	97	NR044645	29	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	99	JN020353
15	<i>Ruminococcus albus</i>	100	AF104839	30	<i>Clostridium absonum</i>	94	NR041006

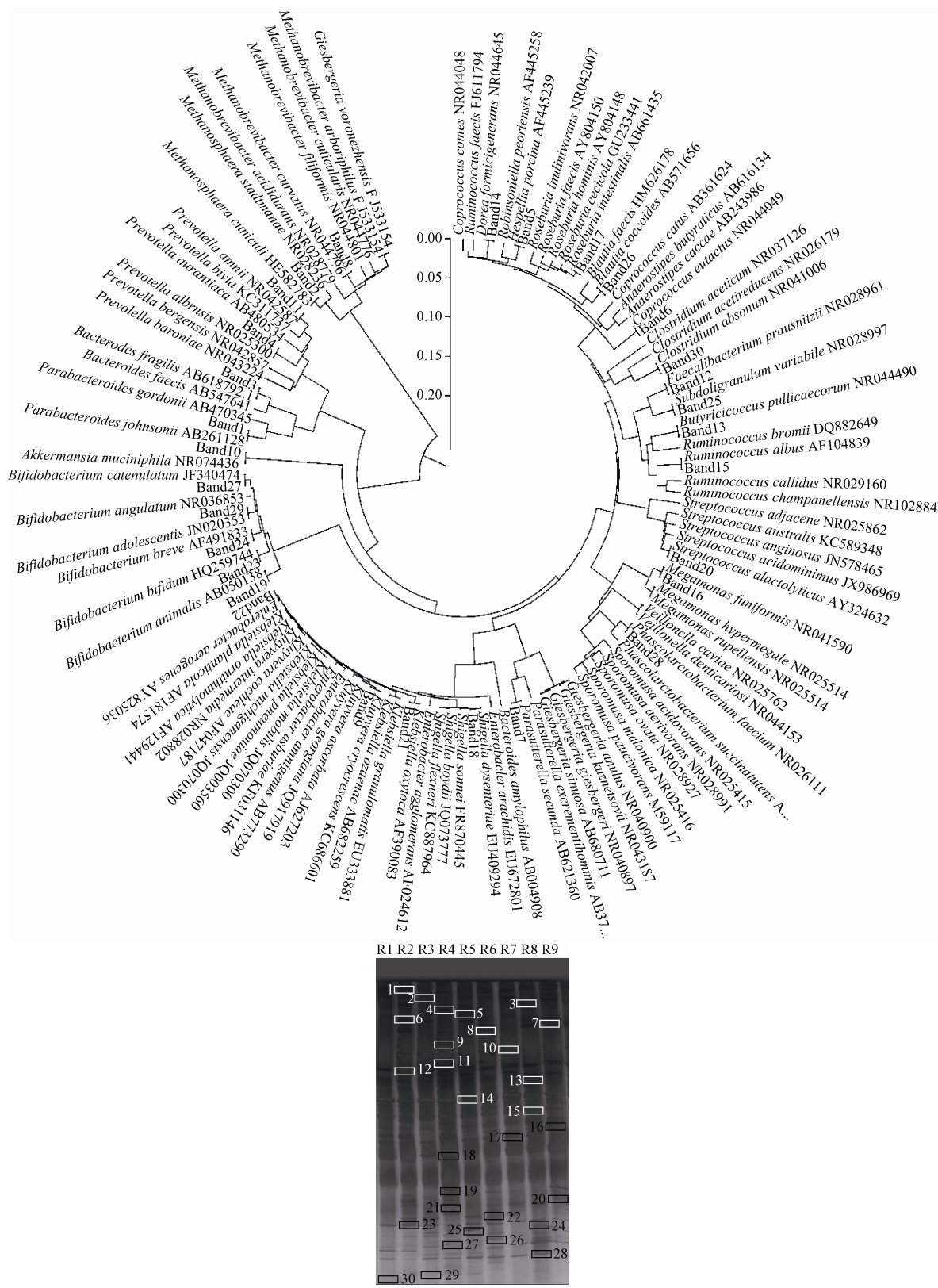


图 8 DGGE 条带回收测序系统发育树图
Figure 8 Phylogenetic trees of DGGE profile of redissolution bands

来保护肠道免受致病菌感染,从而维护肠道微生态平衡,保持肠道年轻态。该信息与本试验种属特异性 PCR 显示的双歧杆菌属是云南大理白族自治州洱源县农村志愿者肠道优势菌属这一结果相一致。

3.2 肠道菌群多样性随年龄增长的动态变化

近年,国内外相关研究机构也对健康老年人和成年人的肠道菌群进行了比较分析,发现健康老年人肠道中双歧杆菌、肠球菌和梭状芽孢杆菌数量^[17-18]低于成年人,肠杆菌、链球菌和梭菌^[13]数量显著增加,高于成年人。Lorenzo 等^[19]也对 14 名百岁老人和 10 名成年人的肠道菌群进行研究,数据显示,肠杆菌属(*Enterobacteriaceae*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、双歧杆菌属(*Bifidobacteria*)、乳杆菌属(*Lactobacilli*)几个菌属的丰度在年龄增长的过程中都发生不同程度的变化,这些研究结果都说明肠道菌群尤其是肠道优势菌群与衰老过程息息相关。本试验种属特异性 PCR 定性试验在云南省大理白族自治州洱源县农村和云南省昆明市的健康成年志愿者粪便样品中共检出优势菌属的乳杆菌属内共 6 个种,除唾液乳杆菌(*L. salivarius*)、发酵乳杆菌(*L. fermentum*)检出率相同,其余 4 种乳杆菌均呈现 Rural 高于 Urban,并且植物乳杆菌(*L. plantarum*)、干酪乳杆菌(*L. casei*)、唾液乳杆菌(*L. salivarius*)在两组样品中检出率较高。类似地研究也采用相似的试验方法对不同年龄段的志愿者肠道中的乳杆菌属多样性进行了对比分析,揭示了肠道中乳杆菌属的多样性特征与年龄相关^[13]。2010 年,王水泉等^[20]通过综合大量国内国际前沿的研究成果论述了植物乳杆菌、干酪乳杆菌在医疗保健方面有很大的潜力。这也为研究云南省大理白族自治州洱源县农村成年志愿者的健康长寿与其肠道中乳杆菌属的关联性提供了线索。

2009 年,Zwieblehner 等^[21]利用 DGGE 技术对 102 个 18-94 岁年龄范围的成年人的肠道菌群进行分析发现,随着年龄的增长,有益肠道菌群的多样性丰度均有所降低,尤其是双歧杆菌属含量,呈现显著下降的趋势。本试验通过种属特异性 PCR 发

现,双歧杆菌属显示较高的检出率,并且 DGGE 明亮条带回收测序结果中双歧杆菌属多样性较高。我们推测,试验结果所显示的云南大理白族自治州洱源县农村志愿者粪便样品中乳酸杆菌属和双歧杆菌属的高多样性丰度可能与当地老百姓普遍长期食用一种经传统独特工艺制作而成的风味奶食品——乳扇存在重要关系。肠道菌群年轻态对人的健康长寿至关重要,而长期自然选择导致的遗传差异^[22-23]、不同地域及民族饮食文化和生活方式差异及所处生存环境的状况等多方面因素^[24-25]都将导致宿主肠道菌群的迥异。因此,只有后续试验中展开研究在上述多种因素共同影响下肠道菌群结构及多样性随年龄增长的复杂变化情况,才能更深刻地探索人类健康长寿的奥妙。

参 考 文 献

- [1] Rabiou BA, Gibson GR. Carbohydrates: a limit on bacterial diversity within the colon[J]. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 2002, 77(3): 443-453
- [2] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(11): 5445-5451
- [3] Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(44): 15718-15723
- [4] Koenig JE, Spor A, 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(1): 4578-4585
- [5] Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(1): 4554-4561
- [6] Zhang JC, Sun ZH, Zhang HP, et al. The effects of probiotic on human intestinal microbiota—Taking *Lactobacillus casei* Zhang as example[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(9): 58-68 (in Chinese)
张家超, 孙志宏, 张和平, 等. 益生菌对肠道菌群的影响—以 *Lactobacillus casei* Zhang 研究为例分析益生菌对肠道菌群的影响[J]. 中国食品学报, 2011, 11(9): 58-68
- [7] Woodmansey EJ, McMurdo ME, MacFarlane GT, et al. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(10): 6113-6122
- [8] Štšepetova J, Sepp E. Diversity and metabolic impact of intestinal *Lactobacillus* species in healthy adults and the elderly[J]. British Journal of Nutrition, 2011, 105(8): 1235-1244
- [9] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Quantitative PCR with

- 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 167-173
- [10] Matto J, Maunuksela L, Kajander K, et al. Composition and temporal stability of gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome—a longitudinal study in IBS and control subjects[J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2005, 43(1): 213-222
- [11] Wang M, Karlsson C, Olsson C, et al. Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2008, 121(1): 129-134
- [12] Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and non-starchpolysaccharides[J]. *Physiological Reviews*, 2001, 81(3): 1031-1064
- [13] He T, Harmsen H, Raangs G, et al. Composition of faecal microbiota of elderly people[J]. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2003, 15: 153-159
- [14] Marlene M, Yara M. Effect of prebiotics on the health of the elderly[J]. *Food Research International*, 2013, 53(1): 426-432
- [15] Cummings JT, Macfarlane GT. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism[J]. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 1997, 21(6): 357-365
- [16] Shinji F, Hidehiro T, Koji H, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate[J]. *Nature*, 2011, 469(7331): 543-547
- [17] Biagi E, Nylund L, Candela M, et al. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians[J]. *PLoS One*, 2010, 5: 10667
- [18] Hayashi H, Sakamoto M, Kitahara M, et al. Molecular analysis of faecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP[J]. *Microbiology and Immunology*, 2003, 47(8): 557-570
- [19] Lorenzo D, Toscano M, Rodighiero V, et al. Cultivable and pyrosequenced fecal microflora in centenarians and young subjects[J]. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2012, 46(8): 1-4
- [20] Wang SQ, Bao Y, Zhang HP, et al. Physiological function and application of *Lactobacillus plantarum*[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010, 12(4): 49-55 (in Chinese)
王水泉, 包艳, 张和平, 等. 植物乳杆菌的生理功能及应用[J]. *中国农业科技导报*, 2010, 12(4): 49-55
- [21] Zwielerhner J, Liszt K, Handschur M, et al. Combined PCR-DGGE fingerprinting and quantitative-PCR indicates shifts in fecal population sizes and diversity of Bacteroides, bifidobacteria and Clostridium cluster IV in institutionalized elderly[J]. *Experimental Gerontology*, 2009, 44(6/7): 440-446
- [22] Kerckhoffs AP, Samsom M, van der Rest ME, et al. Lower bifidobacteria counts in both duodenal mucosa-associated and fecal microbiota in irritable bowel syndrome patient in irritable bowel syndrome patients[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2009, 15(23): 2887-2892
- [23] Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography[J]. *Nature*, 2012, 486(7402): 222-227
- [24] Hansen EE, Lozupone CA, Rey FE, et al. Pan-genome of the dominant human gut-associated archaeon, *Methanobrevibacter smithii*, studied in twins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(1): 4599-4606
- [25] Andersen AD, Mølbak L, Michaelsen KF, et al. Molecular fingerprints of the human fecal microbiota from 9 to 18 months old and the effect of fish oil supplementation[J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2011, 53(3): 303-309