

树鼩大肠内容物细菌的群落多样性分析

郭玉倩¹, 角建林², 袁鑫³, 吴超¹, 王利梅¹, 郑红^{1*}

(1. 昆明医科大学实验动物学部, 昆明 650500; 2. 昆明医科大学技术转移中心, 昆明 650031; 3. 昆明医科大学第一附属医院, 昆明 650032)

【摘要】 目的 应用高通量测序技术分析树鼩大肠细菌的结构与组成。**方法** 采集 3 只雄性树鼩大肠内容物, 用细菌 16SrDNA 通用引物扩增 V3 ~ V4 区, 采用 Illumina PE250 平台测序。**结果** 共获得 160 157 条有效序列, 聚类后得 437 个运算分类单位 (operational taxonomic units, OTUs)。树鼩大肠中的细菌有 9 个门、19 个纲、37 个目、68 个科、137 个属和 194 个种。其中, ①厚壁菌门和变形菌门的丰度最高, 分别为 63.30% 和 28.52%; ②优势纲是芽孢杆菌纲和 γ -变形菌纲 (51.46%、28.02%); ③乳杆菌目和肠杆菌目的丰度最高, 为 45.33% 和 27.51%; ④优势科是乳杆菌科 (35.30%) 和肠杆菌科 (27.51%); ⑤乳杆菌属和埃希氏菌属为优势属 (35.30%、27.49%); ⑥在种的水平, 可培养细菌的丰度为 37.10%, 未分类细菌 27.69%, 不可培养细菌 35.21%。可培养细菌中, 唾液链球菌的丰度最高 (26.66%)。在丰度最高的 20 个种中, 8 种细菌 (40%) 未分类, 为以往未被发现的新种。个体间细菌群落存在一定差异。**结论** 树鼩大肠内容物中的细菌组成具有丰富的多样性, 其中还有许多未被分类鉴定且相对丰度较高的细菌, 需要进一步研究。

【关键词】 树鼩; 大肠细菌; Illumina PE250; 多样性
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 09-0007-07
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.09.002

Diversity analysis of the tree shrew hindgut microbiota by Illumina PE250 sequencing technology

GUO Yuqian¹, JIAO Jianlin², YUAN Xin³, WU Chao¹, WANG Limei¹, ZHENG Hong^{1*}

(1. Department of Laboratory Animal Science, Kunming Medical University, Kunming 650500, China.
2. Technology Transfer Centers, Kunming Medical University, Kunming 650031.
3. The First Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650032)

【Abstract】 Objective To analyze the structure and composition of the tree shrew hindgut microbiota by Illumina PE250 sequencing technology. **Methods** Three male 10-month-old tree shrews were selected. The V3 - V4 region was amplified with universal primers of bacteria 16SrDNA and sequenced with the Illumina PE250 platform after the extraction of total DNA. **Results** A total of 160 157 valid sequences and 437 operational taxonomic units (OTUs) were obtained. The bacteria in the tree shrew hindgut are from 9 phyla, 19 classes, 37 orders, 68 families, 137 genera, and 194 species. Among them, (i) Firmicutes and Proteobacteria had the highest abundance, at 63.30% and 28.52%, respectively. (ii) The dominant classes were Bacilli and Gammaproteobacteria (51.46%, 28.02%). (iii) The abundances of Lactobacillales and Enterobacteriales were high, at 45.33% and 27.51%. (iv) Dominant families were Lactobacillaceae

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81460647); 云南省应用基础研究计划项目 (编号: 2017FE468-014, 2017FE468016); 云南省教育厅科学研究基金项目 (编号: 2018Y048)。

[作者简介] 郭玉倩 (1995—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 药理学。E-mail: 1461553155@qq.com
[通信作者] 郑红 (1969—), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 疾病动物模型。E-mail: 847255170@qq.com

(35.30%) and Enterobacteriaceae (27.51%)。 (v) *Lactobacillus* and *Escherichia-Shigella* were the dominant genera (35.30%, 27.49%)。 (vi) At the species level, the abundance of cultured bacteria was 37.10%, that of unclassified bacteria was 27.69%, and that of uncultured bacteria was 35.21%。 *Lactobacillus salivarius* was the most abundant species (26.66%) among the cultured bacteria. Of the 20 species with the highest abundance, eight (40%) were unclassified and new species. Some differences among individuals in terms of bacterial communities were identified. **Conclusions** The tree shrew hindgut microbiota has rich diversity, and there are many bacteria that have not been identified and have relatively high abundance, which needs further study.

【**Keywords**】 tree shrew; hindgut microbiota; Illumina PE250; diversity

动物大肠中栖息着种类繁多、数量巨大的细菌,与宿主形成了稳定的互利共生关系,在肠道中长期稳定存在。这些菌群影响宿主的营养代谢、生物拮抗、免疫刺激及生长发育等功能。因此,大肠微生态的稳定,对树鼩的健康有重要作用。微生物培养技术仅能研究体外可生长的微生物^[1],这部分细菌仅占胃肠道微生物的1%左右^[2]。那些能在培养基上生长的微生物,其重要性会被过高估,且克隆/测序技术费时费力分辨率低^[3]。高通量测序技术是一种研究微生物生态学的全新技术手段,能全面地反应样品微生物的结构与组成^[4],具有准确性高、检测范围广、快速、结果可靠等优点,普遍应用于细菌多样性分析^[5]。

树鼩(*Tupaia belangeri*, tree shrew)是生活在热带和亚热带地区的哺乳纲攀鼩类的小型动物,在我国云南、贵州、广西、广东等地广泛分布。树鼩具有体型小,繁殖能力强,易驯养,经济易得等优点。树鼩的新陈代谢与解剖结构比啮齿类更接近于非人灵长类动物,常用于替代或减少一些非人灵长类动物的使用。由于其与人类在细胞与分子层面的相似性,在作为人类疾病动物模型方面具有很大的前景。树鼩已在肿瘤学、内分泌学、神经生物学、生殖生物学、免疫学及感染性疾病等方面有广泛和深入的应用,是价值极高的新型实验动物^[6]。

目前,有关树鼩肠道细菌的报道较少^[7-10]。这些研究主要采用的是传统的培养技术,以及以克隆/测序为主要手段的分子生物学技术。已有的报道缺乏有关树鼩肠道细菌的高通量测序研究。因此,本试验旨在应用高通量测序技术研究树鼩大肠细菌结构与组成,为进一步开发利用这一新型实验动物奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3只雄性10月龄树鼩,体重130~150 g,编号A、B、C,由昆明医科大学实验动物学部提供[SCXK

(滇)K2013-0002]。饲养于昆明医科大学普通级实验室[SYXK(滇)K2015-0002],树鼩单笼饲养,自由饮水,每日定时饲喂全价颗粒饲料2次(8:00和14:00),动物饲养温度22℃~25℃,湿度40%~60%,每日明暗交替照明12 h。实验程序符合昆明医科大学动物实验伦理委员会要求(KMMU2017016),并按实验动物使用的3R原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

动物全价颗粒饲料配方为:玉米40%、大麦17%、大米10%、豆粕17%、鱼粉8%、苜蓿粉2.0%、蔗糖1.0%、果糖0.5%、牛油1.5%、猪油1.0%、鸡蛋粉1.2%以及氨基酸、维生素和微量元素等添加剂0.8%。DNA提取试剂盒(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)。荧光定量系统QuantiFluor™-ST (Promega, U.S.);PCR仪(ABI GeneAmp® 9700型)。采用Hiseq2500测序仪(Illumina公司)的PE150测序策略完成测序。

1.3 实验方法

1.3.1 动物处理

树鼩稳定饲喂60 d,在61 d禁食8 h,心脏采血处死动物。取大肠,用0.5 mL生理盐水冲洗大肠内容物,收集冲洗液至离心管,迅速投入液氮中保存,样品立即带回实验室转移至-80℃冰箱,备用。

1.3.2 基因组DNA提取

使用DNA提取试剂盒,按照说明书进行细菌基因组抽提。利用1%的琼脂糖凝胶电泳,检测抽提的树鼩大肠内容物细菌基因组DNA。

1.3.3 PCR扩增

测序是区域341F~806R。使用341F:5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3'和806R:5'-GGACTA C NNGGTATCTAAT-3'细菌特异性引物进行细菌16SrDNA基因部分序列的PCR扩增。

1.3.4 荧光定量

参照电泳初步定量结果,将PCR产物用

QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统进行检测定量,之后按照每个样本的测序要求,进行相应比例的混合。

1.3.5 Illumina PE250 文库构建

连接“Y”字形接头。使用磁珠筛选去除接头自连片段,利用 PCR 扩增进行文库模板的富集。经氢氧化钠变形,产生单链 DNA 片段。

1.3.6 Illumina PE250 测序

DNA 片段的一端与引物碱基互补,固定在芯片上。另一端随机与附近的另外一个引物互补,也被固定住,形成“桥(bridge)”。PCR 扩增,产生 DNA 簇。DNA 扩增子线性化成为单链。加入改造过的 DNA 聚合酶和带有 4 种荧光标记的 dNTP,每次循环只合成一个碱基。用激光扫描反应板表面,读取每条模板序列第一轮反应所聚合上去的核苷酸种类。将“荧光基团”和“终止基团”化学切割,恢复 3' 端粘性,继续聚合第二个核苷酸。统计每轮收集到的荧光信号结果,得到模板 DNA 片段的序列。

1.3.7 生物信息学分析

Illumina PE250 测序得到的 PE reads,首先根据 overlap 关系进行拼接^[11],同时对序列质量进行质控和过滤。优化样本序列后,将序列按 97% 相似性进行运算分类单位(operational taxonomic unit,OTU)聚类^[12],并进行 α 多样性指数分析,计算 Chao 指数、Shannon 指数、Simpson 指数和覆盖(Coverage)指数。每个样本都做了稀释性曲线和 Shannon 指数曲线。用 UniFrac 对 β 多样性进行评估,利用基于 UniFrac 的主坐标分析(principal coordinate analysis,PCoA),将 UniFrac 距离映射到一组正交轴上。采用 RDP classifier 贝叶斯算法,对 OTU 代表序列进行分类学分析^[13]。统计在门、纲、目、科、属、种水平上的物种组成和丰度。

1.4 统计学方法

利用 GraphPad PRISM 软件(GraphPad software, CA, USA)计算出样本序列和 α 多样性的平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)。

2 结果

2.1 样本序列分析和多样性分析

将本实验得到的样本序列进行优化(表 1),共获得 160 157 条有效序列,平均每个样本有(53 386 $\pm$ 2807)条序列。基于序列 97% 的相似性进行 OTU 聚类,共得到 437 个 OTU。样本稀释性曲线(图 1)

显示,每个样本的曲线都趋于平缓,说明本研究的测序量能够覆盖各样本的大多数微生物。

表 1 样本序列统计表
Table 1 Statistics of sample sequences

个体 Individual	序列数 Number of sequences	运算分类单位数 Number of operational taxonomic units
A	52 567	234
B	56 512	89
C	51 078	114
$\bar{x} \pm s$	53 386 $\pm$ 2807	145 $\pm$ 77

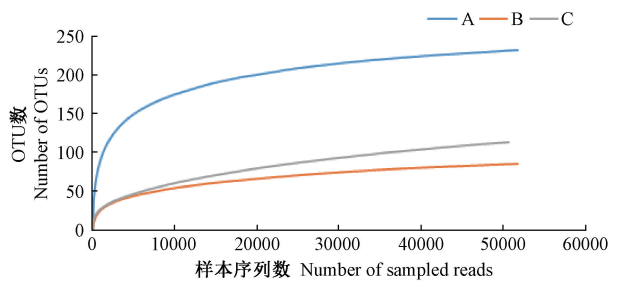


图 1 稀释性曲线
Figure 1 Rarefaction curves

基于 OTU 聚类分析结果,对 OTU 进行 α 多样性分析(表 2),树鼩大肠细菌的 Chao 指数是 181, Shannon 指数是 2.5, Simpson 指数为 0.21。覆盖指数为 0.999,即包含了树鼩大肠内容物中 99.9% 的细菌多样性状况,反映了测序结果代表了样本中微生物的真实情况。Shannon 指数曲线(图 2)显示,样本 A 的微生物群比 B 和 C 更多样化。

未加权 PCoA(图 3B)显示,第一个主坐标(PC1)捕获了 43.42% 的变异,第二个主坐标(PC2)捕获了 16.84% 的变异,A 与 B、C 分离开,而 B、C 聚合在一起;加权 PCoA(图 3A)显示,第一个主坐标(PC1)捕获了 52.69% 的变异,第二个主坐标(PC2)捕获了 29.43% 的变异。加权以后三个样本仍没有聚合起来,样本间存在一定差异。

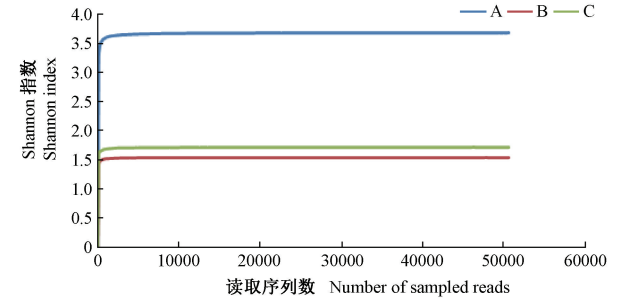
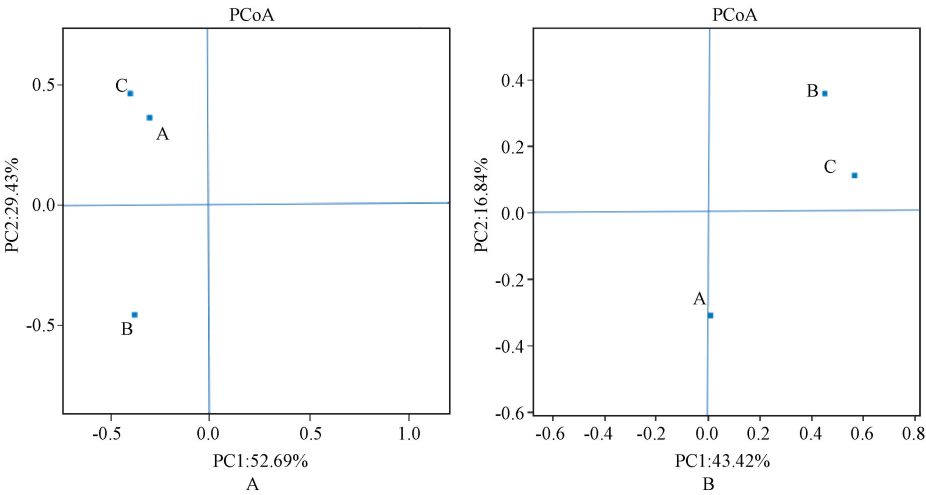


图 2 菌群多样性分析
Figure 2 Flora diversity analysis

表 2 α 多样性指数
Table 2 α diversity indices

	丰度指数 Chao index	菌群多样性指数 Flora diversity indices		覆盖指数 Coverage index
		Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	
$\bar{x} \pm s$	181 ± 53	2. 5 ± 0. 58	0. 21 ± 0. 06	0. 999 ± 0. 0002



注:A;加权;B;未加权。

图 3 β 多样性的主坐标分析

Note. A; Weighted; B; Unweighted.

Figure 3 β-diversity patterns were explored using principal coordinate analysis

2.2 不同分类水平上的物种组成分析

本研究发现,树鼩大肠中的细菌有 9 个门、19 个纲、37 个目、68 个科、137 个属和 194 个种。

在鉴定出的 9 个门中,厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)的丰度最高(91.82%),分别为 63.30% 和 28.52%。其次是放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes),丰度分别是 5.49%、2.56%。以上 4 个门的丰度和为 99.84%。其他 5 个门,包括梭杆菌门(Fusobacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、脱铁杆菌门(Deferribacteres)、酸杆菌门(Acidobacteria)、Saccharibacteria 门,丰度之和仅为 0.14%(图 4)。

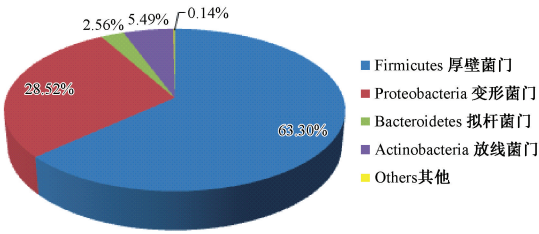


图 4 门水平上菌群组成

Figure 4 Composition of microbial community at the phylum level

在检出的 19 个纲中,丰度最高的是芽孢杆菌纲(Bacilli)和 γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria),分别是 51.46%、28.02%。其次是梭菌纲(Clostridia):6.98%,丹毒丝菌纲(Erysipelotrichia):4.53%,放线菌纲(Actinobacteria):3.58%,拟杆菌纲(Bacteroidia):2.46%和 Coriobacteriia 纲:1.91%。以上 7 个纲的丰度和为 98.94%。其他 12 个纲的丰度和仅为 1.0%,包括严格厌氧菌纲(Negativicutes)、ε-变形菌纲(Epsilonproteobacteria)、δ-变形菌纲(Deltaproteobacteria)、梭杆菌纲(Fusobacteria)、黄杆菌纲(Flavobacteriia)、α-变形菌纲(Alphaproteobacteria)、β-变形菌纲(Betaproteobacteria)、Chloroplast 纲、Saccharibacteria_norank 纲、酸杆菌纲(Acidimicrobiia)、脱铁杆菌纲(Deferribacteres)和全噬菌纲(Holophagae)。

在鉴定出的 37 个目中,乳杆菌目(Lactobacillales)和肠杆菌目(Enterobacteriales)的丰度最高,为 45.33% 和 27.51%。其次是梭菌目(Clostridiales)、芽孢杆菌目(Bacillales)、丹毒丝菌目(Erysipelotrichales)、双歧杆菌目(Bifidobacteriales)、拟杆菌目(Bacteroidales)和 Coriobacteriales 目,6 个目的丰度依此降低,分别为 6.98%、6.13%、4.53%、

3.35%、1.91%、1.81% (图 5)。其他 29 个目,如 Selenomonadales 目、海洋螺菌目 (Oceanospirillales)、弯曲菌目 (Campylobacteriales)、脱硫弧菌目 (Desulfovibrionales)、棒杆菌目 (Corynebacteriales)、假单胞菌目 (Pseudomonadales)、梭杆菌目 (Fusobacteriales) 和黄杆菌目 (Flavobacteriales) 等,丰度之和仅为 1.81%。

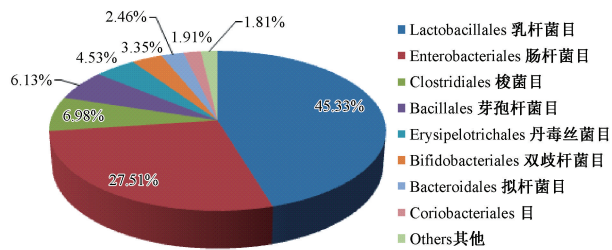


图 5 目水平上菌群组成
Figure 5 Composition of microbial community at the order level

68 个科中,11 个科的丰度和超过 90%。其中乳杆菌科 (Lactobacillaceae) 和肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 的丰度和超过 60%,分别为 35.30% 和 27.51%。丰度在 1% ~ 10% 之间的有 9 个科,由高到低依次为链球菌科 (Streptococcaceae)、毛螺菌科 (Lachnospiraceae)、丹毒丝菌科 (Erysipelotrichaceae)、双歧杆菌科 (Bifidobacteriaceae)、肠球菌科 (Enterococcaceae)、葡萄球菌科 (Staphylococcaceae)、芽孢杆菌科 (Bacillaceae)、普雷沃氏菌科 (Prevotellaceae) 和红蝓杆菌科 (Coriobacteriaceae)。这 9 个科的丰度分别是 6.72%、4.88%、4.52%、3.35%、2.95%、2.66%、2.24%、2.03%、1.91%。其他 57 个科的丰度均低于 1%,包括瘤胃菌科 (Ruminococcaceae)、拟杆菌科 (Bacteroidaceae)、韦荣氏球菌科 (Veillonellaceae)、梭菌科 (Clostridiaceae)、海洋螺菌科 (Oceanospirillaceae)、消化链球菌科 (Peptostreptococcaceae)、揉杆菌科 (Carnobacteriaceae)、螺杆菌科 (Helicobacteraceae) 和脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae) 等。这 56 个科的丰度和仅为 4.52%。

137 个属中,乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 和埃希氏菌 (*Escherichia-Shigella*) 属占主导,丰度和为 62.79% (35.30%、27.49%)。其次是链球菌属 (*Peptostreptococcus*)、*Erysipelatoclostridium* 属、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、*Lachnoclostridium* 属、芽

孢杆菌属 (*Bacillus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、普雷沃菌属 (*Prevotella*)、瘤胃球菌属 (*Ruminococcus*) 和柯林斯氏菌属 (*Collinsella*)。这 11 个属的丰度和为 28.83%,各属的丰度依此分别为 4.62%、4.19%、3.35%、2.95%、2.65%、2.31%、2.23%、2.11%、2.03%、1.3% 和 1.09% (图 6)。其余的 126 个属的丰度极低,总占比仅 8.37%。

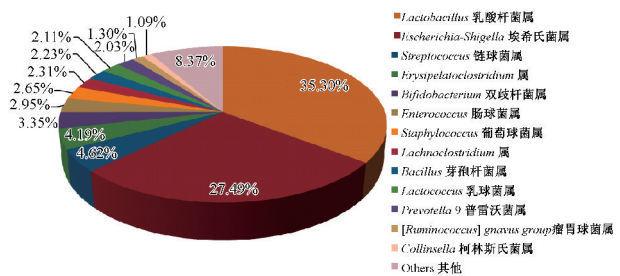


图 6 属水平上群落组成
Figure 6 Composition of microbial community at the genus level

194 个种中,可培养细菌的丰度和为 37.10%,未分类细菌为 27.69%,不可培养细菌 35.21% (图 7)。可培养细菌中,唾液链球菌 (*salivarius*) 的丰度最高 (26.66%)。丰度在 0.38% ~ 2.91% 之间的有 5 个种,从高到低依次为 *treptococcus porcorum* 种 (2.91%)、*Enterococcus faecali* 种 (1.57%)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus subsp. aureus COL*, 1.56%)、*Slackia piriformis* 种 (0.42%) 和 *Bifidobacterium kashiwanohense* 种 (0.38%)。

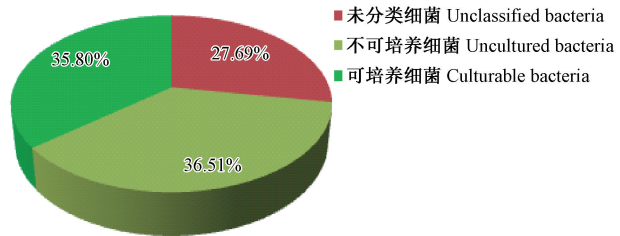


图 7 种水平上细菌分类
Figure 7 Bacterial classification at the species level

丰度最高的 20 个种,归类为 10 个科、7 个纲。即双歧杆菌科、芽孢杆菌科、乳杆菌科、葡萄球菌科、链球菌科、普雷沃氏菌科、毛螺菌科、红蝓杆菌科、丹毒丝菌科和肠杆菌科。这 20 个种,隶属于芽孢菌纲、梭菌纲、放线菌纲、丹毒丝菌纲、Bacteroidia 纲、Coriobacteriia 纲和 γ -变形菌纲 7 个纲。在丰度最高的 20 个种中,8 种细菌 (40%) 未分类,为以往未被发现的新种。7 种 (35%) 不能培养,能培养的已知细菌 (25%) 仅为 5 种 (表 3)。

表 3 种水平上丰度较高的 20 个种及其在纲和科水平上的归类

Table 3 The 20 most abundant species and their classification at class and family levels

纲 Class	科 Family	种 Species	丰度(%) Abundance
γ-变形菌纲 Gammaproteobacteria	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	不可培养的大肠志贺氏菌属 <i>Escherichia-Shigella_uncultured bacterium</i>	15.79
		未分类的大肠志贺氏菌属 <i>Escherichia-Shigella_unclassified</i>	11.70
		唾液链球菌 <i>Lactobacillus salivarius</i>	26.66
		未分类的乳杆菌属 <i>Lactobacillus_unclassified</i>	4.63
芽孢杆菌纲 Bacilli	乳杆菌科 Lactobacillaceae	不可培养的乳杆菌属 <i>Lactobacillus_uncultured</i>	3.72
		芽孢杆菌科 Bacillaceae	
		苏云金杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	2.07
	肠球菌科 Enterococcaceae	肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	1.57
		未分类的肠球菌属 <i>Enterococcus_unclassified</i>	1.38
		金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus COL</i>	1.56
	葡萄球菌科 Staphylococcaceae	未分类的葡萄球菌属 <i>Staphylococcus_unclassified</i>	1.09
		链球菌科 Streptococcaceae	
		未分类的乳球菌属 <i>Lactococcus_unclassified</i>	1.98
		不可培养的链球菌属 <i>Streptococcus_uncultured</i>	1.43
Bacteroidia 纲	普雷沃氏菌科 Prevotellaceae	不可培养的普氏菌属 <i>Prevotella 9_uncultured</i>	2.03
		<i>Lachnoclostridium_uncultured</i> 种	1.33
梭菌纲 Clostridia	毛螺菌科 Lachnospiraceae	不可培养的瘤胃球菌属 [<i>Ruminococcus</i>] <i>gnarus group_uncultured bacterium</i>	1.30
Coriobacteriia 纲	红蜡杆菌科 Coriobacteriaceae	不可培养的菌属 <i>Collinsella_uncultured bacterium</i>	1.03
		不可培养的丹毒丝菌属 <i>Erysipelatoclostridium_uncultured bacterium</i>	2.98
丹毒丝菌纲 Erysipelotrichia	丹毒丝菌科 Erysipelotrichaceae	未分类的丹毒丝菌属 <i>Erysipelatoclostridium_unclassified</i>	1.21
放线菌纲 Actinobacteria	双歧杆菌科 Bifidobacteriaceae	未分类的双歧杆菌属 <i>Bifidobacterium_unclassified</i>	2.80

2.3 不同个体之间的物种组成比较

在门层面,三个样本共享的 5 个门分别是厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、放线菌门和梭杆菌门。蓝藻菌门、脱铁杆菌门、Saccharibacteria 门和酸杆菌门为 A 特有,这 4 个门的丰度和仅占 A 样本总肠道微生物的 0.11%。B 样本中的厚壁菌门和变形菌门与 A、C 样本相比有较大差异,厚壁菌门在样本 A、B、C 中的丰度比是 3.8:1:3.6,变形菌门在样本

A、B、C 中的丰度比是 1:9.1:0.92。而放线菌门在三个样本中的丰度没有太大变化,丰度比为 1:1.39:1.12。

检测到的 137 个属中,65 个属为样本 A 独有,3 个属仅见于样本 B,C 为 4 个属。A 独有的 65 个属的丰度和是 11.56%,其中只有两个属的丰度和大于 1%,分别是乳球菌属(6.32%)和 *Subdoligranulum* 属(1.19%)。B 组特有的属是魏斯

氏菌属、*Senegalimassilia* 属和 *Faecalitalea* 属, 丰度均低于 0.1%。样本 C 独有的属分别是链霉菌属 (0.01%)、*Eggerthella* 属 (0.007%)、*Alloprevotella* 属 (0.003%) 和黄杆菌属 (0.003%)。乳杆菌属的丰度较高, 但三个样本中的差异也较大, C 为 75.26%, B 中 20.15%, A 为 10.50%。

3 讨论

目前, 有关树鼩肠道菌群的报道较少^[7-10], 并且都是基于对菌株进行培养后, 进行鉴定的检测方法。这些研究不能系统且全面地阐述树鼩肠道细菌多样性。本实验通过 Illumina PE250 高通量测序, 研究树鼩大肠微生物群的物种组成及其丰度。其中, Coverage 指数表示各文库的覆盖率, 本实验中覆盖率为 0.999, 说明树鼩大肠细菌 99.9% 多样性情况得到反映。每个样本的稀释曲线都趋于平缓, 表明本实验的测序量能够覆盖各样本的大多数微生物。Shannon 指数曲线表示样本 A 比 B 和 C 的微生物菌群更加多样化。PCoA 分析表明三个样本间菌群组成存在差异。邢进等^[8]采集 61 只树鼩回盲部内容物分离培养, 仅得到 6 科、15 属、29 种树鼩肠道菌。本研究共鉴定出树鼩大肠菌的 68 个科、137 个属、194 个种, 较全面地反映树鼩肠道细菌多样性。

通过 OTU 分类, 本实验共鉴定出树鼩肠道菌的 9 个门。其中, 厚壁菌门 (63.30%) 和变形菌门 (28.52%) 是优势门; 其次是放线菌门和拟杆菌门。刘丽君等^[7]对树鼩粪便细菌进行分离培养, 发现变形菌门的埃希氏菌和变形杆菌以及厚壁菌门的粪肠球菌是树鼩的主要寄生菌群, 与本实验检测到的优势门相同, 但在种属层面有较大差异。Hildebrandt 等^[14]使用高脂肪食物饲喂野生小鼠, 发现小鼠肠道菌群中厚壁菌门和变形菌门的数量增加, 而拟杆菌门含量降低。本研究发现树鼩肠道菌中变形菌门丰度较高, 推测树鼩具有较强的脂肪消化功能。

在属的层次, 本研究发现树鼩肠道乳杆菌属和埃希氏菌属丰度最高。乳杆菌属和埃希氏菌属是人和动物肠道的正常菌群^[15]。乳杆菌属重要的益生菌, 有改善胃肠道动力、调节肠道微生态平衡、抑制抑制肠道炎性反应和抑菌等作用, 保护机体肠道健康^[16-17]。乳杆菌属在肠道内将多糖降解成短链脂肪酸^[18], 能合成维生素 B1、B2、B6、B12、叶酸、维生素 K 等多种维生素和蛋白质, 促进机体的消化吸

收。乳杆菌属还具有抗氧化和调节神经内分泌系统作用。埃希氏菌属归类于肠杆菌科, 能帮助机体合成维生素 B、K 等。一般不致病, 偶尔会引起皮肤、黏膜和脏器等自身感染^[19]。

唾液链球菌在健康人体口腔微生物菌群中占主要地位^[20], 是口腔益生菌的重要候选者^[21]。唾液链球菌能产生细菌素样抑菌物质 (BLISs), 具有抑制其他多种微生物的活性, 能够减少病原菌在口腔、呼吸道等部位的定植^[22]。Cosseau 等^[23]研究发现, 唾液链球菌 K12 株能调节人体上皮细胞中参与固有免疫防御机制、上皮细胞功能与内稳态、细胞骨架修饰、细胞发育与转移及信号通路的相关基因。本实验发现唾液链球菌是树鼩可培养肠道菌中丰度最高的物种 (26.66%), 其功能及机制有待进一步研究。在丰度最高的 20 个种中, 8 种细菌 (40%) 未分类, 为以往未被发现的新种, 需要进一步研究。

本研究使用高通量测序的方法, 第一次较全面地检测了树鼩肠道菌群。但高通量测序技术也存在不足, 虽然会得到大量数据, 但后续数据处理费时费力^[24]; 对于小范围测序所用的费用相对较高^[25]。另外, 样本量较少, 需要进一步开展系统研究, 建立树鼩肠道菌群谱, 为建立人类肠道微生物树鼩模型奠定基础。

参考文献:

- [1] Xu J, Bjursell MK, Himrod J, et al. A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis [J]. Science, 2003, 299(5615): 2074-2076.
- [2] Edwards JE, Huws SA, Kim EJ, et al. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 62(3): 323-335.
- [3] Highlander SK. High throughput sequencing methods for microbiome profiling: application to food animal systems [J]. Anim Health Res Rev, 2012, 13(1): 40-53.
- [4] Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine [J]. Cell, 2006, 124(4): 837-848.
- [5] 徐爱蕾, 黄毅, 王为. 16SrRNA 基因序列分析技术在肠道菌群检测中的应用进展 [J]. 临床消化病杂志, 2015, 27(3): 186-189.
- [6] 沈培清, 郑红, 刘汝文, 等. 中国树鼩实验动物化研究进展和展望 [J]. 动物学研究, 2011, 32(1): 109-114.
- [7] 刘丽君, 余柄廷, 胡凝珠, 等. 树鼩粪便细菌分离培养与鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(10): 64-68.