

无锡城乡年轻居民肠道菌群多样性研究

乔健敏, 张家超, 郑艺, 侯强川, 黄卫强, 霍冬雪, 郭壮, 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: 采用 PCR 和 DGGE 相结合的技术, 研究了生活于无锡城市和乡村的青年志愿者肠道菌群的多样性。基于 DGGE 指纹图谱, 使用聚类分析对志愿者肠道微生物相似性进行分析, 使用 Shannon-Weiner 多样性指数(H')、丰度(S)和均匀度(E_H)对志愿者肠道微生物多样性进行分析, 对图谱中具有代表性的共性和特异性条带进行胶回收和测序以分析志愿者肠道微生物组成; 基于 PCR 技术在种水平上对城乡志愿者肠道内乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 和双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 多样性进行定性分析。结果显示, 无锡城乡青年居民肠道微生物群落结构存在分开趋势, 相似性小于城市或乡村居民内部; 多样性方面差异不显著; 不动杆菌属、双歧杆菌属、葡萄球菌属、乳杆菌属、梭菌属和瘤胃球菌属为城乡青年居民肠道内的共有菌属; 乳杆菌属 *Lactobacillus* (*L.*) 和双歧杆菌属 *Bifidobacterium* (*B.*) 各类菌群在城乡居民肠道内分布差异不显著, 其中 *L. plantarum*, *L. casei*, *L. salivarius* 和 *L. acidophilus* 以及 *B. longum*, *B. breve*, *B. animalis* 和 *B. adolescentis* 分别为无锡青年居民肠道内的优势乳杆菌和双歧杆菌。综合分析, 初步揭示了无锡城市和乡村青年居民肠道微生物多样性差异不显著。

关键词: 无锡城乡年轻居民; 微生物多样性; PCR 技术; DGGE 技术

中图分类号: Q 93-3 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)08—0839—10

Study on the Diversity of Intestinal Flora of Young Rural and Urban Residents in Wuxi

QIAO Jianmin, ZHANG Jiachao, ZHENG Yi, HOU Qiangchuan,
HUANG Weiqiang, HUO Dongxue, GUO Zhuang, ZHANG Heping*

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

Abstract: The gut microbial diversity of young people living in rural and urban Wuxi was studied by the combination of polymerase chain reaction (PCR) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Based on the DGGE profile, the similarity of volunteers was performed by analysis of clustering and PCA. On the other hand, the diversity was evaluated by the Shannon-Weiner index, richness and evenness. The composition of gut microbiota was further characterized by sequencing of the common and special bands of the lanes in DGGE profile. Based on the PCR, the diversity of

收稿日期: 2014-12-09

基金项目: 农业部现代农业产业技术体系建设项目(CARS-37)。

* 通信作者: 张和平(1965—), 男, 内蒙古四子王旗人, 农学博士, 教授, 主要从事乳品生物技术研究。E-mail: hepingdd@vip.sina.com

Lactobacillus and *Bifidobacterium* species in the gut of rural and urban volunteers was analyzed. The results showed that the structure of gut microbiota between rural and urban residents of Wuxi appeared a separated tendency, and the similarity of intestinal flora between them was lower than that of urban or rural residents alone. Furthermore, the diversity between them were not significantly different. The genus of *Acinetobacter*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium* and *Ruminococcus* were the common bacteria in the gut of young urban and rural residents. All kinds of bacteria of *Lactobacillus* (L.) and *Bifidobacterium* (B.) in the gut were not significantly different in rural and urban residents. And the species of *L. plantarum*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. acidophilus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. animalis* and *B. adolescentis* were the predominant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* bacteria, respectively. On the base of the above comprehensive analysis, it can be preliminarily draw a conclusion that the diversity of gut microbiota was not significantly different between the young residents from rural and urban Wuxi.

Keywords: young rural and urban residents in Wuxi, microbial diversity, PCR, DGGE

17 世纪 50 年代, 在微生物学之父列文虎克借助自己发明的显微镜开始研究微生物的同时, 关于人类肠道微生物的研究也随之开始^[1-2]。据报道, 健康成年人肠道微生物的总数达 10^{14} 个, 10 倍于人体细胞, 其微生物基因数量约为 300 万个, 约为人类基因组基因数量的 100 倍。因此, 研究者们将人体肠道微生物基因组称为人体的第二基因组^[3]。这些微生物与宿主共进化, 直接参与人体的能量代谢和免疫系统的调节, 对于人的健康扮演着重要的角色^[4]。

随着科学家使用不同的技术手段对不同年龄、不同国籍、不同遗传背景和生活习惯的人群肠道微生物的研究, 发现人体的肠道微生物多样性在宿主 2 岁后开始趋于稳定并成人化, 此后, 随着宿主进入成人期, 生活方式和饮食习惯成为影响宿主肠道微生物群落结构的更重要的因素^[4-5]。早于 1974 年, Finegold^[6]等通过对坚持传统日式饮食习惯的日本居民和已适应西方饮食习惯的日裔美国居民的肠道微生物进行研究, 结果显示两类人群的肠道菌群结构明显不同。近些年, Wu 等^[7]通过对 98 个健康志愿者的肠道菌群进行研究, 发现居民的肠道菌群可以划分为 2 个分别以拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和普氏菌属 (*Prevotella*) 为核心的独立无交集的 enterotype 类型。enterotype 类型的形成与长期的膳食有关, 与性别以及肥胖等因素无关。Wu 等进一步指出, 长期食用高蛋白质高脂肪的食物能够促使肠道内拟杆菌属 (*Bacteroides*) 细菌的生长, 而食用富含碳水化合物和单糖的食物则可以增加人肠道内普氏菌属

(*Prevotella*) 细菌的含量。

中国是一个陆地面积约 960 万平方千米的大国, 不同地区具有不同的气候、文化和饮食习惯。而不同的人群具有不同的肠道菌群结构^[8]。无锡地处中国东部长江三角洲地区, 是传统的鱼米水乡, 受吴文化的浸育, 形成了典型的南方生活方式和饮食习惯, 而城市和乡村因地理位置的不同生活方式也存在差异。

聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳技术 (PCR-DGGE) 是一种不依赖于培养过程而对复杂微生物群落结构进行有效分析的分子生物学技术, 因其具有低成本、可靠、可重复、操作方便等优点, 近些年被广泛应用于微生物群落结构的研究^[9]。Yoshida 等^[10]使用 PCR-DGGE 技术对太平洋、东海、东京湾以及荒川 (Arakawa River) 水环境中的放线菌进行评价, 结果发现不同位置水环境中的放线菌群落结构不同, 且同一水环境中不同深度微生物群落结构也不同。刘慧杰等^[11]通过使用 PCR-DGGE 技术对红树林沉积物中细菌群落结构进行研究, 证实 PCR-DGGE 技术更能客观地反映红树林沉积物中真实的细菌群落结构信息, 同时也证明红树林区域微生物多样性丰富, 表明未知微生物资源的开发研究具有巨大的潜力。

本文作者应用 PCR 和 DGGE 相结合的技术对生活于无锡市区和乡村的青年居民肠道菌群多样性进行研究, 并结合城乡居民生活环境和饮食习惯分析, 探索了无锡城乡居民肠道菌群多样性的异同。

1 材料与方法

1.1 样本和试材

1.1.1 样本来源 选择 16 位居住于无锡城市和乡村、近一周内无出行记录的本地居民为研究对象,志愿者年龄均在 19~35 岁,身体质量指数(BMI)在 18.5~25.0,近 3 个月内无抗生素类药物摄入,并签订知情同意书。同时,根据食品频率问卷调查(Food frequency questionnaire,FFQ)记录志愿者近 3 日膳

食信息,并根据《中国食物成分表》计算志愿者脂肪、蛋白质和碳水化合物等营养成分的日摄入量^[12],样品采集点分别为无锡乡村的滨湖区和城市的崇安区,各采样点间距离近 100 km,具体样品信息见表 1。

1.1.2 试验所用试剂 试验所用引物由上海桑尼生物科技有限公司合成,16S rRNA 基因 V3 区扩增试剂均购于北京全式金生物技术有限公司,其它试验药品均为大连宝生物技术有限公司产品。

表 1 样品信息

Table 1 Information of subjects

样本信息	乡村 (n=9)		城市 (n=12)	
	中位数	变化区间	中位数	变化区间
年龄/a	29	24~33	27	23~30
BMI/(kg/m ²)	22.2	19~24.9	20.9	18.7~24.8
蛋白质摄入量/g	62.24	48.54~73.66	57.67	48.54~73.66
脂肪摄入量/g	63.85	53.21~78.88	67.92	54.46~78.25
碳水化合物摄入量/g	369.69	310.95~442.24	333.41	290.22~449.15
维生素摄入量/mg	84.85	66.11~98.69	71.52	65.29~91.09
矿物质摄入量/g	3.65	3.50~4.27	3.83	3.20~4.02

注:预试初选 21 人,其中乡村居民 9 名,城市居民 12 名。

1.2 试验方法

1.2.1 粪便样品采集 早餐前分别采集志愿者新鲜粪便样品适量,放入采样管中,并立即加入适量保护剂(Takara Biotechnology,Dalian),粪便和保护剂体积比为 1:2,迅速在液氮中速冻后存放于冷冻环境,72 h 内送回实验室于-80℃冷冻储存以备用。

1.2.2 粪便菌体基因组 DNA 提取 粪便菌体基因组 DNA 的提取使用 QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen) 试剂盒^[13]。得到的基因组 DNA 用 ND-1000 型微量紫外分光光度计测定浓度及 A₂₆₀/A₂₈₀ 值,同时用 1 g/dL 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,调整 DNA 质量浓度至 ng/μL 水平,于-20℃冷冻保存以用于后续试验。

1.2.3 基因组 DNA 16S rRNA V3 区 PCR 扩增 使用通用引物 V3F+GC (5'-GCCGCCCCGGGCGCGCC CCGGGCGGCCCGGGGCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 V3R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') 进行 16S rRNA 基因 V3 区扩增,扩增片断长度为 220 bp,所用仪器为Applied biosystems 公司 PCR 仪。PCR 反应体系 (50 μL) 为:10×PCR 缓冲液 5 μL,dNTP (2.5 mmol/μL) 4 μL,引物 (10 pmol/μL) 各 1.5 μL,

模板 DNA (100 ng/μL) 1.5 μL,Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.5 μL,ddH₂O 补足至 50 μL。扩增反应程序为:95℃ 5 min;95℃ 1 min,55℃ 45 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 7 min。得到的 PCR 产物用 1 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,其余置于-20℃冷冻保存以用于后续 DGGE 分析^[14]。

1.2.4 粪便菌体基因组 DNA 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析 使用 DCode Universal Mutation Detection System(Bio-Rad)仪器,对 16S rRNA 基因 V3 区扩增产物进行 DGGE 分析。分析所用变性剂质量分数为 8%,变性梯度为质量分数 27%~52%,灌胶后电泳在 60℃,200 V 运行 5 h。使用银染方法对所得胶图进行染色,拍照获得 DGGE 指纹图谱^[9]。

1.2.5 乳杆菌属和双歧杆菌属类群定性分析 应用乳杆菌属和双歧杆菌属内常见种的特异性引物 (表 2)对粪便菌体基因组 DNA 进行 PCR 扩增^[14-16],定性分析各目标细菌在样品中的出现频率。乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 检测种包括 *L. plantarum* (植物乳杆菌)、*L. salivarius* (唾液乳杆菌)、*L. casei* (干酪乳杆菌)、*L. acidophilus* (嗜酸乳杆菌)、*L. helveticus* (瑞士乳杆菌) 和 *L. fermentum* (发酵乳杆菌);双歧杆菌

属(*Bifidobacterium*)检测种包括 *B. longum* (长双歧杆菌)、*B. animalis* (动物双歧杆菌)、*B. breve* (短双歧杆菌)和 *B. adolescentis* (青春双歧杆菌)。扩增体系 (25 μ L) 为: 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/ μ L) 2 μ L, 引物 (10 pmol/ μ L) 各 1 μ L, 模

板 DNA 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。得到的 PCR 产物用 1 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳进行检测^[14]。

表 2 乳杆菌属和双歧杆菌属部分种特异性引物

Table 2 Specific primers of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Species

种名	引物名称	引物序列(5'→3')	片段大小/bp	退火温度/ $^{\circ}$ C
<i>L. plantarum</i>	F-plan R-plan	TGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAT TGTTCTCGGTTTCATTATGAAAAAATA	144	60
<i>L. salivarius</i>	F-sali R-sali	GTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGA TAAACAAAGTATTCGATAAATGTACAGGTT	97	61
<i>L. casei</i>	F-casei R-casei	CTTCCTGCGGCTACTGAGATGT CTATAAGTAAGCTTTGATCCGGAGATTT	132	59
<i>L. acidophilus</i>	F-acid R-acid	GAAAGAGCCCAACCAAGTGATT CTTCCCAGATAATTCAACTATCGCTTA	85	59
<i>L. helveticus</i>	F-helv R-helv	CTCTTCTCGGTGCGCCTTG GAAGTGATGGAGAGTAGAGATTA	160	56
<i>L. fermentum</i>	F-ferm R-ferm	ACTTAACCTTACTGATCGTAGATCACTCA AACCGAGAACACCGCGTTAT	88	58
<i>B. longum</i>	F-long R-long	TTCCAGTTGATCGCATGGTC GGGAAGCCGTATCTCTACGA	109	58
<i>B. animalis</i>	F-anim R-anim	CACCAATGCGGAAGACCAG GTTGTTGAGAATCAGCGTGG	184	64
<i>B. breve</i>	F-breve R-breve	CCGGATGCTCCATCACAC ACAAAGTGCCTTGCTCCCT	118	58
<i>B. adolescentis</i>	F-adol R-adol	CTCCAGTTGGATGCATGTC CGAAGCGCTTGCTCCAGT	71	59

1.3 数据处理

1.3.1 统计学分析 基于 Past (Hammer 等, 2001) 软件, 使用 Mann-Whitney 法对城乡样本营养成分摄入量和肠道微生物多样性指数进行差异显著性分析。

1.3.2 DGGE 图谱聚类分析和 PCA 分析 使用 Quantity One 软件对 DGGE 图谱条带去除背景强度和设定噪声水平, 自动获得图谱密度剖面图, 完成条带检测, 利用条带间相似度采用戴斯系数 (Dice coefficient) 计算各样品间相似性, 得到样品相似性矩阵图, 并用 UPGMA 算法绘制系统树状图, 完成图谱聚类分析; 同时使用 Past 软件对相似性矩阵进行 PCA 分析, 并用 Origin 7.0 (Microcal, USA) 绘图软件绘图, 得到基于 PC1 和 PC2 的赋值样本 PCA 分布图^[11, 17]。

1.3.3 样品微生物群落多样性统计学分析 使用多样性指数 Shannon-Weiner 指数 (H)、丰度 (S) 和均匀度 (E_H) 等指标比较样品的微生物多样性^[11, 17]。计

算公式为

$$H = - \sum_{i=1}^s (P_i \ln P_i) \quad (1)$$

$$P_i = n_i / N \quad (2)$$

$$E_H = H / H_{\max} = H / \ln S \quad (3)$$

公式 (1) (2) (3) 中, s 为每条泳带中条带数目总和, 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, $H_{\max}$ 是多样性指数最大值。通过软件自动获得图谱密度剖面图并利用条带间相似度按照上述公式进行计算。

1.3.4 DGGE 条带的序列测定 选择 DGGE 图谱中清晰的共性和特异性条带, 标记后切胶回收, 测序。测序在上海美吉生物医药科技有限公司进行^[11]。

2 试验结果

2.1 无锡城乡居民肠道微生物 PCR-DGGE 指纹图谱

对样本通过基因组 DNA 提取, 16S rRNA V3 区

PCR 扩增和 DGGE 分析,得到样本 PCR-DGGE 指纹图谱(图 1),每一条泳道代表一位志愿者肠道菌群的 DGGE 指纹图谱,不同位置的条带代表该样本中不同细菌的 16S rDNA V3 区基因片段,泳道中条带数量越多,则说明该样本中含有的微生物丰度越高。

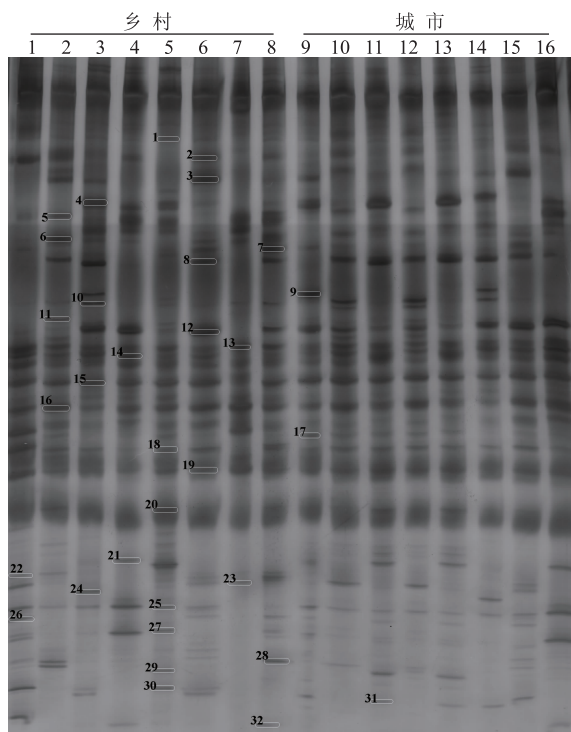


图 1 城乡居民肠道微生物 DGGE 指纹图谱

Fig. 1 DGGE profiles of intestinal microflora for urban and rural residents

由图 1 可知,各样本含有的条带数目不等、位置各异、亮度不同,说明无锡青年居民肠道微生物结构多样性丰富,且存在个体差异。

2.2 基于 PCR-DGGE 指纹图谱的城乡青年居民肠道微生物多样性分析

DGGE 指纹图谱中,每个泳道中电泳条带的多少直观地反映样本中细菌群落的多样性,条带的亮度反映该细菌的相对生物量,泳道中条带越多,亮度越亮,则表示该样本中微生物多样性越丰富,该种属细菌的相对数量越多。研究中,依据电泳图谱各条带信息,使用 Quantity one 软件计算各样本丰度(S)、均匀度(E_H)和 Shannon-Weine 多样性指数(H),以综合分析城乡样本的肠道微生物多样性(表 3)。由表 3 可知,各样品均匀度相似,多样性指数不同,丰度迥异,这个结果与 DGGE 图谱的直观观测结果一致。城市的 12 号样本丰度和多样性指数最高,分别为 44 和 3.628 0,表明 12 号志愿者肠道微生物多样性最高;乡村的 7 号样本丰度和多样性指数最低,分别为 25 和 3.005 2,表明 7 号志愿者肠道微生物多样性最低。分别对城乡样本各丰度、多样性指数和均匀度求算术平均值,可知,城市样本的均匀度、丰度和多样性指数均大于乡村样本,分别为 0.961 7、36.25 和 3.426 2,0.942 6、35.50 和 3.350 5。对结果进行差异显著性分析,均无显著性差异($P>0.05$),暗示无锡城乡青年居民肠道微生物多样性差异不显著。

表 3 城乡居民样本 DGGE 条带多样性指数、丰度及均匀度

Table 3 Shannon-Wiener Index(H), Richness(S) and Evenness(E_H) of DGGE bands for urban and rural residents

乡村	丰度	均匀度	香农指数	城市	丰度	均匀度	香农指数
1	42	0.946 1	3.536 1	9	41	0.973 3	3.614 5
2	36	0.946 6	3.392 3	10	33	0.973 3	3.274 4
3	33	0.924 0	3.230 7	11	36	0.960 3	3.441 3
4	27	0.929 6	3.063 7	12	44	0.958 7	3.628 0
5	39	0.952 8	3.490 7	13	38	0.973 5	3.541 2
6	39	0.948 1	3.473 3	14	32	0.960 7	3.329 4
7	25	0.933 6	3.005 2	15	40	0.954 5	3.520 9
8	43	0.960 4	3.612 1	16	26	0.939 2	3.060 2
平均	35.50±6.68	0.942 6±0.01	3.350 5±0.23	平均	36.25±5.78	0.961 7±0.01	3.426 2±0.19

2.3 基于 PCR-DGGE 指纹图谱的城乡青年居民肠道微生物相似性分析

基于 DGGE 指纹图谱,计算各样品间群落相似性系数可以得到各样品细菌种类差异信息。表 4 为

样品间微生物群落相似性分析结果。整体而言,各样品间的微生物群落相似性系数介于 18.5%~72.5%,系数较低,变化区间较大,说明各样本微生物群落结构差异较大,个体差异明显,此结果与

DGGE 图谱直观观测结果以及多样性分析结果一致。其中,相似性系数较高的有乡村样本的 3 号和 6 号、5 号和 6 号,系数分别为 71.6%、72.5%;城市样本的 9 号和 12 号、14 号和 15 号,系数分别为 66.5%、60.9%。相似性系数较低的有乡村的 4 号和城市的 12 号,乡村的 2 号和城市的 15 号,以及乡村的 3 号和城市的 12 号样本,分别为 18.5%、25.3% 和 22.4%,城市样本和乡村样本内部相似性系数较高,城乡样本间相似性系数较低,说明城市和乡村

青年居民内部肠道微生物群落结构相似性较高,大于城乡青年居民之间。此外,表 4 也显示,部分城乡样本间相似性系数也较高,如乡村的 8 号和城市的 13 号样本,乡村的 4 号和城市的 10 号样本,系数分别为 64.1%、58.4%;而部分城乡样本内部相似性系数较低,如乡村的 2 号和 3 号样本,以及城市的 11 号和 12 号样本,相似性系数为 22.2%和 27.7%,说明部分城乡居民肠道微生物群落结构相似性也较高,存在个体差异。

表 4 城乡居民肠道微生物群落结构相似性分析

Table 4 Similarity coefficients of microbial community of urban and rural residents

%

泳道编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	100															
2	53	100														
3	44	22.2	100													
4	40.5	31.4	48.5	100												
5	42.9	22.6	69.3	36.7	100											
6	46.2	31.9	71.6	41.9	72.5	100										
7	34.2	29.9	49.7	43.2	41.1	41.6	100									
8	53.7	42.3	50.5	60.4	50.4	53.8	39.9	100								
9	52.7	65.4	26	31.6	23.9	30.9	32	41.4	100							
10	48.7	40.3	40.5	58.4	34.4	44	32.5	53.4	46	100						
11	36	25.5	43.9	24.7	51.3	48.3	31.7	46.3	28.6	41.6	100					
12	44.4	56.1	22.4	18.5	24	27.4	25.2	32.6	66.5	40.1	27.7	100				
13	40.3	34.1	49.6	44.8	53.7	55.8	43.8	64.1	35	45.5	53.3	32.7	100			
14	45	37.7	51.9	45.6	54	51.4	49.2	54.5	35.4	49.1	39	33.1	59.8	100		
15	38.4	25.3	67.9	42	60.2	61.6	61.1	47.2	32.2	43	43.2	29.3	56	60.9	100	
16	43.5	37.2	44.8	52.6	46.6	42.7	33.9	58.4	34.9	40.3	45.4	30.9	53.6	59.4	42.8	100

对图谱进行聚类分析以进一步观察无锡青年居民肠道微生物群落结构相似性,见图 2(a),样本共聚为 4 簇(族群 1—4)。族群 1 中,城市的 9 号和 12 号样本以约 66%的相似性聚为一簇;族群 2 中,城市的 14 号和 15 号样本以约 60%的相似性聚为一簇;族群 3 中,乡村的 3 号、5 号和 6 号样本以约 69%的相似性聚为一簇;族群 4 中,城市的 11 号、13 号和 16 号样本以约 40%的相似性聚为一簇。族群 2 (城市样本)和族群 3(乡村样本)以约 35%的相似性聚为一簇,城市或乡村样本按照采集地以较高的相似性聚为一簇,城乡样本间以较低的相似性聚为一簇,说明无锡城市或乡村各自青年居民内部肠道微生物群落结构相似性较高,城乡间则存在差异。族群 1、2 和 4 中,乡村的 2 号、7 号、1 号和 8 号样本

分别以约 63%、53%、40%和 80%的相似性与城市样本集聚为一簇,以及族群 4 中,城市的 10 号样本和乡村的 4 号样本以 58%的相似性聚为一簇,部分乡村样本以一定的相似性与城市样本集聚,暗示部分乡村青年居民肠道微生物群落结构与城市青年居民相似,这也提示,城乡比较而言,城市居民的肠道微生物群落结构相似性更高,个体差异较小,而乡村居民肠道微生物群落结构个体差异较大。

对图谱进行 PCA 分析以进一步观察样本间的集聚趋势,如图 2(b)所示,主成分因子 PC1 的贡献率为 28.07%,主成分因子 PC2 的贡献率为 16.45%;乡村样本集聚于图形左侧,而大部分城市样本集聚于图形右侧,城乡样本分别集聚为一簇,并彼此分开,说明无锡城乡青年居民肠道微生物群落结构具

有分开趋势;此外,也有两个城市样本与乡村样本集聚为一簇的现象存在,说明部分无锡城乡青年居民肠道微生物群落结构相似。

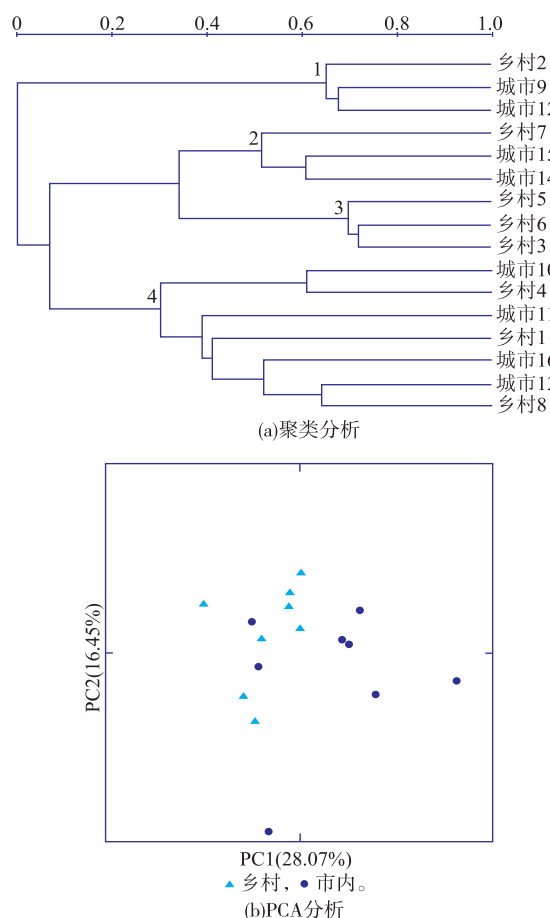


图2 基于DGGE指纹图谱的聚类和PCA分析

Fig. 2 Analysis of cluster and PCA on DGGE profiles

相似性分析说明,居住距离较远、生活环境不同的无锡城乡青年居民肠道微生物群落结构差异较小,相似性小于居住距离较近、生活环境相似的无锡城市或乡村居民内部。

2.4 基于PCR-DGGE指纹图谱对城乡青年居民肠道微生物组成的分析

DGGE指纹图谱不仅可直观地反映样本细菌群落结构和多样性,也可进一步通过切胶回收测序分析样本细菌群落组成。研究中,选取图谱中具有代表性的共性和特异性条带(图1)进行胶回收和克隆测序(表5),以分析不同人群肠道菌群组成的异同。试验中共选取条带32条,其中11条条带为所有样本共有,分别为条带1、12—20和25,测序结果显示分别为变形菌门(Proteobacteria)的不动杆菌属

(*Acinetobacter*),变形菌纲(Alpha proteobacterium)、放线菌门(Actinobacteria)的双歧杆菌属(*Bifidobacterium*);条带2—10、21、23—24、26—29和31—32共18条条带是部分城乡样本共有,测序结果为变形菌门(Proteobacteria)的不动杆菌属(*Acinetobacter*)和杆菌属菌,硬壁菌门(Firmicutes)的葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)和梭菌属(*Clostridium*);条带11、22和30共3条条带为仅乡村样本含有而城市样本不含有,测序结果为杆菌属(*Bacterium*)菌和变形菌门的不动杆菌属菌。

测序结果中,绝大部分条带的序列与GenBank数据库中细菌的同源性大于98%,有的同源性甚至达到100%。但是条带2、10—13、21、23—24、28和31与数据库中最近亲缘菌种间的同源性低于97%,其鉴定结果分别为不可培养杆菌属细菌、长双歧杆菌和Alpha变形菌纲细菌,因此它们所代表的细菌有可能为新的不可培养物种及其属细菌的新菌种。

测序结果表明,城乡青年居民肠道微生物组成在门水平上相同,都含有硬壁菌门、放线菌门和变形菌门;在属水平上没有多样性的差异,但是丰度和数量上存在差异,其中不动杆菌属、双歧杆菌属、葡萄球菌属、乳杆菌属、梭菌属和瘤胃球菌属为城乡青年居民肠道内的共有菌属。

2.5 乳杆菌属和双歧杆菌属类群定性分析结果

肠道内以乳杆菌属和双歧杆菌属为代表的益生乳酸菌,因其可通过代谢食物中的糖类物质生成乳酸及其它代谢物而保护肠道上皮细胞,加强肠道自身免疫系统功能,抵抗肠道肿瘤及炎症等疾病,这些成了近些年食品微生物学界研究的热点。本课题研究中使用PCR技术对乳杆菌属和双歧杆菌属的若干个种在无锡城乡青年志愿者肠道菌群中的出现频率进行检测(表6)。使用琼脂糖凝胶电泳观察各PCR扩增产物,如果出现清晰、明亮的条带,则扩增成功,说明该样品中含有该目标细菌,否则则说明该样品中不含有该目标细菌。结果显示,乳杆菌属细菌中的*L. plantarum*、*L. casei*和*L. salivarius*以及双歧杆菌属的*B. longum*和*B. breve*的检出率较高,为90%左右,在无锡青年居民肠道内普遍存在;乳杆菌属的*L. acidophilus*和双歧杆菌属的*B. animalis*和*B. adolescentis*的检出率适中,约50%~70%,在大部分青年居民肠道内存在;*L. helveticus*

表 5 肠道菌群 PCR-DGGE 特征条带序列比对结果

Table 5 Alignment of intestinal microflora PCR-DGGE band to its most-similar GenBank sequence

条带	序列比对结果	门	相似率/%	NCBI 序列号
1	<i>Acinetobacter</i> sp. strain	Proteobacteria	98	JN600953
2	Uncultured bacterium sp. strain	—	94	JQ180231
3	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain	Proteobacteria	99	HG008810
4	<i>Acinetobacter lwoffii</i> partial 16S rRNA gene	Proteobacteria	96	FN393793
5	Uncultured Moraxellaceae bacterium clone	Proteobacteria	96	JN038281
6	Uncultured bacterium clone	—	96	KC713067
7	Uncultured bacterium clone	—	97	HM327497
8	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain	Proteobacteria	96	KJ788662
9	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain	Proteobacteria	97	JX104151
10	Uncultured bacterium clone	—	91	AY977774
11	Uncultured bacterium clone	—	93	FJ930924
12	<i>Bifidobacterium longum</i> isolate DGGE gel band	Actinobacteria	91	JQ855493
13	<i>Alpha proteobacterium</i> strain	Proteobacteria	93	EU336942
14	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain	Proteobacteria	97	CR933261
15	<i>Acinetobacter</i> sp. strain	Proteobacteria	98	JN600953
16	<i>Acinetobacter bowetii</i> strain	Proteobacteria	98	KC456558
17	<i>Acinetobacter bowetii</i> strain	Proteobacteria	94	KC456561
18	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain	Proteobacteria	97	KC840871
19	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain	Proteobacteria	98	KC840870
20	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain	Proteobacteria	99	KJ788659
21	Uncultured bacterium clone	—	96	JX923273
22	Uncultured bacterium clone	—	97	HQ259885
23	<i>Staphylococcus</i> sp. strain	Firmicutes	95	JX909148
24	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> strain	Firmicutes	95	JQ754466
25	<i>Collinsella aerofaciens</i> gene	Actinobacteria	99	AB595135
26	<i>Acinetobacter</i> sp. strain	Proteobacteria	98	KC422446
27	<i>Ruminococcus</i> sp. strain	Firmicutes	98	KC331203
28	Uncultured <i>Clostridium</i> sp. strain	Firmicutes	87	FN997590
29	<i>Staphylococcus pasteurii</i> strain	Firmicutes	99	JX867325
30	<i>Acinetobacter baumannii</i> strain	Proteobacteria	96	KC188662
31	<i>Moraxellaceae</i> bacterium	Firmicute	95	KF135230
32	<i>Clostridium</i> sp. strain	Firmicutes	98	FM865974

表 6 城市和乡村居民肠道中乳杆菌属和双歧杆菌属各种的定性分析

Table 6 Qualitative analysis of some *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in intestinal tract of urban and rural residents

种名	百分率/%			种名	百分率/%		
	总体(N=21)	乡村(N=9)	城市(N=12)		总体(N=21)	乡村(N=9)	城市(N=12)
<i>L.plantarum</i>	81	89	75	<i>L.salivarius</i>	95	100	92
<i>L.casei</i>	100	100	100	<i>B.animalis</i>	71	78	67
<i>L.helveticus</i>	24	22.22	25	<i>B.longum</i>	86	89	83
<i>L.fermentum</i>	10	11	8	<i>B.breve</i>	95	100	91.67
<i>L.acidophilus</i>	48	44	50	<i>B.adolescentis</i>	67	67	67

注:预试初选 21 人,其中乡村居民 9 名,城市居民 12 名。

和 *L. fermentum* 的检出率较低,为 20% 左右,在部分城乡青年居民肠道内存在。城乡比较而言,*L. plantarum*、*L. fermentum*、*L. salivarius*、*B. animalis*、*B. breve* 和 *B. longum* 的检出率乡村样本高于城市样本,*L. helveticus* 和 *L. acidophilus* 的检出率城市样本高于乡村样本,*L. casei* 和 *B. adolescentis* 的检出率城乡样本相同。使用 Mann-Whitney 分析对各类菌群在城乡样本中的分布进行差异性分析,结果显示均无显著性。

分析可知,*L. plantarum*、*L. casei*、*L. salivarius* 和 *L. acidophilus* 以及 *B. longum*、*B. breve*、*B. animalis* 和 *B. adolescentis* 分别为无锡青年居民肠道内的优势乳杆菌和双歧杆菌。城乡比较而言,各类菌群在居民肠道内分布差异不显著。

3 讨论

个体肠道微生物在经历了婴儿期的不稳定期后,随着个体的成长逐渐成为一个稳定的微生态系统,这个微生态系统受人的基因型、性别、年龄、身体质量指数、地理环境、膳食结构,以及生活方式等因素的影响,不同个体肠道菌群组成不同^[1,5]。本课题研究中,DGGE 图谱直观观测结果和基于图谱的相似性分析均显示,无锡青年居民肠道微生物群落结构存在个体差异。与本研究结果相似,Zoetendal 等^[18]在使用 TGGE 技术对不同个体肠道微生物群落研究的报道中指出,即使是生活在相同环境、具有相同饮食习惯的配偶间,肠道菌群也会显示出较低的相似性。

尽管人体肠道微生物菌群构成个体差异较大,但研究发现不同个体间有相同的核心菌群存在^[19-20],而生活环境和饮食方式是引起核心菌群波动的主要因素^[7-8]。Yatsunenکو 等^[8]对具有西方饮食习惯的美国居民和非西方饮食习惯的非裔马拉维及土著印第安居民的肠道菌群进行研究,结果发现美国居民与马拉维和印第安居民的肠道微生物群落结构明显分离,集聚为不同的簇。Zhang 等^[21]在使用 PCR-DGGE 技术对保持原有生活方式和饮食习惯的锡林郭勒盟草原蒙古族居民和已趋于现代化生活方式的呼和浩特城市蒙古族居民的肠道微生物群落结

构的研究中证实,城市蒙古族志愿者与草原蒙古族志愿者肠道菌群结构具有显著差异。郭壮^[22]亦使用焦磷酸测序技术对西藏藏区居民和城市藏族居民肠道微生物群落结构进行研究,结果显示藏族城市居民样本与藏区居民样本肠道微生物群落结构呈现出明显的分离现象。本研究中得到了与报道相似的结果,基于 DGGE 图谱进行的相似性分析显示,无锡城市和乡村青年居民肠道微生物群落结构呈现分开趋势,相似性小于城市或乡村青年居民内部。不同的生活环境和生活方式使无锡城乡青年居民肠道微生物群落结构不同。

研究中,基于图谱的多样性分析也显示无锡城乡青年居民肠道微生物多样性差异不显著,定性分析也暗示乳杆菌属和双歧杆菌属各类群细菌在城乡青年居民肠道内分布无显著性差异。与本研究结果不同,Filippo 等^[23]报道,生活在非洲布基纳法索(Burkina Faso)村庄的儿童其肠道菌群的多样性大于意大利佛罗伦萨(Florence)的城市儿童。郭壮^[22]报道,藏族城市居民肠道菌群的多样性高于藏区牧民。近些年随着社会的快速发展,城乡差距逐渐缩小,饮食方式也日趋同化,结合居民膳食调查表进行分析发现,城乡青年居民日常膳食中蛋白质、脂肪、碳水化合物等营养元素的摄入量相当,无显著性差异。这些都足以说明无锡城乡青年居民日常饮食结构已趋相似,相似的饮食习惯可能是引起城乡青年居民肠道微生物多样性差异不显著的原因。此外,本研究中,研究对象分别选自同一省市,距离较近(100 km 以内),居民生活环境相似,相似的生活环境可能是引起这一结果的另一原因。

4 结语

综上所述,无锡城市和乡村青年居民肠道微生物多样性差异不显著。通过 DGGE 技术和 PCR 技术相结合的方法分析无锡城市和乡村青年居民肠道菌群多样性的异同,以及对优势菌属乳杆菌属和双歧杆菌属各细菌种在志愿者肠道中的分布差异进行初步的分析,揭示了无锡城乡青年居民的肠道微生物多样性,为后续国内人群肠道微生物群落结构的进一步深入研究提供了先例和基础数据。

参考文献:

- [1] TURNBAUGH P J, LEY R E, HAMADY M, et al. The human microbiome project[J]. **Nature**, 2007, 449: 804-810.
- [2] ECKBURG P B, BIK E M, BERNSTEIN C N, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora [J]. **Science**, 2005, 308: 1635-1638.
- [3] ZHU B L, WANG X, LI L J. Human gut microbiome; the second genome of human body[J]. **Cell**, 2010, 1(8): 718-725.
- [4] MARQUES T M, CRYANA J F, FERGUS S, et al. Gut microbiota modulation and implications for host health; dietary strategies to influence the gut-brain axis[J]. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2014, 22: 239-247.
- [5] CLEMENTE J C, URSELL L K, PARFREY L W, et al. The impact of the gut microbiota on human health an integrative view[J]. **Cell**, 2012, 148: 1258-1270.
- [6] FINEGOLD S M, ATTEBERY H R, SUTTER V L. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets[J]. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 1974, 27(12): 1456-1469.
- [7] WU G D, CHEN J, HOFFMANN C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes [J]. **Science**, 2011, 334(6052): 105-108.
- [8] YATSUNENKO T, REY F E, MANARY M J, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography [J]. **Nature**, 2012, 486(14): 226.
- [9] 刘新宇. 土壤细菌 16S rRNA 基因 V3 区种属特异性检测的法医学应用研究[D]. 沈阳: 中国医科大学法医学院, 2008.
- [10] YOSHIDA A, SEO Y, SUZUKI S, et al. Actinomycetal community structures in seawater and freshwater examined by DGGE analysis of 16S rRNA gene fragments[J]. **Marine Biotechnology**, 2008(10): 554-563.
- [11] 刘慧杰, 杨彩云, 田蕴, 等. 基于 PCR-DGGE 技术的红树林区微生物群落结构[J]. 微生物学报, 2010, 50(7): 923-930.
LIU Huijie, YANG Caiyun, TIAN Yun, et al. Analysis of microbial community structure in mangrove sediments by PCR-DGGE technique[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2010, 50(7): 923-930. (in Chinese)
- [12] 杨月欣, 王光亚, 潘兴昌. 中国食物成分表[M]. 第 2 版. 北京: 北京大学医学出版社, 2009.
- [13] TANAKA S, KOBAYASHI T, SONGJINDA P, et al. Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota[J]. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 2009, 56(1): 80-87.
- [14] 徐洁. 四川地区不同年龄健康人肠道菌群的比较研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 2012.
- [15] ŠTŠEPETOVA J, SEPP E, KOLK H, et al. Diversity and metabolic impact of intestinal *Lactobacillus* species in healthy adults and the elderly[J]. **British Journal of Nutrition**, 2011, 105(8): 1235-1244.
- [16] JUNICK J, BLAUT M. Quantification of human fecal *Bifidobacterium* species by use of Quantitative Real-Time PCR analysis targeting the groEL gene[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2012, 78(8): 2613-2622.
- [17] 高亦豹, 王海燕, 徐岩. 利用 PCR-DGGE 未培养技术对中国白酒高温和中温大曲细菌群落结构的分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(7): 999-1004.
GAO Yibao, WANG Haiyan, XU Yan. PCR-DGGE Analysis of the bacterial community of Chinese liquor high and medium temperature Daqu[J]. **Microbiology China**, 2010, 37(7): 999-1004. (in Chinese)
- [18] ZOETENDAL E G, AKKERMANS A D, De VOS W M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16SrRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1998, 64(10): 3854-3859.
- [19] ARUMUGAM M, RAES J, PELLETIER E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome [J]. **Nature**, 2011, 473 (7346): 174-180.
- [20] HAMADY M, KNIGHT R. Microbial community profiling for human microbiome projects; Tools, techniques, and challenges[J]. **Genome Research**, 2009, 19(7): 1141-1152.
- [21] ZHANG J, ZHENG Y, GUO Z, et al. The diversity of intestinal microbiota of Mongolians living in Inner Mongolia, China[J]. **Beneficial Microbes**, 2013, 4(4): 319-328.
- [22] 郭壮. 应用焦磷酸测序技术对不同人群肠道微生物群落结构的研究[D]. 无锡: 江南大学食品学院, 2013.
- [23] FILIPPO C D, CAVALIERI D, PAOLA M D, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2010, 107(33): 14691-14696.