

肠道微生物与疾病关系的研究新进展 - 运用 454 测序技术分析

李 芝 李云峰 杨之斌 唐蜀昆

(云南省肿瘤医院 云南 昆明 650118)

摘要 :由于传统研究方法成本和速度的限制,远远满足不了对微生物群落大规模的研究,以 454 测序为代表的新一代高通量测序技术凭借低成本、高通量、流动自动化的优势为研究微生物的多样性和组成提供了新的技术平台。本文就近年来 454 测序技术在研究人体肠道微生物与疾病关系的应用进行了综述。

关键词 :454 测序技术 ;人类肠道微生物 ;疾病

中图分类号 :Q-33 R378 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2012)09-1782-03

New Research Progress on the Relationship between Human Intestinal Microbiota and Host Diseases -Application of 454 Sequencing

LI Zhi, LI Yun-feng, YANG Zhi-bin, TANG Shu-Kun

(The tumor hospital of yunnan province, Yunnan, Kunming, 650118, China)

ABSTRACT: Because of the limit of the cost and speed, the traditional research methods can not meet the large-scale study of microbial communities. The new generation sequencing technology such as 454 pyrosequencing provide a new way for understanding of the diversity and composition in Microorganism with the advantage of thigh-throughput ability cost-efficiency and automated facility. In this article the application of 454 sequencing in intestinal microorganism of the human and disease was reviewed.

Key words: 454 sequencing; Intestinal microorganism of the human; Disease

Chinese Library Classification(CLC): Q-33, R378 **Document code**: A

Article ID:1673-6273(2012)09-1782-03

随着社会经济的不断发展,人们物质生活水平的提高,健康越来越成为人们的第一需要。同时,一些慢性代谢性疾病如肥胖和糖尿病的发病率也在日益增加,已经严重威胁到人体的健康。基因与环境的相互作用决定人体的健康,在体内发挥作用、影响人们生老病死的不仅有人的基因,还有大量的共生微生物的基因,即只有人体基因组、人体共生微生物基因组及环境三者之间处于动态平衡,才能保证人体的健康。因此,在研究人体健康关系时一定不能忽略共生微生物的基因,尤其是肠道微生物,近年来,新一代高通量测序的出现,为研究肠道微生态与疾病的关系提供了一个暂新的平台。而 454 测序技术平台凭借其独特的测序读长优势,成为研究微生物基因组深度测序的最佳选择,并已广泛的应用于肠道微生物与疾病的研究中。

1 454 测序法概述

454 测序法,一种以 DNA 扩增的乳胶系统和皮升大小焦磷酸为基础^[1],通过生物发光进行 DNA 序列分析的一种测序技术,以整个微生物群落基因组为研究对象,以功能基因筛选和测序分析为研究手段,研究微生物多样性、种群结构、进化关系、功能活性、相互协作关系及与环境之间的关系的新的微生物研究方法,不但测序通量大,序列读长,测序成本低,可以对所有重要生物的基因组序列可以进行高效廉价的测定,而且无需分离单个细菌,可以直接研究那些不能被实验室分离培养的微生物,从而使人们摆脱物种界限,扩大对胃肠道菌群基因

的认识。其具有速度快、通量高、读长长、准确性高、一致性好及简便高效的优势,完全契合微生物群落研究的要求,大大促进了肠道微生态研究的发展,从而可以在更高更复杂层次上的揭示肠道微生物与人体疾病的关系。

该测序技术由 Roche 公司在 2005 年底建立,开创了边合成边测序的先河。其测序基本原理是通过 PCR 扩增的单链与引物杂交,在 DNA 聚合酶、ATP 硫酸化酶、荧光素酶、三磷酸腺苷双磷酸酶、底物荧光素酶和 5' 磷酸硫腺苷共同作用下,按照碱基配对的原则依次将脱氧核糖核苷三磷酸连接到引物上。在每一轮测序反应中,只加入一种 dNTP,若该 dNTP 与待测模板配对,DNA 聚合酶可以将其掺入到合成链中并释放出等摩尔数的焦磷酸基团(Pi)。ATP 硫酸化酶在 APS 存在的情况下催化焦磷酸形成 ATP,ATP 驱动荧光素酶介导的荧光素向氧化荧光素的转化,氧化荧光素发出与 ATP 量成正比的可见光信号。ATP 和未掺入的 dNTP 由三磷酸腺苷双磷酸酶降解,淬灭光信号,并再生反应体系,然后加入下一种 dNTP,如此循环^[2]。2008 年,该公司推出了 454 测序技术最新的 GS FLX Titanium 系列试剂和软件,进一步提升了读取长度与测序通量。目前 454 测序法每个测序反应耗时 10 个小时,可获得超过 4-6 亿的碱基数据,得到 100 万个序列读长,成本大大降低,且测序结果一致性超过 99.99%。目前其序列读长已超过 400nt,单一序列读长的准确性超过 99%。由于对肠道微生物群落分类一般是通过扩增细菌 16s rDNA 某个区来测序,PCR 产物长度大都超过 200bp,而 454 测序技术平台是目前唯一测序长度超过 200bp 的高通量测序技术,成为研究微生物基因组深度测序的最佳选择。

作者简介 李芝,女,硕士研究生,电话:13698774010,

E-mail: 33261460@qq.com

(收稿日期 2011-08-29 接受日期 2011-09-24)

2 人体肠道微生态系统

人体肠道微生态系统是人体最庞大、最复杂、最重要的微生态系统, 栖息着细菌约有 1 000 ~1 150 种, 其中 160 种为优势菌种, 基因数约是人体自身基因的 150 倍^[3]。目前已经认识的肠道种群至少包括 9 个门细菌、40 个菌属及 400-500 个菌种。人体肠道菌群在肠腔内形成 3 个生物层: 深层紧贴黏膜表面并与黏膜上皮细胞粘连形成细菌生物膜, 该菌群称为膜菌群, 主要由双歧杆菌和乳酸杆菌组成, 这两类菌是肠共生菌, 是肠道菌中最具生理意义的两种细菌, 对机体有益无害; 中层为粪杆菌、消化链球菌、韦荣球菌和优杆菌等厌氧菌; 表层的细菌可游动称为腔菌群, 主要是大肠埃希、肠球菌等好氧和兼性好氧菌。它们与宿主环境形成相互依赖、相互制约的统一体。在正常生理情况下, 主要表现为有益于宿主的微生物群落, 但在病理情况下, 也可能表现为对宿主有害的微生物群落。

肠道微生物受遗传因素、生活方式、环境等诸多因素影响, 参与人体的许多基本生理活动, 在维持肠道正常结构和生理功能、拮抗病原微生物定值、调节人体免疫功能等方面发挥了重要作用, 大量研究表明人体肠道微生物与肥胖、糖尿病、癌症等疾病密切相关。由于传统研究方法局限, 远远满足不了对微生物进行大规模的研究, 近年来随着新一代高通量测序的不断发展和应用, 使得能够在更高更复杂的层次上揭示了肠道微生物与人体健康及疾病的关系。

3 454 测序技术在研究肠道微生物与人体健康及疾病中的应用

对肠道微生物的认识, 很大程度上依赖于研究手段, 既往研究表明: 培养法只能检出胃肠道菌群中 20%~30% 的细菌^[4-5], 提示以培养技术为基础研究微生物菌群的复杂性和基因多态性具有严重偏差。随着基因组学和现代分子生物技术的飞速发展, 肠道微生物的研究已经迈入一个新的阶段, 以 454 测序技术为代表的高通量测序技术使人类可以更清晰地研究和了解人体微生物菌群的复杂性和基因多态性。

3.1 454 测序技术应用于人体正常菌群的研究

研究人体正常菌群的, 目的是为了了解分析人类肠道中的微生物群落在特定空间中的分布、组成、生理生化特征、功能、彼此间的关系及它们与环境间的相互关系的, 最终目的为后续研究肠道微生物与人的肥胖、肠炎等疾病的关系提供重要的理论依据。2010 年 欧盟资助的人类肠道元基因组计划进行了迄今最大的肠道细菌基因研究, 目的是研究人类肠道中的所有微生物群落, 进而了解人类肠道中细菌的物种分布, 最终为后续研究肠道微生物与人的肥胖、肠炎等疾病的关系提供重要的理论依据^[6]。目前, 英、美、法、中等国科学家正在酝酿成立国际人类微生物组研究联盟(IHMC), 旨在对国际人类微生物组研究进行全面的协调^[7]。

3.2 454 测序技术在研究肠道微生物与疾病中的应用

3.2.1 肠道微生物与肥胖 传统观点认为, 肠道微生物与人类结成共生关系, 在漫长的进化过程中形成互利的利益组合体, 参与和辅助人类的能量代谢。肥胖作为一种长期能量失衡的结果, 其产生也可能与肠道微生物有关。2009 年, TURNBAUGH 等^[8]通过 454 测序技术研究了同卵双生和异卵双生成年女性及

其母亲的粪便微生物群落, 双生子在肥胖或瘦的表型上一致。他们分析了来源于 154 个个体的 9920 个细菌全长 16S rRNA 序列, 1937461 个部分 16S rRNA 序列, 以及 2.14G 体内微生物细菌基因组, 发现家庭成员之间共享肠道微生物种群, 存在大量的共享微生物基因组, 但是每个个体的肠道微生物群落在特定的细菌谱系之间存在差异。研究人员发现, 与瘦型志愿者相比, 肥胖者体内拟杆菌门比例降低($P=0.003$), 放线菌门比例升高($P=0.002$)。肥胖者肠道微生物富含基因中 75% 来源于放线菌(瘦型志愿者体内为 0%), 25% 来源于硬壁菌门。瘦型志愿者肠道微生物富含基因中 42% 来源于拟杆菌门(肥胖者体内为 0%)。基因功能注释研究发现, 许多基因与碳水化合物、脂质、氨基酸的代谢有关, 它们在一起构成了肥胖者肠道微生物标记的初始设置。研究人员还发现, 肥胖者肠道微生物多样性降低, 助长了异常的能量输入, 并且微生物处理碳水化合物的磷酸转移酶系统较瘦型志愿者更为富集。可见, 微生物群落中门类别的改变、细菌多样性的降低以及代谢途径改变均与肥胖相关。这些结果表明, 生物有机体组成的多样性可以在功能水平形成一个核心微生物群落, 这一核心的差异与不同的生理学状态(如肥胖和瘦)有关。

Jumpertz^[9]等为研究肠道菌群与膳食能量获取效率有无关系, 采用焦磷酸测序技术对膳食控制的 12 名瘦人和 9 名胖人的粪便检测, 研究结果表明营养负荷是一个关键的变量, 它可以在很短的时间尺度影响肠道(粪)细菌群落结构。此外, 观察肠道微生物和营养物质的吸收, 表明在人体肠道菌群调节营养收获可能发挥的作用。

3.2.2 肠道微生物与糖尿病 糖尿病是常见病和多发病, 其发病率正随着人们生活水平的提高, 人口老化和生活方式的改变而显著增加。糖尿病不是单一病因所致的单一疾病, 而是复合病因的综合征, 与遗传、自身免疫及环境因素有关。越来越多的研究显示, 肠道微生物与糖尿病存在着密切的关系, 近年来亦采用高通量测序技术对肠道微生物与糖尿病之间的关系进行分析。I 型糖尿病, 又名胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)或者青少年糖尿病, 是由一种胰岛素细胞被破坏的自身免疫性疾病, 该病及其动物模型的发病机制已经研究得较为透彻。在过去几十年里, I 型糖尿病在发达国家的发生率显著增加, Giongo 等为研究 I 型糖尿病与自身免疫性肠道菌群是否存在联系, 通过对 8 个小孩粪便菌群 16SrRNA 相应区域进行 454 测序技术分析, 结果提示通过对微生物检测可用于 I 型糖尿病的早期诊断^[10]。II 型糖尿病, 又名非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)或者成年糖尿病, 特点是人体自身能够产生胰岛素, 但细胞无法对其做出反应。其发病原因在于血液循环系统和肝脏的代谢异常, 导致细胞膜上接受胰岛素的受体(酪氨酸受体)发生病变, 影响到胰岛素发挥作用。Larsen 等^[11]采用 qPCR 及对 16SrRNA 的 V4 区域进行编码焦磷酸测序对 18 个 4 健康成年男性及 18 个 II 糖尿病患者粪便菌群分析发现, 与健康成年人相比, 糖尿病患者肠道厚壁杆菌低, 而拟杆菌及变形杆菌较健康人群高。

3.2.3 肠道微生物与肠道疾病的研究 运用 454 测序技术分析肠道菌群与肠道疾病的研究是近年来研究的热点。既往大量研究证明, 肠道微生物与大肠癌发生发展有关, 采用 454 测序技术在更深更复杂层次上分析了肠道微生物与大肠癌的关系。

Grahn Niclas 等^[12]通过采用 454 测序技术对 77 个大肠癌活检标本中幽门螺杆菌的 16S rDNA 可变 V3 区进行测序, 测序结果显示 :77 个标本中有 21 个(27%)检测到幽门螺杆菌 DNA 序列, 同时确定了 16S rDNA 序列最常见的 2 种幽门螺杆菌(*H. pylori* 26695 和 *H. pylori* J99), 从癌组织角度揭示了幽门螺杆菌可能是引发大肠癌的重要病原菌。Wang T 等^[13]采用 454 焦磷酸测序对 56 位健康志愿者及 46 位结肠直肠癌患者粪便菌群 16SrRNA 的 V3 区域测序发现结肠癌患者与健康人群相比, 脆弱类杆菌多, 而普通类杆菌及同行类杆菌少。肠易激综合征是一种功能性肠紊乱性的疾病, 其症状主要为腹部不适并有排便功能紊乱。流行病学相关研究显示至少一部分 IBS 患者的发病与肠道菌群紊乱有关, 为更深一步研究肠道微生物与肠易激综合征的关系, Saulnier^[14]等采用 454 测序技术对 22 名健康儿童及 22 名小儿肠易激综合征患者检测, 发现在小儿肠易激综合征患者肠道中变形杆菌纲比例显著提高, 并且在 IBS 组中副流感嗜血杆菌比较突出, 这些方法可用于儿科患者中的功能性肠道疾病的诊断。

3.2.4 肠道微生物与其它疾病的研究 由于 454 测序技术较传统测序方法测序能力相对更深能完全覆盖微生物群落, 对罕见的少数肠道微生物可以发现。Palacios 等^[15]采用 454 测序技术检验移植器官中发现新型的致死病毒, 接受器官移植的 3 位病人均在手术几周后去世。这些器官来自同一个捐献者, 采用传统的方法(体外培养、PCR、寡核苷酸芯片等)无法检测出病因, 而用 GS 系统检测了从捐献者的肺和肾脏中获取的 RNA, 在得到的 103 632 个序列里找到 14 个与淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (lymphocytic meningitis virus, LCMV) 相似的序列, 随后的 PCR 结果证实捐献的器官中有沙粒序列的病毒。454 测序技术亦用于微生物全基因组的测定, Kennemann 等^[16]为研究人类感染中幽门螺杆菌的进化通过采用 454 测序技术对 5 株幽门螺杆菌菌株进行全基因组测序, 结果表明在混合感染情况下幽门螺杆菌基因组是稳定的。454 测序技术同样使用研究肠道微生物与其他疾病的研究如酒精性肝病、坏死性肠炎、高胆固醇等人体疾病的研究^[17-19]。

4 结语

由上可知, 454 测序技术完全契合肠道微生态研究的要求并且已经得到较为广泛运用, 并受到越来越多研究者的关注。当然, 454 测序同样存在着缺点, 一方面 454 测序技术的主要误差来自相同碱基的连续掺入, 由于没有终止元件来阻止连续掺入, 相同碱基的长度只能从信号强度中推断出来, 这个过程可能产生误差。因此, 454 平台的主要错误类型是插入 / 缺失, 而不是替换。另一方面, 454 测序技术费用由于过于昂贵, 限制了其快速发展。但新的测序技术的开发竞赛还在继续, 更快捷、更便宜、更准确的测序技术层出不穷, 每一项新技术的出现都有超过前代产品的独特之处, 测序技术的持续发展将推动技术进步和成本的进一步下降, 相信在不久的将来, 随着测序技术的更进一步发展, 454 测序技术必将成为临床常规检验技术, 并被不断普及, 在临床诊疗上发挥更大的作用。

参考文献(References)

[1] Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in mi-

crofabricated high-density picolitre reactors [J]. Nature, 2005 (437): 376-380

[2] Rothberg JM, Leamon JH. The development and impact of 454 sequencing [J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(10):1117-1124

[3] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature, 2010, 464(4):59-67

[4] Guarner F, Malagelada R. Gut flora in health and disease [J]. Lancet, 2003, 361(9356):512-519

[5] Rondon MR, August PR, Bettermann AD, et al. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(6):2541-2547

[6] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature, 2010, 464(7285):59-68

[7] 孙玮. 赵立平专访: 人类微生物组研究, 解密人体第二基因组 [N]. 科学时报, 2008

Sun W. Zhao Li-ping Interview: Human microbiome research, decrypt the second human genome [N]. Science Times, 2008

[8] Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunami T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins [J]. Nature, 2009, 457(7228):480-486

[9] Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans [J]. Am J Clin Nutr, 2011, 94(1):58-65

[10] Giongo A, Gano KA, Crabb DB, et al. Toward defining tautoimmune microbiome for type I diabetes [J]. International Society for Microbial Ecology, 2011, 5(1):82-91

[11] Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults [J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9085

[12] Grahn N, Hmani-Aifa M, Fransén K, et al. Molecular identification of Helicobacter DNA present in human colorectal adenocarcinomas by 16S rDNA PCR amplification and pyrosequencing analysis [J]. Journal of Medical Microbiology, 2005, 54:1031-1035

[13] Wang T, Cai G, Qiu Y, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers [J]. ISME Journal, 2011, published online 18 August

[14] Saulnier DM, Riehle K, Mistretta TA, Diaz MA, et al. Gastrointestinal Microbiome Signatures Of Pediatric Patients With Irritable Bowel Syndrome [J]. Gastroenterology, 2011, 141(5):1782-1791

[15] Palacios G, Druce J, Du L, et al. A new arena virus in a cluster of fatal transplant associated diseases [J]. N Engl J Med, 2008, 358 (10): 991-998

[16] Kennemann L, Didelot X, Aebischer T, et al. Helicobacter pylori genome evolution during human infection [J]. PNAS, 2011, 108(12):5033-5038

[17] Yan AW, E Fouts D, Brandl J, et al. Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease [J]. Hepatology, 2011, 53(1): 96-105

[18] Carlisle EM, Poroyko V, Caplan MS, et al. Gram negative bacteria are associated with the early stages of necrotizing enterocolitis [J]. PLoS One, 2011, 6(3): e18084

[19] Bailey MT, Walton JC, Dowd SE, et al. Photoperiod Modulates Gut Bacteria Composition in Male Siberian Hamsters (*Phodopus sungorus*) [J]. Brain Behav Immun, 2009, 24(4): 577-584