



引用格式:鲍志宁,甘祥武,邓均尹,等.高通量测序分析合生元制剂对人体肠道菌群组成的影响[J].轻工学报,2019,34(6):1-8.

中图分类号:Q935 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.06.001

文章编号:2096-1553(2019)06-0001-08

高通量测序分析合生元制剂对人体肠道菌群组成的影响

Effect of synbiotic preparation on gut microbiota in human evaluated by high-throughput sequencing

鲍志宁,甘祥武,邓均尹,吕思行

BAO Zhining, GAN Xiangwu, DENG Junyin, LYU Sixing

广州市微生物研究所,广东 广州 510663

Guangzhou Institute of Microbiology, Guangzhou 510663, China

摘要:通过健康成年人连续服用 HZB-1 合生元制剂对其肠道菌群进行干预,利用高通量测序技术对干预前后受试人员肠道菌群结构进行分析,探究服用 HZB-1 合生元制剂对人体肠道菌群组成的影响.结果表明:采用 HZB-1 合生元制剂干预后,受试人员肠道菌群的丰富度、多样性均有明显改善;在“门”水平上,受试人员肠道菌群丰度明显增加,其中厚壁菌门(*Firmicutes*)占比增高,放线菌门(*Actinobacteria*)和变形菌门(*Proteobacteria*)存在一定的动态平衡;在“属”水平上,布劳特氏菌属(*Blautia*)、柔嫩梭菌属(*Faecalibacterium*)、吉米菌属(*Gemmiger*)等有益菌群丰度明显增加,而嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、*Parasutterella* 菌属等有害菌属丰度明显降低.这表明,合生元制剂的摄入,对肠道菌群结构起到有益的调节作用.

关键词:

肠道菌群;合生元制剂;高通量测序技术

Key words:

gut microbiota;
synbiotic preparation;
high-throughput
sequencing

收稿日期:2019-07-23

基金项目:广州市珠江新星专项项目(201806010070)

作者简介:鲍志宁(1983—),女,山东省烟台市人,广州市微生物研究所高级工程师,博士,主要研究方向为食品生物技术.

Abstract: To explore the changes of intestinal microbiota in healthy human by oral HZB-1 synbiotic, the intestinal flora belong intervention was amplified by high-throughput sequencing, ensuring the effect of synbiotic preparation. The experiment showed that the abundance and diversity of the intestinal microbiota of the subjects were significantly improved. At the "gate" level, the abundance of intestinal microbiota increased significantly and the proportion of Firmicutes increased. There was a certain dynamic balance between *Actinobacteria* and *Proteobacteria*. At the "genus" level, the abundance of beneficial bacteria such as *Blautia*, *Faecalibacterium* and *Gemmiger* increased significantly, while the abundance of harmful bacteria such as *Haemophilus* and *Parasutterella* reduced significantly. This indicated that the intake of synbiotic preparation played a beneficial role in regulating the structure of gut microbiota.

0 前言

健康人群肠道内存在种类繁多、结构与功能多样的微生物,其中有益微生物、有害微生物、中性微生物的种类和数量长期处在动态平衡的状态.研究发现,当肠道内有益菌减少、有害菌增多,肠道菌群的多样性与稳定性将被破坏,宿主会出现腹泻、过敏、炎症等肠道疾病甚至肥胖、抑郁等非肠道疾病^[1-3].临床上有越来越多的医案证明,益生菌对急性腹泻、过敏、特异性湿疹等疾病有较好的预防或治疗效果.欧洲儿科胃肠病学、肝病学和营养协会建议使用鼠李糖乳杆菌 LGG 预防儿童腹泻^[4];婴儿双歧杆菌 Binf 能够缓解贝类引起的过敏反应^[5];乳杆菌 F19 能够预防断奶期间的湿疹反应^[6];低聚果糖、低聚半乳糖、菊粉等益生元,能够刺激肠道菌群中益生菌的繁殖,并能抑制部分有害梭菌的增殖^[7];日常分别补充益生菌或益生元,均可有效实现对一系列疾病或生理异常的膳食干预和预防^[8-9].目前市场上含益生菌的产品多为合生元制剂(益生菌+益生元),但有关合生元制剂对人体肠道菌群结构调节能力的研究较少^[10].

基于 Illumina MisSeq 测序平台的高通量测序技术是一种高效的生物学研究手段,其对自然状态下的微生物群落研究较为有效,特别是对于某些生境中的非可培养微生物,高通量测序技术具有其他技术无法比拟的优势,其处理样本大、数据挖掘程度深,采用该技术能够更为

全面、准确地对肠道菌群的结构和多样性进行分析^[11-13].鉴于此,本实验拟选取若干健康成年人连续服用 HZB-1 合生元制剂对其肠道菌群进行干预,借助高通量测序技术对干预前后受试人员肠道菌群结构进行分析,根据干预前后肠道菌群结构差异的变化,考察服用 HZB-1 合生元制剂对人体肠道菌群组成的影响,探究合生元制剂对肠道菌群的调节作用及干预显著的相关菌属,以期为特定人群生产个性化的复合益生菌制剂提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HZB-1 合生元制剂(干酪乳杆菌 LCA05,嗜酸乳杆菌 LAC12,乳双歧杆菌 BAN01,三菌株的活菌比例为 1:1:1, 3.0×10^{12} CFU/颗, 2 g/颗),由广东省微生物种质资源库制备;成人肠道微生态检测试剂盒,深圳弘睿康生物科技有限公司产;低聚果糖、水苏糖,量子高科生物股份有限公司产.

1.2 仪器与设备

752N 紫外分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司产;SMART 生物显微镜,重庆奥特光学仪器有限公司产;LRH-250 生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司产;HHS-2 恒温水浴锅,上海浦东荣丰科学仪器有限公司产;PHS-3C pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司产;5427R 低温高速冷冻离心机,德国

Eppendorf 产; Verti96 PCR 仪, 美国 ABI 产; Colibri 超微量核酸分光光度计, 德国 Berthold 产。

1.3 实验方法

1.3.1 受试人员的样本采集 本实验所用样本采集自中国, 涵盖山东、杭州、广州三地, 受试人员年龄为 30 ~ 57 岁。对受试人员的要求是: 在开始实验的前两个星期内未发生任何疾病; 实验期间未使用抗生素等药物且无接受治疗的情况; 之前 3 个月内未参与其他实验研究。

在 2018 年 7 ~ 8 月期间, 选取 6 名受试人员, 其中男性 4 人、女性 2 人。受试人员均需保持饮食和睡眠正常且无限制, 每日服用 HZB - 1 合生元制剂 2 颗, 进行 4 周的肠道菌群干预; 干预期间记录饮酒、服药、排便、旅行等特殊情况。在干预前和干预后分别统一采集受试人员粪便 1 次, 即为本实验样本。按照取样受试人员和时间的不同对样本进行编号 (H1_Bef, H1_Aft, H2_Bef, H2_Aft, H3_Bef, H3_Aft, H4_Bef, H4_Aft, H5_Bef, H5_Aft, H6_Bef, H6_Aft), 以示区分。

1.3.2 样本总 DNA 的提取和高通量测序 对采集到的样本进行总 DNA 提取和 16S rRNA 基因测序^[14-15]。使用无菌棉签挑取粪便样本于收集管中, 搅拌混匀, 采用 QIAamp 粪便细菌基因组 DNA 分离试剂盒进行总 DNA 提取, 实验步骤参照试剂盒说明书操作, 提取的 DNA 于 -20 °C 温度下保存。将 HS Reagent 与 HS Buffer 按体积比 1 : 200 配制成检测工作液, 取 20 μL 提取的样本 DNA, 加入 180 μL 检测工作液, 轻轻混匀后于室温下孵育 2 min, 采用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 试剂盒检测 DNA 的浓度和质量, 合格样本 DNA 质量 ≥ 3 μg, OD206/OD280 为 1.8 ~ 2.2。

针对细菌 16S rDNA V3 - V4 区进行特异性扩增^[16-17]。采用引物 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTATCTAAT-3') 进行 PCR 扩增, 将得到的 PCR 产物构建 MiSeq 测序文库,

通过 2 × 300 配对末端 PE 的结构进行测序, 并分析每条序列信息, 质控去除不符合要求的测序结果, 将有效测序的最终结果用于分析样本肠道菌群多样性。

1.3.3 样本肠道菌群多样性分析 将测序得到的原始数据经 UCHIME 软件进行拼接和质控, 得到高质量的序列并对其进行嵌合体过滤, 最后采用 QIIME1.9.1 软件进行 OTUs (operational taxonomic units) 聚类。根据 97% 的相似性水平划分分类操作单元 (OTU), 利用 Greengenes databases 数据库对获得的序列进行聚类分析。通过对 OTUs 聚类分析进行物种注释、多样性分析、主坐标分析, 反映各个样本在不同分类水平上的差异, 计算样本肠道菌群的多样性, 确定测序深度是否有效地覆盖了肠道菌群的实际菌株^[18-19]。

2 结果与分析

2.1 服用 HZB - 1 合生元制剂对肠道菌群多样性的影响

表 1 为样本测序分析结果, 图 1 为样本稀释曲线。由表 1 和图 1 可知, 随着测序序列的增加, 有效 OTU 数目逐渐趋于平缓, 表明本次测序基本涵盖了各样本中的肠道微生物群落。

采用 SHAMAN 统计方法对各样本中肠道微生物的丰富度和均匀度进行分析^[20-21], 结果

表 1 样本测序分析结果

组别	原始序列	有效序列	有效 OTU
H1_Bef	56 313	23 008	570
H1_Aft	80 549	42 241	686
H2_Bef	70 100	53 133	444
H2_Aft	77 672	42 294	628
H3_Bef	71 705	56 420	395
H3_Aft	67 394	37 343	541
H4_Bef	48 567	34 468	415
H4_Aft	74 268	35 209	482
H5_Bef	77 913	55 942	671
H5_Aft	69 099	47 925	571
H6_Bef	70 483	50 060	556
H6_Aft	30 564	18 891	750

见表2. 样本的多样性指数可以反映受试人员肠道菌群的丰富度、多样性和均匀度, 其中, Chao1 指数值是对样本中菌群物种总数的评估, 其数值越大, 表明样本物种丰富度越高. 6 名受试人员经干预后的 Chao1 指数值均比干预前的数值高, 表明采用 HZB - 1 合生元制剂干预后, 受试人员的肠道菌群丰富度均增高了. Simpson 和 Shannon 指数值越大, 表明群落多样性越高. 除 H5_Aft 肠道菌群多样性并未得到有效改善外, 其余受试人员在干预后肠道菌群多样性均有所提高. 不同受试人员的肠道菌群在干预前后存在明显差异, 采用 HZB - 1 合生元制剂干预后, 受试人员肠道菌群的丰富度、多样性均有

明显改善, 而改善幅度的差异可能与其生活方式有关.

通过 PCoA 主坐标分析可以研究数据的相似性与差异性, 图 2 为样本肠道菌群“属”水平的 PCoA 主坐标分析结果. 由图 2 可知, PC1 为第一主成分, 其对总菌群代表性的贡献率为 54.2%; PC2 为第二主成分, 其对总菌群代表性的贡献率为 16.4%. 由图 2a) 可知, 干预前后受试人员肠道菌群样本的聚类出现分离, 表明干预前后受试人员的肠道菌群出现差异. 由图 2b) 可知, 干预前后受试人员之间的肠道菌群组成存在一定的相似性, H3_Bef, H5_Bef, H6_Bef 与 H2_Bef 在图中距离接近, 表明四者肠道菌群组成相似, 其中, 干预前后 H2 的肠道菌群组成差异极为明显.

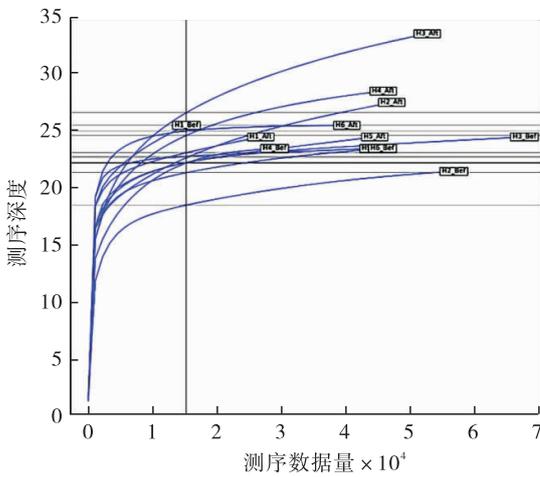


图 1 样本稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction curve analysis of samples

2.2 服用 HZB - 1 合生元制剂对肠道菌群组成的影响

根据样本测序结果, 本实验在“门”“属”分类水平上对肠道菌群的组成进行了分析. 图 3 为受试人员肠道菌群在“门”水平上的差异. 由图 3 可知, 在“门”分类水平上, 服用 HZB - 1 合生元制剂干预前, 6 名受试人员肠道菌群的相关菌株丰度虽存在一定的差异, 但其肠道菌群均主要由拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*) 细菌构

表 2 受试人员肠道菌群丰富性与多样性分析结果

Table 2 Richness and diversity analysis results of gut microbiota of the subjects

组别	Alpha	Chao1	Observed species	Shannon	Simpson	Inv. Simpson
H1_Bef	570	791.478 3	30	4.250 9	0.971 6	35.206 3
H1_Aft	615	1 443.876 7	29	4.758 0	0.980 6	51.678 4
H2_Bef	345	408.551 7	26	3.381 8	0.917 7	12.151 6
H2_Aft	502	760.548 4	31	4.016 8	0.954 4	21.911 2
H3_Bef	271	455.117 6	28	2.694 1	0.856 9	6.987 6
H3_Aft	411	467.073 2	37	3.332 3	0.918 5	12.264 8
H4_Bef	390	565.250 0	24	4.109 6	0.968 8	32.017 7
H4_Aft	387	589.862 1	30	3.715 2	0.943 9	17.835 8
H5_Bef	546	744.139 5	28	4.175 7	0.966 3	29.646 7
H5_Aft	453	782.200 0	29	3.423 2	0.910 1	11.122 6
H6_Bef	409	379.243 2	28	3.759 0	0.957 5	23.527 1
H6_Aft	586	566.557 7	32	4.113 5	0.967 8	31.029 7

成;服用 HZB - 1 益生元制剂干预后,6 名受试人员在“门”水平上的菌群丰度明显增加,且厚

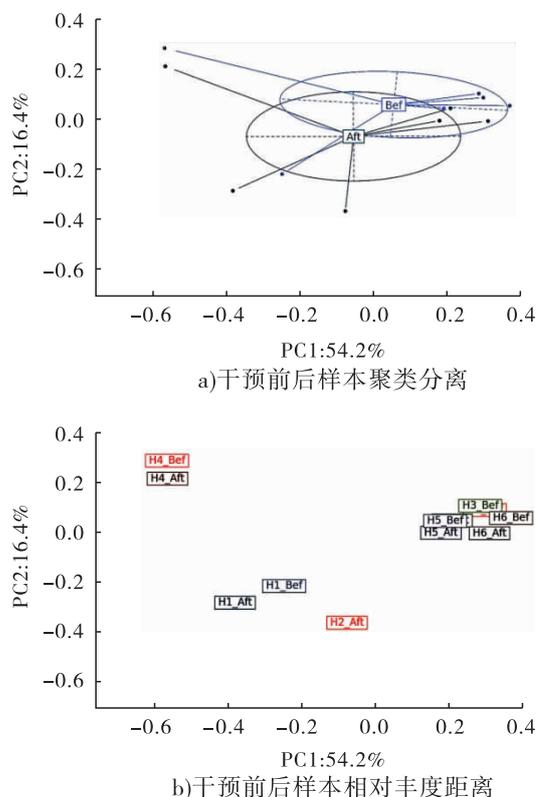


图2 样本肠道菌群“属”水平的 PCoA 主坐标分析结果

Fig. 2 PCoA analysis of the "genus" leve of gut microbiota of samples

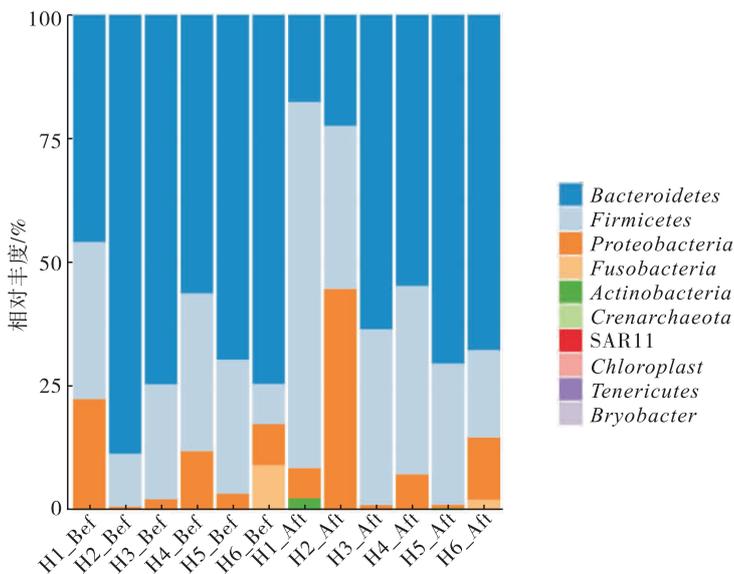


图3 受试人员肠道菌群在“门”水平上的差异

Fig. 3 The differences in the "gate" level of gut microbiota of the subjects

壁菌门占比均有一定程度的增高,这可能与 HZB - 1 合生元制剂中干酪乳杆菌、植物乳杆菌为厚壁菌门细菌且存在一定的调整肠道菌群结构的功能有关. 本实验服用的 HZB - 1 合生元制剂中存在乳双歧杆菌,其属于放线菌门 (*Actinobacteria*),具有一定的增强肌体免疫力的能力和改善肠道菌群结构的功能. 对比 6 名受试人员肠道中的放线菌门占比发现, H1_Aft, H4_Aft 和 H5_Aft 肠道菌群中的放线菌门占比上升, H2_Aft, H3_Aft 和 H6_Aft 肠道菌群中的放线菌门占比下降,与之相应的是 H1_Aft, H4_Aft 和 H5_Aft 肠道菌群中的变形菌门占比下降, H2_Aft, H3_Aft 和 H6_Aft 肠道菌群中的变形菌门占比上升. 变形菌门是分布最为广泛的一门细菌,大量常见的病原菌均属于该门. 本次实验结果显示,这两种菌群在肠道环境中可能存在某种平衡,可以在后续实验中进一步挖掘发现.

图 4 为受试人员肠道菌群在“属”水平上的差异,图 5 为受试人员肠道菌群的相对丰度分布热图. 由图 4 和图 5 可知,在“属”分类水平上,6 名受试人员在服用 HZB - 1 合生元制剂干

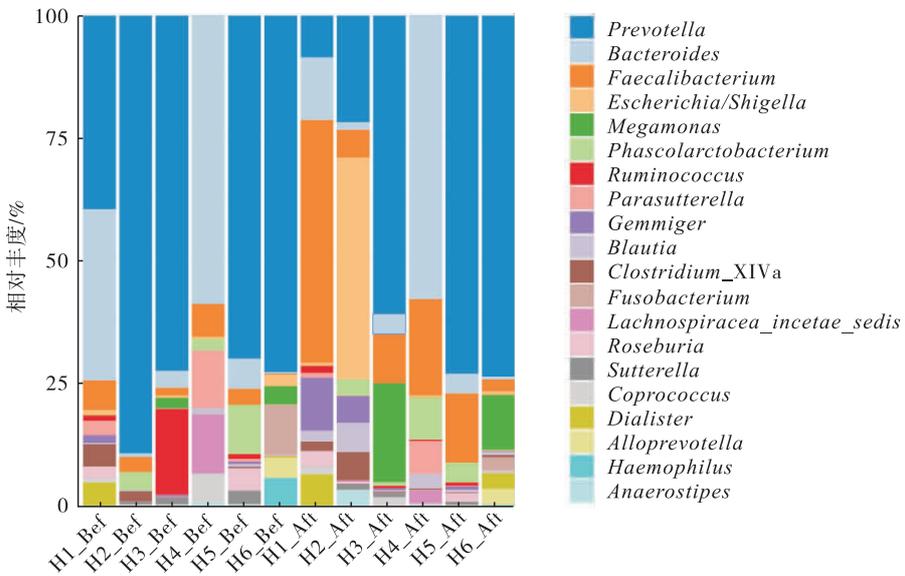


图4 受试人员肠道菌群在“属”水平上的差异

Fig. 4 The differences in the "gate" level of gut microbiota of the subjects

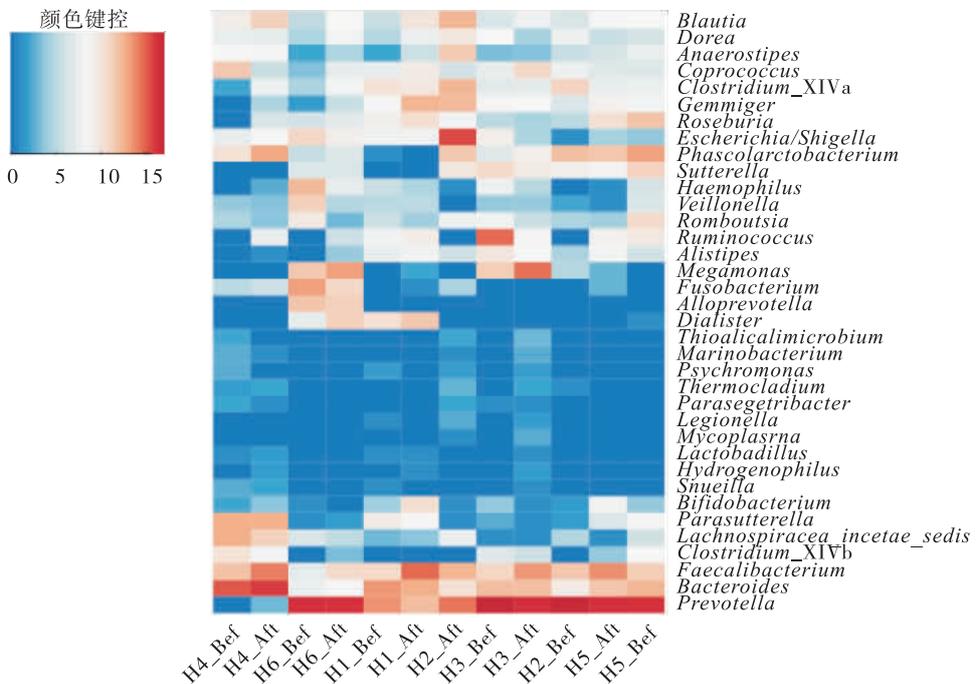


图5 受试人员肠道菌群的相对丰度分布热图

Fig. 5 The heatmap of relative abundance of gut microbiota of the subjects

干预前后的肠道菌群结构都存在极为明显的差异,且干预后菌群种属的相对丰度明显提高,其中普雷沃菌属(*Prevotella*)和拟杆菌属(*Bacteroides*)为核心菌株,这与健康成年人的肠道菌群结构吻合.在服用 HZB-1 合生元制剂干预后,6名受试人员肠道菌群中的布劳特氏菌属

(*Blautia*)、柔嫩梭菌属(*Faecalibacterium*)、吉米菌属(*Gemmiger*)丰度均有明显增加,而嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、*Parasutterella* 菌属丰度均明显降低.研究发现,布劳特氏菌属能够显著提升肠道短链脂肪酸的含量、清除肠道内气体,柔嫩梭菌属能够增加丁酸盐含量、明显改善肠道

炎症,吉米菌属对肠道中丁酸盐的含量也有一定的影响^[22-23];而嗜血杆菌属为常见临床致病菌,能引起原发性化脓感染和严重的继发感染,*Parasutterella* 菌属能诱导肥胖并促使菌群失调^[24-25]。

3 结论

本文选择 6 名健康成年人连续服用 HZB-1 合生元制剂进行 4 周的肠道菌群干预,通过高通量测序分析干预前后其肠道菌群结构的变化.结果表明:虽然本实验中存在一定的个体差异,但依然可以发现,受试人员肠道菌群均主要由拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*) 细菌构成;采用 HZB-1 合生元制剂干预后,受试人员肠道菌群的丰富度、多样性均有明显改善;在“门”水平上,受试人员肠道菌群丰度明显增加,其中厚壁菌门(*Firmicutes*) 占比增高,放线菌门(*Actinobacteria*) 和变形菌门(*Proteobacteria*) 存在一定的动态平衡;在“属”水平上,布劳特氏菌属(*Blautia*)、柔嫩梭菌属(*Faecalibacterium*)、吉米菌属(*Gemmiger*) 等有益菌群的丰度均有明显增加,而嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、*Parasutterella* 菌属等有害菌属的丰度均明显降低.该合生元制剂的摄入对肠道菌群具有良好的改善作用,能够提高肠道菌群结构中的菌群多样性,抑制肠道有害菌,促进有益菌的增殖.该实验通过高通量测序技术和生物信息学分析初步确定了 HZB-1 合生元制剂具有的肠道菌群益生作用,未来希望对具有更多特征性的受试人群进行干预和测试,以更深入地发现和研究合生元产品的功能性特征。

参考文献:

- [1] SEKIROV I, RUSSELL S L, ANTUNES L C M, et al. Gut microbiota in health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2010, 90: 859.
- [2] 胡乐义,王巧民,姜彬言,等. 肠易激综合征患者肠道菌群的变化及意义 [J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(1): 86.
- [3] 孙勇,丁彦青. 溃疡性结肠炎患者肠道菌群与病理变化关系的探讨 [J]. 现代消化及介入治疗, 2009, 14(1): 26.
- [4] HOJSAK I, SZAJEWSKA H, CANANI R B, et al. Probiotics for the prevention of nosocomial diarrhea in children [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2018, 66(1): 3.
- [5] FU L, SONG J, WANG C, et al. Bifidobacterium infantis potentially alleviates shrimp tropomyosin-induced allergy by tolerogenic dendritic cell-dependent induction of regulatory T cells and alterations in gut microbiota [J]. *Front Immunol*, 2017(8): 1536.
- [6] WEST C E, HAMMARSTRÖM M L, HERNELL O. Probiotics during weaning reduce the incidence of eczema [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2009, 20(5): 430.
- [7] MACFARLANE S, CLEARY S, BAHRAM B, et al. Synbiotic consumption changes the metabolism and composition of the gut microbiota in older people and modifies inflammatory processes: a randomised, double-blind, placebo-controlled crossover study [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2013, 38: 804.
- [8] ESPLEY R, BUTTS C, LAING W, et al. Dietary flavonoids from modified apple reduce inflammation markers and modulate gut microbiota in mice [J]. *The Journal of Nutrition*, 2014, 144(2): 146.
- [9] SATOKARI R, VAUGHAN E, FAVIER F, et al. Diversity of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. in breast-fed and formula-fed infants as assessed by 16S rDNA sequence differences [J]. *Microbial Ecology in Health and Disease*,

- 2002,14(2): 97.
- [10] 赵杰,朱维铭,李宁. 益生菌、益生元、合生元与炎症性肠病[J]. 肠外与肠内营养, 2014, 21(4): 251.
- [11] 陈娜,杨毅,张澜,等. Illumina 高通量测序技术分析早产儿出生后肠道菌群变化的初步研究[J]. 中国循证儿科杂志,2014,9(5): 359.
- [12] JIANG W W, WU N, WANG X M, et al. Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease[J]. Scientific Reports,2015(5): 8096.
- [13] 李晓敏,杨丽杰,霍贵成. Illumina 技术研究不同喂养方式婴儿肠道菌群差异[J]. 食品科技, 2012,37(9): 319.
- [14] GAO X F, ZHANG M R, XUE J M, et al. Body mass index differences in the gut microbiota are gender specific[J]. Front Microbiol,2018(9): 1250.
- [15] 胡海兵,崔立,郭靛骅,等. 基于高通量测序技术的冠心病患者肠道菌群多样性研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2016, 34(2):1.
- [16] 曲巍,张智,马建章,等. 高通量测序研究益生菌对小鼠肠道菌群的影响[J]. 食品科学, 2017,38(1):214.
- [17] 臧凯丽,贾彦,崔文静,等. 瑞士乳杆菌调控小鼠肠道菌群变化规律的研究[J]. 食品科学, 2018,39(1):156.
- [18] PAULSEN J A, PTACEK T S, CARTER S J, et al. Gut microbiota composition associated with alterations in cardiorespiratory fitness and psychosocial outcomes among breast cancer survivors[J]. Support Care Cancer, 2017, 25(5): 1563.
- [19] 贺腾辉. 基于 16S rDNA 序列技术分析肾移植患者肠道菌群结构的研究[D]. 太原:山西医科大学,2017.
- [20] QUEREDA J J, DUSSURGET O, NAHORI M A, et al. Bacteriocin from epidemic *Listeria* strains alters the host intestinal microbiota to favor infection[J]. Proc Natl Acad Sci, 2016, 113(20):5706.
- [21] 王侠林,左赞,范红,等. 基于概率话题模型的轻微型肝性脑病患者肠道菌群结构研究[J]. 微生物学报,2018,58(7): 1274.
- [22] 臧凯丽,江岩,孙勇,等. 微生态制剂调节便秘、腹泻人群肠道菌群结构与产短链脂肪酸关键菌属的相关性[J]. 食品科学,2018,39(5):155.
- [23] SALANTRO J P, MUIRHEAD P A, GOODMAN J R. Morphological and physiological characteristics of *Gemmiger formicilis* isolated from chicken ceca [J]. Appl Environ Microbiol, 1976,32(4):623.
- [24] 暴旭广. 2型糖尿病和糖尿病肾病状态下肠道菌群失衡模式研究及血清质谱组学分析[D]. 广州:南方医科大学,2019.
- [25] 陈俊良. 不同果胶对肥胖小鼠生理参数和肠道微生物的影响[D]. 广州:暨南大学,2018.