

研究报告



健康蒙古族入肠道中乳酸菌和双歧杆菌多样性

白梅 侯强川 孙志宏 王记成 郭帅 韩之皓 王月娇 孟和毕力格*

内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室 内蒙古呼和浩特 010018

摘要:【背景】越来越多的研究发现人类的诸多疾病与肠道菌群失衡有关。乳酸菌和双歧杆菌属于肠道中的有益菌，在不同人群肠道中的多样性不尽相同。【目的】在种水平上分析健康蒙古族人群肠道菌群中乳酸菌和双歧杆菌的多样性。【方法】以 27 名健康蒙古族志愿者为研究对象，其中 14 名来自中国内蒙古，13 名来自蒙古国。首次采用乳酸菌和双歧杆菌的特异性引物扩增与 PacBio SMRT 三代测序技术相结合，在种水平上探讨志愿者肠道中乳酸菌和双歧杆菌的丰度和生物多样性，并进一步分析性别、BMI (Body mass index) 值和地域对上述两者可能的影响，以及优势菌种之间的相关性。

【结果】在种的水平上，27 名志愿者肠道样品中共鉴定到 68 个乳酸菌和 11 个双歧杆菌，其中平均相对含量在 1% 以上的乳酸菌有 8 个，包括唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*, 36.41%)、瘤胃乳酸杆菌(*Lactobacillus ruminis*, 17.94%)、德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*, 3.11%)、罗氏乳杆菌(*Lactobacillus rogosae*, 2.23%)、轻型链球菌(*Streptococcus mitis*, 2.18%)、阴道乳杆菌(*Lactobacillus vaginalis*, 2.02%)、魏斯氏乳杆菌(*Weissella confusa*, 1.54%) 和鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*, 1.09%); 双歧杆菌有 5 个，包括青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*, 39.88%)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*, 27.15%)、链状双歧杆菌(*Bifidobacterium catenulatum*, 26.30%)、两歧双歧杆菌(*B. bifidum*, 3.92%) 和角双歧杆菌(*Bifidobacterium angulatum*, 1.71%)，聚类分析分为链状双歧杆菌和青春双歧杆菌 2 个主要的类群。分析结果显示：性别、BMI 值和地域均未能显著影响志愿者肠道中乳酸菌和双歧杆菌的菌群结构($P>0.05$)，但男性和女性之间、中国内蒙古地区和外蒙古国的志愿者之间的个别乳酸菌菌种相对含量存在显著差异($P<0.05$)。对样品中的优势乳酸菌和双歧杆菌进行 Spearman 相关性分析发现，乳酸菌和双歧杆菌彼此之间相关性较为密切，不同菌种间相关性不尽相同，与具体的菌种有关。【结论】首次采用 PacBio SMRT 测序技术在种的水平揭示了健康蒙古族入肠道中乳酸菌和双歧杆菌菌种多样性，为在种水平上解析肠道中乳酸菌和双歧杆菌多样性提供了新的研究思路和实施方案。

关键词: 肠道菌群，乳酸菌，双歧杆菌，特异性引物，单分子实时测序技术

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31660450)

*Corresponding author: Tel: 86-471-4310593; E-mail: mhblg@163.com

Received: 08-11-2018; Accepted: 23-04-2019; Published online: 20-05-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31660450)

*通信作者: Tel: 0471-4310593; E-mail: mhblg@163.com

收稿日期: 2018-11-08; 接受日期: 2019-04-23; 网络首发日期: 2019-05-20

Diversity of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* in the intestine of healthy Mongolians

BAI Mei HOU Qiang-Chuan SUN Zhi-Hong WANG Ji-Cheng GUO Shuai
HAN Zhi-Hao WANG Yue-Jiao Menghe Bilige*

Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education; Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018, China

Abstract: [Background] Intestinal flora performs a crucial role in human health and its imbalance may cause numerous pathological changes. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are the main beneficial bacteria, which to some extent reflect the health status of the intestinal tract. However, the community structure of intestinal flora was different in different populations. [Objective] To analyze the diversity of lactic acid bacteria (LAB) and *Bifidobacterium* in the intestine of healthy Mongolians at the species level. [Methods] We studied the abundance and diversity of LAB and *Bifidobacterium* in 27 healthy Mongolians from Inner Mongolia Autonomous Region of China and Mongolia by using laboratory-designed LAB primers and *Bifidobacterium*-specific primers. This work also aimed to discuss the influence of gender, body mass index (BMI) and location on the quantities of these two bacterial groups, and to analyze the correlation between dominant strain. [Results] At the species level, a total of 68 LAB species and 11 *Bifidobacterium* species were detected in the intestine of 27 healthy Mongolians. Among them, eight LAB species were the most abundant species with relative abundances >1.0%, including *Streptococcus salivarius* (36.41%), *Lactobacillus ruminis* (17.94%), *Lactobacillus delbrueckii* (3.11%), *Lactobacillus rogosae* (2.23%), *Streptococcus mitis* (2.18%), *Lactobacillus vaginalis* (2.02%), *Weissella confuse* (1.54%) and *Lactobacillus rhamnosus* (1.09%). Meanwhile, *Bifidobacterium adolescentis* (39.88%), *Bifidobacterium longum* (27.15%), *Bifidobacterium catenulatum* (26.30%), *Bifidobacterium bifidum* (3.92%) and *Bifidobacterium angulatum* (1.71%) were the most abundant *Bifidobacterium* species with relative abundances >1.0%, and volunteers can be divided into two different groups (*B. catenulatum* group and *B. adolescentis* group) according to the composition of bifidobacteria by the cluster analysis. The results showed that the community structure of LAB and *Bifidobacterium* has no significantly correlation with gender, BMI value and region, and the community structure of LAB also no significantly correlation with BMI value, but there are significant differences in the relative abundances of several LAB species between men and women, between in Inner Mongolia and the Mongolian volunteers ($P < 0.05$). This study also found significant correlations between dominant LAB and *Bifidobacterium*, and the correlation between different species was different and related to specific strains. [Conclusion] This is the first report on the use of PacBio SMRT sequencing technology to evaluate the diversity of lactic acid bacteria (LAB) and *Bifidobacterium* in the intestine of healthy Mongolians at the species level. Based on these data of intestinal flora, it is beneficial to achieve targeted regulation of intestinal flora and accurate medical treatment. In addition, our study could serve as good reference for other studies on the diversity of LAB and *Bifidobacterium* in the intestinal tract at the species level.

Keywords: Gut microbiota, Lactic acid bacteria, *Bifidobacterium*, Specific primers, Single-molecule real-time sequencing technology (SMRT)

消化道是一个人体与外界能量交换的复杂系统, 肠道菌群在消化道内对物质的消化吸收发挥着重要作用, 更会影响免疫、能量代谢以及人体健康的诸多方面, 菌群失调和多样性降低与多种疾病相关^[1], 肠道菌群近十年成为了世界性的研究

热点。在正常情况下, 肠道菌群的构成是动态平衡的, 相互制约、共存共荣, 但如果肠道菌群失调, 就会增加疾病易感性, 破坏肠道菌群的平衡, 会对宿主的健康产生不良影响^[2-3]。

人体肠道菌群是一个复杂的微生态系统, 肠

道内的细菌可大致归属于 10 个门, 其中硬壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*, 肠杆菌为主)、放线菌门 (*Actinobacteria*) 和疣微菌门 (*Verrucomicrobia*) 占主要优势, 其余 5 个门的细菌数量较少^[4]。乳酸菌 (*Lactic acid bacteria*, LAB) 和双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 是肠道内的有益微生物, 具有改善胃肠道环境和维护肠道菌群平衡的作用, 二者的菌群丰度和数量在一定程度上反映了肠道的健康状态^[5]。研究表明不同人群肠道菌群群落结构存在极大差异, Yatsunenکو 等^[6]分析了美国公民、马拉维人和委内瑞拉美洲印第安人 3 个不同人群的肠道微生物群落, 发现 2 个非西方人群的肠道菌群结构在很大程度上不同于西方人群。2014 年, 本实验室研究团队采用焦磷酸测序技术分析了中国 9 个省的汉族、藏族、壮族、哈萨克族、维吾尔族、白族和蒙古族一共 7 个民族 314 份健康志愿者粪便的微生物组成^[7], 研究结果表明不同民族、不同生活方式下同一民族的人群均含有其特有的肠道菌群, 遗憾的是受当时测序条件限制, 分析结果只到属水平。

单分子实时测序 (*Single molecule real time sequencing*, SMRT) 技术是 2013 年美国太平洋生物技术公司 (*Pacific Biosciences*, PacBio) 推出的新型 DNA 测序技术, 其超长的读长可以使研究者准确获得样本中微生物的种水平组成, 且无需模板扩增, 运行时间短, 具有较高通量, 能够准确反映难培养的或是已灭活微生物的情况。PacBio SMRT 测序技术已应用在传统发酵食品微生物多样性分析和人体肠道菌群结构分析等方向。Yang 等利用此方法分析了重庆萝卜泡菜老盐水中细菌的多样性和群落结构^[8]; Kumari 等利用 PacBio SMRT 测序技术检测了人体肠道中潜在的益生乳杆菌菌种^[9]。

本实验室团队针对复杂肠道菌群生物样本, 设计了乳酸菌 16S rRNA 基因特异性扩增引物

L5^[10], L5 可用于高通量测序, 在种水平上鉴定乳酸菌并进行分类, 有助于分析复杂样本中乳酸菌多样性问题。本研究同时设计了双歧杆菌的特异性引物, 在此基础上以 27 名来自中国内蒙古和蒙古国的健康蒙古族志愿者为研究对象, 采用乳酸菌和双歧杆菌特异性引物扩增与 PacBio SMRT 测序技术相结合的方法, 首次在种的水平解析了健康蒙古族肠道微生物组中乳酸菌和双歧杆菌的群落结构及生物多样性, 构建肠道中二者的特征数据库, 基于此肠道菌群特征大数据有利于实现益生菌/元及膳食纤维等干预方法靶向调节肠道菌群, 可对特定病症起到治疗改善作用, 以辅助实现精准医疗。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

1.1.1 实验志愿者信息及样品收集

研究共收集了 27 名健康蒙古族志愿者的有效样品, 包括 14 名来自中国内蒙古和 13 名目前是内蒙古农业大学留学生的蒙古国志愿者, 志愿者信息详见表 1。所有志愿者在提供样品时均没有内分泌失调、糖尿病或其他任何的胃肠道疾病, 且在实验前的 6 个月内没有服用过抗生素类药物。研究得到了内蒙古农业大学的批准, 所有志愿者签署了知情同意书。

1.1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、dNTP mix、10×*Easy Taq* buffer 等 PCR 体系试剂, 大连宝生物工程有限公司; MO BIO Power Fecal[®] DNA Isolation Kit, Mo Bio 公司; 5×TBE 缓冲液 ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.72 g、Tris 碱 54.0 g、硼酸 27.5 g, 定容至 1 L, pH 8.0), 天津基准化学试剂公司; 测序试剂 (DNA/Polymerase Binding Kit P6 V2)、SMRT 建库试剂盒 (*Pacific Biosciences SMRT bell TM Template Prep Kit 1.0*), 太平洋生物科学公司。

测序平台, *Pacific Biosciences* 公司; PCR 仪, *Applied Biosystems* 公司; 微量紫外分光光度计,

表 1 志愿者信息

Table 1 The information of volunteers

序号 No.	编号 Sample No.	所在地 Location	性别 Gender	年龄(岁) Age	身高 Height (cm)	体重 Weight (kg)	BMI 值 BMI
1	M01	IM	M	22	178	65.0	20.5
2	M02	IM	F	21	170	57.0	19.7
3	M04	IM	F	22	155	47.0	19.6
4	M05	IM	F	22	163.5	51.0	19.1
5	M06	IM	F	21	165	59.0	21.7
6	M07	IM	M	22	169	90.0	31.5
7	M08	IM	M	22	175	82.0	26.8
8	M09	IM	M	22	169	75.0	26.3
9	M10	IM	M	21	178	60.0	18.9
10	M11	IM	M	22	170	82.5	28.5
11	M12	IM	M	21	174	66.0	21.8
12	M14	IM	M	22	177	66.0	21.1
13	M17	IM	F	20	160	53.0	20.7
14	M20	IM	F	22	158	62.0	24.8
15	M23	MNG	F	29	163	63.0	23.7
16	M24	MNG	F	32	157	58.0	23.5
17	M25	MNG	M	38	172	87.0	27.8
18	M27	MNG	M	25	181	76.0	23.2
19	M28	MNG	F	28	150	50.0	22.2
20	M29	MNG	F	26	166	66.0	24.0
21	M30	MNG	F	32	160	60.0	23.4
22	M31	MNG	F	28	156	75.0	30.8
23	M32	MNG	M	30	165	76.0	27.9
24	M33	MNG	F	28	158	63.0	25.2
25	M34	MNG	F	27	170	63.0	21.8
26	M36	MNG	M	24	176	74.0	23.9
27	M37	MNG	M	31	175	85.0	27.8

注: IM: 内蒙古; MNG: 蒙古国; F: 女性; M: 男性。

Note: IM: Inner Mongolia; MNG: Mongolia; F: Female; M: Male.

赛默飞科技公司; UPV 凝胶成像分析系统, 上海赛智创业科学公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; 核酸蛋白定量仪, Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品采集

所有志愿者均掌握统一样品采集方法, 样品采集工作由志愿者个人完成。使用实验室提供的无酶无菌管, 采集约 15 g 新鲜粪便样品后立即加入 15 mL 保护液, 编号后立即放入液氮罐冷冻并

尽快运回实验室存放于 -80°C 冰箱, 以备后续实验操作。

1.2.2 样品细菌宏基因组 DNA 提取

样品充分混匀后取 0.3 g, 采用 Power Fecal[®] DNA Isolation Kit 抽提样品中细菌宏基因组 DNA, 操作按照说明书要求步骤进行。获得的 DNA 样品需要通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计检验其完整度、纯度以及浓度, DNA 样品存于 -80°C 冰箱备用。

1.2.3 乳酸菌和双歧杆菌的基因组目的片段扩增、建库及测序

乳酸菌 16S rRNA 基因特异性扩增正向引物: 5'-GCTCAGGAYGAACGCGYGG-3'; 反向引物: 5'-CACCGCTACACATGRADTTC-3'^[10]。双歧杆菌特异性扩增正向引物: 5'-GGTAAGAGTCGGACGCTGTGCAATAA-3'; 反向引物: 5'-GAAAGAAGAAGCCACCAAGTAA-3'。所有引物两端各加一段包含 16 个碱基的识别标签(Barcode), 用于区分同一文库中的不同样品。以提取的细菌宏基因组 DNA 作为模板, 用上述引物进行目的片段扩增, 每个样品均对应特有的标签引物。PCR 反应体系: KAPA HiFi HotStart Ready Mix 25 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L)各 1.2 μ L, 模板 DNA 1.5 μ L, ddH₂O 21.1 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 1 min 30 s; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 28 次循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min, 4 $^{\circ}$ C 终止。

扩增反应在 Applied Biosystems PCR 仪中进行, PCR 反应产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后暂存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。各样品的 PCR 产物经纯化后等质量混合, 用 Pacific Biosciences SMRT bell TM Template Prep Kit 1.0 构建文库, 严格根据试剂盒说明书步骤执行。构建好的文库加测序引物和聚合酶后使用 PacBio RS II 仪器上机测序。

1.2.4 高质量序列的提取

使用 SMRT[®] Analysis Server V2.3.0 中的 RS_ReadsOfinsert.1 流程对原始序列进行质控, 乳酸菌的质控条件为: (1) 插入片段重复测序的次数 ≥ 5 ; (2) 最短插入序列长度为 650 bp; (3) 最长序列长度为 850 bp; (4) 最小预测精确度为 90%。双歧杆菌质控条件受扩增片段长度的影响, 因此将最小插入片段长度和最大插入片段长度分别设置为 600 bp 和 800 bp, 其他质控条件同上。符合以上标准的序列定义为高质量序列, 纳入下一步的生物信息学分析。

根据标记的 Barcode 将原始序列划分到每个样品中, 然后去掉 Barcode 和引物序列, 使用 QIIME

平台(V1.70)对高质量的序列进行生物信息学分析。

乳酸菌分析主要步骤:

(1) PyNAST 校准并将序列排齐, 在 100% 相似性下进行 Uclust 归并, 建立无重复的 16S rRNA 基因全长序列集, 随后按照序列相似性划分操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)。

(2) 应用 Usearch (V6.1)^[11]检测属于嵌合体序列的 OTU 序列, 并在 QIIME 平台下去除。

(3) 对各 OTU 代表性序列分别使用 Greengenes (V13.8)、RDP (V11.5)和 Silva (V128)数据库进行比对, 使用内部脚本整合 3 个数据的注释结果并最终确定各 OTU 的注释结果。基于 OTU table 计算各样品菌群在属和种水平的组成。

(4) 使用 FastTree (V2.1.3)^[12]软件计算基于 OTU 代表性序列的进化树。

(5) 抽平各样本测序序列数并结合步骤(4)生成的进化树进行基于加权 (Weighted) 和非加权 (Unweighted) UniFrac 距离的主坐标分析。

(6) 以所有样品中测序量最低的样品测序量为基准, 计算各样本香农指数 (Shannon-Wiener index)、辛普森指数 (Simpson index)、Chao1 指数和发现的物种数量指数 (Observed species), 用于评估各样本 α 多样性。

双歧杆菌与乳酸菌数据处理步骤主要差异为序列比对数据库不同。双歧杆菌扩增的目的片段为 *rpsK* 基因, 采用的数据库为从各双歧杆菌菌株基因组提取目的片段构建得到, 其他步骤与乳酸菌数据处理过程相同。

1.2.5 数据处理

分别采用 Wilcoxon 秩和检验、Kruskal-Wallis 多组检验比较两组和多组样品间 α 多样性差异。采用 LefSe (Linear discriminant analysis effect size)分析比较不同分组间的差异菌群。使用主坐标分析 (Principal coordinate analysis, PCoA)这一非约束性的排序方法对样本分布做无偏见的观察。基于 R 语言“vegan”包中的 Anosim 函数进行多元方差分析 (Permutational multivariate analysis of variance,

Permanova), 计算不同分组对志愿者目的菌群影响的大小。使用“psych”包中的“corr.test”函数进行不同菌属和菌种间的 Spearman 相关性分析, 并使用“gplots”包以热图的形式展现相关性结果。使用“ggplot2”包对 QIIME 分析得到的原始数据进行可视化处理。

1.2.6 核酸序列登记号

实验所获得的测序数据均已上传到 MG-RAST 数据库 (<http://metagenomics.anl.gov/>), 登录号: mgp89183。

2 结果与分析

人体肠道菌群被认为是人体的又一重要“器官”, 受到遗传基因、年龄、饮食习惯、疾病发生、生活环境、地域等诸多因素影响, 同时肠道菌群也会对宿主的代谢、营养吸收、免疫功能以及神经功能调节产生作用^[1]。本研究所征集的 27 名健康蒙古族志愿者中包括 14 名来自中国内蒙古和 13 名来自蒙古国的留学生志愿者。志愿者年龄在 20–32 岁之间, 平均年龄 24.7 岁。在提供样品时均没有内分泌失调和代谢性疾病或其他任何的胃肠道疾病, 均为健康的青年人, 在实验前的 6 个月内没有摄入过抗生素类药物, 排除抗生素对肠道菌群的干扰。14 名中国志愿者来自内蒙古自治区锡林郭勒盟(6 人)、兴安盟(4 人)、鄂尔多斯市(2 人)和呼伦贝尔市(2 人), 生活在牧区或半农半牧区。通过对志愿者的问卷调查显示, 日常饮食以乳品和肉食(羊肉、牛肉、骆驼肉)为主, 搭配少量米面和蔬菜水果, 其中肥胖(BMI>25)占比 28.6% (4/14), 男女比例为 1:1。13 名留学生志愿者中 11 位来自蒙古国乌兰巴托市, 2 位来自中央省, 虽然生活在市区, 但日常仍是以乳、肉食品为主, 保留着传统的饮食模式, 以羊肉为主, 米面食品和青菜食用相对内蒙古的志愿者要少, 其中肥胖(BMI>25)占比 38.5% (5/13), 男女比例为 4:9。总体来说, 志愿者为健康青年人, 年龄分布上没有明显差距; 内蒙古志愿者的人群地域分布较广, 蒙古国志愿

者相对较集中; 蒙古国留学生志愿者的肥胖比例高于内蒙古志愿者, 但二者之间没有显著差异 ($\chi^2=0.30, P>0.05$)。

2.1 乳酸菌组成与差异分析

2.1.1 志愿者肠道中乳酸菌组成

应用三代测序技术测序后, 全部样品共获得原始下机数据量 98 036 条, 经 QIIME 处理后发现其中共有 20 420 条序列属于乳酸菌, 占比为 20.83%。通过内部脚本提取这部分序列用于后续各样品乳酸菌多样性分析。

27 名志愿者的肠道菌群样品中乳酸菌在属水平和种水平的组成情况如图 1 所示, 可以看出不同个体肠道菌群中乳酸菌的组成及相对含量存在较大差异。从整体来看, 在门水平上, 所有志愿者肠道微生物中鉴定到的乳酸菌均属于硬壁菌门 (*Firmicutes*)。在属的水平上, 共鉴定到 9 个乳酸菌属, 平均相对含量在 1% 以上的菌属共有 4 个, 包括链球菌属 (*Streptococcus*, 63.44%)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*, 30.49%)、瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*, 2.80%) 和魏斯氏菌属 (*Weissella*, 2.11%)。此外本研究还鉴定到了部分相对含量在 1% 以下的乳酸菌属, 包括肠球菌属 (0.63%)、毛螺菌属 (*Lachnospira*, 0.36%)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*, 0.10%)、肉食杆菌属 (*Carnobacterium*, 0.03%) 和光冈菌属 (*Mitsuokella*, 0.01%), 具体结果如图 1A 所示。

在种的水平上, 本研究在所有志愿者样品中共发现 68 个乳酸菌种, 分布情况如图 1B 所示, 平均每名志愿者肠道乳酸菌菌种的数目为 16 个。所有样品中, 平均相对含量在 1% 以上的乳酸菌种共有 8 个, 主要包括唾液链球菌 (*Streptococcus salivarius*, 36.41%)、瘤胃乳酸杆菌 (*Lactobacillus ruminis*, 17.94%)、德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*, 3.11%)、罗氏乳杆菌 (*Lactobacillus rogosae*, 2.23%)、轻型链球菌 (*Streptococcus mitis*, 2.18%)、阴道乳杆菌 (*Lactobacillus vaginalis*, 2.02%)、魏斯氏乳杆菌 (*Weissella confusa*, 1.54%) 和鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*, 1.09%)。

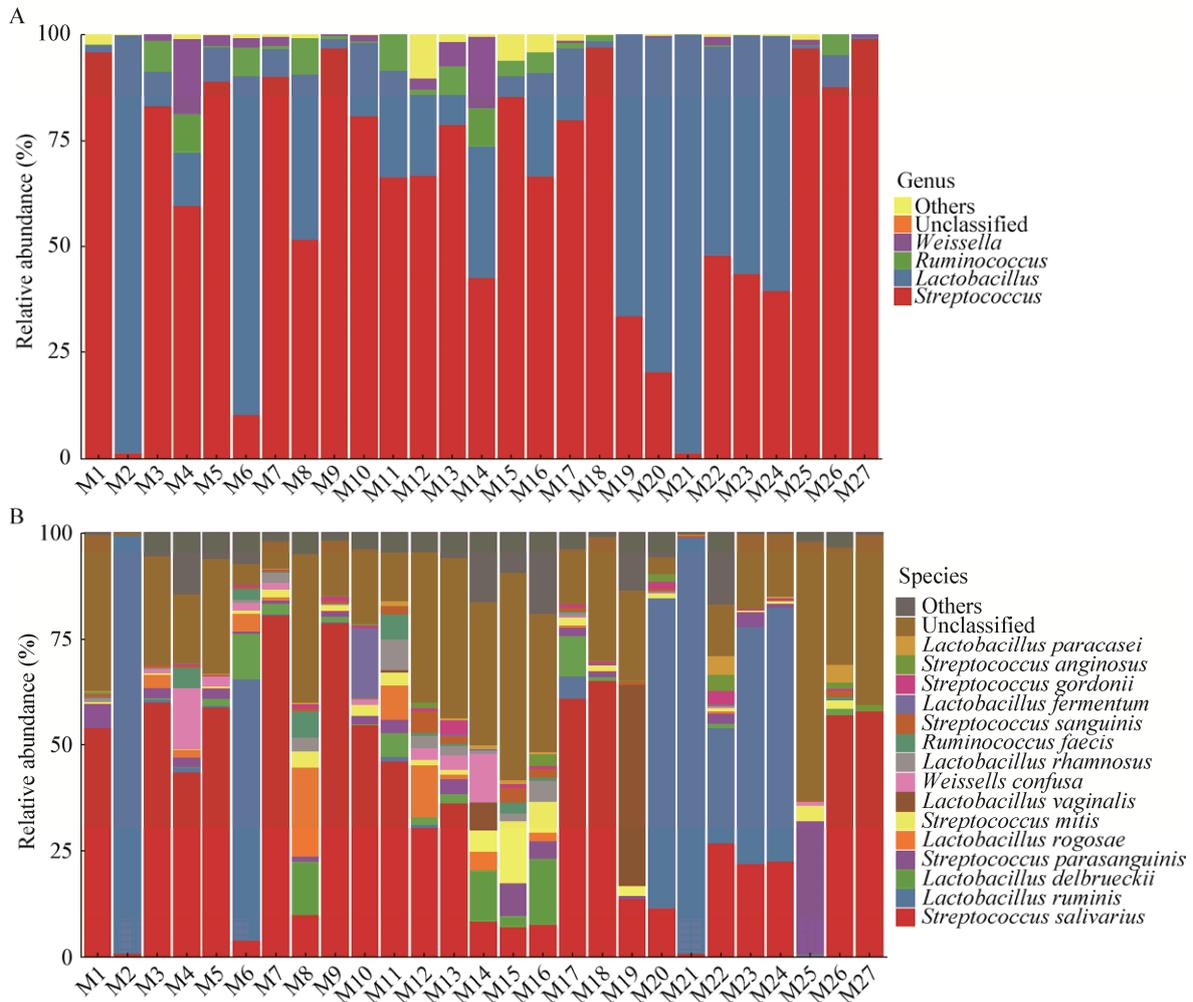


图 1 志愿者肠道菌群样品中乳酸菌在属水平(A)和种水平(B)组成
 Figure 1 The composition of LAB in samples at the genus (A) and species (B) level

2.1.2 性别、BMI 值和地域对志愿者肠道菌群的影响

参考文献[13]将 27 名志愿者根据 BMI 值分为肥胖组(BMI>25)和正常组(18.5<BMI≤24.9), 性别、BMI 值和地域对志愿者肠道中乳酸菌组成的影响如图 2 所示。由图 2 可以看出, 男性志愿者乳酸菌菌群中链球菌属平均含量高于女性志愿者, 女性肠道菌群中乳杆菌属和魏斯氏菌属平均相对含量高于男性; 肥胖组较正常组而言乳杆菌属和魏斯氏菌属略有增加; 来自我国内蒙古自治区的志愿者肠道菌群中乳杆菌属低于蒙古国志愿者的, 而链球菌属、瘤胃球菌属和魏斯氏菌属平均相对含量较高。在种水平上, 肥胖组和正常组没有显著差异 (P>0.05); 男性志愿者肠道中唾液链球菌含量显著

高于女性(P<0.05, 图 3), 而在女性志愿者中瘤胃乳杆菌和阴道乳杆菌较丰富, 后者在男性中几乎不存在。此外, 本研究基于 Chao1 指数和发现的物种数量指数统计发现: 来自我国内蒙古自治区的志愿者肠道菌群中乳酸菌菌种较丰富, 其鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、罗氏乳杆菌(*Lactobacillus rogosae*)、魏斯氏乳杆菌(*Weissella confusa*)和扭链瘤胃球菌(*Ruminococcus torques*)相对含量显著高于蒙古国志愿者(P<0.05, 图 3)。

2.1.3 志愿者肠道乳酸菌群落结构影响因素比较分析

为了进一步探究性别、BMI 值和地域对菌群结构的影响, 进行了基于 Bray-Curtis 距离的

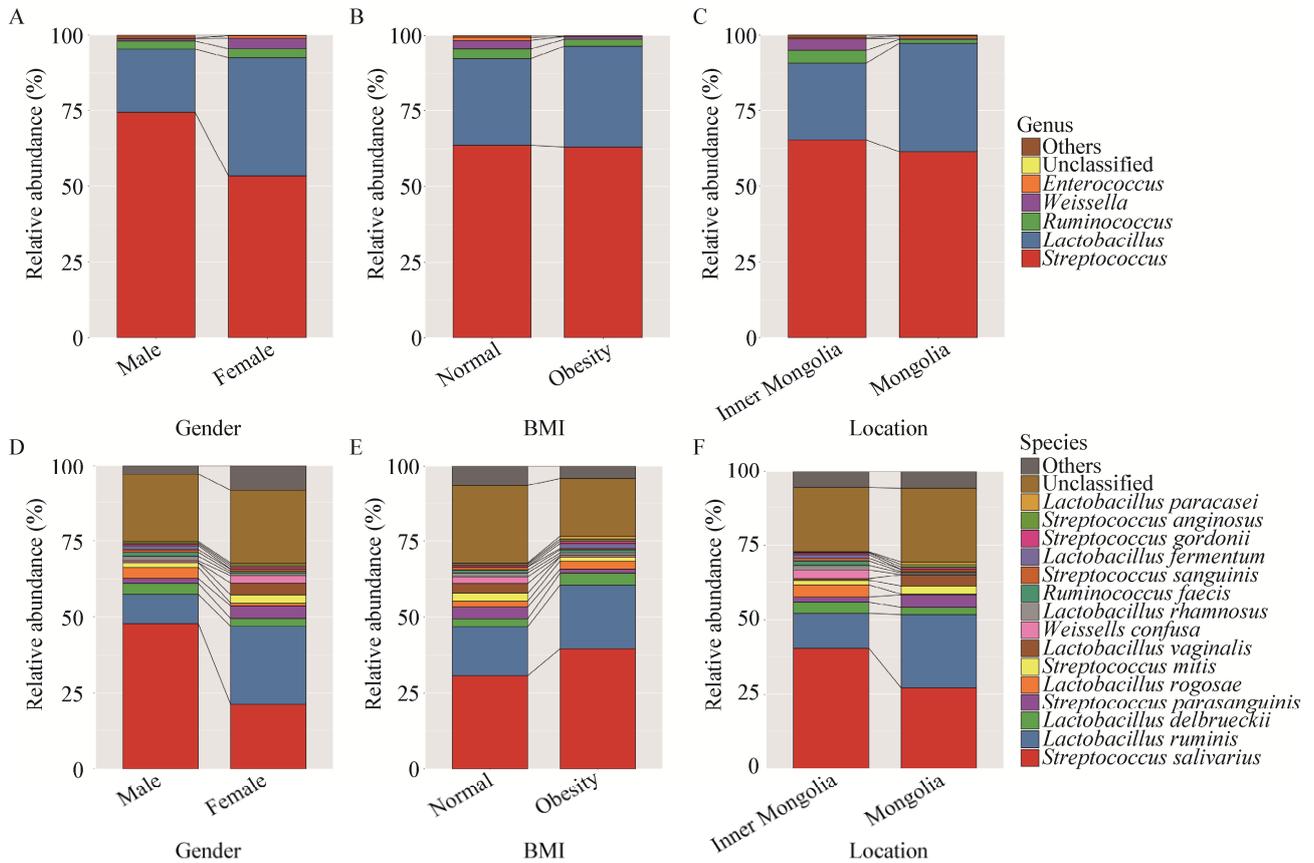


图 2 志愿者性别、BMI 值和地域对肠道中乳酸菌组成的影响

Figure 2 Effects of gender, BMI and location on composition of LAB in intestine

Note: A–C: Effect of gender, BMI and location on genus level; D–F: Effect of gender, BMI and location on species level.

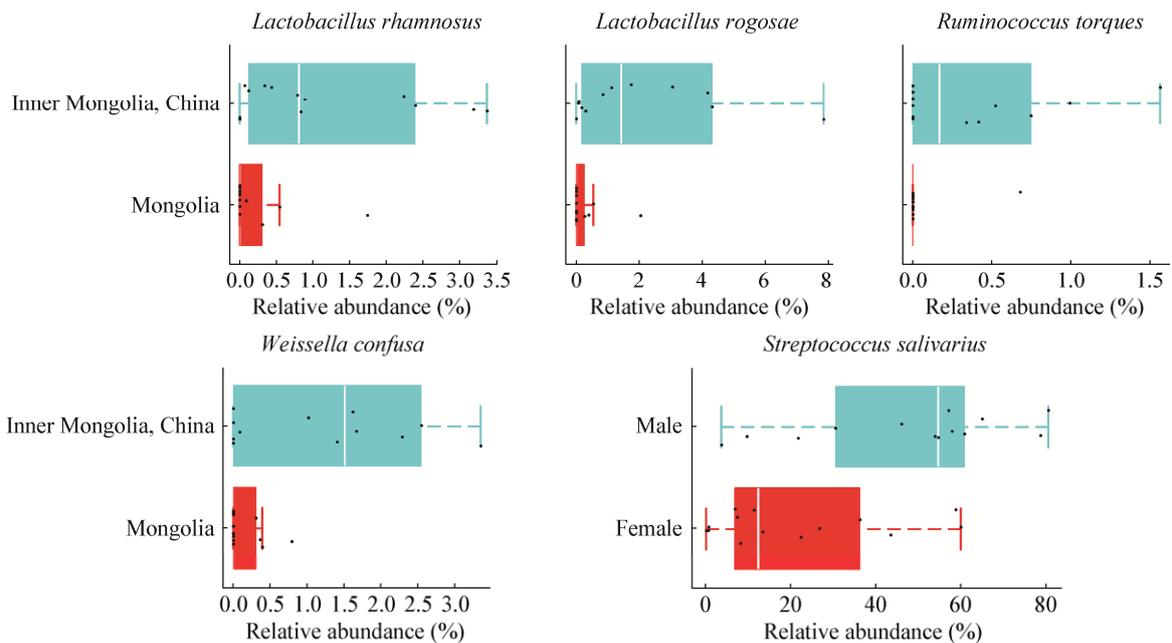


图 3 在性别、BMI 值和地域因素影响下具有显著差异的乳酸菌菌种 ($P < 0.05$)

Figure 3 LAB strains with significant differences in gender, BMI and location factors under the influence ($P < 0.05$)

主坐标分析, 用于直观展现不同分组个体肠道乳酸菌菌群构成的差异, 进一步通过多元方差分析计算了各分组是否会对志愿者肠道乳酸菌菌群结构造成显著影响。由图 4 可知, 性别、BMI 值和地

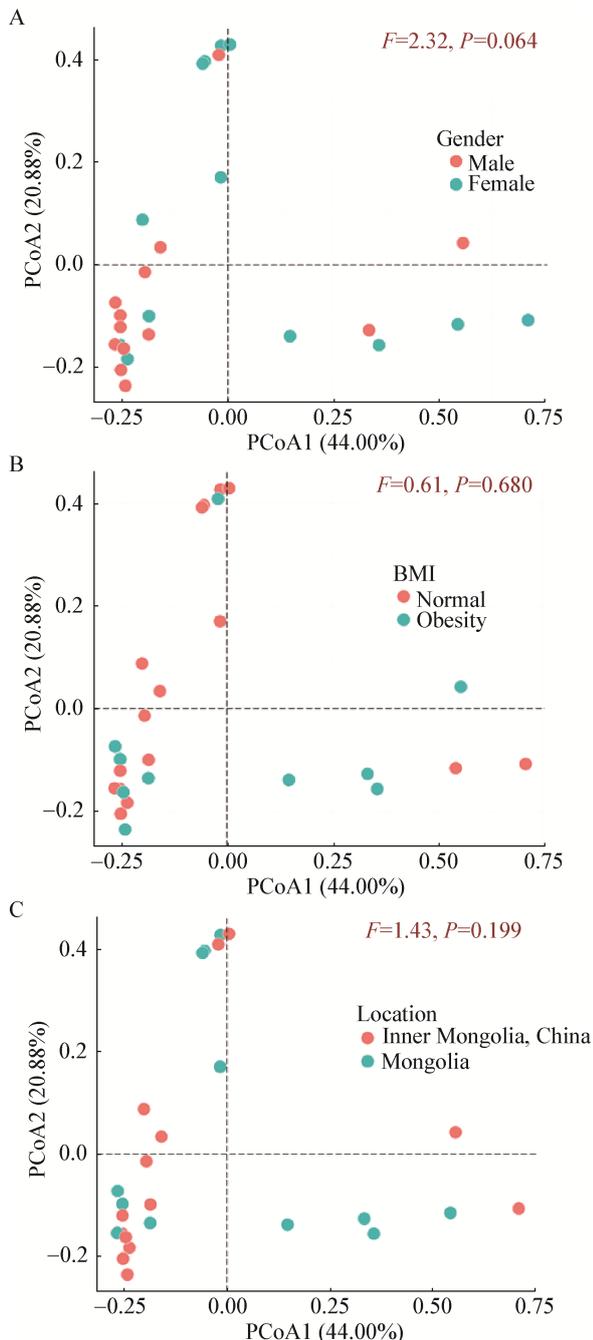


图 4 各样品中乳酸菌菌群基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析

Figure 4 Principal component analysis of *Lactobacillus* in each sample based on Bray-Curtis distance

域均未对肠道菌群结构造成显著性影响($P>0.05$), 但基于性别的分组 P 值较接近 0.05, 进一步比较不同分组 Permanova 计算得到的 F 值, 发现对肠道中乳酸菌影响因素大小排序分别为性别>地区>肥胖。

2.2 志愿者肠道中双歧杆菌组成

2.2.1 志愿者肠道中双歧杆菌的组成分析

全部样品共获得原始下机数据量 62 046 条, 所有志愿者测序数据共鉴定到 11 个双歧杆菌菌种, 平均相对含量在 1% 以上的共有 5 个, 分别为青春双歧杆菌(*B. adolescentis*, 39.88%)、长双歧杆菌(*B. longum*, 27.15%)、链状双歧杆菌(*B. catenulatum*, 26.30%)、两歧双歧杆菌(*B. bifidum*, 3.92%)和角双歧杆菌(*B. angulatum*, 1.71%)。含量较低的双歧杆菌包括动物双歧杆菌(*B. animalis*, 0.15%)、短双歧杆菌(*B. breve*, 0.03%)、*B. kashiwanohense* (0.01%)、*B. boum* (0.001%)、大双歧杆菌(*B. magnum*, 0.001%)和家兔双歧杆菌(*B. cuniculi*, 0.001%)。

基于图 5 发现, 所有样品以加权 UniFrac 距离进行 UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic means) 聚类时, 样品可以分为两个主要的类群, 两个类群的主要差异在于齿双歧杆菌 (*Bifidobacterium catenulatum*) 的相对含量存在显著差异($P<0.001$)。

2.2.2 志愿者肠道双歧杆菌群落结构的影响因素比较分析

为了进一步验证性别、BMI 值和地域对志愿者肠道双歧杆菌可能的影响, 使用基于 UniFrac 距离的 Permanova 检验将这 3 个因素对菌群带来的差异进行分析, 结果如图 6 所示。结果显示, 性别、BMI 值和地域均未能显著影响志愿者肠道中双歧杆菌的结构($P>0.05$)。

2.3 志愿者肠道中乳酸菌和双歧杆菌相关性分析

为了揭示肠道中乳酸菌之间、双歧杆菌之间以及乳酸菌和双歧杆菌之间的相关关系, 对样品中的主要乳酸菌和双歧杆菌进行了 Spearman 相关性分析, 不同菌种之间的相关关系见表 2。

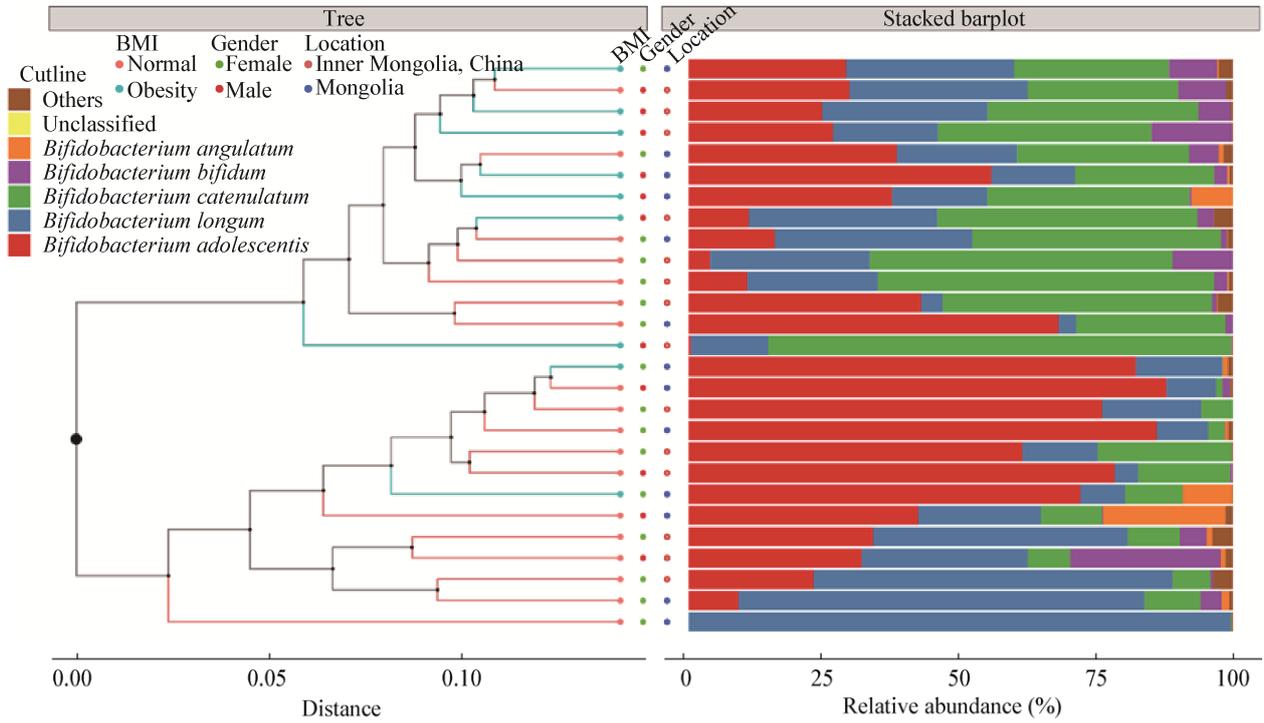


图 5 各样品中双歧杆菌组成含量聚类分析
 Figure 5 Cluster analysis of *Bifidobacterium* composition in each sample

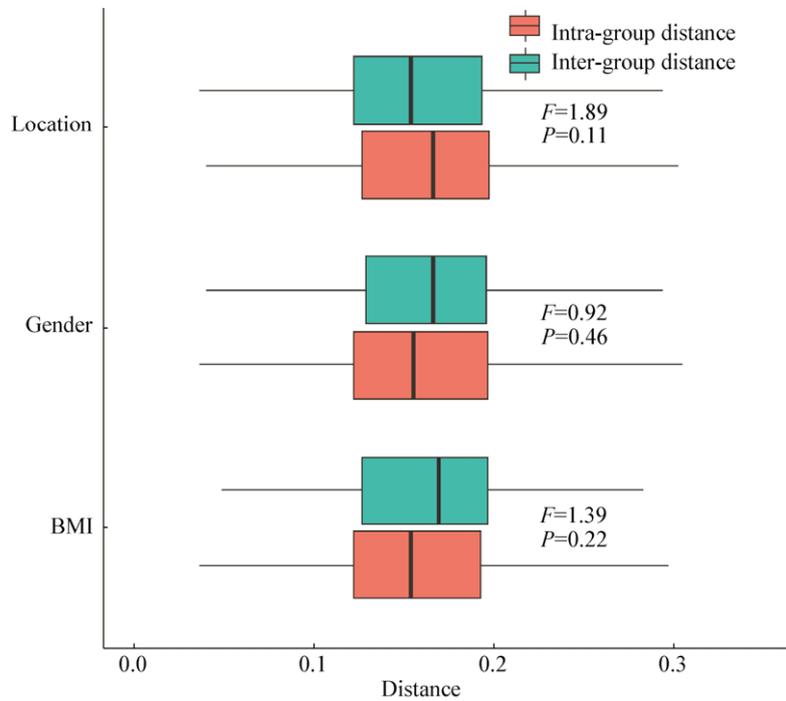


图 6 志愿者的性别、BMI 值和地域对样品中双歧杆菌组成的影响
 Figure 6 Effects of gender, BMI value and geographical location on *Bifidobacterium* composition

表 2 菌种之间的相关关系

Table 2 The correlation between strains

细菌种类之间关系 Relationship between bacterial species	菌种 Strain	菌种 Strain	相关性 Relevance	P 值 P value
乳酸菌之间 Between LAB	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. rogosae</i>	+	<0.001
	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. rhamnosus</i>	+	<0.001
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rogosae</i>	+	<0.001
	<i>L. delbrueckii</i>	<i>S. mitis</i>	+	<0.01
	<i>W. confusa</i>	<i>L. rogosae</i>	+	<0.01
	<i>L. ruminis</i>	<i>S. parasanguinis</i>	-	<0.05
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. parasanguinis</i>	+	<0.05
双歧杆菌之间 Between <i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. adolescentis</i>	-	<0.001
	<i>B. catenulatum</i>	<i>B. adolescentis</i>	-	<0.01
	<i>B. bifidum</i>	<i>B. catenulatum</i>	+	<0.01
乳酸菌与双歧杆菌之间 Between LAB and <i>Bifidobacterium</i>	<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. longum</i>	+	<0.05
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. adolescentis</i>	-	<0.05
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>	+	<0.05

注: +: 正相关; -: 负相关.

Note: +: Positive correlation; -: Negative correlation.

由相关性结果可知, 乳酸菌彼此之间相关性较为密切, 且彼此之间多为正相关关系。双歧杆菌具有相关关系的菌种只有 3 对, 其中 2 对为负相关关系。乳酸菌与双歧杆菌不同菌种间相关性不尽相同, 与具体的菌种有关。

3 讨论

乳酸菌和双歧杆菌是人体肠道中的重要益生菌, 在众多领域应用极为广泛。然而, 所有乳酸菌在健康成人肠道中的平均相对含量均非常低, 累计仅占有肠道菌群的 0.01%–1.8%^[14]。双歧杆菌是新生儿肠道中最早定殖的优势菌属之一, 而在成人肠道中, 其相对含量始终处于较低的水平^[15]。准确揭示这部分在人类肠道中含量较低, 同时又对人体健康极为重要的益生菌群的丰度和多样性组成, 对于后续评估基于人体的各项药物、益生菌/元等的干预实验和个性化医疗的发展具有重要意义。对于具有民族饮食特点的蒙古族人群, Zhang 等^[16]应用荧光定量 PCR 技术和基于 16S rRNA 基因 V1–V3 可变区的高通量测序技术, 对蒙古国 64 名蒙古族志愿者肠道菌群进行了为期一年的动态监测, 在属的水平上揭示了蒙古族人群的核心菌群

构成及变化情况。在本研究中, 我们首次采用乳酸菌和双歧杆菌的特异性引物扩增与 PacBio SMRT 三代测序相结合的技术, 在种水平探讨了蒙古族人群肠道中乳酸菌和双歧杆菌的丰度和生物多样性。此外, 有研究发现地域、年龄、性别和个体 BMI 均会对人体肠道菌群组成产生影响^[15,17-18], 本研究对比分析了地域、性别和个体 BMI 因素对志愿者体内乳杆菌和双歧杆菌可能的影响, 由于志愿者年龄分布较窄未做考虑。

本研究采用乳酸菌特异性引物扩增的产物中约有 20.83% 的序列是属于目的片段, 远大于乳酸菌在人体肠道微生物中所占比例, 样本中共检测到 68 个乳酸菌种, 其中 *Streptococcus* 和 *Lactobacillus* 在志愿者样品中平均相对含量为 38.59% 和 26.39%。Zhang 等发现蒙古族肠道中的核心菌群隶属于 *Prevotella*、*Bacteroides*、*Faecalibacterium*、*Ruminococcus*、*Subdoligranulum* 和 *Coprococcus*^[19], 不包括 *Streptococcus* 和 *Lactobacillus*, 这与肠道中乳酸菌的实际含量较低是相符的。

结果显示唾液链球菌占比最高(36.41%), 唾液链球菌是口腔早期定殖菌, 其同时可定殖于肠

道中,具有下调小肠上皮细胞核因子 κ B (Nuclear factor κ B, NF- κ B)的作用,在肠道炎症反应和内稳态中发挥重要功能^[20],然而也有研究发现该菌在肝性脑病患者肠道微生物中丰度较高,可以作为治疗过程中的生物标记物^[21],上述研究表明唾液链球菌在人体肠道中的作用具有两面性。

不同志愿者肠道中乳酸菌和双歧杆菌的丰度和多样性指数不同,但基于统计学分析显示:不同性别、不同地域以及不同 BMI 值的志愿者之间乳酸菌和双歧杆菌的结构并没有显著差异($P>0.05$)。He 等对我国广东地区 7 009 个受试者的肠道菌群进行分析,发现菌群差异与受试者所在的地区关联最强,远超年龄、BMI 值、性别等指标^[21]。这一现象在本研究结果中并没有显示,可能的原因是:(1)由于志愿者所在地区较分散,不像广州地区人群比较集中,且总样本量比较少,特征差异未显示;(2)由于大部分蒙古国留学生志愿者已到我国内蒙古生活,由地域引起的较大差异受饮食、环境等因素的影响而缩小。

相对而言,女性肠道菌群中乳杆菌属和魏斯氏菌属平均相对含量高于男性,尤其是瘤胃乳酸杆菌和阴道乳杆菌较丰富,而男性志愿者肠道几乎不存在阴道乳杆菌,但其唾液链球菌含量是高于女性的。Suzuki 等针对酸奶消费与健康青年肠道菌群的相关性研究发现,酸奶消费对志愿者肠道中乳酸菌的影响也存在性别差异^[22]。然而,性别是如何影响肠道微生物组成这一问题目前仍没有定论,其中的一种可能是男女身体特征不同引起了菌群定殖差异,更详尽的影响机制还需要后续研究进一步探索。对于双歧杆菌的研究结果显示,长双歧杆菌的相对含量比较高,此前的研究发现长双歧杆菌部分亚种已经进化出运输和消耗多种不同结构寡糖的能力,使其在定殖方面比其他肠道微生物更具优势^[23],这可能是该菌在肠道双歧杆菌种所占比例较高的原因之一。Milani 等的报道显示链状双歧杆菌和青春双歧杆菌是包括人类在内的灵长类动物肠道中典型的双歧杆菌菌种^[24],

这与本研究中青春双歧杆菌、长双歧杆菌和链状双歧杆菌是志愿者肠道总双歧杆菌中占比最多的结果相吻合。根据肠道中优势菌群双歧杆菌菌种的不同,可以将志愿者分为 2 个不同类群,其中齿双歧杆菌(*B. catenulatum*)的相对含量存在显著差异($P<0.001$)。Fang 等^[25]研究发现齿双歧杆菌可以改善回肠粘膜损伤和肠道菌群生态失调,特别是在机会性致病菌 *Parasutterella* 菌属大量存在和可产生短链脂肪酸的厌氧菌、粪球菌属和梭菌属细菌数量减少的情况下,齿双歧杆菌可通过调节肠道菌群而对肝脏起到保护作用。本研究中志愿者肠道菌群中的高齿双歧杆菌含量是否对肝脏有更好的保护作用还需进一步研究。

本研究还发现乳酸菌和双歧杆菌各有部分菌属或菌群存在显著相关关系,如鼠李糖乳杆菌和长双歧杆菌显著相关,Inturri 等^[26]也研究发现鼠李糖乳杆菌 HN001 和长双歧杆菌 BB536 在体内对消化液的耐受有协同增强的正相关作用。本研究结果在一定程度上反映了肠道菌种之间复杂的多元化关系,也可能正是这种菌群间的相互平衡、相互制约最终维持了人体肠道菌群的稳定性。

4 结论

综上,本研究为在种水平深入了解肠道中乳酸菌和双歧杆菌多样性提供了新的研究思路和实施方案,研究结果首次揭示了在种的水平上对健康蒙古族肠道中乳酸菌和双歧杆菌多样性的认识。然而目前仍有部分结果无法得到充分解释,尚需后续研究逐步揭示相关菌属或菌种的功能以及菌群间存在的各种作用机制。

REFERENCES

- [1] Valdes AM, Walter J, Segal E, et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health[J]. *BMJ*, 2018, 361: k2179
- [2] Nie Y, Luo FJ, Lin QL. Dietary nutrition and gut microflora: A promising target for treating diseases[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 75: 72-80
- [3] Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome[J]. *Genome Medicine*, 2016, 8: 51
- [4] Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016,

- 14(1): 20-32
- [5] Forssten SD, Sindelar CW, Ouwehand AC. Probiotics from an industrial perspective[J]. *Anaerobe*, 2011, 17(6): 410-413
- [6] Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography[J]. *Nature*, 2012, 486(7402): 222-227
- [7] Zhang JC, Guo Z, Xue ZS, et al. A phylo-functional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(9): 1979-1990
- [8] Yang JX, Cao JL, Xu HY, et al. Bacterial diversity and community structure in Chongqing radish paocai brines revealed using PacBio single-molecule real-time sequencing technology[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98(9): 3234-3245
- [9] Kumari M, Swarnkar MK, Kumar S, et al. Complete genome sequence of potential probiotic *Lactobacillus* sp. HFC8, isolated from human gut using PacBio SMRT sequencing[J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(6): e01337-15
- [10] Hou QC, Bai XY, Li WC, et al. Design of primers for evaluation of lactic acid bacteria populations in complex biological samples[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2045
- [11] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461
- [12] Price MN, Dehal PS, Arkin AP. Fasttree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2009, 26(7): 1641-1650
- [13] World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic[M]. Geneva: World Health Organization, 2000
- [14] Zhang YJ, Li S, Gan RY, et al. Impacts of gut bacteria on human health and diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(4): 7493-7519
- [15] 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
- [16] Zhang ZG, Zhai HQ, Geng JW, et al. Large-scale survey of gut microbiota associated with MHE via 16S rRNA-based pyrosequencing[J]. *The American Journal of Gastroenterology*, 2013, 108(10): 1601-1611
- [17] Louis P, Scott KP, Duncan SH, et al. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(5): 1197-1208
- [18] Vaughan EE, Heilig HGHJ, Ben-Amor K, et al. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 29(3): 477-490
- [19] Riva A, Borgo F, Lassandro C, et al. Pediatric obesity is associated with an altered gut microbiota and discordant shifts in *Firmicutes* populations[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(1): 95-105
- [20] Bajaj JS, Betrapally NS, Hylemon PB, et al. Salivary microbiota reflects changes in gut microbiota in cirrhosis with hepatic encephalopathy[J]. *Hepatology*, 2015, 62(4): 1260-1271
- [21] He Y, Wu W, Zheng HM, et al. Regional variation limits applications of healthy gut microbiome reference ranges and disease models[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(10): 1532-1535
- [22] Suzuki Y, Ikeda K, Sakuma K, et al. Association between yogurt consumption and intestinal microbiota in healthy young adults differs by host gender[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 847
- [23] Underwood MA, German JB, Lebrilla CB, et al. *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis*: Champion colonizer of the infant gut[J]. *Pediatric Research*, 2015, 77(1/2): 229-235
- [24] Milani C, Duranti S, Bottacini F, et al. The first microbial colonizers of the human gut: Composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota[J]. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 2017, 81(4): e00036-17
- [25] Fang DQ, Shi D, Lv LX, et al. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* LI09 and *Bifidobacterium catenulatum* LI10 attenuate D-galactosamine-induced liver injury by modifying the gut microbiota[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 8770
- [26] Inturri R, Stivala A, Blandino G. Microbiological characteristics of the probiotic strains *B. longum* BB536 and *L. rhamnosus* HN001 used in combination[J]. *Minerva Gastroenterologica e Dietologica*, 2015, 61(4): 191-197